

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

**Avaliação do perfil transcricional de *Trichophyton rubrum* co-cultivado com queratinócitos humanos HaCat utilizando RNA-Seq.**

MESTRANDA : Monise Fazolin Petrucelli  
ORIENTADORA: Profa. Dra. Ana Lúcia Fachin Saltoratto

RIBEIRÃO PRETO- SP  
2017

Mestranda: Monise Fazolin Petrucelli

AVALIAÇÃO DO PERFIL TRANSCRICIONAL DE *Trichophyton rubrum*  
CO-CULTIVADO COM QUERATINÓCITOS HUMANOS HaCat  
UTILIZANDO RNA-SEQ.

Dissertação de mestrado  
apresentada à Universidade de  
Ribeirão Preto UNAERP, como  
requisito para obtenção do título  
de Mestre em Biotecnologia.

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

Ribeirão Preto

2017

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

- Universidade de Ribeirão Preto -

P498a Petrucelli, Monise Fazolin, 1991-  
Avaliação do perfil transcricional de *Trichophyton rubrum*  
co-cultivado com queratinócitos humanos HaCat utilizando RNA-  
Seq / Monise Fazolin Petrucelli. - - Ribeirão Preto, 2017.  
97 f.: il. color.

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

Dissertação (mestrado) - Universidade de Ribeirão Preto,  
UNAERP, Biotecnologia aplicada à saúde. Ribeirão Preto, 2017.

1. Co-cultivo. 2. Dermatófitos. 3. Dermatomicoses. I. Título.

CDD 660.6

**MONISE FAZOLIN PETRUCELLI**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL TRANSCRICIONAL DE *TRYCHOPHYTON RUBRUM*  
CO-CULTIVADO COM QUERATINÓCITOS HUMANOS HACAT UTILIZANDO  
RNA-SEQ**

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: 28 de agosto de 2017

Resultado: Aprovada

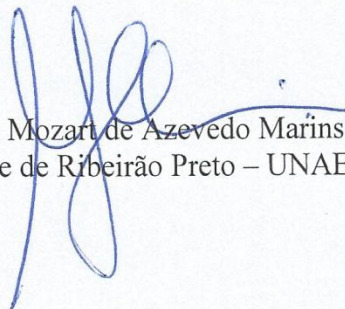
**BANCA EXAMINADORA**



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



Profa. Dra. Marcia Regina von Zeska Kress  
Consultor Científico Vector Control/USP



Prof. Dr. Mozart de Azevedo Marins  
Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP

**RIBEIRÃO PRETO  
2017**

## **AGRADECIMENTOS**

*Primeiramente a Deus por permitir a realização desta conquista.*

*Aos meus pais por todo o apoio, carinho e incentivo em todos os momentos e que foram fundamentais para que eu pudesse acreditar e vencer as etapas de maiores dificuldades.*

*À minha orientadora, Prof. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia por todo o ensinamento proporcionado que contribuíram tanto para meu desenvolvimento pessoal e profissional além do apoio, incentivo, amizade e confiança depositada em mim para a realização deste trabalho.*

*Ao Prof.Dr. Mozart Marins pelos conselhos e discussões que também nos auxiliaram durante a execução deste projeto.*

*À colaboração oferecida pelo Prof. Dr. Wilson e pela técnica Kamila Peroni do Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática do Hemocentro de Ribeirão Preto para a realização do sequenciamento e ao Prof. Dr. Pablo do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP pela colaboração e orientação nas análises de bioinformática.*

*À doutoranda Tatiana Komoto pela amizade e auxílio nas execuções dos experimentos, principalmente nas etapas mais difíceis e 'empacadas' em que me ajudou a superar.*

*À doutoranda Josie Budag pela amizade, conversas, apoio e por termos acreditado juntas que este projeto era possível.*

*A todos os demais colegas de laboratório e da Unidade de Biotecnologia pela amizade, convivência e ajuda durante esses anos e que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.*

*À UNAERP e em especial ao Laboratório GMB pela infraestrutura fornecida e equipamentos utilizados durante os experimentos.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado e apoio financeiro aos estudos.*

*E a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo investimento financeiro dado ao projeto de pesquisa.*

## RESUMO

Os dermatófitos, como o fungo *T. rubrum*, são considerados os maiores causadores de infecções fúngicas de pele, cabelos e unhas, pois utilizam substratos queratinizados como seus principais nutrientes. Além disso, estas infecções também acometem pacientes imunocomprometidos e diabéticos, podendo se comportar de maneira invasiva ocasionando infecções graves. Apesar da importância de *T. rubrum* o processo de interação do fungo com o hospedeiro humano não é bem compreendido do ponto de vista celular e molecular. Para entender a complexa interação dos genes fúngicos e humanos durante o processo infeccioso é necessário utilizar a técnica de RNAseq, pois atualmente é ferramenta molecular mais eficaz que permite a análise concomitante de expressão gênica e diferenciação dos dois tipos celulares através de programas de análise. Dessa forma, o presente estudo teve por objetivo avaliar o perfil transcricional de genes humanos e fúngicos simultaneamente por RNA-Seq através do modelo de infecção *in vitro* de *T. rubrum* co-cultivado em linhagem de queratinócitos humanos HaCat. Para isso, conídios pré-germinados de *T. rubrum* foram co-cultivados com queratinócitos humanos HaCat por 24 horas e após, os RNAs extraídos do co-cultivo, controle de células na ausência do fungo e controle de *T. rubrum* isolado foram sequenciados por RNAseq. Como resultado do sequenciamento obteve-se em média 32 milhões de *reads* para o controle de *T. rubrum* isolado, 26 milhões para o co-cultivo e 40 milhões para o controle de células que foram filtradas e alinhadas com os respectivos genomas de referência utilizando-se os softwares *FastQC* e *Bowtie2*. A expressão diferencial dos genes no co-cultivo em relação aos controles de *T. rubrum* e queratinócitos não infectados foi determinada através do pacote *DESeq/Bioconductor* sendo identificados 369 genes de HaCat e 70 genes de *T. rubrum* diferencialmente expressos em 24h de co-cultivo. Estes genes foram classificados e agrupados em categorias de acordo com suas funcionalidades, das quais foram selecionadas as categorias referentes a processos metabólicos, ao transporte via membrana, a patogenicidade, ao ciclo do glioxilato, estabelecimento da barreira epidermal, resposta de defesa à outros organismos, regulação na produção de citocinas, regulação da migração epitelial e resposta à lesões. Dessa forma, sugerimos que esses processos, evidenciados pela técnica de RNA seq, são os mais relevantes

para compreender os mecanismos moleculares envolvidos na relação entre *T. rubrum* e a célula de queratinócitos humana.

**Palavras- Chaves:** Co- cultivo. Dermatófitos. Dermatomicoses. Rna-Seq. *T. rubrum*.

## ABSTRACT

Dermatophytes, such as the fungus *T. rubrum*, are considered the major cause of fungal infections of the skin, hair and nails, since they use keratinized substrates as their main nutrients. In addition, these infections also affect immunocompromised and diabetic patients, causing serious infections. Despite the importance of *T. rubrum*, the interaction process of the fungus with the human host is not well understood from a cellular and molecular point of view. To understand the complex interaction of fungal and human genes during the infectious process, it is necessary to use the RNAseq technique, since it is the only molecular tool that allows the concomitant analysis of gene expression and differentiation of the two cell types through analysis programs. Thus, the present study aimed to evaluate the transcriptional profile of human and fungal genes simultaneously by RNA-Seq through the *in vitro* infection model of *T. rubrum* co-cultured in HaCat human keratinocyte cells line. For this, pre-germinated conidia of *T. rubrum* were co-cultured with human keratinocytes HaCat for 24 hours and after, the RNA of both was sequenced by RNAseq. As a result of sequencing, 32 million reads were obtained for fungal control, 26 million for co-cultivation and 40 million for control of keratinocyte cells that were filtered and aligned with their respective reference genomes using FastQC and Bowtie2 software. Differential expression of the genes in the co-cultivation relative to the controls of *T. rubrum* and uninfected keratinocytes was determined through the DESeq / Bioconductor package and 369 HaCat genes and 70 differentially expressed *T. rubrum* genes were identified in 24 h of co-culture. These genes were classified and grouped into categories according to their functionalities, from which were chosen the categories referring to metabolic processes, membrane transport, pathogenicity, the glyoxylate cycle, establishment of the epidermal barrier, defense response to other organisms, regulation of cytokine production, regulation of epithelial migration and response to lesions. Thus, we suggest that these processes, evidenced by the technique of RNA seq, are the most relevant to understand the molecular mechanisms involved in the relationship between *T. rubrum* and the human keratinocyte cell.

**Keywords:** Co- cultivation. Dermatophytes. Dermatomycoses. Rna-Seq, *T. rubrum*.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Características macroscópicas do dermatófito <i>T. rubrum</i> .....	15
<b>Figura 2:</b> Características microscópicas do dermatófito <i>T. rubrum</i> .....	15
<b>Figura 3:</b> Estágios principais do processo infeccioso das dermatofitoses.....	17
<b>Figura 4:</b> Modulação das proteínas secretadas pelos dermatófitos em resposta às mudanças de pH no tecido hospedeiro.....	20
<b>Figura 5:</b> Gráficos obtidos por análise por Bioanalyzer para avaliar a integridade do RNA das amostras .....	38
<b>Figura 6</b> Gel virtual com as bandas pertencentes ao RNA fúngico e da célula no co-cultivo.....	40
<b>Figura 7:</b> Gráficos com os tamanhos das bibliotecas de cDNA geradas por bioanalyzer.....	41
<b>Figura 8:</b> Distribuição dos genes de queratinócitos humanos HaCat e <i>T. rubrum</i> modulados em 24 horas de co-cultivo.....	44
<b>Figura 9:</b> Categorização funcional dos genes de <i>T. rubrum</i> diferencialmente expressos em resposta ao co-cultivo com queratinócitos humanos por 24 horas....	46
<b>Figura 10:</b> Representação esquemática da via do ciclo do glioxilato e do ácido tricarbóxico em fungos .....	53
<b>Figura 11:</b> Categorização funcional dos genes de queratinócitos humanos HaCat diferencialmente expressos em resposta ao co-cultivo com <i>T. rubrum</i> por 24 horas .....	56
<b>Figura 12:</b> Comparativo entre as modulações dos genes humanos e fúngicos pelas técnicas de RNA seq e qPCR e o coeficiente de correlação (r).....	71

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a validação dos genes fúngicos e humanos por <i>Real Time PCR</i> .....	35
<b>Tabela 2:</b> Análise de pureza dos RNAs obtidos.....	37
<b>Tabela 3:</b> Quantidade de <i>reads</i> alinhadas com os genomas de referência para <i>Homo Sapiens</i> (HG19) e <i>T. rubrum</i> (CBS).....	43
<b>Tabela 4:</b> Genes relacionados com a patogenicidade.....	48
<b>Tabela 5:</b> Genes relacionados com o transporte via membrana.....	49
<b>Tabela 6:</b> Genes relacionados com o ciclo do glioxilato.....	51
<b>Tabela 7:</b> Genes relacionados com processos metabólicos.....	54
<b>Tabela 8:</b> Genes relacionados com a resposta de defesa do hospedeiro a outros organismos.....	57
<b>Tabela 9:</b> Genes relacionados com a produção e regulação de citocinas.....	61
<b>Tabela 10:</b> Genes relacionados com o estabelecimento da barreira da epiderme...	63
<b>Tabela 11:</b> Genes relacionados com a migração de células epiteliais.....	66
<b>Tabela 12:</b> Genes relacionados com resposta às lesões.....	68
<b>Tabela 13:</b> Valores de expressão gênica por RNA seq e qPCR dos 14 genes selecionados para validação.....	70

## SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO .....	13
1.1 Dermatofitoses e dermatófitos.....	13
1.2 <i>Trichophyton rubrum</i> .....	14
1.3 Mecanismos gerais da infecção na relação dermatófito- hospedeiro.....	16
1.3.1 Contato inicial do patógeno ao tecido hospedeiro .....	17
1.3.2 Adesão do patógeno ao hospedeiro.....	18
1.3.3 Invasão e penetração no tecido do hospedeiro .....	19
1.3.4 Desencadeamento da resposta imune no hospedeiro.....	20
1.4 RNA-Seq: uma nova ferramenta para análises de transcriptomas e expressão gênica.....	25
II. OBJETIVOS.....	26
2.1. Objetivo Geral .....	26
2.2. Objetivos Específicos .....	26
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1. Linhagens utilizadas.....	27
3.2. Padronização do Co-cultivo de <i>T. rubrum</i> em linhagem de queratinócitos humanos HaCat.....	27
3.2.1. Preparação de queratinócitos HaCat.....	27
3.2.2. Preparação da suspensão de conídios de <i>T. rubrum</i> .....	28
3.2.3. Co-cultivo da linhagem HaCat e <i>T. rubrum</i> .....	28
3.2.4. Coleta do co-cultivo de <i>T. rubrum</i> em células HaCat.....	29
3.3. Extração de RNA total.....	29
3.4. Construção de bibliotecas de cDNA para sequenciamento por RNAseq .....	29
3.5. Sequenciamento por RNAseq .....	31
3.6 Análises dos dados obtidos pelo sequenciamento por RNAseq .....	31
3.7 Síntese de cDNA para validação por qPCR .....	32
3.8 Validação dos genes humanos e fúngicos diferencialmente expressos por PCR quantitativo. ....	33

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	37
4.1 Extração, análise da pureza e integridade do RNA total.....	37
4.2 Validação das bibliotecas de cDNA para sequenciamento por RNAseq.....	40
4.3 Análise da qualidade do sequenciamento e mapeamento das <i>reads</i> .....	42
4.4 Análise do perfil transcricional dos genes humanos e fúngicos diferencialmente expressos .....	43
4.5 CATEGORIZAÇÃO FUNCIONAL DOS GENES DE <i>T. rubrum</i> DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM RESPOSTA AO CO-CULTIVO COM QUERATINÓCITOS HACAT.....	45
4.5.1 Genes relacionados com a patogenicidade .....	47
4.5.2 Genes relacionados com o transporte via membrana.....	48
4.5.3 Genes relacionados com o ciclo do glioxilato .....	51
4.5.4 Genes relacionados com processos metabólicos .....	54
4.6 CATEGORIZAÇÃO FUNCIONAL DOS GENES DE QUERATINÓCITOS HUMANOS HACAT DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM RESPOSTA AO CO-CULTIVO COM <i>T. rubrum</i> .....	55
4.6.1 Genes relacionados com a resposta de defesa humana a micro-organismos.....	57
4.6.2 Genes relacionados com a produção e regulação de citocinas .....	61
4.6.3 Genes relacionados com o estabelecimento da barreira epidérmica .....	63
4.6.4 Genes relacionados com a migração de células epiteliais .....	65
4.6.5 Genes relacionados com resposta às lesões teciduais.....	68
4.7 VALIDAÇÃO DE ALGUNS GENES DO TRANSCRIPTOMA HUMANO E FUNGICO POR PCR QUANTITATIVO.....	70
V. CONCLUSÃO .....	71
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXOS .....	83

## I. INTRODUÇÃO

### 1.1 Dermatofitoses e dermatófitos

Dermatofitoses são infecções de caráter superficial de tecidos queratinizados causadas por um grupo de fungos filamentosos denominados de dermatófitos, que utilizam a queratina presente nestes tecidos como fonte de nutrição em um processo infeccioso (PERES et al., 2010; ACHTERMAN; WHITE, 2012). Segundo Hube et al. (2015), dados da Organização Mundial da Saúde demonstram que 20% da população mundial apresenta infecções cutâneas causadas por fungos.

As dermatofitoses são clinicamente denominadas de *tineas* seguidas de seu local anatômico acometido, como por exemplo, *tinea pedis*, *tinea corporis*, *tinea capitis* e *tinea unguium* para infecções de pé, corpo, cabelos e unhas respectivamente (ACHTERMAN; WHITE., 2012; NENOFF et al., 2014). A transmissão dessas doenças ocorre através do contato direto com animais ou pessoas infectadas ou indiretamente, quando há o contato com objetos que estejam contaminados (PERES et al., 2010).

Os sintomas podem ser variados de acordo com o estado imunológico do hospedeiro, e geralmente essas infecções não acometem tecidos subcutâneos ou órgãos internos. As lesões são de aspecto circular, eritematoso e pruriginoso causadas pela ação direta do fungo ou por reações de hipersensibilidade ao micro-organismo ou aos seus produtos metabólicos secretados (PERES et al., 2010). Nas onicomicoses (infecções de unha) pode ocorrer o descolamento das bordas, aparecimento de manchas brancas e em casos mais severos, a distrofia total das unhas (PERES et al., 2010; HUBE et al., 2015). Apesar de estas infecções estarem restritas as camadas superficiais da epiderme e raramente serem associadas com mortalidade, elas podem se comportar de maneira invasiva e causar infecção disseminada e profunda em pacientes imunocomprometidos (PERES et al., 2010; ACHTERMAN; WHITE, 2012).

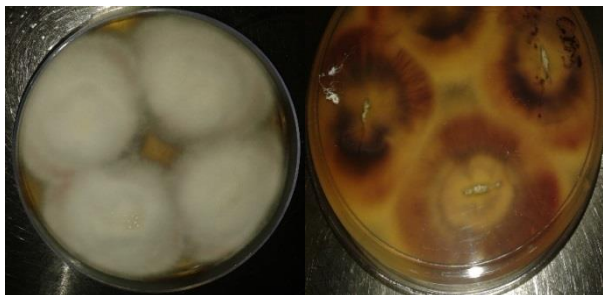
Os fungos causadores das dermatofitoses estão atualmente distribuídos em sete gêneros de acordo com a morfologia de seus macro e micro- conídios e características de reprodução em *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*, *Nannizzia*, *Lophophyton*, *Arthroderma* e *Paraphyton* (HOOG et al., 2016). Além disso, os dermatófitos também podem ser classificados de acordo com seu *habitat* natural de desenvolvimento: antropofílicos, zoofílicos e geofílicos. A maioria das dermatofitoses humanas são causadas por espécies antropofílicas, mas não exclusivamente por esta espécie, já que dermatófitos zoofílicos e geofílicos também podem transmitir a doença para humanos (PERES et al., 2010; BALDO et al., 2011; ACHTERMAN; WHITE, 2012).

As dermatofitoses em geral, são causadas majoritariamente por apenas cinco ou seis espécies de todos os dermatófitos existentes, sendo que destes o *T. rubrum* é considerado o maior causador de infecção em humanos em todo o mundo (LENG et al., 2009; NENOFF et al., 2013; FIRAT et al., 2014; HUBE et al., 2015). Conforme cita Hube et al.(2015), o dermatófito *T. rubrum* é responsável por aproximadamente 69,5% de todas as dermatofitoses causadas pela espécie *Trichophyton*, seguidas de *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton verrucosum* e *Trichophyton tonsurans*.

## **1.2 *Trichophyton rubrum***

O gênero *Trichophyton* inclui um total de 24 espécies, sendo que destas, a espécie *T. rubrum* é responsável pela maior ocorrência de dermatofitoses em todo o mundo, principalmente na Europa. Suas colônias são caracterizadas por apresentar coloração branca de aspecto cotonoso, aveludado e macio. A denominação *rubrum* refere-se à pigmentação encontrada no verso de suas colônias que varia do vermelho ao marrom (Fig. 1) (LAKSHMIPATHY; KANNABIRAN, 2010; NENOFF, et al., 2013).

**Figura 1-**Características macroscópicas do dermatófito *T. rubrum*



**Fonte:** Arquivo pessoal

Microscopicamente, apresenta como característica esporos do tipo microconídios e algumas vezes macroconídios com paredes lisas e de forma alongada dispostos ao longo de suas hifas (Fig.2) (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; LAKSHMIPATHY; KANNABIRAN, 2010).

**Figura 2-** Características microscópicas do dermatófito *T. rubrum*



**Fonte:** <http://www.micropia.nl>

Através de avaliações morfológicas e sequenciamento da região ITS (Internal Transcribed Spacer) do RNA ribossomal de *T. rubrum*, o Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), localizado na Holanda, selecionou a linhagem CBS 118892 para o sequenciamento de seu genoma pelo Broad Institute, localizado nos Estados Unidos, em 2010 (ACHTERMAN et al., 2011), o que possibilitou o surgimento de novos estudos moleculares para melhor compreensão das dermatofitoses causadas por este fungo. Além deste, também foram sequenciados os genomas de *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton equinum*, *Microsporum canis* e *Microsporum gypseum* (ACHTERMAN et al., 2011).

### 1.3 Mecanismos gerais da infecção na relação dermatófito- hospedeiro

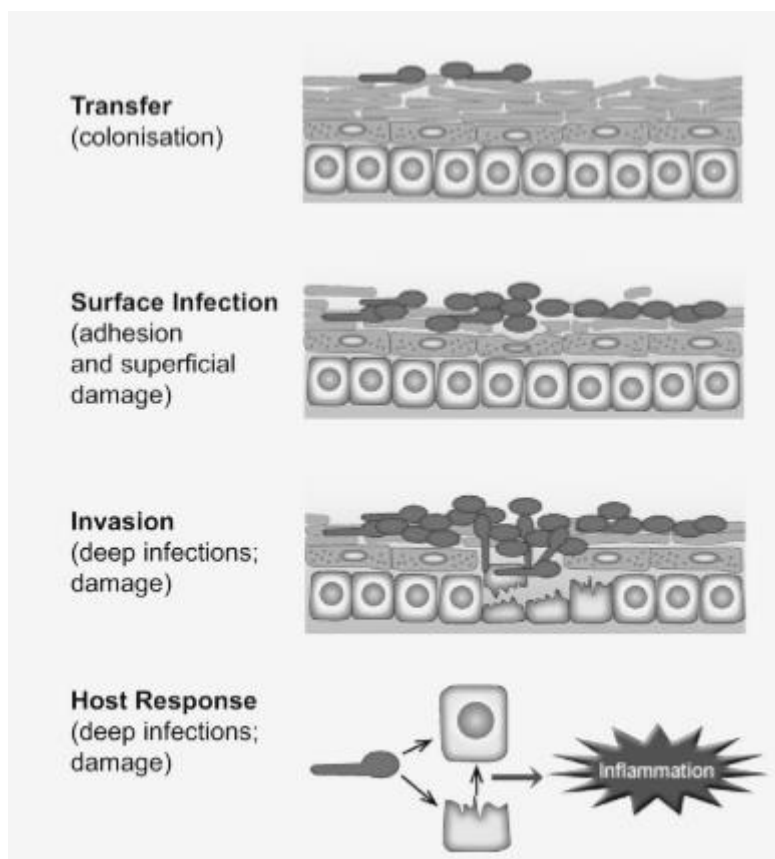
O processo infeccioso das dermatofitoses superficiais ocorre de forma similar entre os diversos tipos de dermatófitos, sendo característicos quatro estágios durante este processo (Fig.3).

- Contato inicial do patógeno com o tecido ou mucosa a ser infectado;
- Aderência do patógeno ao tecido ou mucosa através de proteínas de adesão seguido da proliferação e colonização;
- Invasão ao tecido por endocitose ou penetração;
- Desencadeamento da resposta imune do hospedeiro

Apesar do mecanismo geral de infecção dos dermatófitos ocorrer de forma similar entre as espécies, a forma pela qual cada espécie irá interagir, se adaptar e modular as respostas imunológicas do hospedeiro irá variar entre as espécies (HUBE et al., 2015). Conforme cita Huang et al. (2015), o dermatófito *T. rubrum* é capaz de modular a resposta imune inata da célula hospedeira ocasionando o não reconhecimento do patógeno pelo sistema de defesa celular, diminuindo a resposta imunológica da célula contra o dermatófito facilitando o processo infeccioso.



**Figura 3-** Estágios principais do processo infeccioso das dermatofitoses



**Fonte:** HUBE et al., 2015

### 1.3.1 Contato inicial do patógeno ao tecido hospedeiro

A primeira barreira a ser vencida pelo patógeno para que este entre em contato com o tecido é superar os mecanismos da imunidade inata do hospedeiro para que haja a colonização tecidual. Um dos mecanismos de defesa do hospedeiro para tentar impedir o contato e permanência do patógeno nos tecidos de camadas superficiais é a queratinização, em que as células de queratinócitos renovam o estrato córneo através da descamação epitelial e conseqüentemente eliminam o possível fungo invasor. Para que o fungo não seja eliminado por este processo e consiga se instalar na epiderme é necessário que após sua aderência ao hospedeiro, o artroconídio germine para que a hifa possa penetrar rapidamente no estrato córneo (PERES et al., 2010). Este contato inicial entre o artroconídio e o estrato córneo é fundamental para o início da adesão do micro-organismo ao tecido

e estabelecimento da infecção sendo que esta interação ocorre após 3 a 4 horas de contato (PERES et al., 2010; BALDO et al., 2011).

### 1.3.2 Adesão do patógeno ao hospedeiro

Durante a interação entre o artroconídio e o estrato córneo inicia-se a adesão do fungo ao tecido hospedeiro que é mediada pela interação de proteínas de adesão presentes no fungo denominadas de adesinas, com os receptores pertencentes ao hospedeiro. Entretanto, ainda é escasso o conhecimento sobre quais os fatores que influenciam na aderência e quais são as principais adesinas em dermatófitos (VERMOUT et al., 2008; BALDO et al., 2011; BITENCOURT et al., 2016).

As adesinas são de fundamental importância para a efetiva invasão do fungo ao tecido hospedeiro e conforme cita Bitencourt et al. (2016), a capacidade de adesão de cada dermatófito está associada com maior patogenicidade e virulência do micro-organismo. Além de promover a aderência do fungo ao hospedeiro, as adesinas também participam na formação de biofilmes, desenvolvimento de corpos de frutificação e em alterações morfológicas das colônias (DRANGINIS et al., 2007).

