

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus Araraquara

**"ESTUDO DE INDUÇÃO DE APOPTOSE POR *Paracoccidioides brasiliensis*
DURANTE A INTERAÇÃO COM CÉLULAS EPITELIAIS E EFEITOS ANTI-
APOPTÓTICOS DE SUBSTÂNCIAS NATURAIS"**

Juliana Oliveira Vicentin

Araraquara - SP

2016

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus Araraquara

**"ESTUDO DE INDUÇÃO DE APOPTOSE POR *Paracoccidioides brasiliensis*
DURANTE A INTERAÇÃO COM CÉLULAS EPITELIAIS E EFEITOS ANTI-
APOPTÓTICOS DE SUBSTÂNCIAS NATURAIS"**

Juliana Oliveira Vicentin

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Maria José Soares Mendes Giannini

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª Julhiany de Fátima da Silva

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de Farmacêutico-Bioquímico.

Araraquara - SP

2016

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

Dedico este trabalho à minha mãe,
Elisabeth, pelo grande exemplo
de vida e por todo o suporte.

Agradecimentos

À minha família, em especial à minha mãe, Elisabeth, às minhas tias que estiveram presentes em todos os momentos da minha vida, Lúcia e Andréia, e à minha vó Tite que se manteve firme e forte nas rezas e em sua fé para que eu tirasse aquele 5 bola na prova de química farmacêutica. Muito obrigada por acreditarem nos meus sonhos e na minha capacidade, e me incentivarem desde pequena a lutar pelos meus objetivos.

Gratidão ao meu pai, Lúcio, grande responsável pelo meu crescimento, força e perseverança para superar os obstáculos e dificuldades ao longo do caminho.

Aos amigos e colegas da turma 81, com os quais convivi ao longo de toda a faculdade e compartilhei momentos importantes, alegres e tristes, tranquilos e conturbados: Debi, Pillar, Serginho, Isabela, Martini, Naty, Frota, e tantos outros!

À minha família araraquarense, República Só Caqui, pelo aprendizado e convívio intenso nesses últimos anos. Ganhei amigas, irmãs mais novas e mais velhas, mães, filhas, enfim, ganhei uma família pra vida toda. Sou muito grata pelo carinho, compreensão nos momentos difíceis, pelas conversas, reuniões, festas de terça, quinta, sexta, sábado.. e principalmente por fazerem dessa jornada inesquecível. Meu obrigada especial à minha dupla de todas as horas Deva, à irmã mais nova que a vida me deu, Baca, e à minha veterana maravilhosa Rena, a qual me ensinou os primeiros passos para enfrentar as responsabilidades que estavam por vir. Meninas, vocês são demais!

À minha orientadora Zezé e à professora Ana Marisa, por abrirem as portas da micologia e proporcionarem essa oportunidade maravilhosa de ser aluna de iniciação científica, me permitindo o contato com a área de pesquisa. Obrigada Zezé por me aceitar como aluna orientada, pelo suporte e grande exemplo como pessoa e profissional.

À minha co-orientadora Julhiany, que me acolheu de braços abertos e me ensinou grande parte do que sei hoje. Sou extremamente grata pelo carinho, amizade, por toda a

paciência (que você tem de sobra) e aprendizado, mas principalmente por acreditar em mim e na minha capacidade. O mundo precisa de mais pessoas como você, que enxergam com a alma e não somente com os olhos. Te admiro muito!

Aos queridos colegas da micologia, pelo convívio e aprendizado do dia-a-dia e por atenderem inúmeras vezes os meus pedidos de socorro no laboratório. À Rosângela, um obrigada mais do que especial, por ser essa mãezona que todos amam e não vivem sem. Agradeço os puxões de orelha, as conversas e todo o suporte ao longo dessa jornada.

Resumo

Apoptose é um importante meio de regulação das células e vários patógenos podem modulá-la estabelecendo a infecção no hospedeiro. Em *P. brasiliensis* (*Pb*) já foi demonstrada e ocorre como consequência de sua internalização em células epiteliais podendo culminar na evasão da resposta imune. Dessa forma, este trabalho teve por objetivo avaliar o comportamento de *Pb*, através da verificação de alguns de seus fatores de virulência em induzir apoptose no modelo de interação com células epiteliais e verificar a atividade anti-apoptótica das substâncias naturais maitenina e galatos de alquila para a identificação de alvos interessantes na pesquisa de antifúngicos. Para tanto, utilizou-se o isolado 18 de *Pb* e as adesinas previamente purificadas (glicoproteína de 43kDa e proteína 14-3-3). Foram testadas as substâncias maitenina, galato de decila (G14) e galato de undecila (G15), além dos controles anfotericina B e itraconazol. A avaliação da capacidade de indução de apoptose pelos diferentes fatores de virulência de *Pb* em células epiteliais e o efeito anti-apoptótico das substâncias selecionadas foi realizada por TUNEL (Terminal deoxy-transferase mediated X-dUTP Nick End Labeling), por citometria de fluxo através da avaliação de Bak, Bax e Bcl-2 e confirmação através de qRT-PCR para os mesmos marcadores. Para isto, a expressão desses marcadores foi avaliada em células epiteliais que foram expostas às adesinas de *Pb* (gp43 e proteína 14-3-3) as quais receberam ou não tratamento prévio com maitenina, G14 e G15. Os resultados demonstraram diminuição da expressão dos marcadores pró-apoptóticos quando foi realizado o tratamento prévio com G14, indicando que esta substância poderia ser utilizada como um inibidor de apoptose e dessa maneira poderia auxiliar no controle de infecções fúngicas.

Abstract

Apoptosis is an important mechanism of cell regulation and several pathogens can modulate it, establishing the host infection. It was demonstrated in *P. brasiliensis* (*Pb*) and it occurs as a result of its internalization in epithelial cells, resulting in evasion of the immune response. Thus, this study aimed to evaluate the *Pb* behavior by analyzing some of its virulence factors involved in the induction of apoptosis using the model of interaction with epithelial cells, and verifying the anti-apoptotic activity of natural substances, such as maitenin and alkyl gallates, in order to identify interesting targets for antifungal research. For this purpose, it was used the strain 18 of *Pb*, and the previously purified adhesins (43kDa glycoprotein and 14-3-3 protein). The natural substances maitenin, decyl gallate (G14), and undecyl gallate (G15) were tested, as well as the amphotericin B and itraconazole used as controls. Assessment of apoptosis induction by different virulence factors of *Pb* in epithelial cells and anti-apoptotic effect of selected compounds was performed by TUNEL assay (Terminal deoxy-transferase mediated X-dUTP Nick End Labeling), flow cytometry analysis by evaluating the markers: Bak, Bax and Bcl-2 and confirmed by qRT-PCR for the same markers. Therefore, the expression of these markers was evaluated in the epithelial cells exposed to *Pb* adhesins (protein 14-3-3 and gp43), which were treated or not with maitenin, G14 and G15. The results showed decreased expression of pro-apoptotic markers after treatment with G14, indicating that this substance could be used as an apoptosis inhibitor, and it could help in the control of fungal infections.

SUMÁRIO

Introdução	13
Paracoccidioidomicose	13
Manifestações Clínicas	15
Etiologia	15
Patogênese	19
Adesinas.....	20
Apoptose.....	21
Tratamento e Bioprospeção de Novas Substâncias	27
Drogas Antifúngicas	27
Ácido Gálico.....	28
Objetivos	30
Materiais e Métodos	31
Isolado e Condições de Cultivo	31
Cultura de Células Epiteliais	31
Preparo das Substâncias	31
Teste de Sensibilidade	32
Preparação das Proteínas 14-3-3 e gp43	32
Ocorrência de Apoptose em Células Infectadas com <i>P. brasiliensis</i>	32
Tratamento das Células A549 com as adesinas 14-3-3 e gp43	33
Técnica de "TUNEL"	33
Citometria de Fluxo	34
PCR em Tempo Real	34
Análise Estatística.....	36
Resultados	36
Purificação das adesinas 14-3-3 e gp43	36
Verificação de Apoptose pela Técnica de "TUNEL"	37
Avaliação da Expressão dos Marcadores Pró-Apoptóticos Bak-1 e Bax	38
Avaliação da Expressão do Marcador Anti-Apoptótico Bcl-2	39
Avaliação da Atividade Anti-Apoptótica das Substâncias Naturais	40
Expressão de Bak-1 e Bax após tratamento com G14 e G15	40
Expressão de Bcl-2 após tratamento com G14 e G15	42
Discussão	44
Conclusão	48
Referências Bibliográficas	49
Assinaturas	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica da paracoccidioidomicose	14
Figura 2. <i>Paracoccidioides spp.</i> em ágar sintético McVeigh-Morton modificado, a 18°C ..	17
Figura 3. Forma micelial de <i>Paracoccidioides spp</i>	17
Figura 4. <i>Paracoccidioides spp</i> em ágar Sabouraud Dextrose a 37°C.....	18
Figura 5. Leveduras de <i>Paracoccidioides spp</i>	19
Figura 6. Características morfológicas da apoptose e da necrose	23
Figura 7. Via extrínseca de ativação da apoptose; DD=domínio de morte; DED=efetor do domínio de morte.....	24
Figura 8. As vias intrínseca e extrínseca da apoptose	26
Figura 9. Eletroforese bidimensional mostrando a proteína 14-3-3 e a gp43 após serem purificadas	37
Figura 10. Fragmentação de DNA pela técnica de "TUNEL". Microscopia de fluorescência (figuras) e citometria de fluxo (gráfico). A: controle; B: tratamento com proteína 14-3-3; C: tratamento com gp43; D: tratamento com proteína 14-3-3 e gp43.....	38
Figura 11. Expressão de Bak em células A549 após diferentes tratamentos analisada por citometria de fluxo	39
Figura 12. Expressão de Bcl-2 em células A549 após diferentes tratamentos analisados por citometria de fluxo	40
Figura 13. Gráfico representativo demonstrando a expressão de Bak nas células tratadas simultaneamente com gp43 (50ug/mL) e galato de decila ou galato de undecila, por 24 e 48h por PCR em tempo real. *p<0,05 (n=9)	41
Figura 14. Gráfico representativo demonstrando a expressão de Bax nas células tratadas simultaneamente com gp43 (50ug/mL) e galato de decila ou galato de undecila, por 24 e 48h por PCR em tempo real. *p<0,05 (n=9)	42
Figura 15. Gráfico representativo demonstrando a expressão de Bcl-2 nas células tratadas simultaneamente com gp43 (50ug/mL) e galato de decila, galato de undecila, por 24 e 48h por PCR em tempo real. *p<0,05 (n=9).....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estrutura molecular do ácido gálico (G1) e galatos de alquila (G2–G17).....	30
Tabela 2. Iniciadores utilizados para PCR em tempo real.....	35
Tabela 3. Expressão dos genes Bak-1, Bax e Bcl-2 após os tratamentos com G14 e G15	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
µg	Micrograma
µL	Microlitro
A549	Células epiteliais pulmonares tipo II
APAF-1	Fator de ativação de protease associada à apoptose 1
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CIM	Concentração inibitória mínima
CO₂	Gás carbônico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Fas-L	Ligante de Fas
Fase L	Fase leveduriforme de <i>P. brasiliensis</i>
Fase M	Fase miceliar de <i>P. brasiliensis</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GADPH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
G14	Galato de decila
G15	Galato de undecila
Gp43	Glicoproteína de 43 kDa
HAM F-12	<i>F-12 Nutrient Mixture</i>
kDa	Kilodalton
L	Litro
MEC	Matriz extracelular
mL	Mililitro
mg	Miligrama
MRC-5	Células fibroblásticas de pulmão
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NOK	Queratinócitos normais de mucosa oral
°C	Graus Celsius
p53	Proteína citoplasmática de 53 kDa
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCM	Paracoccidioidomicose

PCR	Reação da polimerase em cadeia
RNA	Ácido ribonucléico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR	Receptores de fatores de necrose tumoral
TUNEL	<i>Terminal deoxy-transferase mediated X-dUTP Nick End Labeling</i>

1. Introdução

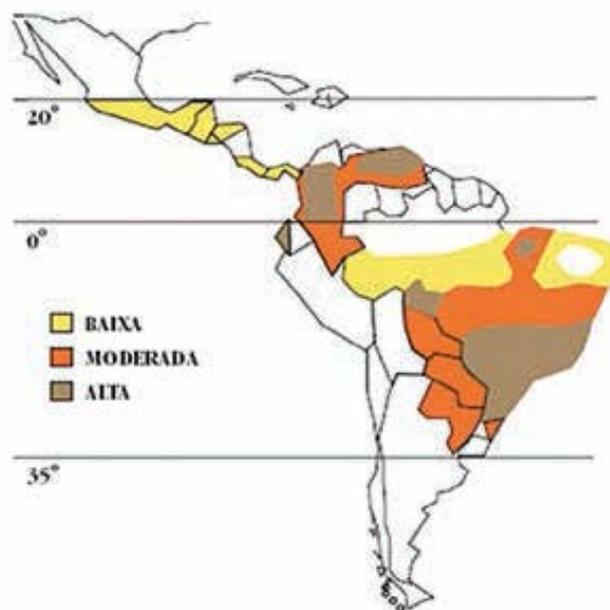
Estima-se que a diversidade dos fungos compreende aproximadamente 1,5 milhão de espécies, das quais atualmente se conhece cerca de 7.400. Apenas algumas espécies são patogênicas para o homem, sendo que 90% das infecções em humanos são causadas por um número pequeno de espécies, entre leveduras, fungos oportunistas e fungos filamentosos (Ajesh e Sreejith, 2009).

