

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

**Análise proteômica de *Trichophyton rubrum* na relação fungo hospedeiro  
e na resposta a moléculas com atividade antifúngica**

Aluna: Mariana Heinzen de Abreu Romani  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Fachin Saltoratto

RIBEIRÃO PRETO  
2022

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

- Universidade de Ribeirão Preto -

ROMANI, Mariana Heizen de Abreu, 1993-  
R758a Análise proteômica de *Trichophyton rubrum* na relação fungo  
hospedeiro e na resposta a moléculas com atividade antifúngica /  
Mariana Heizen de Abreu Romani. – Ribeirão Preto, 2022.  
85 f.: il. color.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Lucia Fachin Saltoratto.

Tese (Doutorado) - Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP,  
Doutorado em Biotecnologia aplicada à Saúde, 2022.

1. Proteínas. 2. Cromatografia a líquido. 3. Infecção fúngica.  
II. Título.

CDD 660.6

**MARIANA HEINZEN DE ABREU ROMANI**

**“ANÁLISE PROTEOMICA DE *TRICHOPHYTON RUBRUM* NA RELAÇÃO FUNGO-HOSPEDEIRO E NA RESPOSTA A MOLÉCULAS COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA”**

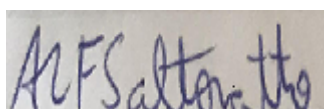
Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

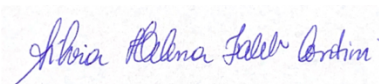
Data da defesa: 29 de junho de 2022

Resultado: Aprovada

**BANCA EXAMINADORA**



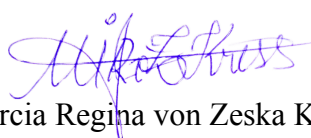
Profa. Dra. Ana Lucia Fachin Saltoratto  
Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP



Profa. Dra. Silvia Helena Taleb Contini  
Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP



Profa. Dra. Tatiana Takahasi Komoto  
Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII



Profa. Dra. Marcia Regina von Zeska Kress  
Universidade de São Paulo – USP

Assinado de forma digital por  
Marcia Regina von Zeska Kress  
Dados: 2022.07.08 09:10:08 -03'00'



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

## **Agradecimentos**

Agradeço à Deus por toda a sua providencia e amparo nesse trajeto, por ter aberto as portas para que esse trabalho se realizasse e através dele eu pudesse descobrir esse mundo desafiador, mas maravilhoso que é a pesquisa!

Dedico esse trabalho:

Aos meus pais e meu irmão que sempre insistiram muito pelos meus estudos, que nunca mediram esforços para que eu pudesse estudar e sempre me incentivaram a não desistir!

Ao meu esposo que percorreu essa jornada ao meu lado, sendo inúmeras vezes ponto de descanso e apoio e sempre me lembrando que eu sou capaz e que Deus é bom!

A todos os que passaram pelo laboratório do GMB nesses 10 anos, eu posso realmente dizer que eu fiz amigos nesse local, agradeço a todos que passaram por lá, que dividiram as dores e sofrimentos da pós graduação, que tornaram os dias mais leves com a amizade e o suporte. Agradeço imensamente à Deus por todas as pessoas que eu conheci no laboratório, foram realmente pessoas que eu aprendi muito na área Acadêmica e também me tornaram uma pessoa melhor!

A Professora Ana Lucia e ao Professor Mozart, por toda a dedicação e paciência desde o início com aquela menina que entrou na Iniciação Científica e hoje se torna uma pesquisadora, para mim foi uma honra trabalhar com vocês, além de professores excelentes, vocês são seres humanos maravilhosos, que nesses anos foram muitas vezes um ombro amigo, um pai e uma mãe quando necessário! Sou muito grata em ter conhecido, sido aluna e amiga de vocês!

Aos meus irmãos de comunidade, que muitas vezes mesmo sem entender o meu trabalho, sempre estiveram por perto e sempre me acalmando nos momentos de desespero e me ajudando a nunca esquecer o quanto Deus é providente!

A UNAERP, CAPES e FAPESP, pela concessão das bolsas de estudo, projeto e toda estrutura necessária para que esse projeto se realizasse!

## RESUMO

*Trichophyton rubrum* representa o agente etiológico mais comum das micoses humanas, sendo responsável por mais de 69,5% de todas as dermatofitoses. Apesar da alta prevalência de dermatofitoses em todo o mundo, ainda é escasso o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvendo a interação fungo-hospedeiro. Os modelos de infecção para estudo de interação dermatófito-hospedeiro ainda são limitados, mas a ferramenta de meio de cultura adicionado de substratos proteicos, vem se destacando pelo fato dos dermatófitos utilizarem a queratina como fonte de nutriente. O uso do meio de cultura contendo queratina pode simular a infecção superficial e a análise proteômica torna possível a identificação global de proteínas relacionadas com a patogenicidade de dermatofitos. Este trabalho realizou a análise proteômica a partir do crescimento de *T. rubrum* em diferentes meios de cultivo contendo queratina e exposto a presença dos compostos antifúngicos: trans-chalcona e um análogo de curcumina. A cromatografia líquida com espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS) identificou 895 proteínas expressas em Meio Mínimo (MM), 348 expressas em Meio Mínimo contendo Queratina (MQ), 238 em Meio Mínimo contendo queratina + trans-chalcona (MQTC) e 276 em Meio Mínimo contendo queratina + curcuminoide (MQCur). Dentre as proteínas mais abundantes encontradas em todos os meios, destaca-se a classe de proteínas de choque térmico (HSPs) que estão envolvidas na interação patógeno- hospedeiro e desempenham um papel importante durante a infecção fúngica de tecidos queratinizados. Além disso, a tioredoxina foi abundante principalmente na presença de queratina, sendo descrita como um possível novo alvo antifúngico. A protease Vacuolar A foi exclusiva na presença dos dois compostos antifúngicos e a proteína contendo domínio hidro SGNH, foi abundante apenas em meio contendo o curcuminoide. A modulação diferencial de proteínas sugere que o fungo apresente capacidade de remodelamento de acordo com as necessidades nutricionais encontradas e pelo estresse causado pelos compostos antifúngicos. Além dessas proteínas já conhecidas, foram identificadas diversas proteínas ainda não caracterizadas funcionalmente, como as proteínas F2SL44\_TRIRC e F2SUJ4\_TRIRC. E as proteínas F2SMI7\_TRIRC e F2SSX3\_TRIRC, cujos genes que já haviam sido evidenciados anteriormente em nosso grupo de pesquisa, agregando dados funcionais sobre elas.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Concentração inibitória mínima (CIM), concentração dos compostos utilizados na proteômica, e concentração fungicida mínima (CFM) em $\mu\text{M}$ dos compostos antifúngicos .....	31
<b>Tabela 2</b> - Quantificação de proteínas .....	32
<b>Tabela 3</b> - 30 proteínas mais abundantes em MM. ....	32
<b>Tabela 4</b> - 30 proteínas mais abundantes em MQ .....	38
<b>Tabela 5</b> - 30 proteínas mais abundantes em MQTC .....	45
<b>Tabela 6</b> - 30 proteínas mais abundantes em MQCur .....	51
<b>Tabela 7</b> - Proteínas mais abundantes em MQ comparado ao MM .....	60
<b>Tabela 8</b> - Proteínas mais abundantes em MM comparadas ao MQ .....	61
<b>Tabela 9</b> - Proteínas não caracterizadas funcionalmente em MM e MQ .....	62
<b>Tabela 10</b> - Proteínas exclusivas em MQ .....	64
<b>Tabela 11</b> - Proteínas não caracterizadas funcionalmente e mais abundantes nos meios de cultura contendo compostos antifúngicos .....	67
<b>Tabela 12</b> - Proteínas observadas nos diferentes meios de culturas e que os respectivos genes já foram evidenciados por DE ABREU et al., (2020).....	71

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Etapas da infecção cutânea por dermatófitos .....	10
<b>Figura 2</b> - Aspectos da linhagem de <i>T. rubrum</i> utilizada .....	26
<b>Figura 3</b> - Estrutura molecular dos compostos utilizados .....	27
<b>Figura 4</b> - Classificação das proteínas de acordo com o Gene Ontology .....	57
<b>Figura 5</b> - Resumo gráfico dos resultados da comparação MM x MQ .....	59
<b>Figura 6</b> - Resumo gráfico dos resultados da comparação MQ x MQ adicionado de compostos antifúngicos .....	66
<b>Figura 7</b> - Resumo gráfico das proteínas putativas envolvidas com adesão já descritas pelo nosso grupo de pesquisa.....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS

MM Meio Mínimo

MQ Meio Mínimo contendo queratina

MQTC Meio Mínimo contendo queratina adicionado de transchalcona

MQCur Meio Mínimo contendo queratina adicionado de curcuminoide

DNA Ácido Desoxirribonucléico

FDA Food Drug Administration

NF-KB Fator nuclear kappa beta

mL mililitro

mM minimolar

NCBI National Center for Biotechnology Information

nm nanômetro

nM nanomolar

PCR Reação em Cadeia da Polimerase

PCRq PCR quantitativo

q.s.p quantidade suficiente para

RNA Ácido Ribonucléico

g gravidade

rpm rotação por minuto

UV ultra violeta

μL microlitro

μM micromolar

μg micrograma

LC MS/MS Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	7
1.1 Infecções causadas por dermatófitos .....	7
1.2 <i>Trichophyton rubrum</i> .....	11
1.3 Tratamento de dermatofitoses .....	12
1.4 Proteínas fúngicas .....	16
1.5 Análise proteômica.....	18
1.6 Modelos de estudo.....	22
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	24
<b>3 HIPÓTESE</b> .....	24
<b>4 OBJETIVO GERAL</b> .....	24
4.1 Objetivos específicos.....	24
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	26
5.1 Linhagens utilizadas .....	26
5.2 Preparação de Suspensão de conídios de <i>T. rubrum</i> .....	26
5.3 Compostos utilizados .....	27
5.4 Determinação da Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração fungicida mínimo (CFM) dos compostos contra <i>T. rubrum</i> .....	27
5.5 Cultivo de <i>T. rubrum</i> em diferentes meios de cultura .....	28
5.6 Preparação de amostra .....	28
5.7 Quantificação de proteínas.....	29
5.8 Preparação das amostras para análise proteômica.....	29
5.9 Análise por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas LC MS/MS .....	30
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	31
6.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos compostos contra <i>T.rubrum</i> .....	31
<b>Tabela 1</b> - Concentração inibitória mínima (CIM), concentração dos compostos utilizados na proteômica, e concentração fungicida mínima (CFM) em $\mu$ M dos compostos antifúngicos .....	31
6.2 Quantificação das proteínas .....	31
<b>Tabela 2</b> - Quantificação de proteínas .....	32
6.3 Análise por espectrometria de massas .....	32
<b>Tabela 3</b> - 30 proteínas mais abundantes em MM.....	32
<b>Tabela 4</b> - 30 proteínas mais abundantes em MQ .....	38
<b>Tabela 5</b> - 30 proteínas mais abundantes em MQTC .....	45
<b>Tabela 6</b> - 30 proteínas mais abundantes em MQCur.....	51
6.4 Classificação das proteínas por Gene Ontology (GO).....	56

6.5 ANÁLISE COMPARATIVA DAS PROTEÍNAS ENCONTRADAS NOS DIFERENTES MEIOS DE CULTURA .....	59
6.5.1 MEIO MÍNIMO (MM) COMPARADO AO MEIO MÍNIMO CONTENDO QUERATINA (MQ).....	59
<b>Tabela 7</b> - Proteínas mais abundantes em MQ comparado ao MM.....	60
<b>Tabela 8</b> - Proteínas mais abundantes em MM comparadas ao MQ .....	61
6.5.1.1 Proteínas não caracterizadas funcionalmente em MM e MQ .....	62
<b>Tabela 9</b> - Proteínas não caracterizadas funcionalmente em MM e MQ .....	62
6.5.1.2 Proteínas Exclusivas em MQ comparando ao MM .....	64
<b>Tabela 10</b> - Proteínas exclusivas em MQ .....	64
6.5.2 MEIO MÍNIMO CONTENDO QUERATINA (MQ) COMPARADO AO MEIO MÍNIMO CONTENDO QUERATINA NA PRESENÇA DE TRANS-CHALCONA (MQTC) E CURCUMINOIDE (MQCur) .....	66
6.5.2.1 Proteínas mais abundantes na presença de compostos antifúngicos .....	66
6.5.2.2 Proteínas não caracterizadas funcionalmente e abundantes na presença de compostos antifúngicos .....	67
<b>Tabela 11</b> - Proteínas não caracterizadas funcionalmente e mais abundantes nos meios de cultura contendo compostos antifúngicos .....	67
<b>Tabela 12</b> - Proteínas observadas nos diferentes meios de culturas e que os respectivos genes já foram evidenciados por DE ABREU et al., (2020).....	71
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	72
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	74
<b>ANEXO</b> .....	86
<b>PREPARO DE MEIOS DE CULTURA</b> .....	86
<b>Meio Mínimo (MM)</b> .....	86
<b>Meio Mínimo Queratina (MQ)</b> .....	86
<b>PREPARO DE SOLUÇÕES</b> .....	86
<b>Solução Salina 0,9%</b> .....	86
<b>Solução de Sais (Cove, 1966)</b> .....	86
<b>Solução de Elementos Traço ( Cove, 1966)</b> .....	86

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Infecções causadas por dermatófitos

Os dermatófitos são um grupo de fungos intimamente relacionados que podem invadir tecido queratinizado (pele, cabelo e unhas) causando infecções denominadas dermatofitoses, comumente referidas como micoses ou tineas e afetam aproximadamente 25% da população mundial. Esses fungos são patógenos cosmopolitas encontrados em muitos nichos ecológicos, como o solo, humanos e animais. As espécies geofílicas encontradas no solo são saprofíticas e raramente causam infecções em humanos e animais. Já os dermatófitos zoofílicos são encontrados principalmente como patógenos em animais e, ocasionalmente, em humanos. Essas espécies podem ser carregadas por animais em sua pele e podem causar infecções agudas e altamente inflamatórias assintomáticas ou sintomáticas em animais e humanos. As espécies antropofílicas são altamente adaptadas aos hospedeiros humanos e desencadeiam uma resposta inflamatória leve e infecção crônica (DE HOOG et al., 2017)

As dermatofitoses afetam indivíduos em todo o mundo, mas sua incidência é maior em países tropicais devido às altas temperaturas e umidade (TAPLIN, 2001). Os fatores que influenciam o desenvolvimento das dermatofitoses incluem idade, sexo, estação do ano, condições socioeconômicas e culturais e localização geográfica (IORIO et al., 2007). Estima-se que cerca de 10 a 15% dos indivíduos estão contaminados com dermatófitos em algum momento de sua vida (PIRES et al., 2014). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), as dermatofitoses afetam cerca de 25% da população mundial (SAI et al., 2019) e 30 a 70% dos adultos são portadores assintomáticos dessas doenças (GUPTA; VERSTEEG; SHEAR, 2017).

O aumento da frequência de dermatofitoses se deve a diversos fatores, como uso de calçados oclusivos, higiene inadequada, nível socioeconômico, ocupação, mudanças climáticas, fatores predisponentes (como imunossupressão / deficiência e diabetes) e melhorias nos exames diagnósticos e atendimento médico (BEGUM et al., 2020; GNAT et al., 2019; MUSHTAQ et al., 2020)

A dermatofitose tem um impacto significativo na qualidade de vida dos pacientes por afetar os aspectos psicológicos, econômicos e sociais, e está associada à ansiedade, depressão e baixa autoestima, principalmente devido ao desconforto relacionado ao prurido e questões

estéticas (MUSHTAQ et al., 2020; NARANG et al., 2019) . As manifestações clínicas incluem lesões circulares, eritematosas e escamosas na pele, enquanto as infecções ungueais (*tinea unguium* ou onicomicose) levam à descoloração, espessamento, descamação e separação do leito ungueal (KOVITWANICHKANONT, 2019). Algumas manifestações atípicas e semelhantes a outras doenças cutâneas podem levar ao diagnóstico errôneo, sendo confundidos com eczema, psoríase, impetigo, dermatite seborreica, eritema multiforme, lúpus eritematoso, dermatite herpetiforme, erupção polimórfica à luz e rosácea (ATZORI et al., 2012; DOGRA; NARANG, 2017). A falta de um diagnóstico precoce e tratamento adequado pode levar a dermatofitose cutânea a infecções invasivas e profundas. Uma revisão sistemática de casos de dermatofitose profunda em todo o mundo, de 2000 a 2020, mostrou que metade dos pacientes que apresenta lesões invasivas, apresentou antes, infecções cutâneas crônicas no mesmo local (WANG et al., 2021).

Esses casos de infecções invasivas estão relacionados principalmente em pacientes imunocomprometidos e predispostos, e pode se apresentar como lesões nodulares ulcerativas e abscessos (DOGRA; NARANG, 2017). As condições subjacentes associadas à dermatofitose profunda incluem transplante de órgãos sólidos, infecção por HIV, uso de drogas imunossupressoras, como corticosteroides sistêmicos e imunodeficiências (ROUZAUD et al., 2016). Além disso, casos de *tinea faciei* (ou *tinea* de máscara) foram relatados na Índia, associados ao aumento do uso de máscaras faciais para evitar contaminação durante a recente pandemia de COVID-19 causada por SARS-CoV-2 (AGARWAL et al., 2021).

Dentre os tipos existentes de dermatofitoses, a onicomicose, uma infecção fúngica que afeta as unhas, é considerada a onicopatía mais prevalente no mundo (BASWAN et al., 2017). Nos países ocidentais, os dermatófitos ainda são responsáveis por até 80% dos casos de onicomicose (GUPTA et al., 2019). O maior índice de relatos de onicomicoses são em idosos, provavelmente devido à presença de diabetes, má circulação periférica, exposição mais longa a fungos patogênicos, trauma ungueal repetido e função imunológica menos efetora (GUPTA et al., 2016), e a alta taxa de recorrência é observada principalmente nestes pacientes (RICH, 1996).

Pacientes imunocomprometidos, com o vírus da imunodeficiência humana (HIV-1), positivo e pacientes transplantados são mais suscetíveis à onicomicose, devido ao seu sistema imunológico enfraquecido pois seu sistema imunológico não consegue combater a infecção adequadamente quando comparado a indivíduos saudáveis ou com ausência de

imunossupressão (MORENO-COUTIÑO; ARENAS; REYES-TERÁN, 2013; TACHIKAWA; YASUOKA; OKA, 1999).

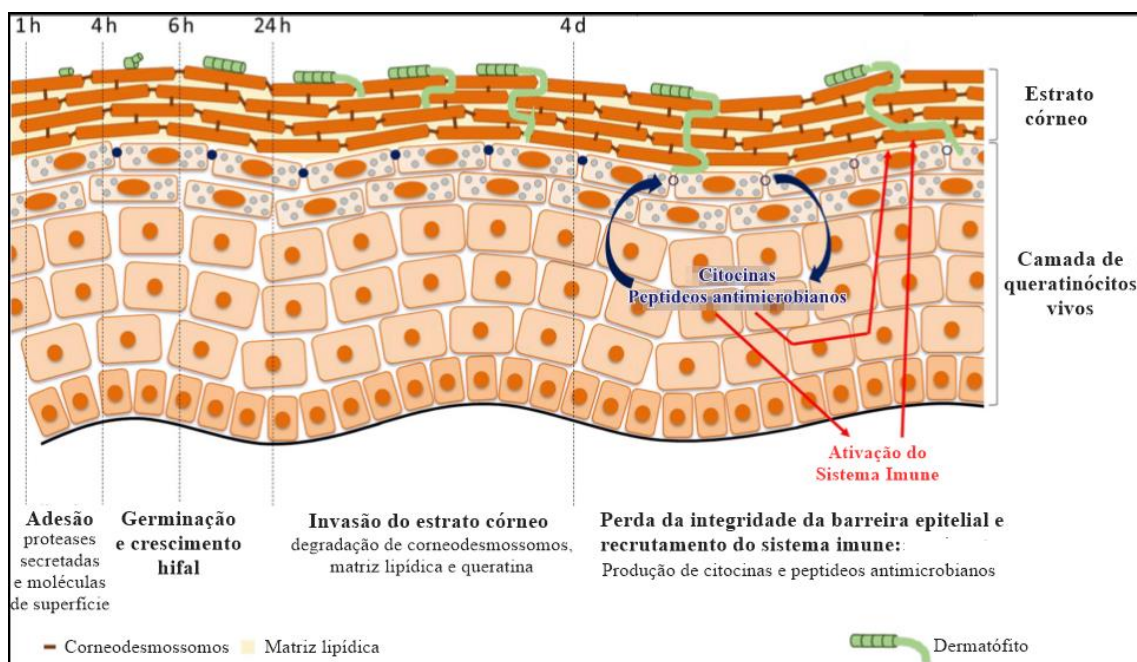
A onicomicose está associada a altas taxas de recorrência, e ocorre em cerca de 6,5% a 53% dos pacientes. Mesmo após a erradicação da infecção, uma recaída pode ocorrer dentro de um ano ou mais, com uma alta probabilidade de afetar mais da metade dos pacientes que foi tratado com sucesso (TOSTI; ELEWSKI, 2016).

Vários fatores podem influenciar uma recaída, como histórico familiar, estilo de vida, diabetes, escolha de terapia, características fúngicas infecciosas e lesões nas unhas (TOSTI; ELEWSKI, 2016). A cura completa de um paciente com onicomicose é um desafio devido à característica impenetrável da unha, que dificulta a penetração dos medicamentos, associada à ausência de função imune intrínseca (HALTEH; SCHER; LIPNER, 2016).

