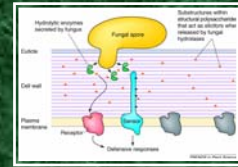
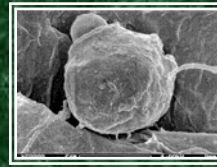
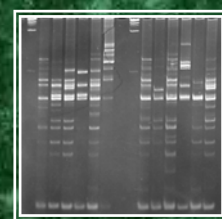
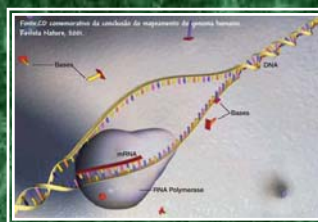
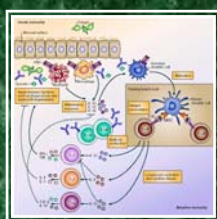


Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada
Bioagentes Patogênicos



Isolamento e caracterização de um mutante
de *Trichophyton rubrum* resistente ao ácido
undecanóico : secreção enzimática e
expressão diferencial de genes



Nalu Teixeira de Aguiar Peres

Ribeirão Preto – SP

2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA
BIOAGENTES PATOGÊNICOS

Isolamento e caracterização de um mutante de
***Trichophyton rubrum* resistente ao Ácido undecanóico:**
secreção enzimática e expressão diferencial de genes

Nalu Teixeira de Aguiar Peres
Orientadora: Profa. Dra. Nilce Maria Martinez Rossi

Ribeirão Preto - SP

2005

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA
BIOAGENTES PATOGÊNICOS

Isolamento e caracterização de um mutante de
***Trichophyton rubrum* resistente ao Ácido undecanóico:**
secreção enzimática e expressão diferencial de genes

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências – Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada, Sub-Área Bioagentes Patogênicos.

Nalu Teixeira de Aguiar Peres

Orientadora: Profa. Dra. Nilce Maria Martinez Rossi

Ribeirão Preto - SP

2005

FICHA CATALOGRÁFICA

Peres, Nalu Teixeira de Aguiar

Isolamento e caracterização de um mutante de *Trichophyton rubrum* resistente ao ácido undecanóico: secreção enzimática e expressão diferencial de genes.

Ribeirão Preto, 2005.

111 p. : il.; 30cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Pós Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, sub-área Bioagentes Patogênicos.

Orientadora: Martinez-Rossi, Nilce Maria.

Trichophyton rubrum, dermatófito, ácido undecanóico.

Figuras da capa (da esquerda para a direita):

1. Lesão de pele característica de dermatofitose (Tinea corporis) (fonte: www.doctorfungus.com).
2. Microscopia óptica mostrando macroconídios de *Trichophyton* (fonte: www.doctorfungus.com).
3. Microscopia eletrônica mostrando a interação entre o conídio de *T. mentagrophytes* e o estrato córneo, após 24 horas de infecção (Duek *et al.*, 2004).
4. Figura esquemática da secreção de enzimas hidrolíticas de um fungo fitopatogênico durante o processo infeccioso (Vorwerk *et al.*, 2004).
5. Esquema ilustrativo da cooperação entre o sistema imune inato e o adaptativo em infecções fúngicas (Romani, 2004).
6. Figura esquemática do processo de transcrição gênica (fonte: CD comemorativo da conclusão do mapeamento do genoma humano, revista Nature 2001).
7. Gel de poliacrilamida proveniente de um experimento de *Differential Display*.

Dedico

Aos meus pais, Sonia e Oswaldo, e ao meu irmão Alessandro. O apoio, a confiança, a dedicação, o carinho e o amor de vocês fizeram com que eu chegasse até aqui. Palavras não conseguem expressar o que vocês representam pra mim... então só posso dizer: Eu amo vocês!

Agradecimentos

À Profa. Dra. Nilce Maria Martinez Rossi pelo esmero em minha orientação, pelas discussões, dedicação, apoio, confiança e amizade, fundamentais para a realização desta dissertação. Fica aqui a minha admiração científica e acadêmica por você!

Ao Prof. Dr. Antonio Rossi Filho pela “co-orientação”, pelas discussões valiosíssimas durante todo o desenvolvimento deste trabalho e também pelos empréstimos de material e equipamentos de seu laboratório. Muito obrigada!

À Dra. Monica Stropa Ferreira Nozawa e ao Dr. Sérgio Ricardo Nozawa pela disponibilidade em me ajudar desde a minha entrada no laboratório, e principalmente pela paciência em ensinar biologia molecular para quem achava que PCR era somente a sigla de “proteína C reativa” ☺.

À Dra. Jeny Rachid Cursino dos Santos pela ajuda nos momentos mais críticos, pela confiança, disponibilidade, conhecimento, discussões sobre biologia molecular, microbiologia, interação... e também pela amizade. Você foi fundamental para o meu crescimento científico. “Obrigadíssima” fofinha!

Aos membros da banca Dra. Claudia Maria Leite Maffei e Dr. Wanderley Dias da Silveira, pelas discussões e sugestões.

À secretária da Imunologia Ana Cristine, que me recebeu com tanto carinho, por todos os auxílios prestados, pela dedicação e amizade sempre dispensadas. E também pelo ombro amigo nas horas mais difíceis. Obrigada Aninha!

Às secretárias do Departamento de Genética Cleusa, Maria Aparecida e Susie, pela atenção e ajuda em todos os momentos, pela torcida e amizade. “Brigadinha”!

Aos técnicos Ana Claudia, Mendel e Rose pelo apoio técnico, essencial para o bom andamento de qualquer trabalho de pesquisa, pelo carinho e amizade com que me receberam no laboratório. Obrigada!

Ao analista de sistemas Pablo Sanches, pelo apoio em bioinformática e pelo nosso *pipeline*, que facilita muito nossa vida nas incontáveis horas analisando seqüências.

À Dona Geralda pelos cafezinhos, bolinhos e chazinhos (que curavam nossas gripes), e também pelo carinho de sempre. Valeu fofis!

Aos amigos e colegas do laboratório de Genética Molecular de Microrganismos Fernanda Paião, Fernanda Maranhão, Fernando, Henrique, Juliana e Luciene. Eu também não poderia esquecer daqueles que estavam no laboratório quando eu cheguei, e certamente deixaram saudades: Ana Graci, Ana Lúcia, Camila, Márcia, Eleusa, Tânia e Eliane. Obrigada a todos pelo apoio, ajuda, discussões e amizade!

Aos amigos e colegas do laboratório de Bioquímica de Microrganismos Carlos, Diana, Emiliana, Janaína e Juliana. Obrigada pelas discussões, empréstimos de material, concentrador... e pela amizade de vocês!

Às minhas queridas amigas Fernanda Paião (sempre ao meu lado, ajudando nos experimentos, estudando e quebrando a cabeça junto comigo), Jeny (que sempre tinha uma palavra amiga e um conselhinho...) e Rose (uma das responsáveis por eu ter vindo para esse laboratório). Muito obrigada!!!!

Aos meus amigos Daniela, Diana, Fernandinho, Juliana, Leo, Isabela, Paulinha, Pryscilla, Rita e Roberta. Ah! também não poderia esquecer o grupo das "homogêneas mais ou menos" Pry, Mirela e Renata - sofremos, mas aprendemos muito e no final, sobrevivemos! Obrigada pelo apoio, amizade e por me aturarem por tanto tempo... Adoro vocês!

Aos meus pais, meu irmão Alê, Juliana, e toda a minha família pelo apoio (emocional e financeiro), confiança, dedicação, carinho e amor de vocês. Obrigada!

A Deus, por tudo! Principalmente pela minha perseverança (quando tudo dava errado) e pelas pessoas maravilhosas que colocou em meu caminho.

Ao CNPq pela bolsa, à CAPES, FAEPA e FAPESP pelos auxílios concedidos.

Resumo

Dermatófitos constituem um grupo de fungos patogênicos que infectam tecidos queratinizados como pele, pêlos e unhas de humanos e animais. *Trichophyton rubrum* é uma espécie antropofílica de dermatófito, sendo o isolado mais freqüente nas lesões de pele e unha em humanos. A secreção de enzimas é um processo importante na invasão e utilização do tecido hospedeiro e na instalação dos dermatófitos, sendo fundamental para sua patogenicidade. O ácido undecanóico (AUN) é um ácido graxo que apresenta propriedades antimicóticas, inibindo queratinases e lipases extracelulares, estimulando a produção de fosfolipase A extracelular, e em altas concentrações inibe também a biossíntese de vários fosfolipídeos de *T. rubrum*. Linhagem deste fungo resistente ao AUN não foi capaz de infectar cobaias. Entretanto, os mecanismos envolvidos na resistência ao AUN e a possível relação de tais mecanismos com a secreção de enzimas por *T. rubrum* ainda não são conhecidos, tornando-se um alvo importante para estudos moleculares.

No presente trabalho foi isolada uma linhagem de *T. rubrum* resistente ao AUN, através de irradiação com luz ultravioleta. A linhagem resistente apresenta valores de concentração inibitória mínima quatro vezes maior que a linhagem selvagem, além de crescer mais lentamente, mesmo em fragmentos de unha humana. Apesar disso, as enzimas queratinolíticas e proteolíticas secretadas pela linhagem mutante apresentam uma maior atividade em relação às secretadas pela selvagem, sugerindo um interessante mecanismo adaptativo, principalmente do ponto de vista patogênico pois estas enzimas são importantes fatores de virulência para dermatófitos. A diferença no crescimento das linhagens foi suprimida quando elas foram cultivadas em meio contendo glicina ou em meio pH 5,0 tamponado, levando à hipótese de que a mutação tenha levado a uma dificuldade em alcalinizar o meio extracelular. As análises de expressão gênica diferencial através de *Differential Display Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Transcription* e *Reverse Northern Blot*, mostraram uma maior expressão do gene que codifica uma enzima transportadora de íons, a H⁺-ATPase de membrana plasmática, pela linhagem resistente. Tal fato sugere um mecanismo molecular para compensar o crescimento mais lento, visto que tal proteína é importante no processo de manutenção do pH intracelular e na captação de nutrientes. As proteínas hipotéticas encontradas no estudo de expressão gênica, podem estar desempenhando um importante papel no mecanismo de resistência ao AUN e serão analisadas, futuramente, através de ensaios funcionais.

Abstract

Dermatophytes are a group of pathogenic molds that have the capacity to invade keratinized tissue such as skin, hair and nails of human and animals. *Trichophyton rubrum* is an anthropophilic dermatophyte and is the most prevalent fungus isolated from skin and nail lesions. Enzyme secretion is an important factor during the invasion and utilization of host tissue and also in the installation of dermatophytes, being essential for their pathogenicity. Undecanoic acid (UDA) is a fatty acid with antimycotic properties which inhibits the production of extracellular keratinase and lipase, stimulates phospholipase A secretion, and at high concentrations inhibits the biosynthesis of several phospholipids in *T. rubrum*. UDA-resistant strain of this fungus was not able to infect guinea pigs. However, the mechanisms underlying the resistance to UDA and their relationship with the enzyme secretion by *T. rubrum* are unclear, thus representing an important target for molecular studies.

In the present study, an UDA-resistant strain of *T. rubrum* was isolated, by irradiation with ultraviolet light. This resistant strain shows minimal inhibitory concentration values four times higher than the wild type, and has a slower growth rate compared to the wild type even in human nail fragments. Despite this, the keratinolytic and proteolytic enzymes secreted by the mutant strain show a higher activity than that secreted by the wild type, suggesting that this may be an interesting adaptation mechanism, mainly from a pathogenic point of view, since these enzymes are important virulence factors for dermatophytes. The differences in growth between the strains were suppressed when they were cultivated in glycine-containing media or in pH 5.0 culture medium. A hypothesis that could be proposed to explain this fact is that the mutation caused a difficulty in growth medium alkalization. The analysis of differential gene expression by *Differential Display Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Transcription* and *Reverse Northern Blot*, showed a higher expression of a translocation ion enzyme coding gene, a plasma membrane H⁺-ATPase by the resistant strain. This fact suggests a molecular mechanism that compensates for the slower growth of this strain, since this protein is important to maintain intracellular pH and nutrient uptake. The hypothetical proteins found by gene expression analysis may be playing an important role in the UDA resistance mechanism. The genes encoding these proteins will be functionally analyzed in the near future.

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|-------------------|---|----|
| Figura 1: | Modelo proposto para a regulação pelo pH das enzimas proteolíticas secretadas pelos dermatófitos..... | 6 |
| Figura 2: | Representação esquemática da reação de DDRT-PCR..... | 12 |
| Figura 3: | Crescimento da linhagem mutante UDA ^r obtida por irradiação com luz ultravioleta..... | 40 |
| Figura 4: | Análise morfológica das linhagens de <i>T. rubrum</i> | 41 |
| Figura 5: | Gráfico representando o crescimento das linhagens MYA-3108 e UDA ^r em meio mínimo..... | 42 |
| Figura 6: | Gráfico representando o crescimento das linhagens MYA-3108 e UDA ^r em meio ágar Sabouraud..... | 43 |
| Figura 7: | Crescimento das linhagens de <i>T. rubrum</i> em meio mínimo suplementado com diferentes fontes de carbono..... | 45 |
| Figura 8: | Crescimento das linhagens de <i>T. rubrum</i> em meio de queratina..... | 46 |
| Figura 9: | Gráfico comparando o crescimento e a degradação de queratina entre as linhagens de <i>T. rubrum</i> | 47 |
| Figura 10: | Padrão colorimétrico da secreção enzimática pelo sistema <i>Api-zym</i> ^R | 49 |
| Figura 11: | Halo de degradação das proteínas do leite pelas linhagens de <i>T. rubrum</i> | 51 |
| Figura 12: | Gráfico comparando o crescimento e a degradação de proteínas entre as linhagens de <i>T. rubrum</i> , em diferentes valores de pH extracelular..... | 52 |
| Figura 13: | Gráfico comparando o crescimento e a degradação de proteínas entre as linhagens de <i>T. rubrum</i> em relação a diferentes concentrações de AUN, em meio de protease pH 5,0..... | 54 |
| Figura 14: | Gráfico comparando o crescimento e a degradação de proteínas entre as linhagens de <i>T. rubrum</i> em relação a diferentes concentrações de AUN, em meio de protease pH 5,0 tamponado..... | 55 |
| Figura 15: | Gráfico comparando o crescimento e a degradação de proteínas entre as linhagens de <i>T. rubrum</i> em relação a diferentes concentrações de AUN, em meio de protease pH 6,8..... | 56 |
| Figura 16: | Gráfico comparando o crescimento e a degradação de proteínas entre as linhagens de <i>T. rubrum</i> em relação a diferentes concentrações de AUN, em meio de protease pH 6,8 tamponado..... | 57 |
| Figura 17: | Gráfico comparando o crescimento e a degradação de proteínas entre as linhagens de <i>T. rubrum</i> em relação a diferentes concentrações de AUN, em meio de protease pH 8,0..... | 58 |

| | | |
|-------------------|---|----|
| Figura 18: | Gráfico comparando o crescimento e degradação de proteínas entre as linhagens de <i>T. rubrum</i> em relação a diferentes concentrações de AUN, em meio de protease pH 8,0 tamponado..... | 60 |
| Figura 19: | Gráfico comparando o crescimento e a degradação de lipídeos entre as linhagens de <i>T. rubrum</i> em relação a diferentes concentrações de AUN, em meio de lipase pH 6,8..... | 61 |
| Figura 20: | Germinação dos conídios das linhagens de <i>T. rubrum</i> sobre fragmentos de unha humana..... | 62 |
| Figura 21: | Padrão eletroforético dos experimentos de DDRT-PCR..... | 64 |
| Figura 22: | Padrão dos produtos de PCR de alguns clones de DDRT-PCR em gel de agarose 0,8%..... | 67 |
| Figura 23: | <i>Reverse Northern Blot</i> dos clones provenientes das reações de DDRT-PCR..... | 68 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | | |
|-------------------|---|----|
| Tabela 1: | Constituintes do meio RPMI-1640..... | 18 |
| Tabela 2: | Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de DDRT-PCR..... | 23 |
| Tabela 3: | Fontes de carbono utilizadas para suplementar o meio mínimo..... | 29 |
| Tabela 4: | Enzimas, substratos, pH de atividade ótima e resultado padrão do <i>Api-zym^R</i> | 31 |
| Tabela 5: | Oligonucleotídeos utilizados nos seis experimentos de DDRT-PCR..... | 34 |
| Tabela 6: | Programa utilizado para a transcrição reversa (RT-PCR)..... | 34 |
| Tabela 7: | Programa utilizado para a amplificação dos cDNAs..... | 34 |
| Tabela 8: | Programa de PCR utilizado para as reações de seqüenciamento..... | 37 |
| Tabela 9: | Programa de PCR para amplificar os insertos dos clones de DDRT-PCR..... | 39 |
| Tabela 10: | CIM do AUN para as linhagens selvagem e mutante de <i>T. rubrum</i> | 41 |
| Tabela 11: | Valores de pH inicial e final dos meios de cultivo das linhagens de <i>T. rubrum</i> | 43 |
| Tabela 12: | Quantificação da atividade das enzimas queratinolíticas secretadas pelas linhagens selvagem e mutante..... | 48 |
| Tabela 13: | Semi-quantificação das enzimas exocelulares detectadas pelo <i>Api-zym^R</i> | 50 |
| Tabela 14: | Quantificação da atividade das proteases secretadas pelas linhagens selvagem e mutante, em diferentes valores de pH do meio de cultivo..... | 52 |
| Tabela 15: | Quantificação da atividade das proteases secretadas pelas linhagens selvagem e mutante, em pH 5,0..... | 54 |
| Tabela 16: | Quantificação da atividade das proteases secretadas pelas linhagens selvagem e mutante, em pH 5,0 tamponado..... | 55 |
| Tabela 17: | Quantificação da atividade das proteases secretadas pelas linhagens selvagem e mutante, em pH 6,8 | 57 |
| Tabela 18: | Quantificação da atividade das proteases secretadas pelas linhagens selvagem e mutante, em pH 6,8 tamponado..... | 58 |
| Tabela 19: | Quantificação da atividade das proteases secretadas pelas linhagens selvagem e mutante, em pH 8,0..... | 59 |
| Tabela 20: | Quantificação da atividade das proteases secretadas pelas linhagens selvagem e mutante, em pH 8,0 tamponado..... | 60 |
| Tabela 21: | Quantificação da atividade das lipases secretadas pelas linhagens selvagem e mutante, em pH 8,0 tamponado..... | 62 |
| Tabela 22: | Análise das seqüências pelo programa BLASTx..... | 66 |
| Tabela 23: | Organização dos clones sobre as membranas de nylon..... | 67 |

ÍNDICE

| | | |
|-------------|--|-----------|
| I. | Introdução..... | 1 |
| II. | Justificativa e objetivo..... | 15 |
| III. | Materiais e Métodos..... | 16 |
| 1. | Linhagens..... | 16 |
| 1.1. | Linhagem de <i>Trichophyton rubrum</i> | 16 |
| 1.2. | Cepa de <i>Escherichia coli</i> | 16 |
| 2. | Manutenção e estoque das linhagens..... | 16 |
| 2.1. | Linhagem de <i>Trichophyton rubrum</i> | 16 |
| 2.2. | Cepa de <i>Escherichia coli</i> | 17 |
| 3. | Meios de cultura..... | 17 |
| 3.1. | Meio mínimo..... | 17 |
| 3.2. | Meio Sabouraud..... | 17 |
| 3.3. | Meio RPMI-1640..... | 17 |
| 3.4. | Meio de Luria e Bertani..... | 19 |
| 3.5. | Meio SOC..... | 19 |
| 3.6. | Meio para protease..... | 19 |
| 3.7. | Meio para lipase..... | 19 |
| 3.8. | Meio de queratina..... | 19 |
| 4. | Soluções..... | 20 |
| 4.1. | Solução de elementos-traço..... | 20 |
| 4.2. | Solução de sais..... | 20 |
| 4.3. | Solução de vitaminas..... | 20 |
| 4.4. | Solução de X-Gal..... | 21 |
| 4.5. | Solução de IPTG..... | 21 |
| 4.6. | Solução estoque de ácido undecanóico..... | 21 |
| 4.7. | Tampão TAE..... | 21 |
| 4.8. | Tampão Tris-EDTA..... | 21 |
| 4.9. | Soluções para RNA..... | 22 |
| 4.10. | Soluções para DD-RTPCR..... | 23 |
| 4.11. | Soluções para obtenção de células competentes..... | 24 |
| 4.12. | Soluções para extração de DNA plasmidial..... | 24 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.13. | Soluções para dosagem de proteínas..... | 25 |
| 4.14. | Soluções utilizadas no tratamento das membranas utilizadas para os experimentos de <i>Reverse Northern Blot</i> | 25 |
| 4.15. | Soluções utilizadas no <i>Reverse Northern Blot</i> | 26 |
| 5. | Obtenção de mutantes de <i>T. rubrum</i> resistentes ao ácido undecanóico.. | 26 |
| 5.1. | Preparo da suspensão de conídios..... | 26 |
| 5.2. | Isolamento do mutante resistente ao AUN..... | 27 |
| 6. | Caracterização do mutante resistente ao ácido undecanóico..... | 27 |
| 6.1. | Resistência ao UDA..... | 27 |
| 6.2. | Teste de crescimento em diferentes fontes de carbono..... | 28 |
| 6.3. | Medida do halo de queratinase..... | 29 |
| 6.4. | Medida do halo de protease..... | 29 |
| 6.5. | Medida do halo de lipase..... | 30 |
| 6.6. | Detecção das enzimas extracelulares pelo sistema <i>Api-zym</i> | 30 |
| 6.7. | Teste de patogenicidade <i>in vitro</i> | 32 |
| 7. | Expressão diferencial de genes por DDRT-PCR..... | 32 |
| 7.1. | Condições de cultivo..... | 32 |
| 7.2. | Extração de RNA total..... | 33 |
| 7.3. | <i>Differential Display - Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction - DDRT-PCR</i> | 33 |
| 8. | Transformação por choque térmico (<i>heat shock</i>)..... | 34 |
| 8.1. | Preparo das células competentes..... | 35 |
| 8.2. | Choque térmico (<i>heat shock</i>) | 35 |
| 9. | Extração de DNA plasmidial..... | 35 |
| 9.1. | <i>Miniprep</i> | 35 |
| 9.2. | <i>Maxiprep</i> | 36 |
| 9.3. | Extração de DNA plasmidial em microplaca..... | 36 |
| 10. | Seqüenciamento..... | 37 |
| 11. | Análises de bioinformática..... | 38 |
| 12. | <i>Reverse northern blotting</i> por marcação a frio..... | 38 |
| 12.1. | PCR da cultura bacteriana..... | 38 |
| 12.2. | Preparo das membranas..... | 38 |
| 12.3. | Preparo das sondas..... | 39 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 12.4. | Pré-hibridação e hibridação..... | 39 |
| IV. | Resultados..... | 40 |
| 1. | Obtenção de uma linhagem de <i>T. rubrum</i> resistente ao ácido undecanóico e determinação da concentração inibitória mínima..... | 40 |
| 2. | Análise morfológica da linhagem mutante..... | 41 |
| 3. | Análise do crescimento das linhagens em meio mínimo e Sabouraud em diferentes valores de pH..... | 42 |
| 4. | Análise do crescimento das linhagens em diferentes fontes de carbono | 44 |
| 5. | Análise do crescimento em meio de queratina..... | 45 |
| 6. | Análise das enzimas secretadas pelas linhagens de <i>T. rubrum</i> | 48 |
| 6.1. | Perfil das enzimas secretadas..... | 48 |
| 6.2. | Análise da degradação de proteínas extracelulares..... | 50 |
| 6.3. | Análise da secreção de lipases extracelulares..... | 61 |
| 7. | Teste de patogenicidade <i>in vitro</i> | 62 |
| 8. | Análise da expressão diferencial de genes por <i>Differential Display Reverse Transcription of Polymerase Chain Reaction</i> – DDRT-PCR... | 63 |
| 8.1. | Análise das seqüências por bioinformática..... | 65 |
| 8.2. | <i>Reverse-Northern Blotting</i> | 67 |
| V. | Discussão..... | 69 |
| VI. | Conclusões..... | 78 |
| VII. | Perspectivas..... | 79 |
| VIII. | Referências bibliográficas..... | 80 |
| | Apêndice..... | 96 |

I. Introdução

Os microrganismos são seres vivos que utilizam diversas fontes de carbono e nitrogênio para adquirir a energia necessária para sua sobrevivência, incluindo tecidos humanos sendo, portanto, capazes de causar doenças. Atualmente, as doenças infecciosas continuam ocupando uma posição de destaque no quadro de mortalidade mundial, apesar dos grandes avanços no desenvolvimento tecnológico e na melhoria da qualidade de vida e higiene. O grau de severidade das infecções depende de fatores como o inóculo, a magnitude da destruição tecidual, a habilidade do agente se multiplicar no tecido e o estado imunológico do hospedeiro. O organismo capaz de causar danos ao hospedeiro é considerado patogênico, e o dano pode ser causado diretamente pela ação do microrganismo ou pela resposta imune contra aquele agente infeccioso (Baron, 1996). Os componentes do patógeno que levam a lesões no hospedeiro são seus fatores de virulência. Contudo, o fato de linhagens avirulentas poderem causar danos em pacientes imunodeprimidos revela a complexidade e o dinamismo do fenômeno de virulência, que inclui tanto fatores do hospedeiro quanto do microrganismo (Casadevall e Pirofski, 1999; 2001). A ocorrência das doenças infecciosas em humanos é um processo dinâmico, resultado da interação entre o patógeno e seu hospedeiro. De um lado o agente infeccioso tenta colonizar o tecido hospedeiro e utilizá-lo como fonte de energia para sua sobrevivência e multiplicação. Do outro, o hospedeiro tenta evitar a entrada, a colonização, a multiplicação e a disseminação do microrganismo através de mecanismos da imunidade inata e da resposta imune adaptativa (Baron, 1996).

As infecções fúngicas causam um amplo espectro de doenças em humanos, acometendo desde sítios anatômicos superficiais envolvendo o estrato córneo da pele, até infecções disseminadas atingindo cérebro, pulmão, coração, fígado, baço e rins. Apesar disto, em geral, as infecções causadas por fungo tendem a ser relativamente benignas em pacientes imunocompetentes. Entretanto, atualmente as doenças fúngicas têm se tornado um importante problema de saúde pública devido ao uso intenso e inapropriado de agentes antimicrobianos e, principalmente, ao elevado número de pacientes imunodeprimidos, seja por terapia imunossupressora (no caso de pacientes com câncer ou transplantados) ou por alguma doença imunossupressiva (como a AIDS) (Jarvis, 1995, Speth *et al.*, 2004). A ocorrência de aspergilose em paciente com síndrome respiratória aguda severa (SARS) (Wang *et al.*, 2003) e a inclusão do fungo dimórfico *Coccidioides immitis* como um agente

de bioterrorismo em potencial (Dixon *et al.*, 2001) indicam que a importância clínica de tais doenças continuará aumentando.

Os fungos apresentam uma relação complexa e não usual com o sistema imune de vertebrados. Para a maioria dos fungos, a patogenicidade não é uma característica estável e a patogênese das infecções fúngicas envolve diversos fatores de virulência que permitem a sobrevivência e a persistência do fungo no organismo hospedeiro, eventualmente levando a danos teciduais. Entre os fatores de virulência dos fungos, podemos citar as estruturas de adesão que possibilitam a aderência do microrganismo ao tecido hospedeiro e à matriz extracelular; a habilidade de usar diversas vias metabólicas, que permite sua sobrevivência intracelular; a termotolerância, capacidade de crescer a 37° C, essencial na disseminação para tecidos profundos; o dimorfismo, ou seja, a capacidade de existir em formas diferentes (filamentosa e leveduriforme) e de alterar entre elas durante a infecção; e a produção e secreção de enzimas como fosfolipases, proteases e elastases, as quais, além de causar danos ao hospedeiro também prejudicam suas defesas (Hogan *et al.*, 1996).

Os mecanismos de defesa do hospedeiro influenciam na manifestação e na severidade das infecções fúngicas, uma vez que as formas clínicas da doença dependem da resposta imune do paciente. Por exemplo, o sistema imune determina qual forma de doença se desenvolverá após exposição contínua ao *Aspergillus fumigatus*, variando de uma reação alérgica, até uma infecção invasiva e profunda (Marr *et al.*, 2002), ou se ocorrerá transição da forma comensal para a parasitária (infecciosa) de *Candida albicans* (Fidel *et al.*, 1994; Romani, 2004). Na maioria dos estudos em humanos, a mortalidade a partir de infecções fúngicas oportunistas (em que o agente naturalmente não é patogênico e apenas causa doença quando encontra uma falha na defesa imunológica do hospedeiro) excede 50%, e apresenta índices mais elevados (acima de 95%) em pacientes que receberam transplante de medula óssea e foram infectados por espécies de *Aspergillus* (Romani, 2004).

As micoses são classificadas como superficiais, cutâneas, subcutâneas, profundas e oportunistas. As micoses cutâneas estão entre as infecções fúngicas mais frequentes, acometem os tecidos queratinizados como pele, pêlos, cabelos e unhas, atingindo tanto indivíduos hígidos quanto imunodeprimidos. As dermatofitoses, classicamente denominadas de tíneas ou tinhas, são causadas por um grupo relacionado de fungos queratinofílicos capazes de utilizar queratina, uma proteína insolúvel presente no estrato córneo, como fonte de carbono e energia. Tais fungos são classificados em três gêneros - *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* - de acordo com a formação e morfologia de seus conídios (estruturas de reprodução assexuada) e divididos em espécies zoofílicas,

geofílicas ou antropofílicas, dependendo de seu habitat primário (animais, solo ou humanos, respectivamente) (Kwon-Chung e Bennett, 1992).

Em geral, as dermatofitoses ocorrem cerca de cinco vezes mais em homens do que em mulheres. Estudos indicam que o crescimento destes patógenos pode ser influenciado por alguns hormônios esteróides. Algumas espécies de *Trichophyton* e *Microsporum* apresentam proteínas citosólicas que se ligam especificamente e com alta afinidade à progesterona, e esta, em concentrações farmacológicas e fisiológicas, inibe o crescimento de dermatófitos de uma maneira dose-dependente, sendo que as espécies antropofílicas respondem mais à ação dos esteróides do que as espécies geofílicas (Schär *et al.*, 1986; Clemons *et al.*, 1988 e 1989). Tais estudos sugerem que a inibição do crescimento pela progesterona e por outros compostos relacionados, desempenhe um papel na restrição da doença em mulheres, através de um atraso no desenvolvimento da hifa, permitindo o aparecimento de uma resposta eficaz do hospedeiro que elimina a infecção (Brasch e Gottkehaskamp, 1992).

A infecção por dermatófitos é adquirida através do contato direto com animais e humanos infectados, ou indireto por fômites contaminados (Weitzman e Summerbell, 1995). Tal infecção pode levar a sintomas brandos ou severos dependendo do estado imunológico do hospedeiro, não ocorrendo, geralmente, invasão de tecidos subcutâneos ou órgãos internos. As lesões dermatofíticas características são circulares, eritematosas e pruriginosas, estão presentes em diversas partes do corpo e podem ser conseqüentes da ação direta do fungo ou reações de hipersensibilidade ao parasita e/ou a seus produtos metabólicos, transportados via hematogênica a locais distantes do foco primário de infecção (Minelli, 1991). No caso das reações alérgicas, a doença é denominada dermatofítide e está classificada dentro das micoalergoses (alergias provocadas por fungos ou por seus produtos metabólicos) (Kwon-Chung e Bennett, 1992).

