

Seminário Parcial de Acompanhamento e Avaliação

“Bases moleculares da interação fungo-hospedeiro: virulência, susceptibilidade, resistência e desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas”.

Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal

Instituição Executora Principal: Universidade de Brasília

Equipe – pesquisadores principais:

Subprojeto 1: Ildinete Silva Pereira; Patrícia Albuquerque; Larissa Fernandes Matos; Márcio Poças; André Moraes Nicola – todos Professores da UnB (campi Darcy Ribeiro e Ceilândia)

Subprojeto 2: Anamélia L. Bocca (UnB); Leila Maria Lopes Bezerra (UERJ)

Subprojeto 3: Márcia Renata Mortari (UnB); Renê de Oliveira Beleboni (UNAERP-RP, SP); Ana Lúcia Fachin Saltoratto (UNAERP-RP, SP).

Alunos de pós-graduação e iniciação científica – os grandes nomes de qualquer projeto

Breve contextualização do projeto e relevância do tema

Incidência mundial **CRIPTOCOCOSE**: 223 mil casos anuais com 181 mil mortes, correspondendo a cerca de 15% de todas as mortes relacionadas à AIDS

A **CANDIDÍASE** invasiva afeta cerca de 750 mil pessoas anualmente. Esta doença está intimamente associada com ambientes hospitalares.

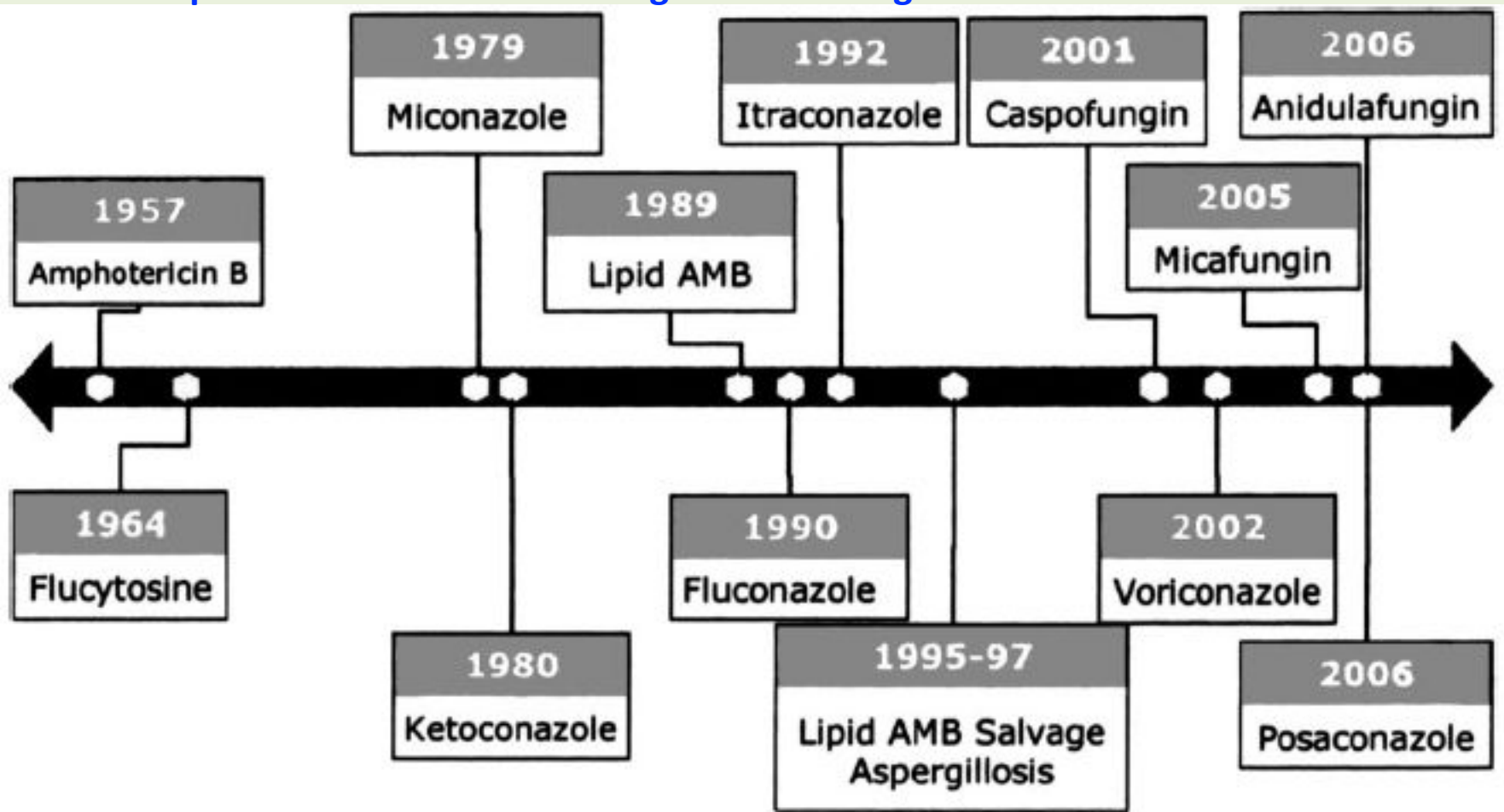
É uma das principais causas de morbidade e mortalidade, especialmente entre idosos e bebês prematuros