A disseminação de dermatófitos em humanos ocorre principalmente por contato indireto através das escamas no ambiente / roupas e contato direto entre humanos, desencadeando uma resposta inflamatória leve e infecção crônica (DE HOOG et al., 2017). Quando a pele humana é infectada por dermatófitos, três passos podem ser reconhecidos. O primeiro, pode acontecer na primeira hora de infecção, onde o artroconídio adere à epiderme hospedeira por meio de proteínas especializadas presentes na superfície fúngica (ESQUENAZI et al., 2003, 2004) e proteases liberadas por fungos, como a Subtilisina 3 (BĂGUȚ et al., 2012; BALDO et al., 2008, 2010). Em um segundo passo, chamado de germinação, o artroconídio detecta condições favoráveis e inicia a reativação da atividade metabólica e seu crescimento em hifas (LIU et al., 2007). O terceiro passo, é denominado de invasão e ocorre após quatro horas de infecção, em que o artroconídeo inicia a formação dos tubos germinativos que crescem para formar hifas segmentadas detectadas na superfície epidérmica a partir da sexta hora de infecção (ALJABRE et al., 1992; FAWAY et al., 2017; LIANG et al., 2016). As hifas invadem a camada cornificada epidérmica, enquanto digerem queratina em pequenos peptídeos e aminoácidos (GRUMBT et al., 2013). Após 24 horas, e durante os 3 dias seguintes à infecção, as hifas invadem a camada cornificada progredindo através de espaços intercelulares e dentro de corneócitos, provavelmente como resultado da degradação dos corneodesmossomos, matriz lipídica extracelular e queratina intracelular (ALJABRE et al., 1992; DUEK et al., 2004; FAWAY et al., 2017; LIANG et al., 2016). No quarto dia de infecção, as hifas atingem a camada granular. Nesta fase, a integridade da barreira epidérmica é perdida (FAWAY et al., 2017). A resposta do hospedeiro frente a uma infecção é extremamente relevante para as infecções

invasivas fúngicas, recorrendo tanto à resposta imune inata ou a resposta adaptativa (ROMANI, 2011; SAFDAR, 2007). Esta resposta é inicialmente uma resposta inflamatória e imunológica, com o objetivo da eliminação do agente patogênico. Por outro lado, o agente patogênico tem a capacidade de adaptar a célula hospedeira para sua própria conveniência, para assim promover a sua sobrevivência e gerar um ambiente adequado para a colonização do organismo hospedeiro. Após o início da infecção, vias de sinalização são ativadas, sendo ligadas à remodelação específica do estado da transcrição da célula hospedeira em resposta à presença do organismo patogênico (BAXT; GARZA-MAYERS; GOLDBERG, 2013). Células infectadas por fungos tipicamente desencadeiam uma resposta inflamatória aguda mediada por citocinas, incluindo as interleucinas e quimiocinas (ENGUITA et al., 2016). As etapas da infecção cutânea por dermatófitos, bem como os impactos no tecido epidérmico, são ilustradas na Figura 1.

**Figura 1** - Etapas da infecção cutânea por dermatófitos



Fonte: Faway, 2018.

## 1.2 *Trichophyton rubrum*

*Trichophyton rubrum* é o agente etiológico mais comum de casos clínicos de dermatofitoses humanos (ACHTERMAN; WHITE, 2012a, 2012b; ANTUORI et al., 2019; MARTINEZ et al., 2012) sendo responsável por 50%-90% das dermatofitoses em humanos (LEE et al., 2015). A infecção geralmente envolve a pele e é restrita às camadas cornificadas, como unhas, estrato córneo e cabelo, porém em hospedeiros imunocomprometidos, *T. rubrum* pode alcançar uma invasão dérmica profunda (RODWELL et al., 2008; SEÇKIN; ARIKAN; HABERAL, 2004). Ainda que não seja geralmente fatal, as infecções causadas pelo *T. rubrum* são muitas vezes difíceis de eliminar completamente e comprometem a qualidade de vida dos pacientes (ACHTERMAN; WHITE, 2012a; LENG et al., 2009; NENOFF et al., 2014). Embora as infecções por dermatófitos sejam tratáveis, há uma alta taxa de reinfecção; resta saber se isso se deve à recaída (o fungo não foi completamente erradicado durante o tratamento) ou a uma nova infecção (GUPTA; COOPER, 2008). Apesar da alta incidência e importância dos dermatófitos na micologia clínica, o diagnóstico desse tipo de infecção nem sempre é preciso e mesmo que tenha sido feitos grandes avanços ao longo dos anos na identificação e diagnóstico de dermatófitos, ainda há uma dificuldade na identificação desses organismos, devido principalmente a falta de um banco de dados completo para identificação de fungos patogênicos, (PETRUCCELLI et al., 2020).

Devido à grande variedade de *T. rubrum* e sua variabilidade na resistência aos medicamentos, ele é um bom modelo para um estudo genético de fungos superficiais patogênicos antes do surgimento de resistência a múltiplas drogas (ZHENG et al., 2019). Nos últimos anos, as tecnologias genômicas e proteômicas forneceram novos recursos para entender os fungos em profundidade. Metodologias de análise de genes de alto desempenho têm sido usadas para obter informações sobre muitos genes de dermatófitos e sobre seus perfis de expressão em diferentes condições experimentais (BURMESTER et al., 2011; DIDEHDAR et al., 2016; PERSINOTI et al., 2018). Projetos de sequenciamento de genoma completo foram concluídos para vários dermatófitos importantes. Esses estudos fornecem grandes quantidades de informações valiosas para elucidar a base molecular da invasão do hospedeiro por dermatófitos, sua virulência e seus mecanismos de resistência antifúngica (PAOLETTI et al., 2005).

Portanto, é útil investigar as propriedades fisiológicas e biológicas do *T. rubrum* em diferentes condições, o que aumentará nossa compreensão sobre esses fungos medicamente importantes e facilitará o desenvolvimento de terapias aprimoradas direcionadas a eles.

### 1.3 Tratamento de dermatofitoses

Várias abordagens terapêuticas são aplicadas no tratamento dessas infecções, como administração oral de terbinafina, itraconazol, fluconazol e cetoconazol (GUPTA; STUDHOLME, 2016; KREIJKAMP-KASPERS et al., 2017). Entretanto, o uso prolongado desses antifúngicos, associado a altas doses terapêuticas, necessárias para atingir uma concentração efetiva no local da infecção, resulta em efeitos colaterais sistêmicos, como toxicidade hepática, interações medicamentosas e problemas de biodisponibilidade (ARRESE; PIÉRARD, 2003; BAROT et al., 2014).

Na maioria dos países, se houver menos de 50% de envolvimento da placa ungueal doente e menos de três unhas envolvidas, a terapia tópica é uma consideração apropriada (GUPTA et al., 2019). O tratamento tópico tem um perfil de segurança favorável, pois eles exibem toxicidade sistêmica mínima; no entanto, as taxas de cura são consideravelmente mais baixas, uma vez que a placa ungueal atua como uma barreira contra a penetração do medicamento (GUPTA; DAIGLE; FOLEY, 2014).

Outra alternativa para o tratamento de onicomioses é o tratamento utilizando Lasers, que podem provocar um efeito fungicida devido ao aquecimento fototérmica do micélio fúngico por meio de fototermólise seletiva (ALTSHULER et al., 2001; ANDERSON; PARRISH, 1983). O direcionamento dos cromóforos fúngicos (por exemplo, quitina, xanthomegnina e melanina) é um método adicional que pode ser usado pelos lasers para obter efeitos fungicida (VURAL et al., 2008). Em janeiro de 2012, a Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA (FDA) aprovou quatro sistemas a laser para o “aumento temporário da unha clara na onicomicose”. Os estudos publicados forneceram evidências de que os lasers podem melhorar temporariamente a aparência estética das unhas onicomiosóticas; no entanto, as taxas de cura clínica relatadas (unhas 100% transparentes) são estimadas em 13% (GUPTA; VERSTEEG, 2017). Dessa forma os lasers não fornecem taxas de eficácia para parâmetros médicos que equivalem ou excedem os encontrados com tratamentos orais e tópicos.

Esse cenário de difícil do tratamento da onicomicose tem estimulado centros de pesquisa especializados em prospecção e desenvolvimento de novas composições mais eficientes e seguras (IOZUMI et al., 2019; RICH et al., 2019). No entanto, a dificuldade de testar modelos pré-clínicos para onicopatias devido às diferenças inerentes à morfologia e hábitos das espécies tipicamente usadas nesse processo, faz dos modelos *ex vivo* uma alternativa importante (MERCER et al., 2019).

O caminho da síntese de ergosterol é considerado como um alvo particularmente interessante para tratamentos antifúngicos, pois ele substitui o colesterol, que é o esterol específico das células animais, para modular a fluidez da bicamada fosfolipídica e servir como precursor de outros componentes celulares (BARASCH; GRIFFIN, 2008; GHANNOUM; RICE, 1999; TATSUMI et al., 2013). As células fúngicas são ainda cercadas por uma parede celular responsável pela resistência mecânica, forma celular e rigidez (LATGÉ, 2007a; PÉREZ; RIBAS, 2013). A parede celular desempenha um papel na adesão entre os próprios fungos, e entre fungos e outras células vivas. É composto de polissacarídeos como  $\beta$ -glucanos e quitina, e glicoproteínas (ERIN CHEN; FISCHBACH; BELKAID, 2018). As cadeias de quitina são interconectadas por ligações de hidrogênio para formar várias camadas e são covalentemente ligadas a  $\beta$ -glucanos e glicoproteínas em rede em seu lado externo (KLIS; RAM; DE GROOT, 2007; ROSS, 2001).

Há interesse atual em identificar novos alvos moleculares para o desenvolvimento de antifúngicos, uma vez que a maioria dos compostos disponíveis comercialmente tem como alvo a via biossintética ergosterol e/ou membrana celular (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2008). A este respeito, as chalconas tem sido evidenciadas por apresentarem múltiplos alvos fúngicos, como enzimas envolvidas na síntese de parede celular concomitante com a inibição da síntese de ácidos graxos e redução do teor de ergosterol (BITENCOURT et al., 2013). Um ensaio de co-cultivo de conídios de *T. rubrum* com queratinócitos expostos a *trans*-chalcona demonstrou a repressão de fatores de virulência conhecidos além de genes da via ergosterol (KOMOTO et al., 2015). Por essas razões, as chalconas são moléculas atraentes com múltiplos alvos fúngicos. A compreensão do modo de ação das chalconas pode ajudar a identificar novas estratégias de terapia antifúngica e esses compostos. Além disso elas poderiam ser usadas como uma sonda farmacológica para investigar alvos fúngicos promissores (BITENCOURT et al., 2019).

Outro alvo molecular para o desenvolvimento de antifúngicos é a parede celular, que é uma estrutura dinâmica essencial para manter a forma celular e proteger contra ameaças ambientais. Nesse sentido, a parede celular é remodelada de acordo com o estágio de desenvolvimento ou após a exposição da droga. Os rearranjos na composição da parede celular garantem a integridade estrutural durante condições que comprometem a integridade da parede celular e/ou da membrana (LEVIN, 2005).

Durante o estresse, a parede celular passa por remodelação através de um reforço por aumento de quantidades de quitina e incorporação de certas proteínas da parede celular. Esse rearranjo ocorre através da conversa cruzada entre diferentes vias de sinalização (LAGORCE et al., 2003; MEYER et al., 2007). Além disso, quaisquer alterações no crescimento polarizado de fungos filamentosos estão relacionadas ao comprometimento da formação da parede celular, bem como a condições que afetam indiretamente a biossíntese da parede celular. Assim, para melhorar as capacidades de sinalização da via CWI, a fim de lidar com diversas condições de estresse, este caminho cruza conversas com outras vias de sinalização ou proteínas (FUCHS; MYLONAKIS, 2009).

Diante disto, os dados obtidos por Bitencourt *et al.*, (2019) em um estudo de *microarray* mostraram que a exposição de *T. rubrum* em meio de cultura com queratina e *trans*-chalcona promoveu mudanças em três vias de sinalização distintas, sugerindo considerável interação entre as vias Tor, CDK kinase e MAPK. Além disso, revelou a ativação da MAPK após exposição a *trans*-chalcona por 1h. Estes resultados sugerem que o modo de ação da *trans*-chalcona está relacionada com alterações acentuadas no metabolismo fúngico, incluindo um desequilíbrio entre a síntese dos ácidos graxos e degradação que interfere com a integridade da membrana celular e da parede celular. Também, a *trans*-chalcona atua em alvos relacionados à fisiologia do dermatófito e ao processo de infecção. Além disso, a *trans*-chalcona atua em fatores de virulência, como proteases, bem como modula proteínas de choque térmico (BITENCOURT et al., 2019), e também possui uma característica termogênica que pode estar relacionada à redução do teor de ergosterol e consequente dano na parede celular ocasionando a morte celular fúngica (BITENCOURT et al., 2013).

Outro composto promissor para o tratamento de dermatofitoses, é o uso de derivados da curcumina como agente antifúngico. Curcumina é um componente ativo da conhecida cúrcuma, um ingrediente principal do curry em pó, que é amplamente utilizado na comida asiática (ZOROFCHIAN MOGHADAMTOUSI et al., 2014). Seu uso é indicado em doses de

até 12 g ao dia (GOEL; KUNNUMAKKARA; AGGARWAL, 2008) e muitos efeitos benéficos à saúde têm sido atribuídos à curcumina, incluindo os antimicrobianos e anti-inflamatórios que podem ser utilizados para tratamentos sistêmicos e tópicos (NGUYEN; FRIEDMAN, 2013; PRASAD et al., 2014; ZOROFCHIAN MOGHADAMTOUSI et al., 2014). Em modelos animais, a curcumina tem efeitos positivos sobre uma variedade de doenças inflamatórias da pele, pode melhorar a reparação de feridas, e provou ser um agente anti-inflamatório e antibacteriano eficaz em compostos para terapia tópica (AGRAWAL et al., 2014; HARSONO et al., 2013; KRAUSZ et al., 2015). A maioria das infecções por dermatófitos são infecções superficiais de pele confinadas ao estrato córneo. Nesta localização, os fungos são acessíveis para curcumina tópicamente aplicada e para luz de comprimento de onda adequado (BRASCH et al., 2017).

Estudos comprovaram consistentemente que uma inibição fotoquímica acentuada de fungos pode ser alcançada com a curcumina (AL-ASMARI; MEREDDY; SULTANBAWA, 2017; BALTAZAR et al., 2015a, 2015b; BRASCH et al., 2017), e seu potencial efeito antifúngico (BRASCH et al., 2017; BRASCH; BECK-JENDROSCHEK; MAHN, 2018; LEE; LEE, 2014; MARTINS et al., 2009; WUTHI-UDOMLERT et al., 2000). Em outro estudo, na busca por uma curcumina combinada com maior solubilidade em água, foi utilizado o Cavacurmin® que é uma formulação de curcuminoides (composta principalmente de curcumina), foi observada a inibição de forma eficaz e permanente o crescimento de *T. rubrum* (BRASCH et al., 2020).

Compostos que possuem efeitos anti-inflamatórios, antimicrobianos, antioxidantes e anticancerígenos têm presente em sua estrutura química diversos polifenóis, caracterizados pela presença de anéis aromáticos (BRGLEZ MOJZER et al., 2016). Dessa forma, há descrição de trabalhos que realizaram modificações na estrutura química da curcumina, gerando novos compostos que apresentaram melhor atividade antioxidante quando comparada com a curcumina original (SAHU, 2016). Além disso, a modificação dos anéis aromáticos terminais da curcumina revelou que os grupos doadores de elétrons podem aumentar a atividade anti-inflamatória desse composto (SARDJIMAN et al., 1997). A curcumina encapsulada mostrou mais efetividade em desencadear apoptose em *Candida albicans* do que a curcumina livre (SHARMA et al., 2010). Isso nos mostra a importância de alterar as características da curcumina através de modificações em sua molécula, para manter suas atividades benéficas e garantir uma maior biodisponibilidade no sítio ativo desejado.

#### 1.4 Proteínas fúngicas

Para melhor compreender o mecanismo de infecção fúngica, tem aumentado o estudo das proteínas fúngicas. Em *T. rubrum* algumas proteínas têm sido amplamente estudadas, como por exemplo: as proteases, que são os fatores de virulência mais estudados dos dermatófitos, pois são necessários para a absorção de nutrientes durante a colonização do tecido hospedeiro e a abundância dessas proteínas no genoma dermatófitos destaca sua importância no hábito de vida do dermatófito (GRUMBT; MONOD; STAIB, 2011; MARTINEZ et al., 2012). Bitencourt et al., (2019) verificou que o dermatófito *T. rubrum* quando crescido em meio contendo substratos proteicos (queratina e elastina) demonstrou a indução de genes codificando proteases e lipases respectivamente (BITENCOURT et al., 2019).

A secreção de enzimas proteolíticas por dermatófitos tem sido considerada um fator-chave na invasão, utilização e posterior disseminação dos fungos através do estrato córneo do hospedeiro (APODACA; MCKERROW, 1990). Jousson et al., (2004) cultivou o *T. rubrum* em meio contendo proteína de soja como única fonte de nitrogênio e realizou o sequenciamento e a caracterização de genes que codificam duas famílias de enzimas proteolíticas secretadas em *T. rubrum* resultando em uma família genética de sete membros subtilisina (SUB) (JOUSSON et al., 2004a) e uma família genética metaloprotease (MEP) de cinco membros (JOUSSON et al., 2004b). Algumas dessas proteases foram identificadas a partir da cultura sobrenadante de *T. rubrum* cultivada em meio contendo proteínas de soja como fonte única de nitrogênio e carbono, onde as atividades de várias enzimas em formas naturais ou recombinantes foram mensuradas (JOUSSON et al., 2004a, 2004b).

As queratinases são importantes fatores de virulência para os dermatófitos, pois são responsáveis pela degradação da queratina na pele, unhas ou cabelos em que esses organismos invadem (VERMOUT et al., 2008). Nos dermatófitos, as proteases extracelulares têm papéis importantes na aquisição de nutrientes, invasão (VERMOUT et al., 2008) e, para algumas proteases específicas, adesão celular (BĂGUȚ et al., 2012).

A classe da família das proteínas de choque térmico (HSP's), também conhecida como resposta ao estresse celular, vem sendo cada dia mais aprofundada nos estudos patógeno-

hospedeiro, pois essas proteínas estão presentes em todos os reinos vivos, exceto para archaea (CHEN; ZHONG; MONTEIRO, 2006) e representam cerca de 1–2% do total de proteínas celulares de mamíferos sob condições de não estresse (L; SL, 2005). Verificou-se que a superexpressão de HSPs promove a sobrevivência celular e protege as proteínas celulares do risco de dano ou agregação. Além do choque térmico, vários fatores aumentam a expressão de HSPs, incluindo fatores ambientais e químicos, causas fisiológicas sem estresse e condições de doença (PIRKKALA; SISTONEN, 2006).

As HSPs são classificadas de acordo com sua massa molecular, onde HSP70, por exemplo, significa subconjunto de HSPs com peso molecular de 70 kDa (HOTER; EL-SABBAN; NAIM, 2018). Os membros pertencentes à família de proteínas HSP90 são moléculas ubíquas altamente conservadas com um peso molecular aproximado de 90 kDa. Elas são chaperonas moleculares que promovem o dobramento de proteínas sintetizadas de novo ou incorretamente dobradas, neutralizando assim sua agregação. As proteínas HSP90 participam de processos celulares essenciais e vias regulatórias, como apoptose, controle do ciclo celular, viabilidade celular, dobramento e degradação de proteínas e eventos de sinalização. Além disso, eles induzem a imunidade adaptativa pela ativação de células apresentadoras de antígenos e células dendríticas. Seu papel proeminente na proteostase, diferenciação celular e desenvolvimento é bem reconhecido. É importante ressaltar que a superexpressão de HSP90 tem sido associada a muitas condições patológicas, como vários tipos de câncer, infecção viral, inflamação e doenças neurodegenerativas, sugerindo um papel potencial na patogênese de muitas doenças (CHEN; ZHONG; MONTEIRO, 2006; R; S; J, 2012). Em fungos ela contribui para a integridade da parede celular, germinação, pigmentação de conídios, resistência a drogas e virulência (JACOB et al., 2015; MARTINS et al., 2016; MENDES et al., 2018).

Outras proteínas interessantes são as quitinases, através delas os fungos são capazes de degradar a quitina exógena para fins nutricionais. Além disso, as quitinases são utilizadas para remodelar e reciclar a quitina da sua própria parede celular, onde é um importante componente estrutural, geralmente localizado nas camadas internas da parede celular do fungo, próximo da membrana plasmática (RUIZ-HERRERA 1991). Enquanto as paredes celulares da levedura têm um baixo teor de quitina de 0,5-5% e a localização da quitina é restrita a septos, anéis de constrição e cicatrizes de brotamento (BULIK et al., 2003; CHAFFIN et al., 1998), as paredes celulares dos fungos filamentosos consistem em até 20% ou mais de quitina e pode ser encontrada em toda a parede celular das hifas (RUIZ-HERRERA 1991). Na parede celular do

fungo, a quitina é reticulada com  $\beta$ -1,3-glucano e este complexo glucano-quitina é covalentemente ligado a outros polissacarídeos (LATGÉ, 2007b; MUZZARELLI et al., 2012). Análises conformacionais detalhadas da quitina fúngica são tecnicamente muito desafiadoras e, infelizmente, não disponível na literatura. As funções estendidas das quitinases fúngicas incluem defesas contra outros fungos e ataque agressivo ao parasitar outros organismos, por exemplo, micoparasitismo (fungos que parasitam outros fungos), entomopatógenos (fungos que atacam insetos) e fungos que capturam nematóides (SEIDL, 2008). O sequenciamento do genoma de *T. rubrum* revelou que os domínios de ligação LysM (que codificam quitinases) são abundantes em dermatófitos e provavelmente mascaram os componentes da parede celular do patógeno, sendo utilizados para confundir a resposta imune do hospedeiro facilitando o processo de infecção (KAR; PATEL; FREE, 2019).