O dermatófito mais freqüentemente isolado de casos clínicos de *tinea pedis* (pés), *tinea unguium* (unhas), *tinea corporis* (corpo), *tinea manuum* (mãos) e *tinea cruris* (região da virilha) é *Trichophyton rubrum* (Anstey *et al.*, 1996; Zais e Rebell, 1996; Foster *et al.*, 2004). Estudos epidemiológicos mostram que este patógeno foi responsável por 48,6% dos casos de dermatofitose na cidade de São Paulo no período de 1992 a 2002 (Chinelli *et al.*, 2003) e 49,7% em Goiânia no período de janeiro a dezembro de 1999 (Costa *et al.*, 2002). Em Lausanne (Suíça) e em Nova York (Estados Unidos), ele foi responsável, respectivamente, por 62,5% e 67% dos casos de onicomicose (infecção da unha) (Monod *et al.*, 2002; Jennings *et al.*, 2002). Atualmente, um fator agravante das dermatofitoses é

que em pacientes imunocomprometidos, *T. rubrum* vem atuando de maneira invasiva provocando infecções profundas e generalizadas, até mesmo com o surgimento de granulomas dermatofíticos (Novick *et al.*, 1987; Grossman *et al.*, 1995, Squeo *et al.*, 1998; Gorani *et al.*, 2002; Nir-Paz *et al.*, 2003; Tateishi *et al.*, 2004).

Para que um agente infeccioso possa se instalar na pele, ele deve ser capaz de sobrepor os mecanismos de defesa inatos do hospedeiro, os quais representam a primeira linha de proteção do organismo contra infecções. A estrutura física e química da pele (como a presença da queratina, que não é utilizada pela maioria dos microrganismos, exceto por dermatófitos e *C. albicans*), a constante exposição à luz ultravioleta, a temperatura, a falta de umidade, a competição com a microbiota normal e a presença de ácidos graxos, tornam o ambiente inóspito para o crescimento de microrganismos (Ogawa *et al.*, 1998).

Um mecanismo importante na defesa contra agentes infecciosos que acometem sítios anatômicos superficiais é a queratinização, processo de renovação do estrato córneo realizado pelos queratinócitos, que leva à descamação epitelial e conseqüentemente à possível remoção do fungo (Wagner e Sohnle, 1995). Na patogênese das dermatofitoses, o contato inicial entre os artroconídios fúngicos e o estrato córneo é o evento mais importante do início da infecção. Após a adesão, o artroconídio deve germinar e a hifa penetrar no estrato córneo rapidamente, para que o fungo não seja eliminado devido à contínua descamação do epitélio (Ogawa *et al.*, 1998). Duek *et al.* (2004) estudaram a infecção *ex vivo* por *Trichophyton mentagrophytes* e mostraram, nesse sistema, que após 12 horas de infecção os microconídios aparecem implantados na camada superficial e que a germinação ocorre dentro de 24 horas. Neste mesmo estudo, os autores relatam o aparecimento de um material polimérico, de natureza química ainda desconhecida, entre o microconídio e a célula do estrato córneo três dias após a infecção, provavelmente desempenhando um importante papel na adesão dos esporos à superfície da pele. Ray e Payne (1988) observaram que *C. albicans* e *C. stellatoidea* quando aderidas ao estrato córneo, adquirem um material da família das mucinas (coesinas), localizado entre os esporos e os corneócitos, sugerindo que tais pontes contêm um componente mucopolissacarídico.

Estudos de infecção *in vitro* mostram que *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* expressam adesinas, provavelmente de natureza glicoprotéica, que reconhecem e se ligam à manose e galactose presentes na superfície de células epiteliais de ovário de hamster chinês (CHO). A ligação à manose foi mais elevada do que à galactose, e *T. rubrum*

expressa mais adesinas que *T. mentagrophytes*. Outro aspecto interessante quanto à interação dos microconídios de *T. rubrum* com as células CHO, foi que os autores observaram não apenas a adesão como também a endocitose dos conídios, sugerindo que o fungo apresenta a capacidade de invadir células uma vez que tais células não são fagócitos profissionais. Já na interação com macrófagos, fagócitos profissionais que mediam a resposta imune, o fungo se adere à superfície do macrófago, ocorrendo a fagocitose clássica e também uma fagocitose induzida na qual o fungo reconhece estruturas do macrófago e é internalizado. Quando o macrófago é pré-tratado com citocalasina D, uma substância que impede a fagocitose por agir na despolimerização dos filamentos de actina, a internalização do conídio também ocorre sugerindo uma participação ativa do fungo neste processo (Esquenazi *et al.*, 2003; 2004).

Uma vez aderido ao tecido hospedeiro, o dermatófito deve obter nutrientes para seu crescimento utilizando macromoléculas do hospedeiro como fonte de carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre. Um dos fatores mais importantes neste processo é a secreção de uma ampla variedade de enzimas como lipases, queratinases, elastases, colagenases, desoxirribonuclease (DNase), fosfatases ácida e alcalina e esterases (Yu e Harmon, 1968; Apodaca e McKerrow, 1991; Brasch *et al.*, 1991; Mushin *et al.*, 1997; Singh, 1997). Esta maquinaria metabólica permite a utilização de proteínas solúveis, substratos queratinosos, ácidos nucleicos, lipídeos e mucinas como fonte de nutrientes dentro de um amplo espectro de pH, possibilitando a completa instalação, desenvolvimento e permanência do dermatófito no tecido hospedeiro.

Apodaca e McKerrow (1989a) relataram, em *T. rubrum*, a regulação da atividade proteolítica em função da concentração de carbono, nitrogênio e enxofre, e Tsuboi *et al.* (1989) mostraram que proteases com atividade ótima em pH ácido são importantes fatores de virulência dos dermatófitos. Em 2004, Martinez-Rossi *et al.*, propuseram um modelo de regulação das enzimas proteolíticas pelo pH, durante o processo infeccioso destes fungos. Nos estágios iniciais da infecção, em resposta ao pH levemente ácido da pele humana o patógeno ativa enzimas proteolíticas não específicas que atuam com atividade ótima em pH ácido. Estas agem em substratos, queratinosos ou não, do estrato córneo gerando peptídeos que são hidrolisados a aminoácidos, os quais são utilizados pelo fungo como fontes de carbono, nitrogênio e enxofre. Tais aminoácidos devem então reprimir a síntese de proteases não específicas e induzir a síntese de queratinases. A utilização destes aminoácidos também leva à produção de acetil CoA e à ativação de proteases e

queratinases com atividade ótima em pH alcalino, permitindo a ocorrência da doença (figura 1).

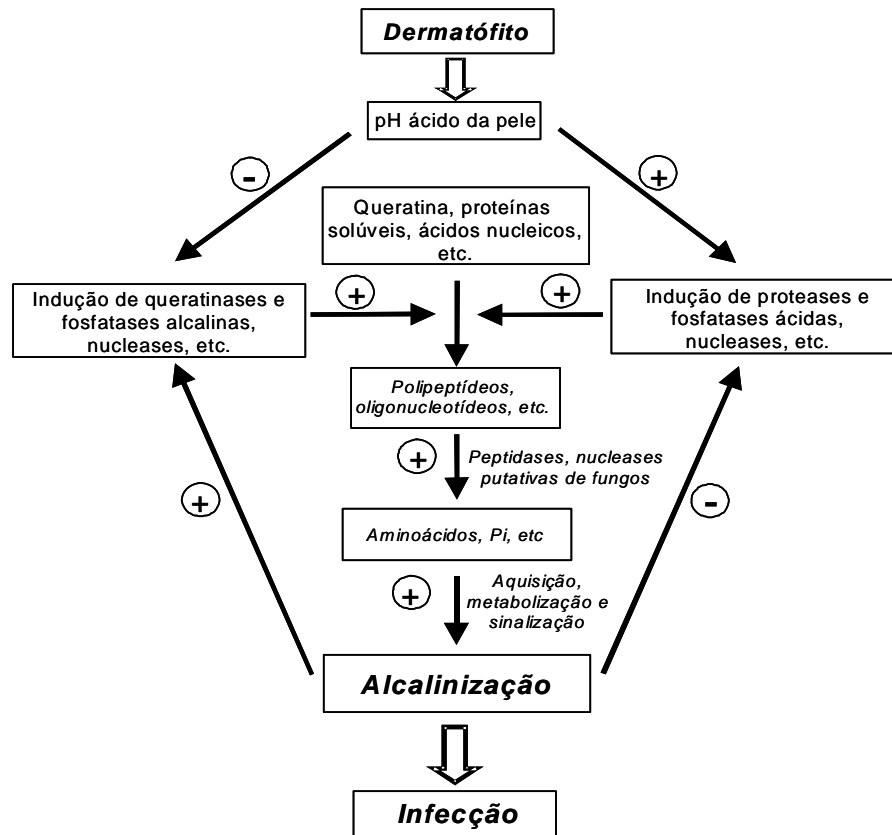


Figura 1. Modelo proposto para a regulação pelo pH das enzimas proteolíticas secretadas pelos dermatófitos. O monitoramento do pH ácido da pele nos estágios iniciais da infecção acarreta a ativação (+) de proteases e queratinases com atividade ótima em pH ácido e a repressão (-) de queratinases com atividade ótima em pH alcalino, liberando polipeptídios. A clivagem destes polipeptídios em aminoácidos, provavelmente por peptidases, suprirá o dermatófito com fontes de carbono, nitrogênio e enxofre. A utilização de alguns aminoácidos, como glicina, produzirá acetil CoA citoplasmático induzindo a alcalinização do meio, e conseqüente repressão (-) das proteases e queratinases com atividade ótima em pH ácido, e ativação (+) das queratinases com atividade ótima em pH alcalino. A ativação das enzimas proteolíticas com atividade ótima em pH alcalino ocasionará a infecção e a manutenção do dermatófito no tecido hospedeiro. (Martinez-Rossi *et al.*, 2004).

Desta maneira, a secreção de enzimas é um processo importante na invasão e utilização do tecido hospedeiro e também na instalação dos dermatófitos, sendo fundamental para sua patogenicidade. A secreção de lipases, por exemplo, é importante na colonização do tecido cutâneo, uma vez que a pele apresenta ácidos graxos saturados que constituem uma barreira importante contra patógenos que infectam sítios anatômicos

superficiais. Vários tipos de esfingosídeos foram recentemente encontrados e são efetivos contra certos dermatófitos e *C. albicans* (Bibel *et al.*, 1993; Wagner e Sohnle, 1995).

Como mencionado anteriormente, as dermatofitoses tendem a ser restritas às camadas superficiais da pele, unha e cabelo. Tal fenômeno tem sido relacionado à presença de transferrina insaturada na derme, podendo impedir o crescimento do fungo nas camadas mais profundas da pele através da competição pelo ferro (Roth *et al.*, 1959; King *et al.*, 1975). O confinamento do fungo às camadas superficiais provavelmente o protege do contato direto com células efectoras do sistema imune. Entretanto, algumas destas infecções são altamente inflamatórias uma vez que se pode observar descamação e formação de pústulas e vesículas no local da infecção, existindo uma relação inversa entre o grau de inflamação e a cronicidade da doença. Geralmente, as lesões menos inflamatórias, como as causadas por *T. rubrum*, são mais crônicas e persistentes enquanto que as infecções causadas por *T. mentagrophytes* são agudas e mais inflamatórias (Sohnle, 1993; Wagner e Sohnle, 1995; Ogawa *et al.*, 1998). Microscopicamente, as lesões são caracterizadas pelo acúmulo de neutrófilos na pele em infecções agudas ou um infiltrado mononuclear em infecções crônicas (Ogawa *et al.*, 1998). Tais células são atraídas para o local da lesão por vários mecanismos, entre os quais podemos citar os fatores do sistema complemento que pode ser ativado através da via alternativa pelo fungo, levando à geração de anafilatoxinas, quimiotoxinas e opsoninas, fatores importantes para a defesa do hospedeiro contra infecções dermatofíticas e também nas reações inflamatórias mediadas por tais moléculas (Swan *et al.*, 1983). Além disso, Tagami *et al.* (1989) relataram que os dermatófitos liberam alguns fatores quimiotáticos, análogos aos produzidos por bactérias, que também seriam responsáveis pelo recrutamento de células no local da lesão.

De maneira geral, o controle das infecções fúngicas depende inicialmente dos complexos mecanismos de defesa característicos de cada hospedeiro. A doença se instala quando ocorre uma falha nesta defesa, tornando-se necessário utilizar drogas fungicidas ou fungistáticas que atuem o mais especificamente possível contra os patógenos, de modo a evitar danos ao hospedeiro. Entretanto, essa especificidade é limitada devido ao pouco conhecimento em várias áreas da biologia dos patógenos, tais como: mecanismos responsáveis pela virulência (Gozaldo *et al.*, 1993), características biológicas dos fungos, mecanismos de resistência aos antifúngicos disponíveis no mercado (Martinez-Rossi, 1995) e mecanismos envolvidos na secreção das enzimas relacionadas com a patogenicidade.

Os antifúngicos de uso comum apresentam um número limitado de alvos celulares, como o ergosterol e as enzimas envolvidas na sua síntese, a síntese de ácidos nucleicos e da parede celular e a formação de microtúbulos (Odds *et al.*, 2003). O ergosterol é o principal esteroide da membrana plasmática de fungos, sendo importante para manter a fluidez e integridade da membrana e para o funcionamento adequado de enzimas da própria membrana celular, incluindo a quitina sintetase que está envolvida no crescimento e divisão celular (Georgopapadakou e Walsh, 1996; White *et al.*, 1998).

Ácidos graxos apresentam propriedades antifúngicas, as quais têm sido avaliadas há muito tempo, principalmente em relação a infecções de pele (Garg e Muller, 1993). O primeiro autor a descrever as propriedades antimicóticas dos ácidos graxos foi Clark, em 1899. Kiesel (1913) notou um aumento na atividade antifúngica dos ácidos graxos saturados em função do aumento no número de átomos de carbono na cadeia dos mesmos. Entretanto, Peck e Rosenfeld (1938) relataram as propriedades antifúngicas do ácido valérico (C₅) e concluíram que não havia relação entre o comprimento da cadeia e as propriedades fungicidas dos ácidos graxos na série de C₁ a C₁₀, estendida para 12 átomos de carbono por Thornton (1963). Os experimentos de Keeney *et al.* (1944) e Wyss *et al.* (1945), mostraram que os ácidos graxos de cadeia longa da série de C₁₂ a C₁₆ apresentavam uma maior propriedade fungistática e fungicida em relação aos da série de C₃ a C₁₀. Porém, em 1993, Garg e Müller demonstraram que os ácidos graxos saturados de cadeia curta (C₇ a C₁₁) são mais tóxicos para dermatófitos do que os de cadeia longa (acima de C₁₂) e que o ácido undecanóico (C₁₁) é o mais tóxico da série de C₇ a C₁₈.

A inibição do crescimento de *T. rubrum* e de outros fungos patogênicos por ácidos graxos de cadeia longa, saturados e insaturados, foi descrita no início da década de 70 por Nathanson (1972). Em geral, os ácidos graxos inibem vários processos biológicos, como a respiração celular (Vicher *et al.*, 1959), o metabolismo de carboidratos (Heseltine, 1952), a captação de fosfato (Samson *et al.*, 1955), o metabolismo de fosfolípidos, a biossíntese e o catabolismo de vários fosfatídeos deste dermatófito (Das e Banerjee, 1982a). Esses efeitos em processos celulares, aparentemente não relacionados, sugerem que a interação entre o ácido graxo e as enzimas celulares de fungos sensíveis pode ser não-específica (Horsfal, 1956; Thornton e Taylor, 1963).

Em particular, o ácido undecanóico (AUN) é capaz de alterar a secreção de enzimas consideradas importantes fatores de virulência para dermatófitos, inibindo queratinases e lipases extracelulares e estimulando a produção de fosfolipase A extracelular em *T. rubrum*, além disso, linhagens resistentes a esta droga não foram capazes de infectar

cobaias (Das e Banerjee, 1982b). Os autores sugeriram que o efeito observado poderia ser devido à inibição das enzimas de forma direta pelo ácido undecanóico. No entanto, tal hipótese foi questionada pelos experimentos de Kok *et al.* (1996), mostrando que, na bactéria *Acinetobacter calcoaceticus*, a produção de lipase é reprimida pelos ácidos graxos, principalmente os de cadeia longa, ou por seus produtos de degradação na etapa de transcrição gênica. Entretanto, o envolvimento do ácido undecanóico no controle da expressão e secreção dessas enzimas e a possível relação entre os mecanismos de resistência ao ácido undecanóico e a secreção de enzimas importantes para a patogenicidade de *T. rubrum* ainda não estão bem elucidados.

Atualmente, as pesquisas envolvendo o ácido undecanóico abordam seu uso conjugado (ligado) a peptídeos antimicrobianos de modo a aumentar o espectro de ação destes compostos que, em sua maioria, são altamente ativos contra bactérias mas não são efetivos contra fungos. A ligação de ácidos lipofílicos de diferentes tamanhos (ácido heptanóico, ácido palmítico e, principalmente, ácido undecanóico) à extremidade N-terminal de um análogo da magainina, um potente peptídeo antimicrobiano seletivo para bactérias, levou a uma atividade antifúngica deste peptídeo contra *Cryptococcus neoformans*, *C. albicans* e *A. fumigatus* (Avrahami e Shai, 2002). A conjugação do AUN a peptídeos sintéticos, que sozinhos apresentam pouca ou nenhuma atividade antimicrobiana, também foi efetiva contra os fungos citados acima e também contra bactérias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (Avrahami e Shai, 2002 e 2003). Os autores relataram que estes lipopeptídeos sintéticos atuam diretamente na membrana plasmática da célula, apresentando a habilidade de atravessar a parede celular, interagir e aumentar a permeabilidade da membrana citoplasmática.

As infecções causadas por *T. rubrum* geralmente estão associadas a recidivas seguidas da interrupção da terapia antifúngica, porém elas não têm sido relacionadas à resistência a antifúngicos (Jackson *et al.*, 1999). Mukherjee *et al.* (2003) relataram o primeiro caso de resistência primária a terbinafina, uma das drogas mais utilizadas em casos de dermatofitose, em linhagem de *T. rubrum* isolada de um paciente com onicomicose cujo tratamento oral com terbinafina não foi efetivo. Tal isolado apresentava susceptibilidade ao itraconazol, ao fluconazol e a griseofulvina, e resistência cruzada com vários outros inibidores da esqualeno epoxidase, incluindo naftidina, butenafina, tolnaftato e tolclilato, sugerindo um mecanismo de resistência alvo específico.

Os principais mecanismos bioquímicos e moleculares que contribuem para o fenótipo de resistência a drogas em eucariotos são: redução da captação da droga; modificação ou degradação da droga dentro da célula; alterações na interação da droga com o sítio alvo ou em outras enzimas envolvidas na mesma via enzimática, através de mutações pontuais, super expressão da molécula alvo, amplificação e conversão gênica (recombinação); aumento do efluxo celular, por exemplo, por uma maior expressão das bombas de efluxo como os transportadores do tipo ABC (*ATP binding cassette*) (White *et al.*, 1998). Inúmeros genes envolvidos na resistência adquirida já foram identificados em alguns fungos como *A. nidulans* (Pereira *et al.*, 1998; Rocha *et al.*, 2002), *C. albicans* (Barker *et al.*; 2004), *C. neoformans* (Posteraro *et al.*, 2003), entre outros.

A resistência à terbinafina em *A. nidulans*, por exemplo, é mediada pela super expressão do gene *sala* que codifica uma enzima, a salicilato 1-monooxigenase, que cataliza a formação do catecol a partir do salicilato, intermediário necessário para a degradação de naftaleno (núcleo aromático presente na estrutura química da terbinafina) (Graminha *et al.*, 2004). Posteraro *et al.* (2003) observaram a super expressão de um gene que codifica um transportador do tipo ABC (*CnAFRI*) numa linhagem de *C. neoformans* resistente ao fluconazol e comprovaram através de nocaute gênico que este gene estava relacionado ao processo de resistência, pois houve um aumento na susceptibilidade à droga na linhagem com o gene rompido e a reversão do fenótipo de resistência quando o gene foi re-introduzido nesta mesma linhagem. Em experimentos de microarranjos, Barker *et al.* (2004) identificaram a super expressão de genes, pela linhagem de *C. albicans* resistente a anfotericina B e ao fluconazol, envolvidos na síntese do ergosterol, no estresse celular e na resistência a outros inibidores da via de síntese do ergosterol. Em *T. rubrum*, dois transportadores do tipo ABC, *atrD* e *atrE*, foram identificados mostrando-se importantes não só no processo de resistência a diversos antifúngicos, mas também na secreção de enzimas e provavelmente na patogenicidade deste dermatófito (Fachin, 2001; Cervelatti, 2003).

A comparação biológica entre linhagens de uma mesma espécie apresentando diferentes níveis de resistência e/ou sensibilidade a agentes inibidores de crescimento é amplamente utilizada nos estudos dos mecanismos envolvidos nos processos de resistência a tais drogas. Os genes expressos por um organismo são as unidades funcionais básicas de seu DNA genômico e como tais regiões não podem ser identificadas a partir da seqüência genômica por si, os produtos gênicos, RNAs mensageiros (mRNAs) ou proteínas, devem ser isolados das células, seqüenciados e identificados. Os genes que são expressos em

níveis baixos ou que são expressos apenas em determinado tipo celular, estágio de desenvolvimento ou condições de cultivo, podem ser responsáveis por fenótipos diferenciados, pela progressão do desenvolvimento ou regulação do crescimento celular (Martin e Pardee, 2000). Deste modo, a “genética da expressão” ou “genômica funcional” é uma das estratégias mais utilizadas na descoberta e na compreensão de mecanismos moleculares envolvidos em diversos processos biológicos (Liang e Pardee, 2003), inclusive na resistência a antifúngicos (Agarwal *et al.*, 2003; Bammert e Foster, 2000). Ao longo dos últimos anos, diversas tecnologias foram desenvolvidas para estudar e comparar genes diferencialmente expressos entre células submetidas a diferentes condições e/ou estímulos. Entre elas podemos citar as técnicas de DDRT-PCR (*Differential Display Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*), microarranjos (*microarrays*), hibridação subtrativa, biblioteca subtrativa e SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*).

A técnica de DDRT-PCR foi descrita inicialmente por Liang e Pardee, em 1992, e consiste basicamente em duas etapas que estão ilustradas na figura 2. A primeira, é uma reação de transcrição reversa da população de mRNA a ser analisada, para obtenção de DNA complementar (cDNA) fita simples, usando um oligonucleotídeo iniciador poli T [oligo d(T)], que se pareia à cauda poliadenilada (poli-A) do mRNA eucarioto. Este oligo d(T) pode possuir na extremidade 3' uma (A, C ou G) ou duas bases-âncora (MN: M pode ser A, C ou G e N pode ser A, C, G ou T). Utilizando cada oligo d(T) trabalha-se, respectivamente, com 1/3 e 1/12 dos mRNAs expressos por uma célula. A segunda etapa consiste na amplificação dos cDNAs obtidos através de uma reação de PCR utilizando oligonucleotídeos de seqüência arbitrária, contendo de 10 a 13 bases o que permite o seu pareamento inespecífico ao cDNA. A análise é feita em gel de poliacrilamida, comparando-se os fragmentos de cDNA das populações em estudo (Liang e Pardee, 1992; Liang *et al.*, 1994).

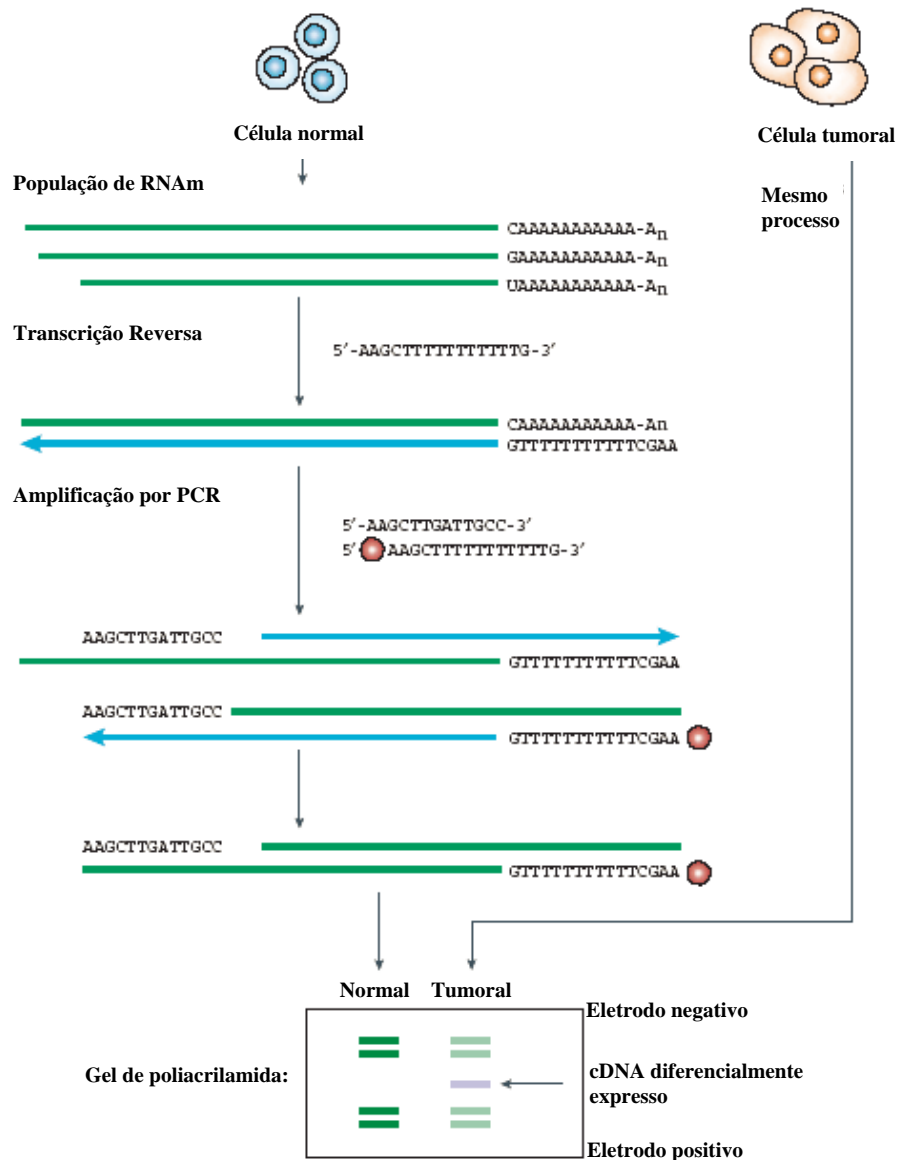


Figura 2. Representação esquemática da reação de DDRT-PCR (Liang e Pardee, 2003).

Uma das principais vantagens do DDRT-PCR, comparado às demais técnicas de análise de expressão diferencial de genes, é o uso de pequenas quantidades de RNA total, não havendo a necessidade de utilizar RNA poli (A)⁺. Outras vantagens desta metodologia são a simplicidade, a rapidez, a capacidade de comparar diferentes estímulos e condições, a reprodutibilidade e a capacidade de se descobrir genes novos, uma vez que a técnica pode ser realizada sem o conhecimento, ou mesmo hipótese, de quais genes estariam envolvidos em determinado processo celular. Entretanto, ela também apresenta algumas desvantagens, como a necessidade de utilizar técnicas complementares trabalhosas e que consomem

grande quantidade de RNA para a confirmação da expressão gênica diferencial, a alta frequência de falsos positivos, a clonagem de seqüências pequenas correspondentes à região 3' não traduzida (3' *untranslated region* – 3'UTR) que poderia reduzir a informação sobre o produto gênico (Bertioli *et al*, 1995; Wan *et al*, 2001).

O *differential display* tem sido aplicado para investigar diversos mecanismos celulares como, por exemplo, genes relacionados às vias de transdução de sinal, à diferenciação e ciclo celular, à resistência a drogas e busca de novos alvos, ao estresse nutricional e ambiental e na identificação de marcadores moleculares para diagnóstico e prognóstico de doenças (Sturtevant, 2000; Liang, 2003). Embora a técnica tenha sido descrita para se analisar genes eucariotos, algumas modificações na técnica possibilitaram o uso de DDRT-PCR também na análise da expressão diferencial de genes em procariotos (Fislage, 1998; Fleming *et al*, 1998). Em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), um fitopatógeno responsável pelo cancro cítrico, o DDRT-PCR foi utilizado em estudos de monitoramento da expressão gênica em resposta ao pH e à presença de antibióticos (Defina, 2003) e, em *Haemophilus parasuis* (patógeno de suínos) sete genes relacionados à virulência foram diferencialmente expressos quando a bactéria foi exposta a condições que mimetizavam as encontradas *in vivo* (Hill *et al.*, 2003).

Uma das principais áreas de investigação na qual DDRT-PCR tem sido muito usado é na pesquisa do câncer, identificando-se muitos oncogenes e genes alvos da proteína supressora de tumores p53 (Liang e Pardee, 2003). Esta técnica de expressão diferencial de genes também tem sido útil na identificação de genes envolvidos no desenvolvimento e diferenciação de células do sistema imune e na interação celular durante diversas fases da resposta imune. Os estudos sobre o perfil de expressão gênica em diferentes linhagens celulares têm utilizado células mononucleares do sangue periférico de humanos, células derivadas do baço, timo ou medula óssea, células provenientes de camundongos transgênicos, células tratadas com citocinas ou outras drogas, etc. Várias moléculas como marcadores de superfície celular (integrinas), chaperonas e moléculas sinalizadoras, receptores nucleares e fatores de transcrição têm sido isolados através destes estudos (Ali *et al.*, 2001).

Em fungos patogênicos, vários estudos têm sido realizados buscando uma melhor compreensão dos diversos mecanismos moleculares envolvidos em vários processos celulares, principalmente na patogênese das infecções fúngicas, na interação com o hospedeiro e na busca de novos alvos para antifúngicos. Utilizando DDRT-PCR, Prigneau *et al.* (2003) encontraram sete genes de *C. albicans*, cuja expressão foi induzida durante a

fagocitose desta levedura por macrófagos murinos. Tais genes codificam proteínas metabólicas relacionadas à β -oxidação e ao ciclo do glioxolato (via bioquímica ausente em mamíferos) e proteínas envolvidas na transdução e no monitoramento de sinais ambientais, como a falta de nutrientes no meio extracelular. Neste estudo, os autores sugerem que a indução destes genes seja devido a uma limitação dos nutrientes dentro do macrófago e seria, portanto, uma reação de defesa do fungo, e que a mudança do metabolismo energético utilizando glicose para uma via metabólica dependente de lipídeos seja necessária para que ocorram as mudanças morfogênicas que permitem que o fungo produza hifas e escape do macrófago. Também utilizando DDRT-PCR, Rude *et al.* (2002) estudaram o perfil transcricional de *C. neoformans*, uma levedura capsulada que causa quadros de meningite, durante a progressão da infecção e detectaram no sétimo dia de infecção, uma indução significativa de um gene que codifica a enzima isocitrato liase, envolvida na via do glioxolato e que se encontra em altos níveis sob condições de baixa tensão de oxigênio e glicose, na presença de acetato, em altas temperaturas e durante o crescimento intracelular.

Em *Histoplasma capsulatum*, um fungo dimórfico que causa uma infecção pulmonar crônica, os pesquisadores identificaram genes que foram induzidos na levedura após este patógeno ter sido ingerido por macrófagos. Os autores relatam que os produtos destes genes podem ser responsáveis pela adesão da levedura aos fagócitos e pela resistência deste patógeno à resposta microbida do fagócito (Porta e Maresca, 2000). Venancio *et al.* (2002) avaliaram genes diferencialmente expressos em *Paracoccidioides brasiliensis*, fungo dimórfico causador de micose sistêmica em humanos, durante a transição dimórfica de hifa para levedura, e encontraram três fragmentos de cDNA expressos apenas na fase micelial e dois expressos na fase de transição micélio-levedura. Estes estudos demonstram o amplo espectro de estudos que estão sendo realizados atualmente, utilizando a metodologia de DDRT-PCR.

II. Justificativa e Objetivo

A importância clínica de *T. rubrum* e a relação entre secreção de enzimas com a patogenicidade deste fungo tornam relevantes os estudos dos mecanismos adaptativos que este patógeno utiliza para o crescimento e a permanência no tecido hospedeiro, e para a secreção de enzimas durante o processo infeccioso. A possível relação entre os mecanismos de resistência ao ácido undecanóico e a secreção de enzimas importantes para a patogenicidade de *T. rubrum*, e o envolvimento deste ácido graxo no controle da expressão dessas enzimas ainda não são conhecidos, tornando-se assim um alvo importante para caracterização molecular.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na resistência ao ácido undecanóico, em *T. rubrum*, e analisar a possível associação destes mecanismos com a patogenicidade deste dermatófito.