MOTIVAÇÃO

- ❖ pequeno número de diferentes classes de antifúngicos usados na clínica;
 - ❖ longo período de tempo requerido nos tratamentos;
 - ❖ a presença de efeitos adversos e tóxicos;
 - ❖ contaminação de inúmeros dispositivos médicos;
- ❖ geralmente atuam em um único alvo do fungo;

Breve contextualização do projeto e relevância do tema

Linha do tempo – Desenvolvimento de agentes antifúngicos

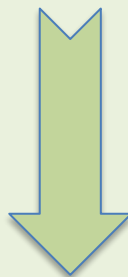
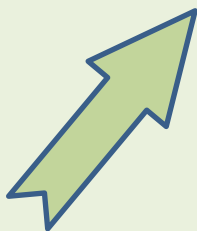


Chapman et al 2008_In Search Of The Holy Grail Of Antifungal Therapy

Breve contextualização do projeto e relevância do tema

Cenário das doenças fúngicas e dos tratamentos

- ❖ aumento da incidência de doenças fúngicas graves - um problema de saúde mundial
- ❖ o pequeno número de fármacos eficazes disponíveis na clínica
- ❖ o aumento da resistência fúngica aos antibióticos disponíveis para os tratamentos



OBJETIVOS PRINCIPAIS

Desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas antifúngicas;
Entendimento dos mecanismos usados pelos fungos patogênicos humanos para aquisição de resistência aos fármacos;
Caracterização do possível efeito de Peptídeos antimicrobianos nos atributos de virulência, bem como na interação hospedeiro-fungo

Objetivos propostos x

realizados Projeto em TRÊS subprojetos – cada um com suas METAS e RESULTADOS

Subprojeto 1 – Caracterização de novos agentes antimicrobianos e estudo de mecanismos utilizados pelos fungos no desenvolvimento de resistência aos fármacos.

Subprojeto 2 – Avaliação da resposta imunológica e inflamatória nas infecções fúngicas

Subprojeto 3 – Identificação, construção de novas estruturas e caracterização do perfil farmacodinâmico de peptídeos e outras moléculas derivadas da biodiversidade brasileira.

Objetivos propostos x realizados

principais metas do projeto a serem finalizadas

- ✓ Análise funcional de genes de diferentes categorias funcionais na expressão de atributos de virulência de *C. neoformans*;
- ✓ Plasticidade fenotípica associada aos mecanismos de suscetibilidade/resistência a fármacos em *C. neoformans* – a hipótese a ser testada nesta etapa é se linhagens mutantes para genes das vias NER e BER de reparo ao DNA, bem como aqueles para modificações pós-traducionais de histonas e para remodelagem da cromatina de *C. neoformans*, quando tratados sucessivamente com doses subletais de antifúngicos (convencionais e/ou AMPs) irão desenvolver o fenótipo de resistência aos antimicrobianos;
- ✓ Análise do perfil transcritômico de *C. neoformans* H99 em resposta ao tratamento com diferentes doses do peptídeo ToAP2 por RNA-seq;
- ✓ Análises e conclusões dos resultados obtidos pela varredura de bibliotecas de leveduras de *C. neoformans* mutantes;

Objetivos propostos x realizados

principais metas do projeto a serem finalizadas

- ✓ Estudo dos mecanismos epigenéticos do fungo *C. neoformans*, a ativação do sistema complemento em dois modelos de doenças fúngicas, como a criptococose e a esporotricose;
- ✓ Avaliação da resposta imunológica em hospedeiros imunocompetentes infectados com o fungo *Cryptococcus neoformans* e tratados com peptídeos anti-inflamatórios;
- ✓ Desenhar racionalmente e construir peptídeos com base nas avaliações dos peptídeos naturais isolados da peçonha de artrópodes ou de resultados obtidos das simulações *in silico*, utilizando ferramentas biotecnológicas;
- ✓ Avaliar os perfis farmacológicos (antifúngicos) desses compostos através de curvas de dose-efeito e tempo-efeito; avaliar o modo de ação antifúngico dos compostos mais ativos através da quantificação do nível de ergosterol e regeneração de protoplastos.

Materiais e

Métodos

Objetivo 1: Caracterização de novos agentes antimicrobianos e estudo de mecanismos utilizados pelos fungos no desenvolvimento de resistência aos fármacos.

- ✓ Segurança farmacológica dos AMPs
- ✓ Ação antifúngica dos AMPs *in vitro* e em modelos de infecção *in vivo*
- ✓ Análise do mecanismo de ação dos AMPs por vários ensaios: microscopia eletrônica de transmissão e varredura; microscopia de força atômica; citometria de fluxo; dicroísmo circular, entre outros
- ✓ Efeito da combinação de AMPs e antifúngicos convencionais
- ✓ Análise funcional de genes de diferentes categorias funcionais na expressão de atributos de virulência de *C. neoformans* (reparo DNA, modificação cromatina, entre outros)

- ✓ Plasticidade fenotípica associada aos mecanismos de suscetibilidade/resistência a fármacos em *C. neoformans* – testar [SE](#) as diferentes linhagens mutantes de *C. neoformans*, quando tratadas sucessivamente com doses subletais de antifúngicos (convencionais e/ou AMPs) irão desenvolver o fenótipo de resistência aos antimicrobianos

Perfil transcritômico de *C. neoformans* H99 em resposta ao tratamento com AMPs por RNA-seq
Varredura de bibliotecas de leveduras mutantes de *C. neoformans* (parceria com o grupo de Dr. Andrew Alspaugh)

Materiais e

Métodos 2 – Avaliação da resposta imunológica e inflamatória nas infecções fúngicas

