

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS

Ana Carolina Alves de Paula e Silva

**Avaliação por métodos fenotípicos e proteômicos de galatos de alquila com
atividade anti – complexo *Paracoccidioides***

Araraquara

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS

Ana Carolina Alves de Paula e Silva

**Avaliação por métodos fenotípicos e proteômicos de galatos de alquila com
atividade anti – complexo *Paracoccidioides***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP como pré-requisito para obtenção do título de Mestre.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini

Araraquara

2012

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

S586a

Silva, Ana Carolina Alves de Paula e
Avaliação por métodos fenotípicos e proteômicos de galatos de alquila
com atividade anti-complexo Paracoccidioides / Ana Carolina Alves de
Paula e Silva. – Araraquara, 2012
107 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de
Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós
Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia
Orientador: Maria José Soares Mendes Giannini

1. Paracoccidioides spp. 2. Teste de sensibilidade antifúngica.
3. AlamarBlue. 4. Ácido gálico. 5. Galatos de alquila. 6. Proteômica.
I. Giannini, Maria José Soares Mendes, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Dedico este trabalho àquelas pessoas que me...

Ensinaram...

Acompanharam...

Auxiliaram...

Aconselharam...

Incentivaram...

Advertiram...

Consolaram...

FORTALECERAM !

Agradecimentos

Agradeço em especial à minha família: à minha mãe Lucia, ao meu padrasto José Carlos e ao meu irmão Mateus, que mesmo sem nunca entenderem o que realmente faço nesta vida de pós-graduação, sempre me escutaram, acompanharam, conduziram, alertaram, suportaram, financiaram e fortaleceram em múltiplos sentidos. Agradeço ainda a todos os meus familiares que sempre demonstraram um carinho enorme e enviaram a mim energias positivas tanto nas horas de conquistas como nas horas de aflição. AMO VOCÊS.

Agradeço à minha orientadora Professora Doutora Maria José Soares Mendes Giannini, e à Professora Doutora Ana Marisa Fusco Almeida, as quais me proporcionaram a oportunidade do meu desenvolvimento como recém-graduada em Farmácia a Mestre em Biotecnologia e Biociências aplicadas à Farmácia. Agradeço a orientação, a dedicação e a confiança, as quais me emolduraram em uma pessoa com iniciativa, forte, pensante e capaz. Você ainda não defendeu a sua dissertação.

Agradeço as professoras Vanderlan da Silva Bolzani e Dulce Helena Siqueira Silva, e ao aluno Maicon Segalla Petrônio que por meio dos projetos Biota-FAPESP, Bioprospecta-FAPESP, e SisBiota do Instituto de Química da UNESP–Araraquara, puderam dar o apoio financeiro ao desenvolvimento deste trabalho. Agradeço ainda a CAPES, pela bolsa concedida.

Ao Doutor Luis Octávio Regasini que sempre esteve disposto em ajudar e auxiliar em inúmeras questões e pedidos, e na contribuição tão rica como componente de banca de qualificação e de defesa de dissertação de Mestrado..

Agradeço ainda à família Micologia, a qual se compõe por mais de 20 pessoas, entre eles estudantes de iniciação científica, mestrandos, técnicos, doutorandos e pós-doutorandos. Neste laboratório, diariamente, em horário integral, pesquisam, estudam e trabalham pessoas não somente maravilhosas, por realizarem seus deveres visando desenvolver os seus projetos, mas porque amam aquilo que fazem, sacrificando almoços, noites, finais de semana, unhas, família e horas de descanso, com o objetivo de alcançar respostas, que os intrigam e perturbam, tanto quanto àqueles que analisarão os resultados finais.