Para atingir este objetivo os seguintes aspectos foram abordados:

- ❖ Ensaios de susceptibilidade da linhagem selvagem ao ácido undecanóico;
- ❖ Obtenção de uma linhagem de *T. rubrum* resistente a esta droga;
- ❖ Ensaios de susceptibilidade ao ácido undecanóico das linhagens selvagem e mutante;
- ❖ Análise do crescimento das linhagens sensível e resistente ao AUN em diferentes fontes de carbono, pH e queratina;
- ❖ Análise das enzimas secretadas pelas linhagens selvagem e mutante;
- ❖ Análise dos genes diferencialmente expressos pelas linhagens, através da metodologia de DDRT-PCR.

III. Material e métodos

1. Linhagens

1.1. Linhagem de *Trichophyton rubrum*

A linhagem H6 (ATCC MYA-3108) de *T. rubrum*, utilizada neste trabalho, foi isolada de um paciente do sexo feminino, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, portador de *tinea cruris*. Esta linhagem foi identificada conforme descrito em McGinnis (1980), pela Profa. Dra. Cláudia Maria Leite Maffei, responsável pelo setor de Micologia do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP. As características desta linhagem são: colônia branca de aspecto cotonoso e encorpado, o reverso da colônia não apresenta pigmentação após 15 dias de crescimento em meio ágar Sabouraud (Atlas, 1993); apresenta microconídios sésseis em forma de lágrima, macroconídios claviformes e resistência *in vivo* ao tratamento com griseofulvina (comunicação pessoal). Estudos de seu cariótipo mostraram a presença de pelo menos cinco cromossomos, e o genoma apresenta aproximadamente 22,05 Mbp (Cervelatti *et al.*, 2004).

1.2. Cepa de *Escherichia coli*

A cepa pMOS *Blue endA1 hsdR17 supE44 recA1 gyrA96 relA1 lac [F', pro AB, lac I, ZAM15, Tn10 (Tet^r)]* foi utilizada para a amplificação dos plasmídios recombinantes.

2. Manutenção e estoque das linhagens

2.1. Linhagens de *T. rubrum*

Para a preservação da linhagem MYA-3108 por períodos mais longos, foram utilizados tubos de ensaio contendo meio ágar Sabouraud inclinado (Atlas, 1993). O mutante resistente ao ácido undecanóico, obtido através de irradiação com luz ultravioleta (item 5.2) da linhagem MYA-3108, foi estocado no mesmo meio de cultura contendo ácido undecanóico na concentração para a qual ele é resistente (80 µg/mL). Após o cultivo, as linhagens foram mantidas em temperatura ambiente e, para repiques periódicos, foram

inoculadas com o auxílio de palitos esterilizados, em placas de Petri contendo meio ágar Sabouraud e incubadas a 28° C por 15 dias.

2.2. Cepa de *Escherichia coli*

A cepa de *E. coli* foi cultivada em meio LB líquido acrescido de tetraciclina (15 µg/mL) por 12 a 24 horas a 37° C. Alíquotas de 1 mL da cultura, contendo 15% (v/v) de glicerol esterilizado, foram estocadas a -80° C. Quando necessário, uma alíquota foi descongelada e inoculada no meio de cultura apropriado. As bactérias contendo plasmídeo com o gene de resistência a ampicilina foram estocadas na presença deste antibiótico na concentração de 50 µg/mL de meio de cultura.

3. Meios de cultura

3.1. Meio Mínimo - MM (Cove, 1966)

Solução de sais (item 4.2)..... 20 mL
 Água destilada (q.s.p)..... 1000 mL

O pH do meio foi ajustado em 6,8. O meio foi autoclavado a 1 atm de pressão e 120° C por 20 minutos. Para o preparo do meio sólido foi adicionado agar para uma concentração final de 1,5% (m/v). Este meio não contém glicose nem nitrato de sódio. Quando necessário, foram acrescentados 50 mM de glicose e 70 mM de nitrato de sódio.

3.2. Meio Sabouraud modificado (Atlas, 1993)

Glicose..... 20 g
 Peptona..... 10 g
 Água destilada (q.s.q)..... 1000 mL

O pH do meio foi ajustado para 5,7. O meio foi autoclavado a 1 atm de pressão e 120° C por 20 minutos. Para o preparo do meio sólido foi adicionado agar para uma concentração final de 1,5% (m/v).

3.3. Meio RPMI-1640

10,4 g do meio RPMI-1640 (Gibco BRL) (tabela 1) foram dissolvidos em 900 mL de água destilada. A seguir, foi adicionado MOPS [ácido 3-(N-morfolina)

propanosulfônico] para uma concentração final de 0,165 M, agitando-se até a completa dissolução do meio. O pH foi ajustado para 7,0 utilizando hidróxido de sódio 1 M e o volume completado para 1 L com água destilada. O meio foi esterilizado através de um sistema de filtração com membrana de nylon de 22µm e estocado a 4° C.

Tabela 1: Constituintes do meio RPMI-1640.

| Constituinte | g/L | Constituinte | g/L |
|-----------------------|--------|---------------------------------------|----------|
| L-arginina | 0,200 | Biotina | 0,0002 |
| L-asparagina (anidro) | 0,050 | D-pantotênico | 0,00025 |
| Ácido L-aspártico | 0,020 | Cloreto de colina | 0,003 |
| L-cisteína.2HCl | 0,0652 | Ácido fólico | 0,001 |
| Ácido L-glutâmico | 0,020 | Mio-inositol | 0,035 |
| L-glutamina | 0,0300 | Niacinamida | 0,001 |
| Glicina | 0,010 | Ácido ρ-aminobenzóico | 0,001 |
| L-histidina | 0,015 | Piridoxina HCl | 0,001 |
| L-hidroxiprolina | 0,020 | Riboflavina | 0,0002 |
| L-isoleucina | 0,050 | Tiamina HCl | 0,001 |
| L-leucina | 0,050 | Vitamina B ₁₂ | 0,000005 |
| L-lisina HCl | 0,040 | Nitrato de cálcio.H ₂ O | 0,100 |
| L-metionina | 0,015 | Cloreto de potássio | 0,400 |
| L-fenilalanina | 0,015 | Sulfato de magnésio (anidro) | 0,04884 |
| L-prolina | 0,020 | Cloreto de sódio | 6,000 |
| L-serina | 0,030 | Fosfato de sódio dibásico (anidro) | 0,800 |
| L-treonina | 0,020 | D-glicose | 2,000 |
| L-triptofano | 0,005 | Glutathiona reduzida | 0,001 |
| L-tirosina.2Na | 0,020 | Vermelho de fenol | 0,0053 |
| L-valina | 0,020 | | |

3.4. Meio de Luria e Bertani - LB (Sambrook *et al.*, 1989)

| | |
|------------------------------|---------|
| Triptona..... | 10 g |
| Extrato de levedura..... | 5 g |
| Cloreto de potássio..... | 0,2 g |
| Cloreto de sódio..... | 0,6 g |
| Água destilada (q.s.p.)..... | 1000 mL |

O pH do meio foi ajustado para 7,4. O meio foi autoclavado a 1 atm de pressão e 120° C por 20 minutos. Para o preparo do meio sólido foi adicionado ágar para uma concentração final de 1,5% (m/v).

3.5. Meio SOC

| | |
|------------------------------|--------|
| Cloreto de potássio 2 M..... | 321 µL |
| Cloreto de magnésio 1 M..... | 250 µL |
| Sulfato de magnésio 1 M..... | 500 µL |
| Glicose 1 M..... | 500 µL |
| Meio LB (q.s.p.)..... | 25 mL |

Todas as soluções utilizadas foram autoclavadas a 1 atm de pressão e 120° C por 20 minutos. O meio foi estocado a -20° C.

3.6. Meio para protease (Katz *et al.*, 1996)

Meio mínimo (item 3.1) acrescido de 1% (m/v) de leite em pó. O pH do meio foi ajustado em 5,0, 6,8 e 8,0. Para os meios tamponados, foi utilizado citrato de sódio 50 mM (pH5,0), PIPES 50 mM (pH 6,8) e tris-HCl 50 mM (pH 8,0). Os meios foram autoclavados a 1 atm de pressão e 120° C por 20 minutos, e suplementados com glicose e nitrato de sódio, para concentração final de 50 mM e 70 mM, respectivamente.

3.7. Meio para lipase (Mushin *et al.*, 1997)

Meio mínimo (item 3.1) suplementado com glicose e nitrato de sódio, para uma concentração final de 50 mM e 70 mM, respectivamente, e 1% (v/v) de tween 20.

3.8. Meio de queratina

Meio mínimo (item 3.1) contendo 0,5% de queratina (Biomedicals).

4. Soluções

4.1. Solução de elementos-traço (Cove, 1966)

| | |
|---|---------|
| Borato de sódio decahidratado..... | 40 mg |
| 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 g |
| Água destilada esterilizada (q.s.p.)..... | 1000 mL |

Esta solução foi mantida em clorofórmio a 4° C.

4.2. Solução de sais (Cove, 1966)

| | |
|--|---------|
| Cloreto de potássio..... | 26 g |
| Sulfato de magnésio heptahidratado..... | 26 g |
| Fosfato de potássio monobásico..... | 76 g |
| Solução de elementos-traço (item 4.1)..... | 50 mL |
| Água destilada esterilizada (q.s.p.)..... | 1000 mL |

Esta solução foi mantida em clorofórmio a 4° C.

4.3. Solução de vitaminas (Cove, 1966)

| | |
|--|--------|
| Ácido fólico..... | 10 mg |
| Ácido nicótico..... | 100 mg |
| Ácido ρ -aminobenzóico..... | 25 mg |
| Biotina..... | 1 mg |
| Cloreto de colina..... | 100 mg |
| Mesoinositol..... | 200 mg |
| Piridoxina HCl..... | 50 mg |
| Pantetonato de cálcio..... | 100 mg |
| Riboflavina..... | 100 mL |
| Tiamina..... | 50 mg |
| Água destilada esterilizada (q.s.p)..... | 100 mL |

Esta solução foi mantida em frasco escuro em clorofórmio a 4° C.

4.4. Solução de X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) (Sambrook *et al.*, 1989)

A solução estoque de X-gal foi preparada em N, N-dimetilformamida na concentração de 20 mg/mL. Esta solução foi mantida a -20° C em frasco escuro, para evitar a fotodegradação.

4.5. Solução de IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) (Sambrook *et al.*, 1989)

A solução estoque de IPTG foi preparada dissolvendo-se 2 g de IPTG em 10 mL de água destilada esterilizada, e mantida a -20° C.

4.6. Solução estoque de ácido undecanóico (AUN) (Sigma)

A solução estoque foi preparada na concentração de 100 mg/mL, utilizando clorofórmio como solvente. Como esse solvente é volátil, a solução foi preparada no momento do uso.

4.7. Tampão TAE (Tris-Acetato) (Sambrook *et al.*, 1989)

| | |
|-----------------------------|---------|
| Tris-base..... | 242 g |
| Ácido acético glacial..... | 57,1 mL |
| EDTA 0,5M..... | 100 mL |
| Água destilada (q.s.p)..... | 1000 mL |

O pH foi ajustado para 8,0 e a solução autoclavada a 1 atm de pressão e 120° C por 20 minutos.

4.8. Tampão Tris-EDTA - TE (Tampão de eluição) (Sambrook *et al.*, 1989)

| | |
|------------------|------|
| Tris-HCl..... | 10 M |
| EDTA pH 8,0..... | 1 M |

O pH foi ajustado para 8,0 e a solução autoclavada a 1 atm de pressão e 120° C por 20 minutos.

4.9. Soluções para RNA

4.9.1. Água livre de RNase (Sambrook *et al.*, 1989)

Para evitar a contaminação da água com RNase, a água deionizada utilizada na extração e no preparo de soluções para RNA foi tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) 0,01% (v/v) e incubada a 37° C por 18-20 horas e autoclavada por 30 minutos, a 1 atm de pressão e 120° C.

4.9.2. Tampão desnaturante para extração de RNA

| | |
|------------------------------|------------|
| Citrato de sódio pH 6,8..... | 26 mM |
| N-lauril sarcosil..... | 0,5% (m/v) |
| 2-β-mercaptoetanol..... | 125 mM |
| Tiocianato de guanidina..... | 4 M |

O tampão foi preparado com água livre de RNase e mantido em frasco escuro a 4° C.

4.9.3. Gel para RNA (Sambrook *et al.*, 1989)

Para o preparo do gel para RNA, a agarose foi dissolvida em água tratada com DEPC e, em seguida, fundida. Quando a temperatura atingiu aproximadamente 60° C, os seguintes reagentes foram adicionados:

| | |
|---------------------------------|-------|
| Formaldeído..... | 20 mL |
| Agarose 1,5% (m/v) fundida..... | 70 mL |
| Tampão de corrida 5X..... | 22 mL |

4.9.4. Tampão de corrida 5X

| | |
|-----------------------|--------|
| MOPS pH 7,0..... | 100 mM |
| Acetato de sódio..... | 40 mM |
| EDTA pH 8,0..... | 5 mM |

Este tampão foi preparado com água livre de RNase e mantido em frasco escuro à temperatura ambiente.

4.9.5. Preparo das amostras

Em um microtubo de 1,5 mL foram misturados 10 µL de RNA, 2 µL de tampão de corrida 5X, 3,5 µL de formaldeído, 10 µL de formamida e 2 µL de *dye loading solution* [tampão de corrida 1X, glicerol 30% (v/v) e um traço de azul de bromofenol contendo brometo de etídeo (1 µg/µL)]. As amostras foram incubadas a 65° C por 15 minutos e resfriadas rapidamente em gelo. A seguir, foram aplicadas em gel para RNA (item 4.9.3.) e submetidas à eletroforese por 4 V/cm em tampão de corrida 1X.

4.10. Soluções para DDRT-PCR

4.10.1. Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados foram diluídos para uma concentração final de 10 pmol/µL (estoque). A tabela 2 mostra as seqüências dos oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de DDRT-PCR.

Tabela 2: Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de DDRT-PCR

| Oligonucleotídeos | Seqüência (5' → 3') |
|-------------------|---------------------------|
| LT11C | TGC CAA GCT TTT TTT TTT C |
| HT11C | AAG CTT TTT TTT TTT C |
| Ea1 | TTT TAT CCA GC |
| Ea4 | TCA GCG TTT TA |
| Ea9 | TTT TAC CCA GC |
| Eca1 | TTT TTC GTT TA |
| Es2 | GCT GCT GGC G |
| Es5 | TGG CGG CGG C |
| Es7 | ATG CGC TGG C |

4.10.2. Gel de poliacrilamida 8%

| | |
|--|--------|
| Solução acrí/bisacrilamida 40% (m/v) / 1% (m/v)..... | 6,0 mL |
| Tampão TAE 50X..... | 600 µL |
| Temed 10% (v/v)..... | 60 µL |
| Persulfato de amônio..... | 250 mg |
| Água destilada (q.s.p)..... | 30 mL |

As reações de DDRT-PCR foram aplicadas neste gel, utilizando azul de bromofenol. As amostras migraram em tampão TAE 1X a 40 mA. Após a migração, o gel foi corado com brometo de etídeo e as bandas foram visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta.

4.11. Soluções para obtenção de células competentes

4.11.1. Tampão I

| | |
|------------------------|-------|
| Tris-HCl pH 7,5..... | 10 mM |
| Cloreto de cálcio..... | 50 mM |

4.11.2. Tampão II

| | |
|------------------------|-----------|
| Tris-HCl pH 7,5..... | 10 mM |
| Cloreto de cálcio..... | 50 mM |
| Glicerol..... | 15% (v/v) |

4.12. Soluções para extração de DNA plasmidial

4.12.1. Solução I

| | |
|------------------|-------|
| Glicose..... | 50 mM |
| Tris-HCl..... | 25 mM |
| EDTA pH 8,0..... | 10 mM |

4.12.2. Solução II

| | |
|-------------------------|----------|
| SDS..... | 1% (m/v) |
| Hidróxido de sódio..... | 0,2 M |

4.12.3. Solução III

| | |
|----------------------------|---------|
| Acetato de potássio..... | 60 mL |
| Ácido acético glacial..... | 11,5 mL |

4.13. Soluções para dosagem de proteínas

4.13.1. Solução A

| | |
|------------------------------------|--------|
| Tartarato de sódio e potássio..... | 2,0 g |
| Carbonato de sódio..... | 100 g |
| Hidróxido de sódio 1N..... | 500 mL |
| Água destilada (q.s.p.)..... | 1 L |

A solução foi armazenada em frasco âmbar.

4.13.2. Solução B

| | |
|--------------------------------------|--------|
| Tartarato de sódio e potássio | 2,0 g |
| Sulfato de cobre pentahidratado..... | 1,0 g |
| Hidróxido de sódio 1N..... | 10 mL |
| Água destilada (q.s.p.)..... | 100 mL |

A solução foi armazenada em frasco âmbar.

4.13.3. Solução C

| | |
|---------------------|-------|
| Folim..... | 1 mL |
| Água destilada..... | 14 mL |

Preparada no momento do uso.

4.14. Soluções utilizadas no tratamento das membranas utilizadas para os experimentos de *Reverse Northern Blot*

4.14.1. Solução desnaturante

| | |
|-------------------------|-------|
| Hidróxido de sódio..... | 0,5 M |
| Cloreto de sódio..... | 1,5 M |

A solução foi autoclavada a 1 atm de pressão e 120° C por 20 minutos, e mantida à temperatura ambiente.

4.14.2. Solução neutralizante

| | |
|-----------------------|-------|
| Tris-base pH 7,4..... | 1,0 M |
| Cloreto de sódio..... | 1,5 M |

A solução foi autoclavada a 1 atm de pressão e 120° C por 20 minutos, e mantida à temperatura ambiente.

4.14.3. Solução SSC 20X

| | |
|------------------------------|---------|
| Cloreto de sódio..... | 175,3 g |
| Citrato de sódio..... | 88,2 g |
| Água destilada (q.s.p.)..... | 1000 mL |

O pH foi ajustado para 7,0. A solução foi autoclavada a 1atm de pressão e 120° C por 20 minutos, e mantida à temperatura ambiente.

4.15. Soluções utilizadas no *Reverse Northern Blot*

Neste procedimento foi utilizada a estratégia de marcação a frio, com fluoresceína, utilizando os Kits *Genes Images Random Prime Labeling Module* (marcação) e *Gene Image CDP-Star Detection Module* (detecção) (Amersham Biosciences).

4.15.1. Solução de hibridação

| | |
|-------------------------------|--------|
| Dextran Sulfato..... | 5 g |
| SSC 20X..... | 25 mL |
| SDS 10% (m/v)..... | 1 mL |
| Líquido bloqueador..... | 5 mL |
| Água deionizada (q.s.p.)..... | 100 mL |

4.15.2. Tampão A

| | |
|-----------------------|--------|
| Tris-HCl..... | 100 mM |
| Cloreto de sódio..... | 300 mM |

O pH foi ajustado para 9,5, a solução foi autoclavada a 1atm de pressão e 120° C por 20 minutos e mantida à temperatura ambiente

5. Obtenção de mutantes de *T. rubrum* resistentes ao ácido undecanóico

5.1. Preparo da suspensão de conídios

A linhagem de *T. rubrum* foi cultivada a 28° C por 14 dias em meio ágar Sabouraud. Após este período, o micélio foi coletado com o auxílio de uma espátula estéril e colocado em solução salina 0,9% (m/v) acrescida de 0,01% tween 80 (v/v), esterilizada. Em seguida, a mistura foi agitada vigorosamente para desagregar a massa de conídios, filtrada através de lã de vidro para remoção das hifas e centrifugada a 2000 rpm por 10

minutos, em centrífuga clínica à temperatura ambiente. O precipitado foi ressuspenso em solução salina 0,9% (m/v) esterilizada e a concentração de conídios desta solução foi estimada através da contagem em câmara de Neubauer.

5.2. Isolamento do mutante resistente ao AUN

Para o isolamento de mutantes resistentes, 5 mL de uma suspensão de conídios da linhagem MYA-3108 contendo 1×10^7 conídios/mL, foram colocados em placa de Petri esterilizada e submetidos à irradiação ultravioleta (*germicidal light* G15T8 a 16 cm de distância) durante 25 segundos, conforme procedimento estabelecido por Fachin *et al.* (1996). Decorrido o tempo de tratamento, 100 µL da solução de conídios irradiados foram inoculados com alça de Drigalski esterilizada em placas contendo 20 mL de meio ágar Sabouraud com concentrações de ácido undecanóico que inibem o crescimento da linhagem MYA-3108. As concentrações de AUN utilizadas foram 50 e 100 µg/mL de meio. A manipulação e a incubação das placas foram realizadas na ausência de luz para evitar o reparo das mutações induzidas pela luz ultravioleta.

6. Caracterização do mutante resistente ao ácido undecanóico

6.1. Resistência ao AUN

6.1.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM é definida como a menor concentração de um agente inibidor em que não se observa o crescimento macroscópico do fungo. Foram utilizados dois protocolos para determinar a CIM do ácido undecanóico para as linhagens de *T. rubrum*: ensaio em meio de cultura sólido e método de microdiluição em meio RPMI.

6.1.2. CIM em meio sólido

Este procedimento foi realizado para o isolamento do mutante de *T. rubrum* resistente ao AUN, e posteriormente para a caracterização da resistência. Para tanto, uma alíquota de 0,1 mL da solução contendo 3×10^6 conídios/mL foi utilizada como inóculo padrão em placas de Petri contendo 20 mL de meio Sabouraud acrescido de diferentes concentrações de ácido undecanóico (20, 25, 30, 35, 40, 50, 80, 100, 110, 120, 130 e 150 µg/mL de meio), em placas controle sem droga e com clorofórmio apenas. O inóculo foi

espalhado com alça de Drigalski esterilizada e as placas foram incubadas a 28° C por 7 dias. Após este período, foi observado o crescimento macroscópico do fungo. O mesmo procedimento também foi realizado para a caracterização da linhagem mutante, utilizando as seguintes concentrações de AUN: 60, 70, 90, 110, 130, 140 e 150 µg/mL de meio.

6.1.3. CIM pelo método de microdiluição

Este experimento foi feito para comparar o nível de resistência ao AUN entre as linhagens selvagem e mutante. O procedimento foi realizado conforme descrito no documento M-38A do Comitê Nacional de Padronização (NCCLS), no qual uma alíquota de 0,1 mL de uma suspensão de conídios contendo 3×10^4 conídios/mL, correspondente a uma transmitância de 70-75 % a 530 nm, foi inoculada em meio RPMI contendo as seguintes concentrações de AUN: 20, 30, 50, 70, 80, 100, 150 e 200 µg/mL para a linhagem selvagem, e de 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 e 300 µg/mL para a mutante. O teste foi realizado em triplicata, e em placa de 96 poços, que foi incubada a 28° C por 7 dias. Após este período, foi observado o crescimento do fungo através da turvação do meio de cultivo. Meios de cultivo sem inóculo, sem droga e com clorofórmio foram utilizados como controles. Como controle do inóculo, a suspensão de conídios foi diluída a uma concentração de 3×10^3 conídios/mL que foi inoculada em meio agar Sabouraud.

6.2. Teste de crescimento em diferentes fontes de carbono

Para uma padronização dos inóculos foram utilizados *plugs* de micélio das linhagens selvagem e mutante (0,5 cm de diâmetro), que foram recortados do meio agar Sabouraud após 14 dias de cultivo a 28° C. Estes *plugs* foram então colocados sobre o meio mínimo sólido contendo diferentes fontes de carbono. A tabela 3 mostra as fontes de carbono (suplementos) utilizadas e suas respectivas concentrações. Os controles continham ou não nitrato de sódio (70 mM).

Tabela 3: Fontes de carbono utilizadas para suplementar o meio mínimo.

| Suplemento | Concentração final no meio de cultivo |
|---------------------|---------------------------------------|
| Glicose | 50 mM |
| Acetato de potássio | 150 mM |
| Galactose | 1 % (m/v) |
| Lactose | 1 % (m/v) |
| Glicina | 50 mM |

6.3. Medida do halo de queratinase

Para detecção das enzimas queratinolíticas secretadas pelas duas linhagens, foi utilizado o ensaio em placa, utilizando o meio descrito no item 3.8, que utiliza queratina como substrato para tais enzimas. As linhagens foram inoculadas por *plugs* de 0,5 cm (obtidos conforme descrito no item 6.2) e, após 7 dias o halo de degradação de queratina produzido pelas linhagens foi medido, descontando-se o crescimento das linhagens. O ensaio foi realizado na ausência e na presença de nitrato de sódio (70mM). Para avaliar se o AUN exerce algum efeito na secreção destas enzimas foram utilizadas as seguintes concentrações da droga 10, 50, 100 e 150 µg/mL de meio, na presença de nitrato de sódio. Como controle foi utilizado clorofórmio, por este ser utilizado como solvente da droga. Para a quantificação da atividade enzimática, ou seja, da zona de queratinase, foi utilizado o cálculo descrito por Price *et al.* (1982). Este cálculo é feito através da razão entre o diâmetro da colônia (crescimento do fungo) e o diâmetro total (referente ao diâmetro da colônia mais o halo de degradação).

6.4. Medida do halo de protease

Para detecção das proteases secretadas pelas duas linhagens, foi utilizado o ensaio em placa, utilizando o meio descrito no item 3.6, que utiliza leite como substrato para as enzimas proteolíticas. As linhagens foram inoculadas por *plugs* de 0,5 cm e, após 4 dias o halo de protease (halo de degradação) produzido pelas linhagens foi medido, descontando-se o crescimento das linhagens. O ensaio foi realizado na ausência e na presença de AUN nas concentrações de 10, 50, 100 e 150 µg/mL de meio, e em placas controle com clorofórmio. Para a quantificação da atividade enzimática, ou seja, da zona de protease, foi utilizado o cálculo descrito por Price *et al.* (1982), descrito no item 6.3.

6.5. Medida do halo de lipase

Para detecção das lipases secretadas pelas duas linhagens, foi utilizado o ensaio em placa utilizando o meio descrito no item 3.7, que utiliza tween 20 como substrato para as enzimas lipolíticas. As linhagens foram inoculadas por *plugs* de 0,5 cm e após 6 dias o halo de lipase (precipitação) produzido pelas linhagens foi medido, descontando-se o crescimento das linhagens. O ensaio foi realizado na ausência e na presença de AUN nas concentrações de 10, 50, 100 e 150 µg/mL de meio, e em placas controle com clorofórmio. O cálculo da zona de lipase, ou seja, a quantificação da atividade enzimática foi feito conforme descrito no item 6.3.

6.6. Detecção das enzimas extracelulares pelo sistema *Api-zym*

Para detecção das enzimas secretadas pelas linhagens sensível e resistente ao ácido undecanóico, foi utilizado o método semiquantitativo *Api-zym*^c (*Api system*, Biomérieux[®]). Para tanto, a superfície micelial de ½ placa de cultivo de cada linhagem, cultivadas por 14 dias a 28° C, foi raspada com espátula esterilizada e inoculada em 25 mL de meio mínimo pH 5,0 (tamponado com citrato de sódio 50 mM) e pH 8,0 (tamponado com Tris-HCl 50 mM), suplementado com glicose 55 mM, nitrato de sódio 70 mM e glicina 50 mM. Após 72 horas de cultivo a 28° C, sob agitação a 200 rpm, os meios foram filtrados e concentrados cerca de 10 vezes em sistema de ultrafiltração *Amycon* (*YM 10*). As amostras foram quantificadas, através do método de Lowry modificado por E. F. Hartree (1964) (descrito no item 6.5.1), e 36 mg de proteína total foram utilizados em cada reação enzimática do sistema *Api-zym*^c, segundo especificações do fabricante. Este sistema detecta a atividade de 19 enzimas, como mostra a tabela 4.

Tabela 4: Enzimas, substratos, pH de atividade ótima e resultado padrão do *Api-zym*^R.

| Nº | Enzimas | Substrato | pH | Resultados | |
|----|--|---|-----|----------------------------------|-------------|
| | | | | Positivo | Negativo |
| 1 | Controle | | | Ausência de cor ou amarelo claro | |
| 2 | Fosfatase alcalina | 2-naftil fosfato | 8.5 | Violeta | Ausência de |
| 3 | Esterase (C ₄) | 2-naftil butirato | 6.5 | Violeta | cor ou |
| 4 | Esterase lipase (C ₈) | 2-naftil caprilato | 7.5 | Violeta | amarelo |
| 5 | Lipase (C ₁₄) | 2-naftil miristato | 7.5 | Violeta | claro |
| 6 | Leucina arilamidase | L-leucil-2-naftilamida | 7.5 | Laranja | |
| 7 | Valina arilamidase | L-valil-2-naftilamida | 7.5 | Laranja | |
| 8 | Cisteína arilamidase | L-cistil-2-naftilamida | 7.5 | Laranja | |
| 9 | Tripsina | N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida | 8.5 | Laranja | |
| 10 | Quimiotripsina | N-glutarilfenilalanina-2-naftilamida | 7.5 | Laranja | |
| 11 | Fosfatase ácida | 2-naftil-fosfato | 5.4 | Violeta | |
| 12 | Naftol-AS-BI-fosfohidrolase | Naftol-AS-BI-fosfato | | Azul | |
| 13 | α -galactosidase | 6-Br-2-naftil- α D-galactopiranosideo | 5.4 | Violeta | |
| 14 | β -galactosidase | 2-naftil- β D-galactopiranosideo | 5.4 | Violeta | |
| 15 | β -glucuronidase | Naftol-AS-BI- β D-glucuronideo | 5.4 | Azul | |
| 16 | α -glucosidase | 2-naftil- α D-glucopiranosideo | 5.4 | Violeta | |
| 17 | β -glucosidase | 6-Br-2-naftil- β D-glucopiranosideo | 5.4 | Violeta | |
| 18 | <i>N</i> -acetil- β -glucosaminidase | 1-naftil- <i>N</i> -acetil- β D-glucosamina | 5.4 | Marrom | |
| 19 | α -manosidase | 6-Br-2-naftil- α D-manopiranosideo | 5.4 | Violeta | |
| 20 | α -fucosidase | 2-naftil- α L-fucopiranosideo | 5.4 | Violeta | |

6.6.1. Dosagem de proteínas extracelulares (Lowry modificado por Hartree, 1972)

O meio de cultura concentrado foi diluído 1:10 em água destilada e 1 mL deste foi adicionado a 0,9 mL de solução A, previamente aquecida a 50° C. A reação foi incubada

nesta temperatura por 10 minutos e a seguir mantida à temperatura ambiente por 5 minutos. Após este período, 100 µL de solução B foram adicionados e a reação permaneceu à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 3 mL de solução C e incubou-se a 50° C por 10 minutos e depois à temperatura ambiente por 5 minutos. A leitura foi realizada a 650 nm. O teste foi realizado em duplicata.

6.7. Teste de patogenicidade *in vitro*

O teste de infecção *in vitro* foi realizado conforme descrito por Takasuka (2000). Este ensaio verifica a capacidade dos conídios germinarem em fragmentos de unha humana, e foi realizado para as duas linhagens em estudo. Um fragmento de unha humana, previamente mantido em etanol por 5 minutos à temperatura ambiente, foi colocado em microtubo de 1,5 mL e, em seguida, 5 µL de uma suspensão de conídios contendo 1×10^7 conídios/mL (preparada conforme o item 5.1) foram inoculados sobre a unha. Após 1 hora à temperatura ambiente, foram adicionados 200 µL de água destilada esterilizada e os tubos foram mantidos a 28° C por 6 dias. Após esse período, o material foi analisado sob microscópio óptico e fotografado utilizando o sistema *Axiophot Zeiss* de epifluorescência equipado com o sistema de imagem digital (câmera *Axiovision Zeiss*). Os controles consistiram de unha sem inoculação de conídios e de conídios em água, na ausência do fragmento de unha.