Dermatófitos como *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* expressam na superfície de seus micro conídios adesinas carboidrato-específicas que reconhecem manose e galactose presente nos tecidos. A maioria das adesinas fúngicas é composta por um carboidrato N- terminal ou um domínio de ligação peptídica, um domínio central rico em serina e treonina com tandem repeats e uma região C- terminal (VERMOUT et al., 2008; BALDO et al., 2011; CHINNAPUN, 2015; BITENCOURT et al., 2016).

Conforme relata Vermout et al.(2008), alguns patógenos como *Candida albicans* secretam proteases aspárticas (Saps) que podem estar envolvidas na aderência deste patógeno ao epitélio. Possivelmente a secreção destas proteases por dermatófitos também pode contribuir para a eficiente aderência destes ao hospedeiro. Além desta protease, a dipeptidil-peptidase IV (DppIV) foi identificada em *Trichophyton spp.* e *M. canis* e também pode estar associada ao processo de

adesão. Baldo et al. (2012) também cita a proteína Sub3 como uma das responsáveis pela adesão de dermatófitos.

### **1.3.3 Invasão e penetração no tecido do hospedeiro**

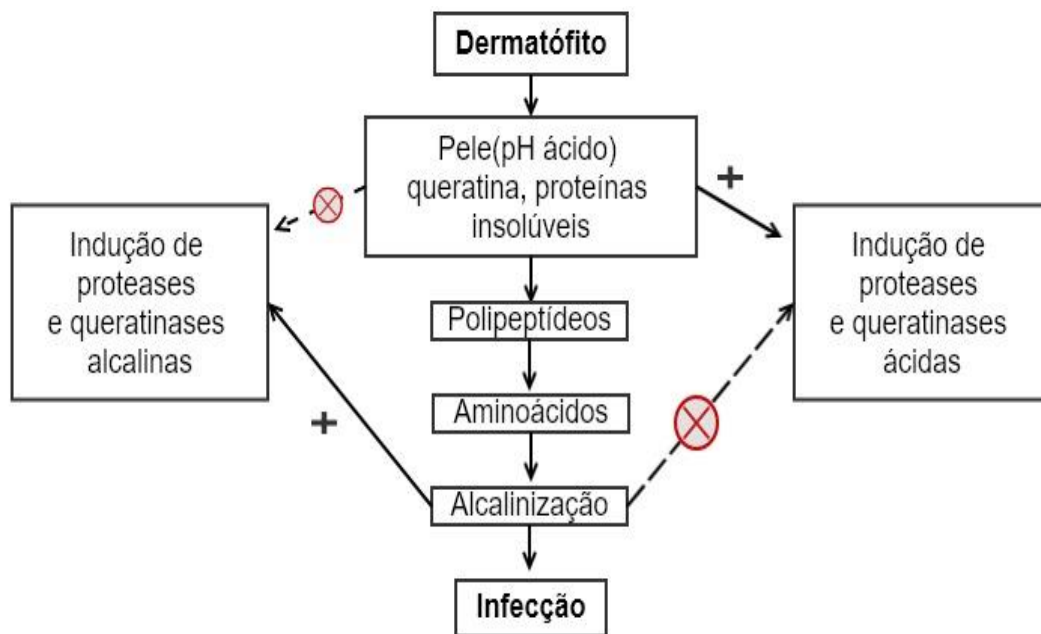
Após a adesão do fungo ao hospedeiro inicia-se a formação do tubo germinativo no artroconídio para que este possa se desenvolver em hifas e penetrar o estrato córneo (BALDO et al., 2011; CHINNAPUN, 2015).

Durante a penetração, os dermatófitos produzem enzimas capazes de degradar tecidos queratinizados como proteases, lipases, elastases, colagenases, fosfatases e esterases, sendo a excreção destas enzimas fundamentais para o processo infeccioso e importante fator de virulência para os dermatófitos (PERES et al., 2010; CHINNAPUN, 2015). Estas enzimas degradam a queratina presente nos tecidos em peptídeos menores e aminoácidos, que são utilizados como fonte de carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre para a nutrição e desenvolvimento do patógeno durante o processo infeccioso (PERES et al., 2010; BALDO et al., 2011; CHINNAPUN, 2015). Para que a degradação das estruturas queratinizadas ocorra de forma efetiva, é necessário a redução das pontes dissulfeto da queratina com a excreção de sulfito pelo dermatófito em condições de pH alcalino ou neutro, sendo este processo chamado de sulfitolise (MONOD, 2008; PERES et al., 2010; KASPEROVA et al., 2014; CHINNAPUN, 2015). A sobrevivência do fungo e a evolução da infecção dependerão do padrão de proteases secretadas pelo fungo, pois além de promover a nutrição do patógeno, também desencadeiam e modulam a resposta imune do hospedeiro. Sendo assim, em pacientes imunocomprometidos a excreção destas proteases pode contribuir para a degradação das camadas mais profundas da pele, como por exemplo, a elastina da derme, gerando infecções de maior gravidade (PERES et al., 2010).

Outro fator de virulência importante é a capacidade que os dermatófitos possuem em modular a expressão de suas proteases de acordo com o pH do hospedeiro. Ao entrar em contato com a pele humana que apresenta pH ácido, o patógeno induz a expressão de proteínas como adesinas, lipases, fosfatases que apresentam atividade ótima em pH ácido favorecendo sua aderência e penetração

no tecido e superando os mecanismos de defesa do hospedeiro (PERES et al.,2010). Conforme estas proteínas degradam os tecidos queratinizados em aminoácidos como a glicina, ocorre a liberação de amônia que promove a alcalinização do meio contribuindo para o dano tecidual e aumento da virulência do dermatófito, que respondendo rapidamente à mudança de pH, passa a reprimir a expressão de proteínas que eram ativas em pH ácido induzindo a expressão de proteases com atividade ótima em pH alcalino (Fig.4). Esta habilidade que os dermatófitos possuem em se adaptar às mudanças de pH favorece a instalação, desenvolvimento e permanência do dermatófito no tecido hospedeiro (MARTINEZ-ROSSI et al., 2011).

**Figura 4-** Modulação das proteínas secretadas pelos dermatófitos em resposta às mudanças de pH no tecido hospedeiro



**Fonte:** Adaptado de PERES et al., 2010

### 1.3.4 Desencadeamento da resposta imune no hospedeiro

A resposta imunológica do hospedeiro ao combate das dermatofitoses irá depender de alguns fatores como: reação do hospedeiro aos metabólitos do fungo, virulência da cepa ou espécie infectante, pois cada espécie de dermatófito varia em

sua capacidade de estimular a resposta imune, o sítio anatômico acometido, já que em casos de *tinea unguim*, por exemplo, o fungo apresenta maior taxa de sobrevivência devido a unha ser um local de difícil acesso para os elementos da resposta imune (HUBE et al., 2015) e características ambientais locais (CRIADO et al., 2011), já que em regiões de clima quente e úmido há a predisposição para doenças de pele como as dermatofitoses (ACHTERMAN; WHITE, 2012)

As dermatofitoses normalmente causam altos níveis de danos ao tecido infectado mais pela reação do hospedeiro ao tentar combater o fungo do que a capacidade deste em causar tal destruição (HUBE et al., 2015). Em geral, as dermatofitoses causadas por *T. rubrum* são de caráter crônico, não inflamatório da pele, de progressão lenta e recorrente, facilitando sua transmissão sugerindo que o fungo tenha se adaptado ao hospedeiro humano (PERES et al., 2010; CRIADO et al., 2011).

Várias células são importantes na resposta imunológica contra as dermatofitoses, como por exemplo, as células de Langerhans (CLs) que atuam como células apresentadoras de antígenos, os fagócitos mononucleares que agem lisando os dermatófitos intra e extracelularmente através da via oxidativa e os leucócitos que ativam o sistema complemento através da exposição aos antígenos do patógeno (CRIADO et al., 2011).

Em adição, os queratinócitos, que anteriormente eram considerados somente como células estruturais da epiderme através da produção de citoqueratinas e de barreira para impedir a entrada de micro-organismos exógenos, verificou-se que eram os principais responsáveis pelo desencadeamento inicial da resposta imune, pois são eles que entram primeiramente em contato com o patógeno durante o processo infeccioso. Os queratinócitos correspondem a aproximadamente 95% das células presentes na epiderme e seu importante papel no reconhecimento inicial do organismo invasor é devido à expressão de receptores do tipo *toll-like* (TLRs) e ligantes de manose presentes em suas membranas. (PIVARCSI et al., 2003; PIVARCSI et al., 2005; CRIADO et al., 2011).

Os receptores *toll like* são receptores de superfície celular importantes na resposta imune inata ou natural, controlando a infecção até que o organismo afetado

possa promover uma resposta antigênica específica (CRIADO et al., 2011). Até o momento, foram identificados 10 TLRs diferentes em humanos responsáveis por reconhecerem antígenos específicos nos patógenos microbianos, sendo que a sinalização para desencadear a resposta imunológica adequada, dependerá de qual TLR o antígeno irá se ligar (CRIADO et al., 2011; RAMNATH et al., 2016).

Dos 11 tipos de receptores *toll like* existentes, os queratinócitos expressam 7 (TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR9). Estes são responsáveis por reconhecer compostos como: peptídeoglicano, ácido lipoteicoico, lipoproteínas bacterianas, RNA dupla fita, lipopolissacarídeos e DNA viral. O TLR2 é considerado o mais importante, pois é capaz de formar homodímeros e heterodímeros com outros receptores TLRs, como é o caso do heterodímero formado entre TLR2/TLR6 responsável por reconhecer fungos patogênicos através do  $\beta$ - 1,3 glucano presente na parede celular fúngica (PIVARCSI et al., 2005). Além deste, foi identificado o aumento da expressão dos TLRs 2 e 4 quando queratinócitos humanos HaCat foram expostos aos conídios de *T. rubrum* (LI et al., 2011).

Criado et al. (2011) também sugere que *T. rubrum* tenha a capacidade de suprimir a expressão de receptores TLRs e células de Langerhans necessárias à estimulação de resposta celular do tipo Th1 (linfócitos T- auxiliares tipo 1 que promovem resposta pró- inflamatória) e estimulando macrófagos da epiderme que promovem resposta tipo Th2 (linfócitos T- auxiliares tipo 2 que promovem resposta anti- inflamatória) sendo esta resposta inadequada ao combate da infecção fúngica e favorecendo a instalação da infecção crônica e extensa por esse dermatófito.

Os queratinócitos também apresentam receptores que se ligam à manose (KcMR) presente na galactomanana da parede celular fúngica (PIVARCSI et al., 2005). Estes receptores medeiam a endocitose de glicoproteínas e estão envolvidos na fagocitose de vários micro-organismos (SZOLNOKY et al., 2001). Além disso, um estudo realizado por Szolnoky et al. (2001), demonstrou a inibição da aderência de *Candida* em células de queratinócitos na presença de manana, sugerindo a expressão do receptor na superfície celular e comprovando a existência deste através de cromatografia de afinidade.

Apesar da importância destes receptores no reconhecimento inicial do micro-organismo invasor, alguns dermatófitos como *T. rubrum* possuem mecanismos de evasão para impedir seu reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro. Um destes mecanismos é a atividade supressora da manana presente em sua parede celular, que nesta espécie de dermatófito é produzida em maior quantidade, sendo capaz de inibir a proliferação de queratinócitos e a resposta linfoproliferativa de leucócitos mononucleares, favorecendo o estabelecimento de infecções crônicas (WAGNER; SOHNLE, 1995; PERES et al., 2010; CRIADO et al., 2011).

A partir do reconhecimento do micro-organismo invasor por receptores de superfície celular do hospedeiro, os queratinócitos produzem amplo espectro de citocinas como fatores de crescimento, interleucinas e fatores estimuladores de colônias de acordo com o patógeno identificado (CRIADO et al., 2011), sendo que na presença de *T. rubrum*, os queratinócitos secretam altos níveis da interleucina IL-8, IL-6, IL-13 (PERES et al., 2010; HAU et al., 2015).

As interleucinas são responsáveis pela ativação e recrutamento de células do sistema imune, como células dendríticas para o local da infecção, atuando também na ativação de neutrófilos, maturação de macrófagos e diferenciação de linfócitos T, além de regular a produção e atividade de outras citocinas com atividade pró ou anti-inflamatória (PIVARCSI et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2011). A regulação na expressão de citocinas é importante, pois quando há a liberação exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, podem ocorrer lesões no órgão-alvo, sendo necessária a expressão de citocinas anti-inflamatórias para que haja um equilíbrio e para minimizar estes efeitos indesejáveis (OLIVEIRA et al., 2011). As citocinas não são expressas constitutivamente, sendo a expressão de seus genes aumentada em situações de infecção (WAGNER; SOHNLE, 1995).

Ademais, outros compostos com atividade antimicrobiana são produzidos pelos queratinócitos como: óxido nítrico,  $\beta$ -defensinas, catelicidinas, RNase7 e antileucoproteases, visando a eliminação do patógeno através da lise de suas membranas ou recrutando leucócitos para o local infectado (PIVARCSI et al., 2005; BECKNELL; SPENCER et al., 2016; RADEMACHER et al., 2016). Em estudos realizados por Firat et al. (2014) mostraram a alta expressão do gene que codifica a RNase7 em queratinócitos quando foram infectados por *T. rubrum*. Esta

ribonuclease possui alta atividade antimicrobiana em humanos e vêm sendo estudada como candidata a novo agente terapêutico contra patógenos resistentes a antibióticos (BECKNELL; SPENCER et al., 2016).

Apesar da alta prevalência de dermatofitoses em todo o mundo, ainda é escasso o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvendo a interação patógeno-hospedeiro possivelmente por dificuldades técnicas dos modelos que mimetizam esta interação além da falta de ferramentas genéticas para o estudo desses organismos (ACHTERMAN; WHITE, 2012).

O modelo animal mais utilizado para o estudo das dermatofitoses é o porquinho da Índia, entretanto, é possível obter resultados satisfatórios somente com espécies de dermatófitos zoofílicos. Não sendo eficazes para o estudo da relação patógeno-hospedeiro para as espécies antropofílicas (ACHTERMAN; WHITE, 2012).

Para sanar este problema, vários modelos vêm sendo desenvolvidos para melhor compreensão das dermatofitoses. Tecidos epiteliais humanos disponíveis comercialmente podem representar uma alternativa para estudos dos estágios iniciais da infecção como adesão e invasão (ACHTERMAN; WHITE, 2012). Outros métodos como crescimento do fungo em meios de cultura contendo substratos proteicos, que mimetizem a infecção e o co-cultivo do patógeno com linhagem de queratinócitos humanos aliados às técnicas de microarray e RT-PCR como os realizados por Bitencourt et al. (2016) e Komoto et al. (2015) respectivamente, são ótimas ferramentas para análise de expressão gênica possibilitando uma melhor compreensão de como esta interação ocorre molecularmente.

Devido ao fato do genoma de sete dermatófitos ter sido recentemente sequenciados e publicados se faz necessário o desenvolvimento de melhores ferramentas de análises genéticas para que as informações sequenciadas possam ser úteis para melhor compreensão de como os dermatófitos interagem com as células humanas e causam doenças possibilitando o desenvolvimento de terapêuticas e tratamentos mais eficazes para o combate dessas doenças (ACHTERMAN; WHITE, 2012).



## 1.4 RNA-Seq: uma nova ferramenta para análises de transcriptomas e expressão gênica

Várias tecnologias vêm sendo desenvolvidas para a análises transcriptômicas, como técnicas de hibridação com bibliotecas de cDNA utilizando sondas marcadas com corantes fluorescentes na técnica de microarrays. Entretanto, estas técnicas encontram limitações: necessidade de conhecimento prévio da sequência específica do genoma, dificuldade em análises de diferentes níveis de expressão e elevados níveis de ruídos por hibridação inespecífica (ZHONG et al., 2009; QIAN et al., 2014).

As análises de transcriptomas têm se tornado uma poderosa ferramenta para a identificação de padrões de expressão gênica de genes hipotéticos assim como também para a análise de perfis de expressão de ESTs, fato que levou a necessidade de técnicas mais aprimoradas denominados de sequenciamentos da nova geração que permite maior leitura de sequencias de um genoma ou transcriptoma em um tempo menor (XU et al., 2015). Estas novas técnicas de sequenciamento encontram aplicações não só para a análise de transcritos, mas também são utilizadas para análises de variações genéticas, sítios de ligação de fatores de transcrição e níveis de metilação de DNA (MARIONI et al., 2008).

Como exemplo de sequenciamento de nova geração, o RNA-seq recentemente desenvolvido, permite mapear e quantificar transcriptomas ao mesmo tempo. Esta nova técnica apresenta várias vantagens em relação aos métodos de sequenciamento já existentes (ZHONG et.al, 2009) sendo que a principal é a capacidade de monitorar a expressão de genes em dois organismos ao mesmo tempo com um elevado nível de precisão (WESTERMANN, 2012). Atualmente, esta técnica já foi aplicada para análises em *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Arabidopsis thaliana*, ratos e células humanas. (ZHONG et.al, 2009) e para o estudo de interação patógeno- hospedeiro como o realizado por Kawahara et al. (2012) que avaliou a interação existente entre o fungo *Magnapotha oryzae* e seu hospedeiro e o realizado por Westermann et al. (2016) que avaliou os mecanismos de infecção da *Salmonella* utilizando como hospedeiro células humanas.

Além disso, o RNA-Seq permite avaliar a expressão de genes tanto do hospedeiro quanto do patógeno em diferentes intervalos de tempo ao longo do processo de infecção, isto é, desde o contato inicial da célula com o patógeno, a invasão até o momento da infecção e instalação patógeno-hospedeiro, obtendo-se assim uma melhor análise das alterações celulares em ambos os organismos. (WESTERMANN, 2012)

Apesar de ser uma técnica recente, o RNA-seq apresenta várias vantagens em relação a técnica de microarray: não se restringe apenas a análises de genomas de organismos já estudados; mesmo com sequências curtas de ~30 bp é possível obter informações de apenas dois éxons conectados; fornece resultados mais precisos já que níveis de ruído interferem menos para erros de mapeamento; é também mais eficaz na detecção de genes pouco ou muito expressos; apresenta uma medição mais precisa dos níveis de transcritos e suas isoformas; tem se demonstrado altamente precisa para quantificar níveis de expressão em comparação ao PCR quantitativo; exige pequenas quantidades de RNA para uma análise precisa (ZHONG et.al, 2009; CHU et al., 2015) e além disso permite a identificação de novos transcritos (HOU et al., 2015).

## **II. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar o perfil transcricional de genes humanos e fúngicos envolvidos na interação fungo- hospedeiro por RNA seq.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Realizar o co-cultivo de *T.rubrum* em linhagem de queratinocitos humanos HaCat ;
- Extração e análise da integridade dos RNAs de *T.rubrum* co-cultivado em linhagem de queratinocitos humanos HaCat para construção das bibliotecas de cDNA para sequenciamento;
- Sequenciamento por RNA seq;

- Análise dos dados obtidos por ferramentas próprias de bioinformática;
- Validação dos dados obtidos por PCR quantitativo.

### III. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Linhagens utilizadas

##### *Trichophyton rubrum*

Foi utilizada a linhagem sequenciada pelo Broad Institute CBS 118892. O cultivo da linhagem foi realizado em meio de cultura ágar Sabouraud por 15 dias a 28°C, segundo os métodos previamente descritos por Bitencourt et al. (2015).

##### **Queratinócitos Humanos HaCat**

Foi utilizada a linhagem imortalizada de queratinócitos humanos HaCat gentilmente cedidas pela Prof. Dra. Ana Paula de Souza Pardo (UNICAMP- Piracicaba) e Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho (Divisão de Farmacologia e Toxicologia, Centro Multidisciplinar de Pesquisa Química, Biológica e Agrícola, CPQBA). O cultivo da linhagem foi realizado em meio RPMI acrescido de 1,2 g de bicarbonato de sódio e 2,38 g de Hepes (Sigma) e suplementado com 10% de soro bovino fetal, mantida em estufa à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 3.2. Padronização do Co-cultivo de *T. rubrum* em linhagem de queratinócitos humanos HaCat.

##### 3.2.1. Preparação de queratinócitos HaCat

A linhagem celular de queratinócitos humanos foi cultivada em garrafas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> em meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal e mantidas em estufa à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> até atingir 90% de confluência. Após o segundo repique, as células foram tripsinizadas, ajustadas para a concentração de 2,0 x 10<sup>5</sup> cél/mL em câmara de Neubauer e transferidas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> em meio RPMI suplementado

com 5% de soro bovino fetal e na ausência de antibióticos e antimicóticos em estufa à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas para permitir a aderência celular.

### **3.2.2. Preparação da suspensão de conídios de *T. rubrum***

Placas da linhagem CBS 118892 de *T. rubrum* foram cultivadas em meio ágar Sabouraud por 15 dias e mantidas à 28°C. Após esse período, a superfície micelial das placas foi raspada com o auxílio de uma espátula estéril para o preparo de suspensão de conídios em salina 0,9%. A solução foi filtrada em lã de vidro e a concentração ajustada em câmara de Neubauer para  $1,0 \times 10^7$  conídio/mL.

Após o ajuste da concentração, a suspensão de conídios foi centrifugada à 1730g para a retirada da salina e o sedimento foi ressuscitado em 5 mL de meio Sabouraud e incubado em agitador orbital sob agitação de 150 RPM à 28°C por 7 horas para induzir o início da germinação dos conídios. Após este período, foi realizada nova centrifugação e o sedimento de conídios foi ressuscitado em meio RPMI suplementado com 5% de soro bovino fetal para co-cultivo em linhagem de queratinócitos.

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

Após o período de 24 horas de incubação para aderência das células HaCat ( $2,0 \times 10^5$  cél/mL), o meio de cultura foi retirado e inoculada a suspensão de conídios ( $1,0 \times 10^7$  conídio/mL) preparada em meio RPMI com 5% de soro bovino fetal (conforme descrito no item 3.2.2). Além do co-cultivo, foram realizados os seguintes controles em triplicata: cultura de queratinócitos sem a presença do patógeno e solução de conídios de *T. rubrum*, ambos cultivados em meio RPMI com 5% de soro fetal bovino.

As garrafas foram re-incubadas em estufa à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> durante o período de 24 horas sendo este o tempo para melhor aderência do fungo à célula e desenvolvimento de suas hifas, possibilitando uma melhor interação entre fungo e hospedeiro de acordo com cada metodologia utilizada.

### **3.2.4. Coleta do co-cultivo de *T. rubrum* em células HaCat**

O co-cultivo e o controle de cultura de queratinócitos, foram retirados da garrafa de cultivo com o auxílio de um raspador celular, pois estes estavam aderidos à garrafa. Após isso, o co-cultivo, controle de queratinócitos e controle de *T. rubrum* foram centrifugados à 1730 *g* por 10 min para a retirada do meio de cultivo. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensão em 1 mL de solução de lise (20 mg/mL de enzimas de lise de *Trichoderma harzianum* da Sigma – Aldrich; 0.7 M KCl e 1 M MgSO<sub>4</sub>, pH 6.8) para o rompimento da parede celular presente nos fungos e incubado sob em agitador orbital sob agitação de 130 RPM à 28°C por 1 hora. Após isso, foi realizada nova centrifugação à 1.000 *g* por 10 min para a retirada da solução de enzimas de lise. O sedimento foi diluído em 350 µL de RA 1 (substância presente no kit de extração Illustra RNAspin Mini RNA isolation da GE Healthcare), seguidos de estocagem em freezer -80°C até a realização da extração de RNA.

### **3.3. Extração de RNA total**

Para a extração do RNA total presente nas amostras em triplicata de co-cultivo (fungo+ queratinócitos), cultura de queratinócitos e solução de conídios de *T. rubrum* foi utilizado o kit de extração Illustra RNAspin Mini RNA Isolation da GE Healthcare conforme instruções do fabricante. A quantificação de RNA presente nas amostras e sua pureza, foi verificada através do Nanophotometer MidSci. A integridade do RNA foi avaliada através de análise no Bioanalyzer 2100 Agilent Technologies, cujo valor de RIN (RNA Integrity Number) deve estar acima de 7 para que o RNA possa ser utilizado para a construção das bibliotecas para o experimento de RNA-Seq.

### **3.4. Construção de bibliotecas de cDNA para sequenciamento por RNAseq**

As bibliotecas de cDNA para sequenciamento por RNAseq foram construídas em triplicata para cada condição (queratinócitos, co-cultivo e suspensão de conídios de *T.*

*rubrum*) em parceria com o Hemocentro de Ribeirão Preto. Para a construção das bibliotecas, o RNA total foi quantificado em fluorímetro Quantus™ Fluorometer (Promega) e sua concentração ajustada para 300 ng de RNA total em 20 µl de água. Após isso, foi utilizado o kit TrueSeq® RNA Sample Prep v2 da Illumina conforme instruções descritas pelo fabricante, que resumidamente se baseia nas seguintes etapas: primeiramente ocorre a separação e purificação dos RNAm pela cauda de poliA através de esferas eletromagnéticas contendo oligo-dT acoplado. Após a separação dos RNAm, estes são fragmentados seguido da síntese da 1º e 2º fita de cDNA. As fitas de cDNA formadas têm suas extremidades reparadas de forma a ficarem coesas e a extremidade 5' das fitas recebe um grupo fosfato. Após este processo, a extremidade 3' das fitas recebe um nucleotídeo A. A adição do grupo fosfato e adenilação permite a ligação dos adaptadores específicos presentes no kit. Estes adaptadores são complementares aos dois tipos de oligonucleotídeos presentes na flowcell. Após a inserção dos adaptadores nas extremidades das fitas de cDNA, ocorre a amplificação das bibliotecas através de PCR finalizando o processo de construção das mesmas.