Agradecimentos

Nestes dois anos de mestrado, foram inúmeras as pessoas que conheci, trabalhei e pude compartilhar experiências, que só a vida nos traz. Mas, dessas pessoas algumas são mais do que especiais, porque com certeza, de uma forma ou de outra, mudam nossas vidas e acrescentam diferentes elementos, bons ou ruins, que nos fazem evoluir. À família micologia tenho gratidão eterna, pois sempre que foi necessário estavam prontos a ajudar, são amigos mais que especiais, são essenciais, como Haroldo, um irmão e um amigo, com um coração enorme, e Julhiany, uma amiga irmã mais velha, que me amparou em todas as horas que precisei. Estes dois foram profissionais e amigos especiais determinantes nessa reta final, conferindo a mim paciência para sanar com todas as minhas dúvidas, energia para me incentivar e ombro para que pudesse desabafar. E como Fernanda S., que também foi peça importante neste meu pequeno trajeto, amiga maravilhosa, que com uma energia esplêndida, sempre me auxiliou e ajudou a em qualquer hora que precisei. Assim como estes, Liliana, uma amiga-irmã que mesmo distante, sua amizade sincera me fortalece transmitindo força. Caroline e Patrícia são mais do que amigas, as considero como irmãs, pois são pessoas tão diferentes entre si, mas me completam. Suélen, amiga que me fortalece porque está sempre disposta a conversar e escutar. Fernanda G., uma amiga incrível, que também me ajudou muito, junto com ela, Nayla e Thais, formam um trio sensacional que gosto muito, um tripé que sempre me deu muita força e alegria, do qual se pode sentir a energia positiva que enviam mesmo de muito longe. Tatiane, Aline, Danielle, Natalia, Jaqueline, Janaina e Regina, meninas que considero e agradeço pelos momentos de descontração e força. Rosângela e Rosemira, duas pessoas maravilhosamente incríveis, pois em uma família tão grande, somente duas amigas-mães como elas poderiam dar conta, seja fisicamente ou emocionalmente. Uma família, com tantas pessoas diferentes, mas que cada uma me completa de uma maneira diferente, fazendo dos meus dias mais felizes e acolhedores.

SUMÁRIO

LISTA DE UNIDADES E ABREVIATURAS	8
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
RESUMO	12
ABSTRACT	103
Capítulo 1.....	114
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	30
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1. Isolados e condições de cultivo.....	31
3.2. Cultura celular.....	31
3.3. Substâncias antifúngicas	32
Figura 1: Estrutura molecular do ácido gálico e galatos de alquila	32
3.4. Teste de sensibilidade antifúngica	32
3.4.1. Padronização do inóculo	32
3.4.2. Teste de sensibilidade	33
3.4.3. Teste de Microdiluição	33
3.4.4. Teste de Macrodiluição.....	34
3.4.5. Avaliação da atividade antifúngica.....	34
3.4.6. Teste de sensibilidade com adição do reagente <i>Alamar blue</i> ® (MABA).....	34
3.5. Análise morfológica do fungo frente aos antifúngicos	35
3.6. Teste de sensibilidade com o ácido gálico e galatos de alquila	35
3.6.1. Fonte e preparação	35
3.6.2. Teste de sensibilidade	35
3.6.3. Ensaio de viabilidade celular fúngica utilizando o kit LIVE/DEADlight®	35

3.7. Avaliação da citotoxicidade dos galatos	36
3.7.1. Ensaio de MTT	36
3.7.2. Ensaio de viabilidade celular utilizando o kit LIVE/DEAD®.....	38
3.8. Análise proteica após contato com as substâncias	38
3.8.1. Cultivo em caldo	38
3.8.2. Tempo de incubação	39
3.8.3. Extração total de proteínas.....	39
3.8.4. Dosagem de proteínas pelo Método de <i>Bradford</i>	40
3.8.5. Análise do perfil proteico por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	40
3.8.6. Análise Proteica por Eletroforese Bidimensional	40
3.9. Espectrometria de massas por MALDI TOF/TOF	42
3.10. Análise de expressão diferencial de genes por PCR em Tempo Real (Real Time PCR)	44
3.10.1. Extração de RNA total e síntese de cDNA	44
3.10.2. Síntese de cDNA.....	44
3.10.3. PCR em Tempo Real (Real Time PCR)	45
4. RESULTADOS.....	47
5. DISCUSSÃO	68
6. CONCLUSÃO	83
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	84

LISTA DE UNIDADES E ABREVIATURAS

mg: miligramas
mL: mililitro
L: litro
 μ g: microgramas
 μ M: micromolar
mM: milimolar
 μ L: microlitro
g: gramas
M: molar
nm: nanômetros
G: giros
x g: força da gravidade
PCR: *Polymerase Chain Reaction*
pI: ponto isoelétrico
2D: bidimensional
SDS-PAGE: gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
CIM: concentração inibitória mínima
CFM: concentração fungicida mínima
RPMI-1640: *Roswell Park Memorial Institute* medium
PCM: paracoccidioidomicose
PBS: tampão fosfato, pH 7,2
HIV/Aids: Human Immunodeficiency Virus / Síndrome da imunodeficiência adquirida
MEC: matriz extracelular
KDa: kilodaltons
gp: glicoproteína
ITC: itraconazol
AMB: anfotericina B
CLSI: *Clinical Laboratory Standard Institute*
NCCLS: *National Committee for Clinical Laboratory Standards*
cDNA: ácido desoxirribonucléico complementar
RNA: ácido ribonucleico
MABA: *Microplate Alamar Blue Assay*
MTT: brometo de (3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
IC₅₀: concentração capaz de inibir 50 %
IS: índice de seletividade
ATCC: *American Type Culture Collection*
BHI: *Brain and Heart Infusion*
rpm: rotações por minuto
°C: graus centígrados

