

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 22/07/2017.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JULIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia**  
**Aplicadas à Farmácia**

**ANA CAROLINA ALVES DE PAULA E SILVA**

**Estudo da atividade anti-*Paracoccidioides* do composto galato de decila: mecanismo de ação e interação fungo-hospedeiro**

Araraquara  
2016

**ANA CAROLINA ALVES DE PAULA E SILVA**

**Estudo da atividade anti-*Paracoccidioides* do composto galato de decila: mecanismo de ação e interação fungo-hospedeiro**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como pré-requisito para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra Maria José Soares Mendes Giannini  
Coorientadora: Profa. Dra Alexandra Ivo Medeiros

Araraquara  
2016

**Ficha Catalográfica**

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

**S586e** Silva, Ana Carolina Alves de Paula e  
Estudo da atividade anti-*Paracoccidioides* do composto Galato de decila: mecanismo de ação e interação fungo-hospedeiro / Ana Carolina Alves de Paula e Silva. – Araraquara, 2016.  
164 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”.  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências  
e Biotecnologia aplicadas à Farmácia, área de pesquisa em Microbiologia.

Orientadora: Maria José Soares Mendes Giannini.  
Coorientadora: Alexandra Ivo Medeiros.

1. Galato de decila. 2. Óxido nítrico. 3. Citometria de fluxo. 4. Interação químico-genética.  
5. N-glicosilação. I. Giannini, Maria José Soares Mendes, orient. II. Medeiros, Alexandra Ivo,  
Coorient. III. Título.

**CAPES: 40500005**

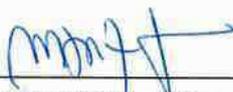
ANA CAROLINA ALVES DE PAULA E SILVA

O papel de compostos derivados de ácido gálico na atividade anti-*Paracoccidioides* usando modelos *in vitro* e *in vivo*.

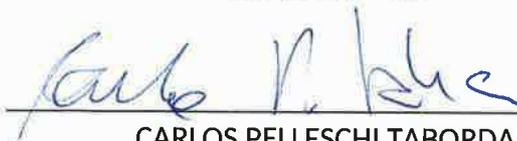
Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Doutora em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

Araraquara, 22 de julho de 2016.

BANCA EXAMINADORA



MARIA JOSÉ SOARES MENDES GIANNINI



CARLOS PELLESCI TABORDA



SONIA ROZENTAL



MARIA DO ROSÁRIO RODRIGUES SILVA



ANDERSON ASSUNÇÃO ANDRADE

Dedico a minha mãe  
por sempre ter me colocado em primeiro lugar.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial à minha família: à minha mãe Lucia, ao meu padrasto José Carlos, ao meu irmão Mateus e ao meu pai Norberto. Especiais porque mesmo sem entenderem, se esforçaram sempre para me apoiar em todas as minhas decisões. AMO VOCÊS.

Agradeço à minha orientadora Professora Doutora Maria José Soares Mendes Giannini, pela orientação e a confiança. Agradeço à minha co-orientadora Professora Doutora Alexandra Ivo Medeiros por abrir as portas de seu laboratório e pela paciência, e suas colaborações Ana Carolina Salina e Gustavo Nazzi por me ajudarem sempre no que foi preciso. Agradeço a Professora Doutora Ana Marisa Fusco Almeida por todo suporte necessário.

Agradeço ao Dr. Fausto Almeida pela disponibilidade e grande colaboração.

Agradeço a Mariana M. Santoni e ao Prof. Cleslei Fernando Zanelli e sua aluna Natalia Barbosa pela paciência.

Agradeço Rosângela Moraes da Silva e Cláudia Tavares dos Santos por serem pessoas tão especiais, um exemplo tanto profissional quanto pessoal.

Agradeço ainda à família Micologia. Nestes quatro anos essa família se compôs de diferentes pós-graduandos, os quais, na peculiaridade de cada um, me ajudaram a evoluir profissional e pessoalmente. Esta evolução foi possível com a colaboração e o convívio diário com cada um, o que me tornou uma pessoa mais colaborativa e cada vez mais centrada.

Em especial ao Haroldo César de Oliveira e a Liliana Scorzoni que me acompanham desde o mestrado, me ensinando, incentivando e reprimindo quando foi preciso. A Patrícia Akemi Assato, a Caroline Maria Marcos, a Junya de Lacorte Singulani, Fernanda Patrícia Gullo e Caroline Barcellos, pela amizade e colaborações.

Agradeço ainda a Fernanda Sangalli Leite, Suélen Andrea Rossi e a Julhiany de Fátima da Silva, as quais mesmo não fazendo mais parte do cotidiano da família micologia, contribuíram muito para o meu crescimento.

Agradeço a CAPES, pelos quatro anos de bolsa concedida. Ao PDSE pelo auxílio financeiro para a realização de seis meses de estágio na Universidade Toronto, Canadá.

Agradeço ao Prof. Dr. Charles Boone, e suas alunas Dra. Shenna Li e Mojca Mattiazzi, da Universidade de Toronto, pela oportunidade de aprimoramento no laboratório “*the Donnelly Centre for Cellular + Biomolecular Research; Banting and Best Department of Medical Research*”.

## SUMÁRIO

Capítulo I.....	8
LISTA DE UNIDADES E ABREVIATURAS.....	9
LISTA DE TABELAS .....	10
LISTA DE FIGURAS .....	11
RESUMO .....	14
ABSTRACT .....	15
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. Nicho ecológico.....	16
1.2. Estudo filogenético .....	17
1.3. Paracoccidioidomicose (PCM).....	17
1.4. Epidemiologia.....	20
1.5. Epidemiologia fora da América Latina .....	21
1.6. PCM <i>versus</i> imunodepressão.....	22
1.7. Fatores que influenciam a infecção .....	22
1.8. Terapêutica .....	23
1.9. Antifúngicos de origem natural .....	24
1.10. Busca de novos fármacos.....	25
1.11. Gênero <i>Alchornea</i> e ácido gálico .....	26
2. OBJETIVO GERAL.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1. Composto com atividade anti- <i>Paracoccidioides</i> .....	30
3.2. Fungo gênero <i>Paracoccidioides</i> .....	30
3.2.1. Meios de cultura.....	30
3.2.2. Condições gerais .....	31
3.2.3. Inóculo .....	31
3.3. Modelo Cultura celular .....	31
3.3.1. Meio de cultura .....	31
3.3.2. Condições gerais .....	32
3.4. Modelo <i>Galleria mellonella</i> .....	32
3.4.1. Condições gerais .....	32
3.5. Ensaio MTT .....	33
3.6. Quantificação da concentração de nitritos no sobrenadante da cultura de macrófago RAW após contato com o composto G14. ....	33
3.7. Análise do composto G14 na atividade mitocondrial e no desenvolvimento das células fúngicas de <i>P. lutzii</i> . ....	34
3.8. Protocolos de marcação .....	35
3.8.1. Marcação das células fúngicas.....	35
3.8.2. Marcação das células de mamífero e hemócito .....	36
3.9. Parâmetros utilizados para análise por citometria de fluxo .....	36
3.10. Parâmetros utilizados para análise por citometria de imagem .....	37
3.11.1. Citometria de imagem .....	39
3.11.2. Citometria de fluxo.....	39
3.12.1. Citometria de fluxo.....	40
3.14. Citotoxicidade em cultura celular .....	41
3.15. Análise da influência do G14 na taxa de interação por citometria de fluxo .....	41
3.15.1. Interação célula de mamífero e células fúngicas de <i>P. lutzii</i> desafiada com o composto G14.....	41
3.15.2. Interação hemócitos e células fúngicas de <i>P. lutzii</i> desafiada com o composto G14 .....	42

3.16.	Curva de sobrevivência da larva <i>G. mellonella</i> frente ao G14 .....	42
3.17.	Avaliação do mecanismo de ação dos galatos de alquila .....	42
3.17.1.	Ensaio de interação químico-genético.....	43
3.17.1.1.	Modelo <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	43
3.17.1.2.	Teste de sensibilidade.....	43
3.17.1.3.	Extração DNA genômico .....	44
3.17.2.	Interação genética.....	45
3.17.3.	Análise dos mutantes preditos.....	45
3.17.3.1.	Método 50:50 .....	45
3.17.3.2.	Cepa GFP x galatos .....	50
3.17.4.	Avaliação da n-glicosilação .....	51
3.17.4.1.1.	Preparo da amostra .....	51
3.17.4.1.2.	Avaliação da atividade enzimática .....	52
3.17.5.	Análise da expressão diferencial de genes .....	52
3.17.5.1.	Extração de RNA total .....	52
3.17.5.2.	Síntese de cDNA .....	53
3.17.5.3.	PCR em tempo real .....	54
4.	RESULTADOS .....	55
4.1.	Quantificação da concentração de nitritos no sobrenadante da cultura de macrófago RAW após contato com o composto G14. ....	55
4.2.	Análise do composto G14 na atividade mitocondrial e do desenvolvimento das células fúngicas de <i>P. lutzii</i> . ....	56
4.3.	Perfil de interação e influência do composto G14.....	57
4.5.	Curva de sobrevivência .....	61
4.6.	Avaliação do mecanismo de ação.....	61
4.6.1.	Ensaio químico-genético.....	61
4.6.3.	Interação genética .....	64
4.6.4.	Método 50:50.....	66
4.7.	Cepa UPR-GFP x galatos .....	68
4.8.	Avaliação da n-glicosilação.....	68
5.	DISCUSSÃO.....	71
6.	CONCLUSÃO.....	80
7.	REFERÊNCIAS .....	82
	Capítulo II.....	99

# Capítulo I

## LISTA DE UNIDADES E ABREVIATURAS

AIDS: *Acquired Immunodeficiency Syndrome*  
 ATCC: *American Type Culture Collection*  
 BHI: *Brain and Heart Infusion*  
 cDNA: ácido desoxirribonucléico complementar  
 CFDA-SE: *Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*  
 CIM: concentração inibitória mínima  
 DAPI: *4',6-Diamidino-2-Phenylindole*  
 DEPC: *Dietil pirocarbonato*  
 DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*  
 DMSO: Dimetilsulfóxido  
 DO: densidade óptica  
 DTT: Ditioneitol  
 HIV/Aids: *Human Immunodeficiency Virus* / Síndrome da imunodeficiência adquirida  
 EDTA: *Ethylenediamine tetraacetic acid*  
 g: gramas  
 GFP: *Green fluorescent protein*  
 L: litro  
 LPS: lipossacarídeo  
 M: molar  
 mM: milimolar  
 mg: miligramas  
 mL: mililitro  
 µg: microgramas  
 µL: microlitro  
 µM: micromolar  
 MTT: brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio  
 NEED: *N-1-naphthyl-ethylenediamine-dichloroplatinum*  
 nm: nanômetros  
 PI01: *Paracoccidioides lutzii* cepa 01  
 Pb18: *Paracoccidioides brasiliensis* isolado 18  
 pb: pares de base  
 PBS: tampão fosfato, pH 7,2  
 PCM: paracoccidioidomicose  
 PCR: *Polymerase Chain Reaction*  
 RNA: ácido ribonucleico  
 RPMI-1640: *Roswell Park Memorial Institute medium*  
 RPM: rotações por minuto  
 TE: solução tampão Tris e EDTA  
 UPR: *unfold protein response*  
 °C: graus celsius

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Iniciadores específicos para genes codificantes (F: <i>foward</i> , R: <i>reverse</i> ). .....	54
Tabela 2: Correlação dos galatos e os genes possivelmente afetados, acompanhados dos processos envolvidos. ....	65
Tabela 3: Correlação dos agentes utilizados como controle e os genes possivelmente afetados, acompanhados dos processos envolvidos. ....	66

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema para análise por citometria de fluxo no ensaio de interação com dupla marcação. Equipamento: BD FACS Canto. Software de análise: BD FACS Diva. P1: *gate* população de células de mamífero (macrófagos, linhagens pulmonares) e hemócitos da larva *G. mellonella*. P2: *gate* derivado da população P1, população positiva para a marcação faloidina. P3: *gate* derivado da população P2, positiva para CFDA-SE..... 37

Figura 2: Esquema para análise por citometria de imagem no ensaio de interação com dupla marcação. Equipamento: *In Cell Analyzer 2000*. Software de análise: *In Cell Investigator*. As células foram detectadas de acordo com o marcador fluorescente e os parâmetros de tamanho estabelecidos. (A): *wave 1* – núcleo/DAPI, (B): *wave2*: fungo/CFDA-SE, (B) *wave 3*: células/ faloidina - Alexa Fluor 647. Circulo azul: detecção da célula; circulo amarelo: detecção do fungo; circulo vermelho (NI): não detecção de interação; circulo verde (I): detecção de interação..... 38

Figura 3: A: Região do plasmídeo com a marca de seleção. B: Iniciadores na região homóloga a ser amplificada. C: Fragmento final. .... 47