Avaliação da resposta imunológica:

- ✓ em hospedeiros imunocompetentes infectados experimentalmente com os mutantes de *C. neoformans* que apresentam alterações na virulência
- ✓ contra *S. schenckii* e *S. brasiliensis* utilizando modelos *in vivo* e *in vitro*, macrófagos humanos derivados de monócitos
- ✓ em hospedeiros imunocompetentes infectados com o fungo *Cryptococcus neoformans* e tratados por via intranasal com peptídeos anti-inflamatórios

Análise do papel dos receptores de complemento no processo infectivo das linhagens mutantes de *C. neoformans* e *S. schenckii* selecionados nas duas primeiras etapas

Materiais e

Métodos

Identificação, construção de novas estruturas e caracterização do perfil farmacodinâmico de peptídeos e outras moléculas derivadas da biodiversidade brasileira

- ✓ Identificar e sintetizar compostos derivados de plantas com ação antifúngica contra o dermatófito *Trichophyton rubrum*
- ✓ Separar e identificar peptídeos isolados da peçonha de vespas sociais da Região Centro-Oeste brasileira
- ✓ Desenhar racionalmente e sintetizar peptídeos com base nas avaliações dos peptídeos naturais isolados da peçonha de artrópodes ou de resultados obtidos das simulações *in silico*, utilizando ferramentas biotecnológicas
- ✓ Sintetizar e avaliar a estabilidade dos peptídeos e dos flavonóides sintéticos
- ✓ Avaliar os perfis farmacológicos (antifúngicos) desses compostos através de curvas de dose-efeito e tempo-efeito
- ✓ Avaliar o modo de ação antifúngico dos compostos mais ativos através da quantificação do nível de ergosterol e regeneração de protoplastos

Recurso aprovado x gasto

Liberado: R\$ 1.000.000,00

EXECUÇÃO FINANCEIRA			
	Recursos Liberados	Recursos Gastos	Saldo
Capital	R\$ 400.000,00	R\$ 154.755,34	R\$ 245.244,66
Custeio	R\$ 600.000,00	R\$ 267.104,66	R\$ 332.895,34
Bolsa	-----	-----	-----
Saldo			R\$ 578.140,00
Data da situação			26/05/2021

Resultados parciais alcançados

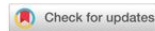
optamos por descrever alguns dos resultados mais importantes ou apresentar algumas das produções mais relevantes e associadas diretamente a cada um dos subprojetos

Resultados parciais alcançados

Subprojeto 1

**SCIENTIFIC
REPORTS**

nature research



Mechanisms of action of antimicrobial peptides ToAP2 and NDBP-5.7 against *Candida albicans* planktonic and biofilm cells

Jhones do Nascimento Dias¹, Calliandra de Souza Silva¹, Alyne Rodrigues de Araújo², Jessica Maria Teles Souza², Paulo Henrique de Holanda Veloso Júnior¹, Wanessa Felix Cabral³, Maria da Glória da Silva³, Peter Eaton⁶, José Roberto de Souza de Almeida Leite³, André Moraes Nicola⁴, Patrícia Albuquerque^{5,7} & Ildinete Silva-Pereira^{1,7}

- ToAP2 and NDBP-5.7 are active against planktonic and biofilms of *C. albicans*.
- Treatment with these peptides increased cell permeability and generated important morphological alterations in *C. albicans* cells.
- ToAP2 showed the most promising antimicrobial effects in most of our assays and can be considered a putative candidate for new antifungal formulations, especially for topical treatments or to be used in combined therapeutic strategies.

- ToAP2 was not lethal to *G. mellonella* larvae (at concentrations up to 40 mg/kg)
- ToAP2 doses of 10, 20 and 40 mg/kg were also able to significantly increase larva survival after *C. albicans* infections
- At the two highest concentrations of this AMP the larva survival profile was similar to what we observed with the amphotericin B treatment.

Resultados parciais alcançados

Subprojeto 1 – modelo *C. neoformans* (artigo em preparação)

- ✓ os AMPs ToAP1 e ToAP2 testados em linhagens de *Cryptococcus spp* com diferentes tamanhos basais de cápsula – **a cápsula não protege o fungo contra a atividade do peptídeo.**
- ✓ leveduras submetidas a tratamentos prévios para indução da cápsula ou melanização – a modulação desses **dois atributos de virulência de *C. neoformans* aumentam a susceptibilidade do fungo aos peptídeos.**
- ✓ ToAP2 é capaz de permeabilizar a membrana plasmática das leveduras de *C. neoformans* e destruir organelas citoplasmáticas.
- ✓ o tratamento com esse peptídeo causou um aparente aumento na espessura das fibras dos polissacarídeos da cápsula.
- ✓ ToAP1 e ToAP2 testados contra biofilmes de *C. neoformans* – ToAP2 inibiu fortemente a formação do biofilme, interferindo possivelmente na adesão das células.

Resultados parciais alcançados

Subprojeto 1 – modelo *C. neoformans* (artigo em preparação)

continuação...