Durante a interação hospedeira-patógeno, a expressão genética do patógeno é geralmente modulada por sinais do hospedeiro. Por isso torna-se necessário entender padrões e dinâmicas de expressão genética de patógenos, a fim de se obter uma visão dos mecanismos patogênicos e sua importância no processo de infecção do hospedeiro (DOBON et al., 2016).

### 1.5 Análise proteômica

O termo proteômica foi introduzido em 1995 para descrever todas as proteínas que são expressas em um genoma (ANDERSON; ANDERSON, 1996). A análise proteômica é uma ferramenta poderosa para a separação de um complexo de proteínas e sua identificação, tornando-se uma parte importante da estratégia da genômica funcional subsequente (ZHEN et al., 2007). Enquanto o termo genoma refere-se à sequência completa do DNA de um organismo, o proteoma diz respeito ao conjunto de proteínas expressas pelo genoma ou, no caso de organismos multicelulares, como o complemento proteico expresso por um tecido ou por células diferenciadas (WASINGER, V.C. et al., 1995). Comparado com o transcriptoma, o proteoma está mais diretamente relacionado à função e fenótipo (BHADAURIA et al., 2007). Diferentemente do genoma, o proteoma varia entre os componentes (células, tecidos, fluidos) de um mesmo organismo multicelular e, considerando-se um único tipo celular, o proteoma pode variar de acordo com as condições às quais o sistema está submetido, refletindo alterações nos níveis de síntese e degradação de proteínas, e à regulação das modificações pós-traducionais das mesmas. O recente aumento de trabalhos publicados na área proteômica ocorreu, em grande

parte, graças aos avanços metodológicos relacionados à separação de proteínas por eletroforese bidimensional em géis de poliacrilamida (2D-PAGE) e, principalmente, à identificação de proteínas utilizando espectrometria de massa (DI FALCO, 2018). O conjunto de técnicas e estratégias proteômicas continua expandindo-se constantemente, o que tem permitido um aumento na velocidade da identificação de proteínas, do estudo de modificações pós-traducionais, e da determinação de interações moleculares que ocorrem nos sistemas biológicos. Assim, existe uma crescente aplicação da proteômica em problemas biológicos que envolvem sinalização celular e transdução de sinais moleculares como, por exemplo, a expressão de proteínas em plantas após condições de salinidade, seca, e contato com patógenos (SALEKDEH; KOMATSU, 2007; SUN et al., 2004; YAN et al., 2005), indicando que a abordagem proteômica é útil para a análise de proteínas em função das alterações a que o organismo é submetido.

A cromatografia é uma técnica físico-química de separação e está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis: fase móvel e a fase estacionária (BERTON, D.C 2010). A cromatografia líquida pode ser combinada a diferentes sistemas de detecção como UV-Visível, Fluorescência, Índice de refração, eletroquímicos e o Espectrômetro de Massas (STOKVIS; ROSING; BEIJNEN, 2005). A técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa figuram entre os instrumentos analíticos mais poderosos e úteis para a quantificação de componentes orgânicos em misturas complexas em estudos ambientais (KLOEPFER; QUINTANA; REEMTSMA, 2005), pesquisa de qualidade e composição de alimentos (KRUVE *et al.*, 2008) e campos bioanalíticos e farmacêuticos (DAMS *et al.*, 2003).

A espectrometria de massas é uma técnica utilizada no estudo das massas de átomos, moléculas ou fragmentos de moléculas. De uma forma geral, a espectrometria de massas baseia-se em propriedades físicas do analito de forma a determinar a relação entre a massa e a carga ( $m/z$ ) de espécies ionizadas em fase gasosa. A proteômica baseada em espectrometria de massa é considerada uma tecnologia indispensável para interpretar a informação codificada no genoma (AEBERSOLD; MANN, 2003).

As técnicas de espectrometria de massas em tandem MS/MS envolvem dois estágios de MS. De forma que, no primeiro estágio, os íons de interesse são isolados dos outros íons gerados na fonte de íons. Este íon isolado – nomeado íon precursor – pode sofrer então subsequentes dissociações gerando assim fragmentos – denominados íons produto que são

então separados com base na sua massa/carga (GLISH; VACHET, 2003; HAN; ASLANIAN; YATES, 2008). Devido à sua sensibilidade e especificidade, especialmente MS/MS, são as técnicas de escolha na maioria dos laboratórios de controle de qualidade privados e governamentais (KAZA et al., 2019), que aplicam métodos analíticos validados.

O analisador de massas Orbitrap é composto por um eletrodo central fusiforme e um eletrodo externo em forma de barril. Os íons são injetados no volume entre os dois eletrodos. Com uma voltagem aplicada entre o eletrodo central e o eletrodo mais externo, um campo elétrico radial distorce a trajetória dos íons em direção ao eletrodo central, enquanto a velocidade tangencial cria uma força centrípeta (HU et al., 2005; PERRY; COOKS; NOLL, 2008). Ajustando os parâmetros do equipamento, os íons ficarão em um espiral quase circular dentro da armadilha. O campo elétrico axial causado pela forma cônica dos eletrodos forçam os íons para a parte mais larga da armadilha iniciando assim as oscilações harmônicas axiais. Eletrodos externos são então utilizados para detectar a corrente destas oscilações axiais. A corrente obtida no domínio do tempo, é transformadora, através da transformada de Fourier, para o domínio da frequência e então convertida no espectro de massas (ZUBAREV; MAKAROV, 2013).

A finalização do processo consiste na interpretação dos espectros gerados pelos espectrômetros de massas que é realizado por consultas a bancos de dados (XU *et al.*, 2006). Em alguns softwares de identificação das proteínas e peptídeos, a proteína ao ser identificada, recebe uma pontuação (score), além de informações como o número de acesso no banco de dados (NCBI), massa molecular, ponto isoelétrico e cobertura de sequência dos espectros de massas.

Alguns estudos têm sido feitos para analisar as proteínas em *T. rubrum*, sabe-se que em um meio contendo proteínas como única fonte de nitrogênio e carbono, os dermatófitos secretam um grande número de proteínas, especialmente proteases capazes de degradar o substrato em compostos que podem ser assimilados pelo fungo (JOUSSON et al., 2004b; MONOD et al., 2005). LENG et al., (2008) analisou o proteoma de conídios de *T. rubrum*, crescidos em meio de cultura Sabouraud, combinando-se proteômica *shotgun* com pré-fractionamento de amostras e digestão enzimática múltipla. No total, 1026 proteínas foram identificadas. A classificação funcional revelou que as proteínas identificadas cobriram quase todos os principais processos biológicos. Algumas proteínas foram esporos específicos e relacionados à sobrevivência e dispersão de conídios de *T. rubrum*, e muitas proteínas foram

importantes para a germinação de conídios e resposta às condições ambientais, o que sugeriu que o proteoma dos conídios de *T. rubrum* é consideravelmente complexo, e que a manutenção da dormência dos conídios é um processo intrincado e elaborado (LENG et al., 2008)

Também Xu *et al.*, (2019) realizou uma análise de propionilação de todo o proteoma nos estágios conidiais e miceliais de *T. rubrum* crescidos em Sabouraud, onde um total de 157 locais propionilados em 115 proteínas foram identificados, e a alta confiança da identificação de propionilação foi validada por ensaio de monitoramento de reação paralela (PRM). Os resultados mostram que as proteínas propioniladas estavam principalmente envolvidas em várias vias metabólicas. Uma comparação dos estágios conidiais e miceliais revelou que a maioria das proteínas e sítios propionilados eram específicos do estágio de crescimento e independentes da abundância de proteínas. Com base nas classificações de função, as proteínas propioniladas tiveram distribuição semelhante nos dois estágios. Além da acetilação, succinilação e propionilação identificadas em *T. rubrum*, 26 outros sítios também foram encontrados neste fungo (XU et al., 2019).

Outro estudo procurou identificar sistematicamente os sítios succinilados e proteínas em *T. rubrum* cultivado em meio Sabouraud onde em um total de 569 sítios de lisina succinilada foram identificados em 284 proteínas. Essas proteínas succiniladas estão envolvidas em vários processos celulares, como metabolismo, tradução e regulação epigenética. Além disso, 24 proteínas relacionadas à patogenicidade foram encontradas como succiniladas. A comparação do succiniloma nos estágios de conídios e micélios revelou que a maioria das proteínas succiniladas e locais eram específicos do estágio de crescimento. Foram identificadas 24 proteínas succiniladas relacionadas à patogenicidade em *T. rubrum* ou proteínas homólogas envolvidas na virulência em outros fungos, como por exemplo a Hsp70, Superóxido desmutase, adesinas entre outras. Oito proteases secretadas foram identificadas como succiniladas, incluindo aminopeptidase, endopeptidase aspártica Pep2, leucina aminopeptidase 1, leucina aminopeptidase 2, protease semelhante a subtilisina, proteína da família Peptidase S41, tripeptidil-peptidase SED2 e carboxipeptidase S1. Além das proteases secretadas, foram identificados transportador de múltiplas drogas, a malato sintase, duas GTPases do tipo Rh e as proteínas de choque térmico (Hsps) Hsp31, Hsp60, Hsp70 e Hsp90, foram fortemente succinilados (XU et al., 2017).

E Xu *et al.*,(2018) realizou a comparação entre os estágios conidial e micelial de *T. rubrum*, com base em seus proteomas de células inteiras e acetilomas de lisina. No total, 4.343

proteínas foram identificadas em ambos os estágios, e 1.879 proteínas foram identificadas como diferencialmente expressas entre os dois estágios. As proteases secretoras foram mais abundantes nos conídios, enquanto o metabolismo aeróbio e a síntese proteica foram significativamente ativados na fase micelial. Além disso, 386 sítios acetilados em 285 proteínas e 5.414 sítios acetilados em 2.335 proteínas foram identificados em conídios e micélios, respectivamente (XU et al., 2018).

A maioria dos trabalhos publicados é realizado com o meio Sabouraud, um meio de cultura rico em nutrientes, por isso torna-se necessário a padronização de um meio de cultura adequado para estudar as proteínas envolvidas na infecção, juntamente com os avanços na tecnologia proteômica e a disponibilidade de dados de sequências genômicas homólogas de outras espécies fúngicas relacionadas tornam possível a identificação global de proteínas secretadas em dermatófitos e a melhor compreensão do efeito dessas proteínas na patogenicidade destes fungos.

#### 1.6 Modelos de estudo

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, 2012b).

A fim de estudar o processo de infecção da pele, vários modelos de infecção foram desenvolvidos. Isso inclui o uso de corneócitos isolados (ALJABRE et al., 1993; ZURITA; HAY, 1987), pele humana explantada (BALDO et al., 2012; DUEK et al., 2004; KAUFMAN et al., 2007; SMIJS et al., 2007), culturas de células usando células de ovário de hamster chinês (CHO) (ESQUENAZI et al., 2003), modelos animais *in vivo*, incluem o uso de cobaias, camundongos e invertebrados (como larvas de *Galleria mellonella*), que também têm sido úteis para avaliar a atividade de drogas antifúngicas (BALTAZAR et al., 2014; FAWAY; LAMBERT DE ROUVROIT; POUMAY, 2018; ISHII et al., 2017; STAIB et al., 2010), queratinócitos humanos imortais (células HaCaT) (BITENCOURT et al., 2016a; CANTELLI et al., 2017; KOMOTO et al., 2015; PETRUCELLI et al., 2018) epiderme humana

reconstituída (EHE) (FAWAY et al., 2017) e crescimento do fungo em meios de cultura contendo substratos proteicos (BITENCOURT et al., 2016a; DE ABREU et al., 2020).

Este último modelo tem sido usado em diversos trabalhos que auxiliaram na compreensão do modo de ação do *T. rubrum*. Como por exemplo, a partir do crescimento do fungo em meios de cultura contendo queratina ou elastina a análise do transcriptoma mostrou uma indução de um grande número de proteases quando *T. rubrum* foi cultivado na presença de queratina, também promoveu a regulação positiva de um gene que codifica uma proteína semelhante à adesina MAD1 de *Magnaporthe grisea* com uma sequência de repetição adjacente. A expressão desse gene semelhante à adesina também foi induzida durante a co-cultura de *T. rubrum* com uma linha celular de queratinócito humano, confirmando seu papel nas interações fungo-hospedeiro (BITENCOURT et al., 2016a).

Também utilizando meio de cultura contendo queratina foi possível estudar genes que codificam proteínas da parede celular com repetições adjacentes revelando a regulação positiva de candidatas adesinas, como a adesina mad1 (TERG\_08771), msb2 (TERG\_05644), scw11 (TERG\_05576) e mps1 (TERG\_08369) na presença de queratina e também na presença de antifúngicos como o fluconazol, indicando essas sequências como novos alvos potenciais para o desenvolvimento de agentes antifúngicos (DE ABREU et al., 2020).

## 2 JUSTIFICATIVA

O *Trichophyton rubrum* é o agente etiológico responsável por mais de 69,5% das infecções causadas por fungos. As infecções provocadas por esse fungo ocorrem principalmente nas camadas queratinizadas como pele, pelos e unhas, pois ele utiliza a queratina como fonte de nutriente. Apesar da alta prevalência de dermatofitoses em todo o mundo, ainda é escasso o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvendo a interação fungo-hospedeiro. A análise funcional das proteínas envolvidas na degradação de estruturas queratinizadas do hospedeiro pode evidenciar atributos proteicos envolvidos na virulência e nos processos de infecção. Além disso, o uso de antifúngicos utilizando a ferramenta de meio de cultura com queratina pode evidenciar proteínas que podem ser alvos celulares putativos no desenvolvimento de novos agentes antifúngicos. A análise proteômica é uma ferramenta poderosa para a separação de um complexo de proteínas e sua identificação, tornando-se uma parte importante da estratégia da genômica funcional subsequente. Além disso, a análise comparativa dos trabalhos de transcriptoma dos trabalhos já publicados pelo grupo de pesquisa e o perfil proteômico de *T. rubrum* cultivado em meio de cultura contendo queratina e na presença de antifúngicos poderá ampliar a compreensão dos processos de patogenicidade deste fungo como a resposta a antifúngicos.

## 3 HIPÓTESE

As proteínas de *T. rubrum* são moduladas por moléculas antifúngicas e também por estímulos que mimetizam a resposta do hospedeiro.

## 4 OBJETIVO GERAL

Avaliar a modulação das proteínas de *T. rubrum* envolvidas na resposta fungo-hospedeiro e na resposta de moléculas antifúngicas de origem natural como a *trans*-chalcona e um curcuminoide utilizando meio de cultura contendo substratos proteicos, como modelo de infecção superficial.

### 4.1 Objetivos específicos

1. Padronizar uma ferramenta *in vitro* para estudo de infecção superficial utilizando meio de cultura contendo substrato proteico (queratina).

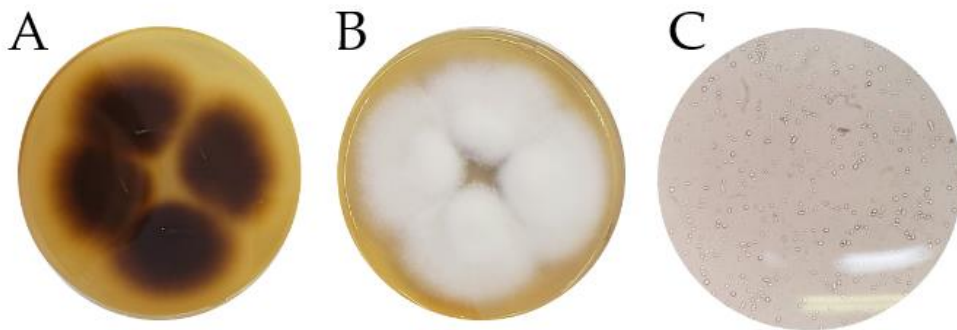
2. Avaliar as proteínas de *T.rubrum* moduladas na resposta fungo-hospedeiro, utilizando a ferramenta que simula a infecção superficial.
3. Avaliar as proteínas de *T.rubrum* moduladas em resposta a presença de agentes antifúngicas de origem natural (*trans*-chalcona e curcuminoide), utilizando a ferramenta de infecção superficial
4. Extrair, quantificar e sequenciar proteínas por espectrometria de massas em cada condição.
5. Análise comparativa dos resultados com bancos de dados de proteínas fúngicas disponíveis

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Linhagens utilizadas

Foi utilizada a linhagem sequenciada pelo Broad Institute CBS 118892 (figura 2). O cultivo da linhagem foi realizado em meio de cultura Sabouraud por 15 dias a 28° C, segundo os métodos previamente descritos por Bitencourt *et al* (2016).

**Figura 2** - Aspectos da linhagem de *T. rubrum* utilizada



A: Verso da placa de Petri, B: frente da placa de Petri, C : suspensão de conídios observados ao microscópio óptico com o aumento de 40x.

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

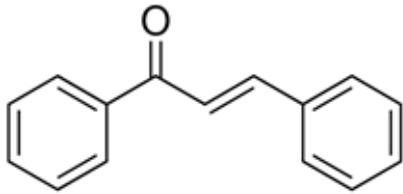
Suspensões de conídios foram preparadas a partir das culturas de *T. rubrum* CBS 118892 crescidas por 15 dias. A suspensão de conídios foi preparada em solução salina 0,9%, agitado para a liberação dos conídios, em seguida a suspensão foi filtrada em lã de vidro e o filtrado resultante foi transferido para um tubo estéril e sua concentração ajustada para as condições de uso: i) sua densidade óptica determinada entre 0,125 – 0,155 de absorbância, o que corresponde a 70-72% de transmitância, em um comprimento de onda de 530 nm, essa suspensão foi diluída 1:50 em meio RPMI para o teste de Concentração Inibitória Mínima, ii) a concentração de conídios foi verificada em um hematímetro e ajustada para  $1 \times 10^6$  conídios/ml para o cultivo em diferentes meios de cultura.

### 5.3 Compostos utilizados

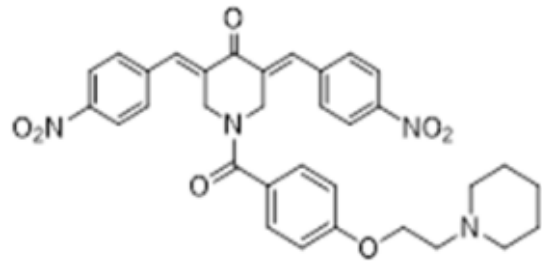
Para os ensaios biológicos foram utilizados a *trans*-chalcona que foi adquirida da Sigma Aldrich® e o curcuminoide 2088 foi gentilmente cedido pelo prof<sup>o</sup> Jonathan Dimmock da University of Saskatchewan do Canadá, químico medicinal o qual tem colaboração com o grupo de pesquisa (figura 3).

**Figura 3** - Estrutura molecular dos compostos utilizados

*Trans*-chalcona



Curcuminoide 2088



Fonte: elaborado pelo autor.

### 5.4 Determinação da Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração fungicida mínimo (CFM) dos compostos contra *T. rubrum*.

Para a determinação da concentração inibitória mínima dos compostos, foi realizada uma micro diluição seriada, de acordo com o método de referência de sensibilidade à antifúngicos M-38-A32 (CLSI, 2008), a qual utilizou placas de 96 poços fundo em “U” em meio RPMI, partindo de uma concentração de 500µg/mL. Após a micro diluição, adicionou-se a suspensão de conídios preparada anteriormente (item 5.2). Incubou-se as placas por 7 dias a 28°C, quando foi observado a mínima concentração do composto em que não apresentava um crescimento macroscópico do fungo.

A Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi determinada a partir dos resultados dos testes de CIM. Foram utilizados 100µL do meio de cultura respectivo a cada poço da placa de 96 onde foi determinada a CIM dos compostos, assim como, os controles positivos. O meio de cultura foi plaqueado em triplicata na superfície das placas contendo Agar Sabouraud dextrose

e foram incubados por 7 dias a 28°C. A CFM foi definida como a menor concentração do composto testado que inibiu o crescimento dos fungos. Os ensaios de CIM e o CFM foram realizados em três experimentos independentes em triplicata (Bitencourt *et al.*, 2016).

### 5.5 Cultivo de *T. rubrum* em diferentes meios de cultura

Inicialmente foi realizado um pré-cultivo, onde suspensões de conídios, na concentração de  $1 \times 10^6$  conídios/ml, foram adicionadas em triplicata em Meio Sabouraud (SAB) (APÊNDICE) e mantidos por 3 dias com agitação de 130rpm a 28°C, logo após os micélios foram filtrados e adicionados nas condições de estudo: i) MM: Meio Mínimo de Cove (COVE, 1966) (APÊNDICE) suplementado com 70 mM de nitrato (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 50 mM de glucose (Sigma Aldrich); ii) Meio Mínimo com Queratina (MQ): meio mínimo de Cove suplementado com queratina bovina a 0,5%, iii) Meio Mínimo com Queratina adicionado de *Trans*-chalcona (MQTC): meio mínimo de Cove suplementado com queratina bovina a 0,5% + 3,25µM de *trans*-chalcona (70% do valor de CIM), i) Meio Mínimo com Queratina adicionado do curcuminoide 2088 (MQCur): meio mínimo de Cove suplementado com queratina bovina a 0,5% + 4,13µM do curcuminoide 2088 (70% do valor de CIM). O pH do meio foi ajustado para 5,0 em todas as condições num volume de 150 mL para todas as condições e todos os ensaios foram incubados por 7 dias com agitação de 150 rpm a 28°C. Em seguida, os micélios foram filtrados em funil de Büchner, em condições estéreis, sendo esses micélios, posteriormente, congelados com nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C para as etapas seguintes de acordo com Bitencourt *et al.*, (2016).