Figura 4: Esquema da recombinação da região homóloga do fragmento e do gene no genoma, levando a integração do fragmento com uma marca de seleção (imagem: (Horecka e Davis, 2014)). .... 48

Figura 5: Esquema recombinação entre uma região do fragmento inserido e uma região homóloga no DNA genômico..... 49

Figura 6: Esquema para análise das cepas GFP. .... 51

Figura 7: Avaliação do potencial antioxidante do G14: (A/B) monocamada de macrófago peritoneal murino RAW desafiada com G14 na faixa de concentração de 1 a 0,13 µg/mL. (A) com estimulação de LPS (1 mg/ml), (B) sem estimulação por LPS. Barra branca: macrófagos não tratados com G14 e não estimulados com LPS. Barra preta: macrófagos não tratados com G14 e estimulados com LPS (1 mg/ml). (C) Taxa de viabilidade da linhagem de macrófago peritoneal murino RAW após 24 horas de contato de G14 na faixa de concentração de 1 a 0,13 µg/mL . \*em relação ao controle Meio (p<0,05); # em relação ao controle de LPS (p<0,05). (ANOVA/Tukey's post-test). .... 56

Figura 8: Análise da atividade mitocondrial e do desenvolvimento das células fúngicas de *P. lutzii* após 24 e 48 horas de contato com as concentrações de 0,5 a 0,13 µg/mL do composto galato de decila. A: ensaio de MTT para análise da atividade mitocondrial; B: porcentagem de células com brotamentos para análise do desenvolvimento. Barra controle: células fúngicas avaliadas sem contato com G14 em cada tempo. \*p<0,05 em relação ao controle do tempo. # p<0,05 em relação à condição tratado 0,5 µg/mL. (ANOVA/Tukey's post-test). .... 57

Figura 9: Perfil de interação das células fúngicas de *P.lutzii* com as linhagens pulmonares humanas A549 (A, B) e MRC5 (C, D), a linhagem de macrófago alveolar murino AMJ2-C11 (E) e hemócitos da larva de *G. mellonella* (F) nos tempos de 1, 3, 6 e 24 horas por citometria de imagem (A,C) e de fluxo (B,D,E,F). Barra T: Taxa de interação após 24 horas de tratamento com G14 na concentração de 0,5 µg/mL por citometria de fluxo em comparação com a taxa de interação do tempo de 24 horas (B,D,E,F). \*p<0,05 entre os tempos..... 58

Figura 10: Análise das imagens adquiridas no equipamento *In Cell Analyzer 2000* da interação das células fúngicas de *P. lutzii* (PI01) as linhagens de pulmonares humana A549 e MRC-5; e aos hemócitos da larva de *G. mellonella* após 6 horas de interação. (A) interação PI01 e MRC-5; (B) interação PI01 e A549; (C) interação PI01 e hemócito. Seta branca: internalização do fungo ao tipo celular estudado; seta vermelha: fungo aderido ao tipo celular estudado. Células fúngicas marcada com CFDA-SE 15 µM (vermelho) e linhagem pulmonar e hemócitos marcados com Alexa Fluor® 647 faloidina 0,165 µM (verde). (A e B) núcleo das linhagens pulmonares marcado com DAPI..... 60

Figura 11: Estudo da sobrevivência de *Galleria mellonella* após infecção com PI01 e tratamento com G14 durante 10 dias de análise. Grupo controle PBS (linha preta), grupo infectado PI01 (linha vermelha), grupo infectado PI01 por seis horas e posteriormente tratado com dose equivalente a 0,5 µg/mL de G14 (linha verde), grupo de larvas inoculado com dose equivalente a 0,5 µg/mL de G14. \* p<0,05 em relação ao grupo PI01 (infectado). ..... 61

Figura 12: Figura representativa da hipersensibilidade da coleção aos galatos em diferentes concentrações. A escala de cores indica a variedade da porcentagem de crescimento. VERDE: porcentagem de crescimento semelhante ao controle DMSO; VERMELHO: porcentagem de crescimento baixa em relação ao controle DMSO. (A): ácido gálico e os derivados hexila, heptila, nonila, decila, undecila, dodecila e tetradecila testados na faixa de concentração de 100 a 0,75 µM. (B): galatos selecionados nonila, decila, undecila e dodecila testados na faixa de concentração de 50 a 12,5 µM. Em destaque concentração selecionada: 22,5µM..... 62

Figura 13: A: Gel 2 % agarose para a confirmação do produto de PCR de cada condição contendo *barcode* do mutante mais a integração do marcador individual 10 pb. Tamanho produto final 267 pb. B: Padrão de 250 a 10000 pb (ThermoFischerScientific-SM1163). C: Exemplo gel 2 % agarose para extração da banda com 267 pb contendo a biblioteca de DNA. .... 63

Figura 14: Gráfico *Java Treeview heatmap*: mutantes coleção *Mini-pool* verso agentes controles, compostos testes e DMSO controle. Vermelho: mutantes hipersensíveis ao tratamento. Verde: mutantes hiper-resistentes ao tratamento. Cinza: sem valor..... 65

Figura 15: (A): Produto de PCR: fragmentos PDR1, PDR3 e SNQ2. (B): confirmação para a inserção do fragmento (*pop-in*), positivo: colchete, negativo: seta vermelha. (C): confirmação para a deleção do fragmento inserido no gene alvo (*pop-out*), positivo: colchete, negativo: seta vermelha. Foi utilizado o padrão de 250 a 10000 pb (ThermoFischerScientific-SM1163)..... 67

Figura 16: Análise do estresse ao retículo endoplasmático pelos galatos de nonila, decila, undecila e dodecila. Cepa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* com sequencia GFP inserida próxima aos genes do grupo UPR, foi tratada com galatos de nonila, decila, undecila e dodecila na concentração de 22,5  $\mu$ M por 3 e 24 horas. Por microscópio de fluorescência foi observado a ativação ou não grupo UPR através da fluorescência do grupo GFP expresso concomitantemente. .... 68

Figura 17: Análise da influência do galato de decila (G14) na atividade relativa de enzimas n-glicosiladas. Células fúngicas das espécies *P. lutzii* (PI01) e *P. brasiliensis* (Pb18) foram desafiadas com o G14 na concentração de 0,5 $\mu$ g/mL (+/barra preta) por 72 horas e a porcentagem da atividade relativa das enzimas  $\alpha$ -(1,3)- glucanase, N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase e  $\alpha$ -amilase foi avaliada de acordo com o controle sem tratamento (-/barra branca). \* $p < 0,05$  em relação ao controle..... 69

Figura 18: RNA total submetido a gel de agarose 1 %. PI01: controle (C) e tratado (T); Pb18: controle (C) e tratado (T). setas: bandas RNAr 26S e 18S, respectivamente. .... 70

Figura 19: Análise por PCR em Tempo Real da expressão relativa dos genes que codificam  $\alpha$ -(1,3)-glucanase (AGN),  $\alpha$ -(1,3)-glucano sintase (AGS), N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG),  $\alpha$ -amilase (AMY), e os genes sensores de estresse ao retículo endoplasmático IRE1 e HAC, nas células fúngicas das espécies *P. lutzii* (PI01) e *P. brasiliensis* (Pb18) desafiadas com o galato de decila (G14) na concentração de 0,5 $\mu$ g/mL por 72 horas. Método utilizado para análise:  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Controle gene endógeno  $\alpha$ -tubulina. Controle negativo: amostra substituída por água DEPC. \* $p < 0,05$  em relação ao gene da outra espécie. .... 71

## RESUMO

O fungo do gênero *Paracoccidioides* é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), micose de grande importância no Brasil e América Latina. Há diferentes terapias disponíveis, como os antifúngicos da classe dos poliênicos, azóis e sulfonamidas. O desenvolvimento de novos antifúngicos com eficácia superior é necessário para prevenir recaídas e diminuir os efeitos secundários, o período de tratamento e sequelas. A molécula de ácido gálico com diferentes modificações (galatos de alquila) apresentou atividade antifúngica contra um painel representativo de fungos patogênicos. O galato de decila (G14) foi objeto de estudo deste trabalho, para o qual a interação *Paracoccidioides*-hospedeiro foi relacionada ao mecanismo de ação. Para tanto, o fungo *Paracoccidioides lutzii* (PI01) foi desafiado com o G14 para análise das alterações no desenvolvimento de brotamentos e na viabilidade celular pelo ensaio de MTT. Foi avaliada a influência do G14 na taxa de interação de PI01 com a linhagem de macrófago alveolar murino AMJ2-C11, com as linhagens pulmonares de mamífero A549 e MRC-5, e hemócitos da larva de *Galleria mellonella* utilizando ensaios por citometria de fluxo. O G14 ainda foi avaliado quanto à taxa de sobrevivência da larva de *G. mellonella* infectada e a capacidade na modulação da produção de óxido nítrico em macrófago RAW. O estudo do mecanismo de ação foi realizado pelo ensaio de interação químico-genética seguida da interação genética, que consiste na comparação de uma coleção de mutantes da levedura *Saccharomyces cerevisiae* com perfil hipersensível ao G14, a um banco de dados de duplos mutantes para prever a via afetada. Em *P. lutzii* (PI01) e *P. brasiliensis* (Pb18) foi avaliada a taxa de atividade de enzimas n-glicosiladas ( $\alpha$ -(1,3)-glucanase, N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase e  $\alpha$ -amilase) ligadas à formação da parede celular; assim como a expressão relativa dos genes envolvidos através de PCR em tempo real. No ensaio de interação químico-genética, cerca de 50 mutantes foram hipersensíveis e com a análise da interação genética deduziu-se influência sobre a via de glicosilação e/ou na resposta a proteínas não enoveladas. A concentração de 0,5  $\mu$ g/mL de G14 apresentou redução significativa de 42 % da atividade metabólica e de 38,5 % na formação de novos brotos do PI01 com 24 horas de contato, indicando forte influência sobre o desenvolvimento da célula fúngica. As enzimas n-glicosiladas testadas para PI01 e Pb18 apresentaram baixa atividade quando desafiadas com G14, porém os genes referentes a estas enzimas não apresentaram expressão relativa baixa, inferindo a influência nas modificações pós-traducionais destas enzimas. A influência do G14 na atividade funcional destas enzimas resulta na instabilidade da parede celular, a qual é um elemento crucial para a virulência e para a interação *Paracoccidioides*-célula hospedeira. Assim, foi observada redução na taxa de interação do PI01 de 1,6 vezes com a linhagem A549, e de 1,2 com a linhagem AMJ2-C11. Além disso, foi observado um aumento no tempo de sobrevivência da larva infectada com PI01 e tratada, indicando que G14 tem propriedades benéficas ao hospedeiro, o que foi observado com a redução de 20 % na quantificação de óxido nítrico quando macrófagos RAW estimulados por LPS foram desafiados com G14, o que sugere uma atividade antioxidante.

**Palavras-chave:** Galato de decila. Óxido nítrico. Citometria de fluxo. Interação químico genética. n-glicosilação.

## ABSTRACT

The fungus of genus *Paracoccidioides* is the etiological agent of paracoccidioidomycosis (PCM), an important mycosis in Brazil and Latin America. There are different available therapies, as antifungals belong to the class of polyenes, azoles and sulfonamides. The development of new antifungal agents with greater effectiveness is required to prevent relapse and reduce side effects, the period of treatment and sequelae. The gallic acid molecule with different modifications (alkyl gallates) showed antifungal activity against a representative panel of pathogenic fungi. The decyl gallate (G14) was the study object of this work, for which the *Paracoccidioides*-host interaction was connected with the mechanism of action. Therefore, the fungus *Paracoccidioides lutzii* (P101) was challenged with the G14 to analyze the changes in the development of budding and cell viability by MTT assay. Then, it was assessed the influence of the G14 in the interaction rate of P101 with murine alveolar macrophage lineage AMJ2-C11, with mammalian lung lineage A549 and MRC-5, and hemocytes of *Galleria mellonella* larvae using assays by flow cytometry. The compound G14 was evaluated for survival rate of infected *G. mellonella* larvae and to capacity of modulation of nitric oxide production in RAW macrophages. The mechanism of action was performed by chemical-genetic interaction assay followed by genetic interaction, which involves comparing a mutant collection, of *Saccharomyces cerevisiae* yeast, with hypersensitive profile to G14 to double mutant database to predict via affected. In *P. lutzii* (P101) and *P. brasiliensis* (Pb18) was evaluated the rate of activity of n-glycosylated enzymes ( $\alpha$ - (1,3) -glucanase, N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase and  $\alpha$ -amylase) linked to cell wall formation; as well as the relative expression of the genes involved by real time PCR. In the test chemical-genetic interaction, about 50 mutants were hypersensitive to G14 and with the genetic interaction analysis was deduced that it influence the glycosylation pathway and/or in the response unfolded proteins. The concentration of 0.5  $\mu\text{g/ml}$  of G14 after 24 hours of contact showed a significant reduction of 42% in metabolic activity and 38.5% in the formation of new buds of P101, indicating a strong influence on the development of the fungal cell. The N-glycosylated enzymes tested for P101 and Pb18 after 72 hours of contact with 0.5  $\mu\text{g/ml}$  of G14 showed low activity when challenged with G14, but the genes related to these enzymes did not show low relative expression, inferring the influence on the post-translational modification of these enzymes. The influence of the G14 in the functional activity of these enzymes results in the instability of the cell wall, which is crucial to the virulence and the host *Paracoccidioides*-cell interaction. Thus, it was observed a reduction in the interaction rate of P101 in 1.6 times with lineage A549 and in 1.2 times with lineage AMJ2-C11. Besides that, it was observed an increase of survival time of P101infected larvae and treated, indicating G14 has properties that benefit the host, what was observed with a reduction of 20% in the quantification of nitric oxide when RAW macrophages stimulated by LPS were challenged with G14, which showed an antioxidant activity.