- ✓ a membrana é o principal alvo desse peptídeo e a permeabilização da bicamada lipídica possa ser o seu principal mecanismo de ação.
- ✓ os resultados no modelo de *C. neoformans* também reforçam o potencial dessas moléculas no desenvolvimento de novas terapias antifúngicas.
- ✓ ToAP1 e ToAP2 foram testados contra vários isolados clínicos de *C. neoformans* – comparado à linhagem de referência H99, **nenhum dos isolados clínicos mostrou resistência ou maior suscetibilidade aos peptídeos**

Resultados parciais alcançados

Subprojeto 1 – modelo *C. neoformans* (artigo em preparação)

Visando aprofundar nosso entendimento sobre o mecanismo de ação desses AMPs empreendemos duas novas e importantes abordagens (não previstas no contexto do subprojeto 1 originalmente):

- ✓ A caracterização do perfil transcritômico de *C. neoformans* H99 em resposta ao tratamento com diferentes doses do peptídeo ToAP2 por RNA-seq;
- ✓ A varredura de bibliotecas de leveduras mutantes de *C. neoformans*, realizada em parceria com o grupo de James Andrew Alspaugh, MD (Professor in Molecular Genetics and Microbiology of Duke University School of Medicine, USA).

Subprojeto 2

Meta 2.1 – Avaliar a resposta imunológica em hospedeiros imunocompetentes infectados experimentalmente com os mutantes *KRE2* (ausência da α 1,2-manosiltransferase, com fenótipo hipovirulento), *CLR3* (deleção do gene de histona D-acetilase, com fenótipo hipovirulento), *CLR6-1* (deleção do gene de da histona D-acetilase, com fenótipo hipervirulento) do fungo *C. neoformans*.

www.nature.com/scientificreports

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

HDAC genes play distinct and redundant roles in *Cryptococcus neoformans* virulence

Received: 18 September 2017

Accepted: 14 February 2018

Published online: 26 March 2018

Fabiana Brandão¹, Shannon K. Esher², Kyla S. Ost², Kaila Pianalto², Connie B. Nichols², Larissa Fernandes¹, Anamélia L. Bocca¹, Marcio José Poças-Fonseca¹ & J. Andrew Alspaugh²

Meta 2.2. Avaliar a resposta imunológica contra linhagens selvagem e mutante para genes rhamnosiltransferases de *S. schenckii* e *S. brasiliensis* utilizando modelos *in vivo* e *in vitro*-

Accepted Manuscript

Generation of *Sporothrix schenckii* mutants expressing the green fluorescent protein suitable for the study of host-fungus interactions

Nancy E. Lozoya-Pérez, Sergio Casas-Flores, José A. Martínez-Álvarez, Luz A. López-Ramírez, Leila M. Lopes-Bezerra, Bernardo Franco, Héctor M. Mora-Montes

PII: S1878-6146(18)30173-9

DOI: [10.1016/j.funbio.2018.07.004](https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.07.004)

Reference: FUNBIO 943



Meta 2.3. Avaliar a resposta imunológica em hospedeiros imunocompetentes infectados com o fungo *C. neoformans* e tratados com peptídeos anti-inflamatórios

Biomedicine & Pharmacotherapy 118 (2019) 109152

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

 **ELSEVIER**

Biomedicine & Pharmacotherapy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biopharm



Peptides ToAP3 and ToAP4 decrease release of inflammatory cytokines through TLR-4 blocking



Paulo Henrique de Holanda Veloso Júnior^{a,1}, Karina Smidt Simon^{a,1},
Raffael Júnio Araújo de Castro^a, Luísa Coutinho Coelho^a, Fabián Andres Hurtado Erazo^a,
Adolfo Carlos Barros de Souza^b, Rogério Coutinho das Neves^c, Viviane Furlan Lozano^d,
Elizabeth Ferroni Schwartz^b, Aldo Henrique Tavares^a, Márcia Renata Mortari^b,
Ana Paula Junqueira-Kipnis^c, Ildinete Silva-Pereira^a, Anamelia Lorenzetti Bocca^{a,*}

Meta 2.3. Avaliar a resposta imunológica em hospedeiros imunocompetentes infectados com o fungo *C. neoformans* e tratados com peptídeos anti-inflamatórios

Em preparação para publicação

**Evaluation of the activity of wasp venom peptides Agelaia-MP and Polybia-MPII
against experimental model of *Cryptococcus neoformans***

Paulo H. H. Veloso Júnior¹, Karina S. Smidt¹, Raffael J. A. Castro¹, Luana C. Camargo,
Stephan, A. M. de Oliveira¹, Fabiana, B. A. Silva², Márcia C. G. Maciel¹, Márcia R.
Mortari³, Anamélia L. Bocca

Meta 2.4. Analisar do papel dos receptores de complemento no processo infectivo das linhagens mutantes de *Sporothrix ssp*

Cell Host & Microbe

Complement receptor-3 mediates inflammatory response to *Sporothrix* species through interaction with their cell wall peptidorhamnomannans.

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Complement receptor-3 mediates inflammatory response to <i>Sporothrix</i> species through interaction with their cell wall peptidorhamnomannans.
Article Type:	Research Article
Keywords:	<i>Sporothrix</i> spp.; Innate immune response; Complement receptor-3; Peptidorhamnomannan, Cell wall; Complement system
Corresponding Author:	Leila M Lopes-Bezerra, PhD Technology and Innovation Center - São Paulo University São Paulo, SP BRAZIL
First Author:	Leila M. Lopes-Bezerra, PhD
Order of Authors:	Leila M. Lopes-Bezerra, PhD Gabriela W.P. Neves Sarah Sze Wah Wong Vishukumar Aimalanianda Catriona Walls Janet A. Willment Lars Erwig Neil A.R. Gow Carol A. Munro Gordon D. Brown

Embora o fungo *P. brasiliensis* não tenha sido previsto como um modelo biológico nas metas do subprojeto 2, este fungo foi analisado dentro do contexto da meta 2.4.