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Iniciadores específicos para genes codificantes.....	45
Tabela 2: Teste de sensibilidade por micrométodo do complexo <i>Paracoccidioides</i> : valores de CIM de anfotericina B e itraconazol em mg/L e μ M.....	50
Tabela 3: Valores de CIM do ácido gálico e seus ésteres contra oito isolados do complexo <i>Paracoccidioides</i>	51
Tabela 4: Avaliação da atividade citotóxica em células de fibroblasto normal de pulmão MRC-5 e o índice de seletividade (IS) da razão entre a IC_{50} e o MIC (MFC) de isolados de <i>P.brasiliensis</i> (18, D03, 339, 02, Emp83) e de <i>P. lutzii</i> (EE, 8334MMT, 01)	57
Tabela 5: Análise de spots após eletroforese bidimensional por faixas de pH e massa molecular relacionado ao número de spots de cada condição.	59
Tabela 6: Análise comparativa preliminar das eletroforeses bidimensionais das células do complexo <i>Paracoccidioides</i> sem tratamento e após tratamento com itraconazol, galato de decila e anfotericina B	62
Tabela 7: Número de spots presentes e ausentes em análise comparativa preliminar das eletroforeses bidimensionais das células do complexo <i>Paracoccidioides</i> sem tratamento e após tratamento com itraconazol, galato de decila e anfotericina B	62
Tabela 8: Valores de CIM para testes de sensibilidade em microdiluição e macrodiluição encontrados na literatura.	70
Tabela 9: Valores de CIM de diversos fungos contras alguns galatos.	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura molecular do ácido gálico e galatos de alquila	32
Figura 2: Teste de sensibilidade em macrodiluição empregando <i>Alamar blue</i> e <i>P.brasiliensis</i> . CIM de anfotericina B de 0,05 mg/L contra Pb18.....	47
Figura 3: Teste de sensibilidade em macrodiluição empregando <i>Alamar blue</i> e <i>P. lutzii</i> . CIM de anfotericina B de 0,1 mg/L contra Pl01.	47
Figura 4: Teste de sensibilidade em macrodiluição empregando <i>Alamar blue</i> e <i>P.brasiliensis</i> . CIM de itraconazol de 0,003 mg/L contra Pb18.....	47
Figura 5: Teste de sensibilidade em macrodiluição empregando <i>Alamar blue</i> e <i>P lutzii</i> . CIM de itraconazol de 0,001 mg/L contra Pl01.	47
Figura 6: Teste de sensibilidade em microdiluição empregando <i>Alamar blue</i> e <i>P.brasiliensis</i> e <i>P.</i> <i>lutzii</i> . CIM de 0,06 mg/L de anfotericina B contra ambos os isolados Pb18 e Pl01(linhas C e E), e 0,008 e 0,004 mg/L de itraconazol contra os mesmos isolados, respectivamente (linhas D e F). 48	48
Figura 7: Comparação do efeito dos fármacos antifúngicos sobre <i>P. brasiliensis</i> Pb18 de cada poço em diferentes diluições, incluindo os poços com os valores de CIM para itraconazol (0,008 mg/L) e anfotericina B (0,06 mg/L) em relação a concentrações menores e ao controle positivo.	49
Figura 8: Comparação do efeito dos fármacos antifúngicos sobre <i>P. lutzii</i> Pl01 de cada poço em diferentes diluições, incluindo os poços com os valores de CIM para itraconazol (0,004 mg/L) e anfotericina B (0,06 mg/L) em relação a concentrações menores e ao controle positivo.	49
Figura 9: Teste de sensibilidade do galato de decila em placa de microdiluição empregando <i>Alamar blue</i> e o complexo <i>Paracoccidioides</i> : Linha C e D: Pl01 com valor de CIM de 0,125mg/L; linha E e F, Pb18 com valor de CIM de 0,004 mg/L.	52
Figura 10: Diferenças no desenvolvimento das células fúngicas nos poços dos valores de CIM para o galato de decila em relação a concentrações menores e ao controle positivo empregando o kit LIVE/DEAD. As células vivas estão coradas em verde e as células mortas em vermelho. CIMs: 0,004 mg/L para Pb18 e 0,125 mg/L para Pl01.....	53
Figura 11: Resultados do teste de sensibilidade com os valores de CIM do ácido gálico e 15 galatos contra Pl01 e Pb18 (A) e seleção de sete galatos com os valores menores de CIMs (B). 54	54
Figura 12: Porcentagem de células viáveis das linhagens celulares A549, HepG2, NOK e MRC-5 em relação a três diferentes concentrações de G12, G14 e G15, respectivamente 1-1mg/L, 2-	