7. Expressão diferencial de genes por DDRT-PCR

7.1. Condições de cultivo

O micélio de duas placas de Petri contendo as linhagens de *T. rubrum* sensível e resistente ao AUN, cultivadas por 14 dias a 28° C em ágar Sabouraud, foi removido com o auxílio de uma espátula esterilizada e inoculado em meio Sabouraud, separadamente. Estas linhagens foram incubadas a 28° C, em agitador a 200 rpm, por 72 horas. A seguir, as linhagens foram filtradas em funil de Büchner e inoculadas em meio mínimo, na ausência e na presença de AUN na concentração de 50 µg/mL de meio, e incubadas a 28° C por 15 minutos. As linhagens foram novamente filtradas, os micélios congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80° C para subsequente extração de RNA.

7.2. Extração de RNA total

Para obtenção do RNA total, utilizou-se o Kit *RNAagents*[®] *Total RNA Isolation System* (Promega). 500 mg do micélio congelado foram macerados em almofariz de porcelana e pistilo esterilizados, com o auxílio de nitrogênio líquido. Após maceração completa, as amostras foram transferidas para tubos de 15 mL, ressuspensas com 6 mL de tampão desnaturante e 0,6 mL de acetato de sódio 3 M pH 4,0 e incubadas em gelo por 5 minutos. Foram adicionados 6 mL de uma mistura de fenol (pH 5,0):clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e os tubos vigorosamente agitados e incubados por 15 minutos em gelo. Esta mistura foi centrifugada a 12000 x g por 20 minutos a 4° C. A fase aquosa foi transferida para um tubo limpo e o RNA precipitado com mesmo volume de isopropanol. A mistura foi incubada a -20° C por 30 minutos e centrifugada a 12000 x g por 20 minutos a 4° C. O precipitado foi lavado com 5 mL de etanol 75% (v/v), centrifugado a 12000 x g por 10 minutos a 4° C e seco. O RNA foi dissolvido em 200 µL de água livre de RNase e incubado por 5 minutos a 65° C. A concentração do RNA foi determinada por absorvância a 260 nm e a integridade do mesmo foi testada em gel de agarose 1,5% (m/v) em condição desnaturante. O RNA foi estocado a -80° C.

7.3. *Differential Display - Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction - DDRT-PCR (Liang e Pardee, 1992)*

Foram realizadas reações de amplificação a partir de RNA total e de oligonucleotídeos ancoradores [oligo d(T)] e aleatórios. A tabela 5 mostra as combinações de oligonucleotídeos utilizadas nos experimentos de DDRT-PCR. Na primeira reação foi feita uma transcrição reversa (RT-PCR) a partir de um oligo d(T), utilizando-se 2 µg de RNA total desnaturado a 65° C por 5 minutos, 500 µM de dNTP, 10 pmol de oligo d(T), 1X tampão para transcrição reversa, 400 U de transcriptase reversa (M-MLV – *Murine Moloney Leukemia Virus*) e o volume final completado com água livre de RNase para 50 µL. Esta reação foi incubada no programa descrito na tabela 6. O cDNA resultante foi amplificado numa reação de PCR utilizando dois oligonucleotídeos arbitrários, escolhidos ao acaso. O volume final da reação foi de 50 µL, contendo 20 µL de cDNA (proveniente da reação de RT-PCR), 10 pmol de cada oligonucleotídeo, 500 µM de dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 1X tampão para PCR. As reações foram incubadas a 94° C por 2 minutos, em seguida foi adicionada 1U de *Taq* DNA polimerase (*hot start*) e as amostras amplificadas segundo o programa descrito na tabela 7. As reações foram estocadas a -20° C. Para a

visualização das bandas diferencialmente expressas, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 8% (m/v) (item 4.10.2), e após a corrida o gel foi corado com brometo de etídeo. As bandas de interesse foram recortadas do gel, eluídas em água deionizada esterilizada, concentradas e clonadas no vetor *pGEM-T* (Promega) (anexo I).

Tabela 5: Oligonucleotídeos utilizados nos seis experimentos de DDRT-PCR*

| Experimento | Oligonucleotídeos utilizados |
|-------------|---|
| 1 | RT-PCR: LT11C / PCR: Eca1 e Es5 |
| 2 | RT-PCR: LT11C / PCR: Ea9 e Es5 |
| 3 | RT-PCR: HT 11C / PCR: Ea1 e Es7 |
| 4 | RT-PCR: HT11C / PCR: Ea9 e Es2 |
| 5 | RT-PCR: HT11C / PCR: Es7 e Es2 |
| 6 | RT-PCR: HT11C / PCR: Es5 e Ea4 |

*RT-PCR: transcrição reversa dos mRNAs; PCR: amplificação dos cDNAs.

Tabela 6: Programa utilizado para a transcrição reversa (RT-PCR)

| Temperatura | Tempo |
|-------------|------------|
| 22° C | 10 minutos |
| 37° C | 50 minutos |
| 70° C | 15 minutos |

Tabela 7: Programa utilizado para a amplificação dos cDNAs

| Temperatura | Tempo | |
|-------------|------------|-------------|
| 94° C | 1 minuto | } 40 ciclos |
| 60° C | 4 minutos | |
| 72° C | 1 minuto | |
| 72° C | 10 minutos | |

8. Transformação por choque térmico (*heat shock*)

Os plasmídios recombinantes (fragmentos de DNA recortados do gel de DDRT-PCR e ligados no vetor de clonagem *pGEM-T*) foram utilizados para transformar a cepa *pMOS Blue* de *E. coli*.

8.1. Preparo das células competentes

A cepa de *E. coli* pMOS *Blue* foi inoculada em 5 mL de meio LB contendo 15 µg/mL de tetraciclina, a partir de uma célula isolada que foi previamente estriada do estoque, e cultivada por 12-24 horas a 37° C. A seguir, 3 mL desta cultura foram inoculados em 250 mL de meio LB com tetraciclina e, então, incubado a 37° C por aproximadamente 2 horas e 30 minutos, ou até que uma absorvância de 0.4-0.5 a 550 nm, fosse atingida. A cultura foi colocada em gelo por 15 minutos e a seguir centrifugada a 5000 x g por 10 minutos a 4° C. As células foram ressuspensas em 125 mL de tampão I, incubadas em gelo por 15 minutos e centrifugadas a 5000 x g por 10 minutos a 4° C. O precipitado foi ressuspensado em 3,5 mL de tampão II, as células foram aliqüotadas em volumes de 200 µL, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80° C.

8.2. Choque térmico (*heat shock*)

Uma aliqüota de 200 µL de células competentes foi descongelada, recebeu a adição de 50 a 100 ng de plasmídio recombinante e incubada em gelo por 30 minutos. Em seguida, as células receberam o choque térmico a 42° C por 40 segundos, sendo imediatamente incubadas em gelo por 2 minutos. Um mL de meio SOC (sem antibiótico) foi adicionado às células transformadas, e estas incubadas a 37° C por 1 hora. Aliqüotas da transformação foram inoculadas e espalhadas com alça de Drigalski esterilizada em placas de Petri contendo meio ágar LB acrescido de 50 µg/mL de ampicilina, 15 µg/mL de tetraciclina, IPTG e X-gal (40 µL da solução estoque). A seguir, as placas foram incubadas por 18 horas a 37° C.

9. Extração de DNA plasmidial

Foram utilizados três protocolos diferentes para a extração do DNA plasmidial, baseado na quantidade de DNA desejada e no número de amostras a serem extraídas.

9.1. Miniprep

Uma colônia bacteriana transformada foi inoculada em 5 mL de meio LB contendo ampicilina (50 µg/mL) e tetraciclina (15 mg/mL) e cultivada a 37° C por 18 horas, sob agitação a 200 rpm. A cultura foi transferida para um microtubo de 1,5 mL e centrifugada a 12000 x g por 1 minuto a 4° C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado bacteriano

ressuspendido em 100 μL de solução I gelada. A seguir, foram adicionados 200 μL de solução II e misturou-se por inversão, mantendo-se em gelo por 5 minutos. Foram, então, adicionados 150 μL de solução III gelada e os tubos novamente mantidos em gelo por 5 minutos. A solução foi centrifugada a 12000 x g por 5 minutos a 4° C e o sobrenadante transferido para um tubo limpo. A seguir, foram adicionados 20 μL de RNase (10 mg/mL) e as amostras mantidas a 37° C por 30 minutos. Decorrido este período, um volume de uma mistura de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) foi adicionado e as amostras novamente submetidas a centrifugação a 12000 x g por 5 minutos para separar as fases. A fase superior foi transferida para um tubo limpo e a esta, adicionados 2 volumes de etanol 95% (v/v) e 0,1 volume de acetato de sódio 3 M. A mistura foi mantida a -20° C por 20 minutos e centrifugada a 12000 x g por 30 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente desprezado e o precipitado lavado com etanol 70% (v/v) e novamente centrifugado a 12000 x g por 5 minutos. O DNA plasmidial foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 50 μL de tampão TE pH 8,0.

9.2. *Maxiprep*

Quando uma grande quantidade de DNA plasmidial era necessária, foi utilizado o *Kit* QUIAGEN Inc. Neste procedimento, todas as especificações descritas pelo fabricante foram seguidas.

9.3. **Extração de DNA plasmidial em microplaca**

Este protocolo foi utilizado para extração de DNA plasmidial em larga escala. Os clones bacterianos, contendo os plasmídios de interesse, foram inoculados em 1mL de meio LB contendo ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e tetraciclina (15 mg/mL), em microplaca *deep well* contendo 96 poços. As bactérias foram cultivadas a 37° C por 22 horas sob vigorosa agitação (300 rpm). Após o crescimento, a microplaca foi centrifugada a 4000 x g por 6 minutos. O sobrenadante foi descartado e 240 μL de solução I adicionados a cada poço. A microplaca foi submetida à agitação em vortex por 5 minutos e novamente centrifugada a 4000 x g por 6 minutos. O sobrenadante foi descartado e 85 μL de uma mistura contendo solução I e RNase (17,6 mL de solução I e 1,1 mL de RNase a 10 mg/mL) adicionados a cada poço. Após 10 minutos de agitação no vortex, as suspensões foram transferidas para uma placa tipo ELISA e 60 μL de solução II adicionados à cada poço. A seguir, a placa foi homogeneizada por inversão e mantida à temperatura ambiente por 10 minutos. Após este

período, 60 μL de acetato de potássio 3 M foram adicionados em cada poço e a placa novamente homogeneizada por inversão e mantida à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, a placa foi incubada a 90° C por 30 minutos e resfriada em gelo por 5 minutos. As amostras foram transferidas para uma placa Millipore acoplada a uma placa tipo ELISA e este sistema foi centrifugado por 6 minutos a 4000 x g. O sistema foi desmontado e o DNA plasmidial precipitado, adicionando-se 110 μL de isopropanol ao filtrado. A placa foi centrifugada por 45 minutos a 5000 x g, o precipitado foi lavado com etanol 70% e centrifugado por 10 minutos a 5000 x g. O DNA plasmidial foi seco a 65° C e ressuspendido em 25 μL de TE pH 8,0.

10. Seqüenciamento

O seqüenciamento automático foi realizado no aparelho *ABI Prism 377* (Perkin Elmer) e as reações foram realizadas com o Kit *Big Dye Terminator Cycle Sequence Ready Reaction*, seguindo os protocolos recomendados pelo fabricante. Foram utilizados na reação de seqüenciamento, de 200 a 400 ng de DNA plasmidial, 3,2 pmol de oligonucleotídeo universal M13 *forward* ou *reverse* e 2 μL de *Big Dye*. As reações foram incubadas no programa de PCR descrito na tabela 8. Após a ciclagem, as amostras foram purificadas com 80 μL de isopropanol 75% (v/v), incubadas por 15 minutos no escuro à temperatura ambiente e centrifugadas por 45 minutos a 5000 x g a 4° C. O sobrenadante foi descartado, seguindo-se duas lavagens com etanol 70% (v/v) gelado, centrifugando por 10 minutos a 5000 x g a 4° C. Depois de secas, as amostras foram ressuspendidas em 2,5 μL de *Loading Color*, aplicando-se 0,7 μL em gel de poliacrilamida no seqüenciador *ABI Prism 377*.

Tabela 8: Programa de PCR utilizado para as reações de seqüenciamento

| Temperatura | Tempo | |
|-------------|-------------|-------------|
| 96° C | 2 minutos | } 39 ciclos |
| 96° C | 20 segundos | |
| 52° C | 30 segundos | |
| 60° C | 4 minutos | |

11. Análises de bioinformática

A análise da qualidade das seqüências nucleotídicas e a retirada das regiões de vetor foram realizadas através do *software phredPhrap* (Ewing *et al.*, 1998; Ewing e Green, 1998). Para buscar similaridades com seqüências depositadas no Genbank, foi utilizado o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>; Altschul *et al.*, 1997). A análise da presença de possíveis domínios funcionais foi realizada no banco de dados InterPro - <http://www.ebi.ac.uk/InterProScan> (Mulder *et al.*, 2003).

12. Reverse Northern Blotting por marcação a frio

Para comprovar a expressão diferencial, foi utilizada a técnica de *Reverse northern blotting* (Dilks *et al.*, 2003).

12.1. PCR da cultura bacteriana

As colônias bacterianas contendo os insertos provenientes do DDRT-PCR foram cultivadas em meio LB acrescido de ampicilina (50 µg/mL) e tetraciclina (15 µg/mL), em placa *deep well*, a 37° C por 22 horas sob vigorosa agitação (300 rpm). A seguir 2 µL da cultura foram utilizados em uma reação de amplificação contendo 1X tampão da *Taq* DNA polimerase, 10 pmol de cada oligonucleotídeo universal M13 (*forward* e *reverse*), 250 µM dNTP, 1,5 mM de cloreto de magnésio e 2 U de *Taq* DNA polimerase. A reação foi submetida ao ciclo descrito na tabela 9.

Tabela 9: Programa de PCR utilizado na amplificação dos insertos dos clones de DDRT-PCR

| Temperatura | Tempo | |
|-------------|-------------|-------------|
| 96° C | 2 minutos | |
| 96° C | 30 segundos | } 35 ciclos |
| 53° C | 30 segundos | |
| 60° C | 3 minutos | |

12.2. Preparo das membranas

Os produtos de PCR (300 ng) obtidos foram colocados sobre membrana de nylon Hybond N⁺ após terem sido desnaturados a 95° C por 5 minutos. As membranas foram

colocadas sobre papel de filtro contendo as seguintes soluções: desnaturante, neutralizante e SSC 2X, deixando-as em contato com cada solução, por 2 minutos. Depois de secas, as membranas foram expostas à luz ultravioleta por 2 minutos de cada lado, para a fixação do DNA.

12.3. Preparo das sondas

As sondas foram obtidas através da transcrição reversa dos RNAs totais utilizando-se oligonucleotídeo oligo d(T). Na reação foram utilizados 2 µg de RNA total desnaturado a 65° C por 5 minutos, 500 µM de dNTP, 10 pmol de cada oligonucleotídeo oligo d(T), 1X tampão para transcrição reversa, 400 U de transcriptase reversa (M-MLV – *Murine Moloney Leukemia Virus*) e o volume final completado com água livre de RNase para 50 µL. A reação foi submetida ao programa descrito na tabela 6. A seguir, 50 ng de cDNA foi utilizado para a marcação das sondas com fluoresceína (*fluorescein-11-dUTP*), utilizando o kit *Genes Images Random Prime Labelling Module* (Amersham Bioscience), seguindo as especificações do fabricante.

12.4. Pré-hibridação e hibridação

As membranas contendo as amostras foram pré-hibridadas em solução de hibridação para marcação a frio por 1 hora a 60° C. A seguir, a sonda marcada foi adicionada a esta solução e as membranas foram hibridadas a 60° C por 16 horas. Após este período, seguiram-se duas lavagens de estringência a 60° C, a primeira com uma solução de SSC 1X e SDS 0,1% (m/v) e a segunda com uma solução de SSC 0,5X e SDS 0,1% (m/v). A seguir, incubou-se a membrana com uma solução de líquido bloqueador e tampão A (1:10) durante 1 hora à temperatura ambiente. Para revelar a marcação, foi usado o Kit *Gene Image CDP-Star Detection Module* (Amersham Bioscience), utilizando um anticorpo anti-fluoresceína conjugado com fosfatase alcalina (*anti-fluorescein alkaline phosphatase (AP) conjugate*) diluído em albumina bovina sérica 0,5% (m/v), preparada com tampão A. A membrana foi incubada com o anticorpo por 1 hora à temperatura ambiente seguindo-se três lavagens com uma solução de tween 20 0,3% (v/v) preparada com buffer A, para remover o excesso de conjugado. O reagente de detecção foi colocado sobre a membrana e esta foi exposta em filme autoradiográfico por cerca de 18 horas.

IV. Resultados

1. Obtenção de uma linhagem de *T. rubrum* resistente ao ácido undecanóico (AUN) e determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

O isolamento de uma linhagem de *T. rubrum* resistente ao AUN foi realizado através da irradiação dos conídios da linhagem selvagem MYA-3108 com luz ultravioleta. Decorridos sete dias da irradiação, três colônias foram isoladas do meio de cultivo contendo 100 µg/mL de AUN. Estas colônias foram repicadas em meio ágar Sabouraud contendo AUN (100 µg/mL), e após 5 dias de cultivo a 28° C apenas uma colônia mostrou-se realmente resistente à droga. Esta colônia foi denominada UDA^r. A figura 3 mostra a resistência ao AUN da linhagem mutante e a sensibilidade da linhagem selvagem, quando cultivadas em meio ágar Sabouraud contendo AUN na concentração de 80 µg/mL de meio.

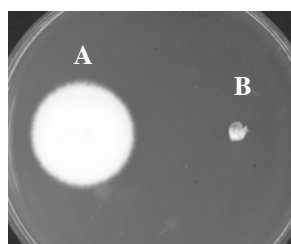


Figura 3: Crescimento da linhagem mutante UDA^r obtida por irradiação com luz ultravioleta (A) e ausência do crescimento da linhagem selvagem MYA-3108 (B) de *T. rubrum*, cultivadas em meio ágar Sabouraud por 7 dias a 28° C na presença de AUN (80 µg/mL).

Para comparar o grau de resistência entre as linhagens mutante (UDA^r) e selvagem (MYA-3108), foram realizados ensaios para determinar a CIM do AUN. A tabela 10 apresenta os valores da CIM, obtidos para as duas linhagens através dos métodos de determinação em meio ágar Sabouraud (sólido) e por microdiluição em meio RPMI, mostrando que a linhagem UDA^r é três a quatro vezes mais resistente ao AUN que a linhagem MYA-3108.

Tabela 10: CIM do AUN para as linhagens selvagem e mutante de *T. rubrum*.

| Linhagem | CIM em meio sólido ^(*) | CIM por microdiluição ^(**) |
|------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|
| MYA-3108 | 30 µg/mL | 50 µg/mL |
| UDA ^r | 110 µg/mL | 200 µg/mL |

^(*) Meio ágar Sabouraud; ^(**) Meio RPMI-1640.

2. Análise morfológica da linhagem mutante.

Para avaliar se a mutação causou alguma alteração na morfologia macro e microscópica deste dermatófito, as linhagens de *T. rubrum* foram cultivadas em meio ágar Sabouraud, em placas de Petri para avaliação macroscópica e em lâminas de microscopia para visualização das hifas e conídios (microscopia). Nenhuma alteração morfológica ocasionada pela mutação pôde ser detectada através dos métodos utilizados (Figura 4). Entretanto, através da figura 4-I nota-se que a linhagem mutante cresce mais lentamente que a selvagem.

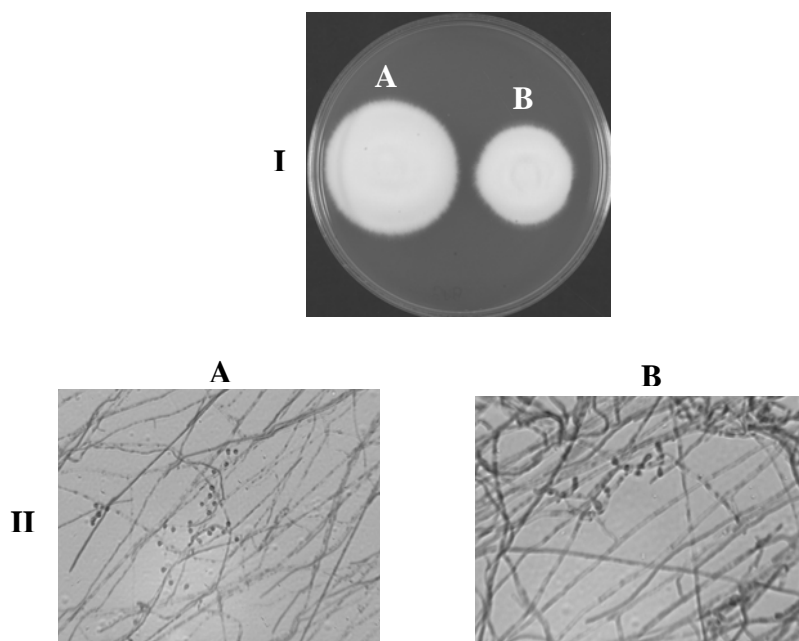


Figura 4: Análise morfológica macro (I) e microscópica (II) das linhagens MYA-3108 (A) e UDA^r (B), cultivadas em meio Sabouraud por 7 dias a 28° C. As imagens foram obtidas em microscópio óptico em um aumento de 400 x.

3. Análise do crescimento das linhagens em meio mínimo e Sabouraud em diferentes valores de pH.

Devido à diferença na velocidade de crescimento entre as linhagens de *T. rubrum* aqui estudadas, foi avaliada a capacidade destas linhagens em crescer nos meios mínimo e Sabouraud em diferentes valores de pH, visto que a composição e o pH do meio de cultivo interferem no crescimento dos microrganismos. A análise do crescimento em meio mínimo (Figura 5) mostra que a linhagem mutante mantém um crescimento reduzido em relação à selvagem. Entretanto, em pH 5,0 tamponado elas apresentam crescimento semelhante, e em pH 8,0 tamponado não crescem. Os valores representam a média dos experimentos, que foram realizados em triplicata.

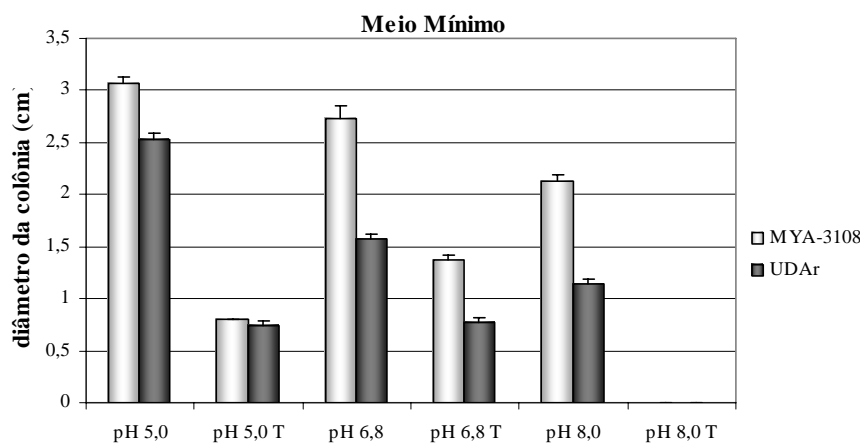


Figura 5: Gráfico representando o crescimento das linhagens MYA-3108 e UDA^r em meio mínimo (suplementado com 50 mM glicose e 70 mM nitrato de sódio) pH5,0, 6,8 e 8,0, tamponados ou não. A leitura foi realizada após 7 dias de cultivo a 28° C.

Em meio rico como o Sabouraud as linhagens crescem melhor, permanecendo, porém, a diferença entre a selvagem e a mutante (Figura 6). Os experimentos foram realizados em triplicata. Os valores representam a média dos experimentos, que foram realizados em triplicata.

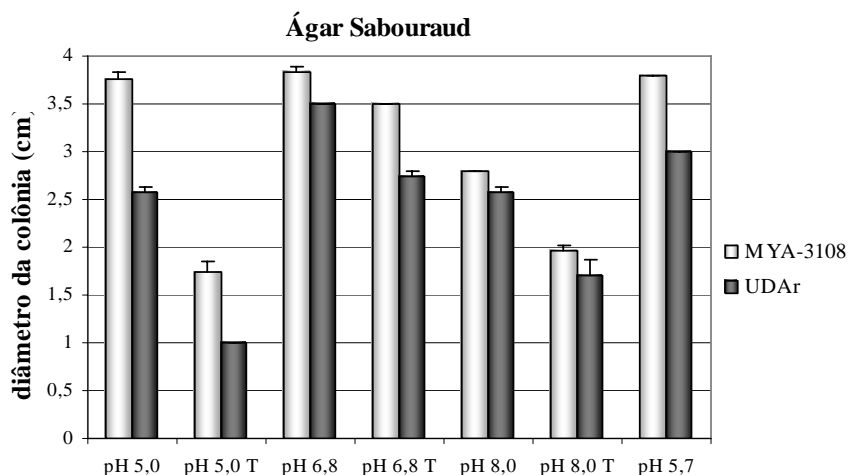


Figura 6: Gráfico representando o crescimento das linhagens MYA–3108 e UDA^r em meio ágar Sabouraud pH 5,0, pH 6,8 e pH 8,0, tamponados ou não, e em pH 5,7 (controle). A leitura foi realizada após 7 dias de cultivo a 28° C.

Após os 7 dias de cultivo das linhagens MYA–3108 e UDA^r nos meios mínimo e Sabouraud em diferentes valores de pH (acima), o pH final dos meios foi medido (nas regiões de crescimento das colônias). A tabela 11 mostra os valores de pH obtidos mostrando que quando as linhagens foram cultivadas nos meios pH 5,0, a linhagem selvagem alterou o pH do meio para 6,5 e a linhagem mutante para 6,0. Quando o pH inicial do meio era 6,8 ou 8,0 as linhagens selvagem e mutante alteraram o pH para 7,5 e 7,0, respectivamente.

Tabela 11: Valores de pH inicial e final dos meios de cultivo (Sabouraud e mínimo).

| MYA-3108 | | UDA ^r | |
|------------|----------|------------------|----------|
| pH inicial | pH final | pH inicial | pH final |
| 5,0 | 6,5 | 5,0 | 6,0 |
| 6,8 | 7,5 | 6,8 | 7,0 |
| 8,0 | 7,5 | 8,0 | 7,0 |

Entretanto, quando as linhagens foram cultivadas em meio mínimo pH 5,0 acrescido de glicina, pelo mesmo período e temperatura de incubação, não foi observada a diferença no crescimento das linhagens, ou seja, os diâmetros das colônias destas linhagens apresentavam a mesma medida e o pH final do meio era igual para as duas (pH final 8,0).

4. Análise do crescimento das linhagens em diferentes fontes de carbono.

As linhagens também foram comparadas quanto à capacidade de crescer em meios de cultivo contendo diferentes fontes de carbono (Tabela 3), para avaliar se a mutação interferiu em tal processo. Os resultados destes experimentos são demonstrados na figura 7, através da qual se pode observar que *T. rubrum* não foi capaz de utilizar acetato de potássio como fonte de carbono em nenhuma das situações analisadas. Na presença de lactose, as linhagens foram capazes de crescer quando foi acrescentada glicina ao meio de cultivo. Quanto à glicose e à galactose, as linhagens crescem, porém não formam uma colônia compacta, como acontece no crescimento em meios ricos (Sabouraud, por exemplo), sendo que na presença de galactose as colônias se mostraram ainda mais escassas (espalhadas no meio). Quando na presença de glicina, as linhagens crescem apresentando uma colônia compacta e a diferença no tamanho da colônia entre as duas linhagens não é observada em nenhuma das fontes testadas, contrastando com os crescimentos nos meios que não continham tal aminoácido.

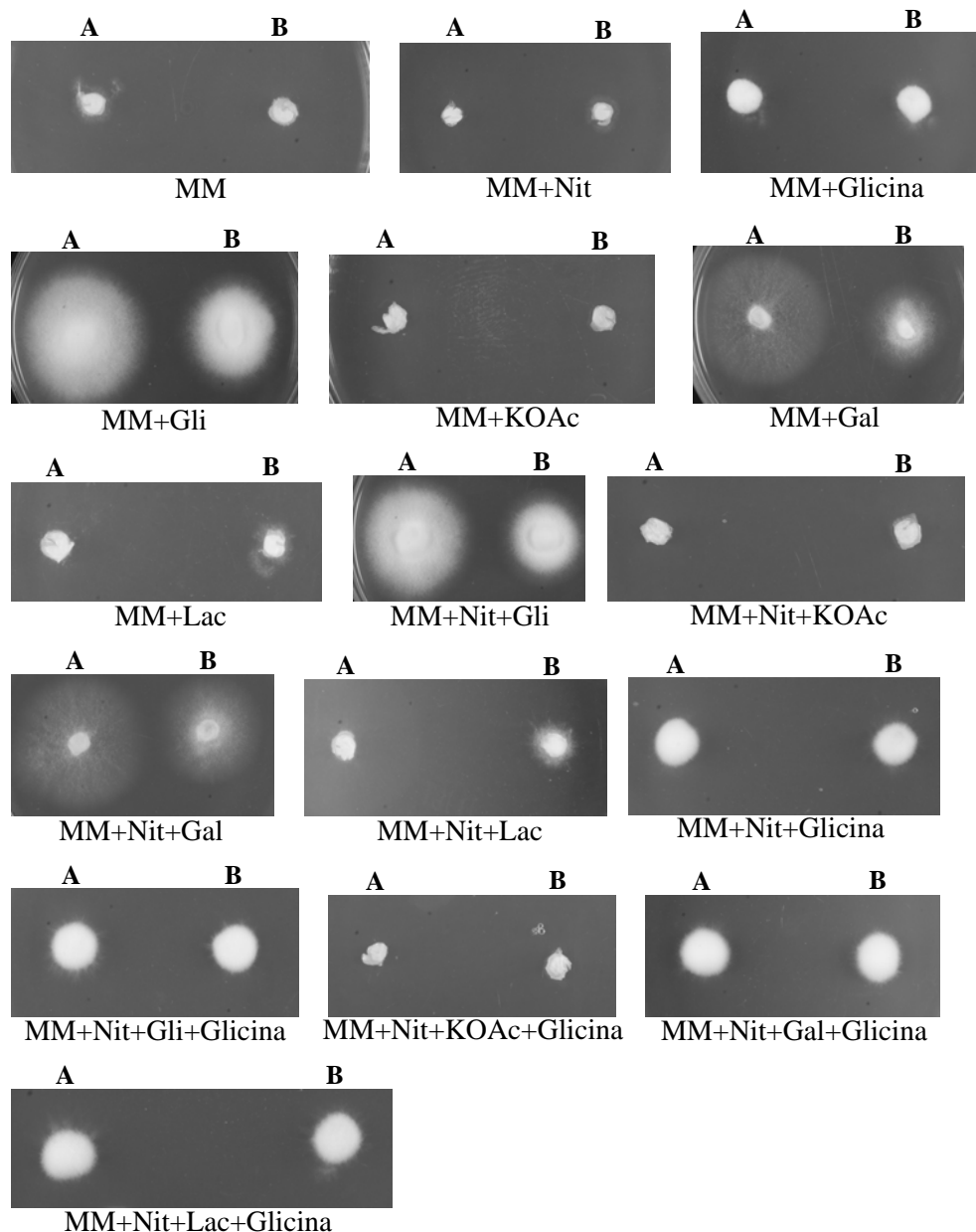


Figura 7: Crescimento das linhagens MYA-3108 (A) e UDA^T (B) em meio mínimo suplementado com diferentes fontes de carbono, por 7 dias a 28° C. MM: meio mínimo (sem fonte de carbono e nitrogênio); Nit: Nitrato de sódio; Gli: Glicose; KOAc: Acetato de potássio; Gal: Galactose; Lac: Lactose.

5. Análise do crescimento em meio de queratina.

Como dermatófitos são fungos capazes de utilizar queratina como fonte de carbono, essa capacidade foi avaliada no mutante UDA^T. As linhagens foram cultivadas por 7 dias a 28° C em meio mínimo contendo apenas queratina, e em meio mínimo contendo queratina e nitrato de sódio (70 mM). As figuras 8 e 9-B mostram o crescimento das linhagens nestes meios e a degradação de queratina. Observa-se no gráfico da figura 9-

B que a degradação de queratina foi maior em meio suplementado com nitrato de sódio e que a linhagem resistente, apesar de crescer mais lentamente (Figura 9-A), suas enzimas queratinolíticas são capazes de degradar, proporcionalmente, uma maior quantidade de queratina presente no meio (figura 9-B).