### 5.6 Preparação de amostra

A preparação das amostras, quantificação e sequenciamento das proteínas foi realizada pela empresa VERITAS BIOTECNOLOGIA LTDA através de serviço terceirizado. Cerca de 150 mg das amostras de micélio foram pesados, ressuspendidos em 1mL de solução de SDS 1% contendo 1mg de DTT (ditiotreitól), sendo em seguida fervidos por 15 minutos a 100° C. Após as amostras voltarem a temperatura ambiente, foram adicionados 1mL de tampão contendo uréia 8M, 5mg de iodoacetamida e Tris-HCl 0,15M pH 8.8 e incubação por 20 minutos no escuro. Em seguida foi realizada a sonicação de cada amostra, em 3 ciclos de 1

minuto cada, com amplitude de 30 e descanso de 2 segundos, mantendo a amostra em gelo. Após a centrifugação a 5.000xg por 30 min a 4°C, o sobrenadante foi coletado. 500µL foram aliqüotados e a precipitação das proteínas foi realizada pela adição de acetona 50%, etanol 49.9% e ácido fórmico 0.1%. O pellet obtido foi ressuspendido em 100 µL de tampão contendo uréia 8M, Tris-HCl 0,15M pH 8.8 e o extrato proteico foi então obtido.

### 5.7 Quantificação de proteínas

Para a quantificação de proteínas foi utilizado o método de Bradford com o reagente Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, cód. 500-0006, Lote L9700067 Rev J). A curva padrão foi realizada com diferentes diluições de BSA, preparada a partir de estoque adquirido comercialmente (Protein Standard 200mg/mL, Sigma, Cód. # P5369-10 mL Lote 110M6005). As amostras foram distribuídas nas microplacas em duplicatas de 1µL cada. A absorbância em 595 nm foi lida em espectrofotômetro (Molecular Devices, SpectraMax Plus 384). Através dos dados obtidos na quantificação, foi estimada a massa total de proteínas presentes nas amostras recebidas.

### 5.8 Preparação das amostras para análise proteômica

Foram utilizados 25 µg de proteína para cada amostra ensaiada. O volume das amostras foi diluído 8 vezes em solução de 0,1 M de bicarbonato de amônio pH  $\geq 8,0$  obtendo-se um volume final de 400µL. As amostras foram então incubadas com 1 µg de tripsina (Promega, V511A) à 37°C durante 12h. Previamente a aplicação das amostras no espectrômetro de massas foi realizado o “clean-up”/ desalting” das amostras, utilizando-se a coluna OASIS HLB Cartridge 1cc (cat. number: 186000383, Waters), conforme descrição do fabricante. Brevemente, a coluna foi equilibrada com solução acetonitrila 2% contendo ácido fórmico 0,1% e a eluição do material de interesse foi realizada com acetonitrila 50%. As amostras foram em seguida secas em speed vac em tubos de baixa absorção de proteínas (ependorf) e aplicadas em espectrômetro de massas, conforme descrito a seguir.

### 5.9 Análise por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas LC MS/MS

A análise por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas LC MS/MS foi realizada na empresa VERITAS BIOTECNOLOGIA LTDA através de serviço terceirizado, onde as amostras digeridas conforme descrito acima, foram analisadas por espectrômetro de massas Orbitrap Eclipse (ThermoFisher) acoplado a um sistema de cromatografia nanoflow Nano LC-MS/MS (Dionex Ultimate 3000 RLSCnano System, ThermoFisher). Cerca de 2 µg de cada amostra foram injetados para análise. Os peptídeos foram separados em coluna NanoEase MZ peptide BEH C18 (130A, 1.7µm, 75µm×250mm, Waters) 300 nL/min utilizando um gradiente de 4-50% de acetonitrile em 90 minutos. Os dados foram adquiridos no MS1 na faixa de M/Z 375–1500 (120.000 de resolução, AGC target 1 E6 com tempo máximo de injeção de 100 ms). Os íons mais abundantes foram submetidos a MS/MS com energia de colisão de 30%, janela de isolamento do precursor de 1.2 m/z, AGC target 1E5 e resolução de 15.000. Os dados brutos (arquivos.raw) foram convertidos a mzXML e processados utilizando o algoritmo Comet (v. 2018). Foi utilizado o banco de dados de fungos, de proteínas revisadas (UNIPROT Junho 2021). Os peptídeos identificados que atingiram o critério máximo de 5% de erro pelo Peptide Prophet foram utilizados para a extração da intensidade para quantificação pelo algoritmo Xpress. Os peptídeos e suas intensidades foram agrupados para gerar a intensidade da proteína utilizando um script na linguagem R.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos compostos contra *T.rubrum*.

Após os sete dias de crescimento foi possível identificar a menor concentração dos compostos que inibiram o crescimento fúngico, onde os dois compostos antifúngicos testados apresentaram resultados semelhantes frente ao *T. rubrum*, conforme descrito na tabela 1 abaixo:

**Tabela 1** - Concentração inibitória mínima (CIM), concentração dos compostos utilizados na proteômica, e concentração fungicida mínima (CFM) em  $\mu\text{M}$  dos compostos antifúngicos

Composto	Valor de CIM	70% do Valor de CIM	Valor de CFM
<i>Trans-chalcona</i>	4,65	3,25	4,65
<b>Curcuminoide 2088</b>	5,9	4,13	5,9
<b>Fluconazol</b>	15.62	10,93	N.E

N.E = Valor não encontrado

Diante dos valores de CIM de cada composto antifúngico ensaiado, observamos que o valor é menor do que o antifúngico comercial fluconazol, mostrando que os compostos antifúngicos testados foram mais eficientes do que o antifúngico utilizado atualmente no tratamento das dermatofitoses. Para os experimentos de proteômica o fungo foi cultivado na presença de 70% do valor de CIM dos antifúngicos (Tabela 1), valor que não impediu o crescimento fúngico e foi possível obter massa micelial para avaliação das proteínas na presença desses compostos antifúngicos de origem natural.

### 6.2 Quantificação das proteínas

Após avaliação da concentração de proteína presente em cada uma das amostras, pelo método de Bradford, estimamos a quantidade de proteína em mg/mL, conforme mostrado na tabela 2 abaixo:

**Tabela 2** - Quantificação de proteínas

<b>Amostra</b>	<b>Concentração de Proteínas (mg/mL)</b>
<b>MM</b>	0,27
<b>MQ</b>	1,0
<b>MQTC</b>	1,6
<b>MQCur</b>	1,2

### 6.3 Análise por espectrometria de massas

As amostras foram analisadas individualmente através de espectrometria de massas avançada e o número de peptídeos identificados foi utilizado como indicativo aproximado de abundância.

Foram identificadas 895 proteínas em MM, 348 em MQ, 238 em MQTC e 276 em MQCur. Todas as proteínas identificadas foram comparadas às do banco de dados de proteínas não redundantes do NCBI, ao banco de dados de grupos ortólogos eucarióticos, ao banco de dados de proteínas (UNIPROT) e ao banco de dados de ontologia de genes para obter informações de anotação funcional. São mostrados nas tabelas 3 e 4 as 30 proteínas mais abundantes em MM e em MQ, respectivamente.

**Tabela 3** - 30 proteínas mais abundantes em MM.

<b>MM</b>					
<b>Número de peptídeos</b>	<b>Nome da proteína</b>	<b>TERG</b>	<b>Gene Ontology (processo biológico)</b>	<b>Gene Ontology (componente celular)</b>	<b>Gene ontology (função molecular)</b>
<b>526</b>	Glutamate dehydrogenase	TERG_04580	cellular amino acid metabolic process [GO:0006520]		glutamate dehydrogenase (NADP+) activity [GO:0004354]; nucleotide

				binding [GO:0000166]
119	Hsp90-like protein	TERG_06963	protein folding [GO:0006457]	ATPase activity [GO:0016887]; ATP binding [GO:0005524]; unfolded protein binding [GO:0051082]
116	Elongation factor 2	TERG_04928		mitochondrion [GO:0005739] GTPase activity [GO:0003924]; GTP binding [GO:0005525]; translation elongation factor activity [GO:0003746]
114	Woronin body major protein	TERG_04281	positive regulation of translational elongation [GO:0045901]	ribosome binding [GO:0043022]; translation elongation factor activity [GO:0003746]
91	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12)	TERG_04402	glucose metabolic process [GO:0006006]; glycolytic process [GO:0006096]	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) (phosphorylating) activity [GO:0004365]; NAD binding [GO:0051287]; NADP binding [GO:0050661]
82	Elongation factor 1-alpha	TERG_00548		GTPase activity [GO:0003924]; GTP binding [GO:0005525]; translation elongation factor

					activity [GO:0003746]
82	Hsp70-like protein	TERG_06505			ATPase activity [GO:0016887]; ATP binding [GO:0005524]
78	Plasma membrane ATPase (EC 7.1.2.1)	TERG_04130	proton export across plasma membrane [GO:0120029]	integral component of membrane [GO:0016021] ; plasma membrane [GO:0005886]	ATP binding [GO:0005524]; P-type proton-exporting transporter activity [GO:0008553]
77	Aldehyde dehydrogenase	TERG_01404			oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, NAD or NADP as acceptor [GO:0016620]
72	Beta-glucosidase (EC 3.2.1.21)	TERG_00481	cellulose catabolic process [GO:0030245]		beta-glucosidase activity [GO:0008422]; scopolin beta-glucosidase activity [GO:0102483]
70	CFEM domain-containing protein	TERG_01507		anchored component of membrane [GO:0031225] ; cell wall [GO:0005618] ; plasma membrane [GO:0005886]	
69	Alpha-1,4 glucan phosphorylase (EC 2.4.1.1)	TERG_03875	carbohydrate metabolic process [GO:0005975]		glycogen phosphorylase activity [GO:0008184];

				linear malto-oligosaccharide phosphorylase activity [GO:0102250]; pyridoxal phosphate binding [GO:0030170]; SHG alpha-glucan phosphorylase activity [GO:0102499]
68	Uncharacterized protein	TERG_02735	response to oxidative stress [GO:0006979]	heme binding [GO:0020037]; iron ion binding [GO:0005506]; oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen [GO:0016705]; peroxidase activity [GO:0004601]
67	Beta-hexosaminidase (EC 3.2.1.52)	TERG_04775	carbohydrate metabolic process [GO:0005975]	beta-N-acetylhexosaminidase activity [GO:0004563]; N-acetyl-beta-D-galactosaminidase activity [GO:0102148]
65	Uncharacterized protein	TERG_05138		
63	Glutamine-fructose-6-phosphate	TERG_01677	carbohydrate derivative metabolic	carbohydrate derivative

	transaminase (Isomerizing)		process [GO:1901135]		binding [GO:0097367]
<b>62</b>	Phosphoacetylglucosamine mutase (PAGM) (EC 5.4.2.3) (Acetylglucosamine phosphomutase) (N-acetylglucosamine-phosphate mutase)	TERG_00250	carbohydrate metabolic process [GO:0005975]; UDP-N-acetylglucosamine biosynthetic process [GO:0006048]		magnesium ion binding [GO:0000287]; phosphoacetylglucosamine mutase activity [GO:0004610]
<b>60</b>	ATP-dependent 6-phosphofructokinase (ATP-PFK) (Phosphofructokinase) (EC 2.7.1.11) (Phosphohexokinase)	TERG_05437	fructose 6-phosphate metabolic process [GO:0006002]	cytoplasm [GO:0005737]	6-phosphofructokinase activity [GO:0003872]; ATP binding [GO:0005524]; metal ion binding [GO:0046872]
<b>59</b>	Pyruvate carboxylase (EC 6.4.1.1)	F2SGS7_TRIR C	gluconeogenesis [GO:0006094]; pyruvate metabolic process [GO:0006090]		ATP binding [GO:0005524]; biotin binding [GO:0009374]; metal ion binding [GO:0046872]; pyruvate carboxylase activity [GO:0004736]
<b>59</b>	Uncharacterized protein	TERG_03624			
<b>55</b>	Uncharacterized protein	TERG_07641			
<b>54</b>	Hsp75-like protein	TERG_01883	'de novo' cotranslational protein folding [GO:0051083];	polysome [GO:0005844]	ATPase activity [GO:0016887]; ATP binding [GO:0005524];

			cellular response to glucose starvation [GO:0042149]; cytoplasmic translation [GO:0002181]; regulation of translational fidelity [GO:0006450]; ribosomal subunit export from nucleus [GO:0000054]; rRNA processing [GO:0006364]; translational frameshifting [GO:0006452]	unfolded protein binding [GO:0051082]
53	Hsp60-like protein	TERG_04141	protein refolding [GO:0042026]	ATPase activity [GO:0016887]; ATP binding [GO:0005524]
53	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) (EC 5.2.1.8)	TERG_06858	protein folding [GO:0006457]	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity [GO:0003755]
51	ATP synthase subunit beta (EC 7.1.2.2)	TERG_04145	proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1) [GO:0045261]	ATP binding [GO:0005524]; proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism [GO:0046961]; proton-transporting ATP synthase activity, rotational

					mechanism [GO:0046933]
50	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	TERG_02032		proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1) [GO:0045261]	ATP binding [GO:0005524]; proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism [GO:0046933]
50	Uncharacterized protein	TERG_04121			metal ion binding [GO:0046872]
47	ADP/ATP translocase (ADP,ATP carrier protein)	TERG_08655	mitochondrial ADP transmembrane transport [GO:0140021]; mitochondrial ATP transmembrane transport [GO:1990544]	integral component of membrane [GO:0016021]; mitochondrial inner membrane [GO:0005743]	ATP:ADP antiporter activity [GO:0005471]
46	Uncharacterized protein	TERG_06144			
45	Uncharacterized protein	TERG_00911			

**Tabela 4** - 30 proteínas mais abundantes em MQ

MQ					
Número de peptídeos	Nome da proteína	TERG	Gene Ontology (processo biológico)	Gene Ontology (componente celular)	Gene Ontology (função molecular)
132	Beta-hexosaminidase (EC 3.2.1.52)	TERG_04775	carbohydrate metabolic process [GO:0005975]		beta-N-acetylhexosaminidase activity [GO:0004563]; N-acetyl-beta-D-

					galactosaminidase activity [GO:0102148]
63	Hsp70-like protein	TERG_06505			ATPase activity [GO:0016887]; ATP binding [GO:0005524]
58	Actin	TERG_06637	ascospore wall assembly [GO:0030476] ; cellular response to oxidative stress [GO:0034599] ; DNA repair [GO:0006281] ; endocytosis [GO:0006897] ; establishment of cell polarity [GO:0030010] ; mitotic actomyosin contractile ring contraction [GO:1902404] ; protein secretion [GO:0009306] ; vacuole inheritance [GO:0000011]	actin cortical patch [GO:0030479]; actin filament [GO:0005884]; actin filament bundle [GO:0032432]; cellular bud neck contractile ring [GO:0000142]; Ino80 complex [GO:0031011]; NuA4 histone acetyltransferase complex [GO:0035267]; Swr1 complex [GO:0000812]	ATP binding [GO:0005524]; histone acetyltransferase activity [GO:0004402]; identical protein binding [GO:0042802]; structural constituent of cytoskeleton [GO:0005200]
49	Uncharacterized protein	TERG_05518			oxidoreductase activity [GO:0016491]
32	Plasma membrane ATPase (EC 7.1.2.1)	TERG_04130	proton export across plasma membrane [GO:0120029]	integral component of membrane [GO:0016021]; plasma	ATP binding [GO:0005524]; P-type proton-exporting transporter activity [GO:0008553]

				membrane [GO:0005886]	
30	Superoxide dismutase [Cu-Zn] (EC 1.15.1.1)	TERG_04335			metal ion binding [GO:0046872]; superoxide dismutase activity [GO:0004784]
28	Elongation factor 1-alpha	TERG_00548			GTPase activity [GO:0003924]; GTP binding [GO:0005525]; translation elongation factor activity [GO:0003746]
27	Glutamate dehydrogenase	TERG_04580	cellular amino acid metabolic process [GO:0006520]		glutamate dehydrogenase (NADP+) activity [GO:0004354]; nucleotide binding [GO:0000166]
27	Aldehyde dehydrogenase	TERG_01404			oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, NAD or NADP as acceptor [GO:0016620]
26	Hsp90-like protein	TERG_06963	protein folding [GO:0006457]		ATPase activity [GO:0016887]; ATP binding [GO:0005524]; unfolded protein binding [GO:0051082]
25	Woronin body major protein	TERG_04281	positive regulation of translational elongation [GO:0045901]		ribosome binding [GO:0043022]; translation elongation factor activity [GO:0003746]
25	Tubulin beta chain	TERG_07904	cytoplasmic microtubule	cytoplasmic microtubule	GTPase activity [GO:0003924]; GTP

---

organization [GO:0031122] ; establishment or maintenance of cell polarity regulating cell shape [GO:0071963] ; intracellular distribution of mitochondria [GO:0048312] ; mitotic spindle assembly [GO:0090307] ; mitotic spindle elongation [GO:0000022] ; mitotic spindle pole body duplication [GO:1903087] ; nuclear migration by microtubule mediated pushing forces [GO:0098863] ; positive regulation of intracellular protein transport [GO:0090316]	[GO:0005881]; spindle microtubule [GO:0005876]; tubulin complex [GO:0045298]	binding [GO:0005525]; structural constituent of cytoskeleton [GO:0005200]
---	---	---

---

<b>24</b>	Chitinase (EC 3.2.1.14)	TERG_00216	chitin catabolic process [GO:0006032] ; polysaccharide catabolic	chitinase activity [GO:0004568]; chitin binding [GO:0008061]
-----------	----------------------------	------------	---	---

---

			process [GO:0000272]		
22	Ribos_L4_asso_C domain-containing protein	TERG_04506	translation [GO:0006412]	ribosome [GO:0005840]	structural constituent of ribosome [GO:0003735]
22	Formate dehydrogenase (FDH) (EC 1.17.1.9) (NAD- dependent formate dehydrogenase)	TERG_06614	formate catabolic process [GO:0042183]	cytoplasm [GO:0005737]; formate dehydrogenase complex [GO:0009326]	formate dehydrogenase (NAD <sup>+</sup> ) activity [GO:0008863]; NAD binding [GO:0051287]; oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor [GO:0016616]
21	Elongation factor 2	TERG_04928		mitochondrion [GO:0005739]	GTPase activity [GO:0003924]; GTP binding [GO:0005525]; translation elongation factor activity [GO:0003746]
21	Uncharacterized protein	TERG_07641			
21	Alpha- mannosidase (EC 3.2.1.24)	TERG_12680	mannose metabolic process [GO:0006013]		alpha-mannosidase activity [GO:0004559]; carbohydrate binding [GO:0030246]; metal ion binding [GO:0046872]
21	Uncharacterized protein	TERG_00060			
21	Uncharacterized protein	TERG_05151			

<b>20</b>	Neutral ceramidase (EC 3.5.1.23)	TERG_00899	ceramide catabolic process [GO:0046514]		ceramidase activity [GO:0102121]; N-acylsphingosine amidohydrolase activity [GO:0017040]
<b>20</b>	Uncharacterized protein	TERG_06927		integral component of membrane [GO:0016021]	
<b>19</b>	But2 domain-containing protein	TERG_06780			
<b>18</b>	Beta-glucosidase (EC 3.2.1.21)	TERG_00481	cellulose catabolic process [GO:0030245]		beta-glucosidase activity [GO:0008422]; scopolin beta-glucosidase activity [GO:0102483]
<b>18</b>	CFEM domain-containing protein	TERG_01507		anchored component of membrane [GO:0031225]; cell wall [GO:0005618]; plasma membrane [GO:0005886]	
<b>18</b>	Transketolase	TERG_01359			metal ion binding [GO:0046872]; transferase activity [GO:0016740]
<b>17</b>	Thioredoxin domain-containing protein	TERG_08848			peroxidase activity [GO:0004601]
<b>17</b>	Thioredoxin domain-containing protein	TERG_00124			peroxidase activity [GO:0004601]
<b>17</b>	Mitochondrial thiamine	TERG_04311	mitochondrial phosphate ion	integral component of	inorganic phosphate transmembrane

	pyrophosphate carrier 1		transmembran e transport [GO:1990547]	membrane [GO:0016021]; mitochondrial inner membrane [GO:0005743]	transporter activity [GO:0005315]
17	MFS domain-containing protein	TERG_04400		integral component of membrane [GO:0016021]; plasma membrane [GO:0005886]	

Dentre as proteínas mais abundantes encontradas nos meios: MM (tabela 3) e MQ (tabela 4), a classe de proteínas de choque térmico (HSPs) nos chamou atenção, pois estão envolvidas nas interações patógeno-hospedeiro e desempenham um papel importante durante a infecção fúngica de tecidos queratinizados (DA C. GODINHO et al., 2014; NEVES-DA-ROCHA et al., 2019). A Hsp90 tem sido estudada como alvo antifúngico em *T. rubrum* (GAZIANO et al., 2018), e sua inibição diminuiu a capacidade de *T. rubrum* de crescer em fragmentos de unha (M. MARTINEZ-ROSSI et al., 2015). Além disso, durante o crescimento de *T. rubrum* em um meio de cultura adicionado de uma fonte de queratina, ocorreu a indução de algumas proteínas de choque térmico como a hsp70-like (Terg\_06505) e a hsp90-like (Terg\_06963) (BITENCOURT et al., 2019). Durante a interação com as moléculas do hospedeiro (co-cultura com queratinócitos), alguns genes que codificam HSPs foram regulados positivamente em *T. rubrum*, como *hsp30*, *hsp104* e a *hsp75 like* (NEVES-DA-ROCHA et al., 2019) e a superexpressão de genes *hsp60*, *hsp70* e *hsp78* foram promovidos através da interação com fragmentos de unha humana (JACOB et al., 2015; M. MARTINEZ-ROSSI et al., 2015). Também a inibição de uma HSP (Hsp90) causou um comprometimento grave no processo de infecção das unhas por *T. rubrum* e prejudicou a atividade queratinolítica a 37 ° C (JACOB et al., 2015; NEVES-DA-ROCHA et al., 2019). Esses dados confirmam a importância das HSPs na interação patógeno hospedeiro.