No Brasil, entre os anos de 1996 e 2006 foram constatadas 3.583 mortes causadas por micoses sistêmicas, sendo que a paracoccidioidomicose (PCM) apresentou-se como a principal causa de morte em pacientes imunocompetentes, com 51,2% dos casos (Prado *et al.*, 2009).

2. Paracoccidioidomicose (PCM)

A PCM é uma micose sistêmica causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides* spp. e é endêmica em áreas úmidas tropicais e subtropicais da América Latina e Central, principalmente em países como Brasil, Equador, Argentina, Colômbia e Venezuela, atingindo em sua maioria homens adultos, trabalhadores rurais e imunodeprimidos. É de grande importância no Brasil, devido à alta concentração de áreas endêmicas da doença (Blotta *et al.*, 1999; Coutinho *et al.*, 2002). Os mais altos índices de mortalidade para esta micose, foram encontrados na região sudeste, especialmente nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, seguidos por Paraná e Rio Grande do Sul (Prado *et al.*, 2009). Estima-se que pelo menos 10 milhões de indivíduos estejam infectados, mas apenas 2% desenvolve a forma crônica da doença (Coutinho *et al.*, 2002; Barrozo *et al.*, 2010; Miranda *et al.*, 2011; Teles e Martins, 2011).

Figura 1 - Distribuição geográfica da paracoccidioidomicose



Fonte: Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006.

Foi descrita pela primeira vez por Adolpho Lutz em 1908, no Brasil, enquanto examinava lesões orais em dois pacientes (Marques, 2008), e então denominada de diversas formas, como: blastomicose sul-americana, doença de Lutz-Splendore-Almeida, granulomatose paracoccidióidica, granuloma paracoccidióidico, granulomatose blastomicoide tropical e granuloma ganglionar maligno de origem blastomicótica (Martinez, 2010). O atual termo Paracoccidioidomicose foi estabelecido em 1971 em Medellín, Colômbia, e tem sido amplamente aceito até hoje (Lacaz, 1982).

A principal forma de contágio por *Paracoccidioides* spp. é pelo trato respiratório através da inalação dos propágulos do fungo (conídios), os quais se desenvolvem em leveduras quando atingem o parênquima pulmonar (Franco *et al.*, 1987). É caracterizada por lesões cutâneas e mucosas, podendo se disseminar para outros órgãos com ênfase no pulmão, podendo causar também lesões granulomatosas no sistema nervoso central do paciente. Sabe-se que a evolução do quadro está relacionada à capacidade de virulência do fungo e à resposta

imune do hospedeiro (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006; Benard e Mendes Giannini, 2009).

A doença representa um grave problema de saúde pública, uma vez que o elevado grau de incapacidade e as vezes até a morte, faz com que os indivíduos afetados interrompam suas atividades, gerando um impacto social e econômico (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

2.1. Manifestações Clínicas

A PCM manifesta-se mais frequentemente a partir dos 30 anos de idade sob as formas aguda e crônica unifocal ou multifocal. A forma aguda afeta pacientes jovens de ambos os sexos, enquanto a crônica é mais prevalente em adultos masculinos, com envolvimento pulmonar e cutâneo. Em mulheres, a infecção é rara em função do papel protetor do hormônio estrogênio (Martinez, 2004).

O paciente com paracoccidiodomicose pode queixar-se de insônia, debilidade, inapetência, disfagia, dispneia, tosse, hemoptise, febre, perda de peso, prurido e ardor. Ao exame extra bucal, podem-se observar macroqueilia, palidez facial, edema e linfadenopatia cervical (Cerri, 1998; Giovani *et al.*, 2000). As estruturas das cartilagens nasais e cordas vocais também podem ser afetadas; em geral, os sintomas pulmonares são inespecíficos (tosse e expectoração) (Achenbach *et al.*, 2002).

2.2. Etiologia

Como já citado anteriormente, membros do gênero *Paracoccidioides* spp. são os agentes etiológicos da paracoccidiodomicose. Atualmente o gênero é composto por duas espécies: *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii* (Teixeira *et al.*, 2009).

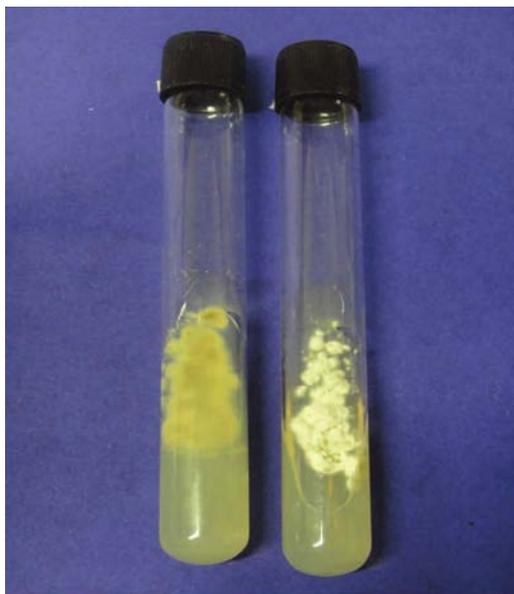
Matute *et al.* (2006) baseado em análises de variabilidade genética, classificou o gênero *Paracoccidioides* em três grupos filogenéticos distintos: S1 - grupo parafilético

encontrado na Argentina, Paraguai, Brasil, Peru e Venezuela; PS2 - grupo monofilético encontrado no Brasil e Venezuela; e PS3 - grupo monofilético encontrado na Colômbia.

Subsequentemente, Carrero *et al.* (2008) analisou e classificou os isolados previamente classificados por Matute *et al.* (2006) em duas espécies filogenéticas, S1 e PS3, e também classificou o isolado Pb-01 em uma nova espécie filogenética. É estimado que o grupo monofilético Pb-01 tenha sido separado dos outros grupos S1, PS2 e PS3 há aproximadamente 30 milhões de anos. Baseado nesses dados, uma nova classificação para os isolados Pb-01 foi proposta por Teixeira *et al.* (2009). O *Paracoccidioides lutzii* seria a nova espécie dentro do gênero *Paracoccidioides*. *P. lutzii* e *P. brasiliensis* podem ser encontrados nas regiões centro-oeste e sudeste/sudoeste do Brasil, respectivamente (Gegembauer *et al.*, 2014).

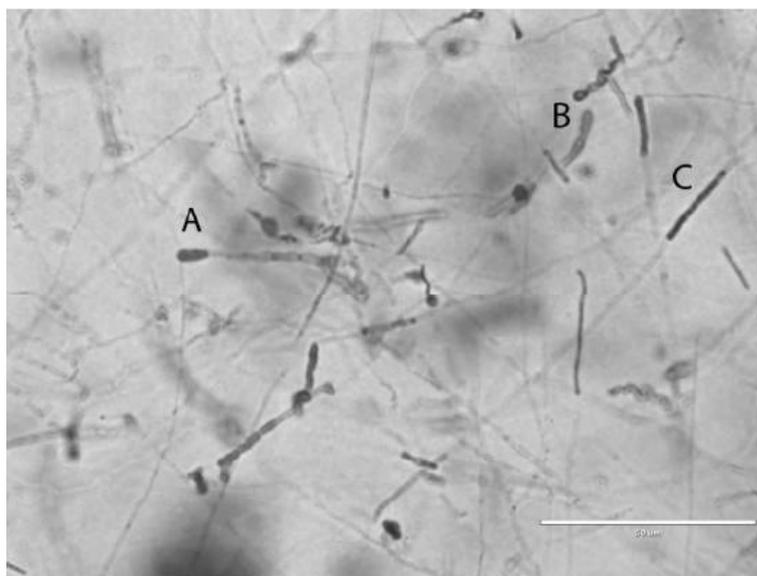
Paracoccidioides spp. têm características de fungo dimórfico, passando pela mudança de uma fase micelial (fase M, ou multicelular) para leveduriforme (fase L, ou unicelular), quando infecta os tecidos do hospedeiro. O crescimento do fungo *in vitro* ocorre na fase miceliana (M), saprobiótica, em temperatura ambiente de 24°C a 28°C, sob a forma de colônias cotonosas, e esbranquiçadas, como representado macroscopicamente na Figura 2. A visualização microscópica das características coloniais da fase M pode ser observada na Figura 3, mostrando os filamentos miceliais compostos de clamidósporo (A), clamidoconídios (B) e artroconídio (C) (Taborda, 2016).

Figura 2. *Paracoccidioides* spp. em ágar sintético McVeigh-Morton modificado, a 18°C.



Fonte: Taborda, 2016.

Figura 3. Forma micelial de *Paracoccidioides* spp.



Fonte: Taborda, 2016.

Por outro lado, a fase leveduriforme (L) representada macroscopicamente na Figura 4 e microscopicamente na figura 5, constitui a forma parasitária do fungo em meios

enriquecidos a 37° C e apresenta culturas chamadas cerebriformes, com células arredondadas, de parede dupla e brotamentos múltiplos característicos (Coutinho *et al.*, 2002; Martinez, 2010).

Através da representação microscópica (Figura 5), observa-se células esféricas com paredes finas e grossas e ao longo da superfície gêmulas esféricas, com estreita conexão com a célula mãe, apresentando a característica de “roda de leme” ou “timão”, a qual é considerada sua forma patognomônica (Taborda, 2016).

Figura 4. *Paracoccidioides* spp. em ágar Sabouraud Dextrose a 37°C.



Fonte: Taborda, 2016.

Figura 5. Leveduras de *Paracoccidioides* spp.



Fonte: Taborda, 2016.

Paracoccidioides é um patógeno versátil com a habilidade de infectar diferentes sistemas e órgãos do corpo humano, através de mecanismos que permitem a aderência e invasão dos tecidos hospedeiros. É considerado um fungo intracelular facultativo capaz de invadir células epiteliais *in vivo* e *in vitro* (Mendes-Giannini *et al.*, 2000) sendo suas habilidades de invadir e aderir dependentes da virulência do isolado (Hanna *et al.*, 2000).

2.3. Patogênese

Paracoccidioides spp. possui mecanismos que permitem sua aderência e invasão das barreiras dos tecidos hospedeiros (Mendes-Giannini *et al.*, 1994; Mendes-Giannini *et al.*, 2006). O fungo sintetiza uma série de substâncias que participam diretamente ou indiretamente da relação parasita-hospedeiro (Mendes-Giannini *et al.*, 2000). Contudo, a colonização dos tecidos hospedeiros pelo fungo é um evento complexo e geralmente envolve um ligante do patógeno e um receptor de célula hospedeira. Existem três componentes do hospedeiro com os quais o fungo pode interagir: produtos secretados pela célula, superfícies da célula hospedeira e proteínas da matriz extracelular (MEC), tais como colágeno tipo I e IV,

fibronectina e laminina (Mendes-Giannini *et al.*, 2006). Dessa maneira, a adesão do patógeno implica no reconhecimento de carboidratos ou proteínas ligantes na superfície da célula do hospedeiro ou proteínas constituintes da MEC (Patti e Hook, 1994; Latge, 2010; Frases *et al.*, 2011).

Estudos tem caracterizado componentes de matriz extracelular envolvidos na interação de *P. brasiliensis* com o hospedeiro, assim como algumas adesinas, que acredita-se ter um importante papel na patogênese da paracoccidiodomicose (Vicentini *et al.*, 1994; Hanna *et al.*, 2000; Gonzalez *et al.*, 2005; Donofrio *et al.*, 2009).