**Keywords:** Decyl gallate. Nitric oxide. Flow cytometry. Chemical-genetic interaction. N-glycosylation.

## 1. INTRODUÇÃO

*Paracoccidioides* spp é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), micose de alto impacto social e médico em áreas endêmicas, devido ao número de casos, e por ser doença crônica, com um tratamento de longa duração e alta taxa de sequelas, as quais podem causar inabilidade ao trabalho físico e uma baixa qualidade de vida. Além disso, o fato da notificação não ser obrigatória, a ausência dos registros de surtos epidêmicos, a extrema dificuldade no diagnóstico precoce aliado à falta de capacidade de um diagnóstico laboratorial eficiente, dificulta uma abordagem epidemiológica 100 % realista da doença (MARTINEZ, 2015).

### 1.1. Nicho ecológico

Pouco se sabe sobre o habitat do *Paracoccidioides* spp. porém alguns estudos na literatura tentam entender a pato-fisiologia deste agente com as informações do seu possível habitat (RESTREPO et al., 2001).

Em uma revisão publicada por Franco et al (2000), foram analisados diferentes publicações que relatavam tentativas de isolar o fungo do solo ou matérias contaminados com solo, sendo que na maioria dos isolados foram confirmados com a caracterização morfológica do fungo, além da avaliação da virulência e da antigenicidade da cepa, e por análises bioquímicas e moleculares.

Evidências epidemiológicas indicam que a forma saprofítica do fungo pode ocorrer em algumas condições restritas do solo, como em locais de vegetação natural, perto de fontes de água ou em áreas com taxas variando de alta a moderada de níveis de precipitação com temperaturas amenas. Bruscas alterações nas condições climáticas que resultem no aumento atípico do armazenamento de água no solo e na taxa de umidade do ar podem contribuir primeiramente para o crescimento do fungo, e posteriormente para a dispersão de conídios (TEIXEIRA et al., 2014). As zonas caracterizadas como endêmicas são comumente as áreas rurais ou de intensa atividade agrícola. O contínuo desmatamento, a extensiva e contínua agricultura, a migração humana para regiões pouco habitadas e inexploradas, com urbanização em condições inadequadas e o impacto ambiental das grandes construções tem um grande impacto sobre a aquisição da PCM (MARTINEZ, 2015).

Há alguns estudos sobre achados deste fungo em animais selvagens, como o tatu, e animais domésticos como em cachorros (BAGAGLI et al., 2006b).

## 1.2. Estudo filogenético

Em 1908, Adolpho Lutz publicou a descrição no Brasil de uma micose pseudococcídica localizada na boca, denominando as micoses causadas por *Pseudococcidia* como Hifoblastomicoses. Em 1912, Alfonso Splendore isolou o mesmo fungo, classificando-o como *Zymonema brasiliensis*. Posteriormente, em 1930, Almeida após comparações com *Coccidioides immitis*, caracterizou o fungo como do gênero *Paracoccidioides* e da espécie *brasiliensis*. Com base em recentes análises filogenéticas, *Paracoccidioides* spp está classificado na Ordem *Onygenales*, na Família *Ajellomycetaceae* (*Ascomycetes*), formando um clado monofilético que inclui os gêneros *Blastomyces*, *Emmonsia* e *Histoplasma*, com *Lacazia loboi* como ancestral comum (BENCHIMOL; SÁ, 2004; UNTEREINER *et al.*, 2004).

Mais recentemente, os diferentes isolados foram classificados em quatro diferentes espécies filogenéticas, S1, PS2, PS3 e PS4 sendo a espécie S1, um grupo parafilético encontrado no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela; a espécie PS2 é um grupo monofilético encontrado no Brasil e Venezuela; a espécie PS3 um grupo monofilético encontrado apenas na Colômbia e a espécie PS4 na Venezuela (MATUTE; MCEWEN, *et al.*, 2006; MATUTE; SEPULVEDA, *et al.*, 2006). Posteriormente, com base na comparação de sequências codificantes e não codificantes de diferentes genes, um isolado denominado *Paracoccidioides lutzii* foi classificado e separado dos demais, e proposta a classificação deste como uma nova espécie filogenética (CARRERO *et al.*, 2008). Contudo, foi estimado que as espécies filogenéticas S1/PS2/PS3/PS4 e *P. lutzii* tiveram um ancestral comum a cerca de 32 milhões de anos (TEIXEIRA *et al.*, 2009). A região centro-oeste do Brasil é considerada a de maior prevalência dos casos de PCM acometidos pela espécie *P. lutzii* (MARQUES-DA-SILVA *et al.*, 2012). A correta taxonomia molecular deste fungo tem aberto novas possibilidades para o estudo e o entendimento de suas relações eco epidemiológicas com seus hospedeiros (BAGAGLI *et al.*, 2006a; BAGAGLI *et al.*, 2008; TEIXEIRA *et al.*, 2014; NOBREGA DE ALMEIDA *et al.*, 2015).

## 1.3. Paracoccidioidomicose (PCM)

- *Rota de infecção*

O gênero *Paracoccidioides* é formado por fungos termodimórficos, os quais apresentam a forma miceliar a 25-27 °C (forma saprofítica-infectante) e forma leveduriforme a 35- 37 °C (forma parasitária). Devido a intensa atividade agrícola presente

nas áreas endêmicas, conídios suspensos no ar, pertencentes à fase miceliar do fungo do gênero *Paracoccidioides*, são inalados pelo hospedeiro. Estes invadem as vias aéreas inferiores, atingindo os alvéolos e bronquíolos terminais. Neste local, a temperatura corporal influencia na diferenciação celular transformando-se na forma leveduriforme multinucleada (RESTREPO, 1985; SAN-BLAS et al., 1993; LACAZ, 1994).

Uma vez inalados, os conídios do fungo entram em contato com o aparato pulmonar e desencadeiam uma reação inflamatória, com presença de macrófagos, células gigantes multinucleadas, linfócitos e células epitelióides formando um granuloma. Na área central do granuloma é comum a presença de linfócitos e macrófagos, os quais por meio da produção de citocinas e outros mediadores inflamatórios assumem importância central na morfogênese e na formação e modulação do granuloma (FORTES et al., 2011). Desta forma, a PCM é considerada uma doença granulomatosa com diferentes formas clínicas. Em pacientes com resposta imune celular preservada, observam-se granulomas epitelióides compactos, bem definidos, com poucos fungos. Aqueles indivíduos com comprometimento imunológico, a inflamação granulomatosa é desorganizada, com grande número de fungos e granulomas frouxos, mal definidos, nestes casos ocorre a proliferação e disseminação do fungo, levando à doença generalizada de mau prognóstico (NISHIKAKU et al., 2009; FORTES et al., 2011).

- *Sistema imunológico*

Tem sido relatado que um elevado nível da resposta imune humoral (Th-2) está associado com o aumento da disseminação da doença, envolvendo IL-4, IL-5 e TGF- $\beta$ . Por outro lado, a resposta imune mediada por células (Th-1) representa o principal mecanismo de defesa na PCM, atuando principalmente TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Dessa forma a inibição da imunidade Th-2 e a estimulação da imunidade Th-1 geralmente aumenta a eficácia dos antifúngicos utilizados na terapia (CALICH et al., 1987; DE ALMEIDA et al., 1998; BENARD et al., 2001; MAMONI et al., 2002; CALVI et al., 2003; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006a; TRAVASSOS; TABORDA, 2012b). Pacientes infectados, classificados como assintomáticos, apresentam uma resposta predominante Th1, enquanto que pacientes com a forma crônica da doença, frequentemente adultos, apresentam padrão Th17/Th22, e na forma aguda (juvenil) uma resposta tipo Th2/Th9 (DE CASTRO et al., 2013; FERNANDES et al., 2015).

- *Formas clínicas*

Entre 1983 a 1986 um grupo de especialistas classificou e determinou as formas clínicas da PCM, as quais foram devidamente publicadas em 1987 por Franco e colaboradores baseando-se no período de latência, da localização e gravidade das lesões, acompanhado do estado nutricional e disfunção do órgão acometido (FRANCO et al., 1987).

Assim, a forma aguda/subaguda, considerada tipo juvenil, representada por cerca de 5 % dos casos, pode ser classificada como moderada ou severa. Geralmente, acomete crianças, adolescentes e adultos com até 35 anos, sem distinção de gênero. Estes pacientes trazem como sintomas febre, perda de peso, e anemia de branda a moderada por 2-3 meses ou mais. Comumente ocorre o expressivo aumento dos nódulos cervicais, axilares e inguinais, assim como do fígado e do baço. Uma alta taxa de pacientes apresenta múltiplas lesões na pele e na mucosa, comprometimento do trato digestivo e há diferentes relatos do acometimento do tecido ósseo (BOCCA et al., 2013).

A forma crônica, com representatividade de mais de 90 % dos casos, ocorre geralmente em indivíduos, com maior frequência do gênero masculino, entre 30 a 60 anos com atividades laborais envolvendo áreas agrícolas. Pode ser classificada de acordo com o tipo de lesão, unifocal ou multifocal. As lesões unifocais estão associadas com a alta severidade da doença, em alguns casos quando acometem o sistema nervoso central e outras funções vitais concomitantemente. As lesões multifocais estão relacionadas com a disseminação da doença. O pulmão é o órgão mais afetado, seguido por lesões na pele e na mucosa (oral, laringe, traqueia, trato digestivo). As lesões cutâneas podem ser únicas ou múltiplas, e são observadas como pápulas ou úlceras principalmente na face. As lesões da mucosas características são ulcerações de fundo granuloso e pontilhado hemorrágico, chamadas de estomatite moriforme. Nódulos linfáticos, glândulas adrenais e outros órgãos podem ser acometidos, com uma menor frequência do intestino, sistema nervoso central, tecido ósseo, baço, olhos, sistema geniturinário e cardiovascular. O curso da doença nesta forma é insidioso, a manifestação de febre é incomum, e quando presente há uma associação com tuberculose. Os pacientes podem demonstrar fraqueza, perda de peso, dispneia, tosse, e às vezes expectoração purulenta e raramente com sangue (BOCCA et al., 2013).

#### 1.4. Epidemiologia

A PCM é uma doença considerada geograficamente limitada à América Latina, com regiões de maior endemicidade, como Brasil, Colômbia e Venezuela, seguidas por outras áreas, de menor incidência, como Bolívia, Paraguai, Argentina, Uruguai e regiões da América Central (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006b; AMEEN et al., 2010; DE ABREU SILVA et al., 2012). Em uma revisão foi descrito que 80 % dos casos de PCM foram reportados no Brasil, nos estados de São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e Rondônia (COLOMBO et al., 2011).

No período de 1980 a 1995 verificou-se uma média anual de mortalidade por PCM no Brasil de 1,45 por milhões de habitantes, com 3181 mortes (COUTINHO et al., 2002). Acredita-se que sua incidência em zonas endêmicas varie de 3 a 4 novos casos/milhão até 1-3 novos casos a cada 100.000 habitantes ao ano (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006a).

As áreas endêmicas do Brasil podem ser divididas de acordo com o grau de incidência da doença, sendo as áreas das regiões Sudeste (estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Minas Gerais), Centro Oeste (principalmente os estados de Goiás e Mato Grosso do Sul) e Sul (estado do Paraná ao Norte do Rio Grande do Sul) classificadas como altamente endêmicas. As regiões localizadas ao longo da extremidade Leste da Amazônia, incluindo os estados do Pará, Maranhão e Tocantins são classificadas como áreas com menor índice da doença. Com taxa de registros ainda menores se destacam as regiões do extremo oeste da região amazônica e o estado de Rondônia, as quais se tornaram relevantes no começo do século 20. Em contraste, a região Nordeste do Brasil é considerada com baixa endemicidade, e a maioria dos casos registrados são advindos de outras regiões (COUTINHO et al., 2002; MARTINEZ, 2015).