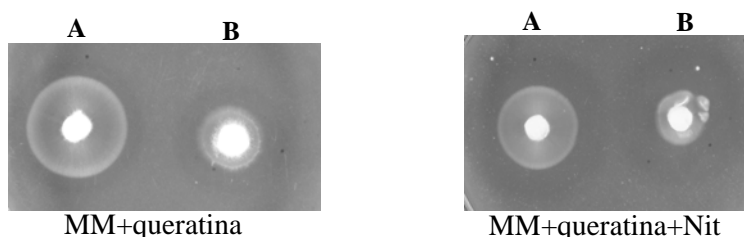


Figura 8: Crescimento das linhagens de *T. rubrum* MYA-3108 (A) e UDA^r (B) em meio de queratina, suplementado ou não com nitrato de sódio (70 mM), por 7 dias a 28° C. MM: meio mínimo, Nit: nitrato de sódio.

Para obtenção de um valor numérico para representar a degradação da queratina, o valor do diâmetro da colônia (crescimento do fungo no meio de cultivo) foi subtraído do valor do diâmetro total, referente ao halo de degradação mais o crescimento do fungo. Os valores obtidos foram colocados no gráfico 9-B como halo de degradação de queratina, e representam a média do experimento realizado em triplicata. A figura 9-A representa o diâmetro das colônias (em centímetros) nos mesmos meios de cultivo. Diferentes concentrações de AUN foram adicionadas ao meio de queratina contendo nitrato de sódio, para avaliar se esta droga interfere no crescimento e na degradação de queratina das linhagens em estudo. O clorofórmio foi utilizado por ser o solvente da droga. As linhagens foram capazes de crescer e de degradar a queratina na presença de todas as concentrações de AUN analisadas, sendo que o mutante continua degradando mais queratina que o selvagem, em relação ao seu crescimento (Figura 9).

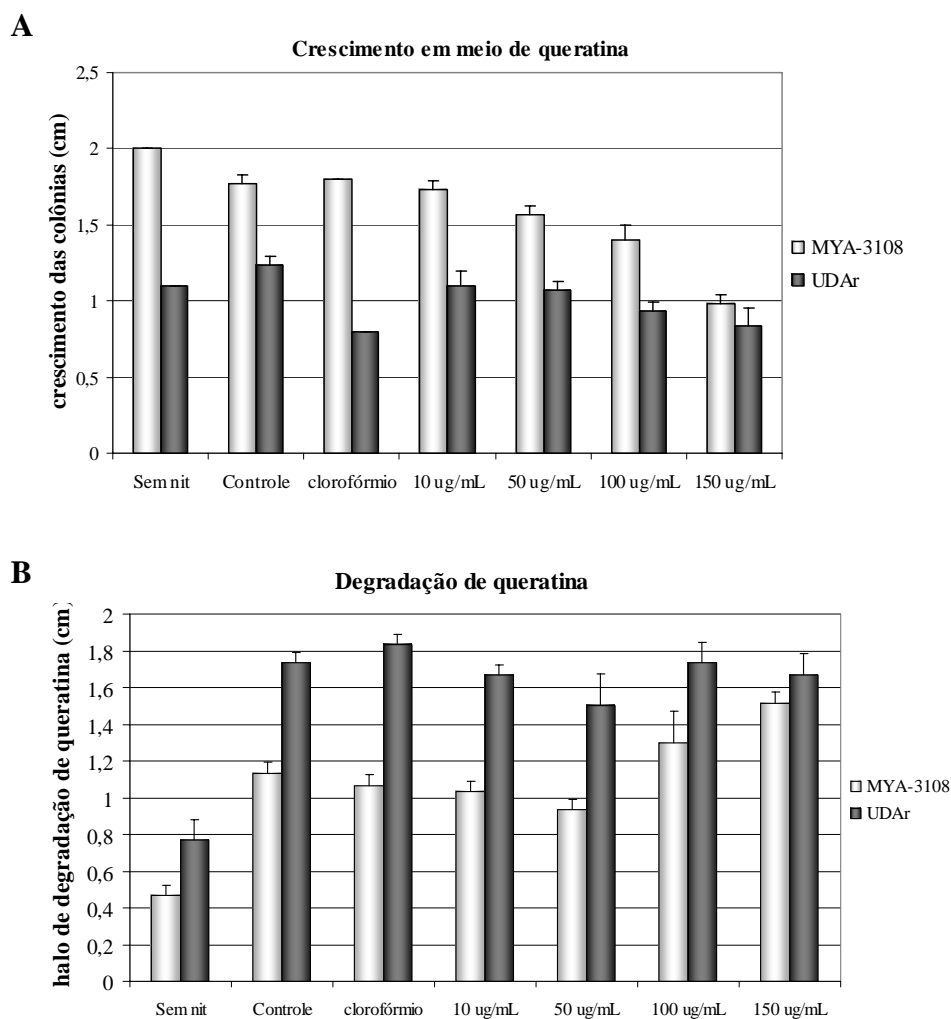


Figura 9: Gráfico comparando o crescimento (A) e a degradação de queratina (B) entre as linhagens de *T. rubrum* MYA-3108 e UDAr^r em meio mínimo (sem fonte de carbono e nitrogênio) contendo queratina, em relação à presença de diferentes concentrações de AUN. Nit: Nitrato de sódio.

A quantificação da atividade das enzimas queratinolíticas, ou seja, a zona de queratinase dos experimentos acima foi calculada através da razão entre o diâmetro da colônia (crescimento do fungo) e o diâmetro total (crescimento mais o halo de degradação). A tabela 12 mostra estes valores, revelando que as enzimas secretadas pela linhagem mutante apresentam uma maior atividade queratinolítica em relação às secretadas pela selvagem. Além disso, nota-se que tais enzimas estão mais ativas na presença de nitrato de sódio.

Tabela 12: Quantificação da atividade das enzimas queratinolíticas (zona de queratinase*) secretadas pelas linhagens selvagem e mutante, na presença e na ausência de AUN.

| Linhagem | Sem nitrato | Controle | Clorofórmio | 10 $\mu\text{g/mL}$ | 50 $\mu\text{g/mL}$ | 100 $\mu\text{g/mL}$ | 150 $\mu\text{g/mL}$ |
|------------------|-------------|----------|-------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| MYA-3108 | 0,81 | 0,60 | 0,63 | 0,63 | 0,63 | 0,56 | 0,37 |
| UDA ^r | 0,59 | 0,41 | 0,30 | 0,40 | 0,42 | 0,35 | 0,33 |

(*) Zona de queratinase = 1: ausência de atividade enzimática; 0: maior atividade enzimática.

6. Análise das enzimas secretadas pelas linhagens de *T. rubrum*.

Para avaliar se a resistência ao AUN afeta a secreção de enzimas extracelulares, um importante fator de virulência para dermatófitos, as linhagens foram submetidas a um teste semi-quantitativo para traçar um perfil de secreção enzimática, e a ensaios para detectar a secreção de proteases e lipases. Nestas análises, as linhagens foram cultivadas em meios específicos e em diferentes valores de pH, exceto para lipases, devido ao envolvimento do pH na sinalização de genes envolvidos no processo de produção e secreção de enzimas.

6.1. Perfil das enzimas secretadas.

Para comparar e traçar um perfil das enzimas secretadas pelas linhagens, foi utilizado o sistema *Api-zym*^R capaz de detectar a atividade de 19 enzimas simultaneamente (tabela 4). O padrão colorimétrico destas reações está ilustrado na figura 10, mostrando uma diferença no perfil enzimático quando as linhagens são cultivadas em diferentes valores de pH e uma diferença sutil entre as duas linhagens em relação à secreção das enzimas: esterase (C₄) (poço 3) em pH 5,0; leucina arilamidase (poço 6) e naftol-AS-BI-fosfohidrolase (poço 12) em pH 8,0; fosfatase ácida (poço 11) em pH 5,0 e pH 8,0.

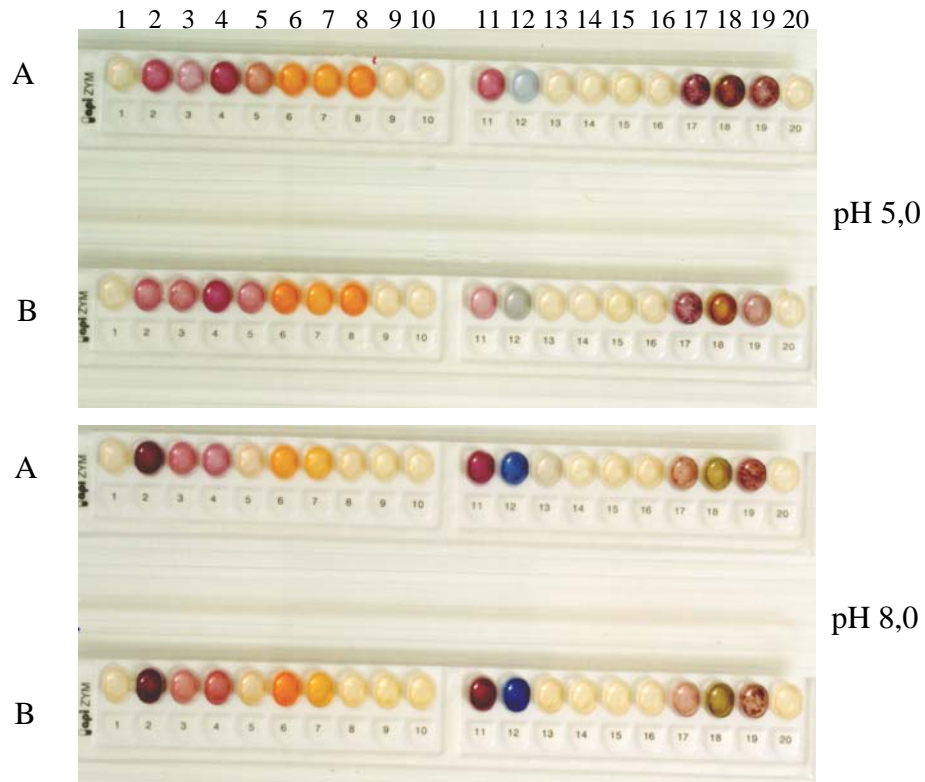


Figura 10: Padrão colorimétrico da secreção enzimática pelo sistema *Api-zym*^R, comparando as linhagens MYA-3108 (A) e UDA^r (B), em pH 5,0 e pH 8,0.

Para a quantificação da atividade enzimática, o sistema *Api-zym* se baseia em uma escala colorimétrica, na qual o valor 1 representa ausência e 5 o máximo de atividade enzimática. Os resultados estão demonstrados na tabela 13.

Tabela 13: Semi-quantificação das enzimas extracelulares detectadas pelo *Api-zym*^R.

| | Enzimas | pH 5,0 | | pH 8,0 | |
|----|--|----------|------------------|----------|------------------|
| | | MYA-3108 | UDA ^r | MYA-3108 | UDA ^r |
| 1 | Controle | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 2 | Fosfatase alcalina | 3 | 3 | 5 | 5 |
| 3 | Esterase (C ₄) | 2 | 3 | 3 | 3 |
| 4 | Esterase lipase (C ₈) | 4 | 4 | 3 | 3 |
| 5 | Lipase (C ₁₄) | 3 | 3 | 0 | 0 |
| 6 | Leucina arilamidase | 4 | 4 | 3 | 4 |
| 7 | Valina arilamidase | 4 | 4 | 3 | 3 |
| 8 | Cisteína arilamidase | 4 | 4 | 2 | 2 |
| 9 | Tripsina | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 10 | Quimiotripsina | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 11 | Fosfatase ácida | 3 | 2 | 4 | 5 |
| 12 | Naftol-AS-BI-fosfohidrolase | 2 | 2 | 4 | 5 |
| 13 | α -galactosidase | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 14 | β -galactosidase | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 15 | β -glucuronidase | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 16 | α -glucosidase | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 17 | β -glucosidase | 4 | 4 | 3 | 3 |
| 18 | <i>N</i> -acetil- β -glucosaminidase | 4 | 4 | 3 | 3 |
| 19 | α -manosidase | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 20 | α -fucosidase | 1 | 1 | 1 | 1 |

6.2. Análise da degradação de proteínas extracelulares.

As proteases que os fungos secretam no meio de cultivo degradam as proteínas do leite, utilizado como substrato para tais enzimas, formando um halo de degradação ao redor da colônia. Devido à regulação das enzimas proteolíticas pelo pH extracelular e à modulação do pH ambiente pelos microrganismos, as linhagens foram cultivadas em meio de proteases pH 5,0, pH 6,8 e pH 8,0, tamponados ou não, por 4 dias a 28° C. Através da figura 11 observa-se que a linhagem resistente, apesar de crescer mais lentamente, degrada, proporcionalmente, uma maior quantidade de proteínas (presentes no meio de cultivo) em relação à linhagem sensível, em pH 5,0, pH 6,8 tamponado e não tamponado e em pH 8,0. Quando as linhagens foram cultivadas em pH 5,0 tamponado nenhuma delas foi capaz de

degradar as proteínas do leite, e em pH 8,0 tamponado a degradação foi semelhante para as linhagens sensível e resistente.

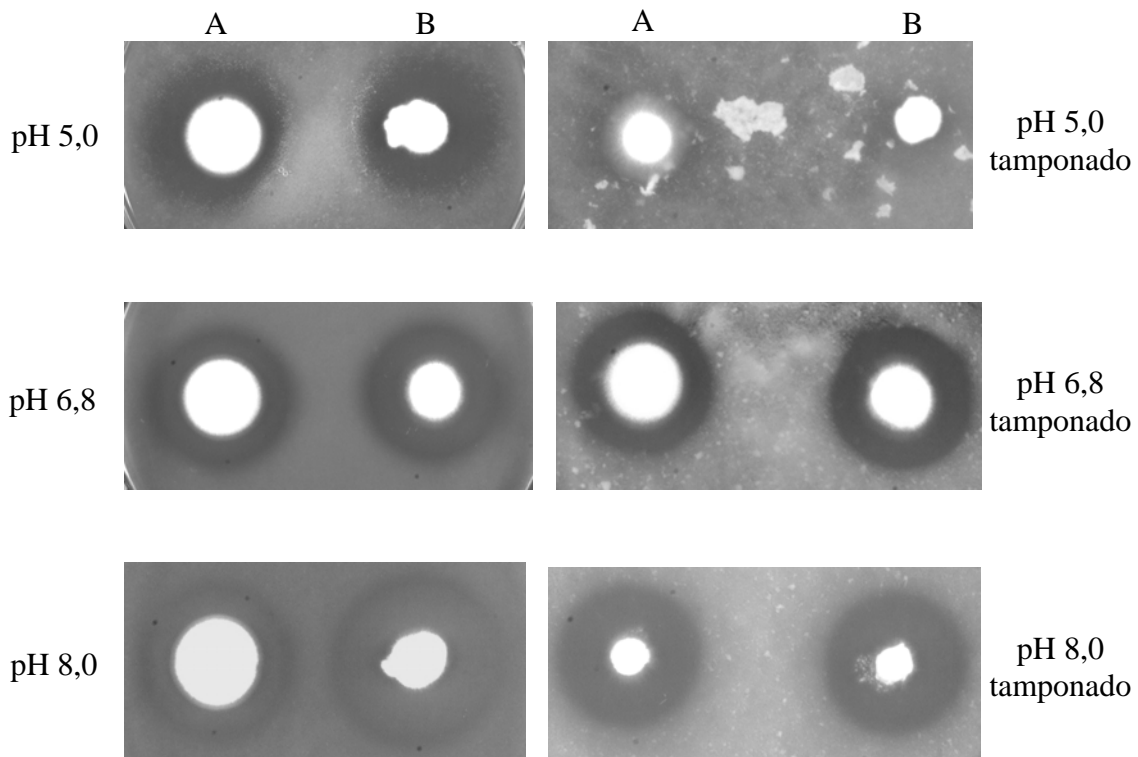


Figura 11: Halo de degradação das proteínas do leite pelas linhagens de *T. rubrum* MYA-3108 (A) e UDA^r (B), cultivadas em meio mínimo contendo leite pH 5,0, 6,8 e 8,0, tamponados ou não. As linhagens foram cultivadas a 28° C por 4 dias.

O halo de degradação das proteínas presentes no meio de cultivo foi medido do mesmo modo que o halo de degradação de queratina. Os valores representam a média do experimento realizado em triplicata e foram colocados no gráfico representado na figura 12-B. A figura 12-A representa o crescimento (em centímetros) das colônias nos mesmos meios de protease.

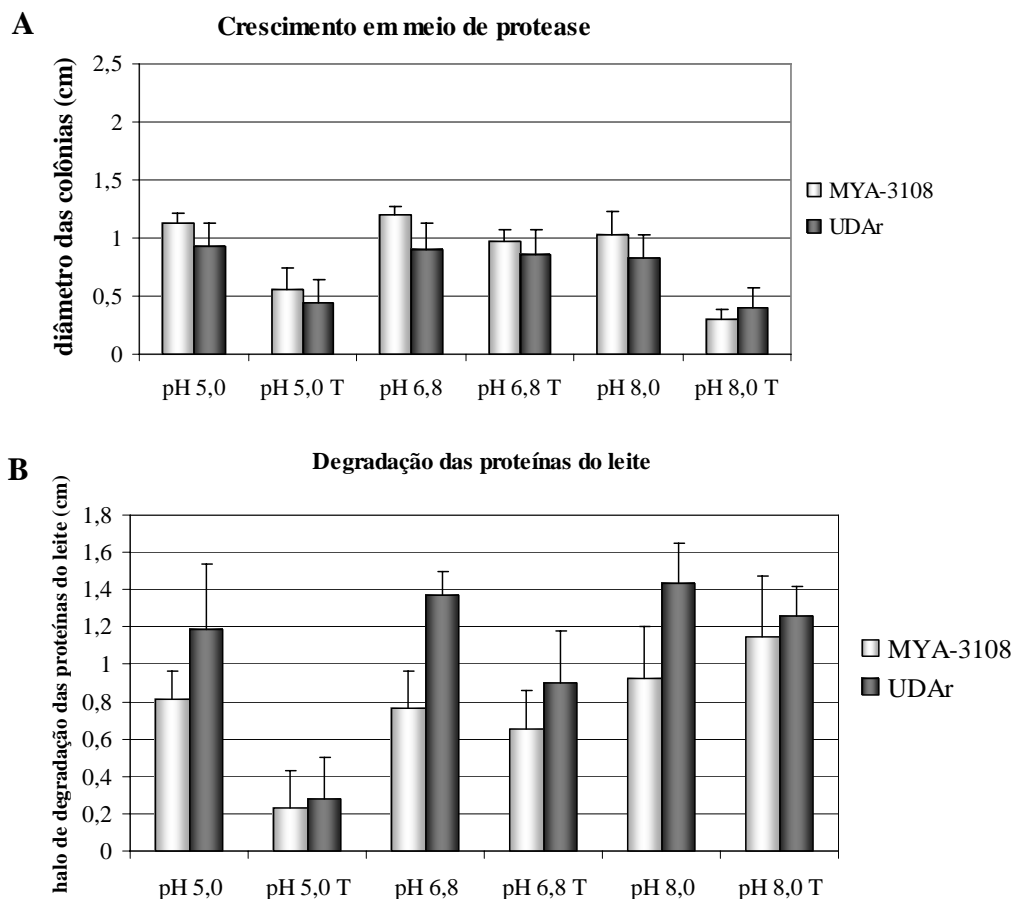


Figura 12: Gráfico comparando o crescimento (A) e a degradação de proteínas (B), entre as linhagens de *T. rubrum* MYA-3108 e UDA^r em relação aos diferentes valores de pH extracelular. As linhagens foram cultivadas a 28° C por 4 dias.

A tabela 14 mostra a atividade das enzimas proteolíticas, obtida através da razão entre o diâmetro da colônia (crescimento do fungo) e o diâmetro total (crescimento mais o halo de degradação). Essa análise revelou que as proteases da linhagem mutante, que atuam em pH 5,0, pH 6,8 e pH 8,0, apresentam uma maior atividade proteolítica em relação às da linhagem selvagem.

Tabela 14: Quantificação da atividade das proteases (zona de protease*) secretadas pelas linhagens selvagem e mutante, nos diferentes valores de pH do meio de cultivo.

| Linhagens | pH 5,0 | pH 5,0 T | pH 6,8 | pH 6,8 T | pH 8,0 | pH 8,0 T |
|------------------|--------|----------|--------|----------|--------|----------|
| MYA- 3108 | 0,67 | 0,85 | 0,69 | 0,68 | 0,63 | 0,41 |
| UDA ^r | 0,56 | 0,81 | 0,51 | 0,60 | 0,48 | 0,41 |

(*) Zona de protease = 1: ausência de atividade enzimática; 0: maior atividade enzimática.

Para analisar se o AUN exerce alguma influência na degradação de proteínas pelas linhagens em estudo, foram realizados os mesmos experimentos acrescentando-se diferentes concentrações de AUN aos meios de cultivo. Os controles representam os meios sem droga (os mesmos das Figuras 11 e 12) e os meios contendo clorofórmio também foram analisados, por ser utilizado como solvente da droga. Os valores numéricos foram obtidos do mesmo modo anteriormente citado e os resultados foram colocados nos gráficos apresentados nas figuras 13 a 18.

Em pH 5,0 observa-se uma diminuição na degradação das proteínas pela linhagem resistente com a adição do clorofórmio e da droga (Figura 13-B). Nas concentrações de AUN acima de 50 µg/mL, a linhagem selvagem não cresceu mas foi capaz de degradar proteínas, e a linhagem resistente não apresentou alteração no seu crescimento (Figura 13).

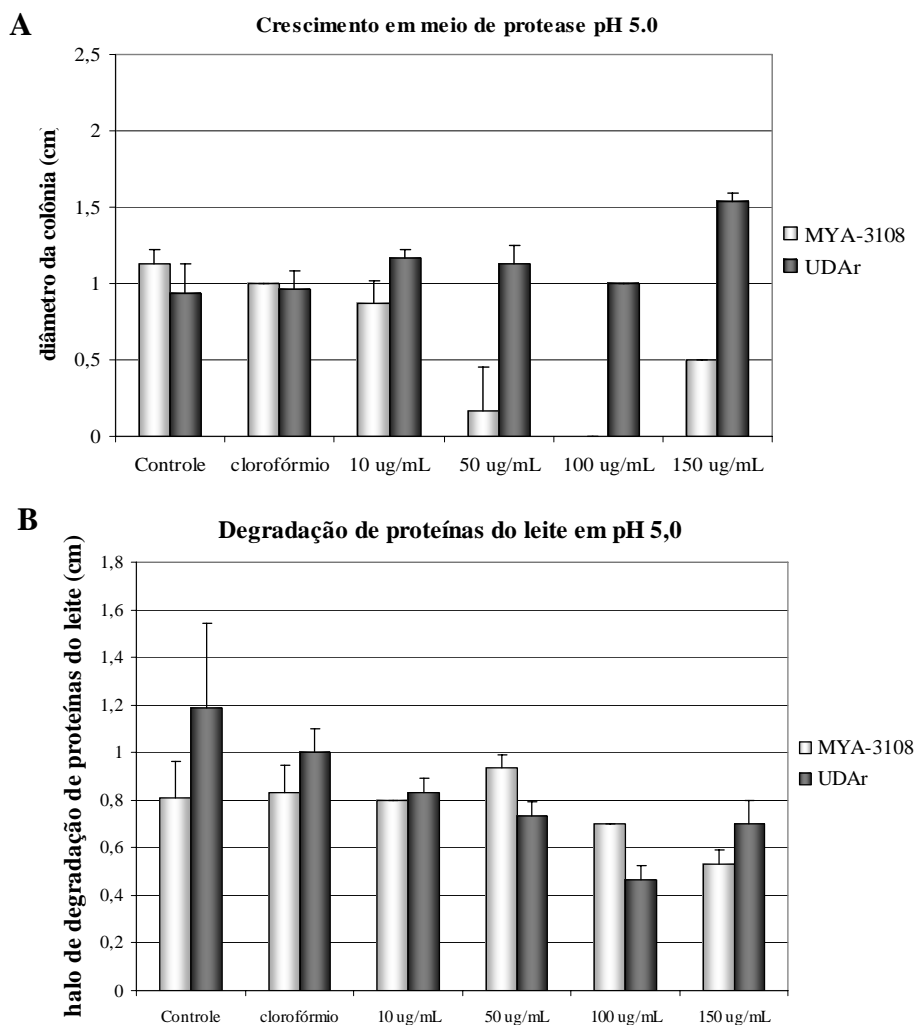


Figura 13: Gráfico comparando o crescimento (A) e a degradação de proteínas (B) entre as linhagens de *T. rubrum* MYA-3108 e UDA^r, em relação a diferentes concentrações de AUN, em meio de protease pH 5,0. As linhagens foram cultivadas a 28° C por 4 dias.

A atividade das enzimas proteolíticas nestes experimentos está demonstrada na tabela 15.

Tabela 15: Quantificação da atividade das proteases (zona de protease*) secretadas pelas linhagens selvagem e mutante, em pH 5,0.

| Linhasgens | Controle | Clorofórmio | 10 µg/mL | 50 µg/mL | 100 µg/mL | 150 µg/mL |
|------------------|----------|-------------|----------|----------|-----------|-----------|
| MYA- 3108 | 0,67 | 0,65 | 0,63 | 0,36 | 0,42 | 0,48 |
| UDA ^r | 0,56 | 0,59 | 0,67 | 0,69 | 0,77 | 0,69 |

(*) Zona de protease = 1: ausência de atividade enzimática; 0: maior atividade enzimática.

Quando o meio foi tamponado em pH 5,0 não foi observada nenhuma relação entre a degradação de proteínas e a presença de AUN (Figura 14).

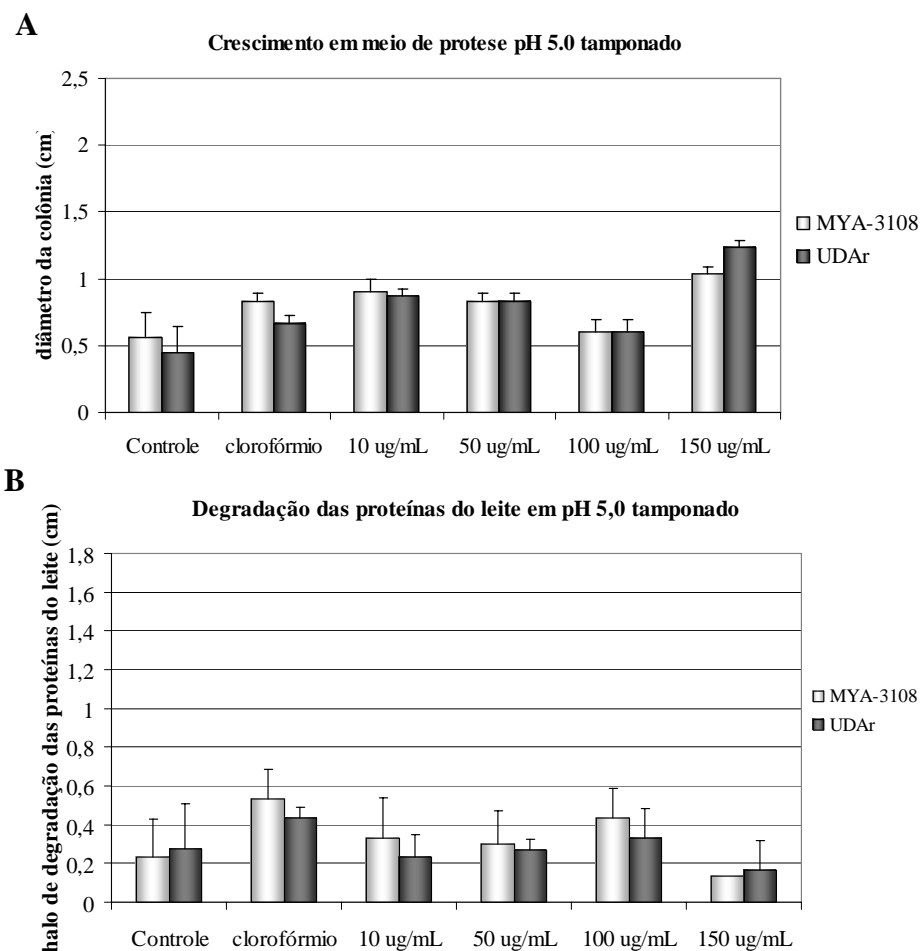


Figura 14: Gráfico comparando o crescimento (A) e a degradação de proteínas (B) entre as linhagens de *T. rubrum* MYA-3108 e UDA^r, em relação a diferentes concentrações de AUN, em meio de protease pH 5,0 tamponado. As linhagens foram cultivadas a 28° C por 4 dias.

A tabela 16 mostra a atividade das enzimas proteolíticas secretadas pelas linhagens nestes experimentos em pH 5,0 tamponado.

Tabela 16: Quantificação da atividade das proteases (zona de protease*) secretadas pelas linhagens selvagem e mutante, em pH 5,0 tamponado.

| Linhasgens | Controle | Clorofórmio | 10 µg/mL | 50 µg/mL | 100 µg/mL | 150 µg/mL |
|------------------|----------|-------------|----------|----------|-----------|-----------|
| MYA- 3108 | 0,85 | 0,80 | 0,81 | 0,82 | 0,72 | 0,89 |
| UDA ^r | 0,81 | 0,64 | 0,83 | 0,84 | 0,77 | 0,88 |

(*) Zona de protease = 1: ausência de atividade enzimática; 0: maior atividade enzimática.

Em pH 6,8 houve uma diminuição da secreção quando o meio foi tamponado, que foi acentuada quando clorofórmio ou droga foi acrescentado aos meios de cultivo (Figuras 15-B e 16-B). Quanto ao crescimento não houve alteração (Figuras 15-A e 16-A).

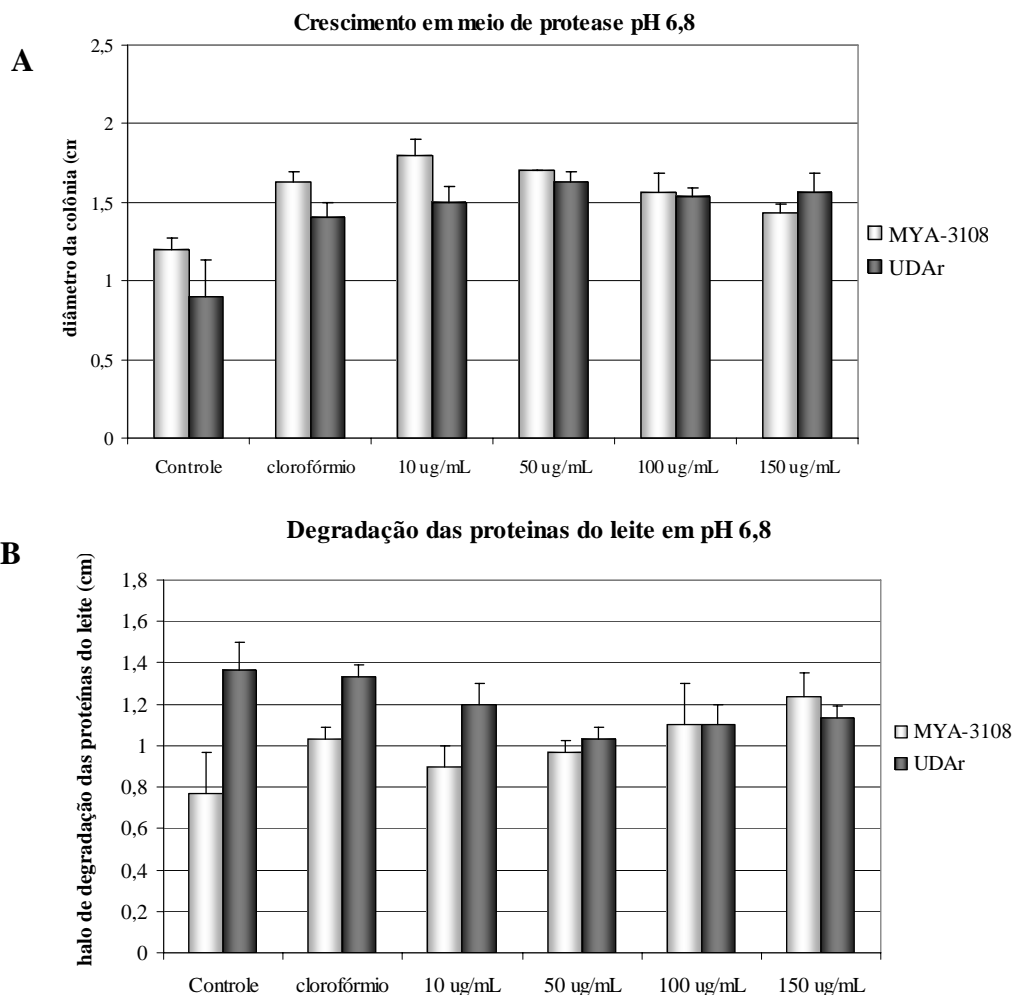


Figura 15: Gráfico comparando o crescimento (A) e a degradação de proteínas (B) entre as linhagens de *T. rubrum* MYA-3108 e UDA^r, em relação a diferentes concentrações de AUN, em meio de protease pH 6,8. As linhagens foram cultivadas a 28° C por 4 dias.