0,5mg/L, 3-0,25mg/L, 4-0,125mg/L, 5-0,06mg/L, 6-0,003mg/L, 7-0,0015mg/L, 8-0,008mg/L, 9-0,004mg/L, 10-0,002mg/L, determinado pelo método do MTT (*valores não são significativamente diferentes em relação ao controle H ₂ O ₂).	56
Figura 13: Ensaio de citotoxicidade em células HepG2 empregando o kit LIVE/DEAD contra o galato de decila. As células vivas estão coradas de verde e as células mortas coradas de vermelho.	58
Figura 14: Eletroforese bidimensional de <i>Pl01</i> 1) sem tratamento; 2) tratado com itraconazol .	60
Figura 15: Eletroforese bidimensional de <i>Pl01</i> 3) tratado com galato de decila; 4) tratado com anfotericina B.....	60
Figura 16: Eletroforese bidimensional de <i>Pb18</i> 5) sem tratamento; 6) tratado com itraconazol.	61
Figura 17: Eletroforese bidimensional de <i>Pb18</i> 7) tratado com galato de decila; 8) tratado com anfotericina B.....	61
Figura 18: Expressão relativa dos genes 14-3-3-like, RanGTP, Enolase, GAPDH, MLD, TCL e 14-3-3-like-2 de <i>Pb18</i> e <i>Pl01</i> após tratamento com galato de decila.....	67

RESUMO

Paracoccidioides brasiliensis e *P. lutzii* são fungos dimórficos, agentes etiológicos da paracoccidioidomicose, que é uma micose humana sistêmica geograficamente confinada na América Latina. Vários antifúngicos podem ser utilizados para o tratamento dessa doença, tais como anfotericina B, sulfamídicos e azólicos (itraconazol) e de maneira geral seu uso é prolongado. As limitações frequentes dos antifúngicos e o aumento na incidência das infecções fúngicas sistêmicas têm ressaltado a necessidade da descoberta e do desenvolvimento de novos fármacos. O objetivo deste estudo foi comparar a atividade antifúngica de anfotericina B, itraconazol e galatos de alquila anti-complexo de *Paracoccidioides* por métodos fenotípicos e proteômicos. Para tanto foi padronizado o teste de sensibilidade para selecionar o galato de maior potência, utilizando o documento M27-A2 (2002), modificado pela adição de *Alamar Blue*. Adicionalmente, análises proteômicas foram realizadas antes e após tratamento com o antifúngico selecionado para verificar o perfil das possíveis proteínas-alvo. A atividade antifúngica foi estudada contra isolados de *P. brasiliensis* (S1, S2 e PS3) e *P. lutzii*, (Pb01-like), e depois o teste foi estendido para mais seis isolados. O valor da CIM do ácido gálico variou de 31,25 a 0,250 mg/L para todos os isolados. Os galatos mostraram valores de CIM entre 16 a 0,004 mg/L. O menor valor de CIM foi observado para seis galatos que possuem uma substituição por uma cadeia relativamente longa de carbonos. O perfil proteico dos isolados Pl01 e Pb18 foi estudado por eletroforese 2D após contato com anfotericina B, itraconazol e o galato de decila (todos a uma concentração de 0,125 mg/L. Mais de 130 spots para ambos os fungos foram observados e a maioria destas proteínas se encontram na faixa de pI de 5,1 a 6,0 e massa molecular variada. Estes resultados revelam um importante arsenal de proteínas envolvidas na ação desta substância. A identificação destas proteínas por MALDI- MS/MS foi realizada para o estudo do perfil proteômico dos isolados após tratamento deste potencial agente antifúngico. Proteínas essenciais pertencentes à via metabólica e de virulência do fungo foram encontradas. Estudos mais detalhados com estas proteínas devem ser realizados para melhor compreensão do impacto dessa substância na interação fungo-hospedeiro.