A validação das bibliotecas geradas foi realizada de acordo com as instruções descritas no protocolo TrueSeq® RNA Sample Preparation v2 guide da Illumina. Para a validação, as bibliotecas foram submetidas a análise pelo equipamento Bioanalyzer 2100 Agilent Technologies, sendo consideradas de boa qualidade as que apresentam em torno de 260 - 300 pb. Foi realizada também nova quantificação das bibliotecas em fluorímetro Quantus™ Fluorometer (Promega) e qPCR. A reação de qPCR seguiu os procedimentos de preparo de amostra e ciclagem descritos no protocolo Sequencing Library qPCR Quantification Guide fornecido pela Illumina, e para a reação foi utilizado o kit KAPA SYBR FAST Master Mix Universal 2x qPCR Master Mix (Kapa Biosystems). A sequência dos primers também foi fornecido pelo protocolo citado: qPCR primer 1.1 (5' AATGATACGGCGACCACCGAGAT 3') e qPCR primer 2.1 (5' CAAGCAGAAGACGGCATACGA 3'). Além de quantificar as bibliotecas geradas, neste caso o uso do qPCR também foi útil para avaliar se os adaptadores estavam inseridos corretamente nas duas extremidades das bibliotecas, já que estes são de fundamental importância para que ocorra o processo de clusterização. Os primers utilizados na reação de qPCR são complementares e específicos à sequência dos adaptadores que estão inseridos nas amostras. Sendo assim, só é quantificada a amostra que contém os dois tipos de adaptadores corretamente inseridos (Illumina,

2011). ). Os valores de Cts (cycle threshold) obtidos durante a reação de qPCR são utilizados para calcular de maneira precisa a concentração exata de DNA em cada biblioteca através da conversão das médias dos valores de Cts para nM que é feita automaticamente com ferramentas de cálculos fornecidas pela Illumina. Após a quantificação, as bibliotecas foram normalizadas conforme recomendações do protocolo TrueSeq® RNA Sample Preparation v2 guide da Illumina e após, foi feito um *pool* de bibliotecas na concentração de 11pM que foi aplicado em 8 microtubos de 0.2 mL dispostos em tiras, seguido da aplicação destes pools nas 8 linhas disponíveis na flowcell através do equipamento cBot da Illumina.

A clusterização das bibliotecas foi realizada no equipamento cBot com o uso do kit TrueSeq® SRCluster v2- cBot- GA da Illumina conforme instruções descritas pelo fabricante.

### **3.5. Sequenciamento por RNAseq**

O sequenciamento das amostras foi realizado em parceria com o Hemocentro de Ribeirão Preto no sequenciador Genome Analyzer Iix com o uso do kit TrueSeq® SBS v5- GA, ambos da Illumina, em *single read* conforme recomendações do fabricante.

Os sequenciadores da plataforma Illumina utilizam como método de sequenciamento o sistema *Sequencing by Synthesis* (SBS technology). Nesta metodologia, todos os dNTPs que formarão a fita complementar do DNA molde que será sequenciado são marcados por fluorescência e possuem terminadores reversíveis, de modo que o dNTP é adicionado, detectado por fluorescência e o terminador é clivado para possibilitar a adição do dNTP seguinte, impedindo que mais de um dNTP seja incorporado e detectado ao mesmo tempo.

### **3.6 Análises dos dados obtidos pelo sequenciamento por RNAseq**

A partir dos dados gerados pelo sequenciamento, a qualidade das *reads* foi avaliada com o uso do software *FastQC*

(<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/index.html>) sendo consideradas *reads* de boa qualidade as que apresentaram um *Phred Score* >20 e descartadas as que não se enquadraram neste parâmetro.

Após a triagem, as *reads* que obtiveram um *Phred Score* >20 foram alinhadas com o genoma de referência de *T. rubrum*, disponível no banco de dados do Broad Institute

([http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte\\_comparative/MultiDownloads.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte_comparative/MultiDownloads.html)) e com o genoma de referência para *Homo Sapiens*- HG19 disponível em <http://hgdownload.soe.ucsc.edu/downloads.html#human>, através do algoritmo *Bowtie2* (Langmead e Salzberg, 2012).

Ao término do alinhamento, foi obtido o número de *reads count*, ou seja, o cálculo do número de *reads* que alinharam com cada transcrito de cada um dos genomas obtendo-se os níveis de expressão dos transcritos entre as amostras. Para avaliar estatisticamente o valor de expressão gênica entre as amostras foi aplicado o teste estatístico FDR (*False Discovery Rate*) com o uso do pacote *DEseq* (ANDERS; HUBER, 2010) através do programa estatístico R/Bioconductor.

A categorização funcional dos genes diferencialmente expressos de *T. rubrum* no co-cultivo foi realizada de acordo com o *Gene Ontology* (BLAKE; HARRIS, 2008) utilizando o algoritmo *Blast2GO* (GOTZ et al., 2008) e para o enriquecimento funcional das categorias super-representadas foi utilizado o algoritmo *BayGo* (VENCIO et al., 2006).

Em relação à categorização funcional dos genes diferencialmente expressos de queratinócitos humanos HaCat, esta também foi realizada de acordo com o *Gene Ontology* (BLAKE; HARRIS, 2008) através do site <http://www.geneontology.org/> e o enriquecimento funcional das categorias super-representadas foi realizado através do software virtual *Enrichr* (CHEN et al., 2013; KULESHOV et al., 2016) disponível em <http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>.

### 3.7 Síntese de cDNA para validação por qPCR



Para a síntese de cDNA foi utilizado o Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription® (Applied Biosystems). Para a reação, 1 µg de RNA total de cada condição (controle de células HaCat, co- cultivo e controle fúngico) foram tratados com o Kit DNase 1 Amplification Grade® (Sigma Aldrich®) e para a transcrição reversa foram utilizados 2 µL de tampão [10X], 0.8 µL dNTP mix [2.5X], 2 µL random primer [10X] e 1 µL de Multiscribe Reverse Transcriptase e o volume final ajustado com q.s.p 10 µL de água DEPC. As condições de ciclagem foram 10 min a 25°C, seguida de 2 horas a 37°C e por fim, 5 min a 85°C. Ao final da transcrição, os cDNAs foram armazenados em freezer -80°C até a utilização dos mesmos para a validação por PCR quantitativo.

### **3.8 Validação dos genes humanos e fúngicos diferencialmente expressos por PCR quantitativo.**

Para a validação de alguns genes fúngicos e humanos foi necessário a síntese de oligonucleotídeos iniciadores específicos que foram desenhados através do site <http://www.idtdna.com>. Todos os oligonucleotídeos iniciadores utilizados no Real Time PCR estão expostos na tabela 1.

Os oligonucleotídeos foram submetidos à análise de eficiência e concentração. Para isso, os cDNAs convertidos a partir de amostras de RNA da linhagem HaCat e CBS de *T.rubrum* foram diluídos em quatro concentrações de forma seriada e cada par de oligonucleotídeo foi diluído nas concentrações de 40nM, 50nM, 70nM, 80nM e 100nM afim de avaliar qual a concentração ideal e melhor eficiência de cada par que seriam utilizadas nas reações de qPCR para a validação dos dados obtidos no sequenciamento. Foram consideradas ideais as concentrações cuja eficiência dos oligonucleotídeos ficou em torno de 90% a 110%. As concentrações utilizadas para cada par de oligonucleotídeo estão expostas na tabela 1.

Para a validação por PCR quantitativo dos dados obtidos por RNA seq foram selecionados genes diferencialmente expressos humanos e fúngicos em resposta à infecção. Os RNAs das condições controle (HaCat e *T. rubrum*) e do co-cultivo utilizados no sequenciamento foram convertidos em cDNA e o experimento foi

realizado em triplicata com o Kit SYBR Green JumpStart Taq Ready Mix® (Sigma Aldrich) no equipamento Mx3300 QPCR system (Stratagene). As condições de ciclagem foram: denaturação inicial à 94°C por 10 minutos seguidos de 40 ciclos à 94°C por 2 minutos, à 60°C por 60 segundos e por fim 72°C por 1 minuto. Ao final de cada ciclo foi avaliada a curva de dissociação de cada produto gênico amplificado. O nível de expressão gênica foi calculado através do método comparativo  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001) utilizando-se os genes 18S e  $\beta$ -tubulina como normalizadores fúngicos e GAPDH e  $\beta$ -actina como normalizadores humanos. Os resultados foram descritos com a média  $\pm$  do desvio padrão de três experimentos.

Para determinar a correlação existente entre ambos os métodos de análise de expressão gênica, foi utilizado o método estatístico de correlação de Pearson ( $r$ ). Através desta análise obtêm-se o grau de colinearidade entre duas variáveis (RNA seq e qPCR) com a finalidade de avaliar a reprodutibilidade e semelhança dos valores de expressão em ambas as técnicas. O coeficiente  $r$  apresenta valores entre -1 e 1 sendo que o sinal indica direção positiva ou negativa da relação e o valor sugere a força desta relação entre as variáveis. Assim, é desejável que o valor de  $r$  seja o mais próximo possível de -1 ou 1 sendo considerada uma forte correlação quando  $r$  apresenta valores entre 0.7 e 1 (FIGUEIREDO FILHO; JUNIOR, 2009).

**Tabela1.** Oligonucleotídeos utilizados para a validação dos genes fúngicos e humanos por PCR quantitativo.

ID	Descrição do produto gênico	Sequência	Amplicon	Concentração	Ref.
TERG_12606	Dipeptidylpeptidase V (DPPV)	F:5'-CGGTTTCGATAAGAACAAGGTC-3' R:5'-ACAACGTATCCCTGGTCAG-3'	126 pb	F: 70nM R: 70nM	Este trabalho
TERG_03102	Sterol 24-C-methyltransferase (ERG6)	F:5'-CTCTGGCAAGACACGAACAC-3' R:5'-CCTTGCAGCCGGTGAAGG-3'	126 pb	F: 100nM R: 100nM	Bitencourt et al., 2013
TERG_01281	Malato Sintase	F:5'-CCTAACCAACTCTTTGTCCGAC-3' R:5'-GAAGCCATCCCTCCATGTAAG-3'	142 pb	F: 100nM R: 100nM	Dados não publicados
TERG_08405	Leucine Aminopeptidase 2	F:5'-GCTGCACAAGGTCAAGTTG-3' R:5'-ACTTCTCGAACAGGTACTION-3'	158 pb	F: 70nM R: 50nM	Este trabalho
TERG_00916	Carboxylic acid transporter	F:5'-CGCATTGGGTATCATGATCAC-3' R:5'-GCTCTTGTTACCGTCATG-3'	109 pb	F: 50nM R: 50nM	Este trabalho
TERG_11638	Isocitrato Liase	F:5'-ACAACCTCTCGCCTTCATTC-3' R:5'-GGTCAGATATCAGGGCAGTTG-3'	144 pb	F: 100nM R: 100nM	Komoto et al., 2015
TERG_07904 (Constitutivo)	Tubulin Beta Chain ( $\beta$ - tubulin)	F:5'-AACATGATGGCTGCCACTGA-3' R:5'-AAGATGGCAGAGCAGGTAAGGT-3'	253 pb	F: 100nM R: 100nM	Jacob et al., 2012
- (Constitutivo)	18S	F: 5'CGCTGGCTTCTTAGAGGGACTAT-3' R: 5'-TGCCTCAAACCTCCATCGACTT-3'	51 pb	F: 100nM R: 70nM	Bitencourt et al., 2013
CASP14	Caspase 14	F:5'-CATCAAAGACAGCCCACAAAC-3' R:5'-TGTCCTTCTCTTCGTGAAC-3'	150 pb	F: 50nM R: 50nM	Este trabalho

CSF2	Colony Stimulating Factor 2	F:5'- TCTGCTTGTCATCCCCTTTG-3' R:5'-ATGACCATCCTGAGTTTCTAGC-3'	122 pb	F: 50nM R: 50nM	Kim et al., 2016
RNAse7	Ribonuclease A Family Member 7	F:5'- GGAGTCACAGCACGAAGACCA-3' R:5'- CATGGCTGAGTTGCATGCTTGA-3'	235 pb	F: 50nM R: 50nM	Köten et al., 2009
SLC11A1	Natural resistance-associated macrophage protein 1	F:5'- CATCTCCGTCTCCCAAAGTG-3' R:5'- TGGATGCTTTAGAGACTTCGTG-3'	144 pb	F: 70nM R: 70nM	Este trabalho
MMP9	Matrix Metalloproteinase 9	F:5'- CAGTTTCCATTCATCTTCCAAGG-3' R:5'- CATCACCGTCGAGTCAGC-3'	150 pb	F: 70nM R: 70nM	Markiewicz et al., 2006
HAS2	Hyaluronan Synthase 2	F:5'- TCCGAGAATGGCTGTACAATG-3' R:5'- AAGAGCTGGATTACTGTGGC-3'	118 pb	F: 70nM R: 70nM	Este trabalho
KRT1	Keratin 1	F:5'- CCTTACAGCACTCTACCAAGC-3' R:5'-TCTGGGCTATATCCTCGTACTG-3'	149 pb	F: 50nM R: 50nM	Este trabalho
FLG	Filaggrin	F:5'- AGCAATCGGTAAATAGGTCTGG-3' R:5'- CCTCATTCGTGTTTGTCTGC-3'	126 pb	F: 50nM R: 50nM	Este trabalho
GAPDH (Constitutivo)	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	F: 5'-AATCCCATCACCATCTTCCAG-3' R: 5'-GAGCCCCAGCCTTCTCCAT-3'	118 pb	F: 100nM R: 70nM	Ma et al., 2015
ACTB (Constitutivo)	Beta-actin	F: 5'-GTTGCGTTACACCCTTCTTG-3' R: 5'-TGCTGTCACCTTACCGTTC-3'	154 pb	F: 70nM R: 70nM	Dai et al., 2012

(\*) TERG: Número de acesso do gene no genoma de *T. rubrum* disponível no site do Broad Institute ([http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte\\_comparative/Multi\\_Downloads.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte_comparative/Multi_Downloads.html)).

## IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Extração, análise da pureza e integridade do RNA total

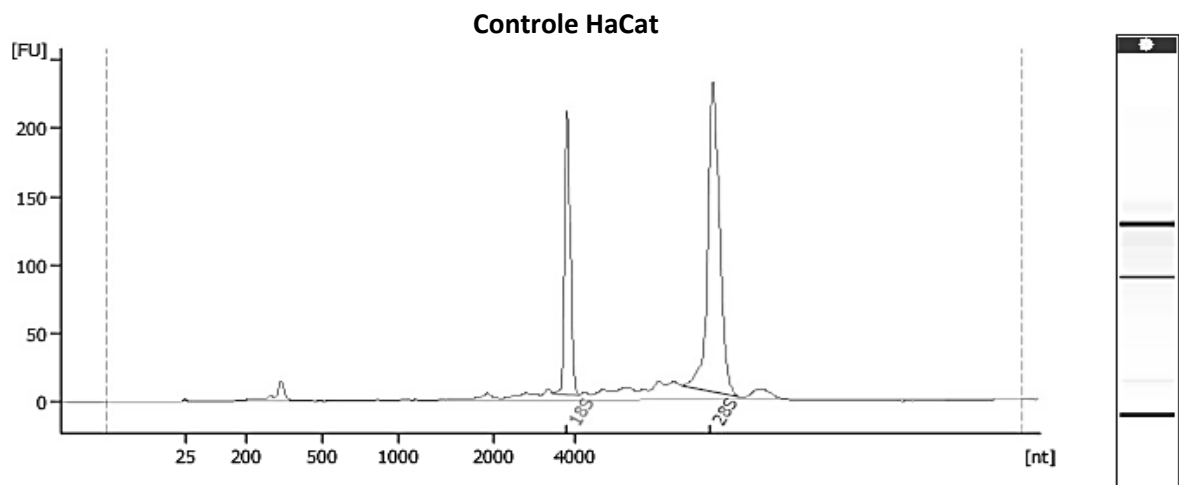
Após o período de 24 h de incubação das condições experimentais controle de células, co-cultivo e controle fúngico, o RNA total as amostras foram extraídos, quantificados e a pureza do RNA foi avaliada através da razão A260/280 e a ausência de solventes e outros contaminantes através da razão A260/230 cujos limites aceitáveis para ambas as razões devem estar entre 1.8- 2.0 ou superior (Tabela 2). Os experimentos foram realizados em triplicata.

**Tabela 2-** Análise de pureza dos RNAs

Amostra	A260/280	A260/230
Co- cultivo 1	<b>2.0</b>	<b>2.2</b>
Co- cultivo 2	<b>2.0</b>	<b>2.1</b>
Co- cultivo 3	<b>2.0</b>	<b>1.9</b>
Controle HaCat 1	<b>2.0</b>	<b>2.1</b>
Controle HaCat 2	<b>1.9</b>	<b>2.3</b>
Controle HaCat 3	<b>2.0</b>	<b>2.2</b>
Controle <i>T. rubrum</i> 1	<b>2.1</b>	<b>1.8</b>
Controle <i>T. rubrum</i> 2	<b>2.0</b>	<b>1.9</b>
Controle <i>T. rubrum</i> 3	<b>2.1</b>	<b>1.8</b>

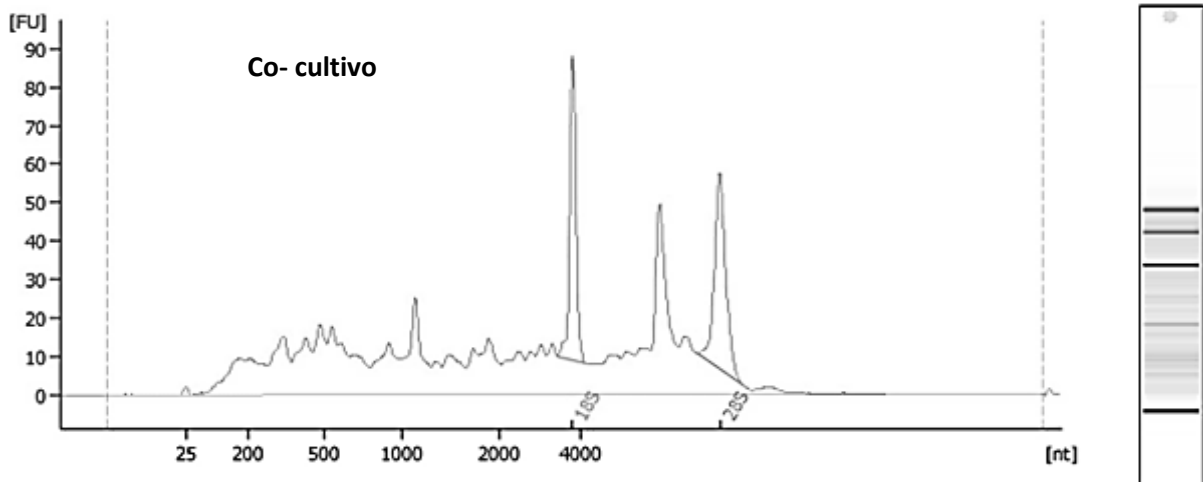
As amostras de RNAs em triplicatas apresentaram a pureza dentro dos limites aceitáveis e foram submetidos à análise por Bioanalyzer (Fig.5) para verificar a integridade das amostras, cujo RIN deve acima de 7 para que estas possam ser utilizadas para a construção das bibliotecas para sequenciamento.

**Figura 5:** Gráficos obtidos por análise por Bioanalyzer para avaliar a integridade do RNA das amostras



**Overall Results for sample 2 : H**

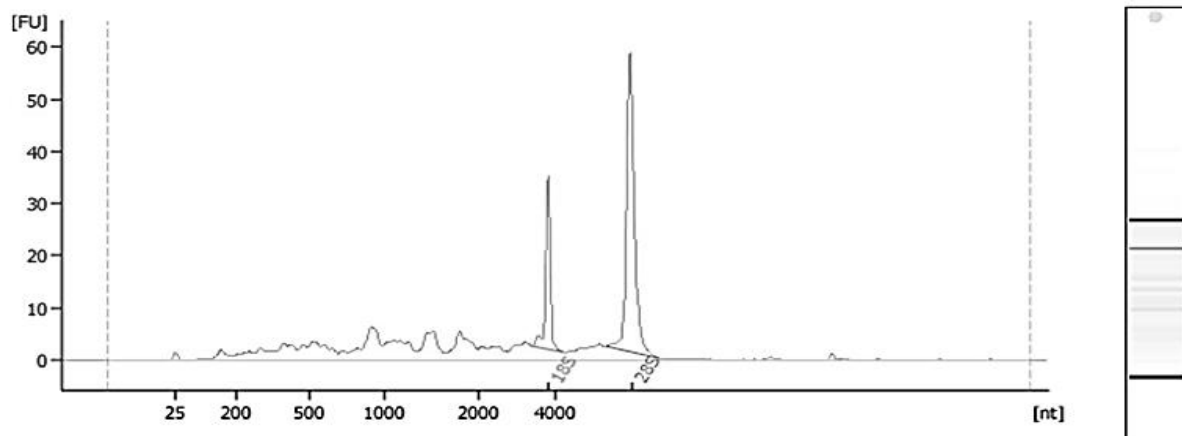
RNA Area:	764.6	RNA Integrity Number (RIN):	9.5 (B.02.07)
RNA Concentration:	1,316 ng/ $\mu$ l		
rRNA Ratio [28s / 18s]:	2.0		



**Overall Results for sample 10 : CO**

RNA Area:	952.4	RNA Integrity Number (RIN):	5.7 (B.02.07)
RNA Concentration:	1,640 ng/ $\mu$ l		
rRNA Ratio [28s / 18s]:	1.0		

### Controle *T. rubrum*

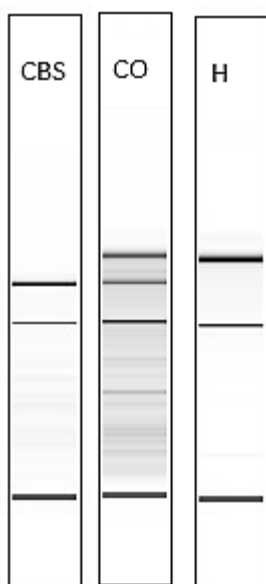


**Overall Results for sample 12 : CBS3**

RNA Area:	252.0	RNA Integrity Number (RIN):	7.5 (B.02.07)
RNA Concentration:	384 ng/ $\mu$ l		
rRNA Ratio [28s / 18s]:	2.6		

Conforme demonstram os gráficos, as amostras controles de célula e fungo apresentaram a integridade necessária para prosseguir com a construção das bibliotecas. Devido ao fato de não conseguirmos separar o RNA fúngico do RNA da célula durante a extração do co-cultivo, não foi possível obter um valor de RIN confiável durante a análise, pois estes estavam misturados na mesma amostra e o software utiliza algoritmos diferentes para a análise do RNA proveniente de células (Eukaryote Total RNA Nano) e RNA proveniente do fungo (Plant RNA Nano). Sendo assim, o valor de RIN foi desconsiderado e a análise foi baseada na integridade das bandas do RNA geradas em gel virtual pelo software (Fig 6).

**Figura 6:** Gel virtual com as bandas pertencentes ao RNA fúngico e da célula no co-cultivo sendo **CBS** para controle *T. rubrum*, **CO** para co- cultivo e **H** para controle HaCat.



Conforme observado na figura acima, o gel virtual do co-cultivo apresenta três bandas correspondentes ao RNA do fungo e célula presentes na mesma amostra de forma íntegra e, portanto viáveis para a construção das bibliotecas de cDNA.