Podemos encontrar na literatura trabalhos com estudos e levantamentos regionais. Em um estudo realizado no período de 1953 a 1978, 212 municípios do estado de São Paulo (regiões norte e central do estado) foram relatados por apresentarem 937 casos de PCM, ou seja, uma incidência de 0,3 a 0,4 casos por 100.000 habitantes por ano (FAVA et al., 1987). Entre 1960 a 1999 estimaram uma média de 2,7 casos por ano na cidade de Ribeirão Preto (estado de São Paulo) e pela análise, de 1000 pacientes acometidos, 497 são naturais da cidade (BELLISSIMO-RODRIGUES et al., 2011), e no período de 1970 e 2009 foi registrado um número significativo de 1219 pacientes (BELLISSIMO-RODRIGUES ET AL., 2013), classificando a região como endêmica. Na região da cidade de Campinas (sudeste do Brasil), entre 1988–1996, foram analisados diferentes casos com

suspeita de PCM, sendo então que 89,7% foram confirmados para a doença (Blotta et al., 1999).

Saindo do estado de São Paulo no período de 1958 a 1987, foram notificados 260 pacientes, naturais do estado do Rio grande do Sul, acometidos pela PCM, revelando uma incidência de 0,9 casos por 100.000 habitantes, por ano (Londero e Ramos, 1990). Outro estudo realizado no estado do Rio Grande do Sul, analisou 123 casos de PCM entre os anos de 1966 e 2009, confirmando o interior do estado como uma região endêmica (De Souza et al., 2014). No estado do Paraná no período de 1980 a 1998 um estudo de 551 óbitos por PCM notificados em 184 municípios, com maior número nas regiões Norte, Central e Oeste do estado, revelou uma taxa de mortalidade de 3,48 por milhão de habitantes, (BITTENCOURT et al., 2005). No estado do Maranhão, entre os anos de 1997 e 2007 foram catalogados 216 casos, concluindo que as regiões Oeste, Leste e Centro do Maranhão registraram 90,3% destes casos, sendo que a região Oeste apresenta prevalência de 10,8 casos por 100.000 habitantes (MATOS et al., 2012). No estado de Mato Grosso do Sul entre 1980 a 1999 foi realizado um estudo clínico e epidemiológico de 422 casos demonstrando a região como endêmica (PANIAGO et al., 2003). Em outro estudo foram investigados a incidência e eventos de morte entre 102 portadores de PCM residentes na região do Lago de Itaipu, na Cidade de Foz do Iguaçu (Oeste do Paraná) no período de 2008 a 2009, dos quais 15 vieram a óbito no período do estudo, classificando a região como endêmica (Loth et al., 2011). Uma análise de 2163 pacientes no período de 1997-2012 no estado de Rondônia que com uma media anual de 9,4 casos a cada 100.000 habitantes constatou alta incidência de PCM (VIEIRA et al., 2014).

### **1.5. Epidemiologia fora da América Latina**

Ao menos 60 casos de PCM foram notificados fora da América Latina, como nos Estados Unidos, Canadá, Espanha e outros países europeus. No Japão foram identificados pelo menos 17 pacientes e uma tendência ao aumento do número anual. Novos casos foram observados na Alemanha, Inglaterra, Espanha, França, Holanda e Japão, nos quais os pacientes tinham relatado visitar ou trabalhar em um ou mais países da América do Sul ou Central, incluindo o Brasil, Venezuela, Bolívia, Equador, Argentina e Paraguai. Em alguns relatos, os pacientes já apresentavam manifestações clínicas da PCM logo após deixar os locais endêmicos, porém em sua maioria, apresentaram lesões depois de pelo menos cinco anos de permanência em países não endêmicos, indicando sítios endêmicos da micose (MANNNS et al., 1996; TELES; MARTINS, 2011; MARTINEZ, 2015).

### 1.6. PCM versus imunodepressão

Há relatos na literatura do comportamento oportunista do fungo *Paracoccidioides* em pacientes com a resposta imune celular deficiente, através da depressão do sistema imunológico por algum tipo de doença, como a AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*) ou por alguma terapia envolvida. Pacientes imunodeprimidos apresentam um quadro de PCM de forma mais disseminada, com uma alta taxa de mortalidade precoce e menor porcentagem de cura depois da terapia antifúngica. Como exemplo, a co-infecção pelo fungo *Paracoccidioides* e o HIV (*human immunodeficiency virus*) (PANIAGO *et al.*, 2005; MOREJÓN *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2009), a qual representa, só no Brasil, aproximadamente 1,4 % dos casos de co-infecção fungo/HIV (PRADO *et al.*, 2009). Martinez (2015) cita diferentes exemplos de casos graves de pacientes acometidos pela PCM e imunodeprimidos, como por doenças hematológicas ou neoplasia de órgãos sólidos, assim como pacientes submetidos a transplante renal, deficientes de CD40L e com polimorfismo genético dos receptores da interleucina 12. Em todos os casos, é comum a reincidência da PCM decorrentes de lesões residuais, levando a reativação do fungo, culminando no estado grave do paciente (PRADO *et al.*, 2009).

### 1.7. Fatores que influenciam a infecção

Em adição ao tipo de resposta imunológica e a área que o paciente reside, outros fatores podem influenciar na progressão da doença. A idade é considerada um importante fator, uma vez que há uma maior incidência em pacientes entre 30 e 60 anos, fase na qual o paciente é mais exposto ao fungo devido ao maior envolvimento com atividades profissionais. Estudos demonstram que a forma aguda/subaguda está associada às três primeiras décadas de vida, e é a única forma que afeta crianças com até 15 anos de idade. A forma crônica é, geralmente, encontrada em pacientes com mais de 30 anos. A taxa de produção do hormônio beta-estradiol, também, é um fator que pode determinar a infecção, uma vez que este inibe o desenvolvimento dos conídios inalados para a forma leveduriforme, além de modular a resposta imune celular. O risco de infecção, também, está associado em mulheres grávidas, uma vez que na gravidez ocorre a redução temporária da resposta celular. Algumas ações associadas ao estilo de vida têm impacto importante para o desenvolvimento da doença. Dessa forma é observado que o risco é 14 vezes maior para fumantes e 3,6 vezes maior entre indivíduos que consomem quantidades superiores a 60 mL por dia de bebidas destiladas. A dificuldade de cura é maior naqueles

pacientes com hábito de consumo médio de 100 mL/dia destas bebidas (AMEEN et al., 2010; Barrozo et al., 2010; TELES; MARTINS, 2011; MARTINEZ, 2015).

### **1.8. Terapêutica**

Há diferentes antifúngicos que podem ser utilizadas para o tratamento da PCM. Ribeiro em 1940 sugeriu um tratamento inicial com sulfapiridina. Posteriormente, Lacaz e Sampaio propuseram o uso da anfotericina B em 1958. Barbosa e Vasconcelos, em 1973, recomendaram o uso da combinação de trimetoprim-sulfametoxazol. Por volta de 1979, Negroni sugeriu o uso de cetoconazol. Restrepo, em 1987 recomendou itraconazol e mais recentemente, em 2007, o uso de voriconazol foi indicado por Queiroz-Telles (CAVALCANTI LUNA et al., 2015).

O tratamento depende da gravidade da doença, do tipo de agente antifúngico disponível e do tempo de uso. Apesar das informações limitadas sobre as diferentes terapias, o itraconazol é a primeira escolha para controlar as formas clínicas classificadas de brandas a moderada da doença. Desde 1987, muitos grupos desenvolveram estudos com os antifúngicos da classe dos azóis, os quais mostraram uma importante redução nos sintomas e um retardo na progressão da doença (NEGRONI; FINQUELIEVICH, et al., 1987; NEGRONI; PALMIERI; KOREN, et al., 1987; NEGRONI; PALMIERI; CHÁ TOREA, 1987; Restrepo et al., 1987). Porém, a terapia com itraconazol não está facilmente disponível nas áreas endêmicas, o que conseqüentemente, confere a combinação da terapia trimetoprim-sulfametoxazol (doses diárias por 12 meses nos casos brandos e 24 meses nos moderados) como uma opção mais acessível e mais utilizada. Nos casos em que a PCM atinge o sistema nervoso central o tratamento deve ser conduzido com fluconazol ou voriconazol, diariamente por 3 a 6 meses, pois ambos possuem uma boa penetração através da barreira hematoencefálica (FERREIRA, 2009; MARQUES, 2012). Atualmente, cetoconazol é o menos usado para o tratamento desta infecção, devido aos seus severos efeitos colaterais (hepatotoxicidade, perda de libido, inibição da produção de corticoide). Deve ser ressaltado a possibilidade dos derivados triazólicos interagirem com outros fármacos, como os antihistamínicos, antiácidos, bloqueadores dos receptores H<sub>2</sub>, barbitúricos, ciclosporinas, difenilhidantoinícos, digoxinas, cisaprida e rifampicina (FERREIRA, 2009).

Nos casos considerados severos, a terapia com anfotericina B é a primeira escolha, porém são bem conhecidos os efeitos colaterais e tóxicos (nefrotoxicidade, toxicidade miocardial, mielotoxicidade etc) relatados em relação a esse antifúngico, o que pode

acarretar na descontinuação da terapia. Nos últimos 30 anos houve um grande esforço para melhorar a formulação da anfotericina B, como exemplo na forma deoxicolato considerada principal opção no tratamento intravenoso dos casos severos de PCM (PEÇANHA *et al.*, 2016), porém esta terapia é considerada pouco acessiva uma vez que estas formulações envolvem alto custo. (LORTHLARY *et al.*, 1999; LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009).

Na literatura não há muitos relatos sobre resistência de *Paracoccidioides* spp. as terapias antifúngicas, no entanto há relatos de que pacientes acometidos pela espécie *P. lutzii* são mais sensíveis a terapia com cetoconazol e trimetoprim-sulfametoxazol do que aqueles acometidos pela espécie *P. brasiliensis* (HAHN *et al.*, 2003). De outra maneira, um estudo demonstrou que o processo de melanização que este fungo é capaz de desenvolver, diminui a sensibilidade a alguns agentes antifúngicos, em particular a anfotericina B (DA SILVA *et al.*, 2006).

As equinocandinas foram descobertas em 1970 através da pesquisa randomizada de metabólicos secundários. É considerada a mais nova classe de agentes antifúngicos, as quais são inibidores da síntese de  $\beta$ -(1,3)-glucano. A caspofungina foi a primeira a ser aprovada para o uso clínico, sendo que as principais descrições na literatura envolvem o tratamento para candidíase e aspergilose (WALKER *et al.*, 2010). Não há relatos do tratamento clínico de PCM com caspofungina, porém estudos *in vitro* avaliaram a sensibilidade de *P. brasiliensis* (fase micelial e leveduriforme) a caspofungina, nos quais o crescimento da fase leveduriforme foi inibida de 20 a 65 %, enquanto que a fase micelial de 75 a 82 % (RODRÍGUEZ-BRITO *et al.*, 2010).

### **1.9. Antifúngicos de origem natural**

Uma tendência é o estudo de compostos naturais ou semissintéticos na busca de importantes atividades biológicas, tal como atividade antifúngica. Em 1989 pesquisas envolvendo o composto Ajoene, o qual é um derivado do extrato etanólico de alho (*Allium sativum* L. família *Liliaceae*), mostrou inibição do crescimento do fungo *P. brasiliensis* afetando a integridade da membrana citoplasmática fúngica (SAN-BLAS *et al.*, 1989; SAN-BLAS *et al.*, 1993; SAN-BLAS *et al.*, 1997). Dois estudos avaliaram o efeito do ajoene em modelo murino, sendo que em um foi apresentado uma redução significativa dos níveis de anticorpos na décima semana de tratamento (MALUF *et al.*, 2008), e em outro mostrou um efeito aditivo positivo quando associado com trimetoprim-sulfametoxazol e protetivo da resposta imune próinflamatória (THOMAZ *et al.*, 2008). Isolados de

*Paracoccidioides* foram sensíveis a curcumina, um composto produzido pelo rizoma da *Curcuma long*, apresentando efeito inibitório maior do que o agente antifúngico fluconazol (MARTINS et al., 2009). Já dois compostos isolados do extrato de *Schinus terebinthifolius* apresentaram forte atividade anti-*Paracoccidioides*, e um deles quando combinado com itraconazol apresentou efeito sinérgico (JOHANN; CISALPINO, et al., 2010; JOHANN; SÁ, et al., 2010). O derivado da chalcona, 6-quinolinila foi capaz de controlar a inflamação em modelo murino melhor que o agente itraconazol, evitando a formação de granuloma e preservando o tecido pulmonar (DE SÁ et al., 2015). Em nosso laboratório foram observados que os compostos maitenina e pristimerina oringem destes compostos apresentaram importante atividade contra isolados de *Paracoccidioides* (GULLO et al., 2012), assim como os derivados do ácido gálico que demonstraram uma relação estrutura atividade contra diferentes fungos patogênicos, incluindo as espécies de *Paracoccidioides* (DE PAULA e SILVA et al., 2014).