ABSTRACT

Paracoccidioides brasiliensis and *P. lutzii* are dimorphic fungi, etiological agents of paracoccidioidomycosis, which is a systemic human mycosis geographically restricted to Latin America. Various antifungal agents may be used to treat this disease, such as amphotericin B, sulfamidic agents and itraconazole, and these drugs are used in long-term therapies. The limitations of antifungals and increased incidence of systemic fungal infections has underscored the need for discovery and development of new drugs. The objective of this study was to compare the antifungal activity of amphotericin B, itraconazole and alkyl gallates anti-*Paracoccidioides* complex by phenotypic and proteomic methods. Thus, the susceptibility test was applied to select the most potent gallate, using the document M27-A2 (2002), modified by the addition of *Alamar Blue*. Finally, proteomic analyses was developed before and after the treatment with the antifungal agent selected, to study the protein profile after this treatment. The antifungal activity was evaluated against isolates of *P. brasiliensis* (S1, S2 and PS3) and *P. lutzii* (PB01-like), and after, the test has been extended to six isolates. The MIC values of gallic acid varied from 31.25 to 0.250 mg/L for all isolates. The gallates showed MIC values ranging from 16 to 0,004 mg/L. The lowest MIC value was observed for six gallates bearing a substitution for a long side chain. The protein profile of isolates Pb18 and Pl01 was studied by 2D electrophoresis after contact with amphotericin B, itraconazole and decyl gallate, all in the concentration of (0.125 mg/L). More than 130 spots for both species were observed, and the most of these proteins are found in the pI range from 5.1 to 6.0 and different molecular weights. These results demonstrated an important arsenal of proteins, which involved in the action of this substance. The identification of these proteins by MALDI-MS / MS was performed for the proteomic profile of these isolates against the potential antifungal agent. In a preliminary analysis, essential proteins belong to the fungal metabolic pathway and virulence factors of the fungus were found. Further studies with these proteins should be conducted to better understand the impact of this substance in the host-fungus interaction.

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

Genêro *Paracoccidioides*

Paracoccidioides brasiliensis e *P. lutzii* são agentes etiológicos da paracoccidioidomicose (PCM), micose que assume importância cada vez maior, dado o aumento de sua frequência, em razão da gravidade de algumas de suas formas anátomo-clínicas e das taxas de mortalidade (Coutinho, Silva *et al.*, 2002). Ambas as espécies são dimórficos termo-dependentes, assim, a 25-27 °C encontram-se na fase miceliana (M), saprobiótica, com culturas de aspecto cotonoso, esbranquiçado e microscopicamente são observados filamentos hialinos, finos e septados. A fase leveduriforme (L) constitui a forma parasitária do fungo, e em meios enriquecidos e a 35-37 °C, as células encontradas são arredondadas, de parede dupla refringente e com múltiplos brotamentos característicos, com estruturas fúngicas semelhantes às encontradas nos tecidos, formando a denominada “roda-de-leme” (San-Blas, Mariño *et al.*, 1993; Lacaz, 1994).

A via inalatória foi sugerida como a principal via de acesso das formas infectantes do fungo ao pulmão, em que propágulos da fase miceliana (artroconídios e aleuroconídios) são inalados, invadindo vias aéreas terminais (alvéolos e bronquíolos terminais) sofrendo diferenciação celular, transformando-se em formas leveduriformes multinucleadas. (Restrepo, 1985). Como consequência pode-se estabelecer a condição de PCM infecção em que o indivíduo permanece assintomático, ou alternativamente, a PCM doença. O desenvolvimento de doença pode se dar de duas formas: aguda/subaguda ou crônica (Shikanai-Yasuda, Telles Filho *et al.*, 2006).

Estima-se que mais de 10 milhões de pessoas estejam infectadas com o fungo, embora apenas 2 % desse total desenvolvam a forma aguda fatal ou crônica. O perfil majoritário de pacientes manifestando PCM nesses estágios é adulto do sexo masculino, trabalhador de zonas rurais e imunodeprimidos (Coutinho, Silva *et al.*, 2002; Barrozo, Benard *et al.*, 2010; Miranda, Gonçalves *et al.*, 2011; Teles e Martins, 2011). A PCM afeta o sistema monocítico-macrofágico sendo que a forma crônica tem alta frequência de envolvimento pulmonar e/ou mucocutâneo. A forma crônica severa multifocal pode causar também lesões granulomatosas no sistema nervoso central do paciente. Independente do órgão afetado, a doença evolui para a formação de sequelas

com danos permanentes ao indivíduo (Shikanai-Yasuda, Telles Filho *et al.*, 2006; Benard e Mendes Giannini, 2009)

Prado e colaboradores verificaram que a PCM foi a principal causa de morte (52 %) entre pacientes com micoses sistêmicas (3583), como verificado no período de 1996 a 2006 (Prado, Silva *et al.*, 2009). No levantamento realizado pelo grupo de Ribeiro, foi constatada prevalência de 4,6 % de micoses sistêmicas entre 1.300 pacientes portadores de HIV/Aids de Cuiabá, Mato Grosso, no período de 2005-2008, sendo que infecções fúngicas causadas por *P. brasiliensis* representam 3,3 % do total (Ribeiro, Hahn *et al.*, 2009).