A atividade das enzimas proteolíticas secretadas pelas linhagens sensível e resistente ao AUN em pH 6,8 está demonstrada na tabela 17.

Tabela 17: Quantificação da atividade das proteases (zona de protease*) secretadas pelas linhagens selvagem e mutante, em pH 6,8.

| Linhagens | Controle | Clorofórmio | 10 µg/mL | 50 µg/mL | 100 µg/mL | 150 µg/mL |
|-------------------|----------|-------------|----------|----------|-----------|-----------|
| MYA-3108 | 0,69 | 0,68 | 0,72 | 0,70 | 0,66 | 0,61 |
| UDAr ^r | 0,51 | 0,59 | 0,63 | 0,68 | 0,65 | 0,65 |

(*) Zona de protease = 1: ausência de atividade enzimática, 0: maior atividade enzimática.

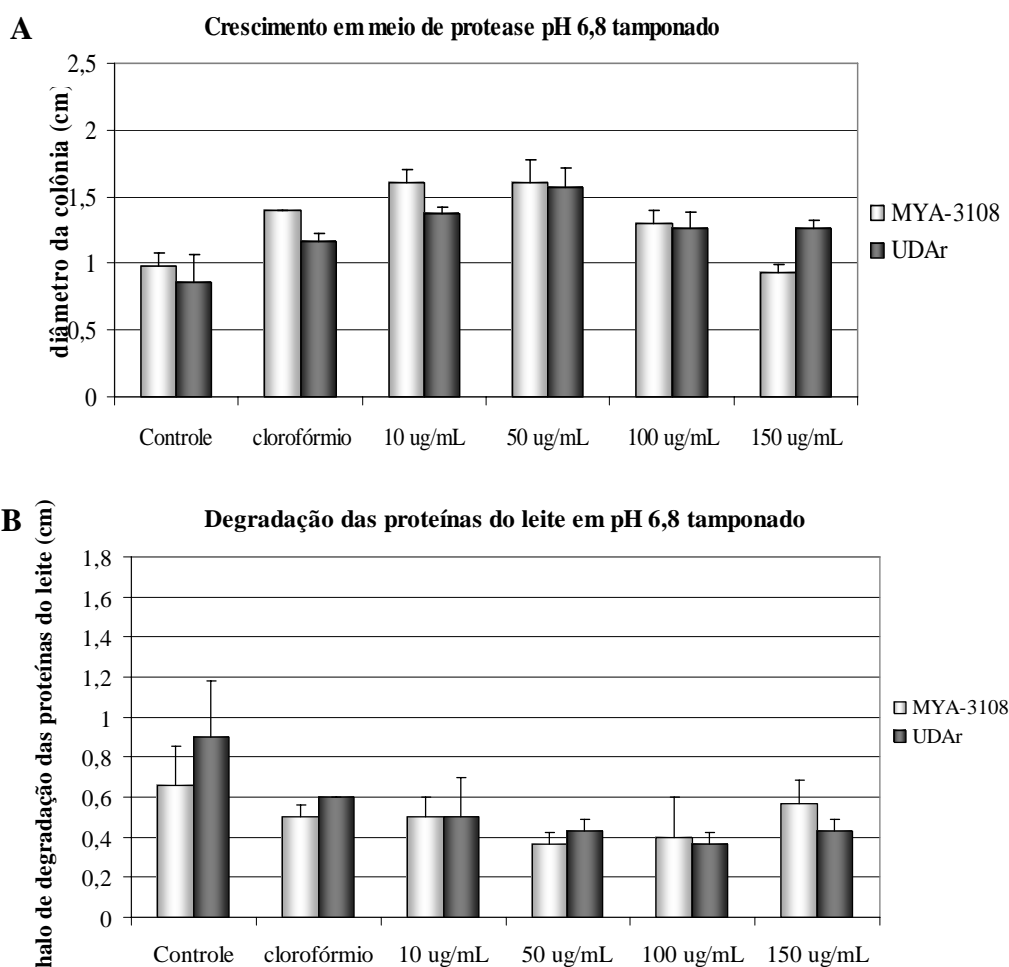


Figura 16: Gráfico comparando o crescimento (A) e a degradação de proteínas (B) entre as linhagens de *T. rubrum* MYA-3108 e UDAr^r, em relação a diferentes concentrações de AUN, em meio de protease pH 6,8 tamponado. As linhagens foram cultivadas a 28° C por 4 dias.

A atividade das enzimas proteolíticas secretadas nestes experimentos realizados em pH 6,8 tamponado está demonstrada na tabela 18.

Tabela 18: Quantificação da atividade das proteases (zona de protease*) secretadas pelas linhagens selvagem e mutante, em pH 6,8 tamponado.

| Linhagens | Controle | Clorofórmio | 10 µg/mL | 50 µg/mL | 100 µg/mL | 150 µg/mL |
|------------------|----------|-------------|----------|----------|-----------|-----------|
| MYA- 3108 | 0,68 | 0,79 | 0,81 | 0,85 | 0,66 | 0,61 |
| UDA ^r | 0,60 | 0,74 | 0,79 | 0,83 | 0,65 | 0,65 |

(*) Zona de protease = 1: ausência de atividade enzimática. 0: maior atividade enzimática.

A maior degradação de proteínas pelas linhagens de *T. rubrum* foi observada em resposta ao pH 8,0. Essa degradação não foi reprimida com a adição de droga em nenhuma das concentrações testadas (Figura 17-B).

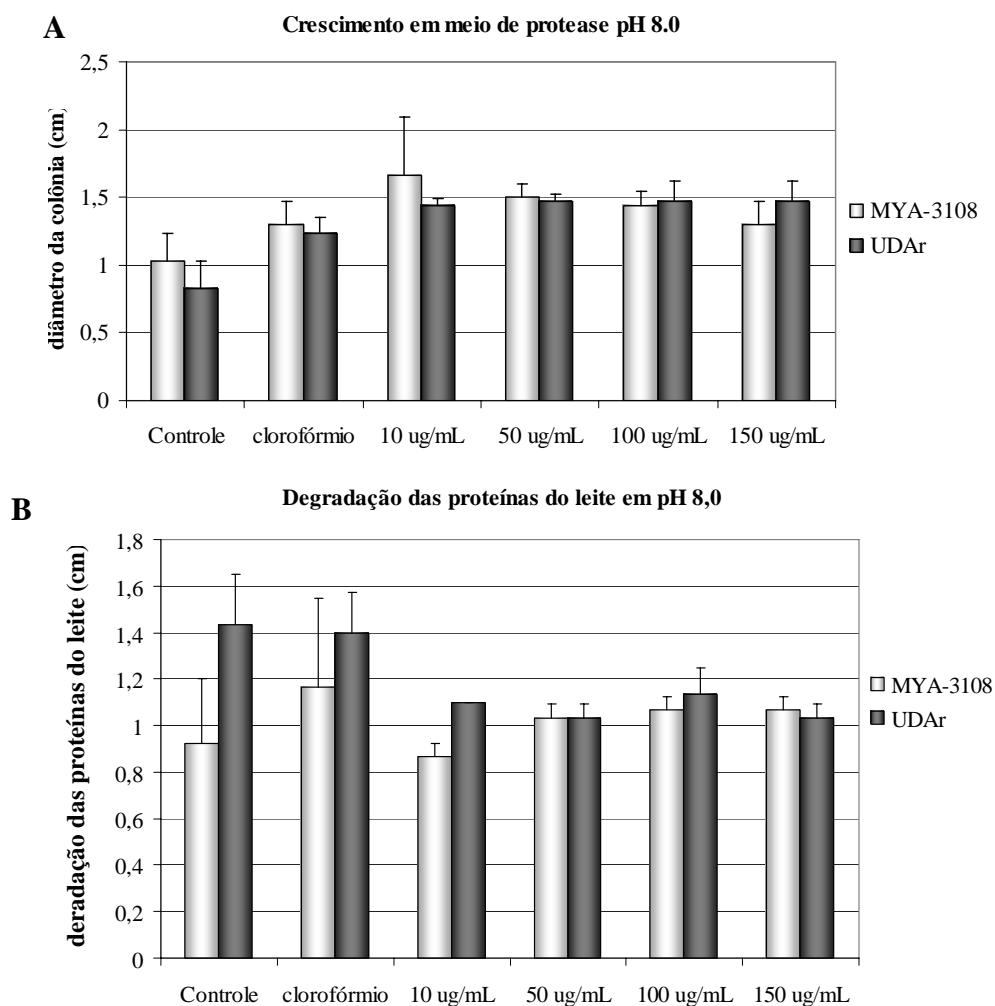


Figura 17: Gráfico comparando o crescimento (A) e a degradação de proteínas (B) entre as linhagens de *T. rubrum* MYA-3108 e UDA^r, em relação a diferentes concentrações de AUN, em meio de protease pH 8,0. As linhagens foram cultivadas a 28° C por 4 dias.

A tabela 19 mostra a atividade das enzimas proteolíticas secretadas nestes experimentos.

Tabela 19: Quantificação da atividade de proteases (zona de protease*) nas linhagens selvagem e mutante, em pH 8,0.

| Linhagens | Controle | Clorofórmio | 10 µg/mL | 50 µg/mL | 100 µg/mL | 150 µg/mL |
|------------------|-----------------|--------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|
| MYA- 3108 | 0,63 | 0,61 | 0,71 | 0,66 | 0,65 | 0,65 |
| UDA ^r | 0,48 | 0,55 | 0,64 | 0,66 | 0,64 | 0,66 |

(*) Zona de protease = 1: ausência de atividade enzimática; 0: maior atividade enzimática.

Entretanto, quando o meio foi tamponado houve uma diminuição tanto no crescimento das linhagens (Figura 18-A), quanto na degradação das proteínas presentes no meio, e esta diminuição foi dose-dependente (Figura 18-B).

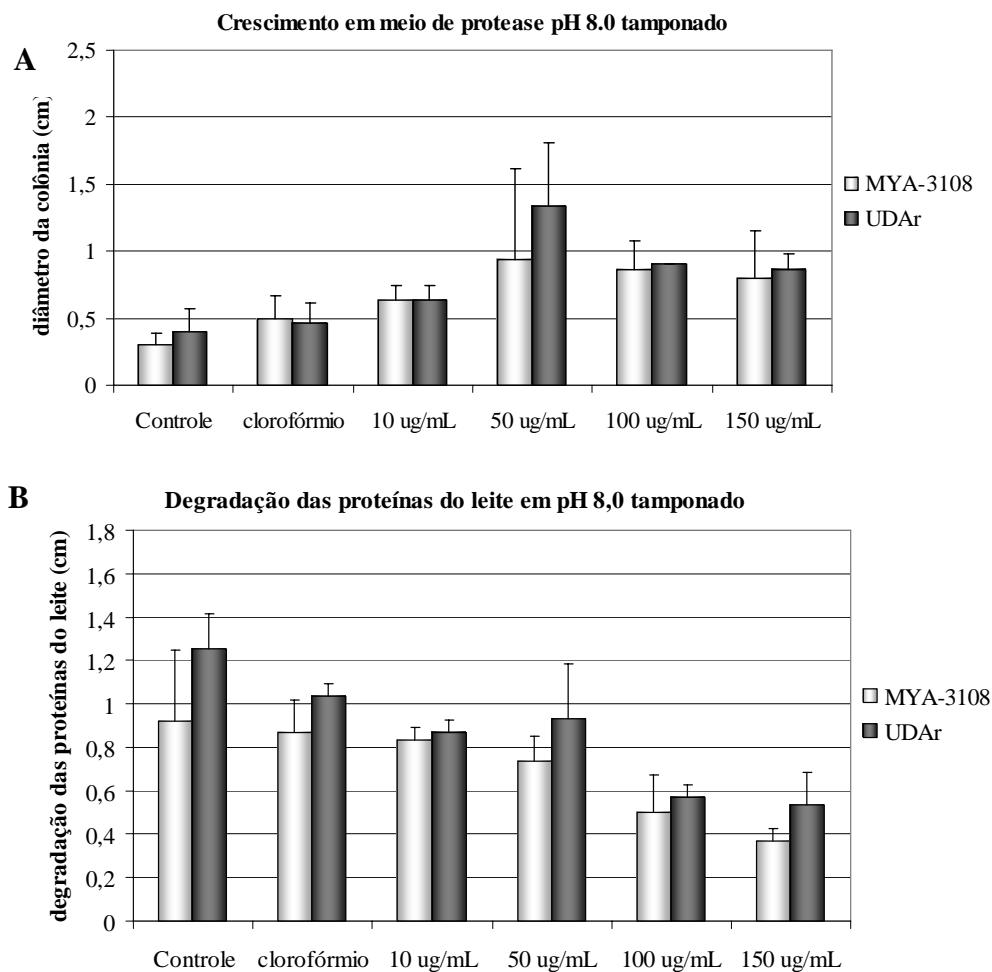


Figura 18: Gráfico comparando o crescimento (A) e degradação de proteínas (B) entre as linhagens de *T. rubrum* MYA-3108 e UDA^r, em relação a diferentes concentrações de AUN, em meio de protease pH 8,0 tamponado. As linhagens foram cultivadas a 28° C por 4 dias.

A atividade das enzimas proteolíticas nestes experimentos está demonstrada na tabela 20.

Tabela 20: Quantificação da atividade de proteases (zona de protease*) nas linhagens selvagem e mutante, em pH 8,0 tamponado.

| Linhagens | Controle | Clorofórmio | 10 µg/mL | 50 µg/mL | 100 | 150 |
|------------------|----------|-------------|----------|----------|-------|-------|
| | | | | | µg/mL | µg/mL |
| MYA- 3108 | 0,63 | 0,53 | 0,61 | 0,60 | 0,73 | 0,78 |
| UDA ^r | 0,41 | 0,47 | 0,57 | 0,71 | 0,71 | 0,72 |

(*) Zona de protease = 1: ausência de atividade enzimática; 0: maior atividade enzimática.

6.3. Análise da degradação de lipídeos extracelulares.

As lipases extracelulares degradam o tween 20 presente no meio de cultivo, formando um halo de precipitação ao redor da colônia. A análise também foi realizada na presença de diferentes concentrações de AUN e de clorofórmio, após 7 dias de incubação a 28° C. O valor numérico foi obtido do mesmo modo que o halo de proteases e o resultado está representado pelo gráfico da figura 19-B, através do qual pode-se observar que não há diferença na degradação deste lipídeo entre as duas linhagens, nem mesmo quando estas foram cultivadas na presença de AUN.

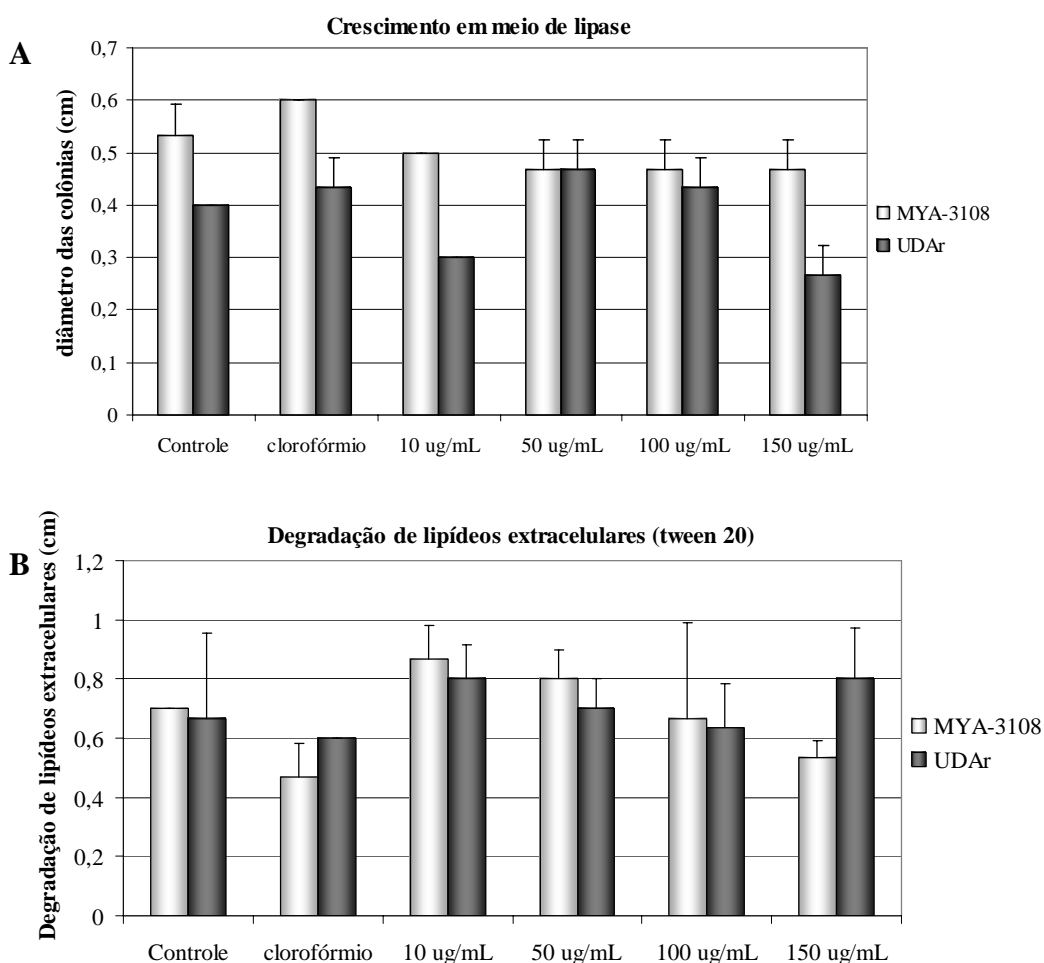


Figura 19: Gráfico comparando o crescimento (A) e a degradação de lipídeos (tween 20) (B) entre as linhagens de *T. rubrum* MYA-3108 e UDA^r em relação a diferentes concentrações de AUN, em meio de lipase pH 6,8. As linhagens foram cultivadas a 28° C por 7 dias.

A tabela 21 mostra os valores obtidos nos cálculos da zona de lipase [razão entre o diâmetro da colônia (crescimento do fungo) e o diâmetro total (crescimento mais o halo

de degradação)], mostrando que não há diferença na atividade das enzimas lipolíticas que degradam o tween 20 entre as linhagens mutante e selvagem.

Tabela 21: Quantificação da atividade das lipases (zona de lipase*) secretadas pelas linhagens selvagem e mutante, em diferentes concentrações de AUN.

| Linhagens | Controle | Clorofórmio | 10 µg/mL | 50 µg/mL | 100 µg/mL | 150 µg/mL |
|------------------|----------|-------------|----------|----------|-----------|-----------|
| MYA- 3108 | 0,69 | 0,78 | 0,63 | 0,65 | 0,70 | 0,73 |
| UDA ^r | 0,69 | 0,70 | 0,63 | 0,68 | 0,70 | 0,61 |

(*) Zona de lipase = 1: ausência de atividade enzimática; 0: maior atividade enzimática.

7. Teste de patogenicidade *in vitro*.

Para analisar se a mutação e o fenótipo de resistência ao AUN interferem na patogenicidade de *T. rubrum*, foi avaliada a capacidade dos conídios das linhagens selvagem e mutante de germinar em fragmentos de unha humana. A figura 20 mostra que a linhagem resistente apresenta uma diminuição na germinação de seus conídios sobre a unha, em comparação à linhagem selvagem. Os conídios das linhagens não foram capazes de germinar em água, na ausência do fragmento de unha

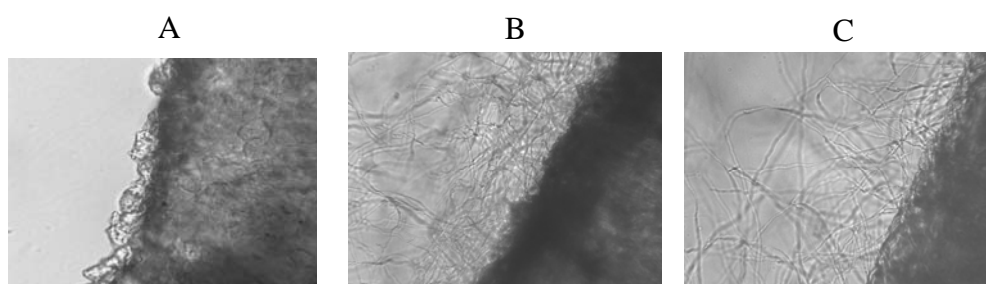


Figura 20: Germinação dos conídios – presença de hifas sobre fragmentos de unha humana. Unha sem inóculo (A), linhagem MYA – 3108 (B) e UDA^r (C). As linhagens foram cultivadas em unha humana a 28° C por 6 dias.

8. Análise da expressão diferencial de genes por *Differential Display Reverse Transcription of Polymerase Chain Reaction* – DDRT-PCR.

A metodologia de DDRT-PCR foi utilizada para analisar os genes diferencialmente expressos pelas linhagens de *T. rubrum* sensível (selvagem) e resistente (mutante) ao AUN, submetidas ou não à droga na concentração de 50 µg/mL. Seis experimentos de DDRT-PCR foram realizados, utilizando diferentes conjuntos de oligonucleotídeos aleatórios (arbitrários). As tabelas 2 e 5 mostram, respectivamente, as seqüências e os conjuntos de oligonucleotídeos utilizados em cada experimento. Através destas reações de DDRT-PCR, encontramos várias bandas diferencialmente expressas entre as condições estudadas, mostrando um perfil diferenciado de expressão gênica entre as duas linhagens submetidas às mesmas condições (presença ou ausência de AUN). A figura 21 mostra o padrão eletroforético em gel de poliacrilamida destes experimentos, indicando as bandas que foram extraídas dos géis. Estas bandas foram clonadas e os clones obtidos foram seqüenciados e utilizados nos experimentos de *reverse northern blotting* para a confirmação da expressão diferencial.

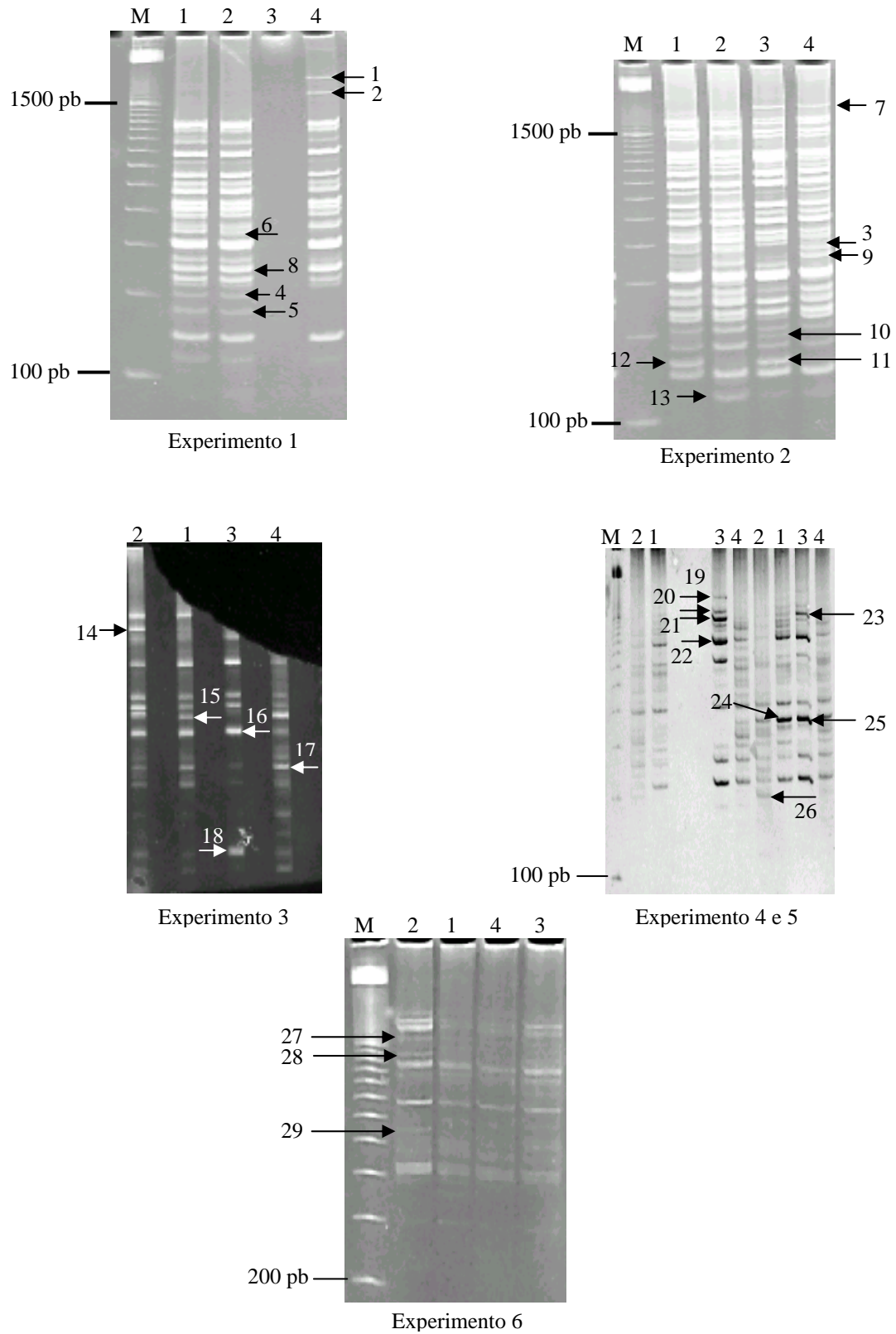


Figura 21: Padrão eletroforético dos experimentos de DDRT-PCR. M: marcador de massa molecular 100 pb; 1: linhagem MYA-3108 com AUN; 2: MYA-3108; 3: linhagem UDA^r com AUN; 4: UDA^r.

8.1. Análise das seqüências por bioinformática.

As seqüências geradas foram submetidas a análises através de ferramentas de bioinformática. O programa *phredPhrap* foi usado para avaliar a qualidade de cada seqüência gerada e retirar as regiões de vetor pelo *crossmatch* (presente no mesmo pacote de programas). As seqüências confiáveis apresentavam um valor de qualidade maior que 30 (valor dado pelo programa *Phrap*), e foram submetidas a análises pelo programa BLASTx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para procurar similaridade com seqüências protéicas depositadas no *GenBank*. A tabela 22 apresenta os resultados obtidos nestas análises, mostrando o tamanho da seqüência dos clones analisados, a proteína depositada no banco de dados, o organismo, o tamanho total da seqüência da mesma que foi similar a EST (*Expressed Sequence Tag*) de *T. rubrum*, a região de similaridade entre elas (a de *T. rubrum* e a do banco de dados), o e-value, a porcentagem de identidade e de positivos, além da condição de expressão visualizada pelo gel de DDRT-PCR.

O programa InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan>) foi utilizado para procurar possíveis domínios e sítios funcionais dentro das ESTs de *T. rubrum*, principalmente devido ao elevado número de seqüências que apresentaram similaridade com proteínas hipotéticas (que ainda não têm função biológica definida) e que não apresentaram similaridade com as seqüências depositadas nos bancos de dados. A seqüência do clone 1.3, referente à banda de número 1 mostrou similaridade com uma proteína hipotética de *A. nidulans* (tabela 13), sendo que a região de similaridade corresponde a um domínio conservado DnaJ (*DnaJ domain*). O clone 15.1 (banda de número 15) apresenta similaridade com domínio *haloacid dehalogenase-like hydrolase*, presente nas proteínas da família *Aldo/keto reductase*, e o clone 17.1 (banda 17) possui um domínio peptidil-prolil cis-trans isomerase, *cyclophilin-type*. O clone 2.6, proveniente da banda de número 2, apresenta similaridade com H⁺-ATPase de membrana plasmática (os membros desta família estão envolvidos no transporte de Na⁺/K⁺, H⁺/K⁺, Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺). A seqüência parcial do mRNA do gene que codifica a H⁺-ATPase de *T. rubrum* foi depositada no *GenBank* por nós (número de acesso: AY234618).

Tabela 22: Análise das seqüências provenientes do DDTR-PCR pelo programa BLASTx.

| Clone | Tamanho da seqüência | Resultado da busca por similaridade | Organismo | Tamanho da proteína | Região de similaridade da (<i>T. rubrum</i>) | Região de similaridade (banco) | E-value | Identidade | Positivos | Condição de expressão |
|-------|----------------------|--------------------------------------|-------------------------------|---------------------|--|--------------------------------|---------|---------------|---------------|-----------------------|
| 1.3 | 697 | Proteína hipotética | <i>A. nidulans</i> | 837 aa | 409 - 50 | 33 - 147 | 3e-12 | 45/120 (37%) | 56/120 (46%) | 3 |
| 1.6 | 594 | Ausente | | | | | | | | 3 |
| 1.7 | 428 | Ausente | | | | | | | | 3 |
| 2.1 | 478 | Ausente | | | | | | | | 3 |
| 2.2 | 616 | Ausente | | | | | | | | 3 |
| 2.3 | 440 | Ausente | | | | | | | | 3 |
| 2.6 | 701 | Plasma membrane ATPase (Proton pump) | <i>Ajellomyces capsulatus</i> | 916 aa | 177 - 701 | 48 - 202 | 5e-59 | 122/175 (69%) | 128/175 (73%) | 3 |
| 2.7 | 428 | Ausente | | | | | | | | 3 |
| 3.1 | 372 | Ausente | | | | | | | | 3 |
| 3.2 | 441 | Ausente | | | | | | | | 3 |
| 4.1 | 472 | Ausente | | | | | | | | 1 |
| 4.2 | 334 | Ausente | | | | | | | | 1 |
| 4.3 | 171 | Ausente | | | | | | | | 1 |
| 4.7 | 241 | Ausente | | | | | | | | 1 |
| 5.1 | 220 | Ausente | | | | | | | | 1 |
| 5.2 | 221 | Ausente | | | | | | | | 1 |
| 5.6 | 421 | Ausente | | | | | | | | 1 |
| 7.5 | 737 | Proteína hipotética | <i>Gibberella zeae</i> | 1130 aa | 623 - 237 | 356 - 488 | 6e-06 | 38/137 (27%) | 55/137 (40%) | 3 |
| 10.5 | 181 | Ausente | | | | | | | | 3 |
| 10.6 | 178 | Ausente | | | | | | | | 3 |
| 10.7 | 161 | Ausente | | | | | | | | 3 |
| 12.7 | 126 | Ausente | | | | | | | | 2 e 4 |
| 13.1 | 190 | Ausente | | | | | | | | 1 |
| 14.2 | 484 | Ausente | | | | | | | | 1 |
| 15.1 | 640 | Proteína hipotética | <i>A. nidulans</i> | 1688 aa | 14 - 607 | 1204 - 1401 | 2e-91 | 163/198 (82%) | 178/198 (89%) | 2 e 4 |
| 16.1 | 500 | Proteína hipotética | <i>Neurospora crassa</i> | 670 aa | 496 - 416 | 512 - 538 | 4e-04 | 17/27 (62%) | 22/27 (81%) | 1, 2 e 3 |
| 17.1 | 452 | Proteína hipotética | <i>A. nidulans</i> | 558 aa | 447 - 4 | 133 - 284 | 4e-25 | 64/154 (41%) | 91/154 (59%) | 1, 2 e 4 |
| 19.3 | 203 | Ausente | | | | | | | | 3 |
| 24.3 | 288 | Ausente | | | | | | | | 2, 3 e 4 |
| 26.1 | 226 | Ausente | | | | | | | | 1 |
| 29.3 | 193 | Ausente | | | | | | | | 1 |

1: MYA-3108, 2: MYA-3108 com AUN, 3: UDA^f, 4: UDA^f com AUN. aa: aminoácidos. Clone: o primeiro numero corresponde ao número da banda recortada do gel de poliacrilamida.