2.3.1. Adesinas

- Glicoproteína de 43 kDa

A gp43 foi descrita pela primeira vez como uma adesina de *P. brasiliensis*, a qual se liga à laminina e fibronectina (Vicentini *et al.*, 1994). A glicoproteína é a molécula mais estudada de *Paracoccidioides* spp., devido a sua grande importância nas interações patógeno-hospedeiro, incluindo o processo de adesão. Estudos *in vitro* mostraram que o tratamento com a gp43 purificada é capaz de reduzir a adesão do *Paracoccidioides*, demonstrando que essa proteína é um dos mediadores da adesão do fungo em células epiteliais hospedeiras e também da sua internalização (Vicentini *et al.*, 1994; Hanna *et al.*, 2000). Essa interação também ocorre em macrófagos. Cepas de *P. brasiliensis*, nas quais a gp43 foi silenciada, se apresentaram menos aderentes ou internalizadas por macrófagos ativados (Almeida *et al.*, 1998; Torres *et al.*, 2013).

- Proteína de 30 kDa

A proteína de 30 kDa foi primeiramente identificada em um estudo proteômico de *P. brasiliensis* antes e após a infecção em camundongos, onde um aumento significativo da sua

expressão foi observado após a infecção, e assim como a gp43 foi caracterizada como um ligante de laminina (Andreotti *et al.*, 2005). Mais tarde, Da Silva *et al.* (2013) sequenciou esta proteína e a identificou como pertencente a família de 14-3-3, que são pequenas proteínas multifuncionais presentes em células eucarióticas. A proteína 14-3-3 encontra-se mais expressa em *P. brasiliensis* recém isolados da passagem em animal, o qual apresenta maior capacidade de adesão. O tratamento com a proteína recombinante, promove a inibição da adesão de *P. brasiliensis* em células epiteliais do pulmão, o que confirma sua importância no processo (Andreotti *et al.*, 2005; Da Silva *et al.*, 2013).

Além disso, em modelos de infecção *in vitro* e *in vivo*, a proteína de 14-3-3 se acumula na parede celular do fungo, sugerindo seu envolvimento na modulação de diferentes processos celulares, como a apoptose, além do seu papel na adesão (Da Silva *et al.*, 2013) e virulência (De Oliveira *et al.*, 2015a).

2.3.2. Apoptose

Em 2008, Silva *et al.* demonstrou que *P. brasiliensis* induz apoptose de macrófagos por meio da expressão de caspase 2, 3 e 8, mas também constataram que o mesmo induz a expressão de genes que codificam para proteínas inibidoras de apoptose, como inibidor de caspase 8 e inibidor de Fas-ligante. Caspases 2 e 8 desencadeiam a transdução de sinais para clivagem de outras caspases, como a caspase-3, que leva a eventos celulares induzindo apoptose.

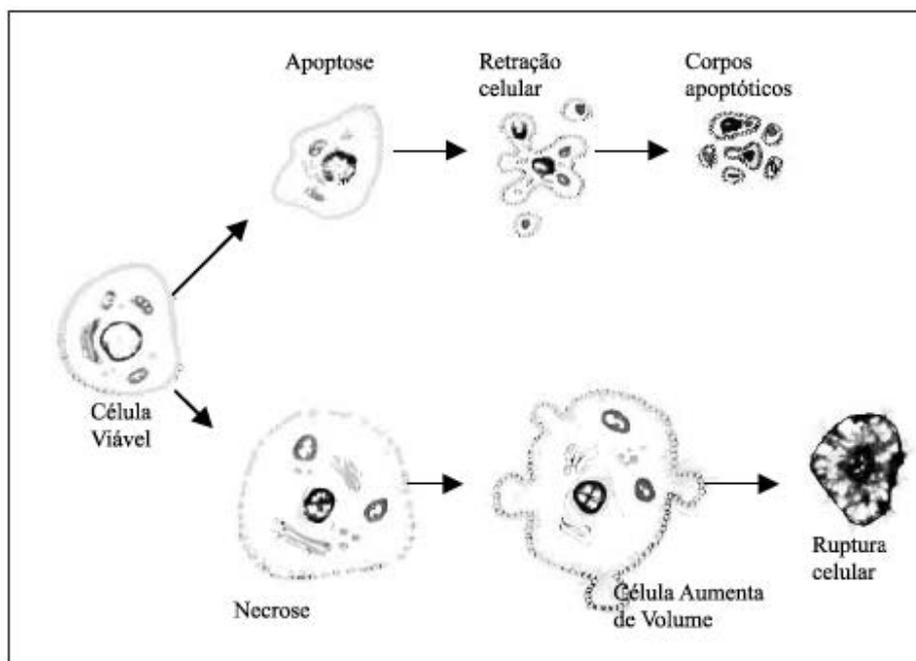
A indução de apoptose também foi observada por (Del Vecchio *et al.*, 2009), quando verificaram que *P. brasiliensis* modulava a apoptose de células epiteliais A549 por meio da expressão de moléculas apoptóticas, como Bcl-2, Bak, caspase-3. Dessa forma, após invadir células epiteliais ou fagócitos, *P. brasiliensis* pode induzir o processo de apoptose, o que permite ao fungo evadir da resposta imune do hospedeiro e beneficia sua sobrevivência

intracelular, também possibilitando a disseminação do fungo para outras partes do organismo (Souto *et al.*, 2003; Mendes-Giannini *et al.*, 2005; Mendes-Giannini *et al.*, 2006; Vericimo *et al.*, 2006).

O processo de apoptose é um programa de morte celular extremamente regulado e de grande eficiência, que requer a interação de inúmeros fatores. Uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos específicos e geneticamente regulados (Saraste e Pulkki, 2000) promovem alterações morfológicas, tais como condensação de cromatina, fragmentação do DNA em oligonucleotídeos, redução no tamanho celular, perda da arquitetura da membrana, entre outras (Perskvist *et al.*, 2002). Os componentes celulares são então transformados em "corpos apoptóticos" envolvidos por membrana plasmática. Em resposta aos sinais de superfície que ocorrem devido a translocação da fosfatidilserina do lado interno para o lado externo da membrana "marcando" as células que deverão ser fagocitadas, os corpos apoptóticos são rapidamente englobados pelas células fagocíticas e degradados em seus lisossomos, sem causar resposta inflamatória e danos aos tecidos (Golstein, 1998).

A necrose é um tipo de morte na qual as células sofrem uma agressão que resulta no aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e consequente ruptura celular (Figura 6). Ao contrário da apoptose, durante o processo de necrose o conteúdo celular é liberado, causando dano às células vizinhas e uma reação inflamatória no local (Ziegler e Groscurth, 2004).

Figura 6. Características morfológicas da apoptose e da necrose



Fonte: Grivicich, 2007.

Diversos são os fatores que podem desencadear a apoptose, entre eles: ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos no DNA, choque térmico, privação de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e níveis aumentados de espécies reativas do oxigênio (Hengartner, 2000).

A ativação da apoptose pode ser iniciada de duas diferentes maneiras: pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial).

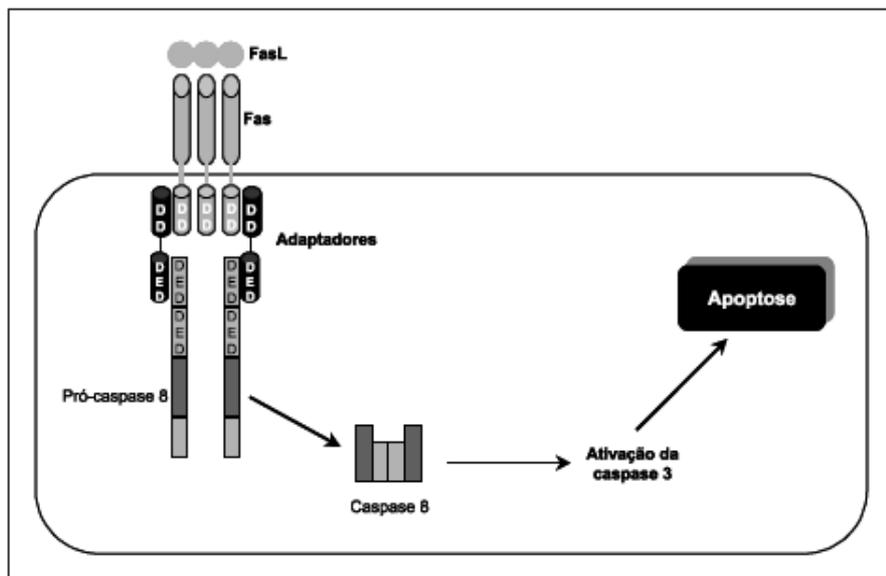
VIA EXTRÍNSECA

A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral TNFR, tais como Fas e TNFR1. Esta ligação é capaz de ativar a cascata das caspases (Budihardjo *et al.*, 1999). Todos os membros da família TNFR possuem um subdomínio extracelular rico em cisteína, o qual permite que eles reconheçam seus ligantes (FasL e TNF). Tal fato resulta na

trimerização e consequente ativação dos receptores de morte específicos (Figura 7).

A sinalização a seguir é mediada pela porção citoplasmática desses receptores que contém uma sequência de 65 aminoácidos chamada "domínio de morte" sendo, por isso, chamados de "receptores de morte celular" (Naismith e Sprang, 1998). Quando os receptores de morte celular reconhecem um ligante específico, os seus domínios de morte interagem com moléculas conhecidas como FADD/MORT-1. Essas moléculas têm a capacidade de recrutarem a caspase-8 que irá ativar a caspase-3, executando a morte por apoptose (Daniel *et al.*, 2001).

Figura 7. Via extrínseca de ativação da apoptose; DD=domínio de morte; DED=efetor do domínio de morte



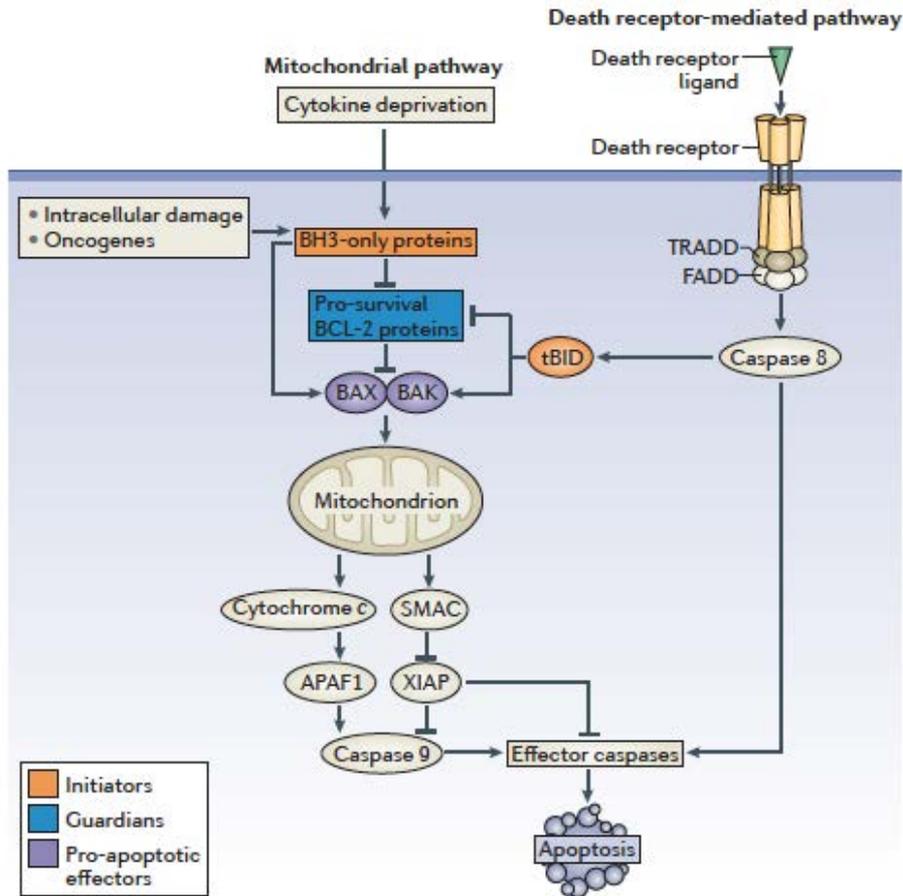
Fonte: Grivicich, 2007.