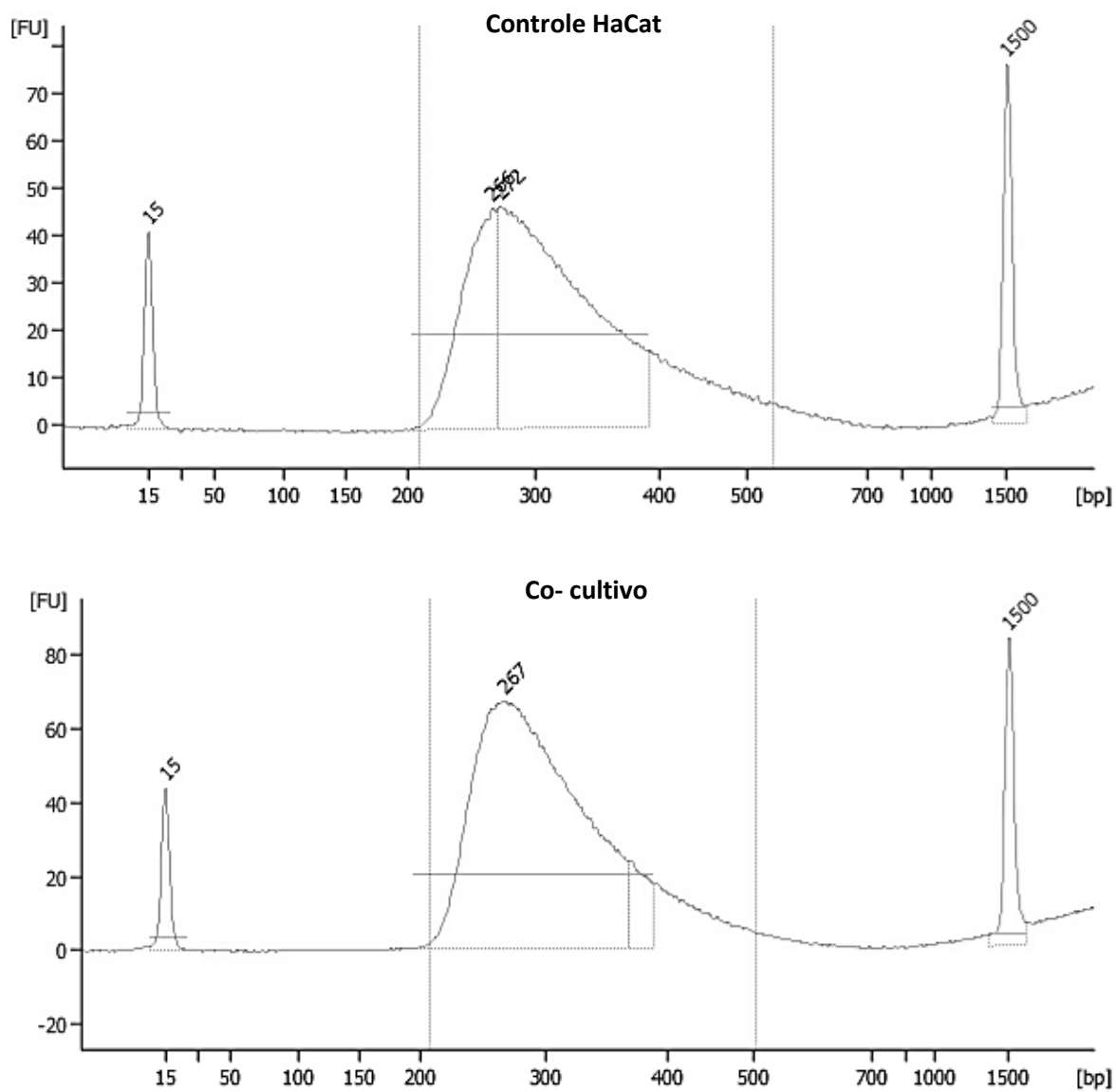
#### **4.2 Validação das bibliotecas de cDNA para sequenciamento por RNAseq**

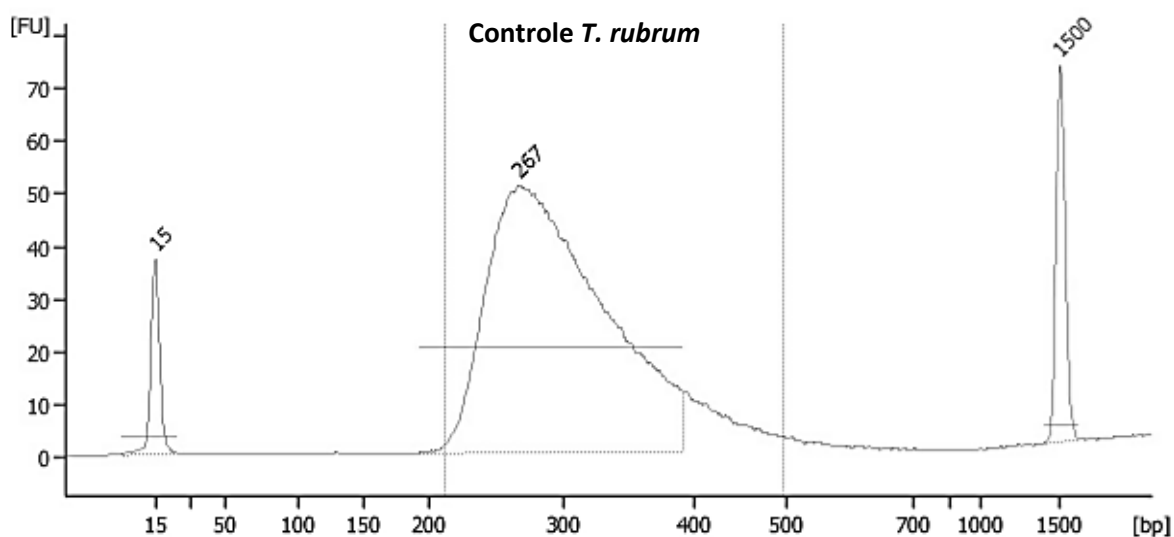
Após a construção das bibliotecas de cDNA foi necessário validá-las por Bioanalyzer para verificar o tamanho e a qualidade das bibliotecas obtidas. De acordo com o protocolo TrueSeq® Sample RNA Preparation v2 Guide fornecido pela Illumina, as bibliotecas de boa qualidade devem apresentar um tamanho aproximadamente de 260 bp para bibliotecas *single read*.

Todas as bibliotecas validadas apresentaram banda com tamanho de 260-300 bp (Fig.7), sendo então consideradas com o tamanho apropriado para a clusterização e sequenciamento.



**Figura 7.** Gráficos com os tamanhos das bibliotecas de cDNA geradas por bioanalyzer





### 4.3 Análise da qualidade do sequenciamento e mapeamento das *reads*

As bibliotecas de controle de células, controle fúngico e co-cultivo foram sequenciadas em triplicata, totalizando nove bibliotecas sequenciadas. Entretanto, ao analisar a correlação existente entre cada réplica, observou-se que uma das réplicas do co-cultivo não apresentou correlação com as demais e, portanto, as análises posteriores foram realizadas em duplicata.

Como resultado do sequenciamento obteve-se em média 32 milhões de *reads* brutas para o controle fúngico, 26 milhões para o co-cultivo e 40 milhões para o controle de células. A partir dos dados brutos gerados, foram removidas as *reads* que apresentaram baixa qualidade através do software FastQC (PATEL; JAIN, 2012). Na tabela 3 está exposta a quantidade de *reads* que resultaram desta triagem para prosseguir com o alinhamento aos genomas.

As *reads* resultantes foram alinhadas, através do algoritmo *Bowtie2* (LANGMEAD; SALZBERG, 2012), com os genomas de referência para *T. rubrum* e com o genoma de referência para *Homo sapiens* HG19. As *reads* geradas a partir do sequenciamento das bibliotecas do co-cultivo foram alinhadas com os dois genomas de referência a fim de identificar quais *reads* eram pertencentes à célula humana e quais pertenciam ao fungo. A tabela 3 mostra os percentuais de alinhamento obtidos para cada biblioteca.

**Tabela 3.** Quantidade de *reads* alinhadas com os genomas de referência para *Homo Sapiens* (HG19) e *T. rubrum* (CBS).

Amostra	<i>Reads</i> Brutas	<i>Reads</i> de qualidade	Genoma Referência <i>T. rubrum</i> (CBS)		Genoma Referência <i>Homo sapiens</i> (HG19)	
			<i>Reads</i> alinhadas	Percentual alinhamento	<i>Reads</i> alinhadas	Percentual Alinhamento
<i>T. rubrum</i> I	37.501.479	36.676.227	31.692.446	86,4%	-	-
<i>T. rubrum</i> II	27.677.792	27.063.599	24.635.560	91,0%	-	-
Co-cultivo I	27.926.550	27.331.638	2.571.234	9,4%	22.298.067	81,5%
Co-cultivo II	25.574.109	25.063.089	1.388.085	5,5%	21.400.355	85,3%
HaCat I	35.308.490	34.530.495	-	-	30.625.029	88,6%
HaCat II	45.385.154	42.869.051	-	-	35.967.133	83,9%

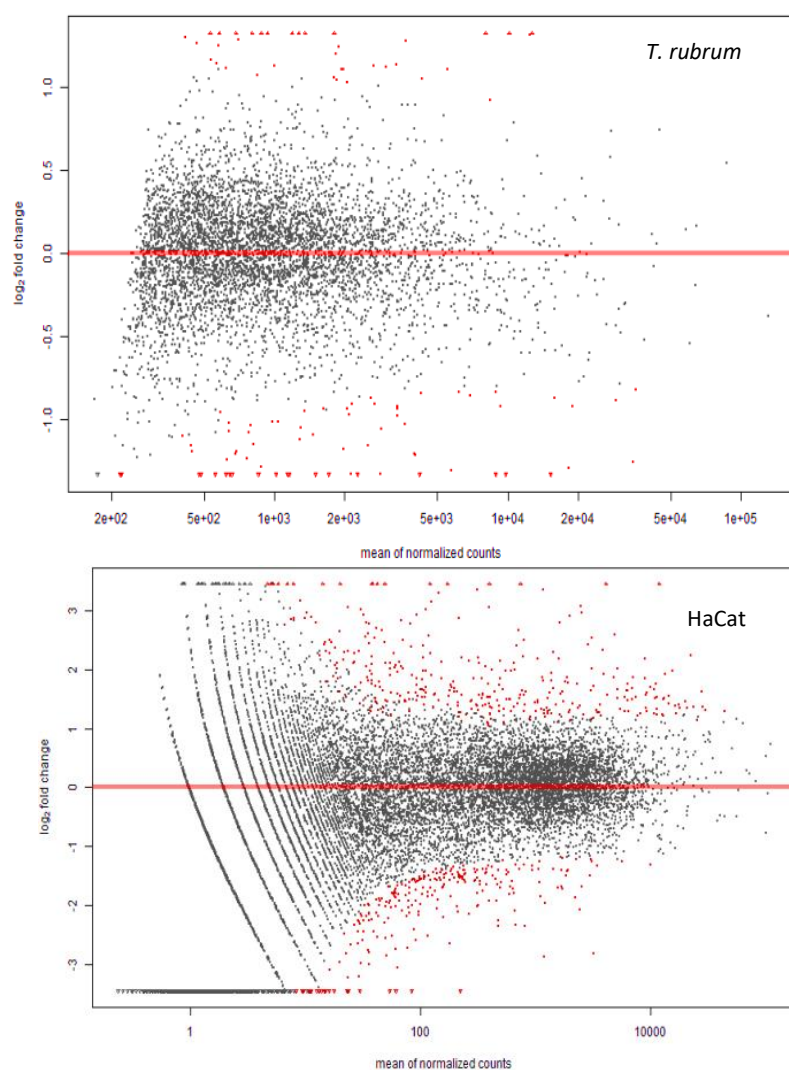
Apesar das bibliotecas co-cultivo I e co-cultivo II apresentarem um elevado número de *reads* de qualidade, quando estas foram alinhadas com o genoma de *T. rubrum* obteve-se um baixo percentual de alinhamento (9,4% e 5,5% respectivamente), indicando que a maioria das *reads* geradas por estas bibliotecas eram pertencentes ao genoma humano. Este resultado já era esperado, pois estas bibliotecas foram construídas a partir do RNA humano e fúngico misturados em uma mesma amostra sendo o genoma humano muito maior em tamanho (2989.43 Mb) quando comparado ao genoma de *T. rubrum* (23 Mb) o que pode justificar a predominância de *reads* humanas nestas bibliotecas. Além disso, a baixa qualidade do genoma de referência disponível para *T. rubrum* (CBS) também pode ter influenciado para o baixo alinhamento. Kawahara et. al. (2012) também obteve um baixo percentual de alinhamento de *reads* (0,1-0,2%) quando as bibliotecas do co-cultivo de *Magnaporthe oryzae* com *Oryza Sativa* foram confrontadas com o genoma de referência do fungo *M.oryzae*. Apesar do baixo alinhamento das *reads* fúngicas, isto não impossibilitou as análises posteriores e identificação de genes fúngicos diferencialmente expressos quando co-cultivados com queratinócitos humanos HaCat.

#### 4.4 Análise do perfil transcricional dos genes humanos e fúngicos diferencialmente expressos

Após o alinhamento e triagem das *reads* de boa qualidade, foram calculados os valores de *reads count* (ANDERS; HUBER, 2010) e posteriormente, aplicado o teste

estatístico FDR (*False Discovery Rate*) sendo considerados como genes diferencialmente expressos os que apresentaram significância estatística menor que 0.05. Com base no valor de expressão de cada gene foi aplicado um valor de corte sendo considerados genes diferencialmente expressos somente os que apresentaram valores inferiores ou superiores a  $\log_2 fold\ change$  1 ou -1, conforme representado na figura 8. Este corte tem o intuito de minimizar a ocorrência de falso positivo devido a genes que apresentam baixos valores de modulação. Ao total, 369 genes de HaCat e 70 genes de *T. rubrum* foram diferencialmente expressos em 24 horas de co-cultivo. A lista completa dos genes modulados em ambos os organismos com seus respectivos valores de modulação podem ser observados nos anexos A e B.

**Figura 8.** Distribuição dos genes de queratinócitos humanos HaCat e *T. rubrum* modulados em 24 horas de co-cultivo. Os pontos em vermelho representam os genes diferencialmente expressos

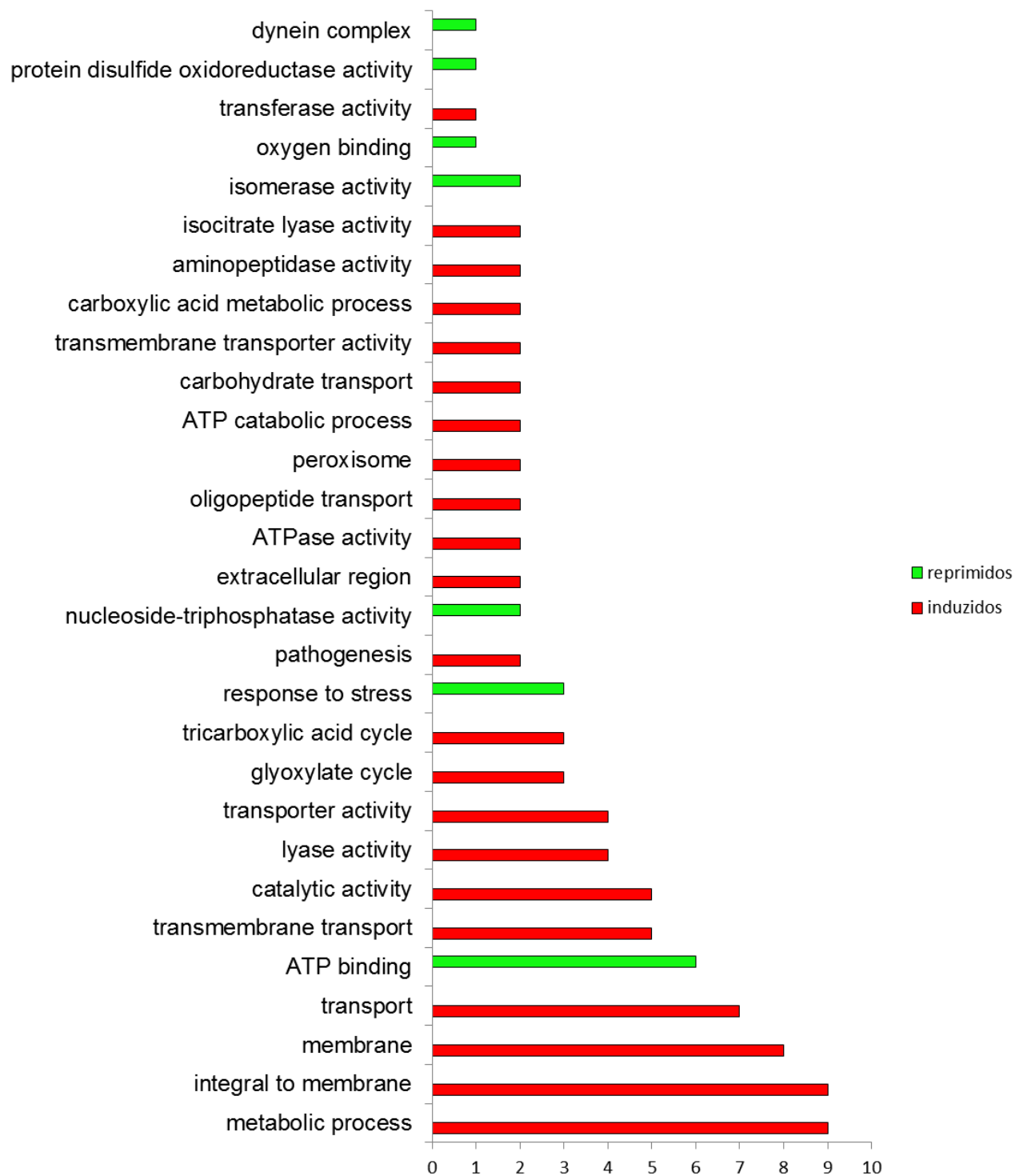


Devido ao fato de a maioria dos genes diferencialmente expressos de *T. rubrum* serem considerados como hipotéticos, foi realizada uma reanotação utilizando o genoma de outros dermatófitos como referência disponível no site do *Broad Institute*. A escolha dos genomas utilizados na reanotação foi baseada no alto grau de similaridade que o genoma de *T. rubrum* apresenta em relação aos dermatófitos escolhidos e de acordo com o grau de identidade de cada produto gênico. A busca por genes ortólogos aos que são classificados como hipotéticos para *T. rubrum* auxilia na análise dos dados contribuindo para a escolha e estudo dos principais genes à serem validados. Os dermatófitos que foram utilizados na reanotação encontram-se identificados na lista de genes diferencialmente expressos de *T. rubrum* na tabela anexo A.

#### **4.5 CATEGORIZAÇÃO FUNCIONAL DOS GENES DE *T. rubrum* DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM RESPOSTA AO CO-CULTIVO COM QUERATINÓCITOS HACAT**

A fim de avaliar quais os aspectos moleculares e biológicos estão envolvidos na resposta do dermatófito *T. rubrum* quando co-cultivado com queratinócitos humanos, foi feita a categorização dos genes diferencialmente expressos de acordo com a funcionalidade de cada gene utilizando-se os algoritmos *Blast2GO* (GOTZ et al., 2008) e *BayGo* (VENCIO et al., 2006). As categorias que obtiveram o maior número de genes ( $p < 0,05$ ), sendo assim as mais representadas, estão expostas na figura 9.

**Figura 9.** Categorização funcional dos genes de *T. rubrum* diferencialmente expressos em resposta ao co-cultivo com queratinócitos humanos por 24 horas. No eixo vertical estão representadas as categorias e no eixo horizontal o número de genes pertencentes a cada categoria.



De acordo com a categorização funcional, é possível observar a modulação de genes pertencentes a várias funções celulares, entretanto para uma melhor compreensão da interação entre fungo-hospedeiro foram escolhidas as categorias relacionadas a processos metabólicos, ao transporte via membrana, a patogenicidade e ao ciclo do glioxilato por serem relevantes nesta interação e que serão discutidas a seguir.

#### **4.5.1 Genes relacionados com a patogenicidade**

Durante o processo infeccioso, dermatófitos como *T. rubrum* secretam endo e exoproteases capazes de degradar a queratina presente no tecido hospedeiro em oligopeptídeos ou aminoácidos (BALDO et al., 2011) que podem ser utilizados como fonte de carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre para a nutrição do fungo (PERES et al., 2010).

As endoproteases secretadas têm a função de clivar as ligações peptídicas internamente, e já as exoproteases clivam estas ligações somente nas regiões N ou C terminal da cadeia polipeptídica. Em conjunto, as endo e exoproteases permitem a degradação dos componentes proteicos necessários para a nutrição do fungo de forma eficiente (MONOD et al., 2002). A capacidade de secreção destas enzimas pelos dermatófitos é considerada um dos fatores de virulência mais bem caracterizados (PERES et al., 2010; MONOD et al., 2005) sendo um elemento muito importante para a invasão, utilização e disseminação do fungo através do estrato córneo do hospedeiro (LENG et al., 2009).

Quando dermatófitos são expostos à meio de cultivos contendo queratina ou outra proteína como única fonte de nitrogênio, estes secretam endoproteases da família das subtilisinas (Sub3, Sub4) e fungalisinas (Mep3, Mep4) além de várias exoproteases incluindo as leucinas aminopeptidases (Laps) e Dipeptidil peptidases (Dpps) (BALDO et al., 2011). Durante o co-cultivo de *T. rubrum* com queratinócitos humanos neste trabalho, foram induzidos genes que codificam duas dessas exoproteases secretadas: a leucina aminopeptidase 2 e a dipeptidil peptidase V (DPPV) conforme exposto na tabela 4 com seus respectivos valores de modulação.

**Tabela 4.** Genes relacionados com a patogenicidade

<b>ID</b>	<b>Descrição do produto gênico</b>	<b>Log<sub>2</sub> Fold Change</b>
TERG_ 12606	Dipeptidil peptidase V	2.2
TERG_ 08405	Leucina Aminopeptidase 2	1.3

As leucinas aminopeptidases são exoproteases pertencentes à família M28 enquanto as dipeptidil peptidases são pertencentes à família S9 sendo que ambas atuam sinergicamente com as subtilisinas e fungalisinas (endoproteases). Enquanto estas últimas quebram as proteínas em polipeptídeos, as Laps em conjunto com a DppIV digerem as cadeias polipeptídicas em aminoácidos e peptídeos menores. Durante este processo, as Laps degradam a cadeia polipeptídica na região N terminal até uma sequência X-Pro, que atua como uma barreira para que não haja a quebra inespecífica pela aminopeptidase. Complementarmente, a sequência X-Pro é removida pela DppIV, permitindo o acesso das Laps aos resíduos seguintes ( BALDO et al., 2011).

De modo semelhante através da análise de expressão gênica por *microarray*, Bitencourt et al. (2016) descreveram a indução das leucinas aminopeptidases Lap1 e Lap2 quando conídios de *T. rubrum* foram cultivados em meio contendo queratina. Além disso, Monod et al. (2005) também relataram a secreção das leucinas aminopeptidases (Lap1 e Lap2) e duas dipeptidil peptidases (DppVI e DppV) pelo dermatófito *T. rubrum*.

Sendo assim, com base nos resultados obtidos durante o co-cultivo de *T. rubrum* com queratinócitos humanos HaCat, a secreção das exoproteases DppV e Lap2 pelo fungo possivelmente ocorre para degradar a queratina presente nos queratinócitos para a sua nutrição e penetração na célula hospedeira, evidenciando que a secreção destas proteases é um importante fator de virulência durante o processo infeccioso.

#### **4.5.2 Genes relacionados com o transporte via membrana**

Outra categoria relevante para o estudo da interação entre fungo-hospedeiro é a que apresentou genes relacionados ao transporte via membrana destacando-se os genes que codificam os transportadores MFS e ABC conforme exposto na tabela 5.



**Tabela 5.** Genes relacionados com o transporte via membrana.

<b>ID</b>	<b>Descrição do produto gênico</b>	<b>Log<sub>2</sub> Fold Change</b>
TERG_04399	Phthalate transporter (MFS transporter)	1.6
TERG_00348	Galactose-proton symporter (MFS transporter)	1.4
TERG_00916	Carboxylic acid transporter (MFS transporter)	1.3
TERG_04952	ABC transporter	1.2
TERG_04356	Amino acid permease	1.1
TERG_07783	Oligopeptide transporter	1.1
TERG_02186	ABC transporter	1.1
TERG_03174	Siderochrome-iron transporter Sit1 (MFS transporter)	-2.0
TERG_05575	MFS multidrug transporter	-1.1

Os fungos apresentam em sua membrana famílias de proteínas transportadoras de efluxo cuja função é a de realizar o transporte de compostos entre as membranas celulares, sendo as mais importantes neste processo a família dos transportadores do tipo ABC (*ATP-binding cassette*) e as do tipo MFS (*major facilitator superfamily*) (CANNON et al., 2009; SORBO; SCHOONBEEK; WAARD, 2000).

Os transportadores do tipo ABC utilizam a energia gerada da hidrólise de ATP para o transporte de solutos através das membranas. Desta forma, esta família de transportadores é considerada o principal sistema ativo de transporte (SORBO; SCHOONBEEK; WAARD, 2000) além de possuir um amplo espectro de afinidade por substratos (CANNON et al., 2009). Já os transportadores da família MFS, abrangem mais de 350 categorias de transportadores incluindo os de açúcares, peptídeos, drogas e íons orgânicos e inorgânicos (SORBO; SCHOONBEEK; WAARD, 2000), entretanto, apresentam afinidade limitada por substratos (CANNON et al., 2009), sendo utilizados como um sistema de transporte ativo secundário (SORBO; SCHOONBEEK; WAARD, 2000).

Além de estes transportadores executarem importante função biológica nas células, eles estão relacionados com a resistência a drogas que alguns fungos apresentam (SORBO; SCHOONBEEK; WAARD, 2000; CANNON et al., 2009) atuando no efluxo de drogas e outros compostos tóxicos para fora da célula (SORBO; SCHOONBEEK; WAARD, 2000).

No presente trabalho observou-se a indução majoritária de genes que codificam transportadores do tipo MFS, destacando-se entre estes o gene que codifica o transportador MFS de ácido carboxílico, pois este pode estar envolvido em uma adaptação nutricional do fungo para obter nutrientes de outras fontes de carbono durante o processo infeccioso, conforme será descrito a seguir.

O conhecimento de quais vias metabólicas os fungos patogênicos utilizam para obtenção de nutrientes durante o processo infeccioso ainda é escasso, pois a forma como cada fungo irá regular essas vias varia entre as espécies. Com isso, o estudo sobre quais vias metabólicas estão envolvidas durante a interação entre fungo-hospedeiro torna-se um alvo atraente para o surgimento de novas drogas que possam atuar especificamente nessas vias (FLECK; SCHÖBEL; BROCK, 2011) pois como o acionamento de algumas vias é uma habilidade exclusiva de fungos patogênicos, os antifúngicos se tornam mais seletivos causando menos efeitos adversos aos humanos (CHEAH et al., 2014).

Os fungos utilizam preferencialmente a glicose para a obtenção de energia, entretanto quando esta se torna escassa, eles são capazes de ativar vias metabólicas alternativas que utilizam outras fontes de carbono como etanol, glicerol, aminoácidos ou ácidos carboxílicos oriundos do ciclo de Krebs para suprir suas necessidades nutricionais (CASAL et al., 2008).

Para a assimilação de ácidos carboxílicos como fontes alternativas de carbono, é necessário que estes sejam transportados através da membrana. Em situações em que o pH encontra-se acima de 5 os ácidos carboxílicos estão predominantemente em forma aniônica e com isso para que sejam assimilados é necessário que a absorção ocorra através de transportadores (VIEIRA et al., 2010).