8.2. Reverse-Northern Blotting.

Os clones provenientes do DDRT-PCR foram amplificados por PCR, para obtenção dos insertos que foram colocados, em duplicata, sobre membranas de nylon para a realização dos experimentos de *reverse northern blotting*. A figura 22 mostra o padrão dos produtos de PCR em gel de agarose 0,8%, e a tabela 23 a organização dos clones sobre as membranas.

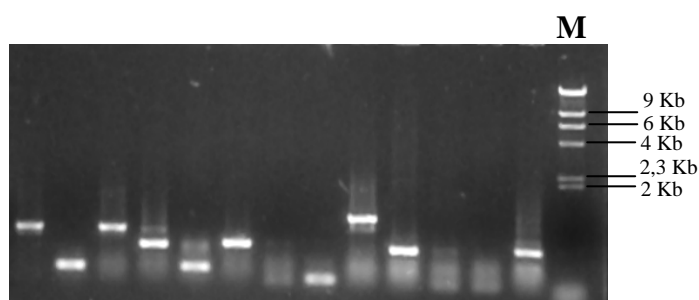


Figura 22: Padrão dos produtos de PCR de alguns clones de DDRT-PCR em gel de agarose 0,8%, utilizando os oligonucleotídeos universais M13. M: DNA do fago λ digerido com *HindIII*.

Tabela 23: Organização dos clones (produto de PCR) sobre as membranas de nylon.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| A | 1.1 | 1.2 | 1.3 | 1.6 | 1.7 | 2.1 | 2.2 | 2.3 | 2.6 | 2.7 | 3.1 | 3.2 |
| B | 4.1 | 4.2 | 4.3 | 4.7 | 5.1 | 5.2 | 5.3 | 5.6 | 6.1 | 6.2 | 6.3 | 6.4 |
| C | 6.5 | 7.1 | 7.2 | 7.3 | 7.4 | 7.5 | 7.6 | 7.7 | 7.8 | 7.9 | 8.1 | 8.2 |
| D | 9.1 | 9.2 | 9.3 | 10.1 | 10.2 | 10.3 | 10.4 | 10.5 | 10.6 | 10.7 | 10.8 | 11.1 |
| E | 12.1 | 12.2 | 12.3 | 12.6 | 12.7 | 13.1 | 13.2 | 13.3 | 13.6 | 13.7 | 14.2 | 15.1 |
| F | 15.2 | 16.1 | 16.2 | 17.1 | 17.2 | 18.2 | 19.2 | 20.2 | 20.3 | 21.2 | 21.3 | 22.1 |
| G | 22.2 | 22.3 | 23.3 | 24.2 | 24.3 | 25.2 | 25.3 | 26.1 | 26.2 | 26.3 | 27.1 | 27.2 |
| H | 27.3 | 27.4 | 28.1 | 28.2 | 29.1 | 29.2 | 29.3 | | | 19.3 | | |

⏟
⏟

Membrana 1
Membrana 2

A figura 23 mostra os resultados dos experimentos de *reverse northern blot*. As membranas contendo os produtos de PCR foram hibridadas com os cDNAs obtidos através da transcrição reversa dos mRNAs das quatro condições estudadas: linhagem MYA-3108 (Figura 23-I), MYA-3108 tratada com AUN (50 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 23-II), UDA^r (Figura 23-III) e UDA^r tratada com AUN (50 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 23-IV). Os círculos nas marcações representam os clones que foram confirmados quanto à expressão diferencial, através destes experimentos.

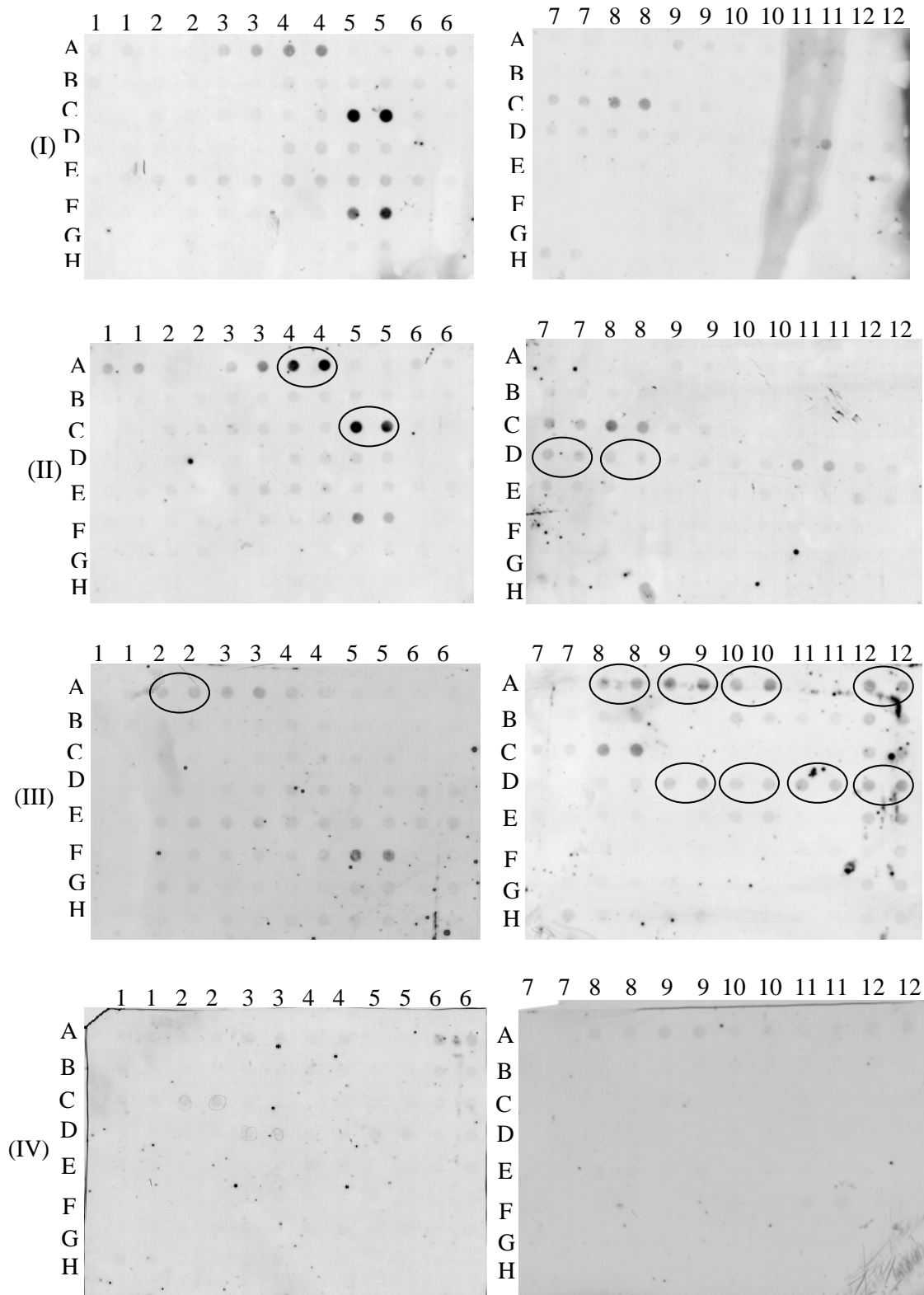


Figura 23: Reverse Northern Blot dos clones provenientes das reações de DDRT-PCR, utilizando como sonda os cDNAs marcados com fluoresceína. I: linhagens MYA-3108, II: MYA-3108 tratada com AUN, III: UDA⁺, IV: UDA⁺ tratada com AUN.

V. Discussão

Para o controle efetivo dos fungos patogênicos é fundamental o conhecimento sobre a biologia dos patógenos, os seus mecanismos de virulência e os processos de interação com o hospedeiro. Além disso, os relatos cada vez mais frequentes de linhagens resistentes aos antifúngicos disponíveis no mercado, tornam necessário o esclarecimento dos mecanismos responsáveis por esse fenótipo e do modo de ação dos agentes inibidores de crescimento. Todo este conhecimento somado pode levar à descoberta de novos alvos celulares e ao desenvolvimento de novas drogas antifúngicas, que atuem de maneira mais específica possível contra o fungo, sem interferir com o hospedeiro. O objetivo principal deste trabalho foi avaliar genes e processos celulares que possam estar envolvidos no mecanismo de resistência ao ácido undecanóico em *T. rubrum* e analisar a possível relação entre estes mecanismos e a secreção de enzimas importantes para o processo de infecção deste dermatófito.

Nos experimentos de obtenção da linhagem resistente, apenas uma das três colônias obtidas se mostrou resistente ao AUN. Este número reduzido de mutantes obtido corrobora com dados da literatura, que descrevem uma baixa ocorrência para a seleção de mutantes resistentes aos fungicidas que apresentam um efeito inibitório inespecífico (Martinez-Rossi, 1995). Além disso, o modo de ação do AUN ainda é pouco conhecido, sabendo-se apenas que este ácido graxo inibe o crescimento do fungo e a produção de algumas enzimas que participam no processo infeccioso (Das e Benerjee, 1982b). Como *T. rubrum* está classificado como um fungo deuteromiceto, ou seja, não apresenta ciclo sexual descrito, não é possível realizar análises de genética clássica para mapear a mutação e descobrir qual (is) gene (s) está (ão) conferindo resistência ao AUN neste fungo. Por isso, neste trabalho as respostas celulares da linhagem resistente foram comparadas às da linhagem selvagem, principalmente levando em consideração os aspectos envolvidos na patogênese das dermatofitoses, para saber se existe relação entre o processo de resistência ao AUN e a secreção de enzimas envolvidas na patogenicidade do dermatófito em estudo.

A linhagem mutante (UDA^r) obtida neste trabalho apresenta uma concentração inibitória mínima para o AUN aproximadamente quatro vezes maior que a linhagem selvagem MYA-3108 (Tabela 10). Embora nenhuma alteração morfológica ocasionada pela mutação tenha sido observada através dos métodos utilizados, o mutante resistente apresenta um crescimento mais lento que o da linhagem selvagem (Figura 4). Esta diminuição no crescimento da linhagem resistente poderia estar relacionada a alguma falha

na assimilação de nutrientes. Desse modo, o cultivo em meio mínimo suplementado com diferentes fontes de carbono poderia dar indícios sobre a capacidade da linhagem mutante em metabolizar algumas fontes de carbono. Tais experimentos não revelaram nenhuma diferença entre as linhagens em relação à capacidade de utilização das fontes de carbono testadas, mostrando que *T. rubrum* não é metabolicamente capaz de crescer utilizando acetato de potássio como única fonte de carbono, e que as linhagens continuavam apresentando diferença no tamanho das colônias (Figura 7). Entretanto, a adição de glicina ao meio de cultivo levou à supressão desta diferença no tamanho das colônias, sugerindo que a mutação pode ter levado a uma maior requisição por este aminoácido para o crescimento da linhagem UDA^r.

Uma hipótese sugerida para explicar a diferença no crescimento das linhagens é que a mutação tenha levado a uma diminuição na capacidade de alcalinizar o meio de cultivo retardando o crescimento da linhagem, visto que *T. rubrum*, independente do pH inicial do meio, tende a alcalinizá-lo durante seu crescimento (Ferreira-Nozawa *et al.*, 2003). Esta dificuldade pôde ser revertida quando a linhagem foi cultivada em meio contendo glicina, pois a utilização deste aminoácido gera acetilCoA que aumenta o pH do meio para valores acima de 9,0, promovendo assim a alcalinização do meio extracelular (Thedei *et al.*, 1994). Além disso, quando o pH do meio foi medido após o cultivo das linhagens, o meio no qual a linhagem mutante cresceu apresentava 0,5 unidade de pH abaixo ao do meio onde a selvagem cresceu (Tabela 11). Outras evidências que favorecem esta hipótese são que, a diferença no crescimento das linhagens também foi suprimida quando elas foram cultivadas em meio mínimo tamponado em pH 5,0, no qual nenhuma das linhagens consegue modular o pH ambiente (Figura 5). As diferenças no tamanho das colônias e no valor do pH após o crescimento também não foram observadas quando foi adicionado glicina ao meio mínimo pH 5,0 não tamponado (na ausência deste aminoácido, tais diferenças foram observadas).

A diminuição da capacidade de alcalinizar o meio e o crescimento diminuído da linhagem mutante poderiam representar desvantagens durante o processo infeccioso. O crescimento mais lento desta linhagem poderia levar à sua eliminação do tecido através da descamação contínua do epitélio. A dificuldade em alcalinizar o meio também se mostra uma desvantagem, principalmente levando em consideração o modelo de regulação das enzimas proteolíticas pelo pH, o qual sugere que os dermatófitos devem alcalinizar o meio para se instalar e permanecer no tecido hospedeiro (Martinez-Rossi *et al.*, 2004), visto que a maioria das proteases queratinolíticas apresenta atividade ótima em meio alcalino

(Brasch *et al.*, 1991). Os resultados do teste de infecção *in vitro* utilizando fragmentos de unha humana, mostraram que os conídios da linhagem resistente são capazes de germinar e formar hifas. Porém, o crescimento desta linhagem ainda é mais lento que o da selvagem (Figura 20) e, mesmo em condições que mimetizam a infecção, a linhagem mutante ainda apresenta uma dificuldade de crescimento em relação à selvagem. Para determinar se esta linhagem manteve ou não sua patogenicidade, experimentos de infecção *in vivo* são necessários, pois vários outros fatores podem influenciar na capacidade de um organismo se instalar e causar infecção, como a resposta do hospedeiro frente ao patógeno.

Como a habilidade dos dermatófitos invadir e subsequentemente se disseminar através do estrato córneo é, em parte, governada pela ação de enzimas proteolíticas produzidas e secretadas por estes patógenos, a secreção destas enzimas foi avaliada neste trabalho. Em todos os meios de cultivo utilizados para a análise da secreção das enzimas proteolíticas a linhagem resistente continuou apresentando uma diferença no seu crescimento, em relação à linhagem selvagem. Entretanto, apesar do crescimento mais lento as enzimas proteolíticas secretadas por esta linhagem mutante, capazes de degradar a queratina e as proteínas do leite (Figuras 8 e 11, respectivamente), apresentam uma maior atividade sobre tais substratos do que as secretadas pela selvagem, conforme mostram os gráficos das figuras 9B e 12B e as tabelas 12 e 14. Estes resultados sugerem um interessante mecanismo adaptativo no qual uma maior degradação de proteínas possibilita a permanência do fungo no tecido hospedeiro, pois o fato desta linhagem crescer mais lentamente poderia levar à sua eliminação do tecido mais rapidamente, através da descamação do epitélio e dos mecanismos de resposta imune do hospedeiro, principalmente os da imunidade inata que é a primeira linha de defesa do organismo humano.

Na literatura, há relatos de uma grande variedade de proteases secretadas por dermatófitos, e diferentes estudos mostram que estas enzimas desempenham um importante papel não apenas na aquisição de nutrientes (Apodaca e McKerrow, 1989a), como também na invasão do tecido hospedeiro (Apodaca e McKerrow, 1989b) e no controle dos mecanismos de defesa (Grappel e Blank, 1972; Collins *et al.*, 1973). Em 2004, cinco genes que codificam metaloproteases (MEP1-5, família das fungalisinas) e sete genes que codificam serina proteases (SUB1-7, família das subtilisinas) em *T. rubrum* foram identificados (Jousson *et al.*, 2004a e b). A alta atividade queratinolítica de dois dos sete genes *Sub* sugere que estas proteases desempenhem um papel importante na virulência deste patógeno. Entretanto, os autores sugerem que as proteases secretadas por

dermatófitos devem apresentar diferentes especificidades por substratos, uma vez que o gene *Sub5* não teve atividade sobre caseína e nem sobre queratina. Como o estrato córneo apresenta uma grande variedade de substratos, esta variedade de proteases seria uma vantagem para os dermatófitos que, segundo estes autores, apresentam um número maior de genes que codificam proteases, em relação a outros fungos patogênicos como o *A. fumigatus*.

Outro gene isolado de *T. rubrum* que apresenta similaridade de seqüência com serina proteases é o *Sub6* (Jousson *et al.*, 2004b). A proteína codificada por este gene foi descrita como um alérgeno, um antígeno protéico que induz produção de Imunoglobulina E (IgE) e resposta imune mediada por células, estimulando respostas de hipersensibilidade imediata e tardia. Tal proteína se mostrou um alérgeno importante entre os pacientes com dermatofitose crônica, uma vez que oito entre dez pacientes apresentaram anticorpos IgE contra esta proteína, sendo que cinco destes pacientes também apresentaram reatividade brônquica a antígenos de *Trichophyton* (Woodfolk *et al.*, 1998). Como a linhagem UDA^r apresenta uma maior degradação de proteínas, outros experimentos precisam ser realizados para determinar quais as enzimas proteolíticas que estão sendo mais expressas por esta linhagem. Além disso, experimentos de infecção *in vivo* poderiam demonstrar se esta linhagem é capaz de infectar o hospedeiro, de desencadear uma maior resposta imune ou ainda levar ao aparecimento de quadros alérgicos.

A síntese de proteases é, em sua maioria, regulada por uma combinação de fatores ambientais como disponibilidade de nutrientes, pH ambiente e temperatura (Ogrydziak *et al.* 1977; Glover *et al.* 1997). Tsuboi *et al.* (1989) mostraram que a quantidade e o tipo de proteases produzidas por um organismo depende da fonte de nitrogênio e do pH ambiente, e Hynes e Kelly (1977) relataram que mutações nos genes *creB* e *creC* de *A. nidulans*, que codificam proteínas que se ligam ao DNA, resultaram em níveis elevados de atividade proteolítica extracelular, mostrando-se uma mutação ganho de função (*gain of function*). Entretanto, devido a esta complexidade, pouco se conhece sobre as vias de sinalização que controlam a expressão de proteases em fungos (Gonzalez-Lopez *et al.*, 2002). Dependendo do pH do meio de cultivo, a levedura *Yarrowia lipolytica* secreta proteases ácidas ou alcalinas, cuja síntese é controlada pela disponibilidade de fontes de carbono, nitrogênio e enxofre, assim como pela presença de proteínas extracelulares.

A patogênese das várias formas de candidíase está associada com a regulação diferencial e temporal de genes que codificam proteases aspárticas secretadas (*secreted aspartic proteases* – *Sap*). Estas enzimas agem como citolisinas em macrófagos após a

fagocitose da *Candida* e estão envolvidas também na aderência a células epiteliais (Monod e Borg-von, 2002). A ativação de conjuntos apropriados de genes *Sap* em *C. albicans*, de acordo com as necessidades do fungo no curso da infecção, é em parte responsável pela adaptação deste patógeno a diferentes nichos do hospedeiro (Staib *et al.*, 2000). Como mencionado anteriormente, *T. rubrum* é um fungo deuteromiceto tornando-se difícil descobrir qual(is) gene(s) sofreu(m) mutação na linhagem resistente, e que além de estar conferindo resistência ao AUN, ainda está provocando uma diminuição no seu crescimento, levando a uma maior atividade das enzimas proteolíticas e queratinolíticas extracelulares e conseqüentemente ocasionando uma maior degradação de proteínas.

Um aspecto interessante observado quanto ao crescimento das colônias foi em relação à sua morfologia no meio ágar Sabouraud pH 8,0, no meio mínimo suplementado com galactose e em meio contendo queratina. Nestes meios, as linhagens de *T. rubrum* crescem espalhando-se no meio de cultivo, diferente do que foi observado quando elas cresceram em meio ágar Sabouraud pH 6,8, em meio mínimo contendo glicose e nos meios suplementados com glicina, nos quais apresentam uma colônia compacta. Levando em consideração o processo infeccioso, durante o qual o fungo deverá se adaptar às condições encontradas no tecido hospedeiro para poder sobreviver e se instalar, o patógeno deve adquirir nutrientes a partir do tecido hospedeiro, e para conseguir sua fonte de nutrientes ele provavelmente se espalha no tecido de modo a aumentar sua superfície de absorção. Como tais patógenos são queratinofílicos, o crescimento do fungo no meio contendo queratina poderia estar mimetizando *in vitro* as condições encontradas *in vivo*, e por isso o fungo se espalha no meio de cultivo na tentativa de aumentar a área de absorção e obter nutrientes. O fato de *T. rubrum* crescer com o mesmo aspecto em galactose também chamou a atenção pelo fato de ter sido relatada a interação de *T. rubrum* com resíduos de galactose presentes na superfície de células CHO, como demonstrado nos experimentos realizados por Esquenazi *et al.* (2004). O mesmo poderia acontecer em pH 8,0, uma vez que nos estágios mais tardios da infecção, no qual o fungo está estabelecido na pele, ocorre uma modulação do pH ambiente de modo a alcalinizá-lo (Martinez-Rossi *et al.*, 2004), e o fungo também estaria se espalhando no meio (tecido hospedeiro) para captar nutrientes.

Quanto à degradação de lipídeos, não foram observadas diferenças na atividade das enzimas lipolíticas secretadas pelas linhagens selvagem e mutante que degradam o tween 20. Através do teste *Api-zym*, apenas diferenças sutis foram observadas em relação às enzimas fosfatase ácida, esterase (C₈), leucina arilamidase e Naftol-AS-BI-fosfohidrolase, e não permitiu chegar a uma conclusão sobre quais enzimas estariam sendo

mais ou menos secretadas pela linhagem mutante. Entretanto, o teste utilizado é semi-quantitativo e análises de quantificação e atividade enzimática devem ser realizados para uma melhor compreensão das enzimas secretadas pela linhagem mutante.

A presença de AUN nos meios de cultivo utilizados para as análises da atividade de proteases, lipases e enzimas queratinolíticas, não mostrou nenhuma ação direta da droga na degradação desses substratos. Apenas em pH 8,0 tamponado observa-se uma diminuição na degradação de proteínas do leite decorrente da adição crescente de AUN ao meio. Embora Das e Banerjee (1982b) tenham relatado uma inibição na produção de lipases e queratinases em *T. rubrum* na presença de AUN, em nossos experimentos tal inibição não foi observada, possivelmente porque as concentrações de droga analisadas e o método de detecção enzimática não foram os mesmos.

Outro fato relevante foi o crescimento da linhagem selvagem de *T. rubrum* nos meios de cultivo (para teste de queratinase, protease e lipase) que continham concentrações de AUN superiores aos valores de CIM nos meios Sabouraud e RPMI. Alguns trabalhos mostram que a concentração de glicose, a composição e o pH do meio de cultivo influenciam no crescimento dos fungos, e conseqüentemente nos testes de sensibilidade a agentes antifúngicos (Klepser *et al.*, 1997; Cuenca-Estrella *et al.*, 2001; Bartizal e Odds, 2003). Deste modo, o crescimento observado nos meios contendo AUN poderia ser explicado pela influência destes fatores, uma vez que os meios utilizados foram suplementados com glicose e havia variação nos valores de pH, além da presença de proteínas nestes meios de cultivo. A droga poderia também perder sua atividade antifúngica por estar sendo inibida pela presença de tais componentes.

Outra abordagem deste trabalho foi analisar genes diferencialmente expressos entre as linhagens sensível e resistente. O conhecimento dos genes que são expressos e o nível de expressão destes genes fornece informações importantes sobre os processos celulares que o organismo está realizando e sobre a regulação da expressão de alguns genes, além de ajudar a elucidar a função de genes de interesse (Horak e Snyder, 2002). Deste modo, avaliar os genes que são diferencialmente expressos entre as linhagens selvagem e mutante pode fornecer informações sobre os mecanismos moleculares envolvidos no processo de resistência ao AUN, assim como aqueles envolvidos na resposta de *T. rubrum* à exposição a esta droga. Os experimentos de DDRT-PCR mostraram um perfil de expressão gênica diferente para as linhagens em estudo. Porém, como o seqüenciamento do genoma de *T. rubrum* ainda não foi realizado, as buscas por similaridade entre seqüências foram realizadas com base nos bancos de dados públicos. As

análises das seqüências dos clones obtidos por estes experimentos mostraram que a maioria das ESTs apresenta similaridade com proteínas hipotéticas conservadas (que não apresentam função conhecida) ou não apresentam similaridade com nenhuma proteína já depositada nos bancos de dados. Esta falta de similaridade pode ser devido ao tamanho das seqüências analisadas, já que algumas delas tinham entre 100 a 200 bases, ou ainda as ESTs poderiam corresponder a genes novos, ou genes exclusivos de *T. rubrum*.

O clone 2.6 foi o único que apresentou similaridade com proteínas de função descrita, sendo sua seqüência similar à H⁺-ATPase de membrana plasmática de *Ajellomyces capsulatus*. Este clone teve sua expressão diferencial confirmada através de *reverse northern blot* (Figura 23), no qual o sinal de hibridação entre este fragmento com o *pool* cDNAs da linhagem mutante foi mais forte do que com o da linhagem selvagem. Esta proteína pertence à família *P-type* de enzimas transportadoras de íons e desempenha um importante papel na fisiologia celular, auxiliando na regulação do pH intracelular e na manutenção do potencial eletroquímico transmembrana, necessário para a captação de nutrientes (Serrano, 1988). A H⁺-ATPase é uma proteína predominante na membrana plasmática, composta de uma única subunidade de aproximadamente 100 KDa contendo um domínio transmembrana responsável pelo transporte, e um domínio catalítico citoplasmático responsável pela hidrólise do ATP. O gene que codifica esta proteína (*pma1*) foi clonado em diversos fungos e se mostra altamente conservado. Experimentos de ruptura gênica em *Saccharomyces cerevisiae* (Serrano *et al.*, 1986), *A. nidulans* (Reoyo *et al.*, 1998) e *C. neoformans* (Soteropoulos *et al.*, 2000) demonstraram que este gene é essencial para os fungos estudados, sendo sua ausência letal. Além disso, a H⁺-ATPase de *C. neoformans* pôde ser inibida tanto *in vitro* como *in vivo* e esta inibição resultou em morte celular (Soteropoulos *et al.*, 2000). Deste modo, a H⁺-ATPase se revela um excelente alvo para drogas antifúngicas, pois em humanos as proteínas desta família são diferentes das encontradas em fungos (Monk e Perlin, 1994; Monk *et al.*, 1995). Foi demonstrada também a participação da H⁺-ATPase na patogenicidade fúngica, em *C. albicans*, através de seu efeito no dimorfismo (Stewart *et al.*, 1988; Monk *et al.*, 1993), na captação de nutrientes e na acidificação do meio (Prasad, 1987).

O fato da H⁺-ATPase ser uma enzima que participa no processo de captação de nutrientes e na regulação do pH intracelular, sugere que uma maior expressão deste gene pela linhagem mutante poderia ser um mecanismo molecular para compensar o crescimento mais lento desta linhagem, possibilitando a captação de nutrientes e conseqüentemente a sobrevivência da linhagem no meio de cultivo. Como o gene *pma1* é

essencial, a diferença de expressão observada neste estudo (variação quantitativa de expressão) é provavelmente devido a uma maior expressão deste gene pela linhagem UDA^r, comparada com a linhagem selvagem cuja expressão é basal (constitutiva) e por isso foi fracamente detectada nos experimentos realizados. Experimentos para quantificar a expressão gênica, através da metodologia de RT-PCR ou PCR em tempo real, poderiam ser utilizados para comparar os níveis de expressão do gene *pma1* nas duas linhagens.

A busca por domínios conservados nas seqüências das proteínas hipotéticas encontradas nos experimentos de DDRT-PCR poderia dar indícios de suas funções. Apenas três clones apresentaram domínios conhecidos. O clone 1.3 apresenta similaridade com uma proteína hipotética de *A. nidulans*. Esta proteína e a EST de *T. rubrum* isolada apresentam um domínio J (ou DnaJ) conservado, o qual está associado ao sistema de proteínas de choque térmico de 70KDa (Hsp70). As proteínas que apresentam tal domínio interagem direta ou indiretamente com as Hsp70, que auxiliam na formação da estrutura terciária de outras proteínas e no transporte intracelular. A função exata destes domínios dentro de uma proteína ainda não está bem elucidada. Alguns autores sugerem que a estrutura e a função das proteínas que apresentam este domínio devem estar envolvidas em processos biológicos fundamentais, como a regulação de proteínas quinases e exocitose, pelo fato dessas proteínas serem altamente conservadas, estando presentes em bactérias, fungos, plantas, animais e alguns vírus (Kelley, 1998). O clone 15.1 apresenta similaridade com outra proteína hipotética de *A. nidulans*, apresentando um domínio *haloacid dehalogenase-like hydrolase*, família que inclui L-2-haloacid dehalogenase, epoxide hydrolases e fosfatases.

Outro clone cuja seqüência apresentou similaridade com domínios conservados foi o 17.1, o qual apresenta similaridade com proteínas hipotéticas conservadas. O domínio peptidil-prolil cis-trans isomerase (PPIase ou rotamase) encontrado na seqüência deste clone, está presente em enzimas que participam da formação da estrutura terciária de outras proteínas. Porém, este domínio está descrito como um domínio hipotético, também sem função esclarecida. Entretanto, a expressão diferencial destes genes não foi confirmada pela técnica de *reverse northern blot* e, portanto, deverá ser examinada por técnicas mais apuradas como *northern blot*, RT-PCR ou até mesmo PCR em tempo real, uma vez que a expressão diferencial destes genes entre as condições estudadas pode ser no nível de expressão.

Em organismos cujo genoma foi completamente seqüenciado, os genes que codificam proteínas hipotéticas representam aproximadamente 50% dos genes

identificados. Os genes identificados neste trabalho poderão ser isolados da biblioteca genômica de *T. rubrum*, já construída em nosso laboratório. O conhecimento da sequência completa destes genes permitirá sua melhor caracterização funcional. A dedução da sequência protéica, codificada pelos genes hipotéticos, poderá levar à identificação de outros domínios conservados e conseqüentemente à obtenção de novas informações funcionais. Além disso, a funcionalidade dos genes de interesse também pode ser avaliada através da obtenção de linhagens de *T. rubrum* com o gene rompido. Análises de expressão gênica através de técnicas mais apuradas como *northern blot*, RT-PCR ou PCR em tempo real podem ser utilizadas para caracterizar as proteínas hipotéticas, e principalmente confirmar a expressão dos genes obtidos por DDRT-PCR, já que alguns clones não foram confirmados através da metodologia de *reverse northern blot*, ou seja, não foram detectados nas condições em que tinham sido isolados (como ocorreu com os clones 1.6 e 7.4 - Figura 23).

O atual trabalho lança novas perspectivas para a compreensão dos mecanismos adaptativos e os de resistência a drogas em *T. rubrum* e sua relação com a secreção de enzimas e a patogenicidade deste dermatófito. Em adição, os resultados obtidos abrem novas possibilidades para o estudo da expressão de novos genes, até então considerados hipotéticos.