Algumas proteínas que são comuns para MM e MQ, são conhecidas em outros fungos como por exemplo a proteína Woronin body que é conhecida por ser importante para a resistência ao estresse e a virulência em *Aspergillus fumigatus* (BECK; ECHTENACHER; EBEL, 2013; LEONHARDT; BECK; EBEL, 2016). Também, a proteína CFEM domain-

containing protein encontrada em *Magnaporthe oryzae* é considerado um fator de virulência fungico pois mutantes nocautes dessa proteína se tornaram incapazes de penetrar nas folhas de arroz (N; S, 2017). Mostrando assim que as proteínas Woronin body e CFEM domain-containing protein encontradas nesse trabalho estão ligados ao estresse e virulência fúngica.

Outra proteína interessante encontrada em maior abundância em MQ, foi a Tioredoxina (tabela 4), a qual vem sendo estudada como um possível alvo antifúngico. Quando o *T. rubrum* foi co-cultivado com células de queratinócitos humanos, o gene (TERG\_08480) que codifica uma Tioredoxina foi regulado positivamente quando exposto a terbinafina (PETRUCELLI et al., 2019). Também em *Trichophyton mentagrophytes* a tioredoxina foi induzida por elementos cutâneos superficiais (queratina) e profundos (elastina), sugerindo que o produto desse gene poderia ser importante na dermatofitose superficial e profunda (KAUFMAN et al., 2005). Essas informações, juntamente com nosso trabalho, onde outras duas tioredoxinas (TERG\_08848 e TERG\_00124) foram abundantes na presença de queratina, sugerem que essa proteína está ligada ao processo infeccioso de *Trichophyton*.

As 30 proteínas mais abundantes quando o fungo foi crescido na presença dos compostos (*trans*-chalcona e curcuminoide) são apresentadas nas tabelas 5 e 6 respectivamente.

**Tabela 5** - 30 proteínas mais abundantes em MQTC

MQTC					
Número de peptídeos	Nome da proteína	TERG	Gene Ontology (processo biológico)	Gene Ontology (componente celular)	Gene Ontology (função molecular)
94	Beta-hexosaminidase (EC 3.2.1.52)	TERG_04775	carbohydrate metabolic process [GO:0005975]		beta-N-acetylhexosaminidase activity [GO:0004563]; N-acetyl-beta-D-galactosaminidase activity [GO:0102148]
46	Uncharacterized protein	TERG_04037			
36	Actin	TERG_06637	ascospore wall assembly	actin cortical patch	ATP binding [GO:0005524];

			[GO:0030476]; cellular response to oxidative stress [GO:0034599]; DNA repair [GO:0006281]; endocytosis [GO:0006897]; establishment of cell polarity [GO:0030010]; mitotic actomyosin contractile ring contraction [GO:1902404]; protein secretion [GO:0009306]; vacuole inheritance [GO:0000011]	[GO:0030479] ; actin filament [GO:0005884] ; actin filament bundle [GO:0032432] ; cellular bud neck contractile ring [GO:0000142] ; Ino80 complex [GO:0031011] ; NuA4 histone acetyltransfera se complex [GO:0035267] ; Swr1 complex [GO:0000812]	histone acetyltransferase activity [GO:0004402]; identical protein binding [GO:0042802]; structural constituent of cytoskeleton [GO:0005200]
26	Hsp70-like protein	TERG_06505			ATPase activity [GO:0016887]; ATP binding [GO:0005524]
20	Elongation factor 1-alpha	TERG_00548			GTPase activity [GO:0003924]; GTP binding [GO:0005525]; translation elongation factor activity [GO:0003746]
20	Elongation factor 2	TERG_04928		mitochondrion [GO:0005739]	GTPase activity [GO:0003924]; GTP binding [GO:0005525]; translation elongation factor activity [GO:0003746]

<b>19</b>	Glutamate dehydrogenase	TERG_04580	cellular amino acid metabolic process [GO:0006520]		glutamate dehydrogenase (NADP+) activity [GO:0004354]; nucleotide binding [GO:0000166]
<b>19</b>	Hsp90-like protein	TERG_06963	protein folding [GO:0006457]		ATPase activity [GO:0016887]; ATP binding [GO:0005524]; unfolded protein binding [GO:0051082]
<b>16</b>	Uncharacterized protein	TERG_05151			
<b>16</b>	But2 domain-containing protein	TERG_06780			
<b>15</b>	Uncharacterized protein	TERG_05518			oxidoreductase activity [GO:0016491]
<b>15</b>	Woronin body major protein	TERG_04281	positive regulation of translational elongation [GO:0045901]		ribosome binding [GO:0043022]; translation elongation factor activity [GO:0003746]
<b>14</b>	Plasma membrane ATPase (EC 7.1.2.1)	TERG_04130	proton export across plasma membrane [GO:0120029]	integral component of membrane [GO:0016021] ; plasma membrane [GO:0005886]	ATP binding [GO:0005524]; P-type proton-exporting transporter activity [GO:0008553]
<b>13</b>	Beta-glucosidase (EC 3.2.1.21)	TERG_00481	cellulose catabolic process [GO:0030245]		beta-glucosidase activity [GO:0008422]; scopolin beta-glucosidase

					activity [GO:0102483]
13	MFS domain-containing protein	TERG_08244		integral component of membrane [GO:0016021]; plasma membrane [GO:0005886]	transmembrane transporter activity [GO:0022857]
12	Thioredoxin domain-containing protein	TERG_08848			
12	Mitochondrial thiamine pyrophosphate carrier 1	TERG_04311	mitochondrial phosphate ion transmembrane transport [GO:1990547]	integral component of membrane [GO:0016021]; mitochondrial inner membrane [GO:0005743]	inorganic phosphate transmembrane transporter activity [GO:0005315]
12	MFS domain-containing protein	TERG_04400		integral component of membrane [GO:0016021]; plasma membrane [GO:0005886]	transmembrane transporter activity [GO:0022857]
12	Uncharacterized protein	TERG_07783	oligopeptide transport [GO:0006857]	integral component of membrane [GO:0016021]	transmembrane transporter activity [GO:0022857]
11	Aldehyde dehydrogenase	TERG_01404			oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, NAD or NADP as acceptor [GO:0016620]

11	14_3_3 domain-containing protein	TERG_06816		
11	Vacuolar protease A	TERG_06704		aspartic-type endopeptidase activity [GO:0004190]
10	Superoxide dismutase [Cu-Zn] (EC 1.15.1.1)	TERG_04335		metal ion binding [GO:0046872]; superoxide dismutase activity [GO:0004784]
10	Formate dehydrogenase (FDH) (EC 1.17.1.9) (NAD-dependent formate dehydrogenase)	TERG_06614	formate catabolic process [GO:0042183]	cytoplasm [GO:0005737]; formate dehydrogenase complex [GO:0009326]; formate dehydrogenase (NAD+) activity [GO:0008863]; NAD binding [GO:0051287]; oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor [GO:0016616]
10	Neutral ceramidase (EC 3.5.1.23)	TERG_00899	ceramide catabolic process [GO:0046514]	ceramidase activity [GO:0102121]; N-acylsphingosine amidohydrolase activity [GO:0017040]
10	CFEM domain-containing protein	TERG_01507		anchored component of membrane [GO:0031225]; cell wall [GO:0005618]; plasma

				membrane [GO:0005886]
10	Thioredoxin domain-containing protein	TERG_00124		peroxidase activity [GO:0004601]
10	Cell division control protein 48	TERG_05378	cell division [GO:0051301]; establishment of endoplasmic reticulum localization involved in endoplasmic reticulum polarization at cell division site [GO:0061166]; mitotic sister chromatid separation [GO:0051306]; mitotic spindle disassembly [GO:0051228]; protein localization to Golgi apparatus [GO:0034067]; sterol regulatory element binding protein cleavage [GO:0035103]; ubiquitin-dependent protein catabolic process [GO:0006511]	chromatin [GO:0000785] ; cytoplasm [GO:0005737] ; mitotic spindle midzone [GO:1990023] ; nucleus [GO:0005634]  ATPase activity [GO:0016887]; ATP binding [GO:0005524]; hydrolase activity [GO:0016787]
10	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP) (EC 4.1.1.49)	TERG_11506	gluconeogenesis [GO:0006094]	ATP binding [GO:0005524]; kinase activity [GO:0016301]; phosphoenolpyruvate carboxykinase

				(ATP) activity [GO:0004612]
9	Chitinase (EC 3.2.1.14)	TERG_00216	chitin catabolic process [GO:0006032]; polysaccharide catabolic process [GO:0000272]	chitinase activity [GO:0004568]; chitin binding [GO:0008061]

**Tabela 6** - 30 proteínas mais abundantes em MQCur

MQCur					
Número de peptídeos	Nome da proteína	TERG	Gene Ontology (processo biológico)	Gene Ontology (componente celular)	Gene Ontology (função molecular)
105	Beta- hexosaminida se (EC 3.2.1.52)	TERG_04775	carbohydrate metabolic process [GO:0005975]		beta-N- acetylhexosami nase activity [GO:0004563]; N-acetyl-beta-D- galactosaminidas e activity [GO:0102148]
72	Uncharacteriz ed protein	TERG_04037			
35	Woronin body major protein	TERG_04281	positive regulation of translational elongation [GO:0045901]		ribosome binding [GO:0043022]; translation elongation factor activity [GO:0003746]
34	Actin	TERG_06637	ascospore wall assembly [GO:0030476]; cellular response to oxidative stress [GO:0034599];	actin cortical patch [GO:0030479] ; actin filament [GO:0005884] ; actin filament	ATP binding [GO:0005524]; histone acetyltransferase activity [GO:0004402];

			DNA repair [GO:0006281]; endocytosis [GO:0006897]; establishment of cell polarity [GO:0030010]; mitotic actomyosin contractile ring contraction [GO:1902404]; protein secretion [GO:0009306]; vacuole inheritance [GO:0000011]	bundle [GO:0032432] ; cellular bud neck contractile ring [GO:0000142] ; Ino80 complex [GO:0031011] ; NuA4 histone acetyltransferase complex [GO:0035267] ; Swr1 complex [GO:0000812]	identical protein binding [GO:0042802]; structural constituent of cytoskeleton [GO:0005200]
28	Hsp70-like protein	TERG_06505			ATPase activity [GO:0016887]; ATP binding [GO:0005524]
28	Uncharacterized protein	TERG_03624			
27	Beta- glucosidase (EC 3.2.1.21)	TERG_00481	cellulose catabolic process [GO:0030245]		beta-glucosidase activity [GO:0008422]; scopolin beta- glucosidase activity [GO:0102483]
27	Neutral ceramidase (EC 3.5.1.23)	TERG_00899	ceramide catabolic process [GO:0046514]		ceramidase activity [GO:0102121]; N- acylsphingosine amidohydrolase activity [GO:0017040]
27	Vacuolar protease A	TERG_06704			aspartic-type endopeptidase

					activity [GO:0004190]
25	MFS domain-containing protein	TERG_08244		integral component of membrane [GO:0016021]; plasma membrane [GO:0005886]	transmembrane transporter activity [GO:0022857]
25	Tubulin alpha chain	TERG_02189	microtubule-based process [GO:0007017]	microtubule [GO:0005874]	GTPase activity [GO:0003924]; GTP binding [GO:0005525]; structural constituent of cytoskeleton [GO:0005200]
23	Plasma membrane ATPase (EC 7.1.2.1)	TERG_04130	proton export across plasma membrane [GO:0120029]	integral component of membrane [GO:0016021]; plasma membrane [GO:0005886]	ATP binding [GO:0005524]; P-type proton-exporting transporter activity [GO:0008553]
23	Uncharacterized protein	TERG_07959	carbohydrate metabolic process [GO:0005975]; fungal-type cell wall organization [GO:0031505]	fungal-type cell wall [GO:0009277]	1,3-beta-glucanosyltransferase activity [GO:0042124]; glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase activity [GO:0042973]
22	Elongation factor 2	TERG_04928		mitochondrion [GO:0005739]	GTPase activity [GO:0003924]; GTP binding [GO:0005525]; translation elongation factor activity [GO:0003746]

<b>22</b>	Chitinase (EC 3.2.1.14)	TERG_00216	chitin catabolic process [GO:0006032]; polysaccharide catabolic process [GO:0000272]	chitinase activity [GO:0004568]; chitin binding [GO:0008061]
<b>21</b>	Lysophospholipase (EC 3.1.1.5)	TERG_05522	phospholipid catabolic process [GO:0009395]	lysophospholipase activity [GO:0004622]; phosphatidyl phospholipase B activity [GO:0102545]
<b>20</b>	Elongation factor 1-alpha	TERG_00548		GTPase activity [GO:0003924]; GTP binding [GO:0005525]; translation elongation factor activity [GO:0003746]
<b>19</b>	Protein disulfide-isomerase (EC 5.3.4.1)	TERG_04662	endoplasmic reticulum lumen [GO:0005788]	protein disulfide isomerase activity [GO:0003756]
<b>18</b>	Aldehyde dehydrogenase	TERG_01404		oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, NAD or NADP as acceptor [GO:0016620]
<b>18</b>	Superoxide dismutase [Cu-Zn] (EC 1.15.1.1)	TERG_04335		metal ion binding [GO:0046872]; superoxide dismutase activity [GO:0004784]
<b>17</b>	Vacuolar protease A	TERG_06704		aspartic-type endopeptidase

					activity [GO:0004190]
<b>16</b>	Hsp90-like protein	TERG_06963	protein folding [GO:0006457]		ATPase activity [GO:0016887]; ATP binding [GO:0005524]; unfolded protein binding [GO:0051082]
<b>16</b>	MFS domain- containing protein	TERG_04400		integral component of membrane [GO:0016021] ; plasma membrane [GO:0005886]	transmembrane transporter activity [GO:0022857]
<b>16</b>	CFEM domain- containing protein	TERG_01507		anchored component of membrane [GO:0031225] ; cell wall [GO:0005618] ; plasma membrane [GO:0005886]	
<b>16</b>	Uncharacteriz ed protein	TERG_01731			
<b>15</b>	Ribos_L4_ass o_C domain- containing protein	TERG_04506	translation [GO:0006412]	ribosome [GO:0005840]	structural constituent of ribosome [GO:0003735]
<b>15</b>	Alpha- mannosidase (EC 3.2.1.24)	TERG_12680	mannose metabolic process [GO:0006013]		alpha- mannosidase activity [GO:0004559]; carbohydrate binding [GO:0030246]; metal ion binding [GO:0046872]

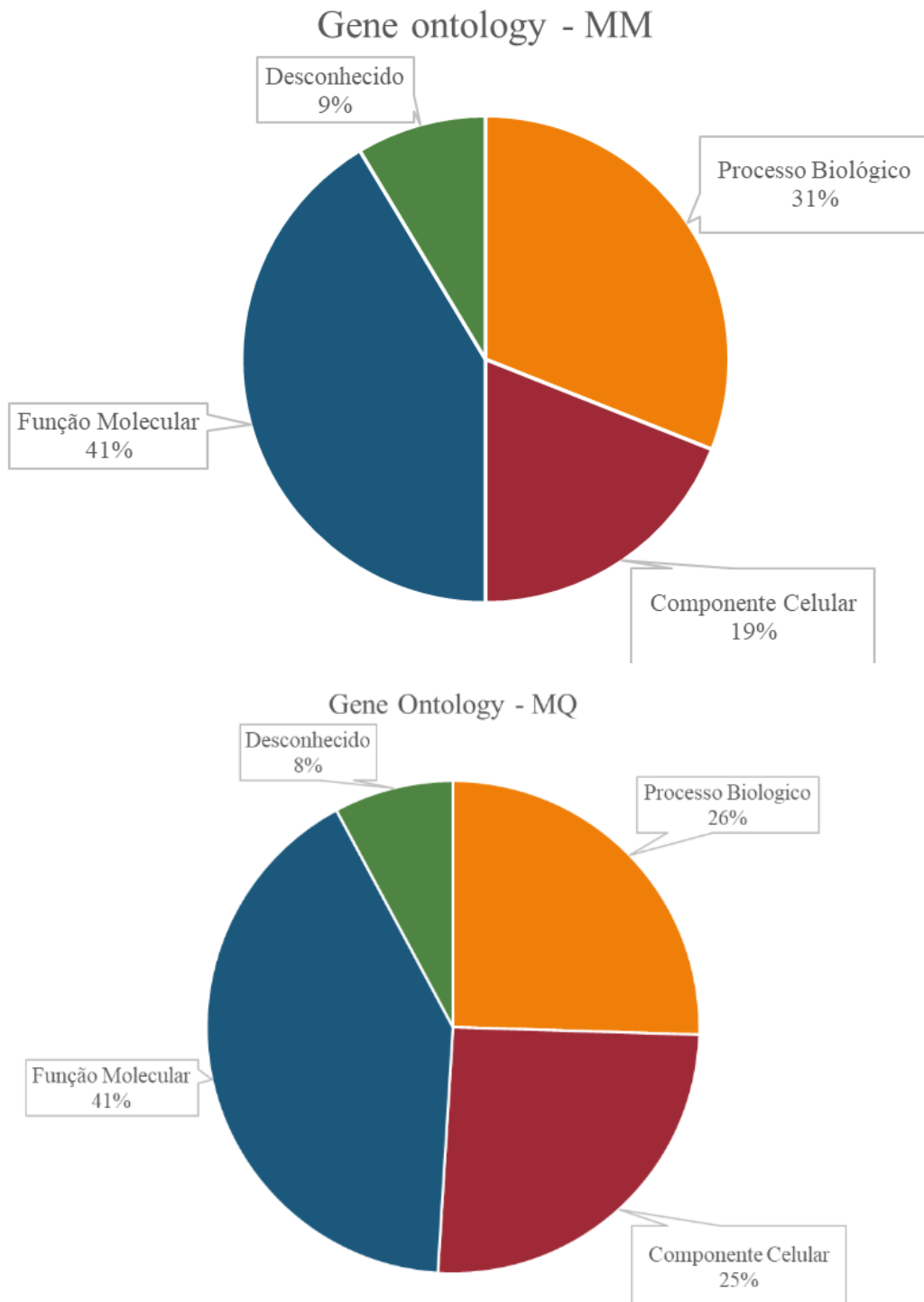
15	Uncharacterized protein	TERG_01869	
15	Uncharacterized protein	TERG_04960	glutathione metabolic process [GO:0006749]
15	SGNH_hydro domain-containing protein	TERG_03459	

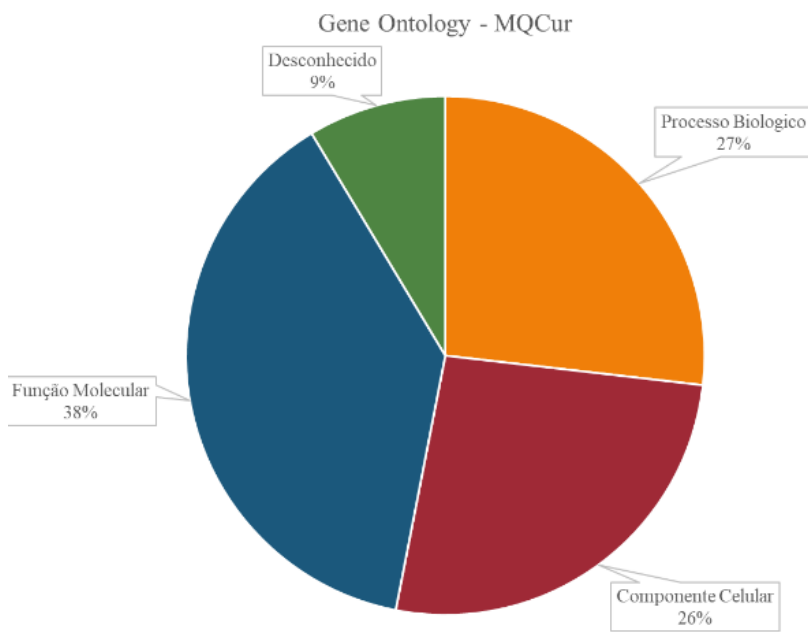
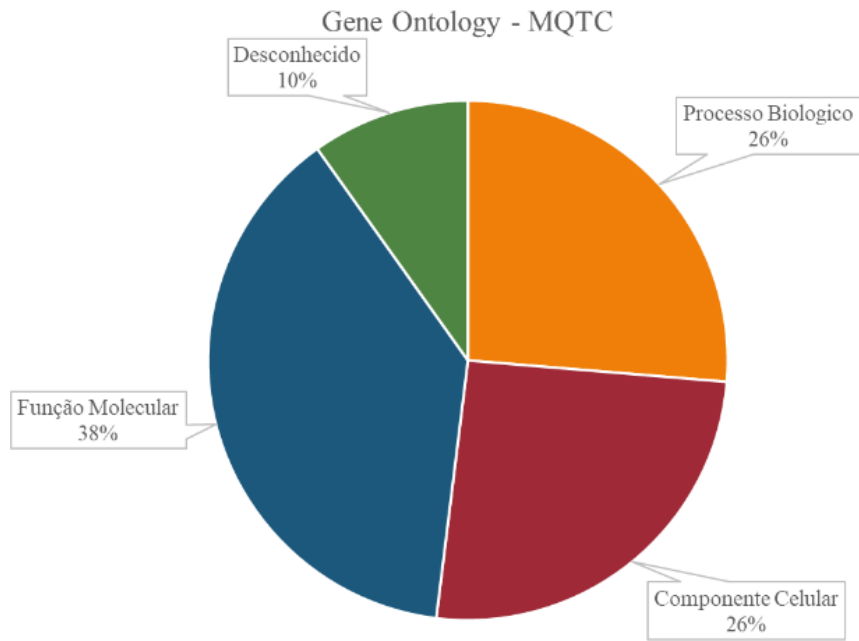
As proteínas mais abundantes em meio de cultura adicionado de *trans*-chalcona (tabela 5) e o curcuminoide (tabela 6) foram semelhantes entre elas, com destaque para a presença de proteínas como as HSPs 70 e 90 e a Woronin body major protein que foram comuns nas duas condições e também na presença apenas de queratina, mostrando que são proteínas importantes para a sobrevivência e processo de infecção fúngica em situações diversas como a presença de queratina e de antifúngicos. Na presença dos compostos antifúngicos também observamos a existência da proteína Vacuolar protease A que foi abundante exclusivamente na presença dos compostos antifúngicos. Dessa forma, como esta proteína está relacionada à resposta fúngica perante a presença de agentes estressores (*trans*-chalcona e curcuminoide), podemos sugerir-la como um possível alvo para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos.