Vieira et al. (2010) avaliaram a expressão de dois transportadores de ácidos carboxílicos de cadeia curta (JEN1 e JEN2) no patógeno *C. Albicans* sugerindo que ambos os transportadores são expressos quando o fungo encontra pouca disponibilidade de glicose dentro do hospedeiro indicando a importância destes transportadores nos estágios iniciais do processo infeccioso. Além disso, ressaltam que a flexibilidade metabólica que este fungo apresenta em obter nutrientes durante o processo infeccioso, contribui para sua virulência.

Neste trabalho foi observada a indução da expressão do gene que codifica o transportador de ácido carboxílico em *T. rubrum* quando este é co-cultivado com queratinócitos humanos, o que pode sugerir que o fungo utilize este transportador como forma alternativa para a obtenção de nutrientes durante o processo infeccioso.

#### 4.5.3 Genes relacionados com o ciclo do glioxilato

Conforme descrito anteriormente, a flexibilidade metabólica que alguns fungos patogênicos apresentam é de extrema importância durante o processo infeccioso (MAYER; WILSON; HUBE, 2013), pois permite que o patógeno obtenha nutrientes através da assimilação de fontes alternativas de carbono quando este infecta o hospedeiro (CHEAH et al., 2014).

A via do ciclo do glioxilato é um exemplo de via metabólica alternativa presente em fungos e ausente em mamíferos (LORENZ; FINK et al., 2001) que têm sido muito estudada como novo alvo para a ação de antifúngos. Estudos demonstram que a ativação da via do ciclo do glioxilato possibilita que o patógeno *C. Albicans* sobreviva e se desenvolva quando é fagocitado por neutrófilos e macrófagos (CHEAH et al., 2014) sendo um fator de virulência importante durante o processo infeccioso (MAYER; WILSON; HUBE, 2013).

Nos resultados aqui obtidos observa-se a indução das duas enzimas principais pertencentes a esta via: Malato sintase e isocitrato liase (Tabela 6) indicando que esta via também possa ser um fator de virulência importante nas infecções causadas por *T. rubrum*.

**Tabela 6.** Genes relacionados com o ciclo do glioxilato

<b>ID</b>	<b>Descrição do produto gênico</b>	<b>Log<sub>2</sub> Fold Change</b>
TERG_01281	Malate synthase, glyoxysomal	1.7
TERG_11638	Isocitrate lyase	1.3
TERG_11639	Isocitrate lyase	1.1

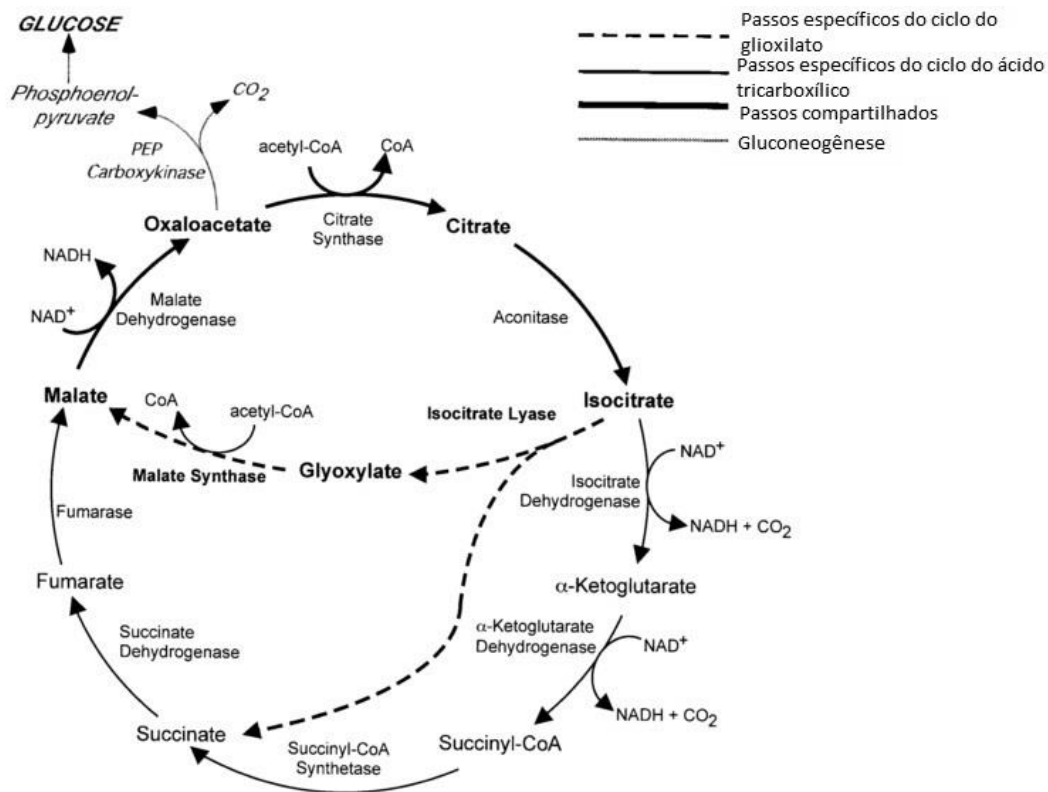
O ciclo do glioxilato é uma modificação do ciclo do ácido tricarboxílico já que desconsidera os passos geradores de CO<sub>2</sub> para que os carbonos possam ser

conservados como substratos para a gluconeogênese, durante os quais são incorporados em novas moléculas de glicose. Em um ambiente com disponibilidade de glicose reduzida, a conservação dos carbonos torna-se importante para a sobrevivência celular (CHEAH et al., 2014). Com a ativação deste ciclo, micro-organismos e plantas são capazes de metabolizar substratos contendo apenas duas moléculas de carbono como etanol e acetato, para a produção de glicose quando estas são as únicas fontes de carbono disponíveis (LORENZ; FINK, 2002).

Dentre as enzimas que participam do ciclo do glioxilato destacam-se a isocitrato liase e a malato sintase sendo estas as únicas que apresentam atividade específica e limitada a este ciclo (LORENZ; FINK, 2001) tornando-se alvos atrativos para a atuação de novos antifúngicos, pois até o momento não foram identificados genes ortólogos destas enzimas em humanos (CHEAH et al., 2014).

Resumidamente, o ciclo do glioxilato apresenta duas etapas principais. Primeiramente, o isocitrato (contendo seis carbonos) é hidrolisado em succinato (quatro carbonos) e glioxilato (dois carbonos) através da enzima isocitrato liase. Na segunda etapa, o acetil-CoA (dois carbonos) é condensado com o glioxilato para a produção de malato (quatro carbonos) através da enzima malato sintase. O malato, que é intermediário do ciclo do ácido tricarboxílico, é convertido em oxaloacetato, em citrato (através da adição de outra molécula de Acetil-CoA) e depois em isocitrato novamente. Desta forma, compostos que apresentam duas moléculas de carbono reabastecem os intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico, através do ciclo do glioxilato (LORENZ; FINK, 2002). O resumo esquemático destes ciclos pode ser observado na figura 10.

**Figura 10.** Representação esquemática da via do ciclo do glicoxilato e do ácido tricarboxílico em fungos



Fonte: Adaptado de Lorenz; Fink (2002).

O gene que codifica a enzima isocitrato liase também foi induzido quando *T. rubrum* foi co-cultivado com queratinócitos humanos HaCat nos resultados obtidos por Komoto et al. (2015) através de análise de expressão gênica por PCR quantitativo. A indução deste mesmo gene e do gene que codifica a enzima malato sintase também foi observada por Zaugg et al. (2009) quando o dermatófito *T. rubrum* foi cultivado em meio de cultura contendo queratina. Em adição, Staib et al.(2009) observaram a indução destes mesmos genes pelo dermatófito *Arthroderma benhamiae* através de um modelo de infecção *in vivo*, sendo que nestes últimos trabalhos citados a expressão gênica foi avaliada por *Microarray*.

Portanto, os dados obtidos acima corroboram com os dados observados neste trabalho, evidenciando a importância desses genes na ativação da via do ciclo do glicoxilato como via alternativa para a adaptação nutricional do dermatófito *T. rubrum*, quando em contato com seu hospedeiro.

#### 4.5.4 Genes relacionados com processos metabólicos

A categoria que representou os genes envolvidos em processos metabólicos apresentou vários genes modulados conforme pode ser observado na tabela 7.

**Tabela 7.** Genes relacionados com processos metabólicos

<b>ID</b>	<b>Descrição do produto gênico</b>	<b>Log<sub>2</sub> Fold Change</b>
TERG_03102	Sterol 24-C-methyltransferase (ERG6)	2.1
TERG_08104	Sodium transport atpase	2.0
TERG_02811	Hypothetical protein ( <i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 acetyl xylan esterase)	1.4
TERG_08333	Delta 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	1.3
TERG_07691	Nonspecific lipid-transfer protein	1.1
TERG_07222	Carbonic anhydrase	1.1
TERG_01270	AMP dependent ligase	1.1

Dentre os genes modulados que estão envolvidos em processos metabólicos durante o co-cultivo de *T. rubrum* com queratinócitos humanos, foi selecionado o gene que codifica a enzima esterol 24-C-metiltransferase devido ao fato de esta estar envolvida na via de biossíntese do ergosterol, conforme será discutido a seguir.

O ergosterol é o maior esterol presente em fungos e assim como o colesterol em mamíferos, ele é responsável pela fluidez e permeabilidade da membrana plasmática (IWAKI et al., 2008) além de ser importante para a função adequada de muitas enzimas ligadas à membrana como, a quitina sintetase, que é importante para o crescimento e divisão celular (WHITE; MARR; BOWDEN, 1998).

Deste modo, a ausência deste esterol em mamíferos faz com que o estudo da via biossintética do ergosterol seja um alvo atrativo para o desenvolvimento de drogas antifúngicas que causem menos efeitos adversos ao hospedeiro (NES et al., 2008) e que possam solucionar a problemática de resistência que alguns fungos apresentam às drogas comercialmente disponíveis que já atuam no ergosterol e em enzimas de sua biossíntese, como a anfotericina B, antifúngicos azólicos e alilaminas como a terbinafina (WHITE; MARR; BOWDEN, 1998; GHANNOUM; RICE, 1999)

Dentre os genes que codificam as enzimas participantes desta via, o ERG6 vem se mostrando importante alvo nesta nova estratégia terapêutica (NES et al., 2008). Um estudo de genômica comparativa entre fungos que causam doenças em humanos realizado por Abadio et al. (2011), revelou que o gene ERG6 estava presente em todos os fungos patogênicos avaliados e destacaram este gene como alvo promissor para a pesquisa e desenvolvimento de novas drogas. Este gene é responsável por codificar a enzima esterol 24-C-metiltransferase, pertencente à família das transferases. A 24 SMT apresenta a propriedade de transferir grupos metil além de desempenhar um papel principal na produção de esteróides, especialmente para a biossíntese de ergosterol (AZAM et al., 2014)

Conforme observado na tabela 7, o gene ERG6 foi induzido quando *T. rubrum* foi co-cultivado com queratinócitos humanos em 24 horas o que pode sugerir que este seja um alvo importante durante o processo infeccioso. A indução deste gene durante o co-cultivo corrobora com os resultados obtidos por Komoto et al. (2015), que utilizou a técnica de PCR quantitativo para verificar que o gene ERG6 também foi induzido quando *T. rubrum* foi co-cultivado nas mesmas condições utilizadas no presente trabalho.

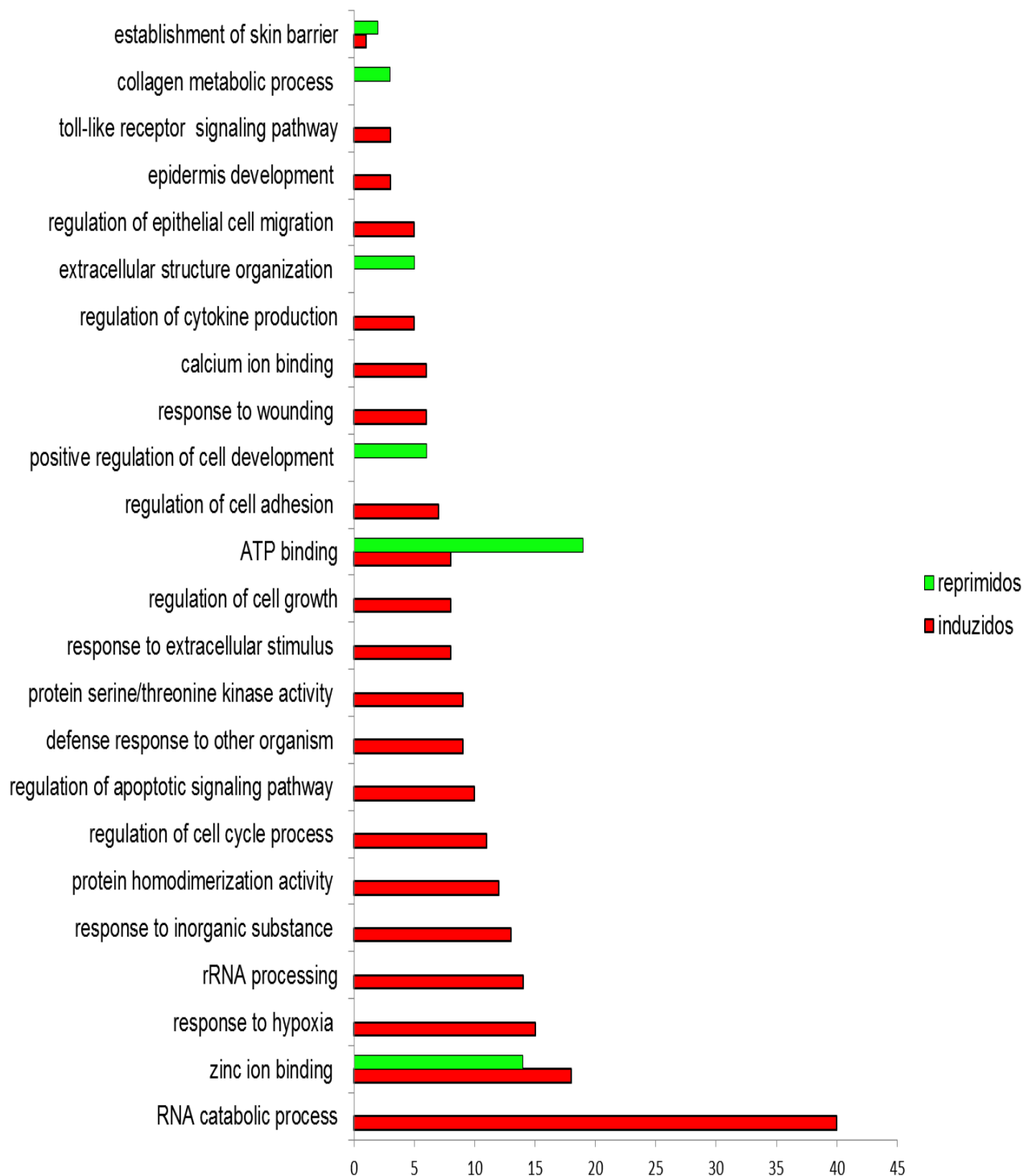
Apesar de este gene não ser considerado como o principal para a biossíntese de ergosterol, já que em cepas mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* com deleção do gene ERG6 não se observou alterações na esporulação, pode-se considerar que alterações nesse gene levam às alterações na permeabilidade e fluidez da membrana fúngica (GABER et al., 1989) dificultando o transporte de nutrientes para o desenvolvimento e sobrevivência de *T. rubrum* no hospedeiro, o que faz deste gene um alvo atrativo para antifúngicos no tratamento de dermatofitoses.

#### **4.6 CATEGORIZAÇÃO FUNCIONAL DOS GENES DE QUERATINÓCITOS HUMANOS HACAT DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM RESPOSTA AO CO-CULTIVO COM *T. rubrum***

Para avaliar quais as funções moleculares e processos biológicos que os genes humanos modulados no co-cultivo com *T. rubrum* estavam inseridos, foi realizada a categorização funcional dos genes diferencialmente expressos através do software

virtual *Enrichr* (CHEN et al., 2013;KULESHOV et al., 2016 ). As categorias que obtiveram o maior número de genes induzidos e reprimidos estão representadas na figura 11.

**Figura 11.** Categorização funcional dos genes de queratinócitos humanos HaCat diferencialmente expressos em resposta ao co-cultivo com *T. rubrum* por 24 horas.





Após o enriquecimento funcional, foi possível avaliar quais funções moleculares e biológicas eram relevantes para o estudo da resposta dos queratinócitos humanos co-cultivados com o dermatófito *T. rubrum*. Para isso, foram escolhidas as categorias referentes ao estabelecimento da barreira epidermal, resposta de defesa à outros organismos, regulação na produção de citocinas, regulação da migração epitelial e resposta à lesões para uma melhor compreensão de quais genes estão envolvidos na resposta do hospedeiro frente às infecções causadas por este fungo.

#### 4.6.1 Genes relacionados com a resposta de defesa humana a micro-organismos

Uma das categorias mais importantes para o estudo da interação entre fungo-hospedeiro é a que envolve os genes que participam da resposta de defesa da célula humana quando esta é colonizada pelo micro-organismo invasor. A tabela 8 apresenta os genes de defesa celular dos queratinócitos humanos modulados em resposta ao co cultivo com *T. rubrum*.

**Tabela 8.** Genes relacionados com a resposta de defesa do hospedeiro a outros organismos

ID	Descrição do produto gênico	Log <sub>2</sub> Fold Change
SERPINE1	Plasminogen activator inhibitor 1	3.5
BNIP3	BCL2 interacting protein 3 like	3.0
SLC11A1	Natural resistance-associated macrophage protein 1	2.2
DDIT4	DNA damage inducible transcript 4	2.2
RNASE7	Ribonuclease 7	2.2
APOBEC3G	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 3G	2.1
CYP1A1	Cytochrome P450 1A1	1.7
RPL39	60S ribosomal protein L39	1.6
IER3	immediate early response 3	1.5

Como um dos mecanismos de defesa celular inato, os queratinócitos produzem peptídeos com atividade antimicrobiana (AMPs) como: catelecidinas, defensinas e ribonucleases (BECKNELL; SPENCER, 2016) visando à eliminação do patógeno através

da lise de suas membranas ou recrutando leucócitos para o local infectado (HARDER; SCHRÖDER, 2002; RADEMACHER et al., 2016).

Neste trabalho, observou-se a indução de uma dessas ribonucleases, a RNase7 (tabela 8), conhecida por apresentar atividade antimicrobiana contra diversos patógenos e que será discutida em maiores detalhes a seguir.

A RNase 7, pertencente a família RNase A, foi primeiramente isolada do estrato córneo de pessoas saudáveis e foi caracterizada por apresentar potencial atividade antimicrobiana *in vitro* contra *C. albicans*, *Pichia pastoris*, *T. rubrum* e bactérias Gram positivas e Gram negativas (HARDER; SCHRÖDER, 2002; MEHRA et al., 2012; BECKNELL; SPENCER, 2016; RADEMACHER et al., 2016). Outras ribonucleases pertencentes a esta mesma família também apresentam potencial antimicrobiano como as RNase2 e RNase3 com atividade antiviral e, assim como a RNase7, a RNase5 e RNase8 desempenham importante função na defesa do hospedeiro contra micro-organismos patogênicos. (RADEMACHER et al., 2016).

O gene RNASE7 é expresso em vários tecidos epiteliais, principalmente nos queratinócitos, e sua expressão é aumentada em pacientes que apresentam psoríase, dermatites atópicas, dermatofitoses e infecções do trato urinário (BECKNELL; SPENCER, 2016; RADEMACHER et al., 2016). O aumento da expressão deste gene em queratinócitos é induzido por citocinas pró-inflamatórias (interferon- $\gamma$ , interleucina-1 $\beta$ , interleucina- 17A e 17C) assim como também pelo próprio estímulo microbiano quando o micro-organismo entra em contato com a célula.

Os mecanismos que conferem à ribonuclease 7 propriedades antimicrobianas ainda são poucos conhecidos, entretanto, estudos funcionais recentes sugerem que a atividade antimicrobiana esteja no domínio N-terminal do peptídeo, que é comum entre todos os membros da família RNase A com atividade antimicrobiana (TORRENT et al., 2013).

Em relação ao mecanismo de ação, este já foi caracterizado em bactérias. Estudos de *binding* realizados por Huang et al. (2007) demonstraram que a RNase 7 se liga na região de carga negativa da membrana bacteriana causando sua ruptura por interações eletrostáticas. Além disso, Torrent et al. (2010) concluíram que o produto do gene RNase7 é capaz de despolarizar a membrana citoplasmática das bactérias *E.coli* e

*S.aureus* e se ligar aos lipopolissacarídeos e peptídioglicano presentes na parede celular das bactérias Gram- negativas e Gram-positivas, respectivamente.

O resultado da indução do gene que codifica a RNase 7 observado neste trabalho corrobora com o resultado obtido por Firat et al. (2014) que também relataram o aumento da expressão de RNase7 quando células de queratinócitos foram expostas aos conídios de *T. rubrum*. Com base nesses dados, pode-se sugerir que a produção deste peptídeo antimicrobiano pelos queratinócitos durante o co-cultivo seja um recurso de defesa importante quando estes são infectados pelo dermatófito *T. rubrum*.

Outro gene modulado neste trabalho que também merece destaque devido sua importância na resposta de defesa do hospedeiro é o gene SLC11A1 também conhecido como Nramp1, que codifica uma proteína integral de membrana expressa em fagolisossomos de macrófagos e em compartimentos intracelulares de neutrófilos e células dendríticas (NAIRZ et al., 2009).

Esta proteína atua diretamente no transporte de íons divalentes, como ferro e manganês, ativando macrófagos e exercendo também vários efeitos pleiotrópicos no sistema imunológico inato (STOBER et al., 2007).Dentre estes efeitos destacam-se: regulação da produção de quimiocinas e citocinas como a proteína inflamatória de macrófagos 1- $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), fatores de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina (IL) 1- $\beta$ , formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e no processamento e apresentação de antígenos (BLACKWELL et al., 2000; BLACKWELL et al., 2001; STOBER et al., 2007; NAIRZ et al., 2009).

Além de contribuir com o sistema imunológico inato, a proteína SLC11A1 também é caracterizada por apresentar potencial atividade antimicrobiana, conferindo proteção ao hospedeiro contra ataque de patógenos intracelulares como *Salmonella*, *Micobactérias* e *Leishmania*, possivelmente pela capacidade que esta proteína apresenta de regular a homeostasia de ferro em macrófagos conforme será descrito a seguir (BLACKWELL et al., 2000; BLACKWELL et al., 2001; NAIRZ et al., 2009).

A disponibilidade de ferro intracelular influencia fortemente a eficácia das funções imunológicas que os macrófagos apresentam. A sobrecarga de ferro em macrófagos reduz a expressão de fatores de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e de moléculas pertencentes ao complexo de

histocompatibilidade de classe II (MHC II), prejudicando a produção de citocinas e apresentação de antígenos via moléculas de MHC. Sendo assim, os macrófagos controlam rigidamente o equilíbrio entre o armazenamento intracelular e o efluxo de ferro para o citoplasma (NAIRZ et al., 2009). Em contrapartida, o ferro é essencial para promover o crescimento e proliferação de micro-organismos, principalmente os patógenos humanos, sendo então a privação de disponibilidade de ferro intracelular uma estratégia de defesa importante para o hospedeiro (NAIRZ et al., 2009).

Estudos realizados por Nairz et al. (2009) evidenciaram que o gene SLC11A1 exerce múltiplas funções quando macrófagos foram infectados *in vitro* por *Salmonella*, influenciando tanto a expressão de resposta imune antibacteriana como o acesso da bactéria pelo ferro intracelular, cujo nível foi reduzido em macrófagos infectados. Além disso, a redução de ferro intracelular promoveu o aumento da produção de fator de necrose tumoral  $\alpha$ , interleucina 6, assim como o aumento da expressão de iNOS.

Desta forma, SLC11A1 é capaz de reduzir a concentração de ferro intracelular de macrófagos infectados, privando o micro-organismo invasor do ferro essencial para sua multiplicação e concomitantemente promove o aumento da produção de moléculas efetoras antimicrobianas (NAIRZ et al., 2009).

Apesar de o aumento da expressão deste gene como mecanismo de defesa do hospedeiro ser mais elucidado para macrófagos, estudos realizados por Noronha et al. (2014) relataram o aumento da expressão do gene SLC11A1 em células de queratinócitos de pacientes que sofreram queimaduras severas sugerindo também que este gene participe da resposta imune inata quando há uma lesão tecidual.

Em um processo infeccioso por dermatófitos também ocorre a lesão tecidual, já que conforme dito anteriormente, o fungo secreta proteases para a degradação da queratina presente nos tecidos para sua nutrição como a DPPV e LAP2 descritas neste trabalho. O aumento da expressão do gene SLC11A1 pelos queratinócitos quando em co-cultivo com *T. rubrum* pode sugerir um mecanismo de defesa importante por parte do hospedeiro, já que este gene está relacionado com a ativação de macrófagos e regulação de citocinas e quimiocinas do sistema imune inato. Além disso, apesar dos queratinócitos não serem células fagocitárias, experimentos de microscopia eletrônica demonstraram que no co-cultivo aqui realizado há a penetração da hifa de *T. rubrum* no

interior da célula de queratinócitos (dados não mostrados) o que pode sugerir também que a expressão do gene SLC11A1 possa ser uma tentativa de diminuir a disponibilidade de ferro para o desenvolvimento de *T. rubrum* quando este infecta o tecido, sendo que um transportador MFS de ferro de *T. rubrum* (TERG\_03174) encontra-se reprimido (Anexo A- tabela 2) durante o co-cultivo.

#### 4.6.2 Genes relacionados com a produção e regulação de citocinas

Outra categoria importante para a compreensão dos mecanismos de defesa imune do hospedeiro foi a que relacionou os genes envolvidos na produção e regulação de citocinas, onde se enquadrou novamente o gene SLC11A1, porém agora com destaque para o gene CSF2.