VI. Conclusão

- ❖ A linhagem de *T. rubrum* UDA^r cresce mais lentamente e é cerca de quatro vezes mais resistente ao ácido undecanóico que a linhagem controle MYA-3108. A diferença no crescimento das linhagens foi superada na presença de glicina ou em pH 5,0 tamponado, sugerindo que tal linhagem apresenta uma dificuldade em alcalinizar o meio de cultivo, podendo ser uma desvantagem do ponto de vista patogênico.
- ❖ Em condições que mimetizam a infecção *in vitro*, os conídios da linhagem resistente foram capazes de germinar sobre os fragmentos de unha humana de modo menos agressivo que a linhagem selvagem.
- ❖ Para que a linhagem resistente possa adquirir nutrientes do meio e sobreviver é sugerido um mecanismo de adaptação através da secreção de enzimas proteolíticas, devido à maior secreção de enzimas proteolíticas e queratinolíticas por essa linhagem.
- ❖ A presença do AUN, nas concentrações testadas, não interferiu significativamente na secreção das enzimas proteolíticas e queratinolíticas.
- ❖ A maior expressão de um gene que codifica uma H⁺-ATPase de membrana plasmática sugere um mecanismo molecular que pode contribuir para a captação de nutrientes pela linhagem resistente, devido ao envolvimento desta proteína no transporte de íons, na regulação do pH intracelular e na aquisição de nutrientes.

VII. Perspectivas

- ❖ Experimentos de infecção *in vivo* através da inoculação de conídios das linhagens em cobaias poderão revelar se a linhagem mutante manteve ou não sua patogenicidade. Se a linhagem for capaz de infectar as cobaias, estudos histopatológicos do tecido infectado podem ser realizados para analisar se a resposta celular desencadeada pelas duas linhagens em estudo foi semelhante.
- ❖ Análises quantitativas da expressão gênica poderão ser realizadas com o gene que codifica a H⁺-ATPase, e também para os outros genes identificados no DDRT-PCR, para revelar os níveis de expressão deste (s) gene (s) nas linhagens estudadas.
- ❖ Várias proteínas hipotéticas foram obtidas a partir dos experimentos de DDRT-PCR, as quais são alvos interessantes para estudos funcionais. Tais estudos podem envolver a caracterização da expressão destes genes nas linhagens de *T. rubrum* selvagem e mutante UDA^r em diferentes condições ambientais como pH e concentrações distintas de droga. Além disso, há também a possibilidade de se obter linhagens de *T. rubrum* com o gene rompido, através da construção de cassetes de ruptura gênica e transformação por recombinação homóloga.

VI. Referências bibliográficas

- Agarwal AK, Rogers PD, Baerson SR, Jacob MR, Barker KS, Cleary JD, Walker LA, Nagle DG, Clark AM (2003). Genome-wide expression profiling of the response to polyene, pyrimidine, azole, and echinocandin antifungal agents in *Saccharomyces cerevisiae*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 278 (37): 34988-35015.
- Ali M, Markham AF, Isaacs JD (2001). Application of differential display to immunological research. **J. Immunol. Methods.** 250(1-2):29-43.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** 25(17): 3389-3402.
- Anstey A, Lucke TW, Philpot C (1996). Tinea cepitis caused by *Trichophyton rubrum*. **Br. J. Dermatol.** 135: 113-115.
- Apodaca G and McKerrow JH (1989a). Regulation of *Trichophyton rubrum* proteolytic activity. **Infect. Immun.** 3081-3090.
- Apodaca G and McKerrow JH (1989b). Purification and characterization of a 27,000-Mr extracellular proteinase from *Trichophyton rubrum*. **Infect. Immun.** 57(10):3072-3080.
- Apodaca G and McKerrow JH (1991). Expression of proteolytic activity by cultures of *Trichophyton rubrum*. **J. Med. Veter. Mycol.** 28(2): 159-171.
- Atlas RM (1993). Handbook of microbiological media. Edited by Lawrence C. Perks. Ed. CRC Press. pp786.
- Avrahami D and Shai Y (2002). Conjugation of a magainin analogue with lipophilic acids controls hydrophobicity, solution assembly, and cell selectivity. **Biochem.** 41: 2254-2263.

-
- Avrahami D and Shai Y (2003). Bestowing antifungal and antibacterial activities by lipophilic acid conjugation to D,L-amino acid-containing antimicrobial peptides: a plausible mode of action. **Biochem.** 42: 14946-14956.
- Bammert GF and Fostel JM (2000). Genome – wide expression patterns in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of drug treatments and genetic alterations affecting biosynthesis of ergosterol. **Antimicrob. Agents Chemother.** 44 (5): 1255 -1265.
- Barker KS, Crisp S, Wiederhold N, Lewis RE, Bareither B, Eckstein J, Barbuch R, Bard M, Rogers PD (2004). Genome-wide expression profiling reveals genes associated with amphotericin B and fluconazole resistance in experimentally induced antifungal resistant isolates of *Candida albicans*. **J. Antimicrob. Chemother.** 54(2):376-385.
- Bartizal C, Odds FC (2003). Influences of methodological variables on susceptibility testing of caspofungin against *Candida* species and *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 47(7):2100-2107.
- Baron S (1996). Medical Microbiology. 4th ed. Galveston (TX - USA), section 5.
- Bertioli DJ, Schlichter UH, Adams MJ, Burrows PR, Steinbiss HH, Antoniw JF. (1995). An analysis of differential display shows a strong bias towards high copy number mRNAs. **Nucleic Acids Res.** 23(21):4520-4523.
- Bibel DJ, Aly R, Shah S, Shinefield HR (1993). Sphingosines: antimicrobial barriers of the skin. **Acta. Dermatol. Venereol.** 73: 407-411.
- Brasch J and Gottkehasckamp D (1992). The effect of selected human steroid hormones upon the growth of dermatophytes with different adaptation to man. **Mycopathologia** 120:98-102.
- Brasch J, Martin B-S, Christophers E (1991). Enzyme release by *Trichophyton rubrum* depends on nutritional conditions. **Mycoses** 34: 365-368.

- Casadevall A and Pirofski LA (1999). Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. **Infect. Immun.** 67(8): 3703-3713..
- Casadevall A and Pirofski LA (2001). Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. **J. Infect. Dis.** 184: 337-344.
- Cervelatti EP (2003). Aspectos moleculares da resistência a drogas e patogenicidade de *Trichophyton rubrum*: identificação e caracterização funcional de um transportador do tipo ABC e análise do transcriptoma deste dermatófito. Tese de doutorado apresentada ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão-USP, 119 pps.
- Cervelatti EP, Ferreira-Nozawa MS, Aquino-Ferreira R, Fachin AL, Martinez-Rossi NM (2004). Electrophoretic molecular karyotype of the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Gen. Mol. Biol.** 27(1): 99-112.
- Chinelli PAV, Sofiatti AA, Nunes RS, Martins JEC (2003). Dermatophyte agents in the city of São Paulo from 1992 to 2002. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo** 45(5): 259-263.
- Clark JF (1899). Toxic effects of deleterious agents on the germination and development of certain filamentous fungi. **Botan. Gaz.** 28: 289-404.
- Clemons KV, Schär G, Stover EP, Feldman D, Stevens DA (1988). Dermatophyte-hormone relationships: Progesterone binding specificity in the genera *Trichophyton* and *Microsporum*. **J. Clin. Microbiol.** 26:2110-2115.
- Clemons KV, Stover EP, Schär G, Stathis PA, Chan K, Tokes L, Stevens DA, Feldman D (1989). Steroids metabolism as a mechanism of escape from progesterone-mediated growth inhibition in *Trichophyton mentagrophytes*. **J. Biol. Chem.** 264:11186-11192.
- Collins JP, Grappel SF, Blank F (1973). Role of keratinases in dermatophytosis. II. Fluorescent antibody studies with keratinase II of *Trichophyton mentagrophytes*. **Dermatologica** 146(2):95-100.

- Costa M, Passos XS, Souza LKH, Miranda ATB, Lemos JA, Júnior JGO, Silva RR (2002). Epidemiologia e etiologia das dermatofitoses em Goiânia, GO, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 35(1): 19-22.
- Cove DJ (1966). The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. **Biochim. Biophys. Acta** 113: 51-56.
- Cuenca-Estrella M, Diaz-Guerra TM, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL (2001). Influence of glucose supplementation and inoculum size on growth kinetics and antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. **J. Clin. Microbiol.** 39(2):525-532.
- Das SK and Banerjee AB (1982a). Effect of undecanoic acid on phospholipid metabolism in *Trichophyton rubrum*. **Sabouraudia** 20: 267-272.
- Das SK and Banerjee AB (1982b). Effect of undecanoic acid on the production of exocellular lipolytic and keratinolytic enzymes by undecanoic acid-sensitive and resistant strains of *Trichophyton rubrum*. **Sabouraudia** 20: 179-184.
- Defina TPA (2003). Monitoramento da expressão gênica de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* em diferentes condições ambientais. Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Biociências – UNESP Rio Claro, 82 pps.
- Dilks DW, Ring RH, Khawaja XZ, Novak TJ, Aston C (2003). High-throughput confirmation of differential display PCR results using reverse Northern blotting. **J. Neurosci. Methods.** 123(1):47-54.
- Dixon DM (2001). *Coccidioides immitis* as a select agent of bioterrorism. **J. Appl. Microbiol.** 91: 602-605.
- Duek L, Kaufman G, Ulman Y, Berdicevsky I (2004). The pathogenesis of dermatophyte infections in human skin sections. **J. Infect.** 48: 175-180.

- Esquenazi D, Alviano CS, Souza W, Rozental S (2004). The influence of surface carbohydrates during *in vitro* infection of mammalian cells by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Res. Microbiol.** 155: 144-153.
- Esquenazi D, Souza W, Alviano C S, Rozental S (2003). The role of surface carbohydrates on the interaction of microconidia of *Trichophyton mentagrophytes* with epithelial cells. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** 35:113-123.
- Ewing B and Green P (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Res.** 8(3): 186-194.
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Res.** 8(3): 175-185.
- Fachin AL (2001). Clonagem e caracterização do gene *atrD* que codifica um transportador do tipo ABC (*ATP-Binding Cassette*) envolvido na resistência a múltiplas drogas no dermatófito *Trichophyton rubrum*. Tese de doutorado apresentada ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão-USP, 123 pps.
- Fachin AL, Maffei CM, Martinez-Rossi NM (1996). *In vitro* susceptibility of *Trichophyton rubrum* isolates to griseofulvin and tioconazole. Induction and isolation of a resistant mutant to both antimycotic drugs. Mutant of *Trichophyton rubrum* resistant to griseofulvin and tioconazole. **Mycopathologia** 135(3):141-143.
- Ferreira-Nozawa MS, Nozawa SR, Martinez-Rossi NM, Rossi A (2003). The dermatophyte *Trichophyton rubrum* secretes an EDTA-sensitive alkaline phosphatase on high-phosphate medium. **Bras. J. Microbiol.** 34:161-164.
- Fidel PL, Sobel JD (1994). The role of cell-mediated immunity in candidiasis. **Trends Microbiol.** 2:202-206.
- Fislage R (1998). Differential display approach to quantitation of environmental stimuli on bacterial gene expression. **Electrophoresis** 19(4):613-616.

- Fleming JT, Yao W, Sauler GS (1998). Optimization of differential display of prokaryotic mRNA: application to pure culture and soil microcosms. **Appl. Environ. Microbiol.** 64(10):3698-3706.
- Foster KW, Ghannoum MA, Elewski BE (2004). Epidemiologic surveillance of cutaneous fungal infection in the United States from 1999 to 2002. **Am. Acad. Dermatol.** 50(5): 748-752.
- Garg AP and Muller J (1993). Fungitoxicity of fatty acids against dermatophytes. **Mycoses** 36: 51-63.
- Georgopapadakou NH, Walsh TJ (1996). Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. **Antimicrob. Agents Chemother.** 40(2):279-291.
- Glover DJ, McEwen RK, Thomas CR, Young TW (1997). pH-regulated expression of the acid and alkaline extracellular proteases of *Yarrowia lipolytica*. **Microbiology** 143(9): 3045-3054.
- Gonzalez-Lopez CI, Szabo R, Blanchin-Roland S, Gaillardin C (2002). Genetic control of extracellular protease synthesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Genetics** 160(2):417-427.
- Gorani A, Schiera A, Oriani A (2002). Case Report. Widespread tinea corporis due to *Trichophyton rubrum*. **Mycoses** 45(5-6):195-197.
- Gozaldo D, Elorza MV, Sanjuan R, Marcilla A, Valentin E, Sentandreu R (1993). Critical steps in fungal cell wall synthesis: strategies for their inhibition. **Pharmacol. Therap.** 60: 337-345.
- Graminha MAS, Rocha EMF, Prade RA, Martinez-Rossi NM (2004). Terbinafine resistance mediated by salicylate 1-monooxygenase in *Aspergillus nidulans*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 48(9): 3530-3535.

- Grappel SF and Blank F (1972). Role of keratinases in dermatophytosis. I. Immune responses of guinea pigs infected with *Trichophyton mentagrophytes* and guinea pigs immunized with keratinases. **Dermatologica** 145(4):245-255.
- Grossman ME, Pappert AS, Garzon MC, Silvers DN (1995). *Trichophyton rubrum* infection in the immunocompromised host: report of three cases. **J. Am. Acad. Dermatol.** 33: 315-318.
- Hartree EF. (1972). Determination of protein: a modification of lowry method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.** 48: 422-427.
- Heseltine WW (1952). Sodium propionate and its derivatives as bacteriostatics and fungistatics. **J. Pharm. Pharmacol.** 4:577-581.
- Hill CE, Metcalf DS, MacInnes JI. (2003). A search for virulence genes of *Haemophilus parasuis* using differential display RT-PCR. **Vet. Microbiol.** 96(2):189-202.
- Hogan L, Klein B, Levitz S (1996). Virulence factors of medically important fungi. **Clin. Microbiol. Rev.** 9: 169-488.
- Horak CE and Snyder M. (2002). Global analysis of gene expression in yeast. **Funct. Integr. Genomics** 2: 171-180.
- Horsfall JG (1956). Principles of fungicidal actions. Waltan, Massachusetts: Chron. Bot. Co. 89-112.
- Hynes MJ and Kelly JM (1977). Pleiotropic mutants of *Aspergillus nidulans* altered in carbon metabolism. **Mol. Gen. Genet.** 50(2):193-204.
- Jackson CJ, Barton RC, Evans EG (1999). Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal DNA intergenic spacer regions. **J. Clin. Microbiol.** 37: 931-936.

- Jarvis MR (1995). Epidemiology of nosocomial fungal infections with emphasis on *Candida* species. **Clin. Inf. Dis.** 20: 1526-1530.
- Jennings MB, Weinberg JM, Koestenblatt EK, Lesczczynski C (2002). Study of clinically suspected onychomycosis in a podiatric population. **J. Am. Podiatr. Med. Assoc.** 92: 327-330.
- Jousson O, Lechenne B, Bontems O, Capoccia S, Mignon B, Barblan J, Quadroni M, Monod M (2004b). Multiplication of an ancestral gene encoding secreted fungalysin preceded species differentiation in the dermatophytes *Trichophyton* and *Microsporum*. **Microbiology** 150(Pt 2):301-310.
- Jousson O, Lechenne B, Bontems O, Mignon B, Reichard U, Barblan J, Quadroni M, Monod M (2004a). Secreted subtilisin gene family in *Trichophyton rubrum*. **Gene** 339:79-88.
- Katz ME, Flynn PK, vanKuyk PA, Cheetham BF (1996). Mutations affecting extracellular protease production in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. **Mol. Gen. Genet.** 250: 715-724.
- Keeney EL, Ajello L, Broyles EN, Lankford E (1944). Propionate and undecylenate ointments in the treatment of tinea pedis in vitro comparasion of their fungistatic and antibacterial effects with other ointments. **Bull. Johns. Hopk. Hosp.** 75: 417-439.
- Kelley WL (1998). The J-domain family and the recruitment of chaperone power. **Trends Biochem Sci.** 23(6):222-227.
- Kiesel A (1913). Recherches sur L'action de divers acides et sels acides sur le developement de L'*Aspergillus niger*. **Ann. Inst. Pasteur.** 27: 391-420.
- King RD, Khan HA, Foye JC, Greenberg JH, Jones JE (1975). Transferrin, iron, and dermatophytes. I. Serum dermatophyte inhibitory component definitively identified as unsaturated transferrin. **J. Lab. Clin. Med.** 86: 204-212.

- Klepser ME, Ernst EJ, Ernst ME, Pfaller MA (1997). Growth medium effect on the antifungal activity of LY 303366. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 29(4):227-231.
- Kok RG, Nudel CB, Gonzalez RH, Nugteren IM, Hellingwerf KJ (1996). Physiological factors affecting production of extracellular lipase (LipA) in *Acinetobacter calcoaceticus* BD413: Fatty acid repression of *lipA* expression and degradation of LipA. **J. Bacteriol.** 178: 6025-6035.
- Kwon-Chung KJ and Bennett JE (1992). Medical mycology. Ed. Lea and Febiger, USA. pp 105-161.
- Liang P and Pardee AB (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science** 257: 967-971.
- Liang P and Pardee AB (2003). Analysing differential gene expression in cancer. **Nat. Rev. Cancer** 3(11):869-876.
- Liang P, Zhu W, Zhang X, Guo Z, O'Connell RP, Averboukh L, Wang F, Pardee AB (1994). Differential display using one-base anchored oligo-dT primers. **Nucleic Acids Res.** 22(25): 5763-5764.
- Marr KA, Patterson T, Denning D (2002). Aspergillosis. Pathogenesis, clinical manifestations, and therapy. **Infect. Clin. North. Am.** 16:875-894.
- Martin KJ and Pardee AB (2000). Identifying expressed genes. **Proc Natl. Acad. Sci. USA** 97(8): 3789-3791.
- Martinez-Rossi NM (1995). Agentes antimicóticos: mecanismos de ação e genética da resistência. Tese de Livre-Docência, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.
- Martinez-Rossi NM, Ferreira-Nozawa MS, Graminha MAS, Nozawa SR, Fachin AL, Cervelatti EP, Prade RA, Rossi A (2004). Molecular aspects of dermatophyte-host interactions. *In* Fungi in Human and animal Health. Ed Scientific Publishers, Jodhpur, Índia. 143-165p.

- McGinnis MR (1980). Laboratory handbook of medical mycology. Academic Press, New York.
- Minelli L (1991). Micoses superficiais, esporotricose e micetomas. *In* Doenças transmissíveis, Ed. Savier 3ª edição.
- Monk BC and Perlin DS (1994). Fungal plasma membrane proton pumps as promising new antifungal targets. **Crit. Rev. Microbiol.** 20(3):209-223.
- Monk BC, Mason AB, Abramochkin G, Haber JE, Seto-Young D, Perlin DS (1995). The yeast plasma membrane proton pumping ATPase is a viable antifungal target. I. Effects of the cysteine-modifying reagent omeprazole. **Biochim. Biophys. Acta** 1239(1):81-90.
- Monk BC, Niimi M, Sheperd MG (1993). The *Candida albicans* plasma membrane and H⁺-ATPase during yeast growth and germ tube formation. **J. Bacteriol.** 175: 5566-5573.
- Monod M and Borg-von ZM (2002). Secreted aspartic proteases as virulence factors of *Candida* species. **Biol. Chem.**383(7-8): 1087-1093.
- Monod M, Jaccoud S, Zaugg C, Lechenne B, Baudraz F, Panizzon R (2002). Survey of dermatophyte infections in the Lausanne area Switzerland. **Dermatol.** 205(2): 201-203.
- Mukherjee PK, Leidich SD, Isham N, Leitner I, Ryder NS, Ghannoum A (2003). Clinical *Trichophyton rubrum* strain exhibiting primary resistance to terbinafine. **Antimicrob. Agents Chemother.** 47(1): 82-86.
- Mulder NJ, Apweiler R, Attwood TK, Bairoch A, Barrell D, Bateman A, Binns D, Biswas M, Bradley P, Bork P, Bucher P, Copley RR, Courcelle E, Das U, Durbin R, Falquet L, Fleischmann W, Griffiths-Jones S, Haft D, Harte N, Hulo N, Kahn D, Kanapin A, Krestyaninova M, Lopez R, Letunic I, Lonsdale D, Silventoinen V, Orchard SE, Pagni

M, Peyruc D, Ponting CP, Selengut JD, Servant F, Sigrist CJ, Vaughan R, Zdobnov EM (2003). The InterPro Database, 2003 brings increased coverage and new features. **Nucleic Acids Res.** 31(1):315-318.

Mushin TM, Aubaudi AH, Al-Duboon AH (1997). Extracellular enzyme activities of dermatophytes and yeast isolates on solid media. **Mycoses** 40: 465-469.

Nathanson RB (1972). The fungistatic action of oleic, linoleic and linolenic acids on *Trichophyton rubrum* in vitro. **J. Invest. Dermat.** 35: 261-263.

Nir-Paz R, Elinav H, Pierard GE, Walker D, Maly A, Shapiro M, Barton RC, Polacheck I (2003). Deep infection by *Trichophyton rubrum* in an immunocompromised patient. **J. Clin. Microbiol.** 41(11): 5298-5301.

Novick NL, Tapia L, Bottone EJ (1987). Invasive *Trichophyton rubrum* infection in an immunocompromised host. **Am. J. Med.** 82: 321-325.

Odds FC, Brown AJP, Gow NAR (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends Microbiol.** 11(6): 272-279.

Ogawa H, Summerbell RC, Clemons KV, Koga T, Ran Y-P, Rashid A, Sohnle PG, Stevens DA, Tsuboi R (1998). Dermatophytes and host defense in cutaneous mycoses. **Med. Mycol.** 36(supplI): 166-173.

Ogrydziak DM, Demain AL, Tannenbaum SR (1977). Regulation of extracellular protease production in *Candida lipolytica*. **Biochem. Biophys. Acta.** 497(2): 525-538.

Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO (1982). Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia** 20(1):7-14.

Peck SM and Rosenfeld H (1938). The effects of hydrogen ion concentration, fatty acids and vitamin C on the growth of fungi. **J. Invest. Dermatol.** 1:237-265.

- Pereira M, Fachin AL, Martinez-Rossi NM (1998). The gene that determines resistance to tioconazole and to acridine derivatives in *Aspergillus nidulans* may have a corresponding gene in *Trichophyton rubrum*. **Mycopathologia** 143: 71-75.
- Porta A and Maresca B (2000). Host response and *Histoplasma capsulatum*/macrophage molecular interactions. **Med. Mycol.** 38(6):399-406.
- Posteraro B, Sanguinetti M, Sanglard D, La Sorda M, Boccia S, Romano L, Morace G, Fadda G (2003). Identification and characterization of a *Cryptococcus neoformans* ATP binding cassette (ABC) transporter-encoding gene, *CnAFRI*, involved in the resistance to fluconazole. **Mol. Microbiol.** 47(2):357-371.
- Prasad R (1987). Nutrient transport in *Candida albicans*, a pathogenic yeast. **Yeast** 3(4): 209-221.
- Prigneau O, Porta A, Poudrier JA, Colonna-Romano S, Noel T, Maresca B (2003). Genes involved in beta-oxidation, energy metabolism and glyoxylate cycle are induced by *Candida albicans* during macrophage infection. **Yeast** 20(8): 723-30.
- Ray TL and Payne CD (1988). Scanning electron microscopy of epidermal adherence and cavitation in murine candidiasis: a role for *Candida* acid proteinase. **Infect. Immun.** 56: 1942-1949.
- Reoyo E, Espeso EA, Peñalva MA, Suárez T (1998). The essential *Aspergillus nidulans* gene *pmaA* encodes a homologue of plasma membrane H⁺-ATPases. **Fungal Gen. Biol.** 23: 288-299.
- Rocha EMF, Almeida CB, Martinez-Rossi NM (2002). Identification of genes involved in terbinafine resistance in *Aspergillus nidulans*. **Lett. Appl. Microbiol.** 35: 228-232.
- Romani L (2004). Immunity to fungi. **Nat. Rev. Immunol.** 4: 1-10.
- Roth FJ Jr, Boyd CC, Sagami S, Blank H (1959). An evaluation of the fungistatic activity of serum. **J. Invest. Dermatol.** 32(5): 549-556.

- Rude TH, Toffaletti DL, Cox GM, Perfect JR (2002). Relationship of the glyoxylate pathway to the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.** 70(10): 5684-5694.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd Edition. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York-USA.
- Samson FA, Katz AM, Harris DL (1955). Effects of acetate and other short chain fatty acids on yeast metabolism. **Arch. Biochem. Biophys.** 54: 407-423.
- Schär G, Stover EP, Clemons KV, Feldman D, Stevens DA (1986). Progesterone binding and inhibition of growth in *Trichophyton mentagrophytes*. **Infect. Immun.** 52: 763-767.
- Serrano R (1988). Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membrane of plants and fungi. **Biochim. Biophys. Acta** 947: 1-28.
- Serrano R, Kielland-Brandt MC, Fink GR (1986). Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺ + K⁺), K⁺ and Ca²⁺ - ATPase. **Nature** 319:689-693.
- Singh JS (1997). Characterization of extracellular keratinase of *Trichophyton simii* and its role in keratin degradation. **Mycopathology** 137: 493-500.
- Sohnle PG (1993). Dermatophytosis. *In* Fungal infections and immune responses. Plenum Press, New York, pp.27-47.
- Soteropoulos P, Vaz T, Santangelo R, Paderu P, Huang DY, Tamás MJ, Perlin DS (2000). Molecular characterization of the plasma membrane H⁺-ATPase, an antifungal target in *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 44(9): 2349-2355.
- Speth C, Rambach G, Lass-Flörl C, Dierich MP, Würzner R (2004). The role of complement in invasive fungal infections. **Mycoses** 47: 93-103.

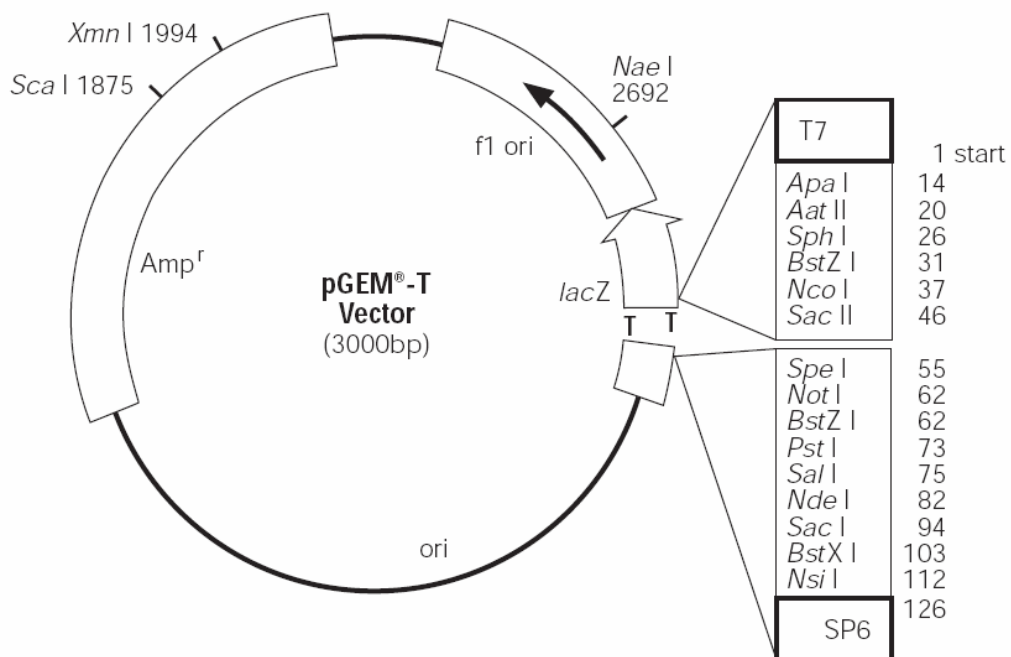
- Squeo RF, Beer R, Silvers D, Weitzman I, Grossman M. (1998). Invasive *Trichophyton rubrum* resembling blastomycosis infection in the immunocompromised host. **J. Am. Acad. Dermatol.** 39: 379-380.
- Staib P, Kretschmar M, Nichterlein T, Hof H, Morschhauser J (2000). Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 97(11): 6102-6107.
- Stewart E, Gow NA, Bowen DV (1988). Cytoplasmic alkalinization during germ tube formation in *Candida albicans*. **Gen. Microbiol.** 135 (Pt 5):1079-1087.
- Sturtevant J (2000). Applications of differential-display reverse transcription-PCR to molecular pathogenesis and medical mycology. **Clin. Microbiol. Rev.** 13(3): 408-427.
- Swan JW, Dahl MV, Coppo PA, Hammerschmidt DE (1983). Complement activation by *Trichophyton rubrum*. **J. Invest. Dermatol.** 80(3): 156-158.
- Tagami H, Kudoh K, Takematsu H (1989). Inflammation and immunity in dermatophytosis. **Dermatologica** 179(suppl 1): 1-8.
- Takasuka T. (2000). Amino acid- or protein-dependent growth of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** 29(4): 241-245.
- Tateishi Y, Sato H, Akiyama M, Abe M, Kobayashi H, Umehara S, Yamaguchi J, Shibaki H, Shimizu H (2004). Severe generalized deep dermatophytosis due to *Trichophyton rubrum* (trichophytic granuloma) in a patient with atopic dermatitis. **Arch. Dermatol.** 140(5): 624-625.
- Thedei G Jr, Doubowetz TH, Rossi A (1994). Effect of carbon sources and extracellular pH on the acidification of the culture medium and phosphatase excretion in *Neurospora crassa*. **Brazilian J. Med. Biol. Res.** 27: 1129-1134.

- Thornton RH and Taylor WB (1963). Antifungal activity of fatty acids to *Pithomices chartarum* (Berk. and Curt.) M. B. Ellis in field trials. **N. Z. J. Agric. Res.** 6: 329-342.
- Thornton RH (1963). Antifungal activity of fatty acids to *Pithomices chartarum* (Berk. and Curt.) M. B. Ellis and other fungi. **N. Z. J. Agric. Res.** 6: 469-483.
- Tsuboi R, Ko IK, Takamori K, Ogawa H (1989). Isolation of keratinolytic proteinase from *Trichophyton mentagrophytes* with enzymatic activity at acidic pH. **Infect. Immun.** 57: 3479-3483.
- Vorwerk S, Somerville S, Somerville C (2004). The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. **Trends in Plant Sci.** 9(4):203-209.
- Venancio EJ, Kyaw CM, Mello CV, Silva SP, Soares CM, Felipe MS, Silva-Pereira I (2002). Identification of differentially expressed transcripts in the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by differential display. **Med. Mycol.** 40(1): 45-51.
- Vicher EE, Lyon I, White EL (1959). Studies on the respiration of *Trichophyton rubrum*. **Mycopathol. Myc. Appl.** 12: 186-195.
- Wagner DK and Sohnle PG (1995). Cutaneous defenses against dermatophytes and yeasts. **Clin. Microbiol. Rev.** 8: 317-335.
- Wan JS, Sharp SJ, Poirier GM, Wagaman PC, Chambers J, Pyati J, Hom Y, Galindo JE, Huvar A, Peterson PA, Jackson MR, Erlander MG (2001). Cloning differentially expressed mRNAs. **Nat. Biotechnol.** 14:1685-1691.
- Wang H (2003). Fatal aspergillosis in a patient with SARS who was treated with corticosteroids. **N. Engl. J. Med.** 349, p. 507-508.
- Weitzman I and Summerbell R (1995). The dermatophytes. **Clin. Microbiol. Rev.** 240-259.

- White TC, Marr KA, Bowden RA (1998). Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clin. Microbiol. Rev.** 11(2): 382-402.
- Woodfolk JA, Wheatley LM, Piyasena RV, Benjamin DC, Platts-Mills TA (1998). *Trichophyton* antigens associated with IgE antibodies and delayed type hypersensitivity. Sequence homology to two families of serine proteinases. **J. Biol. Chem.** 273(45):29489-29496.
- Wyss O, Ludwig BJ, Joiner RR (1945). The fungistatic and fungicidal action of fatty acids and related compounds. **Arch. Biochem.** 7: 415-425.
- Yu RJ and Harmon SR (1968). Purification of keratinase from *Trichophyton mentagrophytes*. **J. Bacteriol.** 98: 1435-1436.
- Zais N and Rebell G (1996). Chronic dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum*. **J. Am. Acad. Dermatol.** 35(3): S17-S20.

Apêndice

Anexo I - pGEM-T



Anexo 1: Esquema do vetor de clonagem pGEM-T.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)