A PCM é geograficamente limitada à América Latina, com regiões de maior endemicidade, como o Brasil, Colômbia, Venezuela, seguidas por outras áreas, de menor incidência, como Bolívia, Paraguai, Argentina, Uruguai e regiões da América Central (Shikanai-Yasuda, Telles Filho *et al.*, 2006). Entretanto, outros casos foram relatados fora desta área em geral com períodos longos de latência, representando reativações endógenas de focos infecciosos previamente adquiridos nessas regiões (Manns, Baylis *et al.*, 1996). Pouco se sabe sobre o habitat de *P. brasiliensis*, achados do fungo têm sido relatados em solo, água e plantas de áreas endêmicas, mais recentemente em tatus, mas nenhum desses estudos até o momento pode estabelecer definitivamente seu nicho ecológico (Bagagli, Bosco *et al.*, 2006).

A primeira descrição da PCM foi realizada em São Paulo, em 1908, por Adolpho Lutz, com relatos das características do agente etiológico, previamente denominado *Zymonema brasiliensis* por Splendore em 1912. Almeida (1930), após comparações com *Coccidioides immitis*, caracterizou o fungo como do gênero *Paracoccidioides* e da espécie *P. brasiliensis*, pertencente ao Reino: Fungi; Divisão Eumycota; Ordem: Onygenales; Família: Ajjelomycetaceae.

Neste sentido, estima-se que o gênero *Paracoccidioides* provavelmente surgiu entre 23 e 5 milhões de anos durante o Mioceno. Sua evolução provavelmente ocorreu na América do Sul, alcançando posteriormente a América Central a cerca de cinco milhões de anos atrás, durante o Plioceno, com a ascensão do Istmo do Panamá, unindo as Américas do Sul e Norte. Como ocorreu a chegada do fungo ao Norte ainda não é certo, porém estudos relevam o possível papel dos animais da ordem *Xenarthra*, carreando o fungo do sul para o Norte. Esta relação vem sendo estudada, pois o fungo foi isolado de tatus (principalmente *Dasypus novencintus*) jovens e

adultos, ambos os sexos e sem nenhum sinal visível de PCM. Porém, a presença de granuloma com elementos fúngicos compatíveis com *P. brasiliensis* é ocasionalmente observado em linfonodos, baço e pulmões de alguns animais indicando condição ativa da PCM (Bagagli, Bosco *et al.*, 2006).

Com base em recentes análises filogenéticas, *P. brasiliensis* está classificado na Ordem Onygenales, na Família Ajellomycetaceae, formando um clado monofilético que inclui os gêneros *Blastomyces*, *Emmonsia* e *Histoplasma* (Untereiner, Scott *et al.*, 2004). (Matute, Sepulveda *et al.*, 2006), classificaram este fungo em três diferentes espécies filogenéticas, S1, PS2 e PS3 sendo a espécie S1, um grupo parafilético encontrado no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela, a espécie PS2, um grupo monofilético encontrado no Brasil e Venezuela e a espécie PS3, um grupo monofilético encontrado apenas na Colômbia. (Carrero, Niño-Vega *et al.*, 2008), estudaram 21 isolados de *P. brasiliensis*, incluindo sete novos isolados, com base na comparação de sequências codantes e não codantes de diferentes genes, além das regiões ITS (sequências espaçadoras internas). Estes foram classificados dentro de duas espécies filogenéticas, S1 e PS3, anteriormente descritas por (Matute, Sepulveda *et al.*, 2006), que além de classificar o isolado Pb01 separado dos demais, propuseram a classificação deste como uma nova espécie filogenética.

Em uma análise com 88 isolados, foram identificados 17 como pertencentes ao grupo Pb01 e estimaram que as espécies filogenéticas S1/PS2/PS3 e Pb01 tiveram um ancestral comum a cerca de 32 milhões de anos, e por meio de análises de recombinação sugeriram a existência de isolamento reprodutivo entre estas espécies e por isso propuseram os isolados Pb01 como uma nova espécie, *P. lutzii* (Teixeira, Theodoro *et al.*, 2009). A correta taxonomia molecular deste fungo tem aberto possibilidades novas para o estudo e o entendimento de suas relações eco-epidemiológicas com seus hospedeiros (Bagagli, Bosco *et al.*, 2006; Bagagli, Theodoro *et al.*, 2008).

O desenvolvimento de PCM está associado, principalmente, à virulência do fungo e à resistência do hospedeiro (Kashino, Fazioli *et al.*, 2000; Chiarella, Arruda *et al.*, 2007; Benard, 2008; Loures, Pina *et al.*, 2011). O padrão do granuloma formado em resposta aos diferentes isolados de *P. brasiliensis* em modelos experimentais de infecção exemplifica o fator

relacionado à virulência do patógeno (Singer-Vermes, Burger *et al.*, 1989; Xidieh, Lenzi *et al.*, 1999; González, Gómez *et al.*, 2008; Pina, Bernardino *et al.*, 2008). Já a resistência do hospedeiro à infecção por *P. brasiliensis* está relacionada à formação de um granuloma epitelióide compacto e à capacidade de desenvolver uma resposta imunológica celular efetiva (Franco, 1987; Franco, Peracoli *et al.*, 1993; Borges-Walmsley, Chen *et al.*, 2002; Da Silva, Svidzinski *et al.*, 2009).