#### **1.10. Busca de novos fármacos**

Para o estudo de novos compostos com potencial atividade antifúngica é preciso lançar mão de um conjunto de técnicas *in vitro* e *in vivo*, para as quais os processos envolvidos não sejam de alto custo e não violem direitos éticos. Experimentos *in vitro* oferecem uma análise básica sobre o alvo de estudo, como por exemplo, a influência direta de um composto sobre o fungo, ou então a influência em um sistema mais complexo. Após obter estas respostas, atualmente a ciência ainda disponibiliza métodos considerados *in vivo* chamados de modelos alternativos, que podem ser utilizados para realizar o pré *screening* dos compostos com atividade promissora, e assim minimizar o uso do modelo murino, os quais são imprescindíveis para uma resposta final, porém com inúmeras restrições para seu uso.

- *Galleria mellonella*

Em 1959, Russell e Burch propuseram a teoria dos três Rs (Reduzir, Reutilizar e Reciclar) almejando tornar o mundo consciente da questão do uso desenfreado de animais na pesquisa, a fim de obrigá-los a buscar alternativas para o uso de modelos animais experimentais (ARORA et al., 2011). A fase larval da *Galleria mellonella* é amplamente utilizada como um modelo animal alternativo (MYLONAKIS; ABALLAY, 2005; FUCHS; MYLONAKIS, 2006; CHAMILOS et al., 2007; MYLONAKIS et al., 2007; PELEG et al., 2009; FUCHS et al., 2010; LIONAKIS, 2011; DESALERMOS et al., 2012). Este modelo

possibilita experimentos com variação de temperatura de 25 a 37 °C, faixa esta que mimetiza as condições do hospedeiro e assim a possibilidade do estudo de infecções fúngicas. Além disso, *G. mellonella* tem seis tipos de células, algumas das quais têm capacidade fagocítica, as quais desempenham um papel importante como sistema de defesa. Alterações na densidade da hemolinfa durante a infecção podem ser facilmente mensuradas e utilizadas como um parâmetro da resposta da larva após a exposição a agentes patogênicos ou substâncias de interesse (FUCHS; MYLONAKIS, 2006; FUCHS et al., 2010; DESALERMOS et al., 2012; JACOBSEN, 2014).

Existem estudos na literatura que correlacionam a eficácia de agentes antifúngicos neste modelo e em testes *in vitro* e *in vivo* (MESA-ARANGO et al., 2013; SCORZONI et al., 2013), como exemplo um estudo que verificou a eficácia de um composto denominado antraquinonas derivado de uma planta *Rubiaceae*, *Morinda tomentosa*, contra o fungo *C. albicans* (FAVRE-GODAL et al., 2014). Neste sentido, preliminarmente o uso de modelos animais alternativos simples tem sido utilizados para gerar os dados preliminares na busca por novos compostos antifúngicos naturais necessários para avançar etapas mais críticas da pesquisa evitando obstáculos da pesquisa antifúngica atual, tais como restrições de custo, tempo e ética. Outras vantagens como temperatura de manutenção similar a utilizada *in vitro* com células de mamíferos e ao hospedeiro, e a semelhança estrutural e funcional da resposta imune inata aos mamíferos, aumentam a credibilidade deste modelo.

### 1.11. Gênero *Alchornea* e ácido gálico

Por meio de diversos estudos em vários biomas naturais foi possível observar grande ocorrência de espécies do gênero *Alchornea*. Esse gênero tem sido utilizado atualmente como agente antidiarréico, anti-inflamatório, antireumático e no tratamento de hanseníase e de outras doenças cutâneas. 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; CALVO et al., 2007).

Estudos químicos da espécie *A. glandulosa*, revelaram a presença de compostos fenólicos como exemplo o ácido gálico, constituinte majoritário no extrato etanólico. O ácido gálico é um metabólito especial de ocorrência ampla no reino vegetal, o qual apresenta diversas atividades biológicas como anti-inflamatório, antioxidante, antimutagênico, anticarcinogênico, antibacteriana, antiviral, analgésica. Como antioxidante

o ácido gálico poderia atuar como agente antiapoptótico e proteger as células humanas contra danos oxidativos (CALVO et al., 2007; TREVIÑO-CUETO et al., 2007; LOPES et al., 2011).

Devido as suas variadas propriedades e aplicações comerciais, o ácido gálico é um composto de notável interesse para as indústrias farmacêuticas e químicas. Ácido gálico (ácido 3,4,5-triidroxibenzóico) pode ser acumulada na forma livre ou produzida pela hidrólise ácida de ácidos tânicos, porém este possui elevado custo econômico, baixa produção e a pureza como desvantagens (MORAIS et al., 2010; XIMENES et al., 2010; LOPES et al., 2011). Alternativamente, o ácido gálico pode ser produzido por hidrólise microbiana de ácidos tânicos pela tanase (tannin-acylhydrolase EC 3.1.1.20), uma enzima induzível, secretados por microrganismos (POURRAT et al., 1987; INOUE et al., 1995; PINTO, 2002); mas principalmente é uma substância orgânica que ocorre em muitas plantas, como raízes de *Paeonia rockii* (PICERNO et al., 2011), espécies de *Astronium* (DA SILVA et al., 2011), frutos de *Syzygium cumini* (Tobal et al., 2012), *Euphorbia lunulata* (YANG et al., 2011), folhas, caules e raízes de variedades diferentes de *Labisa pumila Benth* (KARIMI et al., 2011), *Zingiber officinale* (GHASEMZADEH ET AL., 2010), caules de *Klainedoxa gabonensis* (WANSI et al., 2010), *Nervilia aragoana* e folhas de *Atlantia monophylla* (REDDY et al., 2010), *Lawsonia inermis* (SULTANA et al., 2009), *Ardisia chinensis* (LI et al., 2006) e *Alchornea glandulosa* (CALVO et al., 2007).

Há na literatura, trabalhos com ácido gálico e galatos, especialmente estudos focados na relação estrutura atividade destas substâncias. A atividade antimicrobiana de uma série sintética de alcoóis de cadeia longa e aqueles naturalmente encontrados foram estudados contra 15 microrganismos, a fim de adquirir novos conhecimentos sobre suas funções estruturais. Foi observado que a atividade antimicrobiana máxima parece ser dependente do comprimento da cadeia hidrofóbica a partir do grupamento hidroxila (hidrofílico), chamado de efeito *cutoff*, além também de depender do microrganismo a ser testado, ou seja, devem ser consideradas as diferentes morfologias entre os microrganismos testados, como tamanho, forma da célula e espessura de parede (KUBO et al., 1995).

Da mesma forma Kubo et al (2001) avaliaram a atividade antifúngica dos galatos de propila, octila e dodecila, por serem legalmente permitidos para uso como aditivos antioxidantes em produtos alimentícios e cosméticos. Entre os três galatos testados, o galato de octila exibiu atividade antifúngica contra *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Candida albicans*, e *Aspergillus niger*. Por isso, o modo de ação fungicida do galato de octila contra *S. cerevisiae* foi avaliada, considerando os

estudos já realizados por Kubo et al, (1995). Assim foi observado que a estrutura cabeça polar e cauda apolar, e ainda a não atividade antimicrobiana específica do galato de octila, foi similar àquela encontrada com os álcoois de cadeia longa em muitos aspectos, e as funções adicionais foram consideradas aos galatos de alquilas. Como no grupo éster não existe uma estrutura álcool, é possível que este grupamento esteja envolvido provocando uma atividade adicional, ou que as esterases presentes no interior da célula hidrolisem o galato de alquila para ácido gálico e os correspondentes álcoois. Concluiu-se que a atividade fungicida do galato de octila depende do comprimento da cadeia alquila e da capacidade de atuar como um agente surfactante não iônico, ou seja, atua como uma substância tensoativa que age como detergente na membrana da celular fúngica (KUBO et al., 2001).

Leal et al (2009) apresentaram resultados da atividade antifúngica de uma série completa de 15 galatos de alquila e seis análogos atuando contra um painel representativo de fungos patogênicos oportunistas. Neste trabalho ressaltaram a importância em considerar o microrganismo testado, a presença de hidroxilas, a influência do comprimento da cadeia e a hidrofobicidade destas substâncias.

Por meio da parceria no Projeto BIOTA-FAPESP e SISBIOTA CNPq, com o Instituto de Química da UNESP de Araraquara, o ácido gálico e seus derivados, denominados galatos de alquila, foram avaliados previamente e classificados como detentores de forte atividade fungicida. Foi observado que a substância ácido gálico apresentou uma CIM (concentração inibitória mínima) que variou de 31,25 a 0,250 mg/L para os isolados das espécies filogenéticas S1, S2 e PS3 de *P. brasiliensis* e para *P. lutzii*, enquanto que os galatos de alquila mostraram valores de CIM entre 16 a 0,004 mg/L, para as mesmas espécies. O menor valor de CIM foi observado para seis galatos que possuem uma substituição por uma cadeia relativamente longa de carbonos, entre este foi destacado o galato de decila (G14). Tais substâncias apresentaram viabilidade celular maior que 80 % nos ensaios de citotoxicidade pelo método de MTT, para duas linhagens celulares pulmonares diferentes (DE PAULA e SILVA et al., 2014). Assim, este trabalho tem como objetivo estudar a influência destas substâncias no sistema *Paracoccidioides*-hospedeiro e compreender o possível mecanismo de ação dos mesmos empregando diferentes metodologias.

processo de n-glicosilação inibido, assim como uma redução da atividade da  $\alpha$ -(1,4)-amilase, o que poderia afetar a composição da parede celular fúngica e desenvolvimento do fungo (DOS REIS ALMEIDA et al., 2014).

Dessa maneira, como foi predito que os galatos afetam a mesma via do agente Tunicamicina, a atividade relativa das enzimas  $\alpha$ -(1,3)-glucanase, N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase e  $\alpha$ -amilase foram analisadas por ensaios enzimáticos. Menor atividade enzimática foi observada após o tratamento com o G14, corroborando com os resultados descritos na literatura. A n-glicosilação das proteínas de *P. brasiliensis* é crucial para muitos processos biológicos assim como para interação da levedura com a célula hospedeira, sugerindo que este composto tem potencial para bloquear este processo e interferir na virulência do fungo (DOS REIS ALMEIDA et al., 2011)

No ensaio da expressão relativa dos genes codificantes destas enzimas, foi observado que todos os genes foram hiperexpressos, com relevância significativa em relação ao controle não tratado. Dessa forma a célula fúngica recruta de forma expressiva o produto destes genes, os quais após modificações traducionais seriam enzimas ativas na possível recuperação da parede celular. Porém, com a baixa atividade enzimática destas enzimas, foi pressuposto que o composto galato de decila interfere na via da n-glicosilação, afetando na forma ativa final da enzima e assim na formação adequada da parede celular.

## 6. CONCLUSÃO

Dessa maneira neste trabalho foi observado que o composto galato de decila (G14) foi capaz de diminuir a quantidade de nitritos no sobrenadante da monocamada da linhagem de macrófagos RAW estimulada por LPS, o que sugere atividade antioxidante.

Através da análise por citometria de fluxo, foi observado que as linhagens pulmonares humanas, MRC-5 e A549, apresentaram o mesmo perfil de interação com *P. lutzii*, entre os tempos estudados. Já a linhagem de macrófago alveolar murino AMJ2-C11 apresentou uma progressiva taxa de interação até o tempo de 24 horas, resultado que difere do perfil dos outros tipos celulares. No modelo mais complexo *G. mellonella* houve uma parcial semelhança com o perfil das linhagens pulmonares humana, confirmando ser um bom modelo para o estudo *Paracoccidioides*-hospedeiro.

Ainda foi possível observar e confirmar a capacidade das células fúngicas de *P. lutzii* em aderir e invadir as linhagens pulmonares MRC-5 e A549 e aos hemócitos da larva de - *G. mellonella* com 6 horas de interação.

Contudo, o composto G14 foi capaz de diminuir a atividade metabólica e a formação de novos brotos das células fúngicas de *P. lutzii*, o que certamente contribuiu para reduzir a taxa de interação de PI01 a linhagem A549 e aos macrófagos AMJ2-C11, além de apresentar importante capacidade do aumento da taxa de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* infectadas com PI01.

Corroborando com estes resultados, verificamos que o G14 possui forte influência na via da n-glicosilação ou/e da resposta a proteínas não enoveladas, pressupondo seu mecanismo de ação de acordo com a avaliação da interação genética. Esta hipótese ainda foi previamente confirmada pela verificação da baixa atividade enzimática e da contínua expressão dos genes que codificam estas enzimas n-glicosiladas relacionadas à formação da parede celular de *Paracoccidioides* spp.

Assim, o composto G14 é um agente antifúngico capaz de diminuir a capacidade do fungo em reestabelecer a homeostasia, neste caso a reintegração da parede celular, inferindo-se que sua ação antifúngica está ligada diretamente a virulência do fungo, levando a menores taxas de interação fungo-célula hospedeira.