**Tabela 9.** Genes relacionados com a produção e regulação de citocinas

<b>ID</b>	<b>Descrição do produto gênico</b>	<b>Log<sub>2</sub> Fold Change</b>
SERPINE1	Plasminogen activator inhibitor 1	3.5
CSF2	Colony stimulating factor 2	2.8
SLC11A1	Natural resistance-associated macrophage protein 1	2.2
HMOX1	Heme oxygenase 1	1.6
UBB	Ubiquitin B	1.2

A proteína codificada pelo gene CSF2 ou GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) é uma citocina responsável pela proliferação, diferenciação e aumento das funções imunológicas de granulócitos, macrófagos, monócitos e células dendríticas favorecendo a defesa do hospedeiro contra um amplo espectro de organismos invasores (HAMILTON, 2002).

A citocina GM-CSF é produzida por vários tipos celulares incluindo macrófagos, mastócitos, células T, fibroblastos, células endoteliais e algumas células epiteliais como os queratinócitos (SHI et al., 2006; TANI et al., 2007) e sua atividade biológica é exercida através da sua ligação à receptores de superfície celular (GM-CSFR) expressos nestas células (SHI et al., 2006).

Em condições normais, a GM-CSF encontra-se em concentrações muito baixas sendo até mesmo indetectável, entretanto, há um aumento considerável em sua quantidade quando há o estímulo de resposta imunológica, como na presença de lipopolissacarídeos bacterianos. Além de aumentar a resposta imune na presença de antígenos, esta citocina também é capaz de alterar o balanço da diferenciação de linfócitos Th1 e Th2 (SHI et al., 2006).

Durante o co-cultivo de queratinócitos com *T. rubrum* por 24 horas, observou-se a indução do gene CSF2 (tabela 9) sugerindo que esta citocina seja expressa pelos queratinócitos para o recrutamento e ativação de células do sistema imune como macrófagos e células dendríticas para o local da infecção, favorecendo a resposta de defesa do hospedeiro. Resultados similares foram obtidos por Shiraki et al. (2006) que identificou o aumento da expressão de GM-CSF quando células de queratinócitos foram infectadas pelo dermatófito *Arthroderma benhamiae*.

Devido seu importante papel para o sistema imune, estudos apontam para o uso clínico da citocina GM-CSF como um adjuvante imunológico para o tratamento de diversas doenças, sendo já empregada no tratamento de pacientes com neutropenia submetidos à quimioterapia, em portadores do vírus da AIDS e para recém-transplantados de medula óssea (HÜBEL; DALE; LILES, 2002; SHI et al., 2006).

Estudos também apontam para o uso de GM-CSF como adjuvante para o tratamento de infecções fúngicas (HÜBEL; DALE; LILES, 2002). Em um estudo experimental em ratos com candidemia, o tratamento com GM-CSF aumentou a taxa de sobrevivência dos animais e eliminação de *C. albicans* do fígado e baço (LIEHL, et al., 1994). Já em estudos realizados por Bodey et al. (1994) avaliaram o efeito do uso concomitante de anfotericina B e GM-CSF em pacientes neutropênicos com infecções fúngicas causadas pelas espécies do gênero *Aspergillus* e *Candida*, sendo que dos 8 pacientes avaliados ao total, 6 responderam positivamente ao tratamento e destes 4 se curaram completamente da infecção. Já Natarajan et al. (1998) avaliaram o efeito sinérgico de fluconazol com GM-CSF cujos resultados demonstraram aumento do efeito deste antifúngico para o combate de *C. albicans*.

Apesar dos resultados relatados serem promissores como uma nova estratégia para o tratamento de infecções fúngicas principalmente em pacientes

imunocomprometidos cujas infecções apresentam maior gravidade, o uso de GM-CSF pode induzir uma resposta hiper inflamatória devido ao aumento excessivo do número de neutrófilos sendo necessários estudos clínicos maiores para que esta citocina possa ser clinicamente usada no tratamento de infecções fúngicas (POSCH et al., 2017).

#### 4.6.3 Genes relacionados com o estabelecimento da barreira epidérmica

Apesar de esta categoria não estar entre as mais representativas em números de genes modulados, ela foi escolhida devido à modulação do gene CASP14, FLG e KRT1 cujos estudos demonstram grande participação destes para a formação e manutenção da barreira da epiderme e que serão discutidos a seguir.

**Tabela 10.** Genes relacionados com o estabelecimento da barreira da epiderme

<b>ID</b>	<b>Descrição do produto gênico</b>	<b>Log<sub>2</sub> Fold Change</b>
CASP14	Caspase 14	3.7
KRT1	Keratin 1	- 4.0
FLG	Fillagrin	- 1.8

Uma das principais funções da pele humana é a formação de uma barreira para a proteção contra o ataque de patógenos, danos físicos e químicos além de reduzir a perda de água transepidérmica evitando a desidratação (HOFFJAN; STEMMLER, 2007; MCGRATH, 2008; HVID et al., 2011).

Sua formação ocorre através da diferenciação terminal dos queratinócitos em corneócitos, cujo processo denominado de cornificação é similar a apoptose, porém sem que haja a fragmentação da célula em corpos apoptóticos e subsequente fagocitose (ECKHART et al., 2000; LIPPENS et al., 2005). Durante o processo de cornificação, as células de queratinócitos perdem o núcleo, e a constituição celular passa a ser predominantemente de queratina e filagrina, que juntas passam a constituir aproximadamente 80-90% da massa da epiderme (LIPPENS et al., 2005; MCGRATH, 2008; ADDOR; AOKI, 2010).

A filagrina é inicialmente sintetizada como pró-filagrina e somente após modificações pós-traducionais, os fragmentos polipeptídicos da filagrina são quebrados

e liberados. Durante a cornificação, a filagrina agrega a queratina 1, queratina 10 e outros filamentos intermediários dentro do citoesqueleto dos queratinócitos permitindo que estes adquiram a conformação achatada e compactada formando a barreira da epiderme (BROWN; IRVINE, 2008; MCGRATH, 2008). Além de participar da constituição da barreira epitelial, a queratina 1 também é responsável pela manutenção de sua integridade (BROWN; IRVINE, 2008; ROTH et al., 2012; DONG et al., 2017).

Após a compactação dos queratinócitos, a filagrina é quebrada para a liberação de aminoácidos higroscópicos que irão aumentar a flexibilidade da camada cornificada, além de contribuir para a retenção de água na barreira epitelial mantendo a hidratação natural da pele (BROWN; IRVINE, 2008; MCGRATH, 2008)

Durante a formação da barreira da epiderme e da quebra da filagrina, ocorre o aumento da expressão da caspase 14, sendo esta a única caspase que não está envolvida na via apoptótica (HVID et al., 2011; GKEGKES et al., 2013). A expressão da caspase 14 é restrita a algumas camadas epiteliais e sua expressão está associada ao processo de diferenciação dos queratinócitos. Além disso, é classificada também como uma caspase inflamatória, porém estudos ainda devem ser elucidados para afirmar se esta pode atuar como ativadora de citocinas (LIPPENS et al., 2005).

Sendo assim, pode-se sugerir que as proteínas caspase 14, filagrina e queratina 1 atuam em conjunto e são essenciais para a manutenção da integridade da estrutura cornificada da pele. Denecker et al. (2007) demonstraram que ratos deficientes em caspase 14 mostraram baixo acúmulo de fragmentos de filagrina no estrato córneo e aumento da perda de água transepidérmica. Ademais, Jensen et al. (2007) também demonstraram o aumento de desidratação e diminuição da expressão da filagrina em casos de *tinea corporis* causadas pelo dermatófito *T. rubrum*. Já Roth et al. (2012) relataram que ratos com deleção do gene KRT1 tiveram alterações na integridade da barreira epidérmica.

Em relação aos resultados obtidos durante o co-cultivo de queratinócitos com *T. rubrum*, observou-se a indução da caspase 14 e repressão dos genes que codificam a filagrina e a queratina 1 (tabela 10) indicando alterações que poderiam levar à diminuição da integridade da barreira epidérmica favorecendo a instalação e invasão do fungo ao tecido. Sabe-se que dermatófitos como *T. rubrum* se ligam à queratina para



utilizá-la como nutriente em um processo infeccioso além de causarem profundas mudanças na função e estrutura da barreira epitelial (LEE et al., 2011). Sendo assim, a repressão dos genes FLG e KRT1 observada neste trabalho pode sugerir como ocorre molecularmente a diminuição da função da barreira epidérmica nas dermatofitoses causadas por esse fungo, sendo a filagrina e queratina 1 essenciais para a formação da camada cornificada, conforme descrito em parágrafos anteriores.

Distúrbios na função da barreira epitelial são acompanhados também por mudanças na proliferação e diferenciação da epiderme (JENSEN et al., 2007), fato este que poderia justificar o aumento da expressão do gene CASP14 possivelmente como recurso para aumentar a diferenciação de queratinócitos para corneócitos na tentativa de reforçar a estrutura da barreira ou para reparar os danos ocasionados pela repressão de genes FLG e KRT1 como resposta de defesa do hospedeiro quando queratinócitos são infectados por *T. rubrum*.

#### **4.6.4 Genes relacionados com a migração de células epiteliais**

A imunidade inata do hospedeiro deve fornecer mecanismos de defesa contra micro-organismos invasores além de contribuir para o reparo dos tecidos afetados e regular a atividade e influxo das células envolvidas na imunidade adquirida (PARKS; WILSON; LÓPEZ-BOADO, 2004).

Quando ocorre uma lesão da barreira do epitélio criando um ponto de entrada para micro-organismos e toxinas, as células epiteliais respondem rapidamente visando à cicatrização do ferimento através do aumento da proliferação celular, remodelação do tecido afetado além de facilitar a migração de células epiteliais e células inflamatórias como linfócitos, mastócitos e monócitos para que estas possam chegar rapidamente aos locais afetados (PARKS; WILSON; LÓPEZ-BOADO, 2004; PURWAR et al., 2008).

Sendo assim, a categoria que relacionou os genes envolvidos na migração de células epiteliais também foi escolhida para análise, principalmente devido a modulação do gene que codifica a metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9) conforme demonstrado abaixo na tabela 11.

**Tabela 11.** Genes relacionados com a migração de células epiteliais

<b>ID</b>	<b>Descrição do produto gênico</b>	<b>Log<sub>2</sub> Fold Change</b>
STC1	Stanniocalcin 1	3.1
RGCC	Regulator of cell cycle	2.8
EFNA1	Ephrin A1	2.5
MMP9	Matrix metalloproteinase 9	2.0
HBEGF	Heparin binding EGF like growth factor	1.8

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são conhecidas por influenciar na remodelação de tecidos lesionados através da degradação da matriz extracelular (PURWAR, 2008). No entanto, esta não é nem a única e nem a principal função dessas enzimas já que estudos apontam que as MMPs são capazes de atuar principalmente em proteínas não pertencentes à matriz extracelular, como citocinas, quimiocinas, receptores e peptídeos antimicrobianos, muitas vezes potencializando o efeito dos mesmos. Ademais, as MMPs não são expressas em tecidos saudáveis, sendo sua expressão detectada somente em processos de reparo de tecidos infectados ou inflamados (PARKS, WILSON; LÓPEZ-BOADO, 2004).

Dentre as metaloproteinases de matriz existentes em humanos, a MMP9 também conhecida como gelatinase B, é uma das mais importantes endopeptidases envolvidas na patofisiologia de diversas doenças de pele, sendo responsável pela clivagem de fibronectina, elastina e colágeno IV da membrana basal. Na pele, a MMP-9 é expressa por eosinófilos, mastócitos, células de Langerhans e queratinócitos (PURWAR et al., 2008).

Assim como todas MMPs, a MMP-9 é secretada na forma de pró-enzima, sendo biologicamente inativa até que ocorra a clivagem da cisteína que bloqueia a atividade de seu sítio catalítico (VISSE; NAGASE, 2003; PARKS, WILSON; LÓPEZ-BOADO, 2004). Estudos recentes demonstraram que a MMP-9 auxilia na migração de células inflamatórias para a epiderme (RATZINGER et al., 2002), demonstrando que as metaloproteinases desempenham importante papel na regulação do fluxo de células imunocompetentes para dentro e para fora do compartimento epidérmico (PURWAR et al., 2008) .

Todavia, a atividade enzimática das MMPs deve ser extremamente regulada já que sua ação descontrolada pode causar danos ao tecido. Caso haja um desequilíbrio entre a atividade das MMPs e seus inibidores que bloqueiam suas atividades catalíticas (TIMPs- Tissue Inhibitor of Metalloproteinase), pode ocorrer a degradação excessiva da matriz extracelular com conseqüente destruição do tecido (MURPHY; NAGASE, 2008).

As alterações nos padrões de expressão de MMP-9 estão associadas com algumas doenças. Como a MMP-9 degrada o colágeno tipo IV, principal componente da membrana basal, a ativação excessiva desta metaloprotease pode causar danos ao tecido facilitando a disseminação do patógeno além de promover o aumento da inflamação devido ao fato de facilitar a migração de células inflamatórias ao local afetado (MURPHY; NAGASE, 2008).

Lee et al. (2002) avaliaram o efeito da expressão de MMP-9 em infecções oculares causadas pelo vírus da Herpes. Os resultados obtidos indicaram aumento da expressão de MMP-9 contribuindo para a angiogênese inflamatória, efeito este que promove o agravamento da ceratite provocada por este vírus. Já Campos et al. (2014) relataram que o aumento descontrolado da expressão de MMP-9 leva a degradação excessiva da membrana basal da pele e aumento da migração de células inflamatórias que contribuem para o desenvolvimento de úlceras em pacientes com Leishmaniose cutânea. Apesar de estes resultados indicarem que o aumento da expressão de MMP-9 pode estar associado ao agravamento de algumas doenças, pouco se sabe sobre a expressão de MMPs e seus efeitos durante o processo infeccioso causado por dermatófitos (KITISIN; LUPLERTLOP, 2015).

Somente com os dados de expressão gênica da indução do gene MMP9 durante o co-cultivo, não é possível identificar se esta enzima é ativada durante um processo infeccioso causado por *T. rubrum*. Possivelmente, esta enzima seja expressa pelos queratinócitos para promover o reparo à barreira epitelial já que esta é lesionada devido a degradação dos tecidos queratinizados provocada pela penetração do fungo ao tecido.

Além disso, as infecções causadas por *T. rubrum* tem como característica apresentar caráter não inflamatório (PERES et al., 2010; CRIADO et al., 2011), o que nos sugere que a participação desta enzima nas dermatofitoses causadas por este fungo não acarrete no aumento da inflamação, conforme relatado em outras condições

patológicas. No entanto, vale ressaltar que em pacientes imunocomprometidos as dermatofitoses apresentam maior gravidade com possível disseminação do fungo para camadas mais profundas da pele (PERES et al., 2010; ACHTERMAN; WHITE, 2012) já que o sistema imunológico do paciente encontra-se debilitado. Considerando que esta enzima em sua forma ativa atua na quebra da matriz extracelular, se tornam válidos estudos futuros que possam verificar se esta enzima pode ou não facilitar também a disseminação do fungo e agravamento da doença nesses tipos de pacientes.

#### 4.6.5 Genes relacionados com resposta às lesões teciduais

Conforme dito anteriormente, o reparo do tecido epitelial quando afetado por uma injúria é um aspecto importante para a correta função da barreira epidérmica e eficiência da resposta imune inata. Sendo assim, a categoria de genes relacionados com resposta às lesões também foi escolhida para análise, com destaque para o gene HAS2 que codifica o tipo 2 da enzima hialurano sintase, que será discutida a seguir.

**Tabela 12.** Genes relacionados com resposta às lesões

<b>ID</b>	<b>Descrição do produto gênico</b>	<b>Log<sub>2</sub> Fold Change</b>
SLC11A1	Natural resistance-associated macrophage protein 1	2.2
JUN	Jun proto-oncogene, AP-1	1.8
CYP1A1	Cytochrome P450 family 1 subfamily A member	1.7
ADM	Adrenomedullin	1.7
HMOX1	Heme oxygenase 1	1.6
LGALS1	Galectin 1	1.5
HAS2	Hyaluronan synthase 2	1.4

O hialurano, também conhecido como ácido hialurônico (HA) é considerado um dos maiores componentes da matriz extracelular, além de desempenhar importante função na regulação do reparo de tecidos lesionados auxiliando na ativação de células inflamatórias e na estimulação de quimiocinas e citocinas através de sua interação com receptores TLRs (JIANG; LIANG; NOBLE, 2007; JIANG; LIANG; NOBLE, 2011; MALAISSE et al., 2014). Acredita-se que o HA também possa estar envolvido na regulação, proliferação e migração de células de queratinócitos, entretanto ainda não há

um consenso entre a real participação deste nesses processos (MALAISSE et al., 2014; MALAISSE et al., 2015).

Em humanos, o HA existe em todos os tecidos, entretanto, é mais abundante no vítreo ocular, cordão umbilical, válvulas cardíacas, pele e tecidos esqueléticos (JIANG; LIANG; NOBLE, 2007; JIANG; LIANG; NOBLE, 2011). Sua síntese é realizada pela enzima hialurano sintase, que é dividida em três tipos: HAS 1, HAS 2 e HAS 3 (MALAISSE et al., 2015). A distribuição, expressão nos tecidos e suas funções diferem umas das outras, já que fatores como tamanho do polímero de HA gerado e receptores no qual as enzimas irão se ligar são determinantes para a função que irão desempenhar (JIANG; LIANG; NOBLE, 2007; JIANG; LIANG; NOBLE, 2011; MALAISSE et al., 2015; JOKELA et al., 2017).

O metabolismo de HA é aumentado em situações de injúrias teciduais, como em infecções, exposições a agentes químicos, radiação ultravioleta e em inflamações, sendo que nestes casos são observados aumento de mRNA de HAS2 e HAS3 (JOKELA et al., 2017). Jokela et al. (2017) sugerem que a indução dos genes HAS esteja associada com a liberação de nucleotídeos para o espaço extracelular que ocorre nestas situações de injúrias. A liberação destes nucleotídeos (UTP, UDP, ATP e ADP) age como uma espécie de alarme para a sinalização e ativação dos mecanismos de defesa celular, e conforme observado em seus resultados, a quebra do nucleotídeo UTP pode elevar a expressão do gene HAS2 em células HaCat.

O aumento da expressão dos genes HAS1, HAS2 e HAS3 também está associado a algumas doenças como: fibrose pulmonar, asma (predominantemente HAS2), pneumonia, hepatite viral, aterosclerose, diabetes, entre outras (JIANG, LIANG e NOBLE, 2011), entretanto ainda é escasso o conhecimento da participação destes nas dermatofitoses.

No presente trabalho observa-se a indução do gene HAS2 em células de queratinócitos (tabela 12) quando co-cultivadas na presença de *T. rubrum*, indicando uma possível participação desse gene nas dermatofitoses causadas por este fungo como mais um mecanismo de defesa do hospedeiro para promover o reparo à barreira epitelial que é desestruturada pela secreção de proteases queratinolíticas secretadas pelo fungo durante um processo infeccioso.

Ademais, estudos realizados por Sakai et al. (2007) demonstraram um potencial efeito antifúngico de HA ao inibir o crescimento de *C.albicans in vitro* demonstrando a participação de HA como mecanismo de defesa do hospedeiro frente à infecções causadas por este fungo.

#### 4.7 VALIDAÇÃO DE ALGUNS GENES DO TRANSCRIPTOMA HUMANO E FUNGICO POR PCR QUANTITATIVO

Alguns genes humanos e fúngicos modulados no RNA seq e discutidos neste trabalho foram selecionados para a validação por PCR quantitativo a fim de verificar a correlação do perfil de expressão gênica entre as duas técnicas.

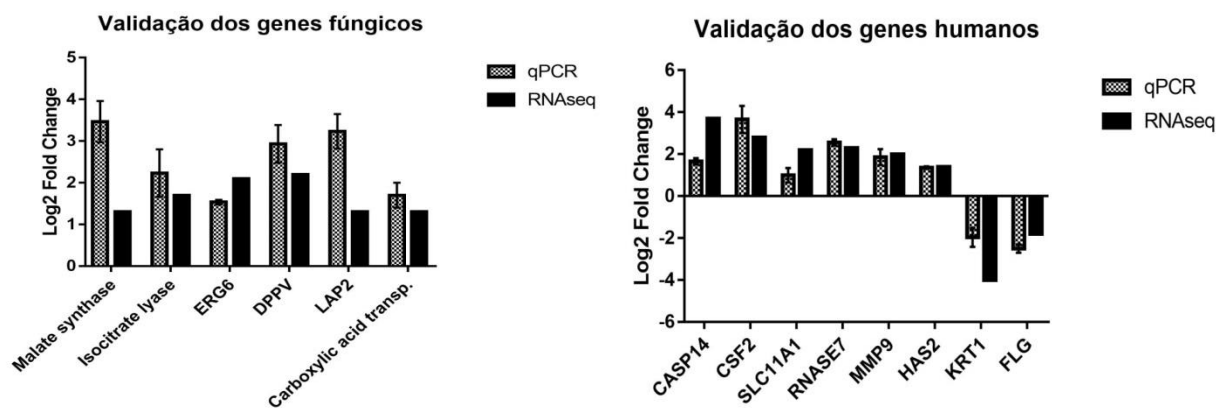
Na tabela 13 estão expostos os valores de expressão em  $\text{Log}_2\text{Fold Change}$  resultantes de ambas as técnicas dos genes selecionados para a validação e que foram utilizados para o cálculo da correlação de Pearson. Na figura 12 está representado o comparativo dos valores de  $\text{Log}_2\text{Fold Change}$  obtidos por RNA seq e qPCR com o correspondente valor de correlação entre as variáveis.

**Tabela 13.** Valores de expressão gênica por RNA seq e qPCR dos 14 genes selecionados para validação

ID	Produto gênico	qPCR	RNAseq
TERG_01281	Malate synthase	3.5	1.7
TERG_11638	Isocitrate lyase	2.2	1.3
TERG_03102	Sterol 24-C-methyltransferase (ERG6)	1.6	2.1
TERG_12606	Dipeptidil peptidase V (DPPV)	2.9	2.2
TERG_08405	Leucine Aminopeptidase 2 (LAP 2)	3.3	1.3
TERG_00916	Carboxilic acid transporter	1.7	1.3
RNASE7	Ribonuclease A family member 7	2.6	2.3
CSF2	Colony Stimulating Factor 2	3.7	2.8
MMP9	Matrix metallopeptidase 9	1.9	2.6
HAS2	Hyaluronan synthase 2	1.4	1.4
SLC11A1	Natural resistance-associated macrophage protein 1	1.1	2.2
CASP14	Caspase 14	1.7	3.7
KRT1	Keratin 1	-2.0	-4.0
FLG	Fillagrin	-2.0	-1.8

(\*) TERG: Número de acesso do gene no genoma de *T. rubrum*

**Figura 12.** Comparativo entre as modulações dos genes humanos e fúngicos pelas técnicas de RNA seq e qPCR e o coeficiente de correlação (r)



Coeficiente de correlação (r) = 0,8

Conforme é possível observar na figura 11, os resultados de expressão gênica obtidos por RNAseq apresentaram forte correlação ( $r= 0,8$  com  $p < 0.001$ ) com os valores obtidos por qPCR sugerindo que o sequenciamento realizado apresentou resultados confiáveis, ressaltando também a reprodutibilidade e acurácia da técnica.

## V. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados conclui-se que:

- ✓ O método de co- cultivo entre *T. rubrum* e queratinócitos humanos HaCat por 24 h se mostrou eficaz para análise concomitante dos dois tipos celulares, contribuindo para uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na interação fungo- hospedeiro.
- ✓ Foram modulados 70 genes de *T. rubrum* e 369 genes de queratinócitos HaCat em 24h de co-cultivo;
- ✓ Em relação aos genes modulados de *T. rubrum*, as categorias relacionadas a processos metabólicos, patogenicidade, transporte via membrana e via do glicolito foram escolhidas para o estudo do processo de infecção do fungo durante o co-cultivo com queratinocitos.
- ✓ Dentre os genes avaliados nas categorias citadas acima, sugere-se que em 24h de co-cultivo o fungo ativa os genes DPPV e LAP2 para a degradação da

queratina presente nas células a fim de penetrar no tecido hospedeiro. Possivelmente a partir do momento que este penetra o tecido, o fungo induz os genes que codificam a malato sintase, isocitrato liase e o transportador de ácido carboxílico como forma de adaptação nutricional para que este possa obter nutrientes de fontes alternativas de carbono. Além disso, o fungo ativa o gene ERG6 da via biossintética do ergosterol sendo este um alvo atrativo para o desenvolvimento de novos antifúngicos.

- ✓ Em relação aos genes modulados nos queratinócitos humanos HaCat na presença de *T.rubrum*, foram escolhidas as categorias de estabelecimento da barreira epidérmica, resposta de defesa à outros organismos, regulação na produção de citocinas, regulação da migração epitelial e resposta à lesões teciduais.
- ✓ Sugere-se que os queratinócitos ativem genes específicos para manter a barreira da epiderme e regular a migração de células epiteliais e inflamatórias possivelmente na tentativa de impedir que o fungo penetre ao tecido hospedeiro e favorecer a eliminação do patógeno. Vale ressaltar que dois genes essenciais para a manutenção da barreira como KRT1 e FLG encontram-se reprimidos, o que pode facilitar a invasão do fungo ao hospedeiro.
- ✓ Os queratinócitos induzem genes que codificam peptídeos antimicrobianos como RNASE7 e genes que regulam a produção e regulação de citocinas importantes para a imunidade inata do hospedeiro.
- ✓ Os resultados de expressão gênica obtidos através da técnica de RNAseq apresentaram forte correlação( $r= 0,8$ ) quando comparados aos valores obtidos por qPCR demonstrando a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados assim como a eficácia do sequenciamento realizado neste trabalho.