VIA INTRÍNSECA

Já na via intrínseca, as mitocôndrias expressam na superfície de sua membrana uma proteína conhecida como Bcl-2. A família Bcl-2 inclui 25 proteínas, pro-apoptóticas e anti-apoptóticas. Muitas destas proteínas regulam a fase de apoptose dependente da mitocôndria: Bcl-2 e Bcl-X, as quais transmitem sinais para iniciar a apoptose, enquanto outras: Bak e Bax promovem a liberação de proteínas apoptogênicas mitocondriais. Sendo assim, as primeiras inibem a apoptose, enquanto as segundas a estimulam. As caspases, uma família de cisteíno-proteases com especificidade para resíduos de aspartato, são produzidas nas células sob a forma de zimogênios inativos. Caspases efetoras, como a caspase-3, são ativadas por uma caspase iniciadora, como a caspase-9, através de clivagem proteolítica em sítios específicos de resíduos internos de aspartato (Nicholson, 2000; Reed, 2002).

Portanto, quando as proteínas pertencentes a essa família são estimuladas em resposta à algum stress citotóxico, em quantidade suficiente para ultrapassar o limiar apoptótico, Bax e Bak formam oligômeros que permeabilizam a membrana mitocondrial externa (Li *et al.*, 1997); Esse evento libera fatores apoptogênicos no citosol, tais como o citocromo C, o qual promove a ativação da caspase 9 no APAF-1 (fator de ativação de protease associada à apoptose 1) o que levará à ativação das caspases efetoras. Uma vez ativadas, as caspases efetoras são responsáveis pela clivagem proteolítica de muitas proteínas responsáveis pela sobrevivência celular, como as proteínas estruturais (Nicholson, 2000; Reed, 2002).

Figura 8. As vias intrínseca e extrínseca da apoptose.



Fonte: Czabotar, 2014.

- p53

Adicionalmente, a p53 de mamíferos é um gene supressor tumoral envolvido no ciclo de regulação celular, reparo do DNA e morte celular programada (Schuler *et al.*, 2000). Uma das respostas mais notáveis à ativação da p53 é a indução da apoptose. Células comprometidas a sofrer apoptose pela via p53 dependente tipicamente seguem a via intrínseca, ou mitocondrial, apesar da p53 também modular a morte celular pelos receptores de morte. Esta proteína tem a habilidade de ativar a transcrição de vários genes pró-apoptóticos, incluindo aqueles que codificam os membros da família Bcl-2 (Amaral *et al.*, 2010).

Dessa maneira, através da modulação da apoptose em células hospedeiras, é possível eliminar mecanismos de defesa necessários para erradicar o patógeno do organismo, regular a replicação do patógeno ou promover a inflamação para promover o "clearance" ou prevenir que o patógeno se espalhe para outros tecidos (Gao e Kwaik, 2000). O processo de apoptose é inerente à todas as células e parece estar relacionado à internalização do fungo em células epiteliais (Jacobson, 1997; Jacobson *et al.*, 1997; Vaux e Korsmeyer, 1999; Albert, 2004). Como consequência, o patógeno atinge o meio extracelular, elimina células fagocíticas ou estimula a resposta inflamatória (Monack *et al.*, 1996; Muller *et al.*, 1996; Zychlinsky *et al.*, 1996; Wronowska *et al.*, 2005).

2.4. Tratamento e Bioprospecção de Novas Substâncias

- Drogas Antifúngicas

Entre os fármacos de escolha atuais para micoses sistêmicas estão a clássica combinação de sulfametaxol/trimetoprim, itraconazol, cetoconazol, fluconazol e anfotericina B (Marques, 2003; Restrepo *et al.*, 2008; Marques, 2012).

A maioria dos azóis possui má absorção pelo organismo e muitos efeitos adversos como náuseas, dor abdominal, prurido, vômitos, entre outros. Os que possuem ação rápida e os derivados da sulfanamida (sulfadiazina, sulfametoxipiridazina e sulfadoxina) constituem alternativas terapêuticas úteis nas formas mais leves da doença. A combinação sulfametaxol/trimetoprim é distribuída gratuitamente no Brasil, pelo Ministério da Saúde, sendo sua maior desvantagem a necessidade de tratamentos longos (mais de 12 meses) para casos moderados e severos. Estudos comparativos recentes indicam que algumas drogas, tais como a terbinafina, anfotericina lipossomal, e o voriconazol possuem potencial terapêutico contra a PCM e podem vir a ser incluídas no tratamento da PCM. Estes estudos também

relataram que esquemas terapêuticos mais curtos com itraconazol sejam capazes de induzir cura em pacientes cronicamente infectados, porém ainda existem desafios no tratamento, como a necessidade de mais estudos controlados, busca por novas drogas e combinações e compostos capazes de modular a resposta imune nos casos graves (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2015).

A anfotericina B, recomendada para o tratamento da PCM desde 1958, ainda é a primeira droga de escolha para os casos mais graves da doença, independente do estado imunológico do paciente, e apresenta alta toxicidade. Sendo assim, algumas espécies vegetais com propriedades antifúngicas e menos agressivas ao organismo, podem proporcionar uma melhor qualidade de vida aos pacientes com paracoccidioidomicose e outras micoses endêmicas, especialmente para casos de pacientes com AIDS (Nakai *et al.*, 2003; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2015).

- Ácido Gálico

A espécie *Alchornea glandulosa* (*Euphorbiaceae*) é uma árvore de 10-20 metros com caules tortuosos, sendo popularmente conhecida como “tapiá” “tanheiro de folha-redonda”, “tanheiro”, “canela-raposa” ou “amor-seco”, sendo encontrada nas regiões sul e sudoeste do Brasil, e principalmente na Mata Atlântica (Pinto, 2002). Estudos químicos da espécie *A. glandulosa*, revelaram a presença de substâncias fenólicas como o ácido gálico (ácido 3,4,5-triidroxibenzóico), o qual apresenta diversas atividades biológicas como antiinflamatória, antioxidante, antimutagênica, anticarcinogênica, antibacteriana, antiviral e analgésica. Devido à sua variada propriedade e aplicações comerciais, o ácido gálico é uma substância de interesse para as indústrias farmacêuticas e químicas (Sumbul *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012). Um estudo realizado pelo nosso grupo verificou a atividade antifúngica do ácido gálico frente

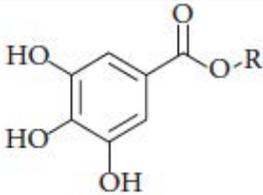
a diferentes isolados de *P. brasiliensis*, e comprovou-se que essa substância apresentou uma potente ação anti- *Paracoccidioides* (De Paula E Silva, 2012).

Há na literatura, trabalhos com ácido gálico e seus derivados, especialmente estudos focados na relação estrutura-atividade destas substâncias. Desde 1995, (Kubo *et al.*), avaliaram a atividade antimicrobiana de uma série de alcoóis de cadeia longa (alcanóis), sendo testados contra 15 microrganismos e a atividade máxima parece ser dependente do comprimento da cadeia hidrofóbica, e também do microrganismo testado.

Em um estudo preliminar de De Paula E Silva *et al.* (2014), dentre a série de 14 galatos de alquila, demonstrados na Tabela 1, o galato de decila (G14) foi selecionado como o que teve melhor atividade antifúngica para uma grande variedade de fungos patogênicos de importância clínica, assim como o galato de undecila (G15). Por este motivo as duas substâncias foram selecionadas para a realização deste estudo.

Como alternativa aos fármacos disponíveis, substâncias de origem vegetal modificadas sinteticamente com possível ação antifúngica, podem vir a substituir e complementar tratamentos já existentes, com o intuito de diminuir a toxicidade e a consequente melhora na qualidade de vida dos pacientes com paracoccidioidomicose e outras micoses endêmicas (Brandao *et al.*, 2010).

Tabela 1. Estrutura molecular do ácido gálico (G1) e galatos de alquila (G2–G17).

			
	G1	Gallic acid	H
	G2	Methyl gallate	CH ₃
	G3	Ethyl gallate	CH ₂ CH ₃
	G4	Propyl gallate	(CH ₂) ₂ CH ₃
	G5	Isopropyl gallate	CH(CH ₃) ₂
	G6	Butyl gallate	(CH ₂) ₃ CH ₃
	G7	Pentyl gallate	(CH ₂) ₄ CH ₃
R	G9	Isobutyl gallate	CH ₂ CH(CH ₃) ₂
	G10	Hexyl gallate	(CH ₂) ₅ CH ₃
	G11	Heptyl gallate	(CH ₂) ₆ CH ₃
	G12	Octyl gallate	(CH ₂) ₇ CH ₃
	G14	Decyl gallate	(CH ₂) ₉ CH ₃
	G15	Undecyl gallate	(CH ₂) ₁₀ CH ₃
	G16	Dodecyl gallate	(CH ₂) ₁₁ CH ₃
	G17	Tetradecyl gallate	(CH ₂) ₁₃ CH ₃

Fonte: De Paula e Silva *et al.*, 2014.

3. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento de *P. brasiliensis*, através da verificação de alguns de seus fatores de virulência (gp43 e proteína 14-3-3) em induzir apoptose no modelo de interação com células epiteliais pulmonares A549, para um melhor entendimento dos mecanismos de patogenicidade desse microrganismo; assim como, verificar a atividade anti-apoptótica das substâncias, maitenina, galato de decila (G14) e galato de undecila (G15) para a identificação de alvos interessantes na pesquisa de antifúngicos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Isolado e Condições de Cultivo

Foi utilizado o isolado 18 de *P. brasiliensis* na fase leveduriforme, isolado de um caso clínico de paracoccidioidomicose da Faculdade de Medicina de São Paulo - FM-USP e mantido na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, São Paulo, Brasil, em meio de Fava Netto (Fava Netto 1961) a 37°C.

2.2. Cultura de Células Epiteliais

Neste estudo foi utilizada a linhagem de células A549, pneumócitos tipo II, que são células epiteliais respiratórias, obtidas da American Type Culture Collection (USA). As células foram cultivadas em meio HAM F-12 (Cultilab, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab), e mantidas a 36.5°C e 5% CO₂. A formação da monocamada de células foi avaliada e monitorada por microscopia ótica.

2.3. Preparo das Substâncias

Foram empregadas a maitenina enviada pelo Instituto de Química da UNESP - Araraquara, e os galatos pelo Prof. Dr Luis Octávio Regasini do Departamento de Química e Ciências Ambientais do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) da UNESP - São José do Rio Preto. Todos foram diluídos assepticamente em 1 mL de dimetilsulfóxido e solubilizados com o auxílio do vórtex. Foram realizados cálculos para determinar a quantidade de cada substância a ser colocada, para que a concentração inicial na placa de microdiluição fosse 250µg/mL.

2.4. Teste de Sensibilidade

Os testes de sensibilidade para os galatos de alquila foram previamente realizados por De Paula E Silva *et al.* (2014) de acordo com o documento M27-A3 (2008) - Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma aprovada - do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). Já os testes de sensibilidade para a maitenina foram previamente realizados por Gullo *et al.* (2012) de acordo com o mesmo documento acima citado. Foram testadas as substâncias naturais maitenina e galatos de alquila, além dos controles anfotericina B e itraconazol contra a cepa teste de *P. brasiliensis*.

2.5. Preparação de 14-3-3 e gp43

A proteína 14-3-3 foi preparada por expressão heteróloga em *Escherichia coli*, como descrito por Da Silva *et al.* (2013), e a gp43 foi purificada a partir do exoantígeno bruto de *P. brasiliensis*, previamente descrito por Mendes Giannini *et al.* (1989). Posteriormente, o exoantígeno foi fracionado por cromatografia de filtração em gel em colunas Sephacryl S-100 (Pharmacia-Biotech, USA) usando AKTA FPLC (GE Healthcare, USA). Uma análise de eletroforese bi-dimensional foi realizada utilizando o IPGphor III (GE Healthcare), eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) e Coomassie Blue Phast Gel R350, destacando os pontos específicos correspondentes às massas moleculares de 30 kDa e 43 kDa, respectivamente.

2.7. Ocorrência de apoptose em células infectadas com *P. brasiliensis*

Para avaliar a capacidade de indução de apoptose pelas proteínas gp43 e 14-3-3 de *P. brasiliensis* em células epiteliais, bem como verificar o efeito anti-apoptótico das substâncias selecionadas foram realizadas diferentes técnicas:

2.7.1. Tratamento das Células A549 com as Adesinas 14-3-3 e gp43

As células A549 foram cultivadas a 36.5°C em placas de 24 poços e as concentrações de células foram ajustadas para 1.0×10^6 células por poço. As células foram incubadas por 5, 24, 48 e 72 horas com 25 µg/mL da proteína apropriada (somente a proteína 14-3-3, a gp43 ou o tratamento combinado da proteína 14-3-3 com a gp43) dissolvida em meio HAM F-12 Nutrient. Após as incubações, as células foram lavadas 3 vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Nos experimentos para controle negativo, as células A549 não foram pré incubadas com nenhuma proteína e os controles positivos foram realizados utilizando 1 mM metotrexato (Zodiac®, Brazil).