β 2 Integrin-Mediated Susceptibility to *Paracoccidioides brasiliensis* Experimental Infection in Mice

OPEN ACCESS

Edited by:
Angel Gonzalez,
University of Antioquia, Colombia

Stephan Alberto Machado de Oliveira^{1,2†}, **Janayna Nunes Reis**^{1†}, **Elisa Catão**², **Andre Correa Amaral**³, **Ana Camila Oliveira Souza**^{1†}, **Alice Melo Ribeiro**², **Lúcia Helena Faccioli**⁴, **Fabiana Pirani Carneiro**⁵, **Clara Luna Freitas Marina**⁶, **Pedro Henrique Bürgel**⁶, **Larissa Fernandes**⁷, **Aldo Henrique Tavares**⁷ and **Anamelia Lorenzetti Bocca**^{1,2,6*}

Relatório de acompanhamento

Subprojeto 3 – Identificação, construção de novas estruturas e caracterização do perfil farmacodinâmico de peptídeos antimicrobianos e outras moléculas derivadas da biodiversidade brasileira.

Avaliação da resposta imunológica e inflamatória nas infecções fúngicas.



**Profas Dra. Marcia Mortari, Dra. ANA LÚCIA FACHIN e Prof Dr
Rene Beleboni**

Mestrado concluído

“Aspectos celulares e moleculares da interação de *Trichophyton rubrum* em linhagem de macrófago humano THP-1”. Gabriela Gonzalez Segura. (Bolsista CAPES-PROSUP taxa). 2019

Vanessa Inácia Borges (Farmácia-Unaerp). “Avaliação da atividade antifúngica e anti-inflamatória de curcuminoides e chalconoides durante o co-cultivo de *Trichophyton rubrum* em linhagem de macrófago humano THP-1”. (Projeto IC Fapesp 2018/22233-0). Apresentação TCC em fevereiro de 2021

Defesa de tese de doutorado: junho de 2021

INVESTIGAÇÃO DA RESPOSTA CELULAR E MOLECULAR ATRAVÉS DO RNA-SEQ DA INTERAÇÃO DE MACRÓFAGOS HUMANOS THP-1 CO-CULTIVADOS COM *Trichophyton rubrum*

Bruna Aline Michelotto Cantelli

RESUMO

Os dermatófitos são fungos que utilizam substratos queratinizados como principal fonte de nutrientes, acometendo principalmente pele, cabelos e unhas. Dentre os dermatófitos, o *Trichophyton rubrum* (*T. rubrum*) é considerado o principal causador de dermatofitoses em todo o mundo. Apesar da maioria das micoses apresentarem caráter superficial, atualmente *T. rubrum* vem causando infecções sistêmicas em pacientes com o sistema imunológico debilitado ocasionando lesões graves e profundas. Assim, torna-se importante compreender o mecanismo de ativação do sistema imunológico do hospedeiro em uma infecção sistêmica. O presente trabalho teve como objetivo principal caracterizar a infecção sistêmica provocada por conídios germinados vivos (CGV) e conídios germinados inativados (CGI) de *T. rubrum* do ponto de vista molecular e celular utilizando a linhagem de monócitos/macrófagos humanos (THP-1). Na análise da viabilidade celular dos macrófagos após o contato de CGV de *T. rubrum* por 24h observamos a liberação de 20% de LDH, mostrando que 80% dos macrófagos estavam viáveis. No tempo de 24 h observamos também a maior liberação da IL-6, utilizando CGV ou CGI, dado que indica ativação do sistema imune. A liberação da TNF- α , IL-8 e IL-1 β foi maior utilizando CGV, no entanto para IL-2 e IL-12 a liberação foi maior utilizando CGI. O sequenciamento de nova geração da resposta ao co-cultivo CGI de *T. rubrum* mostraram 83 genes modulados sendo 65 induzidos e 18 reprimidos. A categorização dos genes modulados evidenciou as vias de transdução de sinais, comunicação celular e resposta imune. Foram selecionados 16 genes para serem validados e verificamos que a relação de Pearson foi de 0,98, indicando uma alta correlação entre o RNA-seq e qPCR. Foi observado que a modulação de expressão para todos os genes foi semelhante utilizando CGV ou CGI no co-cultivo. Entretanto, os valores de fold change foram maiores utilizando CGV. A comparação do co-cultivo de *T. rubrum* e estimulação com LPS bacteriano em macrófagos THP-1 mostrou a diferença no perfil de modulação de alguns genes estudados nesse trabalho, como ANKRD1, TRL8, CD1D e principalmente TRL7. Devido a alta expressão do gene IL-32 no RNAseq, quantificamos a interleucina IL-32 e verificamos a maior liberação no co-cultivo com *T. rubrum*, quando comparado com a estimulação com LPS. Desta forma, podemos concluir que o modelo de co-cultivo de macrófagos com *T. rubrum* mostrou a ativação do sistema imunológico, através do aumento de liberação de interleucinas pro-inflamatórias e pelo perfil de expressão gênica observado no RNA-seq. Através dos resultados obtidos podemos evidenciar possíveis alvos moleculares expressos nos macrófagos que podem ser explorados através de terapias anti-dermatofitos que envolvam a ativação do sistema imune.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Trans-chalcone activity against *Trichophyton rubrum* relies on an interplay between signaling pathways related to cell wall integrity and fatty acid metabolism