## 7. REFERÊNCIAS

ALCANTARA, C. et al. Role of protein kinase C in cytokine secretion by lung epithelial cells during infection with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Pathog Dis**, v. 73, n. 7, Oct 2015. ISSN 2049-632X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26152710> >.

ALMEIDA, F. et al. *Toxoplasma gondii* Chitinase Induces Macrophage Activation. **PLoS One**, v. 10, n. 12, p. e0144507, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26659253> >.

AMEEN, M.; TALHARI, C.; TALHARI, S. Advances in paracoccidioidomycosis. **Clin Exp Dermatol**, v. 35, n. 6, p. 576-80, Aug 2010. ISSN 1365-2230. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19874328> >.

ARORA, T. et al. Substitute of Animals in Drug Research: An Approach Towards Fulfillment of 4R's. **Indian J Pharm Sci**, v. 73, n. 1, p. 1-6, Jan 2011. ISSN 1998-3743 (Electronic) 0250-474X (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=22131615](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22131615) >.

BAGAGLI, E. et al. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. **Infect Genet Evol**, v. 6, n. 5, p. 344-51, Sep 2006a. ISSN 1567-1348. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16473563> >.

BAGAGLI, E. et al. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. **Infect Genet Evol**, v. 6, n. 5, p. 344-51, Sep 2006b. ISSN 1567-1348. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16473563> >.

BAGAGLI, E. et al. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 197-207, 2008 Apr-May 2008. ISSN 0301-486X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18777629> >.

BARROS, B. C. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* induces recruitment of  $\alpha 3$  and  $\alpha 5$  integrins into epithelial cell membrane rafts, leading to cytokine secretion. **Microbes Infect**, v. 18, n. 1, p. 68-77, Jan 2016. ISSN 1769-714X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26369712> >.

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, p. e643, 2010. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20361032> >.

BELLISSIMO-RODRIGUES, F. et al. Endemic paracoccidioidomycosis: relationship between clinical presentation and patients' demographic features. **Med Mycol**, v. 51, n. 3, p. 313-8, Apr 2013. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22928923> >.

BELLISSIMO-RODRIGUES, F.; MACHADO, A. A.; MARTINEZ, R.  
Paracoccidioidomycosis epidemiological features of a 1,000-cases series from a hyperendemic area on the southeast of Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v. 85, n. 3, p. 546-50, Sep 2011. ISSN 1476-1645. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21896820> >.

BENARD, G. et al. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, v. 13, n. 4, p. 248-52, Feb 2001. ISSN 1043-4666. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11237434> >.

BENCHIMOL, J.; SÁ, M. **Adolpho Lutz: Dermatologia e Micologia**. Rio de Janeiro: 2004. 620

BERNARDINO, S. et al. TNF- $\alpha$  and CD8<sup>+</sup> T cells mediate the beneficial effects of nitric oxide synthase-2 deficiency in pulmonary paracoccidioidomycosis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 8, p. e2325, 2013. ISSN 1935-2735. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23936574> >.

BITTENCOURT, J. I.; DE OLIVEIRA, R. M.; COUTINHO, Z. F.  
Paracoccidioidomycosis mortality in the State of Paraná, Brazil, 1980/1998. **Cad Saude Publica**, v. 21, n. 6, p. 1856-64, 2005 Nov-Dec 2005. ISSN 0102-311X. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16410872> >.

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. 390-4, Sep 1999. ISSN 0002-9637. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10497977> >.

BOCCA, A. L. et al. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. **Future Microbiol**, v. 8, n. 9, p. 1177-91, Sep 2013. ISSN 1746-0921. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24020744> >.

BONFIM, S. M. et al. Chitinase from *Paracoccidioides brasiliensis*: molecular cloning, structural, phylogenetic, expression and activity analysis. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 46, n. 2, p. 269-83, Mar 2006. ISSN 0928-8244. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16487309> >.

BORGES-WALMSLEY, M. I. et al. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends Microbiol**, v. 10, n. 2, p. 80-7, Feb 2002. ISSN 0966-842X. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11827809> >.

BRUMMER, E. et al. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. **Infect Immun**, v. 57, n. 8, p. 2289-94, Aug 1989. ISSN 0019-9567. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2744848> >.

BURGER, E. et al. Cytokines Expressed in the Granulomatous Lesions in Experimental Paracoccidioidomycosis: Role in Host Protective Immunity and as

Fungal Virulence Factor. **J. Clin. Cell. Immunol.** S1:010. doi:10.4172/2155-9899.S1-010 2013.

CALICH, V. L. et al. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* in mice is controlled by a single dominant autosomal gene. **Infect Immun**, v. 55, n. 8, p. 1919-23, Aug 1987. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3610318> >.

CALVI, S. A. et al. Effect of cytokines on the in vitro fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. **Microbes Infect**, v. 5, n. 2, p. 107-13, Feb 2003. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12650768> >.

CALVO, T. R. et al. Constituents and antiulcer effect of *Alchornea glandulosa*: activation of cell proliferation in gastric mucosa during the healing process. **Biol Pharm Bull**, v. 30, n. 3, p. 451-9, Mar 2007. ISSN 0918-6158. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17329837> >.

CAMACHO, E. et al. Expression of *Paracoccidioides brasiliensis* AMY1 in a *Histoplasma capsulatum* amy1 mutant, relates an  $\alpha$ -(1,4)-amylase to cell wall  $\alpha$ -(1,3)-glucan synthesis. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e50201, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23185578> >.

CARBONELL, L. M. Cell wall changes during the budding process of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatitidis*. **J Bacteriol**, v. 94, n. 1, p. 213-23, Jul 1967. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6027991> >.

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. 605-12, May 2008. ISSN 1096-0937. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18364259> >.

CAVALCANTI LUNA, M. A. et al. Copper-induced adaptation, oxidative stress and its tolerance in *Aspergillus niger* UCP1261. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 418-427, 11// 2015. ISSN 0717-3458. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0717345815001220> >.

CHAMILOS, G. et al. Role of mini-host models in the study of medically important fungi. **Lancet Infect Dis**, v. 7, n. 1, p. 42-55, Jan 2007. ISSN 1473-3099. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17182343> >.

COLOMBO, A. L. et al. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. **Med Mycol**, v. 49, n. 8, p. 785-98, Nov 2011. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21539506> >.

COLTRI, K. C. et al. Paracoccin, a GlcNAc-binding lectin from *Paracoccidioides brasiliensis*, binds to laminin and induces TNF- $\alpha$  production by macrophages. **Microbes Infect**, v. 8, n. 3, p. 704-13, Mar 2006. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16476564> >.

COOPER, G. M. Protein Folding and Processing. In: (Ed.). **The Cell: A Molecular Approach**. 2nd. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2000.

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. 5581-94, Sep 2015. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26124176> >.

COSTANZO, M. et al. The genetic landscape of a cell. **Science**, v. 327, n. 5964, p. 425-31, Jan 2010. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20093466> >.

COUTINHO, Z. F. et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad Saude Publica**, v. 18, n. 5, p. 1441-54, 2002 Sep-Oct 2002. ISSN 0102-311X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12244377> >.

DA SILVA, M. B. et al. Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. **Microbes Infect**, v. 8, n. 1, p. 197-205, Jan 2006. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16213179> >.

DA SILVA, V. C. et al. Characterization of gallotannins from *Astronium* species by flow injection analysis- electrospray ionization-ion trap-tandem mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng)**, v. 17, n. 4, p. 365-75, 2011. ISSN 1469-0667. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22006629> >.

DE ABREU E SILVA, M. A. et al. Important aspects of oral paracoccidioidomycosis-a literature review. **Mycoses**, Oct 2012. ISSN 1439-0507. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23088400> >.

DE ALMEIDA, S. R. et al. Pattern of immune response to GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* in susceptible and resistant mice is influenced by antigen-presenting cells. **Cell Immunol**, v. 190, n. 1, p. 68-76, Nov 1998. ISSN 0008-8749. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9826448> >.

DE CASTRO, L. F. et al. Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. **J Infect**, Jul 2013. ISSN 1532-2742. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23872208> >.

DE GROOT, P. W.; RAM, A. F.; KLIS, F. M. Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. **Fungal Genet Biol**, v. 42, n. 8, p. 657-75, Aug 2005. ISSN 1087-1845. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15896991> >.

DE OLIVEIRA, H. C. et al. Importance of adhesins in virulence of *Paracoccidioides* spp. **Front Microbiol**, v. 6, p. 303, 2015. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25914695> >.

DE PAULA E SILVA, A. C. et al. Antifungal Activity of Decyl Gallate against Several Species of Pathogenic Fungi. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2014, p.

506273, 2014. ISSN 1741-427X. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25505923> >.

DE SOUZA, S. P.; JORGE, V. M.; XAVIER, M. O. Paracoccidioidomycosis in southern Rio Grande do Sul: a retrospective study of histopathologically diagnosed cases. **Braz J Microbiol**, v. 45, n. 1, p. 243-7, 2014. ISSN 1678-4405. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24948940> >.

DE SÁ, N. P. et al. Antifungal activity of 6-quinolinyl N-oxide chalcones against Paracoccidioides. **J Antimicrob Chemother**, v. 70, n. 3, p. 841-5, Mar 2015. ISSN 1460-2091. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25362572> >.

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. 749-54, Aug 2009. ISSN 1678-8060. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19820837> >.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J Immunol Methods**, v. 89, n. 2, p. 271-7, May 1986. ISSN 0022-1759. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3486233> >.

DESALERMOS, A.; FUCHS, B. B.; MYLONAKIS, E. Selecting an invertebrate model host for the study of fungal pathogenesis. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 2, p. e1002451, Feb 2012. ISSN 1553-7374. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22319439> >.

DOS REIS ALMEIDA, F. B. et al. Influence of N-glycosylation on the morphogenesis and growth of Paracoccidioides brasiliensis and on the biological activities of yeast proteins. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e29216, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22216217> >.

DOS REIS ALMEIDA, F. B. et al. Paracoccin from Paracoccidioides brasiliensis; purification through affinity with chitin and identification of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity. **Yeast**, v. 27, n. 2, p. 67-76, Feb 2010. ISSN 1097-0061. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19908201> >.

DOS REIS ALMEIDA, F. B. et al.  $\alpha$ -(1,4)-Amylase, but not  $\alpha$ - and  $\beta$ -(1,3)-glucanases, may be responsible for the impaired growth and morphogenesis of Paracoccidioides brasiliensis induced by N-glycosylation inhibition. **Yeast**, v. 31, n. 1, p. 1-11, Jan 2014. ISSN 1097-0061. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24155051> >.

DUO-CHUAN, L. Review of fungal chitinases. **Mycopathologia**, v. 161, n. 6, p. 345-60, Jun 2006. ISSN 0301-486X. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16761182> >.

FAVA, S. D. C. et al. Distribuição geográfica e morbidade da paracoccidioidomicose no Estado de São Paulo. **Rev Microbiol**. v.18, n.4, p. 349-356, out.-dez. 1987.

FAVRE-GODAL, Q. et al. Comprehensive approach for the detection of antifungal compounds using a susceptible strain of Candida albicans and confirmation of in vivo

activity with the *Galleria mellonella* model. **Phytochemistry**, v. 105, p. 68-78, Sep 2014. ISSN 1873-3700. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24984572> >.

FERNANDES, R. K. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* Interferes on Dendritic Cells Maturation by Inhibiting PGE2 Production. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0120948, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25793979> >.

FERRARI, M.; FORNASIERO, M. C.; ISETTA, A. M. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. **J Immunol Methods**, v. 131, n. 2, p. 165-72, Aug 1990. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2391427> >.

FERREIRA, M. S. *Paracoccidioidomycosis*. **Paediatr Respir Rev**, v. 10, n. 4, p. 161-5, Dec 2009. ISSN 1526-0550. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19879504> >.

FORTES, M. R. P. et al. Immunology of *paracoccidioidomycosis*. Rio de Janeiro: na. Bras. Dermatol. Rio de Janeiro, v.86, n.3, p. 516-525, May/June, 2011.

FRANCO, M. et al. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. **Med Mycol**, v. 38, n. 3, p. 185-91, Jun 2000. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10892985> >.

FRANCO, M. et al. *Paracoccidioidomycosis*: a recently proposed classification of its clinical forms. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 20, n. 2, p. 129-32, 1987 Apr-Jun 1987. ISSN 0037-8682. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3507739> >.

FREE, S. J. Fungal cell wall organization and biosynthesis. **Adv Genet**, v. 81, p. 33-82, 2013. ISSN 0065-2660. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23419716> >.

FUCHS, B. B.; MYLONAKIS, E. Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. **Curr Opin Microbiol**, v. 9, n. 4, p. 346-51, Aug 2006. ISSN 1369-5274. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16814595> >.