2.7.2. Técnica de “TUNEL” (Terminal deoxy-transferase mediated X-dUTP Nick End Labeling)

Esta técnica foi realizada conforme descrito por Zychlinsky *et al.* (1996) e tem como princípio a marcação específica de sequências de DNA da fragmentação que ocorre durante o processo de apoptose. Para isso, as células epiteliais foram dispostas em lamínulas de vidro e incubadas por 5 h e 24 h com a proteína 14-3-3 e a gp43, como descrito previamente, lavadas e fixadas com paraformaldeído 4% em PBS. As lamínulas foram bloqueadas com albumina de soro bovino, permeabilizadas durante 15 min com 0,2% de Triton X-100 e então incubadas com a D-transferase terminal e o dUTP fluorescente (Boehringer Mannheim, Alemanha). Os corpos apoptóticos foram visualizados e contados por microscopia de fluorescência (Leica, Alemanha) utilizando conjuntos de filtros para isotiocianato de fluoresceína (FITC) e por citometria de fluxo (BD FACSCanto; BD Biosciences, EUA). Todos os experimentos foram repetidos três vezes e realizados em triplicatas; Determinou-se a média e o desvio padrão de pelo menos três experimentos distintos e então foi feita a análise estatística dos resultados.

2.7.3. Citometria de Fluxo

As células epiteliais foram cultivadas em placas de seis poços, ajustadas para 1.0×10^6 células por poço e incubadas com a proteína 14-3-3 e a gp43, como previamente descrito, durante 5 h, 24 h, 48 h e 72 h. Após a incubação, as células foram tripsinizadas e em seguida, lavadas com uma solução de PBS e colocadas em etanol 70% em PBS durante a noite a 4°C. Posteriormente, as células foram lavadas três vezes com PBS e permeabilizadas com 1% de saponina. A reação foi desenvolvida utilizando anticorpos anti-Bak e anti-Bcl-2, diluídos 1:200 em PBS. Após três lavagens com PBS, as células foram incubadas com anticorpo anti-camundongo conjugado com FITC (isotiocianato de fluoresceína) durante 30 min, lavadas duas vezes e ressuspensas em PBS. Os controles negativos, também foram preparados utilizando um anticorpo primário irrelevante. As células (10.000/amostra) foram analisadas pelo citômetro de fluxo FACSCanto (sistema Becton Dickinson de imunocitometria, EUA) para verificação da expressão de Bcl-2 e Bak. Para a quantificação e comparação, as porcentagens de células positivas e os valores de intensidade de fluorescência média foram calculados através do software FACSDiva.

2.7.4. PCR em Tempo Real

Para a confirmação dos dados foi realizada a técnica de PCR em tempo real utilizando iniciadores adequadamente construídos para amplificar as regiões correspondentes aos genes Bak, Bax, Bcl-2 e GADPH (gene controle – constitutivamente expresso). As sequências desses iniciadores encontram-se esquematizadas na tabela a seguir:

Tabela 2. Iniciadores utilizados para PCR em tempo real

Gene	Sequência do Primer (5'→3')
Bak R	CTGCCAGGGAACAGAGAAGG
Bak F	GTTCTGTTGGGCCAGTTGT
Bax R	CCACAAAGATGGTCACGGTCTG
Bax F	GAACCATCATGGGCTGGACA
Bcl-2 R	CCTTGGCATGAGATGCAGGA
Bcl-2 F	GATTGATGGGATCGTTGCCTTA
GADPH R	TGGTGAAGACGCCAGTGGA
GADPH F	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC

Para isso, células A549 foram cultivadas em garrafas de 75 mm³, ajustadas a concentração de 1.0×10^6 células/mL e incubadas com a gp43 e os galatos de decila (G14) ou undecila (G15) por 5 h, 24 h, 48 h and 72 h. Após cada período de incubação, as células foram lavadas com PBS e removidas das garrafas. O RNA total extraído foi isolado a partir das células que receberam tratamento e das que não foram expostas (controle) usando o reagente TRIzol (Invitrogen Life Technologies, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, o RNA total (1 µg) foi reversamente transcrito em cDNA através da transcriptase reversa RevertAid™ H Minus (Fermentas, Life Sciences, Canada). As reações de PCR foram realizadas utilizando-se 1 µL de cDNA, 12,5 µL de 2X Maxima® SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (Thermo Scientific, USA), e 25 pmol de cada primer, adicionando água à reação até atingir o volume de 25 µL. As reações foram realizadas com temperatura inicial de 50°C por 2 minutos, seguido por 10 minutos a 95°C. Depois, 40 ciclos de 95°C a 15 segundos, seguidos de anelamento e síntese a 60°C por um minuto. As reações foram realizadas em triplicata utilizando o aparelho Applied Biosystems 7500 cycler.

Em seguida a PCR, foi realizada a análise da curva de melting para a confirmação da emissão de sinal correspondente a um único produto. A expressão relativa de cada mRNA foi

padronizada a partir de GADPH (utilizado como referência) e os dados foram analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$. A média das triplicatas para cada amostra de RNA foi calculada e em seguida o valor $2^{-\Delta\Delta CT}$. Como controle negativo utilizamos todos os reagentes exceto os galatos de decila (G14) e undecila (G15). Depois de 40 ciclos de amplificação, nenhum produto de amplificação foi detectado para o controle negativo.

2.7.5. Análise Estatística

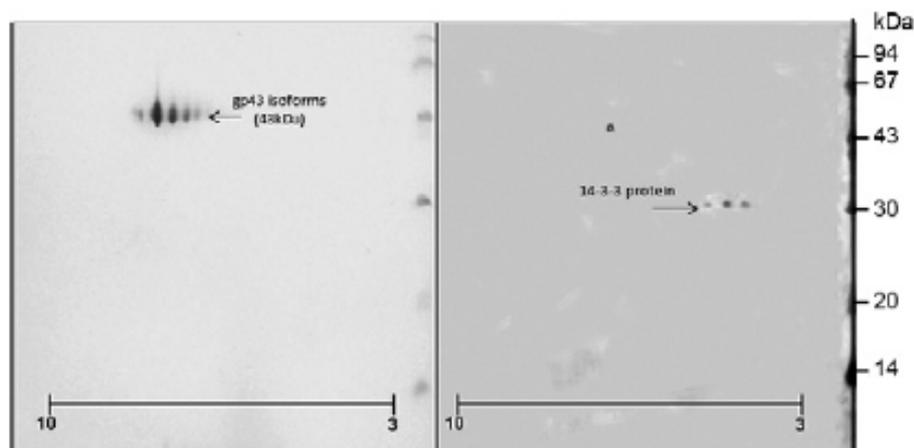
A análise estatística foi calculada por ANOVA, seguida por Teste de Tukey a partir do software GraphPad Prism 5.0. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0.05$.

3. Resultados

3.1. Purificação das Adesinas 14-3-3 e da gp43

Marcações específicas correspondentes às respectivas massas moleculares da gp43 e da proteína 14-3-3 podem ser observadas abaixo (Figura 9) indicadas por setas, confirmando a pureza das proteínas que foram utilizadas nos experimentos propostos. As análises foram realizadas por eletroforese bidimensional, eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida - SDS (SDS-PAGE) e coradas com Coomassie Blue Phast Gel R350.

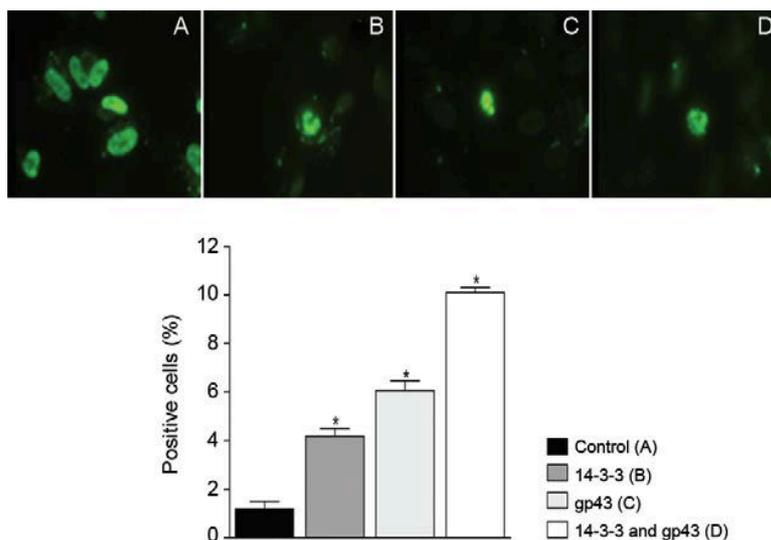
Figura 9. Eletroforese bidimensional mostrando a proteína 14-3-3 e a gp43 após serem purificadas.



3.2. Verificação de Apoptose pela Técnica de "TUNEL"

Para determinar se as células epiteliais sofrem apoptose após tratamento com as proteínas de *P. brasiliensis*, a fragmentação de DNA foi avaliada pela técnica de "TUNEL". Partindo do princípio de que células A549 não tratadas tem aproximadamente 1% de células apoptóticas (Da Silva *et al.*, 2015), os corpos apoptóticos foram visualizados e contados por microscopia de fluorescência (Leica, Alemanha) como representado na Figura 12, assim como por citometria de fluxo (gráfico da Figura 12). Após o tratamento com gp43 e proteína 14-3-3 por 5 h, não houve aumento significativo de células apoptóticas se comparadas com o controle (células que não receberam tratamento). Entretanto, após 24 h de tratamento, houve um aumento significativo de 4% quando tratadas com a proteína 14-3-3, de 6% quando tratadas com gp43 e 10% quando tratadas com ambas as adesinas. Os resultados dos tratamentos de 48 h e 72 h também foram avaliados, porém não apresentaram diferenças significativas se comparados com os resultados obtidos após o tratamento de 24 h. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada tratamento.

Figura 10. Fragmentação de DNA pela técnica de "TUNEL". **A:** controle; **B:** tratamento com proteína 14-3-3; **C:** tratamento com gp43; **D:** tratamento com proteína 14-3-3 e gp43.



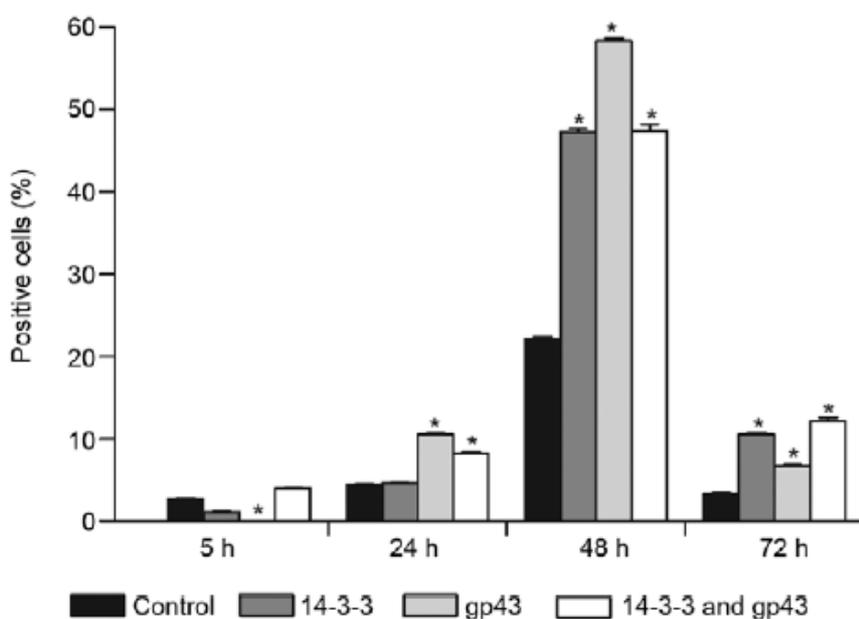
3.3. Avaliação da expressão dos marcadores pró-apoptóticos Bak-1 e Bax

A Figura 10 mostra os resultados do tratamento das células epiteliais A549 com a gp43 e a proteína 14-3-3 após diferentes períodos de tempo em relação à expressão de Bak pelo método de citometria de fluxo. Com 5 h de tratamento, uma diferença significativa na expressão de Bak foi observada entre as células tratadas com gp43 e as não tratadas. Após 24 h de tratamento com a gp43 ou ambas as proteínas (gp43 + 14-3-3), um aumento da expressão de Bak foi observado. Após 48 h, todos os tratamentos levaram à aumentos significantes da expressão de Bak quando comparados com o tratamento de 24 h e o controle. O maior aumento da expressão de Bak foi observado no tratamento com a gp43. O mesmo foi observado por PCR em tempo real com o marcador Bak, o qual também apresentou um aumento em sua expressão após o tratamento com gp43. Os níveis de expressão aumentaram 271 vezes após 24 h e 53 vezes após 48 h. Além disso, a expressão de Bax aumentou 112 vezes após 24 h de tratamento com gp43 e três vezes após 48 h. Esse perfil de expressão dos marcadores pró-apoptóticos observados por citometria de fluxo e PCR em tempo real,

confirma a ativação desses marcadores pela gp43.