Tamires Aparecida Bitencourt^{1,2}, Claudia Macedo², Matheus Eloy Franco^{1,4}, Marina Campos Rocha³, Igor Sawasaki Moreli², Bruna Aline Micheloto Cantelli¹, Pablo Rodrigo Sanchez², Renê Oliveira Belebioni¹, Iran Malavazi³, Geraldo Aleixo Passos², Mozart Marins¹ and Ana Lúcia Fachin^{1*}

Abstract

Background: *Trichophyton rubrum* is the main etiological agent of skin and nail infections worldwide. Because of its keratinolytic activity and anthropophilic nature, infection models based on the addition of protein substrates have been employed to assess transcriptional profiles and to elucidate aspects related to host-pathogen interactions. Chalcones are widespread compounds with pronounced activity against dermatophytes. The toxicity of trans-chalcone towards *T. rubrum* is not fully understood but seems to rely on diverse cellular targets. Within this context, a better understanding of the mode of action of trans-chalcone may help identify new strategies of antifungal therapy and reveal new chemotherapeutic targets. This work aimed to assess the transcriptional profile of *T. rubrum* grown on different protein sources (keratin or elastin) to mimic natural infection sites and exposed to trans-chalcone in order to elucidate the mechanisms underlying the antifungal activity of trans-chalcone.

Results: Overall, the use of different protein sources caused only slight differences in the transcriptional profile of *T. rubrum*. The main differences were the modulation of proteases and lipases in gene categories when *T. rubrum* was grown on keratin and elastin, respectively. In addition, some genes encoding heat shock proteins were up-regulated during the growth of *T. rubrum* on keratin. The transcriptional profile of *T. rubrum* exposed to trans-chalcone included four main categories: fatty acid and lipid metabolism, overall stress response, cell wall integrity pathway, and alternative energy metabolism. Consistently, *T. rubrum* Mapk was strongly activated during the first hours of trans-chalcone exposure. Noteworthy, trans-chalcone inhibited genes involved in keratin degradation. The results also showed effects of trans-chalcone on fatty acid synthesis and metabolic pathways involved in acetyl-CoA supply.

Conclusion: Our results suggest that the mode of action of trans-chalcone is related to pronounced changes in fungal metabolism, including an imbalance between fatty acid synthesis and degradation that interferes with cell membrane and cell wall integrity. In addition, this compound exerts activity against important virulence factors. Taken together, trans-chalcone acts on targets related to dermatophyte physiology and the infection process.

Keywords: Chalcone, CWI, Elastin, Keratin, Dermatophyte, Transcriptional profile

Article

The Transcriptional Profile of *Trichophyton rubrum* Co-Cultured with Human Keratinocytes Shows New Insights about Gene Modulation by Terbinafine

Monise Fazolin Petrucelli ¹, Josie Budag Matsuda ¹, Kamila Peroni ², Pablo Rodrigo Sanches ³, Wilson Araújo Silva Jr. ^{2,3,4,5}, Rene Oliveira Belebony ¹, Nilce Maria Martinez-Rossi ³, Mozart Marins ¹ and Ana Lúcia Fachin ^{1,*}

¹ Biotechnology Unit, University of Ribeirão Preto-UNAERP, Av. Coslábile Romano 2201, Ribeirão Preto 14960-900, SP, Brazil; mofazolin@gmail.com (M.F.P.); josie@unidavi.edu.br (J.B.M.); rbelebony@unaerp.br (R.O.B.); mmarins@gmbbio.br (M.M.)

² National Institute of Science and Technology in Stem Cell and Cell Therapy, Center for Cell-Based Therapy, Ribeirão Preto 14051-140, SP, Brazil; kperoni@gmail.com (K.P.); wilsonjr@usp.br (W.A.S.J.)

³ Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto 14049-900, SP, Brazil; psanches@gmail.com (P.R.S.); nmmrossi@usp.br (N.M.M.-R.)

⁴ Center for Integrative System Biology-CISBI-NAP/USP, University of São Paulo, Ribeirão Preto 14049-900, SP, Brazil

⁵ Center for Medical Genomics, University Hospital of the Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto 14015-010, SP, Brazil

* Correspondence: afachin@unaerp.br or analuciafachin1972@gmail.com; Fax: +55-16-36037030

Received: 6 November 2019; Accepted: 22 November 2019; Published: 29 November 2019



277 genes de *T. rubrum* foram diferencialmente expressos na presença da terbinafina

Article

Dual RNA-Seq Analysis of *Trichophyton rubrum* and HaCat Keratinocyte Co-Culture Highlights Important Genes for Fungal-Host Interaction

Monise Fazolin Petrucelli ¹, Kamila Peronni ², Pablo Rodrigo Sanches ³,
Tatiana Takahasi Komoto ¹, Josie Budag Matsuda ¹, Wilson Araújo da Silva Jr. ^{2,4},
Rene Oliveira Belebony ¹, Nilce Maria Martinez-Rossi ³, Mozart Marins ¹ and
Ana Lúcia Fachin ^{1,*}

¹ Biotechnology Unit, University of Ribeirão Preto-UNAERP, São Paulo 2201, Brazil; mofazolin@gmail.com (M.F.P.); tattytk@hotmail.com (T.T.K.); josie@unidavi.edu.br (J.B.M.); rbelebony@unaerp.br (R.O.B.); mmarins@gmb.bio.br (M.M.)