## REFERÊNCIAS

- ABADIO, A. K. R. et al. Comparative genomics allowed the identification of drug targets against human fungal pathogens. **Bmc Genomics**. v.12, n.1, p.1-10, 2011.
- 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.
- ACHTERMAN, R. R.; WHITE, T. C. A Foot in the Door for Dermatophyte Research. **Plos Pathog**. v.8, n.3, 2012.
- ADDOR, F. A. S.; AOKI, V. Barreira cutânea na dermatite atópica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v.85, n.2, p.184-194, 2010.
- ANDERS, S; HUBER, W. Differential expression analysis for sequence count data. **Genome Biology**. v.11, n.10, p.3-12. 2010.
- AZAM, S. S. et al. Structure and dynamics studies of sterol 24-C-methyltransferase with mechanism based inactivators for the disruption of ergosterol biosynthesis. **Molecular Biology Reports**. v.41, n.7, p.4279-4293, 2014.
- 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.
- BALDO, A. et al. Mechanisms of skin adherence and invasion by dermatophytes. **Mycoses**. v.55, n.3, p.218-223, 2011.
- BECKNELL, B.; SPENCER, J. A Review of Ribonuclease 7's Structure, Regulation, and Contributions to Host Defense. **Ijms**. v.17, n.3, p.1-10, 2016.
- 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, n.1, p.1-6, 2013.
- BITENCOURT, T. A. et al. Transcription profile of *Trichophyton rubrum* conidia grown on keratin reveals the induction of an adhesin-like protein gene with a tandem repeat pattern. **Bmc Genomics**. v.17, n.1, 2016.
- BLACKWELL, J. M. et al. Understanding the multiple functions of Nramp1. **Microbes and Infection**. v.2, n.3, p.317-321, 2000.
- BLACKWELL, J. M. et al. SLC11A1 (formerly NRAMP1) and disease resistance. Microreview. **Cellular Microbiology**. v.3, n.12, p.773-784, 2001.
- BLAKE, J. A.; HARRIS, M. A. The Gene Ontology (GO) Project: Structured Vocabularies for Molecular Biology and Their Application to Genome and Expression Analysis. **Current Protocols in Bioinformatics**. p.721-729, 2008.

- BODEY, G. P. et al. Role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as adjuvant treatment in neutropenic patients with bacterial and fungal infection. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. v.13, n.2, p.18-22, 1994.
- BROWN, S. J.; IRVINE, A. D. Atopic Eczema and the Filaggrin Story. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**. v.27, n.2, p.128-137, 2008.
- CAMPOS, T. M. et al. Matrix Metalloproteinase 9 Production by Monocytes is Enhanced by TNF and Participates in the Pathology of Human Cutaneous Leishmaniasis. **Plos Neglected Tropical Diseases**. v.8, n.11, p.1-8, 2014.
- CANNON, R. D. et al. Efflux-Mediated Antifungal Drug Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v.22, n.2, p.291-321, 2009.
- CASAL, M. et al. Transport of carboxylic acids in yeasts. **Fems Microbiology Reviews**. v.32, n.6, p.974-994, 2008.
- CHEAH, H.; LIM, V.; SANDAI, D. Inhibitors of the Glyoxylate Cycle Enzyme ICL1 in *Candida albicans* for Potential Use as Antifungal Agents. **Plos One**. v.9, n.4, p.1-8, 2014.
- CHEN, E. et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. **Bmc Bioinformatics**. v.14, n.1, p.128-142, 2013.
- CHINNAPUN, D. Virulence Factors Involved in Pathogenicity of Dermatophytes. **Walailak Journal**. v.12 p.573-580, 2015.
- CHU, C. et al. DeGPS is a powerful tool for detecting differential expression in RNA-sequencing studies. **Bmc Genomics**. v.16, n.1, p.1-12, 2015.
- CRIADO, P. R. et al. Micoses superficiais e os elementos da resposta imune. **Anais. Brasileiros de Dermatologia**. v.86, n.4, p.726-731, 2011.
- DAI, Z. et al. Antitumor activity of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, on breast cancer in Vitro and in Vivo. **Cancer Cell International**. v.12, n.1, p.1-8, 2012.
- DENECKER, G. et al. Caspase-14 protects against epidermal UVB photodamage and water loss. **Nature Cell Biology**. v.9, n.6, p.666-674, 2007.
- DONG, X. et al. Critical role of Keratin 1 in maintaining epithelial barrier and correlation of its down-regulation with the progression of inflammatory bowel disease. **Gene**. v.608, p.13-19, 2017.
- DRANGINIS, A. M. et al. A Biochemical Guide to Yeast Adhesins: Glycoproteins for Social and Antisocial Occasions. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.71, n.2, p.282-294, 2007.
- ECKHART, L. et al. Terminal Differentiation of Human Keratinocytes and Stratum Corneum Formation is Associated with Caspase-14 Activation. **Journal of Investigative Dermatology**. v.115, n.6, p.1148-1151, 2000.

- FACHIN, A. L. et al. Role of the ABC transporter TruMDR2 in terbinafine, 4-nitroquinoline N-oxide and ethidium bromide susceptibility in *T. rubrum*. **Journal of Medical Microbiology**. v.55, n.8, p.1093-1099, 2006.
- FIGUEIREDO FILHO, D. B.; SILVA JÚNIOR, J. A. da. Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson (r). **Revista Política Hoje**. v.18, n.1, p.115-146, 2009.
- FIRAT, Y. H. al. Infection of Keratinocytes with *Trichophyton rubrum* Induces Epidermal Growth Factor-Dependent RNase 7 and Human Beta-Defensin-3 Expression. **Plos One**. v.9, n.4, p.1-7, 2014.
- FLECK, C. B.; SCHÖBEL, F.; BROCK, M. Nutrient acquisition by pathogenic fungi: Nutrient availability, pathway regulation, and differences in substrate utilization. **International Journal of Medical Microbiology**. v.301, n.5, p.400-407, 2011.
- GABER, R. F. et al. The yeast gene ERG6 is required for normal membrane function but is not essential for biosynthesis of the cell-cycle-sparking sterol. **Molecular and Cellular Biology**. v.9, n.8, p.3447-3456, 1989.
- GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**. v.12, n.4, p.501-517, 1999.
- GKEGKES, I. D. et al. Expression of caspase-14 and keratin-19 in the human epidermis and appendages during fetal skin development. **Archives of Dermatological Research**. v.305, n.5, p.379-387, 2013.
- GOTZ, S. et al. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. **Nucleic Acids Research**. v.36, n.10, p.3420-3435, 2008.
- HAMILTON, J. GM-CSF in inflammation and autoimmunity. **Trends in Immunology**, v.23, n.8, p.403-408, 2002.
- HARDER, J.; SCHRODER, J. RNase 7, a Novel Innate Immune Defense Antimicrobial Protein of Healthy Human Skin. **Journal of Biological Chemistry**. v.277, n.48, p.46779-46784, 2002.
- HAU, C. S. et al. Immunoresponses in dermatomycoses. **The Journal of Dermatology**. v.42, n.3, p.236-244, 2015.
- HOFFJAN, S.; STEMMLER, S. On the role of the epidermal differentiation complex in ichthyosis vulgaris, atopic dermatitis and psoriasis. **British Journal of Dermatology**. v.157, n.3, p.441-449, 2007.
- HOOG, G. Sybren de et al. Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. **Mycopathologia** v.182, n. 1-2, p.5-31, 25 out. 2016
- HOU, Z. et al. A cost-effective RNA sequencing protocol for large-scale gene expression studies. **Scientific Reports**. v.5, p.1-5, 2015.
- HUANG, X. et al. *Trichophyton rubrum* conidia modulate the expression and transport of Toll-like receptor 2 in HaCaT cell. **Microbial Pathogenesis**. v.83-84, p.1-5, 2015.

HUANG, Y. et al. The Flexible and Clustered Lysine Residues of Human Ribonuclease 7 Are Critical for Membrane Permeability and Antimicrobial Activity. **Journal of Biological Chemistry**. v.282, n.7, p.4626-4633, 2006.

HUBE, B. et al. Dermatomycoses and inflammation: The adaptive balance between growth, damage, and survival. **Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology**. v.25, n.1, p.44-58, 2015.

HÜBEL, K; DALE, D. C.; LILES, W. C. Therapeutic Use of Cytokines to Modulate Phagocyte Function for the Treatment of Infectious Diseases: Current Status of Granulocyte Colony-Stimulating Factor, Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, Macrophage Colony-Stimulating Factor, and Interferon- $\gamma$ . **The Journal of Infectious Diseases**. v. 185, n. 10, p.1490-1501, 15 maio 2002.

HVID, M. et al. Regulation of caspase 14 expression in keratinocytes by inflammatory cytokines - a possible link between reduced skin barrier function and inflammation? **Experimental Dermatology**. v.20, n.8, p.633-636, 2011.

ILLUMINA. Cluster Station User Guide. 2011. Disponível em: <[http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/myillumina/ab41723c-129f-47e1-8000-7282fb605c87/clusterstationuserguide\\_15018818\\_d.pdf](http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/myillumina/ab41723c-129f-47e1-8000-7282fb605c87/clusterstationuserguide_15018818_d.pdf)>. Acesso em: 28 set. 2016.

ILLUMINA. Paired-End Sequencing. Disponível em: <[http://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing/paired-end-sequencing\\_assay.html](http://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing/paired-end-sequencing_assay.html)>. Acesso em: 28 set. 2016.

ILLUMINA. Sequencing Library qPCR Quantification Guide. 2011. Disponível em: <[http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/myillumina/e4a1cd4c-9293-4263-8b7d-fe52650c25eb/sequencing\\_library\\_qpcr\\_quantification\\_guide\\_11322363\\_c.pdf](http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/myillumina/e4a1cd4c-9293-4263-8b7d-fe52650c25eb/sequencing_library_qpcr_quantification_guide_11322363_c.pdf)>. Acesso em: 28 set. 2016.

ILLUMINA. TruSeq® RNA Sample Preparation v2 Guide. 2014. Disponível em: <[http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/samplepreps\\_truseq/truseqrna/truseq-rna-sample-prep-v2-guide-15026495-f.pdf](http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/samplepreps_truseq/truseqrna/truseq-rna-sample-prep-v2-guide-15026495-f.pdf)>. Acesso em: 28 set. 2016.

IWAKI, T. et al. Multiple functions of ergosterol in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Microbiology**. v.154, n.3, p.830-841, 2008.

JACOB, T. R. et al. Rpb2 is a reliable reference gene for quantitative gene expression analysis in the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Medical Mycology**. v.50, n.4, p.368-377, 2012.

JENSEN, J. et al. Barrier Function, Epidermal Differentiation, and Human  $\beta$ -Defensin 2 Expression in *Tinea Corporis*. **Journal of Investigative Dermatology**. v.127, n.7, p.1720-1727, 2007.

JIANG, D.; LIANG, J.; NOBLE, P. W. Hyaluronan as an Immune Regulator in Human Diseases. **Physiological Reviews**. v.91, n.1, p.221-264, 2011.

- JIANG, D.; LIANG, J.; NOBLE, P. W. Hyaluronan in Tissue Injury and Repair. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**. v.23, n.1, p.435-461, 2007.
- JOKELA, T. et al. Human Keratinocytes Respond to Extracellular UTP by Induction of Hyaluronan Synthase 2 Expression and Increased Hyaluronan Synthesis. **Journal of Biological Chemistry**. v.292, n.12, p.4861-4872, 2017.
- KASPEROVA, A. et al. Exposition of dermatophyte *T. mentagrophytes* to L-cystine induces expression and activation of cysteine dioxygenase. **Mycoses: Diagnosis, Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases**. v.57, n.11, p.672-678, 2014.
- KAWAHARA, Y. et al. Simultaneous RNA-Seq Analysis of a Mixed Transcriptome of Rice and Blast Fungus Interaction. **Plos One**. v.7, n.11, 2012.
- KIM, H. K. et al. Increased expression of the aryl hydrocarbon receptor in allergic nasal mucosa, contributing to chemokine secretion in nasal epithelium. **American Journal of Rhinology and Allergy**. v.30, n.4, p.107-112, 2016.
- KING, R. D. et al. Identification of carbon dioxide as a dermatophyte inhibitory factor produced by *Candida albicans*. **Canadian Journal of Microbiology**. v.22, p.1720-1727, 1976.
- KITISIN, T.; LUPLERTLOP, N. Induction by epidermophyton floccosum of human fibroblast matrix metalloproteinase-9 secretion in vitro. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine Public Health**. v.46, n.2, p.268-275, 2015.
- KOMOTO, T. T. et al. Gene Expression Response of *Trichophyton rubrum* during Coculture on Keratinocytes Exposed to Antifungal Agents. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. v.2015, p.1-7, 2015.
- KÖTEN, B. et al. RNase 7 Contributes to the Cutaneous Defense against *Enterococcus faecium*. **Plos One**. v.4, n.7, p.1-9, 2009.
- KULESHOV, M. V. et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. **Nucleic Acids Research**. v.44, n.1, p.90-97, 2016.
- LAKSHMIPATHY, D. T.; KANNABIRAN, K. Review on dermatomycosis: pathogenesis and treatment. **Natural Science**. v.02, n.07, p.726-731, 2010.
- LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**. v.9, n.4, p.357-359, 2012.
- LEE, S. et al. Role of matrix metalloproteinase-9 in angiogenesis caused by ocular infection with herpes simplex virus. **Journal of Clinical Investigation**. v.110, n.8, p.1105-1111, 2002.
- LEE, W. J. et al. Disruption of barrier function in dermatophytosis and pityriasis versicolor. **The Journal of Dermatology**. v.38, n.11, p.1049-1053, 2011.
- LENG, W. et al. Expression dynamics of secreted protease genes in *Trichophyton rubrum* induced by key host's proteinaceous components. **Medical Mycology**. v.47, n.7, p.759-765, 2009.

- LIEHL, E. et al. Prediction of the role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in animals and man from in vitro results. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. v.13, n.2, p.9-17, 1994.
- LIPPENS, S. et al. Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification. **Cell Death and Differentiation**. v.12, p.1497-1508, 2005.
- LIU, T. et al. The use of global transcriptional analysis to reveal the biological and cellular events involved in distinct development phases of *Trichophyton rubrum* conidial germination. **Bmc Genomics**. v.8, n.1, p.100-114, 2007.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**. v.25, n.4, p.402-408, 2001.
- LORENZ, M. C.; FINK, G. R. Life and Death in a Macrophage: Role of the Glyoxylate Cycle in Virulence. **Eukaryotic Cell**. v.1, n.5, p.657-662, 2002.
- LORENZ, M. C.; FINK, G. R. The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. **Nature**. v.412, n.6842, p.83-86, 2001.
- MA, Rui et al. HOXB7-S3 inhibits the proliferation and invasion of MCF-7 human breast cancer cells. **Molecular Medicine Reports**. v.12, p.4901-4908, 2015.
- MALAISSSE, J. et al. Hyaluronan Metabolism in Human Keratinocytes and Atopic Dermatitis Skin Is Driven by a Balance of Hyaluronan Synthases 1 and 3. **Journal of Investigative Dermatology**. v.134, n.8, p.2174-2182, 2014.
- MALAISSSE, J. et al. Hyaluronan Does Not Regulate Human Epidermal Keratinocyte Proliferation and Differentiation. **Journal of Biological Chemistry**. v.291, n.12, p.6347-6358, 2015.
- MARIONI, J. C. et al. RNA-seq: An assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. **Genome Research**. v.9, n.18, p.1509-1517, 2008.
- MARKIEWICZ, M.; PANNEERSELVAM, K.; MARKS, N. Role of Klotho in migration and proliferation of human dermal microvascular endothelial cells. **Microvascular Research**. v.107, p.76-82, 2016.
- MARTINEZ-ROSSI, N. M. et al. Role of pH in the pathogenesis of dermatophytoses. **Mycoses**. v.55, n.5, p.381-387, 2011.
- MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**. v.4, n.2, p.119-128, 2013.
- MCGRATH, J. Filaggrin and the great epidermal barrier grief. **Australasian Journal of Dermatology**. v.49, n.2, p.67-74, 2008.
- MEHRA, T. et al. Alternative approaches to antifungal therapies. **Experimental Dermatology**. v.21, n.10, p.778-782, 2012.
- MONOD, M. Aminopeptidases and dipeptidyl-peptidases secreted by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Microbiology**. v.151, n.1, p.145-155, 2005.

- MONOD, M. et al. Secreted proteases from pathogenic fungi. **International Journal of Medical Microbiology**. v.292, n.5-6, p.405-419, 2002.
- MONOD, M. Secreted Proteases from Dermatophytes. **Mycopathologia**, v.166, n.5-6, p.285-294, 2008.
- MURPHY, G; NAGASE, H. Progress in matrix metalloproteinase research. **Molecular Aspects of Medicine**. v.29, n.5, p.290-308, 2008.
- NAIRZ, M. et al. Slc11a1 limits intracellular growth of Salmonella entericasv. Typhimurium by promoting macrophage immune effector functions and impairing bacterial iron acquisition. **Cellular Microbiology**. v.11, n.9, p.1365-1381, 2009.
- NATARAJAN, U. et al. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on candidacidal activity of neutrophils, monocytes or monocyte-derived macrophages and synergy with fluconazole. **Journal of Medical Microbiology**. v.47, n.4, p.359-363, 1998.
- NENOFF, P. et al. Mycology - an update. Part 1: Dermatomycoses. **Jddg: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**. v.12, n.3, p.188-210, 2013.
- NENOFF, P. et al. Mycology - an update Part 2: Dermatomycoses. **Jddg: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**. v.12, n.9, p.749-777, 2014.
- NES, W. D. et al. Sterol 24-C-methyltransferase: An enzymatic target for the disruption of ergosterol biosynthesis and homeostasis in Cryptococcus neoformans. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.481, n.2, p.210-218, 2009.
- NORONHA, S. A. A. Corrêa de et al. Innate and adaptive immunity gene expression of human keratinocytes cultured of severe burn injury. **Acta Cirurgica Brasileira**. v. 29, n. 3, p.60-67, jan. 2014.
- OLIVEIRA, C. M. B. et al. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v.61, n.2, p.260-265, 2011.
- OSHEROV, N.; MAY, G. S. The molecular mechanisms of conidial germination. **Fems Microbiology Letters**. v.199, n.2, p.153-160, 2001.
- OZSOLAK, F.; MILOS, P. M. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. **Nature Reviews Genetics**. v.12, n.2, p.87-98, 2010.
- PARKS, W. C.; WILSON, C. L.; LÓPEZ-BOADO, Y. S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. **Nature Reviews Immunology**. v.4, n.8, p.617-629, 2004.
- PATEL, R. K.; JAIN, M. Ngs qc Toolkit: A Toolkit for Quality Control of Next Generation Sequencing Data. **Plos One**. v.7, n.2, p.1-7, 2012.
- PERES, N. T. A. et al. Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v.85, n.5, p.657-667, 2010.
- PIVARCSI, A.. Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. **International Immunology**. v.15, n.6, p.721-730, 2003.

- PIVARCSI, A.; NAGY, I.; KEMENY, L. Innate Immunity in the Skin: How Keratinocytes Fight Against Pathogens. **Current Immunology Reviews**. v.1, n.1, p.29-42, 2005.
- POSCH, W. et al. Promising immunotherapy against fungal diseases. **Expert Opinion on Biological Therapy**. v.17, n.7, p.861-870, 2017.
- PURWAR, R. et al. Modulation of Keratinocyte-Derived MMP-9 by IL-13: A Possible Role for the Pathogenesis of Epidermal Inflammation. **Journal of Investigative Dermatology**. v.128, n.1, p.59-66, 2008.
- QIAN, Xi et al. RNA-Seq Technology and Its Application in Fish Transcriptomics. **Omics: A Journal of Integrative Biology**. v.18, n.2, p.98-110, 2014.
- RADEMACHER, F.; SIMANSKI, M.; HARDER, J. RNase 7 in Cutaneous Defense. **Ijms**. v.17, n.4, p.1-12, 2016.
- RAMNATH, D. et al. The toll-like receptor 3 pathway in homeostasis, responses to injury and wound repair. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. v.61 p.1-9, 2016.
- RATZINGER, G. et al. Matrix Metalloproteinases 9 and 2 Are Necessary for the Migration of Langerhans Cells and Dermal Dendritic Cells from Human and Murine Skin. **The Journal of Immunology**. v.168, n.9, p.4361-4371, 2002.
- ROTH, W. et al. Keratin 1 maintains skin integrity and participates in an inflammatory network in skin through interleukin-18. **Journal of Cell Science**. v.125, n.22, p.5269-5279, 2012.
- SAKAI, A. et al. Potential role of high molecular weight hyaluronan in the anti-Candida activity of human oral epithelial cells. **Medical Mycology**. v.45, n.1, p.73-79, 2007.
- SHI, Y. et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know. **Cell Research**. v.16, n.2, p.126-133, 2006.
- SHIRAKI, Y. Cytokine secretion profiles of human keratinocytes during *Trichophyton tonsurans* and *Arthroderma benhamiae* infections. **Journal of Medical Microbiology**. v.55, n.9, p.1175-1185, 2006.
- SORBO, G. del; SCHOONBEEK, H.; WAARD, M. A. Fungal Transporters Involved in Efflux of Natural Toxic Compounds and Fungicides. **Fungal Genetics and Biology**. v.30, n.1, p.1-15, 2000.
- STAIB, P. et al. Differential gene expression in the pathogenic dermatophyte *Arthroderma benhamiae* in vitro versus during infection. **Microbiology**. v.156, n.3, p.884-895, 2009.
- STOBER, C. B. et al. Slc11a1, Formerly Nramp1, Is Expressed in Dendritic Cells and Influences Major Histocompatibility Complex Class II Expression and Antigen-Presenting Cell Function. **Infection and Immunity**. v.75, n.10, p.5059-5067, 2007.



- SZOLNOKY, G. et al. A Mannose-Binding Receptor is Expressed on Human Keratinocytes and Mediates Killing of *Candida albicans*. **Journal of Investigative Dermatology**. v.117, n.2, p.205-213, 2001.
- TANI, K. et al. The effect of dermatophytes on cytokine production by human keratinocytes. **Archives of Dermatological Research**. v.299, n.8, p.381-387, 21, 2007.
- TORRENT, M. et al. Comparison of human RNase 3 and RNase 7 bactericidal action at the Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall. **Febs Journal**. v.277, n.7, p.1713-1725, 2010.
- TORRENT, M. et al. Ribonucleases as a host-defence family: evidence of evolutionarily conserved antimicrobial activity at the N-terminus. **Biochemical Journal**. v.456, n.1, p.99-108, 2013.
- VÊNCIO, R. Z.; KOIDE, T.; GOMES, S. L. BayGO: Bayesian analysis of ontology term enrichment in microarray data. **Bmc Bioinformatics**. v.86, n.7, p.1-11, 2006.
- VERMOUT, S. et al. Pathogenesis of Dermatophytosis. **Mycopathologia**. v.166, n. 5-6, p.267-275, 2008.
- VIEIRA, N. et al. Functional specialization and differential regulation of short-chain carboxylic acid transporters in the pathogen *Candida albicans*. **Molecular Microbiology**. v.75, n.6, p.1337-1354, 2010.
- VISSE, R. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. **Circulation Research**. v.92, n.8, p.827-839, 2003.
- WAGNER, D. K.; SOHNLE, P. G. Cutaneous defenses against dermatophytes and yeasts. **Clinical Microbioly Review**. v.8, n.3, p.317-335, 1995.
- WATANABE, S. et al. The Effects of *Malassezia* Yeasts on Cytokine Production by Human Keratinocytes. **Journal of Investigative Dermatology**. v.116, n.5, p.769-773, 2001.
- WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R. C. The Dermatophytes. **Clinical Microbiology Reviews**. v.8, n.2, p.240-259, 1995.
- WESTERMANN, A. J.; GORSKI, S. A.; VOGEL, J. Dual RNA-seq of pathogen and host. **Nature Reviews Microbiology**. v.10, n.9, p.618-630, 2012.
- WESTERMANN, A. J. et al. Dual RNA-seq unveils noncoding RNA functions in host-pathogen interactions. **Nature**. v.529, n.7587, p.496-501, 2016.
- WHITE, T. C.; MARR, K. A.; BOWDEN, R. A. Clinical, Cellular, and Molecular Factors That Contribute to Antifungal Drug Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**. v.11, n.2, p.382-402, 1998.
- XU, X. et al. Proteogenomic Analysis of *T. rubrum* Aided by RNA Sequencing. **Journal of Proteome Research**. v.5, n.14, p.1-12, 2015.

Y, Li et al. The immune response of human keratinocytes to *Trichophyton rubrum* conidia is partially mediated by toll-like receptor-2, 4, dectin-1 and cytokines. **Journal of Southern Medical University**, v. 31, n. 4, p.678-681, abr. 2011.

ZAUGG, C. et al. Gene Expression Profiling in the Human Pathogenic Dermatophyte *Trichophyton rubrum* during Growth on Proteins. **Eukaryotic Cell**. v.8, n.2, p.241-250, 2008.

ZHONG, W. et.al. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**. v.10, p.57-63 2009.