#### 6.4 Classificação das proteínas por Gene Ontology (GO)

Quando analisadas todas as proteínas encontradas nesse estudo, observamos que as proteínas apresentaram distribuição semelhante em todas as condições de cultivo com base na classificação GO, sendo mais abundante a Função molecular, Processo biológico e Componente celular, respectivamente, mostrando assim que o perfil de proteína nos quatro meios é semelhante em relação a função molecular e biológica de acordo com mostrado na figura 4.

**Figura 4** - Classificação das proteínas de acordo com o Gene Ontology

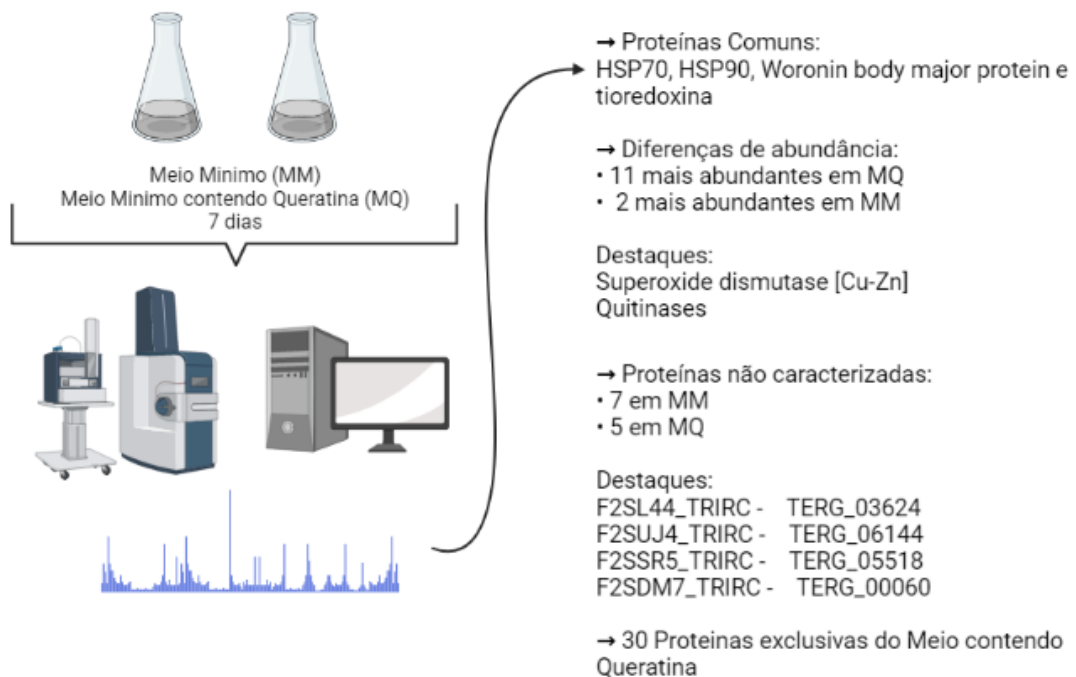




## 6.5 ANÁLISE COMPARATIVA DAS PROTEÍNAS ENCONTRADAS NOS DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

### 6.5.1 MEIO MÍNIMO (MM) COMPARADO AO MEIO MÍNIMO CONTENDO QUERATINA (MQ)

**Figura 5** - Resumo gráfico dos resultados da comparação MM x MQ



Fonte: elaborado pelo autor.

Dentre as 30 proteínas mais abundantes em MM e MQ, todas as identificadas foram comuns entre as condições ensaiadas (item 6.3), porém 11 foram mais abundantes em MQ quando comparado ao MM, conforme apresentado na tabela 7 e duas foram mais abundantes em MM quando comparado ao MQ conforme apresentado na tabela 8.

**Tabela 7** - Proteínas mais abundantes em MQ comparado ao MM

<b>Nome da proteína</b>	<b>Número de peptídeos em MQ</b>	<b>Ordem de abundância em MQ</b>	<b>Número de peptídeos em MM</b>	<b>Ordem de abundância em MM</b>
Superoxide dismutase [Cu-Zn] (EC 1.15.1.1)	30	6°	22	112°
Tubulin beta chain	25	12°	16	165°
Chitinase (EC 3.2.1.14)	24	13°	25	95°
Ribos_L4_asso_C domain-containing protein	22	14°	15	175°
Formate dehydrogenase (FDH) (EC 1.17.1.9) (NAD-dependent formate dehydrogenase)	22	15°	12	232°
Alpha-mannosidase (EC 3.2.1.24)	21	18°	33	59°
Neutral ceramidase (EC 3.5.1.23)	20	21°	30	65°
But2 domain-containing protein	19	23°	25	94°
Transketolase	18	26°	30	64°
Mitochondrial thiamine pyrophosphate carrier	17	29°	27	76°
MFS domain-containing protein	17	30°	25	38°

**Tabela 8** - Proteínas mais abundantes em MM comparadas ao MQ

Nome da proteína	Número de peptídeos em MM	Ordem de abundância em MM	Número de peptídeos em MQ	Ordem de abundância em MQ
ATP-dependent 6-phosphofructokinase (ATP-PFK) (Phosphofructokinase) (EC 2.7.1.11) (Phosphohexokinase)	60	18°	2	246°
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) (EC 5.2.1.8)	53	24°	2	254°

Dentre as proteínas mais abundantes e diferentemente moduladas nas duas condições (MM e MQ) algumas já foram descritas em *T. rubrum* como a Superoxide dismutase [Cu-Zn] e quitinases. A Superoxide dismutase [Cu-Zn] (TERG\_08969) e também quitinases foram induzidas quando o micélio de *T. rubrum* foi exposto ao ácido undecanóico por 3h e 12h (MENDES et al., 2018);

A análise comparativa do genoma de *T. rubrum*, revelou que os genomas desses fungos são fortemente enriquecidos para famílias de genes contendo proteínas LysM as quais os tipos predominantes são os de quitinases do subgrupo C e proteínas efetoras LysM (MARTINEZ et al., 2012). As quitinases desempenham um papel vital na adaptação de *T. rubrum* ao substrato, e o gene que codifica uma quitinase de classe V participa da degradação da queratina (LOPES et al., 2020). Esse mesmo dado está acontecendo no presente estudo pois as quitinases foram mais predominantes em MQ (tabela 7), apresentando um papel importante na adaptação do fungo ao meio que simula a infecção.

Diante da diferença de abundância das proteínas nas duas condições podemos sugerir que o fungo remodela suas proteínas de acordo com as necessidades nutricionais encontradas no meio de cultura. No MM, as proteínas podem estar relacionadas a sobrevivência fúngica em ambientes de estresse, como a disponibilidade limitada de nutrientes. Já no MQ, que simulou o

processo de infecção, o fungo remodelou suas proteínas para serem capazes de degradar a queratina e utilizá-la como fonte de nutrientes, garantindo assim sua sobrevivência.

#### 6.5.1.1 Proteínas não caracterizadas funcionalmente em MM e MQ

Quando analisamos as 30 proteínas mais abundantes em cada meio (MM e MQ), observamos a presença de 7 proteínas não caracterizadas em MM e 5 em MQ conforme apresentado na tabela 9.

**Tabela 9** - Proteínas não caracterizadas funcionalmente em MM e MQ

<b>Entrada</b>	<b>TERG</b>	<b>Descrição</b>
<b>MM</b>		
<b>F2SKG4_TRIRC -</b>	TERG_02735	N.E
<b>F2SRC0_TRIRC -</b>	TERG_05138	N.E
<b>F2SL44_TRIRC -</b>	TERG_03624	Regulado negativamente quando exposto ao ácido undecanóico (MARTINS et al., 2019)
<b>F2SYI7_TRIRC -</b>	TERG_07641	N.E
<b>F2SPX2_TRIRC -</b>	TERG_04121	N.E
<b>F2SUJ4_TRIRC -</b>	TERG_06144	Regulado negativamente quando exposto ao ácido undecanóico (MARTINS et al., 2019)
<b>F2SDV6_TRIRC -</b>	TERG_00911	N.E

<b>MQ</b>		
<b>F2SSR5_TRIRC -</b>	TERG_05518	Modulado exclusivamente em substratos de queratina (negativamente). T. A. Bitencourt <i>et al.</i> , 2016)
<b>F2SYI7_TRIRC -</b>	TERG_07641	N.E
<b>F2SDM7_TRIRC -</b>	TERG_00060	Modulado em substratos de queratina e elastina (negativamente). (BITENCOURT <i>et al.</i> , 2016)
<b>F2SRD2_TRIRC -</b>	TERG_05151	N.E
<b>F2SWK7_TRIRC -</b>	TERG_06927	N.E

Para a maior parte dessas proteínas ainda não temos informação sobre suas funções, porém para algumas delas seus genes já foram descritos. Por exemplo Bitencourt *et al.*, (2016) realizou uma análise de transcriptoma, com conídios de *T. rubrum* crescidos em meio mínimo adicionados de substratos proteicos (queratina e elastina) por 24, 36 e 72 h e mostrou que os genes TERG\_05518 e TERG\_00060 foram modulados negativamente em meio contendo queratina. No trabalho de Bitencourt *et al.*, (2016) foi utilizado um inoculo inicial de conídios e o tempo máximo de cultivo de 72h. No presente trabalho, o inoculo foi realizado com conídios pré-germinados em meio Sabouraud líquido (meio rico) por 3 dias, foi filtrado e os micélios foram cultivados em meio com queratina por 7 dias no intuito de obter maior quantidade de micélio para os experimentos de proteômica. O MQ é pobre em nutrientes, e o fungo precisa degradar a queratina para sobreviver. Foi observado que muitos conídios não se desenvolviam quando colocados diretamente no meio contendo queratina e assim não conseguíamos massa suficiente para a análise proteômica. Desta forma, optamos em fazer um pré cultivo em meio Sabouraud líquido por 72h e depois transferir o micélio para as condições de estudo. Podemos

sugerir que essas proteínas codificadas pelas TERG\_05518 e TERG\_00060 podem estar envolvidas no processo de utilização da queratina, pois elas estavam reprimidas no processo inicial de infecção (72 h) e depois passaram a ser induzidas num tempo maior de infecção (7dias).

De forma semelhante, Martins et al., (2019) realizou o pré cultivo de conídios de *T. rubrum* em meio Sabouraud e depois o micélio foi transferido para diferentes condições (meio mínimo, meio mínimo contendo queratina e meio RPMI contendo ácido undecanóico). Foi observado que na presença do ácido undecanóico por 3 e 12h as proteínas codificadas pelos genes TERG\_03624, TERG\_06144 foram reguladas negativamente (MARTINS et al., 2019), mostrando assim que essas proteínas podem estar envolvidas no processo de infecção fúngica. Dessa forma acreditamos que essas outras proteínas, as quais ainda não foram caracterizadas funcionalmente também sejam importantes para o processo de infecção por *T. rubrum*.

#### 6.5.1.2 Proteínas Exclusivas em MQ comparando ao MM

Quando comparamos as situações MM e MQ, observamos que algumas proteínas foram exclusivas em MQ, como apresentado na tabela 10.

**Tabela 10** - Proteínas exclusivas em MQ

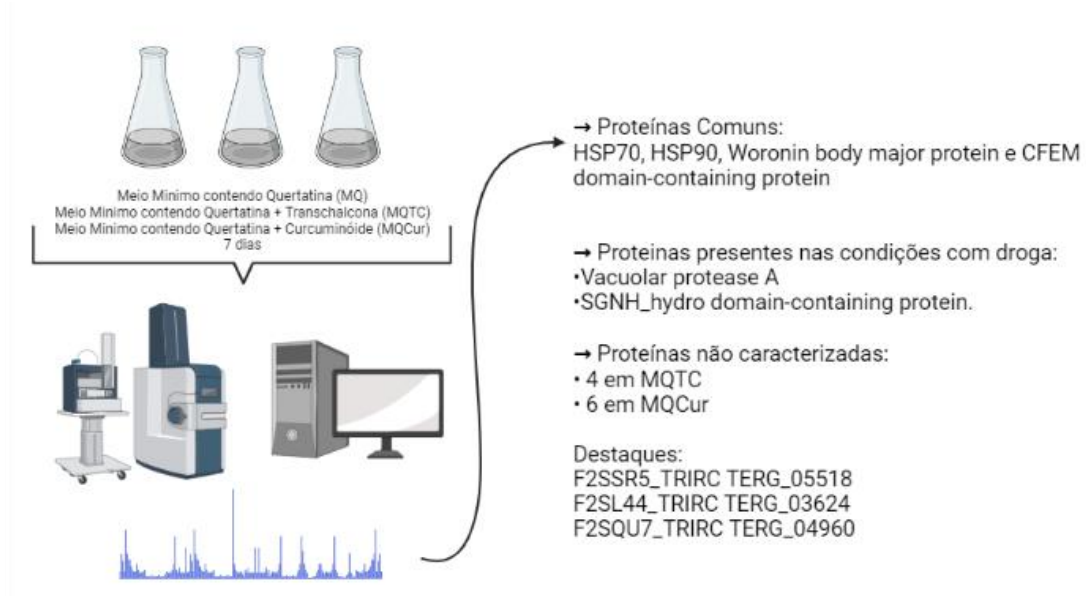
Amidase (EC 3.5.1.4)
40S ribosomal protein S0
NMO domain-containing protein
FAD_binding_3 domain-containing protein
ATP synthase subunit gamma
Rab-GAP TBC domain-containing protein
Pyruvate decarboxylase (EC 4.1.1.1)
GLTP domain-containing protein
Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase (EC 4.1.3.4)
WD_REPEATS_REGION domain-containing protein
Cytochrome b561 domain-containing protein
Sulfate adenyltransferase (EC 2.7.7.4) (ATP-sulfurylase) (Sulfate adenylate

transferase) (SAT)
HIT domain-containing protein
60S acidic ribosomal protein P1
Extracellular metalloproteinase (EC 3.4.24.-) (Fungalsin)
APH domain-containing protein
Serine/threonine-protein phosphatase (EC 3.1.3.16)
DUF2415 domain-containing protein
Glutathione-disulfide reductase (EC 1.8.1.7)
DUF4139 domain-containing protein
ATP pyrophosphate-lyase (EC 4.6.1.1) (Adenylate cyclase) (Adenylyl cyclase)
MFS-type efflux pump MFS1
GTP-binding protein ypt2
Beta_elim_lyase domain-containing protein
ATP-dependent (S)-NAD(P)H-hydrate dehydratase (EC 4.2.1.93) (ATP-dependent NAD(P)HX dehydratase)
Copper-containing nitrite reductase (EC 1.7.2.1)
U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein MPP10
Autophagy-related protein 1 (EC 2.7.11.1)
Glucosamine-6-phosphate isomerase (EC 3.5.99.6) (Glucosamine-6-phosphate deaminase)
ERCC4 domain-containing protein

Devido ao fato dessas proteínas serem diferencialmente expressas em MQ quando comparado com o MM, podemos relacioná-las com o processo de infecção causado pela interação do *T. rubrum* com a queratina, a qual simula uma infecção.

### 6.5.2 MEIO MÍNIMO CONTENDO QUERATINA (MQ) COMPARADO AO MEIO MÍNIMO CONTENDO QUERATINA NA PRESENÇA DE TRANS-CHALCONA (MQTC) E CURCUMINOIDE (MQCur)

**Figura 6** - Resumo gráfico dos resultados da comparação MQ x MQ adicionado de compostos antifúngicos



#### 6.5.2.1 Proteínas mais abundantes na presença de compostos antifúngicos

A maioria das proteínas encontradas foram comuns nas situações MQTC e MQCur, como por exemplo a Hsp90, Hsp70, Woronin body major protein e CFEM domain-containing protein (item 6.3), porém duas em especial nos chamaram a atenção pela abundância na presença dos compostos antifúngicos e a carência ou até mesmo ausência nas outras condições. São elas a Vacuolar protease A e a SGNH\_hydro domain-containing protein.

A Vacuolar protease A, foi uma das 30 proteínas mais abundantes em MQTC e em MQCur, já em MQ e MM ela ocupou a posição de número 97 e 124 respectivamente, Dado que demonstra que essa proteína pode estar estritamente ligada à presença de compostos antifúngicos, estando envolvida com a resposta fúngica ao estresse causado pelos compostos antifúngicos. Esses dados vão de encontro com o trabalho de Bakula *et al.*, (2021) que observaram que essa proteína está envolvida com a capacidade de virulência de *T. rubrum* (BAKUŁA *et al.*, 2021).

A SGNH\_hydro domain-containing protein foi uma das 30 proteínas mais abundantes em MQCur, em MQ ocupa a posição de número 272, e não aparece nas condições MM e MQTC. Devido a essa maior abundância em MQCur acreditamos que ela possa estar diretamente ligada ao modo de ação do curcuminoide. Em outro trabalho, o gene que codifica essa proteína foi modulado positivamente na presença de elastina (Bitencourt *et al.*,2019), estando relacionado também com a infecção profunda.

Devido ao fato dessas duas proteínas estarem presentes principalmente durante a exposição aos compostos antifúngicos, nós podemos sugerir que o fungo as utiliza como forma de sobrevivência e adaptação ao estresse causado pelos compostos antifúngicos. Sendo assim essas proteínas podem ser alvos antifúngicos interessantes para desenvolvimentos de novos agentes antifúngicos.

#### 6.5.2.2 Proteínas não caracterizadas funcionalmente e abundantes na presença de compostos antifúngicos

Quando analisamos as 30 proteínas mais abundantes em cada meio (MQTC e MQCur), observamos a presença de 4 proteínas não caracterizadas funcionalmente em MQTC e 6 em MQCur, conforme apresentado na tabela 11.

**Tabela 11** - Proteínas não caracterizadas funcionalmente e mais abundantes nos meios de cultura contendo compostos antifúngicos

<b>Entrada</b>	<b>TERG</b>	<b>Descrição</b>
<b>MQTC</b>		
<b>F2SPN9_TRIRC</b>	TERG_04037	N.E
<b>F2SRD2_TRIRC</b>	TERG_05151	N.E
<b>F2SSR5_TRIRC</b>	TERG_05518	Modulado negativamente na presença de queratina (Bitencourt <i>et al.</i> , 2016).
<b>F2SZ14_TRIRC</b>	TERG_07783	N.E

MQCur		
<b>F2SPN9_TRIRC</b>	TERG_04037	N.E
<b>F2SL44_TRIRC</b>	TERG_03624	Regulado negativamente na presença de UDA. (Martins <i>et al.</i> , 2019) Gene associado a parede celular
<b>F2SZI9_TRIRC</b>	TERG_07959	N.E
<b>F2SHQ4_TRIRC</b>	TERG_01731	N.E
<b>F2SIK0_TRIRC</b>	TERG_01869	N.E
<b>F2SQU7_TRIRC</b>	TERG_04960	Regulada positiva após 3h de exposição à UDA. (MARTINS <i>et al.</i> , 2019)

N.E = Não encontrado

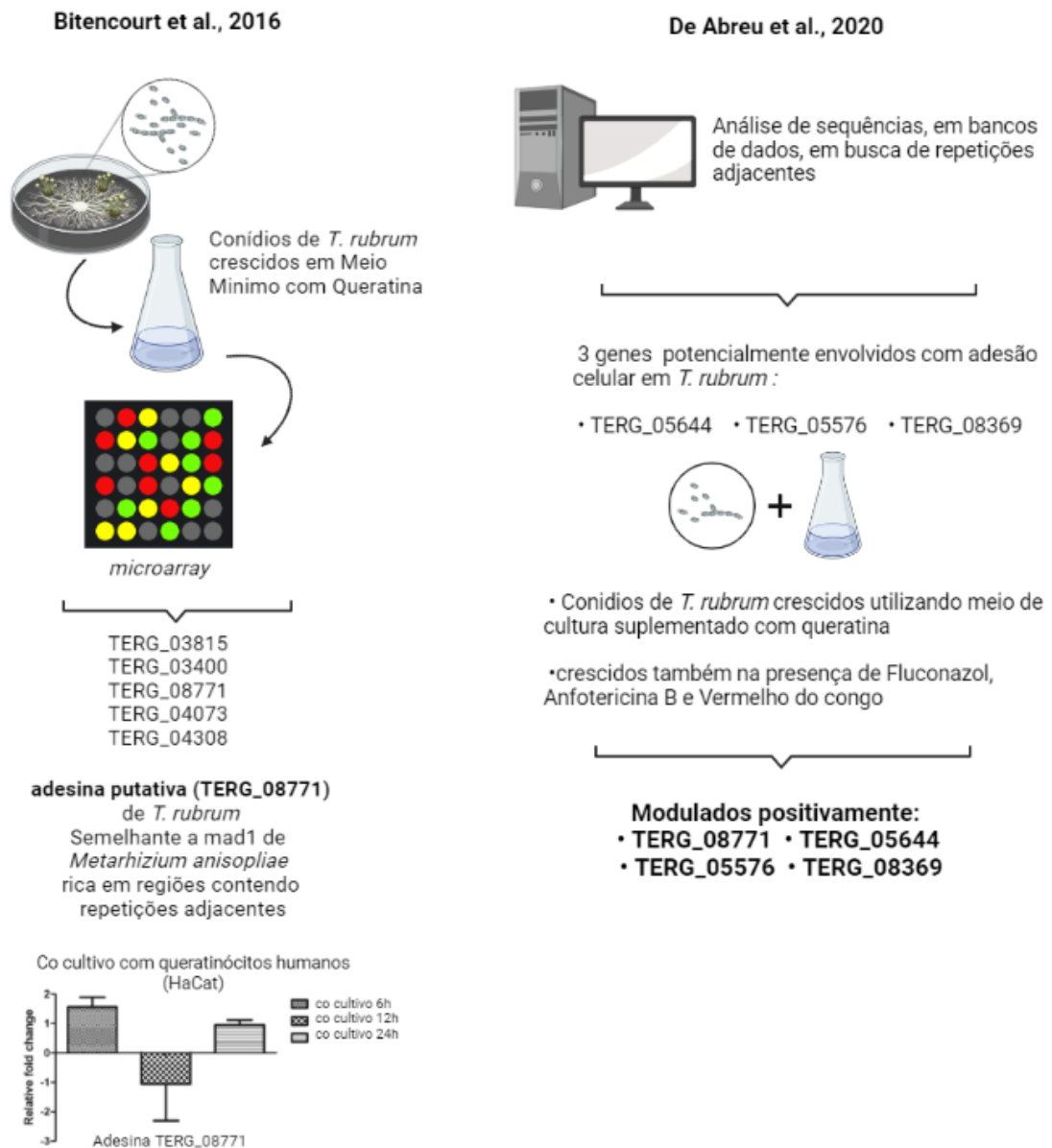
As informações sobre as proteínas não caracterizadas funcionalmente na comparação MM e MQ são escassas, na comparação com os meios de cultura contendo os compostos antifúngicos esse fato também ocorreu.