Na PCM, os mecanismos envolvidos, desde o primeiro contato com o agente até os estágios subsequentes da doença são pouco conhecidos. No entanto, sabe-se que um amplo espectro de apresentações clínicas pode ocorrer variando desde formas cutâneas e sistêmicas, podendo atingir vários tecidos, com ênfase no pulmão (Franco, Peracoli *et al.*, 1993; Shikanai-Yasuda, Telles Filho *et al.*, 2006). A doença pode afetar diretamente os órgãos e, portanto, *P. brasiliensis* deve ter desenvolvido mecanismos que o capacitam aderir, invadir e extravasar barreiras impostas pelos tecidos do hospedeiro (Mendes-Giannini, Taylor *et al.*, 2000), sintetizando várias substâncias que participam direta ou indiretamente da relação parasito-hospedeiro.

P. brasiliensis é considerado um fungo intracelular facultativo, podendo aderir e invadir células epiteliais *in vivo* e *in vitro* (Mendes-Giannini, Taylor *et al.*, 2000). A capacidade de aderência e invasão do fungo é dependente da virulência do isolado (Hanna, Monteiro Da Silva *et al.*, 2000). A endocitose deste fungo ativa os microfilamentos e microtúbulos, além de induzir apoptose (Mendes-Giannini, Hanna *et al.*, 2004). Embora a invasão de células não fagocíticas seja de extrema importância na patogênese da doença, a descrição de algumas adesinas, o conhecimento de genes e moléculas relacionados à adesão e invasão durante o processo infeccioso ainda é restrito.

Os possíveis mecanismos responsáveis por determinar a patogenicidade e virulência de *P. brasiliensis* vêm sendo investigados extensivamente por meio de experimentos de interação *ex-vivo* deste patógeno com células em cultura (Flavia Popi, Lopes *et al.*, 2002; De Mattos Grosso, De Almeida *et al.*, 2003; Andreotti, Monteiro Da Silva *et al.*, 2005; Barbosa, Báó *et al.*, 2006; Mendes-Giannini, Andreotti *et al.*, 2006; Fernandes, Paes *et al.*, 2008; García Blanco, Muñoz *et al.*, 2011; Silva, Napimoga *et al.*, 2011) e de experimentos que utilizam ferramentas moleculares

de *high throughput* tais como microarranjos de cDNA, inserção e/ou deleção gênica, interferência de RNA, entre outros (Felipe, Andrade *et al.*, 2003; Goldman, Dos Reis Marques *et al.*, 2003; Hwang, Hocking-Murray *et al.*, 2003; Idnurm, Reedy *et al.*, 2004; Nittler, Hocking-Murray *et al.*, 2005; Bailão, Schrank *et al.*, 2006; Marion, Rappleye *et al.*, 2006; Rappleye e Goldman, 2006; Tavares, Silva *et al.*, 2007).

Estudos caracterizaram componentes da matriz extracelular envolvidos na interação de *P. brasiliensis* com o hospedeiro. A MEC consiste de uma rede tridimensional de proteínas como colágeno, glicoproteínas não-colagênicas, principalmente fibronectina e laminina, e proteoglicanas que parece refletir à capacidade proliferativa do fungo (Mendes-Giannini, Taylor *et al.*, 2000). Em geral, os genes envolvidos em adesão não são constitutivamente expressos, mas sim ativados quando influenciados no sítio de infecção no hospedeiro (Cheng, Clancy *et al.*, 2005; Verstrepen e Fink, 2009). O entendimento e identificação de moléculas envolvidas na adesão de microrganismos aos diferentes substratos no hospedeiro são importantes como novos alvos para tratamentos mais eficientes em micoses sistêmicas.