## ANEXOS

### ANEXO A- Genes de *T. rubrum* diferencialmente expressos em 24 horas de co-cultivo

ID	Descrição do produto gênico	Log <sub>2</sub> Fold Change
TERG_12606	Dipeptidylpeptidase V (DPPV)	2.2
TERG_01280	Hypothetical protein ( <i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 igE-binding protein)	2.1
TERG_03102	Sterol 24-C-methyltransferase- ERG6	2.1
TERG_08104	Potassium/sodium efflux P-type atpase	2.0
TERG_01281	Malate synthase	1.7
TERG_04399	Phthalate transporter	1.6
TERG_00348	Galactose-proton symporter	1.4
TERG_02811	Hypothetical protein ( <i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 acetyl xylan esterase (Axe1)	1.4
TERG_12645	Hypothetical protein	1.3
TERG_07017	Oxidoreductase	1.3
TERG_08333	1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	1.3
TERG_02671	Hypothetical protein	1.3
TERG_02023	Extracellular matrix protein	1.3
TERG_08405	Leucine aminopeptidase 2	1.3
TERG_00916	Carboxylic acid transporter	1.3
TERG_11638	Isocitrate lyase	1.3
TERG_04952	ABC transporter	1.2
TERG_08286	Hypothetical protein ( <i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 GPI anchored CFEM domain protein)	1.2
TERG_03712	Hypothetical protein ( <i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 hydantoinase)	1.1
TERG_11639	Isocitrate lyase	1.1
TERG_01270	AMP dependent ligase	1.1
TERG_07691	Nonspecific lipid-transfer protein	1.1
TERG_07783	Oligopeptide transporter	1.1
TERG_02186	ABC transporter	1.1
TERG_04356	Amino acid permease	1.1
TERG_04580	NADP-specific glutamate dehydrogenase	1.0
TERG_01406	Hypothetical protein ( <i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 phospholipase D)	-2.9
TERG_07726	Hypothetical protein	-2.2
TERG_03174	MFS siderochrome iron transporter	-2.0

TERG_06355	Hypothetical protein ( <i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 acetyltransferase)	-1.9
TERG_07035	Hypothetical protein	-1.8
TERG_04156	Hypothetical protein	-1.8
TERG_05655	AN1 zinc finger protein	-1.7
TERG_01622	Hypothetical protein	-1.6
TERG_07477	Hypothetical protein ( <i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 copper-sulfate regulated protein)	-1.6
TERG_06186	Protein disulfide-isomerase domain-containing protein	-1.6
TERG_03708	Hypothetical protein ( <i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 short-chain dehydrogenase)	-1.5
TERG_03855	Hypothetical protein ( <i>Microsporum canis</i> CBS 113480 WW domain-containing protein)	-1.5
TERG_00499	Hypothetical protein	-1.4
TERG_03175	Hypothetical protein ( <i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 DUF833 domain protein)	-1.4
TERG_04073	Glutathione synthetase	-1.4
TERG_125	Hypothetical protein	-1.4
TERG_08139	NAD dependent epimerase/dehydratase	-1.3
TERG_06963	Hsp90-like protein	-1.3
TERG_01731	Hypothetical protein	-1.3
TERG_03340	Oxidoreductase	-1.3
TERG_01659	Hypothetical protein ( <i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 heat shock protein Hsp30-like)	-1.3
TERG_04863	Hypothetical protein	-1.3
TERG_08854	Hypothetical protein ( <i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 mitochondrial hypoxia responsive domain-containing protein)	-1.3
TERG_01988	Hypothetical protein( <i> Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 F-box domain protein)	-1.2
TERG_12510	Hypothetical protein	-1.2
TERG_07949	Heat shock protein 78	-1.2
TERG_04043	Hypothetical protein	-1.2
TERG_11780	Hypothetical protein ( <i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 pre-mrna splicing factor)	-1.2
TERG_00175	Hypothetical protein ( <i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 ferric-chelate reductase (Fre2)	-1.2
TERG_02278	Hypothetical protein	-1.2
TERG_05575	MFS multidrug transporter	-1.1
TERG_06315	Hypothetical protein ( <i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 integral membrane protein)	-1.1
TERG_07083	Hypothetical protein	-1.1
TERG_03070	Hypothetical protein ( <i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 flotillin domain-containing protein)	-1.0
TERG_07364	Hypothetical protein ( <i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase)	-1.0
TERG_04966	Hypothetical protein	-1.0
TERG_00070	Maleylacetoacetate isomerase	-1.0

## Anexo B- Genes de queratinócitos humanos HaCat expressos em 24 horas de co-cultivo

<b>ID</b>	<b>Descrição do produto gênico</b>	<b>Log<sub>2</sub>Fold Change</b>
SLC9A2	Solute carrier family 9 member A2	5.0
ANGPTL4	Angiopoietin like 4	4.7
DES	Desmin	4.5
C4orf47	Chromosome 4 open reading frame 47	4.5
KISS1R	KISS1 receptor	4.5
NSA2	NSA2, ribosome biogenesis homolog	4.4
HIST1H3C	Histone cluster 1 H3 family member c	4.0
SEC11C	SEC11 homolog C, signal peptidase complex subunit	3.9
KPNA7	Karyopherin subunit alpha 7	3.8
CASP14	Caspase 14	3.7
SLC2A3	Solute carrier family 2 member 3	3.7
ALDOC	Aldolase, fructose-bisphosphate C	3.7
LINC01127	Long intergenic non-protein coding RNA 1127	3.7
MT1B	Metallothionein 1B	3.6
SERPINE1	Serpin family E member 1	3.6
MAF	MAF bzip transcription fator	3.5
LOC101927136	Uncharacterized LOC101927136-long non-coding	3.5
CA9	Carbonic anhydrase 9	3.4
TGM2	Transglutaminase 2	3.4
PADI1	Peptidyl arginine deiminase 1	3.3
STC1	Stanniocalcin 1	3.1
BNIP3	BCL2 interacting protein 3	3.1
LSS	Lanosterol synthase	3.1
MT1H	Metallothionein 1H	3.1
MT1JP	Metallothionein 1J, pseudogene	3.0
MYH16	Myosin heavy chain 16 pseudogene	3.0
MT1X	Metallothionein 1X	3.0

PLA2G2F	Phospholipase A2 group IIF	3.0
CALB1	Calbindin 1	2.9
KRT42P	Keratin 42 pseudogene	2.9
ENO2	Enolase 2	2.9
ZFP90	ZFP90 zinc finger protein	2.9
VEZT	Vezatin, adherens junctions transmembrane	2.9
CSF2	Colony stimulating factor 2	2.9
MT1L	Metallothionein 1L, pseudogene	2.8
CCNG1	Cyclin G1	2.8
AKR1C1	Aldo-keto reductase family 1 member C1	2.8
RGCC	Regulator of cell cycle	2.8
WFDC3	WAP four-disulfide core domain 3	2.8
KRT17P5	Keratin 17 pseudogene 5	2.8
C20orf195(FNDC11)	Fibronectin type III domain containing 11	2.7
PFKFB4	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4	2.7
WISP2	WNT1 inducible signaling pathway protein 2	2.7
SNRPD2P2	Small nuclear ribonucleoprotein D2 pseudogene 2	2.6
FZD10	Frizzled class receptor 10	2.6
KCTD11	Potassium channel tetramerization domain containing 11	2.6
CLIC3	Chloride intracellular channel 3	2.6
EFNA1	Ephrin A1	2.5
MTRNR2L8	MT-RNR2-like 8	2.5
OLMALINC	Oligodendrocyte maturation-associated long intergenic non-coding RNA	2.5
WIP1	WD repeat domain, phosphoinositide interacting	2.5
LINC00887	Long intergenic non-protein coding RNA	2.5
RPL17	Ribosomal protein L17	2.4
ITGA5	Integrin subunit alpha 5	2.4
RPLP1	Ribosomal protein lateral stalk subunit P1	2.4
KIAA1755	Kiaa1755	2.4
AKR1C4	Aldo-keto reductase family 1 member C4	2.4

LOXL2	Lysyl oxidase like 2	2.3
ABCA3	ATP binding cassette subfamily A member 3	2.3
MT1A	Metallothionein 1 <sup>a</sup>	2.3
MIR155HG	MIR155 host gene	2.3
RPS27	Ribosomal protein S27	2.3
SLC11A1	Natural resistance-associated macrophage protein 1	2.3
RAB11A	RAB11A, member RAS oncogene family	2.3
MTRNR2L5	MT-RNR2-like 5	2.3
RNASE7	Ribonuclease 7	2.3
DDIT4	DNA damage inducible transcript 4	2.2
RASSF7	Ras association domain family member 7	2.2
TBCA	Tubulin folding cofactor A	2.2
MIR210HG	MIR210 host gene	2.2
TXN	Thioredoxin	2.2
LINC01355	Long intergenic non-protein coding RNA 1355	2.2
INSIG1	Insulin induced gene 1	2.2
RPS29	Ribosomal protein S29	2.2
CRIP1	Cysteine rich protein 1	2.2
MT2A	Metallothionein 2 <sup>a</sup>	2.2
SEPT8	Septin 8	2.2
GJB4	Gap junction protein beta 4	2.2
RPSAP52	Ribosomal protein SA pseudogene	2.1
APOBEC3G	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 3G	2.1
EGLN3	Egl-9 family hypoxia inducible factor 3	2.1
AGBL5	ATP/GTP binding protein like 5	2.1
MTRNR2L6	MT-RNR2-like 6	2.1
TCAF2	TRPM8 channel associated factor 2	2.1
MRPS18A	Mitochondrial ribosomal protein	2.1
FTMT	Ferritin mitochondrial	2.1
EMP3	Epithelial membrane protein 3	2.1
S100P	S100 calcium binding protein P	2.1

KRT84	Keratin 84	2.1
MMP9	Matrix metalloproteinase 9	2.1
ALG5	Dolichyl-phosphate beta-glucosyltransferase	2.1
PAG1	Phosphoprotein membrane anchor with glycosphingolipid microdomains 1	2.1
TINF2	TERF1 interacting nuclear factor 2	2.0
RPS21	Ribosomal protein S21	2.0
NENF	Neudesin neurotrophic factor	2.0
BNIP3L	BCL2 interacting protein 3 like	2.0
LOC554223	Histocompatibility antigen-related	2.0
SMS	Spermine synthase	2.0
KRT16P3	Keratin 16 pseudogene 3	2.0
CDA	Cytidine deaminase	2.0
PPIAL4G	Peptidylprolyl isomerase A like 4G	2.0
SHROOM4	Shroom family member 4	2.0
MTRNR2L4	MT-RNR2-like 4	2.0
LAMC2	Laminin subunit gamma 2	2.0
OSGIN1	Oxidative stress induced growth inhibitor	2.0
SENP6	SUMO1/sentrin specific peptidase 6	2.0
ATP5I	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial Fo complex subunit E	2.0
IGFL1	IGF like family member 1	1.9
AMY2B	Amylase, alpha 2B (pancreatic)	1.9
RPS18	Ribosomal protein S18	1.9
HK2	Hexokinase 2	1.9
ANKRD37	Ankyrin repeat domain 37	1.9
LOC100507431	Uncharacterized LOC100507431	1.9
SUMO2	Small ubiquitin-like modifier 2	1.9
FAM83A	Family with sequence similarity 83 member A	1.9
JUN	Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	1.9
BHLHE40	Basic helix-loop-helix family member 40	1.9



ADAM19	ADAM metallopeptidase domain 19	1.9
TMC8	Transmembrane channel like 8	1.8
MSC	Musculin	1.8
RPL12	Ribosomal protein L12	1.8
HBEGF	Heparin binding EGF like growth factor	1.8
ARNT2	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2	1.8
PPP2R5B	Protein phosphatase 2 regulatory subunit b/beta	1.8
LINC01204	Long intergenic non-protein coding RNA 1204	1.8
RNF181	Ring finger protein 181	1.8
BRMS1	Breast cancer metastasis suppressor 1	1.8
CDK7	Cyclin dependent kinase 7	1.8
FTH1P3	Ferritin heavy chain 1 pseudogene 3	1.8
EIF3L	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L	1.8
LBH	Limb bud and heart development	1.8
FGFBP1	Fibroblast growth factor binding protein 1	1.8
CYP1A1	Cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1	1.8
ADM	Adrenomedullin	1.8
RPS12	Ribosomal protein S12	1.7
NHP2	NHP2 ribonucleoprotein	1.7
RPS28	Ribosomal protein S28	1.7
RPL10	Ribosomal protein L10	1.7
MVD	Mevalonate diphosphate decarboxylase	1.7
RGS20	Regulator of G-protein signaling 20	1.7
EXOSC10	Exosome component 10	1.7
RPL37A	Ribosomal protein L37A	1.7
SYNGR3	Synaptogyrin 3	1.7
RPL39	Ribosomal protein L39	1.7
MTRNR2L9	MT-RNR2-like 9	1.7
DAPK2	Death associated protein kinase 2	1.7
MIR100HG	Mir-100-let-7a-2 cluster host gene	1.7

RPL23	Ribosomal protein L23	1.7
AKR1B10	Aldo-keto reductase family 1 member B10	1.7
CHMP5	Charged multivesicular body protein 5	1.7
RPS19	Ribosomal protein S19	1.7
FAM83A-AS1	FAM83A antisense RNA 1	1.7
LINC00704	Long intergenic non-protein coding RNA 704	1.6
RPS16	Ribosomal protein S16	1.6
FAM162A	Family with sequence similarity 162 member A	1.6
ATP5H	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial Fo complex subunit D	1.6
RPS7	Ribosomal protein S7	1.6
CT62	Cancer/testis antigen 62	1.6
HMOX1	Heme oxygenase 1	1.6
PNRC1	Proline rich nuclear receptor coactivator 1	1.6
GOLGA7B	Golgin A7 family member B	1.6
LOC344887	Nmra like redox sensor 2, pseudogene	1.6
WDR54	WD repeat domain 54	1.6
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	1.6
INSIG2	Insulin induced gene 2	1.6
APCDD1L-AS1	APCDD1L antisense RNA 1 (head to head)	1.6
TMBIM1	Transmembrane BAX inhibitor motif containing 1	1.6
RAB2A	RAB2A, member RAS oncogene family	1.6
TMEM45A	Transmembrane protein 45 <sup>a</sup>	1.6
FAM214B	Family with sequence similarity 214 member B	1.6
CASC8	Cancer susceptibility 8 (non-protein coding)	1.6
RPL24	Ribosomal protein L24	1.6
MMD	Monocyte to macrophage differentiation associated	1.6
DUSP5	Dual specificity phosphatase 5	1.6
LGALS1	Galectin 1	1.6
MIR622	Microrna 622	1.6
MMP28	Matrix metalloproteinase 28	1.6

SNHG5	Small nucleolar RNA host gene 5	1.6
LOC391322	D-dopachrome tautomerase-like	1.6
RPL19	Ribosomal protein L19	1.6
PRSS22	Protease, serine 22	1.6
JAZF1	JAZF zinc finger 1	1.5
EFNA3	Ephrin A3	1.5
RPS25	Ribosomal protein S25	1.5
IER3	Immediate early response 3	1.5
BIK	BCL2 interacting killer	1.5
ERO1A	Endoplasmic reticulum oxidoreductase 1 alpha	1.5
TP53INP2	Tumor protein p53 inducible nuclear protein 2	1.5
RPL35A	Ribosomal protein l35a	1.5
RRAS	Related RAS viral (r-ras) oncogene homolog	1.5
GBAS	Nipsnap homolog 2	1.5
KIF3C	Kinesin family member 3C	1.5
IDI1	Isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1	1.5
RPL27A	Ribosomal protein l27a	1.5
TMEM120A	Transmembrane protein 120 <sup>a</sup>	1.5
PPIH	Peptidylprolyl isomerase H	1.5
VKORC1	Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1	1.5
RPS11	Ribosomal protein S11	1.5
RTN4R	Reticulon 4 receptor	1.5
RPLP2	Ribosomal protein lateral stalk subunit P2	1.5
WNT7A	Wnt family member 7 <sup>a</sup>	1.5
CYP27B1	Cytochrome P450 family 27 subfamily B member 1	1.5
RPL18A	Ribosomal protein l18a	1.5
PSMB3	Proteasome subunit beta 3	1.5
RPL5	Ribosomal protein L5	1.5
HAS2	Hyaluronan synthase 2	1.5
LINC01605	Long intergenic non-protein coding RNA 1605	1.5

ACTG1P17	Actin gamma 1 pseudogene 17	1.5
FNTA	Farnesyltransferase, CAAX box, alpha	1.4
MUC13	Mucin 13, cell surface associated	1.4
IGIP	Iga inducing protein	1.4
FOS	Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	1.4
BTG1	BTG anti-proliferation factor 1	1.4
SNHG6	Small nucleolar RNA host gene 6	1.4
GAS5	Growth arrest specific 5 (non-protein coding)	1.4
RPL30	Ribosomal protein L30	1.4
MICALCL	MICAL C-terminal like	1.4
PPP2R5C	Protein phosphatase 2 regulatory subunit b'gamma	1.4
RPS8	Ribosomal protein S8	1.4
RPL35	Ribosomal protein L35	1.4
RPL13AP20	Ribosomal protein L13a pseudogene 20	1.4
PPP5C	Protein phosphatase 5 catalytic subunit	1.4
HMG2P46	High mobility group nucleosomal binding domain 2 pseudogene 46	1.4
RPL7A	Ribosomal protein l7a	1.4
RPL26	Ribosomal protein L26	1.3
RPS4X	Ribosomal protein S4, X-linked	1.3
RPS13	Ribosomal protein S13	1.3
RPL27	Ribosomal protein L27	1.3
RPS6	Ribosomal protein S6	1.3
RPL37	Ribosomal protein L37	1.3
PSMB2	Proteasome subunit beta 2	1.3
COX7B	Cytochrome c oxidase subunit 7B	1.3
RPL3	Ribosomal protein L3	1.3
EIF3E	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	1.2
UBB	Ubiquitin B	1.2
RPS3A	Ribosomal protein S3A	1.2
RPL7	Ribosomal protein L7	1.2

POTEI	POTE ankyrin domain family member 1	1.2
LOC100129636	Uncharacterized LOC100129636	-5.7
POTEM	POTE ankyrin domain family member	-5.3
SNORA51	Small nucleolar RNA, H/ACA box	-4.9
MIR7161	Microna 7161	-4.7
ANP32A-IT1	ANP32A intronic transcript 1	-4.6
UCKL1	Uridine-cytidine kinase 1 like 1	-4.5
LOC100128531	Uncharacterized LOC100128531	-4.5
FNDC3B	Fibronectin type III domain containing	-4.4
LOC729739	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) pseudogene	-4.3
RPL23AP64	Ribosomal protein L23a pseudogene	-4.2
KRT1	Keratin 1	-4.0
MIR663AHG	MIR663A host gene	-3.9
LOC101559451	Uncharacterized LOC101559451	-3.7
FDPSP2	Farnesyl diphosphate synthase pseudogene 2	-3.2
MMP12	Matrix metalloproteinase 12	-3.2
NSD1	Nuclear receptor binding SET domain	-3.1
CYCSP52	Cytochrome c, somatic pseudogene	-3.0
EME2	Essential meiotic structure-specific endonuclease subunit 2	-3.0
MIR4442	Microna 4442	-3.0
COL12A1	Collagen type XII alpha 1 chain	-2.9
RPL23AP32	Ribosomal protein L23a pseudogene	-2.9
HSP90AB4P	Heat shock protein 90 alpha family class B member 4, pseudogene	-2.8
SNORD45A	Small nucleolar RNA, C/D box	-2.8
FBXL19-AS1	FBXL19 antisense RNA 1 (head to head)	-2.8
TRIM26	Tripartite motif containing 26	-2.8
IARS	Isoleucyl-trna synthetase	-2.8
KIF14	Kinesin family member 14	-2.7
IFITM4P	Interferon induced transmembrane protein 4 pseudogene	-2.7
MEGF8	Multiple EGF like domains 8	-2.7

HNRNPL	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	-2.7
SPTBN5	Spectrin beta, non-erythrocytic 5	-2.7
SOX2	SRY-box 2	-2.6
KIAA0586	Kiaa0586	-2.6
RBP5	Retinol binding protein 5	-2.6
AGRN	Agrin	-2.6
CAD	Carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase, and dihydroorotase	-2.5
C9orf172	Chromosome 9 open reading frame	-2.5
ANKRD30BL	Ankyrin repeat domain 30B like	-2.4
ITPRIPL2	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor interacting protein like 2	-2.4
SMC4	Structural maintenance of chromosomes 4	-2.4
MKI67	Marker of proliferation Ki-67	-2.4
EIF5A	Eukaryotic translation initiation factor 5A	-2.4
LMNB1	Lamin B1	-2.3
LOC100190986	Uncharacterized LOC100190986	-2.3
DNAH11	Dynein axonemal heavy chain 11	-2.3
EIF5	Eukaryotic translation initiation factor 5	-2.3
MSH2	Muts homolog 2	-2.2
SREK1	Splicing regulatory glutamic acid and lysine rich protein 1	-2.2
IGSF9B	Immunoglobulin superfamily member 9B	-2.2
UGT8	UDP glycosyltransferase 8	-2.2
PWAR5	Prader Willi/Angelman region RNA 5	-2.2
C1RL-AS1	C1RL antisense RNA 1	-2.1
UCKL1-AS1	UCKL1 antisense RNA 1	-2.1
ACTG1P4	Actin gamma 1 pseudogene 4	-2.1
TNPO2	Transportin 2	-2.1
PUS1	Pseudouridylate synthase 1	-2.1
LOC100130331	POTE ankyrin domain family, member F	-2.1
RACGAP1P	Rac gtpase activating protein 1	-2.1
NAT10	N-acetyltransferase 10	-2.1

ECT2	Epithelial cell transforming 2	-2.0
SLC25A2	Solute carrier family 25 member 2	-2.0
MGA	MGA, MAX dimerization protein	-2.0
LOC101929767	Uncharacterized LOC101929767	-2.0
UBA1	Ubiquitin like modifier activating enzyme 1	-2.0
POTEF	POTE ankyrin domain family member F	-2.0
SDPR	Caveolae associated protein 2(cavin2)	-2.0
SVIL	Supervillin	-2.0
TAF1L	TATA-box binding protein associated factor 1 like	-2.0
C5orf17	Chromosome 5 open reading frame 17	-1.9
TFAMP1	Transcription factor A, mitochondrial pseudogene 1	-1.9
EWSR1	EWS RNA binding protein 1	-1.9
CPD	Carboxypeptidase D	-1.9
ANP32D	Acidic nuclear phosphoprotein 32 family member	-1.9
LOC374443	C-type lectin domain family 2 member D pseudogene	-1.9
KIF4B	Kinesin family member 4B	-1.9
ZNF106	Zinc finger protein 106	-1.9
FLG	Fillagrin	-1.9
ZFHX3	Zinc finger homeobox 3	-1.8
ZNF138	Zinc finger protein 138	-1.8
LOC100288842	UDP-glcnac:betagal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 5 pseudogene	-1.8
E2F3	E2F transcription factor 3	-1.8
HERC5	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 5	-1.8
TMEM5-AS1	TMEM5 antisense RNA 1	-1.8
NAP1L2	Nucleosome assembly protein 1 like 2	-1.8
XRCC6P5	X-ray repair cross complementing 6 pseudogene	-1.8
KPNB1	Karyopherin subunit beta 1	-1.8
DPYSL3	Dihydropyrimidinase like 3	-1.8
NEAT1	Nuclear paraspeckle assembly transcript 1 (non-protein coding)	-1.8
AURKAPS1	Aurora kinase A pseudogene 1	-1.7

ANKRD36BP1	Ankyrin repeat domain 36B pseudogene 1	-1.7
KIAA0754	Kiaa0754	-1.7
METTL7A	Methyltransferase like 7A	-1.7
SAMHD1	SAM and HD domain containing deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase 1	-1.7
PIK3R1	Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1	-1.7
PRPS1L1	Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1-like 1	-1.7
STAG3L2	Stromal antigen 3-like 2 (pseudogene)	-1.7
MMP13	Matrix metalloproteinase 13	-1.7
ASPM	Abnormal spindle microtubule assembly	-1.7
CHD8	Chromodomain helicase DNA binding protein 8	-1.7
SFT2D2	SFT2 domain containing 2	-1.7
FAM72C	Family with sequence similarity 72 member C	-1.7
DDX21	Dexd-box helicase 21	-1.6
CCDC144B	Coiled-coil domain containing 144B (pseudogene)	-1.6
NCR3LG1	Natural killer cell cytotoxicity receptor 3 ligand 1	-1.6
HELZ2	Helicase with zinc finger 2	-1.6
RSAD2	Radical S-adenosyl methionine domain containing 2	-1.6
BMS1P6	BMS1, ribosome biogenesis factor pseudogene 6	-1.6
ANAPC5	Anaphase promoting complex subunit 5	-1.6
JRK	Jrk helix-turn-helix protein	-1.6
USP1	Ubiquitin specific peptidase 1	-1.6
TRANK1	Tetratricopeptide repeat and ankyrin repeat containing 1	-1.6
NEU3	Neuraminidase 3	-1.6
OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase like	-1.6
SLC25A24	Solute carrier family 25 member 24	-1.5
GBP4	Guanylate binding protein 4	-1.5
CSMD3	CUB and Sushi multiple domains 3	-1.5
MFN2	Mitofusin 2	-1.5
MUC4	Mucin 4, cell surface associated	-1.5
POLR1A	RNA polymerase I subunit A	-1.5



TRPV6	Transient receptor potential cation channel subfamily V member 6	-1.5
UBA5	Ubiquitin like modifier activating enzyme 5	-1.5
TRIM66	Tripartite motif containing 66	-1.5
LOC494127	NFYC pseudogene	-1.5
LOC728024	Chromosome X open reading frame 56 pseudogene	-1.4
MIA3	MIA family member 3, ER export fator	-1.4
LOC401127	WD repeat domain 5 pseudogene	-1.4
LOC341056	SUMO1 activating enzyme subunit 1 pseudogene	-1.4
PANDAR	Promoter of CDKN1A antisense DNA damage activated RNA	-1.4
DCAF13P3	DDB1 and CUL4 associated factor 13 pseudogene 3	-1.4

---