O gene TERG\_05518 que codifica uma proteína abundante na presença de queratina foi abundante novamente na presença de MQTC. Bitencourt *et al.*, (2016) mostrou que a TERG\_05518 foi modulada negativamente quando o *T. rubrum* foi crescido em meio contendo queratina em tempo de 24h, 36h e 72h (BITENCOURT *et al.*, 2016). Acreditamos que esse gene foi reprimido nesse trabalho, devido ao menor tempo de cultivo. Já no presente trabalho, a proteína codificada pela TERG\_05518 foi abundante no sétimo dia de cultivo na presença de *trans*-chalcona. Sugerimos que o maior tempo de exposição aos compostos antifúngicos induziu a expressão dessa proteína, que pode ser necessária para a sobrevivência fúngica em situações de estresse, como o causado pela presença da *trans*-chalcona.

No presente trabalho, a proteína codificada pelo gene TERG\_04960 foi induzida em meio contendo o curcuminoide. Martins *et al.*, (2019) observou que o gene TERG\_04960 também foi modulado positivamente, quando conídios de *T. rubrum* cresceram na presença de ácido undecanóico. Podemos sugerir que a proteína codificada pelo gene TERG\_04960 tenha papel importante na resposta a compostos antifúngicos na situação de infecção de *T. rubrum* (MARTINS *et al.*, 2019).

## 6.6 Proteínas putativas envolvidas com adesão já descritas pelo grupo de pesquisa

**Figura 7** - Resumo gráfico das proteínas putativas envolvidas com adesão já descritas pelo nosso grupo de pesquisa.



Bitencourt *et al.*, (2016a) analisou a modulação gênica de conídios de *T. rubrum* durante o crescimento em MQ através da técnica de *microarray*. Os resultados mostraram modulação de genes que codificam proteínas envolvidas com transdução de sinal, status de dormência dos conídios de *T. rubrum* e os estágios iniciais da germinação dos esporos. Além disso, o mesmo trabalho destacou a indução de um gene codificador de uma adesina putativa

(TERG\_08771) de *T. rubrum* durante o crescimento dos conídios em queratina (BITENCOURT et al., 2016a).

As análises *in silico* dessa adesina (TERG\_08771) expressa em conídios de *T. rubrum* durante o crescimento em meio com queratina, evidenciaram domínios semelhantes com o gene *mad1*, que codifica uma adesina em *Metarhizium anisopliae* que é expressa principalmente na fase de germinação dos conídios e importante para a virulência fúngica. Devido a esses dados, nosso grupo de pesquisa analisou sequências codificadoras e regiões *upstream* para a busca de repetições adjacentes (características de adesinas) em bancos de dados disponíveis do Broad Institute (<http://www.broad.mit.edu/>). A partir dessa análise, foram identificadas novas TERGs que posteriormente foram anotadas e categorizadas. Os genes encontrados nessa análise foram submetidos a análise de predição de função como adesinas putativas através da ferramenta Faapred (<http://bioinfo.icgeb.res.in/faap.>), que identificou 3 TERGS potencialmente envolvidas com adesão celular em *T. rubrum* TERG\_05644, TERG\_05576 e TERG\_08369 (DE ABREU et al., 2020).

Quando o *T. rubrum* foi crescido utilizando meio de cultura suplementado com queratina e co-cultivado em células de queratinócitos humanos HaCaT (BITENCOURT et al., 2016a; DE ABREU et al., 2020) o mesmo perfil de expressão foi obtido para esses genes (modulados positivamente), o que indica que os dois modelos são adequados para estudo de expressão de adesinas durante a interação fungo-hospedeiro. Também foram modulados positivamente quando o fungo foi exposto a drogas que atuam na membrana e na parede celular fúngica (Fluconazol, Anfotericina B e Vermelho do congo), indicando que a adesina (TERG\_08771) e as proteínas de parede celular de *T. rubrum* podem ser moduladas de acordo com a susceptibilidade à antifúngicos (DE ABREU et al., 2020).

Ao analisarmos as proteínas não caracterizadas funcionalmente do presente trabalho (todas as proteínas, não somente as 30 mais abundantes), observamos a presença de 2 proteínas já estudadas em nosso grupo de pesquisa, descritas por DE ABREU *et al.*, (2020) conforme apresentado na tabela 12 onde mostramos a abundância dessas proteínas em cada condição estudada.

**Tabela 12** - Proteínas observadas nos diferentes meios de culturas e que os respectivos genes já foram evidenciados por DE ABREU *et al.*, (2020)

Proteína	TERG	Ordem de	Ordem de	Ordem de	Ordem de
		abundância	abundância	abundância	abundância
		MM	MQ	MQTC	MQCur
<b>F2SMI7_TRIRC</b>	TERG_08771	781°	N.E	N.E	N.E
<b>F2SSX3_TRIRC</b>	TERG_05576	69°	105°	72°	47°

N.E Não encontrado

O gene TERG\_08771 que codifica a proteína F2SMI7\_TRIRC, foi modulado positivamente quando o *T. rubrum* foi crescido em meio contendo queratina e na presença de queratinócitos humanos (HaCat) (DE ABREU *et al.*, 2020).

Porém, no presente trabalho essa proteína não foi detectada nos meios onde a queratina estava presente. Dessa forma, podemos sugerir que esse gene pode ter sofrido uma flutuação temporal em sua expressão de acordo com o processo do ciclo celular, pois ele foi mais expresso em cultura de queratinócitos nos momentos iniciais da infecção (7h), depois ocorreu uma diminuição (14h) e novamente um aumento da expressão (24h) conforme o passar do tempo (BITENCOURT *et al.*, 2016a).

Acredita-se que esse fato continuou acontecendo de acordo com tempo maior de cultivo. Devido a essa característica, acreditamos que no presente trabalho, no momento em que coletamos o micélio fúngico para a análise proteômica, o fungo estava passando por essa remodelagem de proteínas de parede celular, o que pode explicar o fato da proteína codificada pelo gene TERG\_08771 ter aparecido apenas na condição de MM e não ter aparecido em nenhuma condição em que a queratina estava presente.

Apesar da proteína F2SMI7\_TRIRC (TERG\_08771) não estar entre as proteínas mais abundantes nas condições contendo queratina, é importante ressaltar a importância dela para a sobrevivência fúngica, uma vez que seu gene já foi expresso em situações de crescimento em diferentes meios de cultura (meio contendo queratina e presença de queratinócitos) e também na presença de drogas. Além disso, essa proteína foi observada quando o fungo foi cultivado em meio de cultura pobre em nutrientes (MM), mostrando que ela pode ser importante para a adaptação e desenvolvimento fúngico em diferentes situações de estresse.

Já a proteína F2SSX3\_TRIRC que é codificada pelo gene TERG\_05576 foi presente em todas as condições de estudo, sendo a 69<sup>a</sup> em MM, 105<sup>a</sup> em MQ, 72<sup>a</sup> em MQTC e 47<sup>a</sup> em MQCur. Essa proteína é ortóloga a proteína SCW11 de *S. cerevisiae*, proteína da parede celular semelhante às glucanases, cuja principal função é a degradação da parede celular durante a divisão celular (CAPPELLARO; MRSA; TANNER, 1998; ZEITLINGER et al., 2003) e também está associada ao metabolismo da parede celular (DOOLIN et al., 2001). Além disso, há evidência de sua participação em condições de estresse osmótico (GAO et al., 2014). Sendo assim, nossos resultados atuais corroboram com os nossos resultados anteriores, devido ao fato dela estar presente em todas as condições que o fungo foi exposto (diversos meios de cultura e co-cultivo com queratinócitos humanos), podemos assegurar que ela é essencial para a sobrevivência fúngica. Também sendo presente quando o fungo é submetido a situações de estresse causado por diversas agentes antifúngicos (Fluconazol, Vermelho do Congo, Trans-chalcona e curcuminoide) mostrando dessa forma que ela é essencial para a sobrevivência fúngica mesmo nas situações mais adversas. Diante da sua importância, podemos sugerir que essa proteína para ser explorado como potencial alvo para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos.

## 7 CONCLUSÃO

Diante desse estudo, podemos concluir que:

- A utilização de meio mínimo adicionado de queratina foi adequada para simular uma infecção superficial, estudar a interação fungo-hospedeiro e, além disso, foi eficiente para avaliar o mecanismo de ação de novos compostos antifúngicos como a *trans*-chalcona e o análogo da curcumina. A ferramenta foi adequada para proporcionar o crescimento fúngico, obter massa micelial suficiente e produzir proteína para a análise proteômica.
- A análise proteômica foi realizada com êxito, foi possível identificar o perfil proteômico das quatro condições estudadas onde observamos que algumas proteínas são especificamente moduladas na presença e na ausência da queratina. Além de proteínas já conhecidas e relacionadas com a virulência fúngica, como as HSPs que estão

envolvidas na interação patógeno-hospedeiro e desempenham um papel importante durante a infecção fúngica de tecidos queratinizados.

- Também foi possível identificar proteínas que apresentaram diferenças de abundância, com por exemplo a *Superoxide dismutase* e a *Chitinase* que foram mais abundantes em MMQ do que em MM. Podemos sugerir que essas proteínas estão relacionadas ao processo de sobrevivência do fungo ao hospedeiro (a queratina) e assim relacionados ao processo infeccioso.
- Foram identificadas proteínas que podem ser consideradas possíveis alvos antifúngicos, como: a Vacuolar protease A, que é existente apenas na presença dos antifúngicos estando envolvida com a resposta fúngica ao estresse causado pelos antifúngicos e a proteína SGNH\_hydro domain-containing protein, que é exclusiva na presença do curcuminoide, a qual acreditamos que estar diretamente ligada ao modo de ação do curcuminoide.
- Além das proteínas já conhecidas, foram identificadas diversas proteínas que ainda não foram caracterizadas funcionalmente, algumas mais abundantes na presença da queratina, as quais acreditamos que estejam relacionadas com o processo de infecção fúngica, devido ao fato de o fungo utilizar a queratina como fonte de nutriente. Outras ainda foram mais abundantes na presença dos antifúngicos, as quais acreditamos estarem relacionadas com o estresse causado pelos antifúngicos, sendo assim necessárias para a sobrevivência e adaptação fúngica.
- Algumas proteínas abundantes no presente trabalho mas não caracterizadas funcionalmente, já tiveram seus genes (adesinas) correspondentes estudados em trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa (TERG\_08771 e TERG\_05576), Esses dados são complementares, porque mostram a importância dessas sequências gênicas evidenciadas pelos experimentos de transcriptoma quanto pela análise proteômica, as quais podem ser exploradas como potenciais alvos para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos.

## REFERÊNCIAS

- ACHTERMAN, R. R.; WHITE, T. C. A Foot in the Door for Dermatophyte Research. **PLoS Pathogens**, 2012a.
- ACHTERMAN, R. R.; WHITE, T. C. Dermatophyte Virulence Factors: Identifying and Analyzing Genes That May Contribute to Chronic or Acute Skin Infections. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 1–8, 2012b.
- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 198–207, 13 mar. 2003.
- AGARWAL, A. et al. “Mask tinea”: tinea faciei possibly potentiated by prolonged mask usage during the COVID-19 pandemic. **Clinical and experimental dermatology**, v. 46, n. 1, p. 190–193, 1 jan. 2021.
- AGRAWAL, R. et al. Development and Evaluation of Curcumin-loaded Elastic Vesicles as an Effective Topical Anti-inflammatory Formulation. **AAPS PharmSciTech**, 2014.
- AL-ASMARI, F.; MEREDDY, R.; SULTANBAWA, Y. A novel photosensitization treatment for the inactivation of fungal spores and cells mediated by curcumin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 2017.
- ALJABRE, S. H. et al. Adherence of arthroconidia and germlings of anthropophilic and zoophilic varieties of Trichophyton mentagrophytes to human corneocytes as an early event in the pathogenesis of dermatophytosis. **Clinical and experimental dermatology**, v. 18, n. 3, p. 231–5, maio 1993.
- ALJABRE, S. H. M. et al. Germination of trichophyton mentagrophytes on human stratum corneum in vitro. **Medical Mycology**, 1992.
- ALTSHULER, G. B. et al. Extended theory of selective photothermolysis. **Lasers in Surgery and Medicine**, 2001.
- ANDERSON, N. G.; ANDERSON, N. L. **Twenty years of two-dimensional electrophoresis: Past, present and future**. **Electrophoresis**, 1996.
- ANDERSON, R.; PARRISH, J. Selective photothermolysis: precise microsurgery by selective absorption of pulsed radiation. **Science**, 1983.
- ANTUORI, A. et al. Epidemiology of dermatophytic infections between 2008 and 2017 in Barcelona, Spain. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 37, n. 10, p. 642–647, 1 dez. 2019.
- APODACA, G.; MCKERROW, J. H. Expression of proteolytic activity by cultures of Trichophyton rubrum. **J Med Vet Mycol**, v. 28, n. 2, p. 159–171, 1990.
- ARRESE, J. E.; PIÉRARD, G. E. **Treatment failures and relapses in onychomycosis: A stubborn clinical problem**. **Dermatology**, 2003.
- ATZORI, L. et al. Dermatophyte infections mimicking other skin diseases: a 154-person case survey of tinea atypica in the district of Cagliari (Italy). **International journal of dermatology**, v. 51, n. 4, p. 410–415, abr. 2012.

- BĂGUȚ, E. T. et al. Subtilisin Sub3 is involved in adherence of *Microsporum canis* to human and animal epidermis. **Veterinary Microbiology**, 2012.
- BAKUŁA, Z. et al. A first insight into the genome of *Prototheca wickerhamii*, a major causative agent of human protothecosis. **BMC Genomics**, v. 22, n. 1, 1 dez. 2021.
- BALDO, A. et al. Secreted subtilisins of *Microsporum canis* are involved in adherence of arthroconidia to feline corneocytes. **Journal of Medical Microbiology**, 2008.
- BALDO, A. et al. Secreted subtilisin Sub3 from *Microsporum canis* is required for adherence to but not for invasion of the epidermis. **British Journal of Dermatology**, 2010.
- BALDO, A. et al. Mechanisms of skin adherence and invasion by dermatophytes. **Mycoses**, 2012.
- BALTAZAR, L. DE M. et al. IFN- $\gamma$  impairs *Trichophyton rubrum* proliferation in a murine model of dermatophytosis through the production of IL-1 $\beta$  and reactive oxygen species. **Medical Mycology**, v. 52, n. 3, p. 293–302, abr. 2014.
- BALTAZAR, L. M. et al. *Trichophyton rubrum* is inhibited by free and nanoparticle encapsulated curcumin by induction of nitrosative stress after photodynamic activation. **PLoS ONE**, 2015a.
- BALTAZAR, L. M. et al. **Photodynamic therapy efficiently controls dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum* in a murine model.** **British Journal of Dermatology**, 2015b.
- BARASCH, A.; GRIFFIN, A. V. **Miconazole revisited: New evidence of antifungal efficacy from laboratory and clinical trials.** **Future Microbiology**, 2008.
- BAROT, B. S. et al. Drug delivery to the nail: Therapeutic options and challenges for onychomycosis. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, 2014.
- BASWAN, S. et al. **Understanding the formidable nail barrier: A review of the nail microstructure, composition and diseases.** **Mycoses**, 2017.
- BAXT, L. A.; GARZA-MAYERS, A. C.; GOLDBERG, M. B. Bacterial Subversion of Host Innate Immune Pathways. **Science**, v. 340, n. 6133, p. 697–701, 10 maio 2013.
- BECK, J.; ECHTENACHER, B.; EBEL, F. Woronin bodies, their impact on stress resistance and virulence of the pathogenic mould *Aspergillus fumigatus* and their anchoring at the septal pore of filamentous Ascomycota. **Molecular Microbiology**, v. 89, n. 5, p. 857–871, 1 set. 2013.
- BEGUM, J. et al. Recent advances in the diagnosis of dermatophytosis. **Journal of Basic Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 293–303, 2020.
- BHADAURIA, V. et al. Advances in fungal proteomics. **Microbiological research**, v. 162, n. 3, p. 193–200, 27 jul. 2007.
- BITENCOURT, T. et al. Genomics 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**, p. 1–14, 2016a.
- BITENCOURT, T. A. et al. Trans-chalcone and quercetin down-regulate fatty acid synthase gene expression and reduce ergosterol content in the human pathogenic dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 13, p. 229, 17 set. 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**, 2016b.
- BITENCOURT, T. A. et al. Trans-chalcone activity against *Trichophyton rubrum* relies on an interplay between signaling pathways related to cell wall integrity and fatty acid metabolism. **BMC Genomics**, 2019.
- BRASCH, J. et al. Inhibition of dermatophytes by photodynamic treatment with curcumin. **Medical Mycology**, 2017.
- BRASCH, J. et al. Clinical isolates of *Trichophyton rubrum* are completely inhibited by photochemical treatment with a  $\gamma$ -cyclodextrin formulation of curcuminoids. **Mycoses**, 2020.
- BRASCH, J.; BECK-JENDROSCHKE, V.; MAHN, V. Photochemical inhibition of *Trichophyton rubrum* by different compoundings of curcumin. **Mycoses**, 2018.
- BRGLEZ MOJZER, E. et al. **Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. Molecules (Basel, Switzerland)**, 2016.
- BULIK, D. A. et al. Chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* in response to supplementation of growth medium with glucosamine and cell wall stress. **Eukaryotic cell**, v. 2, n. 5, p. 886–900, out. 2003.
- BURMESTER, A. et al. Comparative and functional genomics provide insights into the pathogenicity of dermatophytic fungi. **Genome biology**, v. 12, n. 1, p. R7, 2011.
- CANTELLI, B. A. M. et al. Caffeic acid and licochalcone A interfere with the glyoxylate cycle of *Trichophyton rubrum*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, n. November, p. 0–1, 2017.
- CAPPELLARO, C.; MRSA, V.; TANNER, W. New Potential Cell Wall Glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and Their Involvement in Mating. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 19, p. 5030–5037, 1998.
- CHAFFIN, W. L. et al. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 62, n. 1, p. 130–180, mar. 1998.
- CHEN, B.; ZHONG, D.; MONTEIRO, A. Comparative genomics and evolution of the HSP90 family of genes across all kingdoms of organisms. **BMC Genomics** **2006 7:1**, v. 7, n. 1, p. 1–19, 17 jun. 2006.
- CLSI. M38-A2 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard—Second Edition. **Clinical and Laboratory Standard Institute**, v. 28, n. 16, p. 29, 2008.
- COVE, D. J. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology and Biological Oxidation**, v. 113, n. 1, p. 51–56, 1966.
- DA C. GODINHO, R. M. et al. The vacuolar-sorting protein Snf7 is required for export of virulence determinants in members of the *Cryptococcus neoformans* complex. **Scientific Reports** **2014 4:1**, v. 4, n. 1, p. 1–11, 2 set. 2014.