FUCHS, B. B. et al. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. **Virulence**, v. 1, n. 6, p. 475-82, 2010 Nov-Dec 2010. ISSN 2150-5608. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21178491> >.

FUJITA, K.; KUBO, I. Plasma membrane injury induced by nonyl gallate in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Appl Microbiol**, v. 92, n. 6, p. 1035-42, 2002. ISSN 1364-5072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12010543> >.

FUNG, S. Y. et al. Unbiased screening of marine sponge extracts for anti-inflammatory agents combined with chemical genomics identifies girolline as an inhibitor of protein synthesis. **ACS Chem Biol**, v. 9, n. 1, p. 247-57, Jan 2014. ISSN 1554-8937. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24117378> >.

FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate.: *J. Biochem.* v. 41, n.5, p. 583-603, 1954.

GERLIER, D.; THOMASSET, N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. **J Immunol Methods**, v. 94, n. 1-2, p. 57-63, Nov 1986. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3782817> >.

GHASEMZADEH, A.; JAAFAR, H. Z.; RAHMAT, A. Elevated carbon dioxide increases contents of flavonoids and phenolic compounds, and antioxidant activities in Malaysian young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe.) varieties. **Molecules**, v. 15, n. 11, p. 7907-22, Nov 2010. ISSN 1420-3049. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21060298> >.

GIAEVER, G. et al. Chemogenomic profiling: identifying the functional interactions of small molecules in yeast. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 3, p. 793-8, Jan 2004. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14718668> >.

GONZALEZ, A. et al. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Infect Immun**, v. 68, n. 5, p. 2546-52, May 2000. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10768942> >.

GULLO, F. P. et al. Antifungal activity of maytenin and pristimerin. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2012, p. 340787, 2012. ISSN 1741-4288. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22675379> >.

HAHN, R. C. et al. Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and in vitro resistance to ketoconazole and trimethoprim sulphamethoxazole. **Mycoses**, v. 46, n. 8, p. 342-7, Sep 2003. ISSN 0933-7407. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12950907> >.

HAWORTH, R. S.; CRAGOE, E. J.; FLIEGEL, L. Amiloride and 5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride inhibit medium acidification and glucose metabolism by the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Biochim Biophys Acta**, v. 1145, n. 2, p. 266-72, Feb 1993. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8431459> >.

HO, C. H. et al. Combining functional genomics and chemical biology to identify targets of bioactive compounds. **Curr Opin Chem Biol**, v. 15, n. 1, p. 66-78, Feb 2011. ISSN 1879-0402. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21093351> >.

HORECKA, J.; DAVIS, R. W. The 50:50 method for PCR-based seamless genome editing in yeast. **Yeast**, v. 31, n. 3, p. 103-12, Mar 2014. ISSN 1097-0061. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24639370> >.

INOUE, M. et al. Selective induction of cell death in cancer cells by gallic acid. **Biol Pharm Bull**, v. 18, n. 11, p. 1526-30, Nov 1995. ISSN 0918-6158. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8593472> >.

JACOBSEN, I. D. *Galleria mellonella* as a model host to study virulence of *Candida*. **Virulence**, v. 5, n. 2, p. 237-9, Feb 2014. ISSN 2150-5608. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24384470> >.

JANEČEK, Š.; SVENSSON, B.; MACGREGOR, E. A.  $\alpha$ -Amylase: an enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases. **Cell Mol Life Sci**, v. 71, n. 7, p. 1149-70, Apr 2014. ISSN 1420-9071. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23807207> >.

JOHANN, S. et al. Antifungal activity of extracts of some plants used in Brazilian traditional medicine against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Pharm Biol**, v. 48, n. 4, p. 388-96, Apr 2010. ISSN 1744-5116. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20645716> >.

JOHANN, S. et al. Antifungal activity of schinol and a new biphenyl compound isolated from *Schinus terebinthifolius* against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v. 9, p. 30, 2010. ISSN 1476-0711. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20939907> >.

KANETSUNA, F.; CARBONELL, L. M. Cell wall glucans of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Bacteriol**, v. 101, n. 3, p. 675-80, Mar 1970. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5442818> >.

KANETSUNA, F. et al. Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Bacteriol**, v. 110, n. 1, p. 208-18, Apr 1972. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5018021> >.

KARIMI, E.; JAAFAR, H. Z.; AHMAD, S. Phytochemical analysis and antimicrobial activities of methanolic extracts of leaf, stem and root from different varieties of *Labisa pumila* Benth. **Molecules**, v. 16, n. 6, p. 4438-50, 2011. ISSN 1420-3049. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21623314> >.

KARTHIK, N.; AKANKSHA, K.; PANDEY, A. Production, purification and properties of fungal chitinases--a review. **Indian J Exp Biol**, v. 52, n. 11, p. 1025-35, Nov 2014. ISSN 0019-5189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25434097> >.

KRISHNAN, K.; ASKEW, D. S. Endoplasmic reticulum stress and fungal pathogenesis. **Fungal Biol Rev**, v. 28, n. 2-3, p. 29-35, Oct 2014. ISSN 1749-4613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25419229> >.

KRÓL, E. et al. Antibacterial activity of alkyl gallates is a combination of direct targeting of FtsZ and permeabilization of bacterial membranes. **Front Microbiol**, v. 6, p. 390, 2015. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25972861> >.

KUBO, I.; MUROI, H.; KUBO, A. Structural functions of antimicrobial long-chain alcohols and phenols. **Bioorg Med Chem**, v. 3, n. 7, p. 873-80, Jul 1995. ISSN 0968-0896. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7582963> >.

KUBO, I.; XIAO, P.; FUJITA, K. Antifungal activity of octyl gallate: structural criteria and mode of action. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 11, n. 3, p. 347-50, Feb 2001. ISSN 0960-894X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11212107> >.

- LACAZ, C. S. *Paracoccidioides brasiliensis*: morphology, evolutionary cycle, maintenance during saprophytic life, biology, virulence, taxonomy. In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A. et al. ed. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 13-22.
- LANIADO-LABORÍN, R.; CABRALES-VARGAS, M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Rev Iberoam Micol**, v. 26, n. 4, p. 223-7, Dec 2009. ISSN 1130-1406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19836985> >.
- LEAL, P. C. et al. Relation between lipophilicity of alkyl gallates and antifungal activity against yeasts and filamentous fungi. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 19, n. 6, p. 1793-6, Mar 2009. ISSN 1464-3405. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19232493> >.
- LI, Y. L. et al. [Study on the chemical constituents of *Ardisia chinensis*]. **Zhong Yao Cai**, v. 29, n. 4, p. 331-3, Apr 2006. ISSN 1001-4454. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16913485> >.
- LIONAKIS, M. S. *Drosophila* and *Galleria* insect model hosts: new tools for the study of fungal virulence, pharmacology and immunology. **Virulence**, v. 2, n. 6, p. 521-7, 2011 Nov-Dec 2011. ISSN 2150-5608. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22186764> >.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, Dec 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609> >.
- LODISH, H. et al. Protein Glycosylation in the ER and Golgi Complex. In: FREEMAN, W. H. (Ed.). **Molecular Cell Biology**. 4th edition. New York, 2000. cap. 17.7,
- LONDERO, A. T.; RAMOS, C. D. Paracoccidioidomicose. Estudo clínico e micológico de 260 casos observados no interior do Estado do Rio Grande do Sul. . **J Pneumol**, v. 16, p. 129, 1990.
- LOPES, F. C. et al. Inhibition of hydrogen peroxide, nitric oxide and TNF-alpha production in peritoneal macrophages by ethyl acetate fraction from *Alchornea glandulosa*. **Biol Pharm Bull**, v. 28, n. 9, p. 1726-30, Sep 2005. ISSN 0918-6158. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16141548> >.
- LOPES, F. C. et al. *Alchornea glandulosa* ethyl acetate fraction exhibits antiangiogenic activity: preliminary findings from in vitro assays using human umbilical vein endothelial cells. **J Med Food**, v. 14, n. 10, p. 1244-53, Oct 2011. ISSN 1557-7600. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21663472> >.
- LOPEZ, A. et al. Chemical-genetic approaches for exploring the mode of action of natural products. **Prog Drug Res**, v. 66, p. 237, 239-71, 2008. ISSN 0071-786X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18416308> >.
- LORTHLARY, O.; DENNING, D. W.; DUPONT, B. Endemic mycosis: a treatment update. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 43, n.3, p. 321-331, 1999.

- LOTH, E. A. et al. Occurrence of 102 cases of paracoccidioidomycosis in 18 months in the Itaipu Lake region, Western Paraná. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, n. 5, p. 636-7, Oct 2011. ISSN 1678-9849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22031083> >.
- MALUF, M. L. et al. Antifungal activity of ajoene on experimental murine paracoccidioidomycosis. **Rev Iberoam Micol**, v. 25, n. 3, p. 163-6, Sep 2008. ISSN 1130-1406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18785786> >.
- MAMONI, R. L. et al. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. **Med Mycol**, v. 40, n. 2, p. 153-9, Apr 2002. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12058728> >.
- MANNS, B. J. et al. Paracoccidioidomycosis: case report and review. **Clin Infect Dis**, v. 23, n. 5, p. 1026-32, Nov 1996. ISSN 1058-4838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8922797> >.
- MARQUES, S. A. Paracoccidioidomycosis. **Clin Dermatol**, v. 30, n. 6, p. 610-5, 2012 Nov-Dec 2012. ISSN 1879-1131. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23068148> >.
- MARQUES-DA-SILVA, S. H. et al. Occurrence of Paracoccidioides lutzii in the Amazon region: description of two cases. **Am J Trop Med Hyg**, v. 87, n. 4, p. 710-4, Oct 2012. ISSN 1476-1645. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22927496> >.
- MARTINEZ, R. EPIDEMIOLOGY OF PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 57 Suppl 19, p. 11-20, Sep 2015. ISSN 1678-9946. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26465364> >.
- MARTINS, C. V. et al. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. **J Antimicrob Chemother**, v. 63, n. 2, p. 337-9, Feb 2009. ISSN 1460-2091. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19038979> >.
- MATOS, W. B. et al. Paracoccidioidomycosis in the state of Maranhão, Brazil: geographical and clinical aspects. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 45, n. 3, p. 385-9, Jun 2012. ISSN 1678-9849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22760141> >.
- 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, Jan 2006. ISSN 0737-4038. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16151188> >.
- MATUTE, D. R. et al. Microsatellite analysis of three phylogenetic species of Paracoccidioides brasiliensis. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 6, p. 2153-7, Jun 2006. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16757613> >.

MAZA, P. K. et al. Paracoccidioides brasiliensis induces secretion of IL-6 and IL-8 by lung epithelial cells. Modulation of host cytokine levels by fungal proteases. **Microbes Infect**, v. 14, n. 12, p. 1077-85, Oct 2012. ISSN 1769-714X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22687715> >.

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. 882-91, Aug 2004. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15310464> >.

MESA-ARANGO, A. C. et al. The non-mammalian host Galleria mellonella can be used to study the virulence of the fungal pathogen Candida tropicalis and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast. **Med Mycol**, v. 51, n. 5, p. 461-72, Jul 2013. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23170962> >.

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. 129-35, Jul 2007. ISSN 0003-6072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17120081> >.

MORAIS, M. C. et al. Suppression of TNF- $\alpha$  induced NF $\kappa$ B activity by gallic acid and its semi-synthetic esters: possible role in cancer chemoprevention. **Nat Prod Res**, v. 24, n. 18, p. 1758-65, Nov 2010. ISSN 1478-6427. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20408045> >.

MOREJÓN, K. M.; MACHADO, A. A.; MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycosis in patients infected with and not infected with human immunodeficiency virus: a case-control study. **Am J Trop Med Hyg**, v. 80, n. 3, p. 359-66, Mar 2009. ISSN 1476-1645. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19270282> >.

MYLONAKIS, E.; ABALLAY, A. Worms and flies as genetically tractable animal models to study host-pathogen interactions. **Infect Immun**, v. 73, n. 7, p. 3833-41, Jul 2005. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15972468> >.

MYLONAKIS, E.; CASADEVALL, A.; AUSUBEL, F. M. Exploiting amoeboid and non-vertebrate animal model systems to study the virulence of human pathogenic fungi. **PLoS Pathog**, v. 3, n. 7, p. e101, Jul 2007. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17676994> >.

NAGAI, K. et al. N-glycosylation is requisite for the enzyme activity and Golgi retention of N-acetylglucosaminyltransferase III. **Glycobiology**, v. 7, n. 6, p. 769-76, Sep 1997. ISSN 0959-6658. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9376679> >.

NASCIMENTO, F. R. et al. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. **J Immunol**, v. 168, n. 9, p. 4593-600, May 2002. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11971007> >.

NEGRONI, R.; FINQUELIEVICH, J. L.; GOSIS, A. S. [Comparative study of the efficiency of itraconazole and ketoconazole in the treatment of experimental paracoccidioidomycosis]. **Med Cutan Ibero Lat Am**, v. 15, n. 6, p. 455-60, 1987. ISSN 0210-5187. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2828779> >.