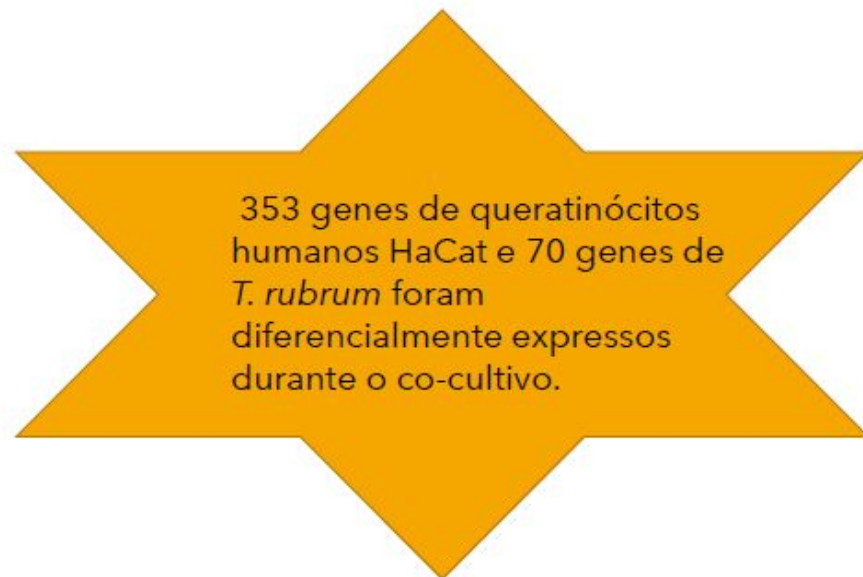
² Laboratory of Molecular Genetics and Bioinformatics, Regional Hemotherapy Center of Ribeirão Preto, Ribeirão Preto 2501, Brazil; kperonni@gmail.com (K.P.); wilsonjr@usp.br (W.A.d.S.J.)

³ Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto 14049-900, Brazil; psanches@gmail.com (P.R.S.); nmrossi@usp.br (N.M.M.-R.)

⁴ Center for Medical Genomics at the Clinics Hospital of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto 14049-900, Brazil

* Correspondence: afachin@unaerp.br; Fax: +55-16-3603-7030

Received: 30 May 2018; Accepted: 16 July 2018; Published: 19 July 2018



Genes 2018, 9, 362; doi:10.3390/genes9070362

ORIGINAL ARTICLE



Expression of genes containing tandem repeat patterns involved in the fungal-host interaction and in the response to antifungals in *Trichophyton rubrum*

Mariana Heinzen de Abreu¹ | Tamires Aparecida Bitencourt² |
Matheus Eloy Franco³ | Igor Sawasaki Moreli⁴ | Bruna Aline Michelotto Cantelli¹ |
Tatiana Takahasi Komoto¹ | Mozart Marins¹ | Ana Lúcia Fachin¹

¹Unidade de Biotecnologia, Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, Brazil

²Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, Brazil

³Instituto Federal do Sul de Minas—Campus Machado, Machado, Brazil

Correspondence

Ana Lúcia Fachin, Unidade de Biotecnologia, Universidade de Ribeirão Preto, Av. Costabile Romano 3301, 14096-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil.
Email: afachin@unesp.br

Funding Information

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant/Award Number: 2019/10514-8, 2018/22701-6, 2016/11886-0 and 2015/23435-8; CAPES

Summary

Background: *Trichophyton rubrum* is the most common aetiological agent of human dermatophytoses. These infections mainly occur in keratinised layers such as skin, hair and nails because the fungus uses keratin as a nutrient source. Fluconazole and amphotericin are antifungal agents most commonly used to treat dermatophytoses and acts on cell membrane ergosterol. Despite the clinical importance of *T. rubrum*, the mechanisms underlying the fungal-host relationship have not yet been clarified. Tandem repeats (TRs) are short DNA sequences that are involved in a variety of adaptive functions, including the process of fungal infection. It is known that the larger the number of TRs in the genome, the greater the capacity of cell-cell junction and surface adhesion, especially when these repeats are present in regions encoding cell surface proteins.

Objectives: To identify *in silico* *T. rubrum* genes containing TR patterns and to analyse the modulation of these genes in culture medium containing keratin (a model simulating skin infection) and antifungal drugs.

Methods: The Dermatophyte Tandem Repeats Database (DTRDB) and the FaaPred tool were used to identify four *T. rubrum* genes containing TR patterns. Quantitative real-time (RT) PCR was used to evaluate the gene expression during the growth of *T. rubrum* on keratin and in the presence of fluconazole, amphotericin B and Congo red (acts in the cell wall).

Results: The expression of these genes was found to be induced in culture medium containing keratin. In addition, these genes were induced in the presence of antifungal agents, especially fluconazole, indicating an adaptive response to the stress caused by this drug.

Conclusion: The results suggest an important role of genes containing TRs in the fungal-host interaction and in the susceptibility to inhibitory compounds, indicating these sequences as new potential targets for the development of antifungal agents.

KEYWORDS

adhesion, cell wall proteins, fluconazole, fungal infection, gene expression

Article

Cellular and Molecular Response of Macrophages THP-1 during Co-Culture with Inactive *Trichophyton rubrum* Conidia

Gabriela Gonzalez Segura ¹ , Irena Aline Cantelli ¹, Kamila Peronni ², Pablo Rodrigo Sanches ³ , Tatiana Takahashi Komoto ¹ , Elen Rizzi ¹, Rene Oliveira Belebont ^{1,4}, Wilson Araújo da Silva Junior ^{3,5,6} , Nilce Maria Martinez-Rossi ³ , Mozart Martins ^{1,4}  and Ana Lúcia Fachin ^{3,4,7} 

¹ Biotechnology Unit, University of Ribeirão Preto-UNAERP, Av. Costábile Romano, 2201, Ribeirão Preto CEP 14096-900, São Paulo, Brazil; gabrielagonzalezsegura@hotmail.com (G.G.S.); brucanelli@hotmail.com (I.A.C.); tatianytk@hotmail.com (T.T.K.); ersanchez@unaerp.br (E.R.); rbelebont@unaerp.br (R.O.B.); mmartins@igml.bio.br (M.M.)