Para a realização dos experimentos por citometria de fluxo foi utilizado somente o marcador Bak, pois apenas o anticorpo anti-Bak estava disponível no laboratório. Já para a realização da PCR em tempo real, utilizou-se a sequência para o gene Bax. Apesar de ambos os marcadores (Bak e Bax) serem fatores pró-apoptóticos, podemos observar diferenças na expressão desses marcadores devido às condições na realização dos experimentos.

Figura 11. Expressão de Bak em células A549 após diferentes tratamentos analisados por citometria de fluxo.

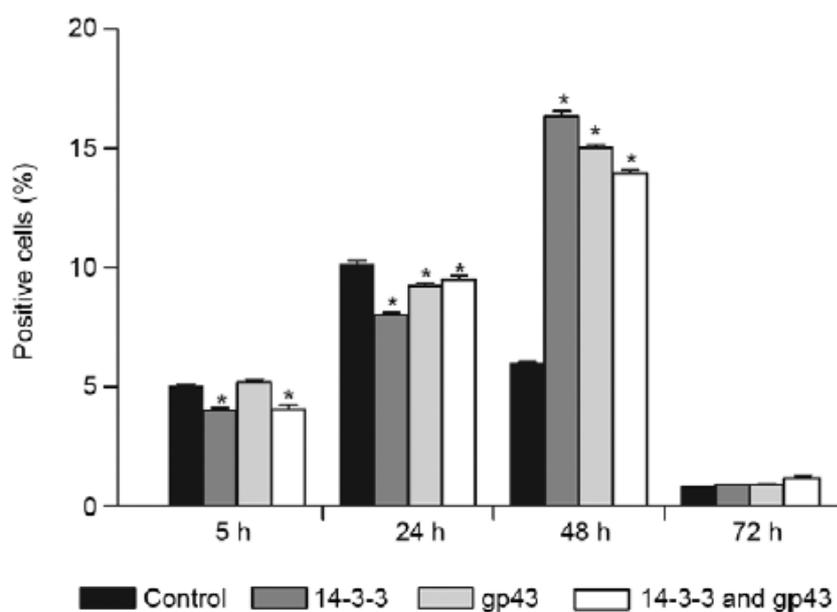


3.4. Avaliação da expressão do marcador anti-apoptótico Bcl-2

A expressão de Bcl-2 foi avaliada em células após o tratamento com a proteína 14-3-3 e gp43 por citometria de fluxo. Após 5 h, foi observada uma diminuição da expressão de Bcl-2 quando as células foram tratadas com 14-3-3 e 14-3-3 + gp43. Com 24 h de tratamento, a gp43 também levou à uma redução significativa da expressão de Bcl-2. Entretanto, após 48 h nos tratamentos com 14-3-3 e ambas as proteínas, houve um aumento significativo da

expressão de Bcl-2 seguido por uma redução após 72 h de tratamento (Figura 11). O mesmo perfil de expressão de Bcl-2 foi observado usando PCR em tempo real. Após 24 h de tratamento com 14-3-3, gp43 ou ambas as proteínas (14-3-3 + gp43), houve uma diminuição de 2 vezes na expressão do marcador. Após 48 h e 72 h, não foi observada nenhuma diferença significativa na expressão de Bcl-2, indicando uma possível perda desta via devido ao tratamento.

Figura 12. Expressão de Bcl-2 em células A549 após diferentes tratamentos analisada por citometria de fluxo. Os asteriscos significam diferenças significativas em relação ao controle ($p < 0.05$).



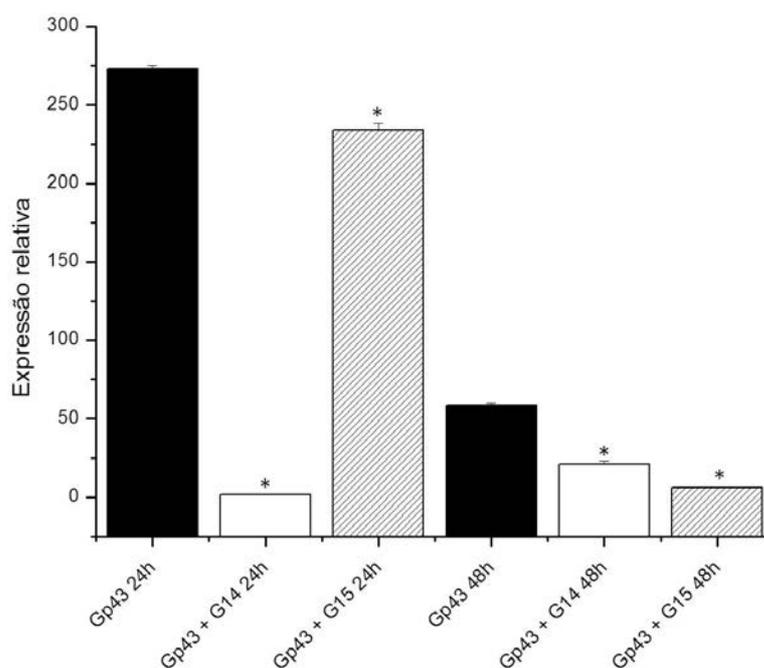
3.5. Avaliação da Atividade Anti-Apoptótica das Substâncias Naturais

3.5.1. Expressão dos marcadores pró-apoptóticos Bak-1 e Bax após tratamento com G14 e G15

PCR em tempo real foi utilizado para a avaliação da ação anti-apoptótica dos galatos

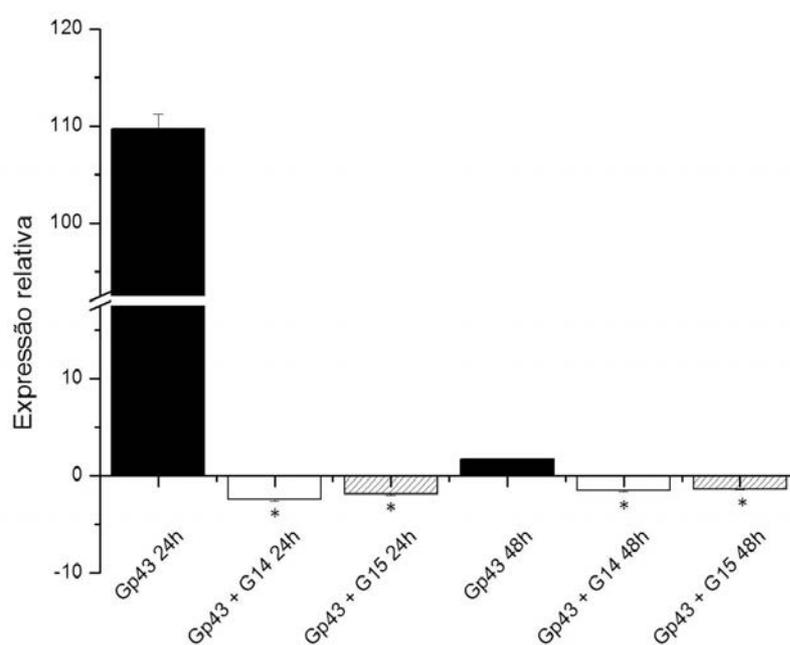
de alquila selecionados. Após avaliarmos a expressão do gene Bak, foi possível observar que as células tratadas com a gp43 e o galato de decila com 24h de tratamento, apresentaram uma expressão 271,01 vezes menor quando comparadas com o controle (células tratadas somente com gp43). Em células tratadas com gp43 e o galato de undecila, foi observado um valor menos acentuado, apresentando uma expressão 38,82 vezes menor. Com 48 horas de tratamento também observamos uma diminuição na expressão do gene em ambos os tratamentos: com o galato de decila Bak-1 foi 17,7 vezes menos exposto, enquanto que com o galato de undecila 52,53 vezes menos exposto quando comparados com o controle (Figura 13).

Figura 13. Gráfico representativo demonstrando a expressão de Bak nas células tratadas simultaneamente com gp43 (50ug/mL) e galato de decila ou galato de undecila, por 24 e 48h por PCR em tempo real. * $p < 0,05$ (n=9)



Outro gene avaliado foi Bax, uma proteína da família Bcl-2 com função pró-apoptótica assim como Bak. Após a análise foi observado que as células tratadas com gp43 e G14 apresentaram uma diminuição de 112,12 vezes em sua expressão quando comparado com o controle após o tratamento de 24 h e as células tratadas com gp43 e G15 apresentaram uma expressão de 111,57 vezes menor. Após o tratamento de 48 horas com gp43, tanto as células tratadas com G14 quanto com G15 diminuíram cerca de 3 vezes a expressão do gene Bax.

Figura 14. Gráfico representativo demonstrando a expressão de Bax nas células tratadas simultaneamente com gp43 (50ug/mL) e galato de decila ou galato de undecila, por 24 e 48h por PCR em tempo real. * $p < 0,05$ (n=9)



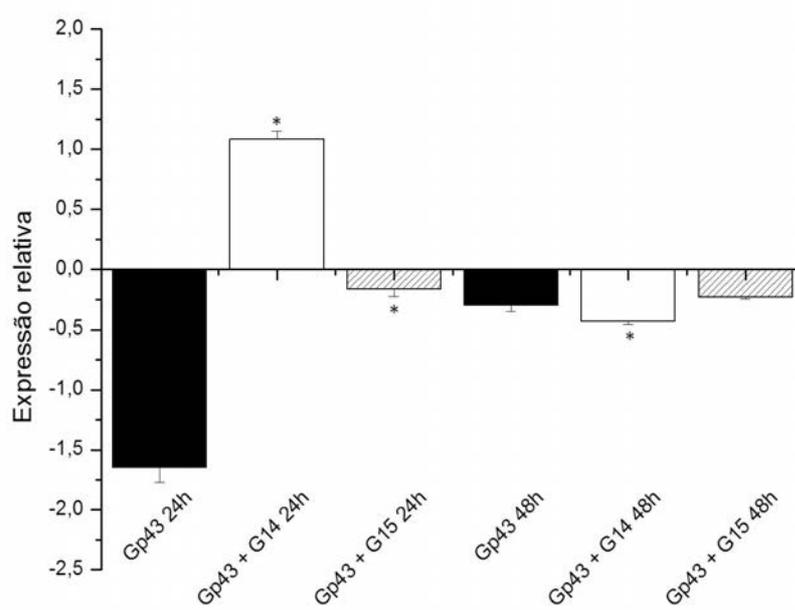
3.5.2. Expressão do marcador anti-apoptótico Bcl-2 após tratamento com G14 e G15

Dando continuidade à avaliação do potencial anti-apoptótico dos galatos de alquila selecionados, realizamos PCR em tempo real para analisar a expressão do gene Bcl-2 em

células tratadas com gp43 e os galatos de decila e undecila. A análise da expressão do marcador anti-apoptótico Bcl-2 foi confirmada por PCR em tempo real e foi possível verificar que no tratamento das células A549 com a gp43 houve uma diminuição de aproximadamente 2 vezes na expressão desse gene.

Após 24 horas de tratamento observamos um aumento na expressão do gene de 2,73 vezes para células tratadas com o galato de decila e 0,92 vezes para as células tratadas com o galato de undecila quando comparado com o controle. Após 48 horas de tratamento não observamos nenhuma alteração na expressão desse gene para o tratamento com G15, mas observamos uma diminuição de aproximadamente 0,25 vezes para o tratamento com G14 se comparado com o controle. (Figura 15).

Figura 15. Gráfico representativo demonstrando a expressão de Bcl-2 nas células tratadas simultaneamente com gp43 (50ug/mL) e galato de decila, galato de undecila, por 24 e 48h por PCR em tempo real. * $p < 0,05$ (n=9)



Para sumarizar os dados obtidos por PCR em tempo real e facilitar o entendimento dos resultados, foi montada uma tabela (Tabela 3) a qual está demonstrada abaixo. As setas ↑ significam um aumento na expressão dos genes, as setas ↓ significam uma diminuição e o traço (—) indica que não houve aumento ou diminuição significativa.

Tabela 3. Expressão dos genes Bak-1, Bax e Bcl-2 após os tratamentos com G14 e G15.