- DE ABREU, M. H. et al. Expression of genes containing tandem repeat patterns involved in the fungal-host interaction and in the response to antifungals in *Trichophyton rubrum*. **Mycoses**, 2020.
- DE HOOG, S. et al. Skin Fungi from Colonization to Infection. **Microbiology spectrum**, v. 5, n. 4, 25 ago. 2017.
- DI FALCO, M. R. Mass spectrometry-based proteomics. In: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.: s.n.].
- DIDEHDAR, M. et al. Development of a high-resolution melting analysis assay for rapid and high-throughput identification of clinically important dermatophyte species. **Mycoses**, 2016.
- DOBON, A. et al. The host-pathogen interaction between wheat and yellow rust induces temporally coordinated waves of gene expression. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 1–14, 20 maio 2016.
- DOGRA, S.; NARANG, T. Emerging atypical and unusual presentations of dermatophytosis in India. **Clinical Dermatology Review**, v. 1, n. 3, 2017.
- DOOLIN, M.-T. et al. Overlapping and distinct roles of the duplicated yeast transcription factors Ace2p and Swi5p. **Molecular Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 422–432, 1 abr. 2001.
- DUEK, L. et al. The pathogenesis of dermatophyte infections in human skin sections. **The Journal of infection**, v. 48, n. 2, p. 175–80, fev. 2004.
- ENGUITA, F. et al. Transcriptomic Crosstalk between Fungal Invasive Pathogens and Their Host Cells: Opportunities and Challenges for Next-Generation Sequencing Methods. **Journal of Fungi**, v. 2, n. 1, p. 7, 14 jan. 2016.
- ERIN CHEN, Y.; FISCHBACH, M. A.; BELKAID, Y. **Skin microbiota-host interactions**. **Nature**, 2018.
- ESQUENAZI, D. et al. The role of surface carbohydrates on the interaction of microconidia of *Trichophyton mentagrophytes* with epithelial cells. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 2003a.
- ESQUENAZI, D. et al. The role of surface carbohydrates on the interaction of microconidia of *Trichophyton mentagrophytes* with epithelial cells. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 35, n. 2, p. 113–23, 20 mar. 2003b.
- ESQUENAZI, D. et al. The influence of surface carbohydrates during in vitro infection of mammalian cells by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Research in Microbiology**, v. 155, n. 3, p. 144–153, abr. 2004.
- FAWAY, É. et al. Modeling dermatophytosis in reconstructed human epidermis: A new tool to study infection mechanisms and to test antifungal agents. **Medical Mycology**, 2017.
- FAWAY, É.; LAMBERT DE ROUVROIT, C.; POUMAY, Y. *In vitro* models of dermatophyte infection to investigate epidermal barrier alterations. **Experimental Dermatology**, p. 0–1, 2018.
- FUCHS, B. B.; MYLONAKIS, E. Our paths might cross: the role of the fungal cell wall integrity pathway in stress response and cross talk with other stress response pathways. **Eukaryotic cell**, v. 8, n. 11, p. 1616–25, nov. 2009.
- Fungal Cell Wall: Structure, Synthesis, and Assembly - José Ruiz-Herrera - Google Livros**. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=GgFOHp->

tiF4C&oi=fnd&pg=PA1&ots=6tOjAmCXbH&sig=Jn7qR7JZCoyiimRxkr3ZOpBn0NY&redir\_esc=y#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 16 dez. 2021.

GAO, Q. et al. Salt stress causes cell wall damage in yeast cells lacking mitochondrial DNA. **Microbial Cell**, 2014.

GAZIANO, R. et al. Antifungal activity of *Cardiospermum halicacabum* L. (Sapindaceae) against *Trichophyton rubrum* occurs through molecular interaction with fungal Hsp90. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 12, p. 2185, 2018.

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**, 1999.

GLISH, G. L.; VACHET, R. W. THE BASICS OF MASS SPECTROMETRY IN THE TWENTY-FIRST CENTURY. v. 2, 2003.

GNAT, S. et al. Host- and pathogen-dependent susceptibility and predisposition to dermatophytosis. **Journal of medical microbiology**, v. 68, n. 6, p. 823–836, 1 jun. 2019.

GRUMBT, M. et al. Keratin degradation by dermatophytes relies on cysteine dioxygenase and a sulfite efflux pump. **Journal of Investigative Dermatology**, 2013.

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

GUPTA, A. K. et al. The prevalence of unsuspected onychomycosis and its causative organisms in a multicentre Canadian sample of 30 000 patients visiting physicians' offices. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, 2016.

GUPTA, A. K. et al. **Global perspectives for the management of onychomycosis**. **International Journal of Dermatology**, 2019.

GUPTA, A. K.; COOPER, E. A. **Update in antifungal therapy of dermatophytosis**. **Mycopathologia**, 2008.

GUPTA, A. K.; DAIGLE, D.; FOLEY, K. A. **Topical Therapy for Toenail Onychomycosis: An Evidence-Based Review**. **American Journal of Clinical Dermatology**, 2014.

GUPTA, A. K.; STUDHOLME, C. **Novel investigational therapies for onychomycosis: An update**. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, 2016.

GUPTA, A. K.; VERSTEEG, S. G. **A critical review of improvement rates for laser therapy used to treat toenail onychomycosis**. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, 2017.

GUPTA, A. K.; VERSTEEG, S. G.; SHEAR, N. H. Onychomycosis in the 21st Century: An Update on Diagnosis, Epidemiology, and Treatment. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 21, n. 6, p. 525–539, nov. 2017.

HALTEH, P.; SCHER, R. K.; LIPNER, S. R. **Over-the-counter and natural remedies for onychomycosis: Do they really work?** **Cutis**, 2016.

HAN, X.; ASLANIAN, A.; YATES, J. R. Mass spectrometry for proteomics. **Current opinion in chemical biology**, v. 12, n. 5, p. 483–490, out. 2008.

HARSONO, D. et al. **Curcumin myths or wonders? A systematic analysis of in vitro studies. Wound Repair and Regeneration**, 2013.

HOTER, A.; EL-SABBAN, M. E.; NAIM, H. Y. The HSP90 Family: Structure, Regulation, Function, and Implications in Health and Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 9, 1 set. 2018.

HU, Q. et al. The Orbitrap: a new mass spectrometer. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 40, n. 4, p. 430–443, 1 abr. 2005.

IORIO, R. et al. Dermatophytoses in cats and humans in central Italy: Epidemiological aspects. **Mycoses**, v. 50, n. 6, p. 491–495, nov. 2007.

IOZUMI, K. et al. Efficacy of long-term treatment with efinaconazole 10% solution in patients with onychomycosis, including severe cases: A multicenter, single-arm study. **Journal of Dermatology**, 2019.

ISHII, M. et al. An invertebrate infection model for evaluating anti-fungal agents against dermatophytosis. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.

JACOB, T. R. et al. Heat Shock Protein 90 (Hsp90) as a Molecular Target for the Development of Novel Drugs Against the Dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. NOV, 2015a.

JACOB, T. R. et al. Heat Shock Protein 90 (Hsp90) as a Molecular Target for the Development of Novel Drugs Against the Dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. NOV, 2015b.

JOUSSON, O. et al. Secreted subtilisin gene family in *Trichophyton rubrum*. **Gene**, 2004a.

JOUSSON, O. et al. Multiplication of an ancestral gene encoding secreted fungalysin preceded species differentiation in the dermatophytes *Trichophyton* and *Microsporum*. **Microbiology**, 2004b.

KAR, B.; PATEL, P.; FREE, S. J. *Trichophyton rubrum* LysM proteins bind to fungal cell wall chitin and to the N-linked oligosaccharides present on human skin glycoproteins. **PLoS ONE**, v. 14, n. 4, 1 abr. 2019.

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

KAUFMAN, G. et al. Infection stages of the dermatophyte pathogen *Trichophyton*: Microscopic characterization and proteolytic enzymes. **Medical Mycology**, 2007.

KAZA, M. et al. Bioanalytical method validation: new FDA guidance vs. EMA guideline. Better or worse? **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 165, p. 381–385, 20 fev. 2019.

KLIS, F. M.; RAM, A. F. J.; DE GROOT, P. W. J. A Molecular and Genomic View of the Fungal Cell Wall. In: **Biology of the Fungal Cell**. [s.l.: s.n.].

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 : eCAM**, v. 2015, p. 180535, 2015a.

- 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, 2015b.
- KOVITWANICHKANONT, T. AJGP-10-2019-Clinical-Kovitwanichkanont-Superficial-Fungal-Infections-WEB. v. 48, n. 10, p. 706–711, 2019.
- KRAUSZ, A. E. et al. Curcumin-encapsulated nanoparticles as innovative antimicrobial and wound healing agent. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, 2015.
- KREIJKAMP-KASPERS, S. et al. **Oral antifungal medication for toenail onychomycosis. Cochrane Database of Systematic Reviews**, 2017.
- L, W.; SL, L. HSP90 and the chaperoning of cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 5, n. 10, p. 761–772, out. 2005.
- LAGORCE, A. et al. Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, 2003.
- LATGÉ, J. P. **The cell wall: A carbohydrate armour for the fungal cell. Molecular Microbiology**, 2007a.
- LATGÉ, J. P. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. **Molecular microbiology**, v. 66, n. 2, p. 279–290, out. 2007b.
- LEE, W. J. et al. Increasing prevalence of *Trichophyton rubrum* identified through an analysis of 115,846 cases over the last 37 years. **Journal of Korean Medical Science**, 2015.
- LEE, W.; LEE, D. G. An antifungal mechanism of curcumin lies in membrane-targeted action within *Candida albicans*. **IUBMB Life**, 2014.
- LENG, W. et al. Proteomic profile of dormant *Trichophyton rubrum* conidia. **BMC genomics**, v. 9, p. 303, 25 jun. 2008.
- 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, nov. 2009.
- LEONHARDT, Y.; BECK, J.; EBEL, F. Functional characterization of the Woronin body protein WscA of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 306, n. 3, p. 165–173, 1 maio 2016.
- LEVIN, D. E. Cell Wall Integrity Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 2, p. 262–291, 1 jun. 2005.
- LIANG, P. P. et al. A trichophyton *Rubrum* infection model based on the reconstructed human epidermis - Episkin®. **Chinese Medical Journal**, 2016.
- 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, p. 100, 2007.
- LOPES, L. et al. Genes coding for LysM domains in the dermatophyte *Trichophyton rubrum*: A transcription analysis. **Medical Mycology**, v. 58, n. 3, p. 372–379, 1 abr. 2020.

- M. MARTINEZ-ROSSI, N. et al. Heat Shock Proteins in Dermatophytes: Current Advances and Perspectives. **Current Genomics**, 2015.
- MARTINEZ, D. A. et al. Comparative genome analysis of *Trichophyton rubrum* and related dermatophytes reveals candidate genes involved in infection. **mBio**, 2012a.
- MARTINEZ, D. A. et al. Comparative Genome Analysis of *Trichophyton rubrum* and Related Dermatophytes Reveals Candidate Genes Involved in Infection. **mBio**, v. 3, n. 5, p. e00259-12-e00259-12, 4 set. 2012b.
- MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N. T. A.; ROSSI, A. Antifungal Resistance Mechanisms in Dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5–6, p. 369–383, 14 nov. 2008.
- MARTINS, C. V. B. et al. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2009.
- MARTINS, M. P. et al. Compensatory expression of multidrug-resistance genes encoding ABC transporters in dermatophytes. **Journal of Medical Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 605–610, 1 jul. 2016.
- MARTINS, M. P. et al. Global Analysis of Cell Wall Genes Revealed Putative Virulence Factors in the Dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Frontiers in Microbiology**, 2019.
- MENDES, N. S. et al. Transcriptome-wide survey of gene expression changes and alternative splicing in *Trichophyton rubrum* in response to undecanoic acid. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.
- MERCER, D. K. et al. Improved methods for assessing therapeutic potential of antifungal agents against dermatophytes and their application in the development of NP213, a novel onychomycosis therapy candidate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2019.
- MEYER, V. et al. Survival in the presence of antifungals: Genome-wide expression profiling of *aspergillus niger* in response to sublethal concentrations of caspofungin and fenpropimorph. **Journal of Biological Chemistry**, 2007.
- MONOD, M. et al. Aminopeptidases and dipeptidyl-peptidases secreted by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Microbiology**, 2005.
- MORENO-COUTIÑO, G.; ARENAS, R.; REYES-TERÁN, G. Improvement in onychomycosis after initiation of combined antiretroviral therapy. **International Journal of Dermatology**, 2013.
- MUSHTAQ, S. et al. Impact on quality of life in patients with dermatophytosis. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 61, n. 2, 2020.
- MUZZARELLI, R. A. A. et al. Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 995–1012, 15 jan. 2012.
- N, S.; S, R. B. WISH, a novel CFEM GPCR is indispensable for surface sensing, asexual and pathogenic differentiation in rice blast fungus. **Fungal genetics and biology : FG & B**, v. 105, p. 37–51, 1 ago. 2017.
- NARANG, T. et al. Quality of life and psychological morbidity in patients with superficial cutaneous dermatophytosis. **Mycoses**, v. 62, n. 8, 2019.

- NENOFF, P. et al. Mycology - an update. Part 1: Dermatomycoses: Causative agents, epidemiology and pathogenesis. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 12, n. 3, p. 188–210, mar. 2014.
- NEVES-DA-ROCHA et al. Alternative Splicing in Heat Shock Protein Transcripts as a Mechanism of Cell Adaptation in *Trichophyton rubrum*. **Cells**, 2019.
- NGUYEN, T. A.; FRIEDMAN, A. J. Curcumin: A novel treatment for skin-related disorders. **Journal of Drugs in Dermatology**, 2013.
- PAOLETTI, M. et al. Evidence for sexuality in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. **Current Biology**, 2005.
- PÉREZ, P.; RIBAS, J. C. Fungal Cell Wall Analysis. In: **Laboratory Protocols in Fungal Biology**. New York, NY: Springer New York, 2013. p. 175–196.
- PERRY, R. H.; COOKS, R. G.; NOLL, R. J. Orbitrap mass spectrometry: instrumentation, ion motion and applications. **Mass spectrometry reviews**, v. 27, n. 6, p. 661–699, nov. 2008.
- PERSINOTI, G. F. et al. Whole-genome analysis illustrates global clonal population structure of the ubiquitous dermatophyte pathogen *trichophyton rubrum*. **Genetics**, 2018.
- PETRUCCELLI, M. F. et al. HaCat Keratinocyte Co-Culture Highlights Important Genes for Fungal-Host Interaction. p. 1–18, 2018.
- PETRUCCELLI, M. F. et al. The transcriptional profile of *trichophyton rubrum* co-cultured with human keratinocytes shows new insights about gene modulation by terbinafine. **Pathogens**, 2019.
- PETRUCCELLI, M. F., de Abreu, M. H., Cantelli, B. A. M., Segura, G. G., Nishimura, F. G., Bitencourt, T. A., Marins, M.; Fachin, A. L. (2020). Epidemiology and diagnostic perspectives of dermatophytoses. **Journal of Fungi**. <https://doi.org/10.3390/jof6040310>
- PIRES, C. A. A. et al. Clinical, epidemiological, and therapeutic profile of dermatophytosis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 2, p. 259–264, 2014.
- PIRKKALA, L.; SISTONEN, L. Heat Shock Proteins (HSPs): Structure, Function and Genetics. **Encyclopedia of Life Sciences**, 27 jan. 2006.
- PRASAD, S. et al. **Curcumin, a component of golden spice: From bedside to bench and back**. **Biotechnology Advances**, 2014.
- R, G.; S, T.; J, F. Broad action of Hsp90 as a host chaperone required for viral replication. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1823, n. 3, p. 698–706, mar. 2012.
- RICH, P. Special patient populations: Onychomycosis in the diabetic patient. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 1996.
- RICH, P. et al. Tavaborole 5% Topical Solution for the Treatment of Toenail Onychomycosis in Pediatric Patients: Results from a Phase 4 Open-Label Study. **Journal of drugs in dermatology : JDD**, 2019.
- RODWELL, G. E. J. et al. The prevalence of dermatophyte infection in patients infected with human immunodeficiency virus. **International Journal of Dermatology**, 2008.

- ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 4, p. 275–288, 11 abr. 2011.
- ROSS, I. K. Fungal Cell Walls. **Encyclopedia of Life Sciences**, p. 1–7, 2001.
- ROUZAUD, C. et al. **Severe dermatophytosis and acquired or innate immunodeficiency: A review.** **Journal of Fungi**, 2016.
- SAFDAR, A. Difficulties with fungal infections in acute myelogenous leukemia patients: immune enhancement strategies. **The oncologist**, v. 12 Suppl 2, n. Supplement 2, p. 2–6, 2007.
- SAHU, P. K. Design, structure activity relationship, cytotoxicity and evaluation of antioxidant activity of curcumin derivatives/analogues. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 121, p. 510–516, 2016.
- SAI, MR. B. S. et al. SPECIATION AND IN VITRO ACTIVITY OF FOUR ANTIFUNGAL DRUGS AGAINST CLINICAL ISOLATES OF DERMATOPHYTES BY E-TEST METHOD. **International Journal of Scientific Research**, v. 8, n. 6, jun. 2019.
- SALEKDEH, G. H.; KOMATSU, S. **Crop proteomics: Aim at sustainable agriculture of tomorrow.** **Proteomics**, 2007.
- SARDJIMAN, S. S. et al. 1,5-Diphenyl-1,4-pentadiene-3-ones and cyclic analogues as antioxidative agents. Synthesis and structure-activity relationship. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 1997.
- SEÇKIN, D.; ARIKAN, S.; HABERAL, M. Deep dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum* with concomitant disseminated nocardiosis in a renal transplant recipient. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 2004.
- SEIDL, V. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. **Fungal Biology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 36–42, 1 fev. 2008.
- SHARMA, M. et al. Antifungal curcumin induces reactive oxygen species and triggers an early apoptosis but prevents hyphae development by targeting the global repressor TUP1 in *Candida albicans*. **Bioscience Reports**, 2010.
- SMIJS, T. G. M. et al. A novel ex vivo skin model to study the susceptibility of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* to photodynamic treatment in different growth phases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2007.
- STAIB, P. et al. Differential gene expression in the pathogenic dermatophyte *Arthroderma benhamiae* in vitro versus during infection. **Microbiology**, 2010.
- STOKVIS, E.; ROSING, H.; BEIJNEN, J. H. Liquid chromatography-mass spectrometry for the quantitative bioanalysis of anticancer drugs. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24, n. 6, p. 887–917, 1 nov. 2005.
- SUN, T. K. et al. Proteomic analysis of pathogen-responsive proteins from rice leaves induced by rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. **Proteomics**, 2004.

- TACHIKAWA, N.; YASUOKA, A.; OKA, S. Improvement of onychomycosis without antifungal therapy after initiation of highly active anti-retroviral therapy (HAART) in an HIV-infected patient. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, 1999.
- TAPLIN, D. Dermatophytosis in Vietnam. **undefined**, 2001.
- TATSUMI, Y. et al. Mechanism of action of efinaconazole, a novel triazole antifungal agent. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2013.
- TOSTI, A.; ELEWSKI, B. E. **Onychomycosis: Practical Approaches to Minimize Relapse and Recurrence. Skin Appendage Disorders**, 2016.
- VERMOUT, S. et al. Pathogenesis of Dermatophytosis. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5–6, p. 267–275, 14 nov. 2008.
- VURAL, E. et al. The effects of laser irradiation on *Trichophyton rubrum* growth. **Lasers in Medical Science**, 2008.
- WANG, R. et al. Invasive dermatophyte infection: A systematic review. **Mycoses**, v. 64, n. 4, p. 340–348, 1 abr. 2021.
- WASINGER, V.C., CORDWELL, S.J., CERPA-POLJAK A., YAN, J.X., GOOLEY, A.A., WILKINS, M.R., DUNCAN, M.W., HARRIS, R., WILLIAMS, K.L., HUMPHERY-SMITH, I. et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. **Electrophoresis**, 1995.
- WUTHI-UDOMLERT, M. et al. Antifungal activity of *Curcuma longa* grown in Thailand. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, 2000.
- XU, X. et al. The first succinylome profile of *Trichophyton rubrum* reveals lysine succinylation on proteins involved in various key cellular processes. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, 4 ago. 2017.
- XU, X. et al. The First Whole-Cell Proteome- and Lysine-Acetylome-Based Comparison between *Trichophyton rubrum* Conidial and Mycelial Stages. **Journal of proteome research**, v. 17, n. 4, p. 1436–1451, 6 abr. 2018.
- XU, X. et al. Proteome-Wide Identification of Lysine Propionylation in the Conidial and Mycelial Stages of *Trichophyton rubrum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 13 nov. 2019.
- YAN, S. et al. Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. **Proteomics**, 2005.
- ZEITLINGER, J. et al. Program-specific distribution of a transcription factor dependent on partner transcription factor and MAPK signaling. **Cell**, v. 113, n. 3, p. 395–404, 2 maio 2003.
- ZHEN, Y. et al. Comparative proteome analysis of differentially expressed proteins induced by Al toxicity in soybean. **Physiologia Plantarum**, 2007.
- ZHENG, H. et al. Whole-genome resequencing of *Trichophyton rubrum* provides insights into population differentiation and drug resistance. **Mycopathologia**, 2019.
- ZOROFCHIAN MOGHADAMTOUSI, S. et al. **A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. BioMed Research International**, 2014.
- ZUBAREV, R. A.; MAKAROV, A. Orbitrap mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 11, p. 5288–5296, 4 jun. 2013.

ZURITA, J.; HAY, R. J. Adherence of dermatophyte microconidia and arthroconidia to human keratinocytes in vitro. **The Journal of investigative dermatology**, v. 89, n. 5, p. 529–34, nov. 1987.

## ANEXO

### PREPARO DE MEIOS DE CULTURA

#### Meio Mínimo (MM)

Solução de sais: 20mL

Glicose: 10,09g

Nitrato de sódio: 0,058g

Caseína: 2,0g

Água destilada (q.s.p): 1000 mL

pH: 5,0

Esterilizado por autoclavagem, 15 min a 1atm

#### Meio Mínimo Queratina (MQ)

Solução de sais: 20ml

Queratina bovina: 5g

Água destilada (q.s.p): 1000 mL

pH: 5,0

Esterilizado por autoclavagem, 15 min a 1atm

### PREPARO DE SOLUÇÕES

#### Solução Salina 0,9%

Cloreto de sódio: 9 g

Água destilada (q.s.p): 1000 mL

Esterilizado por autoclavagem, 15 min a 1atm

#### Solução de Sais (Cove, 1966)

Fosfato de potássio monofásico: 76g

Cloreto de Potássio: 26g

Sulfato de Magnésio heptahidratado: 26g

Solução de Elementos traço: 50 mL

Água destilada (q.s.p): 1000 mL

Esterilizado por autoclavagem, 15 min a 1atm

#### Solução de Elementos Traço (Cove, 1966)

Borato de sódio decahidratado: 40mg

Sulfato de cobre pentahidratado: 400 mg

Sulfato de ferro heptahidratado: 532 mg

Sulfato de manganês monohidratado: 292 mg

Molibdato de sódio bihidratado: 800 mg

Sulfato de zinco heptahidratado: 8 mg

Água destilada (q.s.p): 1000 mL