NEGRONI, R. et al. Oral treatment of paracoccidioidomycosis and histoplasmosis with itraconazole in humans. **Rev Infect Dis**, v. 9 Suppl 1, p. S47-50, 1987 Jan-Feb 1987. ISSN 0162-0886. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3027846> >.

NEGRONI, R.; PALMIERI, O. J.; CHÁ TOREA, J. C. [Treatment of paracoccidioidomycosis and histoplasmosis by oral itraconazole]. **Medicina (B Aires)**, v. 47, n. 5, p. 505-8, 1987. ISSN 0025-7680. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2849706> >.

NISHIKAKU, A. S. et al. Nitric oxide participation in granulomatous response induced by Paracoccidioides brasiliensis infection in mice. **Med Microbiol Immunol**, v. 198, n. 2, p. 123-35, May 2009. ISSN 1432-1831. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19360439> >.

NOBREGA DE ALMEIDA, J. et al. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Differentiation of the Dimorphic Fungal Species Paracoccidioides brasiliensis and Paracoccidioides lutzii. **J Clin Microbiol**, v. 53, n. 4, p. 1383-6, Apr 2015. ISSN 1098-660X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25631803> >.

PANIAGO, A. M. et al. [Paracoccidioidomycosis: a clinical and epidemiological study of 422 cases observed in Mato Grosso do Sul]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 36, n. 4, p. 455-459, 2003 Jul-Aug 2003. ISSN 0037-8682. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12937721> >.

PANIAGO, A. M. et al. Paracoccidioidomycosis in patients with human immunodeficiency virus: review of 12 cases observed in an endemic region in Brazil. **J Infect**, v. 51, n. 3, p. 248-252, Oct 2005. ISSN 1532-2742. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16230222> >.

PARSONS, A. B. et al. Integration of chemical-genetic and genetic interaction data links bioactive compounds to cellular target pathways. **Nat Biotechnol**, v. 22, n. 1, p. 62-9, Jan 2004. ISSN 1087-0156. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14661025> >.

PARSONS, A. B. et al. Exploring the mode-of-action of bioactive compounds by chemical-genetic profiling in yeast. **Cell**, v. 126, n. 3, p. 611-25, Aug 2006. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16901791> >.

PELEG, A. Y. et al. Galleria mellonella as a model system to study Acinetobacter baumannii pathogenesis and therapeutics. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 6, p. 2605-2609, Jun 2009. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19332683> >.

PEÇANHA, P. M. et al. Amphotericin B lipid complex in the treatment of severe paracoccidioidomycosis: a case series. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2016. ISSN 0924-8579. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857916301674>>.

PICERNO, P. et al. Screening of a polar extract of *Paeonia rockii*: composition and antioxidant and antifungal activities. **J Ethnopharmacol**, v. 138, n. 3, p. 705-12, Dec 2011. ISSN 1872-7573. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22004890>>.

PIECUCH, A.; OBLĄK, E. Yeast ABC proteins involved in multidrug resistance. **Cell Mol Biol Lett**, v. 19, n. 1, p. 1-22, Mar 2014. ISSN 1689-1392. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24297686>>.

PINTO, A. C. et al. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Quim. Nova** [online]. v.25, suppl.1, p.45-61, 2002. ISSN 0100-4042. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422002000800009>>.

POURRAT, H. et al. Production of gallic acid from *Rhus coriaria* L. **Biotechnol. Lett.** v. 9, p. 731-734, 1987.

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. 513-21, May 2009. ISSN 1678-8060. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19547881>>.

RAMARAO, N.; NIELSEN-LEROUX, C.; LERECLUS, D. The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. **J Vis Exp**, n. 70, p. e4392, 2012. ISSN 1940-087X. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23271509>>.

REDDY, K. H.; SHARMA, P. V.; REDDY, O. V. A comparative in vitro study on antifungal and antioxidant activities of *Nervilia aragoana* and *Atlantia monophylla*. **Pharm Biol**, v. 48, n. 5, p. 595-602, May 2010. ISSN 1744-5116. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20645805>>.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Sabouraudia**. v. 23, p. 323-34, 1985.

RESTREPO, A. et al. Itraconazole in the treatment of paracoccidioidomycosis: a preliminary report. **Rev Infect Dis**, v. 9 Suppl 1, p. S51-6, 1987 Jan-Feb 1987. ISSN 0162-0886. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3027847>>.

RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G.; CASTAÑEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med Mycol**, v. 39, n. 3, p. 233-41, Jun 2001. ISSN 1369-3786. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11446526>>.

RIBEIRO, L. C. et al. [Systemic mycosis: factors associated with death among patients infected with the human immunodeficiency virus, Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil,

2005-2008]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42, n. 6, p. 698-705, 2009 Nov-Dec 2009. ISSN 1678-9849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20209358> >.

RIESKE, P.; KRYNSKA, B.; AZIZI, S. A. Human fibroblast-derived cell lines have characteristics of embryonic stem cells and cells of neuro-ectodermal origin. **Differentiation**, v. 73, n. 9-10, p. 474-83, Dec 2005. ISSN 0301-4681. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16351691> >.

RODRÍGUEZ-BRITO, S.; NIÑO-VEGA, G.; SAN-BLAS, G. Caspofungin affects growth of *Paracoccidioides brasiliensis* in both morphological phases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 12, p. 5391-4, Dec 2010. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20937789> >.

RONG, Y.; GENG, Z.; LAU, B. H. Ginkgo biloba attenuates oxidative stress in macrophages and endothelial cells. **Free Radic Biol Med**, v. 20, n. 1, p. 121-7, 1996. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8903688> >.

RUBPORN, A. et al. Comparative proteomic analysis of lung cancer cell line and lung fibroblast cell line. **Cancer Genomics Proteomics**, v. 6, n. 4, p. 229-37, 2009 Jul-Aug 2009. ISSN 1790-6245. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19657000> >.

SAN-BLAS, G. et al. Effect of ajoene on dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Med Vet Mycol**, v. 31, n. 2, p. 133-41, 1993. ISSN 0268-1218. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8509950> >.

SAN-BLAS, G. et al. Inhibition of growth of the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by ajoene. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 33, n. 9, p. 1641-4, Sep 1989. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2817865> >.

SAN-BLAS, G. et al. Inhibition of *Paracoccidioides brasiliensis* by ajoene is associated with blockade of phosphatidylcholine biosynthesis. **Microbiology**, v. 143 ( Pt 5), p. 1583-6, May 1997. ISSN 1350-0872. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9168609> >.

SANTOS, M. O. et al. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the N-acetyl-beta-D-glucosaminidase homologue of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol**, v. 42, n. 3, p. 247-53, Jun 2004. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15283239> >.

SCHÄFER, G.; KASCHULA, C. H. The immunomodulation and anti-inflammatory effects of garlic organosulfur compounds in cancer chemoprevention. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 14, n. 2, p. 233-40, Feb 2014. ISSN 1875-5992. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24237225> >.

SCORZONI, L. et al. Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e60047, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23555877> >.

SCORZONI, L. et al Comparison of virulence between *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* using *Galleria mellonella* as a host model. **Virulence**, v. 6, n. 8, p. 766-776, 2015.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Guidelines in paracoccidioidomycosis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39, n. 3, p. 297-310, 2006 May-Jun 2006a. ISSN 0037-8682. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16906260> >.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. [Guidelines in paracoccidioidomycosis]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39, n. 3, p. 297-310, 2006 May-Jun 2006b. ISSN 0037-8682. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16906260>>.

SHORT, B.; BARR, F. The Golgi apparatus. **Current Biology**, v. 10, n. 16, p. R583-R585, AUG 24 2000 2000. ISSN 0960-9822.

SMITH, A. M. et al. Quantitative phenotyping via deep barcode sequencing. **Genome Res**, v. 19, n. 10, p. 1836-42, Oct 2009. ISSN 1549-5469. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19622793> >.

SULTANA, N.; CHOUDHARY, M. I.; KHAN, A. Protein glycation inhibitory activities of *Lawsonia inermis* and its active principles. **J Enzyme Inhib Med Chem**, v. 24, n. 1, p. 257-61, Feb 2009. ISSN 1475-6374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18825553> >.

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. 273-83, Aug 2009. ISSN 1095-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19376249> >.

TEIXEIRA, M. M. et al. *Paracoccidioides* species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 10, p. e1004397, Oct 2014. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25357210> >.

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. 2254-64, Oct 2011. ISSN 1873-3573. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21962643> >.

TELES, F. R. 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, 10/15/ 2011. ISSN 0039-9140. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914011006928> >.

THOMAZ, L. et al. Experimental paracoccidioidomycosis: alternative therapy with ajoene, compound from *Allium sativum*, associated with sulfamethoxazole/trimethoprim. **Med Mycol**, v. 46, n. 2, p. 113-8, Mar 2008. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18324489> >.

THOMAZ, L. et al. *Galleria mellonella* as a model host to study *Paracoccidioides lutzii* and *Histoplasma capsulatum*. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 139-46, Feb 2013. ISSN 2150-5608. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23302787> >.

TOBAL, T. M. et al. Evaluation of the use of *Syzygium cumini* fruit extract as an antioxidant additive in orange juice and its sensorial impact. **Int J Food Sci Nutr**, v. 63, n. 3, p. 273-7, May 2012. ISSN 1465-3478. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21981004> >.

TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. New advances in the development of a vaccine against paracoccidioidomycosis. **Front Microbiol**, v. 3, p. 212, 2012a. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22701452> >.

TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Paracoccidioidomycosis vaccine. **Hum Vaccin Immunother**, v. 8, n. 10, Oct 2012b. ISSN 2164-554X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22894948> >.

TREVIÑO-CUETO, B. et al. Gallic acid and tannase accumulation during fungal solid state culture of a tannin-rich desert plant (*Larrea tridentata* Cov.). **Bioresour Technol**, v. 98, n. 3, p. 721-4, Feb 2007. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16574410> >.

UNTEREINER, W. A. et al. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. **Mycologia**, v. 96, n. 4, p. 812-21, 2004 Jul-Aug 2004. ISSN 0027-5514. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21148901> >.

VAN DER KAAIJ, R. M. et al. Phylogenetic and biochemical characterization of a novel cluster of intracellular fungal alpha-amylase enzymes. **Microbiology**, v. 153, n. Pt 12, p. 4003-15, Dec 2007. ISSN 1350-0872. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18048915> >.

VIEIRA, G. E. D. et al. Paracoccidioidomycosis in a western Brazilian Amazon State: clinical-epidemiologic profile and spatial distribution of the disease. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 47, n. 1, p. 63-8, 2014 Jan-Feb 2014. ISSN 1678-9849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24603739> >.

VILLALOBOS-DUNO, H. et al. Biochemical characterization of *Paracoccidioides brasiliensis*  $\alpha$ -1,3-glucanase Agn1p, and its functionality by heterologous Expression in *Schizosaccharomyces pombe*. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e66853, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23825576> >.

VISBAL, G. et al. Synthesis, in vitro antifungal activity and mechanism of action of four sterol hydrazone analogues against the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Steroids**, v. 76, n. 10-11, p. 1069-81, 2011 Sep-Oct 2011. ISSN 1878-5867. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21605581> >.

VOLTAN, A. R. et al. Early Endosome Antigen 1 (EEA1) decreases in macrophages infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol**, v. 51, n. 7, p. 759-64, Oct 2013. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23566224> >.

WALKER, L. A.; GOW, N. A.; MUNRO, C. A. Fungal echinocandin resistance. **Fungal Genet Biol**, v. 47, n. 2, p. 117-26, Feb 2010. ISSN 1096-0937. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19770064> >.

WANSI, J. D. et al. Antimicrobial and antioxidant effects of phenolic constituents from *Klainedoxa gabonensis*. **Pharm Biol**, v. 48, n. 10, p. 1124-9, Oct 2010. ISSN 1744-5116. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20738149> >.

WILLIAMS, D. E. et al. Padanamides A and B, highly modified linear tetrapeptides produced in culture by a *Streptomyces* sp. isolated from a marine sediment. **Org Lett**, v. 13, n. 15, p. 3936-9, Aug 2011. ISSN 1523-7052. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21749075> >.

XIMENES, V. F. et al. Inhibitory effect of gallic acid and its esters on 2,2'-azobis(2-amidinopropane)hydrochloride (AAPH)-induced hemolysis and depletion of intracellular glutathione in erythrocytes. **J Agric Food Chem**, v. 58, n. 9, p. 5355-62, May 2010. ISSN 1520-5118. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20397726> >.

YANG, Z. G. et al. Inhibitory effects of constituents from *Euphorbia lunulata* on differentiation of 3T3-L1 cells and nitric oxide production in RAW264.7 cells. **Molecules**, v. 16, n. 10, p. 8305-18, 2011. ISSN 1420-3049. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21959301> >.