Incubação	24 h			48 h		
	gp43 + G14	gp43 + G15	gp43	gp43 + G14	gp43 + G15	gp43
Bak-1	↓271,01x	↓38,82x	↑275x	↓17,7x	↓52,53x	↑75x
Bax	↓112,12x	↓111,57x	↑110x	↓3x	↓3x	↑2x
Bcl-2	↑2,73x	↑0,92x	↓2x	↓0,25x	—	—

4. Discussão

No atual estudo, foi avaliada a expressão de Bak e Bcl-2 por citometria de fluxo, as quais não apresentaram nenhuma alteração significativa em sua expressão no tratamento com a proteína 14-3-3 em 5 h se comparados com o controle negativo. Entretanto, no tratamento com gp43 após 24 h houve um aumento na expressão de Bak, mas não de Bcl-2, demonstrando a indução da apoptose pela gp43. Após 48 h de tratamento com gp43 e/ou proteína 14-3-3, enquanto a expressão de Bak aumentou, a expressão de Bcl-2 também aumentou, mas em menor proporção.

Esses resultados sugerem dois possíveis mecanismos usados pelo fungo durante o processo de infecção. A primeira hipótese seria que a indução da apoptose através da expressão de Bak levaria à uma resposta celular havendo um aumento da expressão de Bcl-2 afim de impedir a morte celular. Já na segunda hipótese, o fungo induziria a expressão tanto de Bak quanto de Bcl-2 com o objetivo de causar danos à célula, porém sem matá-la, e dessa forma consegue se proteger do sistema imune do hospedeiro. Mendes-Giannini *et al.* (2004)

descreveram um comportamento similar durante a infecção de *P. brasiliensis* e Del Vecchio *et al.* (2009) a partir de um modelo *in vitro*, compararam duas cepas de *P. brasiliensis* (Pb18R sendo a cepa mais virulenta e Pb18SP sendo a menos virulenta) demonstrando a partir das técnicas de TUNEL e citometria de fluxo que caspase-3, Bak e Bcl-2 intermedeiam o processo de indução de apoptose em células epiteliais A549. Foi observada uma maior expressão dos fatores pró-apoptóticos em Pb18R, um isolado recente de cultura celular e com alta capacidade de adesão, demonstrando uma relação entre os fatores de virulência com a capacidade de indução de apoptose por *P. brasiliensis*.

Os resultados obtidos pela técnica de TUNEL mostraram que o tratamento com as proteínas de *P. brasiliensis*, gp43 e a proteína 14-3-3 por 24 horas, levaram ao aumento do número de células apoptóticas, indicando que ambas as proteínas são capazes de induzir apoptose.

Em estudos anteriores, esse mecanismo utilizado por *P. brasiliensis* foi avaliado em células epiteliais e o número de células apoptóticas aumentaram juntamente com a exposição ao fungo (Mendes-Giannini *et al.*, 2004; Del Vecchio *et al.*, 2009), o que sugere que esta seja uma condição da internalização do fungo ao desencadear a apoptose em células epiteliais. A indução da apoptose em células hospedeiras tem sido relacionada com a patogênese microbiana. Vários patógenos possuem proteínas em sua superfície ou secretam metabólitos capazes de agir como indutores de apoptose em células hospedeiras (Da Silva *et al.*, 2015).

Superti *et al.* (2005), demonstraram em *Yersinia* spp., uma bactéria Gram-negativa enteropatogênica, que tem a capacidade de induzir apoptose em células epiteliais com o auxílio de proteínas expressas em sua superfície, as quais permitem a aderência da bactéria e sua invasão em células expostas no lúmen intestinal. Dessa forma, a *Yersinia* consegue atacar o hospedeiro e ganhar acesso ao tecido. Outro exemplo é a *Shigella flexneri*, que de acordo com Zychlinsky *et al.* (1996), invade as células M da mucosa intestinal e coloniza o tecido a

partir da sua internalização em macrófagos, nos quais, a partir de fatores de virulência induz a apoptose, sendo este, um fator crucial para o início da patogênese da shigelose. A aderência e internalização de *Staphylococcus aureus* em células epiteliais também estão associadas aos fatores de virulência (Haslinger-Loffler *et al.*, 2005), os quais são capazes de induzir apoptose nessas células. Foi observado no estudo de Hu *et al.* (2014) um aumento da expressão de Fas e FADD (Fas-associated death domain) e a subsequente ativação das caspases 3 e 8, demonstrando que essa seja a possível via de ocorrência do processo de apoptose.

Os mecanismos de invasão das células hospedeiras, a permanência dentro das células e a subsequente indução de apoptose, podem explicar o eficiente comportamento de *P. brasiliensis* em promover a infecção do tecido e/ou a sua disseminação pelo sangue (Monteiro Da Silva *et al.*, 2007). As proteínas de *P. brasiliensis* 14-3-3 e gp43 agem como adesinas e fatores de virulência contribuindo para a aderência e internalização do fungo nas células hospedeiras. De acordo com os resultados apresentados neste estudo podemos concluir que ambas as proteínas participam do processo de apoptose, e que também podem contribuir em muitos outros mecanismos importantes na patogênese de *P. brasiliensis*, segundo estudos recentes de Da Silva *et al.* (2015).

Para avaliar a atividade anti-apoptótica das substâncias naturais selecionadas, foi utilizada a técnica de PCR em tempo real, a qual também verificou a atividade apoptótica da gp43 através da análise da expressão dos marcadores pró e anti-apoptóticos: Bcl-2, Bak e Bax. A expressão de Bak, marcador pró-apoptótico, no controle experimental foi 275 vezes maior do que no controle negativo e as células que receberam o tratamento por 24 horas com G14 e G15, expressaram esta proteína respectivamente 271 e 39 vezes menor quando comparadas com o controle experimental. Já com 48 horas de tratamento, também houve um aumento significativo da expressão desse marcador no controle experimental em relação ao controle negativo, e para as células tratadas com G14 e G15 houve diminuição na expressão

de Bak.

Outro marcador pró-apoptótico avaliado foi Bax, o qual foi expresso 110 vezes mais no controle experimental quando comparado com o controle negativo. Já as células tratadas com G14 e G15 por 24 horas, apresentaram uma diminuição na expressão desse marcador. Em 48 horas, a expressão de Bax foi duas vezes aumentada no controle experimental e tanto no tratamento com G14 quanto com G15 houve diminuição na expressão desse gene, porém menos significativa do que no tratamento de 24 horas.

Na avaliação do marcador anti-apoptótico Bcl-2, o controle experimental apresentou diminuição em sua expressão após 24 horas, enquanto que no tratamento das células, também por 24 horas com G14 e G15 houve um aumento da expressão de Bcl-2, respectivamente em 2,7 vezes e de 0,92 vezes, quando comparado com o controle. Após 48 horas de tratamento, não foi observada nenhuma alteração na expressão desse marcador.

Dessa forma, a partir dos resultados obtidos por PCR em tempo real, foi possível verificar que os galatos de alquila testados possuem atividade anti-apoptótica, e segundo os ensaios de sensibilidade dos galatos para *Pb*, as substâncias demonstraram as seguintes CIMs: G14 0,004mg/L e G15 0,015mg/L, sendo então considerados alternativas importantes ao tratamento da paracoccidiodomicose.

Em um estudo preliminar de De Paula E Silva *et al.* (2014), foram testados uma série de 14 galatos de alquila, os quais apresentam importante atividade biológica descrita na literatura contra diferentes espécies de fungos, incluindo diferentes isolados de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. Essas moléculas apresentaram importantes relações entre estrutura e atividade e o galato de decila foi o que apresentou melhor atividade antifúngica contra uma variedade de fungos patogênicos de grande importância clínica, incluindo *P. brasiliensis*. Em relação à citotoxicidade do ácido gálico e dos galatos de alquila, De Paula E Silva (2012) avaliou essas substâncias em células epiteliais respiratórias e observou-se uma alta viabilidade celular para

as linhagens MRC5 e A549, revelando uma baixa citotoxicidade desses compostos para ambas as linhagens de células. Dessa forma, os compostos testados podem ser eficazes no caso de terapias de difícil diagnóstico de espécie ou gênero específicos.

Já em relação à maitenina não obtivemos resultados positivos neste estudo, porém Gullo *et al.* (2012) avaliaram a atividade antifúngica de compostos naturais e semi-sintéticos, sendo um deles a maitenina, e observou-se uma excelente concentração inibitória mínima (MIC de 0.12 mg/L) dessa substância contra diferentes isolados de *P. brasiliensis*.

Dessa forma, além da verificação da atividade anti-apoptótica dos galatos de alquila, a partir da técnica de PCR em tempo real, também pudemos confirmar que a gp43 apresenta atividade apoptótica e talvez este seja o principal componente do fungo na atividade apoptótica de *Pb* demonstrada em trabalhos anteriores (Mendes-Giannini *et al.*, 2004).

5. Conclusão

Os resultados deste estudo permitem concluir que:

1. Ambas as proteínas, gp43 e proteína 14-3-3, participam do processo de apoptose;
2. Verificou-se atividade anti-apoptótica dos galatos de alquila G14 e G15, o que sugere boas perspectivas de seu uso como alternativa de tratamento na paracoccidiodomicose.

Referências Bibliográficas

- ACHENBACH, R. et al. Paracoccidioidomycosis: unusual clinical presentation and utility of computerized tomography scanning for diagnosis. **Int J Dermatol**, v. 41, n. 12, p. 881-882, 2002.
- AJESH, K.; SREEJITH, K. Peptide antibiotics: an alternative and effective antimicrobial strategy to circumvent fungal infections. **Peptides**, v. 30, n. 5, p. 999-1006, 2009.
- ALBERT, M. L. Death-defying immunity: do apoptotic cells influence antigen processing and presentation? **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 3, p. 223-231, 2004.
- ALMEIDA, S. R.; UNTERKIRCHER, C. S.; CAMARGO, Z. P. Involvement of the major glycoprotein (gp43) of *Paracoccidioides brasiliensis* in attachment to macrophages. **Med Mycol**, v. 36, n. 6, p. 405-411, 1998.
- AMARAL, J. D. et al. The role of p53 in apoptosis. **Discov Med**, v. 9, n. 45, p. 145-152, Feb 2010.
- ANDREOTTI, P. F. et al. Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect**, v. 7, n. 5-6, p. 875-881, 2005.
- BARROZO, L. V. et al. First description of a cluster of acute/subacute paracoccidioidomycosis cases and its association with a climatic anomaly. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 3, 2010.
- BARROZO, L. V. et al. Climate and acute/subacute paracoccidioidomycosis in a hyper-endemic area in Brazil. **Int J Epidemiol**, v. 38, n. 6, p. 1642-1649, 2009.
- BENARD, G. et al. Responses of T and B lymphocytes to a *Paracoccidioides brasiliensis* cell wall extract in healthy sensitized and nonsensitized subjects. **Am J Trop Med Hyg**, v. 53, n. 2, p. 189-194, 1995.
- BENARD, G.; MENDES GIANNINI, M. J. **Textbook of Pediatric Infections Diseases - Paracoccidioidomycosis**. 6. Philadelphia: 2009. 2762-2776
- BLOTTA, M. H. et al. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. **Am J Trop Med Hyg**, v. 61, n. 3, p. 390-394, 1999.
- BRANDAO, G. C. et al. Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of extracts and constituents from *Polygonum spectabile* Mart. **Phytomedicine**, v. 17, n. 12, p. 926-929, 2010.
- BUDIARDJO, I. et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 15, p. 269-290, 1999.
- CARRERO, L. L. et al. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal Genet Biol**, v. 45, n. 5, p. 605-612, 2008.