² National Institute of Science and Technology in Stem Cell and Cell Therapy, Center for Cell-Based Therapy, Av. Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto CEP 14049-900, São Paulo, Brazil; kaperoni@gmail.com

³ Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto CEP 14049-900, Brazil; psanches@usp.br (P.R.S.); nmrossi@usp.br (N.M.M.-R.); wilsonjr@usp.br (W.A.d.S.J.)

⁴ Medicine School, University of Ribeirão Preto-UNAERP, Av. Costábile Romano, 2201, Ribeirão Preto CEP 14096-900, São Paulo, Brazil

⁵ Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, Center for Integrative System Biology-CISB-NAFUSP, University of São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto CEP 14049-900, São Paulo, Brazil

⁶ Center for Medical Genetics, University Hospital of the Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto CEP 14049-900, São Paulo, Brazil

* Correspondence: afachin@unaerp.br; Fax: +55-16-36020280

Received: 12 November 2020; Accepted: 30 November 2020; Published: 12 December 2020



Abstract: *Trichophyton rubrum* is causing an increasing number of invasive infections, especially in immunocompromised and diabetic patients. The fungal invasive infectious process is complex and has not yet been fully elucidated. Therefore, this study aimed to understand the cellular and molecular mechanisms during the interaction of macrophages and *T. rubrum*. For this purpose, we used a co-culture of previously germinated and heat-inactivated *T. rubrum* conidia placed in contact with human macrophages cell line THP-1 for 24 h. This interaction led to a higher level of release of interleukins IL-6, IL-2, nuclear factor kappa beta (NF- κ B) and an increase in reactive oxygen species (ROS) production, demonstrating the cellular defense by macrophages against dead fungal elements. Cell viability assays showed that 70% of macrophages remained viable during co-culture. Human microRNA expression is involved in fungal infection and may modulate the immune response. Thus, the macrophage expression profile of microRNAs during co-culture revealed the modulation of 83 microRNAs, with repression of 33 microRNAs and induction of 50 microRNAs. These data were analyzed using bioinformatics analysis programs and the modulation of the expression of some microRNAs was validated by qRT-PCR. In silico analysis showed that the target genes of these microRNAs are related to the inflammatory response, oxidative stress, apoptosis, drug resistance, and cell proliferation.

Keywords: deep dermatophytosis; cytokines; microRNA NGS

Review

Epidemiology and Diagnostic Perspectives of Dermatophytoses

Monise Fazolin Petrucelli ¹ , Mariana Helnaen de Abreu ¹, Bruna Aline Michelotto Cantelli ¹, Gabriela Gonzalez Segura ¹, Felipe Garcia Nishimura ¹, Tamires Aparecida Bitencourt ^{1,2,3}, Mozart Martins ¹  and Ana Lúcia Fachin ^{1,*} 

¹ Biotechnology Unit, Uniaerp, Av. Costábile Romano, 2201, Ribeirão Preto SP 14096-900, Brazil; mofazolin@gmail.com (M.F.P.); marihelnaen@gmail.com (M.H.d.A.); brucacantelli@hotmail.com (B.A.M.C.); gabrielagonzalezsegura@hotmail.com (G.G.S.); felipegnishi@hotmail.com (F.G.N.); tabitencourt@yahoo.com.br (T.A.B.); mmartins@gmsh.bio.br (M.M.)

² Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto SP 14049-900, Brazil

³ Department of Biochemistry and Immunology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto SP 14049-900, Brazil

* Correspondence: afachin@uniarerp.br; Fax: +55-16-3603-7030

Received: 15 October 2020; Accepted: 2 November 2020; Published: 23 November 2020



Abstract: Dermatophytoses affect about 25% of the world population, and the filamentous fungus *Trichophyton rubrum* is the main causative agent of this group of diseases. Dermatophytoses are caused by pathogenic fungi that generally trigger superficial infections and that feed on keratinized substrates such as skin, hair, and nails. However, there are an increasing number of reports describing dermatophytes that invade deep layers such as the dermis and hypodermis and that can cause deep infections in diabetic and immunocompromised patients, as well as in individuals with immunodeficiency. Despite the high incidence and importance of dermatophytes in clinical mycology, the diagnosis of this type of infection is not always accurate. The conventional methods most commonly used for mycological diagnosis are based on the identification of microbiological and biochemical features. However, in view of the limitations of these conventional methods, molecular diagnostic techniques are increasingly being used because of their higher sensitivity, specificity and rapidity and have become more accessible. The most widely used molecular techniques are conventional PCR, quantitative PCR, multiplex PCR, nested PCR, PCR-RFLP, and PCR-ELISA. Another promising technique for the identification of microorganisms is the analysis of protein profiles by MALDI-TOF MS. Molecular techniques are promising but it is necessary to improve the quality and availability of the information in genomic and proteomic databases in order to streamline the use of bioinformatics in the identification of dermatophytes of clinical interest.

Keywords: deep infections; MALDI-TOF MS; mycological diagnosis; PCR; *Trichophyton rubrum*