- CERRI, A., SILVA E.X.S.R., PACCA, F. T. Paracoccidioidomicose; aspectos de interesse para o cirurgião-dentista. **Rev Paul Odont**, v. 20, p. 19-24, 1998.
- COSTA, F. G. et al. Alkaloids as inhibitors of malate synthase from *Paracoccidioides* spp.: receptor-ligand interaction-based virtual screening and molecular docking studies, antifungal activity, and the adhesion process. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 9, p. 5581-5594, 2015.
- COUTINHO, Z. F. et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad Saude Publica**, v. 18, n. 5, p. 1441-1454, 2002.
- CZABOTAR, P. E. et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, n. 1, p. 49-63, 2014.
- DA SILVA, J. F. et al. Paracoccidioides brasiliensis 30 kDa adhesin: identification as a 14-3-3 protein, cloning and subcellular localization in infection models. **PLoS One**, v. 8, n. 4, 2013.
- DA SILVA, J. F. et al. Influence of the Paracoccidioides brasiliensis 14-3-3 and gp43 proteins on the induction of apoptosis in A549 epithelial cells. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 476-484, 2015.
- DANIEL, P. T. et al. The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. **Leukemia**, v. 15, n. 7, p. 1022-1032, 2001.
- DE CARVALHO TAVARES, L. et al. Quinolinyln and quinolinyln N-oxide chalcones: synthesis, antifungal and cytotoxic activities. **Eur J Med Chem**, v. 46, n. 9, p. 4448-4456, Sep 2011.
- DE OLIVEIRA, H. C. et al. Paracoccidioides-host Interaction: An Overview on Recent Advances in the Paracoccidioidomycosis. **Front Microbiol**, v. 6, 2015b.
- DE OLIVEIRA, H. C. et al. Alterations of protein expression in conditions of copper-deprivation for *Paracoccidioides lutzii* in the presence of extracellular matrix components. **BMC Microbiol**, v. 14, p. 302, 2014.
- DE OLIVEIRA, H. C. et al. Importance of adhesins in virulence of *Paracoccidioides* spp. **Front Microbiol**, v. 6, p. 303, 2015a.
- DE PAULA E SILVA, A. C. **Avaliação por métodos fenotípicos e proteômicos de galatos de alquila com atividade anti-complexo Paracoccidioides**. (Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia)). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara.2012.
- DE PAULA E SILVA, A. C. et al. Antifungal Activity of Decyl Gallate against Several Species of Pathogenic Fungi. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2014.
- DEL VECCHIO, A. et al. Induction of apoptosis in A549 pulmonary cells by two *Paracoccidioides brasiliensis* samples. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 5, p. 749-754, 2009.

DONOFRIO, F. C. et al. Enolase from *Paracoccidioides brasiliensis*: isolation and identification as a fibronectin-binding protein. **J Med Microbiol**, v. 58, n. Pt 6, p. 706-713, 2009.

FRANCO, M. et al. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 20, n. 2, p. 129-132, 1987.

FRASES, S.; VIANA, N. B.; CASADEVALL, A. Biophysical methods for the study of microbial surfaces. **Front Microbiol**, v. 2, p. 207, 2011.

GAO, L. Y.; KWAIK, Y. A. The modulation of host cell apoptosis by intracellular bacterial pathogens. **Trends Microbiol**, v. 8, n. 7, p. 306-313, 2000.

GEGEMBAUER, G. et al. Serology of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 7, 2014.

GIOVANI, E. M. et al. Paracoccidioidomycosis in an HIV-positive patient: a case report with gingival aspects. **Oral Dis**, v. 6, n. 5, p. 327-329, 2000.

GOES, A. M. Paracoccidioidomycosis disease (Lutz-Splendore-Almeida): etiology, epidemiology and pathogenesis. **Rev Med Minas Gerais**, v. 24 (1), p. 61-66, 2014.

GOLSTEIN, P. Cell death in us and others. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1283, 1998.

GONZALEZ, A. et al. Recognition of extracellular matrix proteins by *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. **Med Mycol**, v. 43, n. 7, p. 637-645, 2005.

GRIVICICH, I., REGNER, A. Morte Celular por Apoptose. **Rev Bras de Cancerologia**, v. 53 (3), p. 335-343, 2007.

GULLO, F. P. **Antifúngicos naturais e sintéticos: estudos dos mecanismos de ação em sistemas de infecção in vitro empregando cepas de *Cryptococcus***. (Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia aplicada a farmácia)). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara.2012.

GULLO, F. P. et al. Antifungal activity of maytenin and pristimerin. **Evid Based Complement Alternat Med**, p. 1-6, 2012.

HANNA, S. A.; MONTEIRO DA SILVA, J. L.; GIANNINI, M. J. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. **Microbes Infect**, v. 2, n. 8, p. 877-884, 2000.

HASLINGER-LOFFLER, B. et al. Multiple virulence factors are required for *Staphylococcus aureus*-induced apoptosis in endothelial cells. **Cell Microbiol**, v. 7, n. 8, p. 1087-1097, 2005.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-776, 2000.

- HU, Q. et al. Staphylococcus aureus induces apoptosis in primary bovine mammary epithelial cells through Fas-FADD death receptor-linked caspase-8 signaling. **DNA Cell Biol**, v. 33, n. 6, p. 388-397, 2014.
- JACOBSON, M. D. Apoptosis: Bcl-2-related proteins get connected. **Curr Biol**, v. 7, n. 5, p. 77-81, 1997.
- JACOBSON, M. D.; WEIL, M.; RAFF, M. C. Programmed cell death in animal development. **Cell**, v. 88, n. 3, p. 347-354, 1997.
- KUBO, I.; MUROI, H.; KUBO, A. Structural functions of antimicrobial long-chain alcohols and phenols. **Bioorg Med Chem**, v. 3, n. 7, p. 873-880, 1995.
- LACAZ, C. S. Evolução dos conhecimentos sobre a paracoccidioidomicose. Um pouco da história. In. **Paracoccidioidomicose Blastomicose Sul-Americana**. São Paulo: Sarvier, p.1-9. 1982.
- LATGE, J. P. Tasting the fungal cell wall. **Cell Microbiol**, v. 12, n. 7, p. 863-872, 2010.
- LI, P. et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 479-489, 1997.
- LIU, Z. et al. Gallic acid as a cancer-selective agent induces apoptosis in pancreatic cancer cells. **Chemotherapy**, v. 58, n. 3, p. 185-194, 2012.
- MARQUES, S. A. Paracoccidioidomicose - Atualização Epidemiológica, Clínica e Terapêutica. **Anais Bras Derm**, v. 78, p. 135-150, 2003.
- MARQUES, S. A. Paracoccidioidomycosis: a century from the first case report. **An Bras Dermatol**, v. 83, p. 271-273, 2008.
- MARQUES, S. A. Paracoccidioidomycosis. **Clin Dermatol**, v. 30, n. 6, p. 610-615, 2012.
- MARTINEZ, R. Paracoccidioidomicose. In. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.204-221. 2004.
- MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycosis: the dimension of the problem of a neglected disease. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, n. 4, p. 480, 2010.
- MATUTE, D. R. et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol Biol Evol**, v. 23, n. 1, p. 65-73, 2006.
- MENDES-GIANNINI, M. J. et al. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect**, v. 8, n. 6, p. 1550-1559, 2006.
- MENDES-GIANNINI, M. J. et al. Antibody response to the 43 kDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as a marker for the evaluation of patients under treatment. **Am J Trop Med Hyg**, v. 43, n. 2, p. 200-206, 1990.

- MENDES-GIANNINI, M. J. et al. Invasion of epithelial mammalian cells by *Paracoccidioides brasiliensis* leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell. **Microbes Infect**, v. 6, n. 10, p. 882-891, 2004.
- MENDES-GIANNINI, M. J. et al. Infection and apparent invasion of Vero cells by *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Med Vet Mycol**, v. 32, n. 3, p. 189-197, 1994.
- MENDES-GIANNINI, M. J. et al. Interaction of pathogenic fungi with host cells: Molecular and cellular approaches. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 45, n. 3, p. 383-394, 2005.
- MENDES-GIANNINI, M. J. et al. Pathogenesis II: fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. **Med Mycol**, v. 38, p. 113-123, 2000.
- MIRANDA, E. J.; GONCALVES, L. G.; FRANCA, F. O. Chronic pulmonary paracoccidioidomycosis in an AIDS patient and *Mycobacterium gordonae* as confounding factor. **Braz J Infect Dis**, v. 15, n. 1, p. 92-93, 2011.
- MONACK, D. M. et al. *Salmonella typhimurium* invasion induces apoptosis in infected macrophages. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 18, p. 9833-9838, 1996.
- MONTEIRO DA SILVA, J. L. et al. Epithelial cells treated with genistein inhibit adhesion and endocytosis of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 92, n. 1, p. 129-135, 2007.
- MULLER, A.; HACKER, J.; BRAND, B. C. Evidence for apoptosis of human macrophage-like HL-60 cells by *Legionella pneumophila* infection. **Infect Immun**, v. 64, n. 12, p. 4900-4906, 1996.
- NAISMITH, J. H.; SPRANG, S. R. Modularity in the TNF-receptor family. **Trends Biochem Sci**, v. 23, n. 2, p. 74-79, 1998.
- NAKAI, T. et al. In vitro antifungal activity of Micafungin (FK463) against dimorphic fungi: comparison of yeast-like and mycelial forms. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 4, p. 1376-1381, Apr 2003.
- NICHOLSON, D. W. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 810-816, 2000.
- PATTI, J. M.; HOOK, M. Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules. **Curr Opin Cell Biol**, v. 6, n. 5, p. 752-758, 1994.
- PERSKVIST, N. et al. Rab5a GTPase regulates fusion between pathogen-containing phagosomes and cytoplasmic organelles in human neutrophils. **J Cell Sci**, v. 115, n. 6, p. 1321-1330, 2002.
- PINTO, A. C. Produtos Naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 25, p. 45-51, 2002.

- PRADO, M. et al. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 513-521, 2009.
- REED, J. C. Apoptosis-based therapies. **Nat Rev Drug Discov**, v. 1, n. 2, p. 111-121, 2002.
- RESTREPO, A. et al. Pulmonary paracoccidioidomycosis. **Semin Respir Crit Care Med**, v. 29, n. 2, p. 182-197, 2008.
- SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovasc Res**, v. 45, n. 3, p. 528-537, 2000.
- SCHULER, M. et al. p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. **J Biol Chem**, v. 275, n. 10, p. 7337-7342, 2000.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Guidelines in paracoccidioidomycosis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39, n. 3, p. 297-310, 2006.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Paracoccidioidomycosis Treatment. **Rev Inst Med Trop**, v.57, n. 19, p. 31-37, 2015.
- SILVA, S.S. et al. Transcriptional response of murine macrophages upon infection with opsonized *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. **J Microbes and Infection**, v. 10, n. 1, p. 12-20, 2008.
- SOUTO, P. C. et al. Programmed cell death in thymus during experimental paracoccidioidomycosis. **Med Microbiol Immunol**, v. 192, n. 4, p. 225-229, 2003.
- SUMBUL, S. et al. Role of phenolic compounds in peptic ulcer: An overview. **J Pharm Bioallied Sci**, v. 3, n. 3, p. 361-367, 2011.
- SUPERTI, F. et al. Inv-mediated apoptosis of epithelial cells infected with enteropathogenic *Yersinia*: a protective effect of lactoferrin. **Res Microbiol**, v. 156, n. 5-6, p. 728-737, 2005.
- TABORDA, C. P. Paracoccidioidomycosis: An Endemic Mycosis in the Americas. In. **Medical Mycology Current Trends and Future Prospects**: Taylor & Francis Group, cap. 10, p.254-273. 2016.
- TEIXEIRA, M. M. et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Mol Phylogenet Evol**, v. 52, n. 2, p. 273-283, 2009.
- TELES, F. R.; MARTINS, M. L. Laboratorial diagnosis of paracoccidioidomycosis and new insights for the future of fungal diagnosis. **Talanta**, v. 85, n. 5, p. 2254-2264, 2011.
- TORRES, I. et al. Inhibition of PbGP43 expression may suggest that gp43 is a virulence factor in *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLoS One**, v. 8, n. 7, 2013.
- VAUX, D. L.; KORSMEYER, S. J. Cell death in development. **Cell**, v. 96, n. 2, p. 245-254, 1999.

VERICIMO, M. A. et al. Increased apoptosis during the early phase of experimental paracoccidioidomycosis as a phenotypic marker of resistance. **Microbes Infect**, v. 8, n. 12-13, p. 2811-2820, 2006.

VICENTINI, A. P. et al. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infect Immun**, v. 62, n. 4, p. 1465-1469, 1994.

WRONOWSKA, W.; GODLEWSKA, R.; JAGUSZTYN-KRYNICKA, E. K. Influence of human gastrointestinal tract bacterial pathogens on host cell apoptosis. **Postepy Biochem**, v. 51, n. 3, p. 270-279, 2005.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News Physiol Sci**, v. 19, p. 124-128, 2004.

ZYCHLINSKY, A. et al. In vivo apoptosis in *Shigella flexneri* infections. **Infect Immun**, v. 64, n. 12, p. 5357-5365, 1996.

De acordo,

Aluno:

Juliana Oliveira Vicentin

Orientador:

Prof^ª. Dr^ª Maria José Soares Mendes Giannini

Co-orientador:

Prof^ª. Dr^ª Julhiany de Fátima da Silva

Araraquara, 12 de julho de 2016