Algumas moléculas de *P. brasiliensis* já foram identificadas como ligantes de componentes da matriz extracelular. A gp43 foi a primeira a ser identificada como ligante de laminina (Vicentini, Gesztesi *et al.*, 1994; Hanna, Monteiro Da Silva *et al.*, 2000; André, Lopes *et al.*, 2004). A glicoproteína de 43 kDa tem papel na aderência, fato este também confirmado pelo uso de soro anti-gp 43 que inibiu o processo de adesão em 85% (Hanna, Monteiro Da Silva *et al.*, 2000). Estudos adicionais mostraram que em ensaios de afinidade de ligação, a gp43 foi capaz de se ligar tanto a fibronectina quanto a laminina. Em *P. brasiliensis*, algumas outras adesinas foram também descritas, e acredita-se que tenham papel importante em sua patogênese (Andreotti, Monteiro Da Silva *et al.*, 2005; González, Gómez *et al.*, 2005; Barbosa, Bão *et al.*, 2006; Mendes-Giannini, Andreotti *et al.*, 2006; Pereira, Bão *et al.*, 2007; Da Silva Neto, De Fátima Da Silva *et al.*, 2009; Donofrio, Calil *et al.*, 2009; Hernandez, Garcia *et al.*, 2011; Rezende, Borges *et al.*, 2011). Uma adesina de 30 kDa de *P. brasiliensis*, com capacidade de ligação a laminina foi isolada sendo mais expressa num isolado de *P. brasiliensis* que apresentava alta capacidade de adesão (Andreotti, Monteiro Da Silva *et al.*, 2005). *P. brasiliensis* também apresentou em sua superfície celular, duas proteínas com massas moleculares de 19 e 32 kDa que interagem com diferentes proteínas da MEC, tais como

laminina, fibrinogênio e fibronectina. Ensaios utilizando conídios de *P. brasiliensis*, pré-incubados com anticorpo monoclonal anti-32 kDa inibiram, de modo concentração-dependente, a aderência do fungo as proteínas da MEC (González, Gómez *et al.*, 2005; Hernandez, Garcia *et al.*, 2011). Recentemente, análises da sequência desta proteína a caracterizaram como uma hidrolase, e isolados nocautes para esta apresentaram alterações na morfologia das células leveduriformes e redução da capacidade de aderência às células epiteliais humanas *in vitro* e diminuição da virulência em modelos de infecção em camundongos (Hernández, Almeida *et al.*, 2010; Hernández, Almeida *et al.*, 2011).

Outros compostos de *P. brasiliensis* também foram estudados quanto a sua capacidade de produzir resposta imunológica em hospedeiros, entre estas proteínas foram descritas as de 57, 48 e 45 kDa (Casotto, 1990; Ferreira-Da-Cruz, Galvão-Castro *et al.*, 1992), uma proteína recombinante de 27 kDa (Ortiz, Garcia *et al.*, 1996; García Blanco, Muñoz *et al.*, 2011) e um antígeno circulante de 87 kDa (Gómez, Figueroa *et al.*, 1998) que revelou homologia com proteínas de choque térmico (Hsp) de vários organismos (Díez, Gómez *et al.*, 2002). Seis componentes proteicos sintetizados preferencialmente na fase leveduriforme de *P. brasiliensis* foram identificados, sendo altamente homólogos à catalase, frutose-1,6-bifosfato, aldolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, malato desidrogenase e triose fosfato isomerase de várias origens (Da Fonseca, Jesuino *et al.*, 2001; Carneiro, De Faria *et al.*, 2005; Barbosa, Bão *et al.*, 2006; Pereira, Bão *et al.*, 2007; Da Silva Neto, De Fátima Da Silva *et al.*, 2009). Outra proteína caracterizada foi a Hsp60 de *P. brasiliensis* e sua proteína recombinante foi reconhecida por soros de pacientes com paracoccidioidomicose (Izacc, Gomez *et al.*, 2001; Cunha, Zancopé-Oliveira *et al.*, 2002). Mais recentemente em *P. lutzii* foi identificado e caracterizado o fator de choque térmico (Paes, Mello-De-Sousa *et al.*, 2011). Costa e colaboradores estudaram as proteínas de 39 e 78 kDa presentes na fase leveduriforme de *P. brasiliensis* em que o sequenciamento de aminoácidos revelou identidade à manosil e glicosiltransferase de várias origens (Costa, Gómez *et al.*, 2002).

Além dessas adesinas, também foram caracterizadas enzimas de *P. brasiliensis* que interagem com moléculas do hospedeiro, sendo consideradas então adesinas-like, como a glicose-6-fosfato desidrogenase ligantes de laminina, fibronectina e colágeno tipo I (Barbosa, Bão *et al.*, 2006), triose fosfato isomerase que também se liga aos componentes da matriz, como

laminina e fibronectina (Pereira, Bão *et al.*, 2007) e isocitrato liase ligantes de laminina, fibronectina e colágeno tipo I e que tem a fosforilação como principal mecanismo de regulação (Zambuzzi-Carvalho, Cruz *et al.*, 2009; Cruz, Brock *et al.*, 2011). Posteriormente, foi isolada e caracterizada uma proteína de 70 kDa, denominada paracoccina, capaz de se ligar a *N*-acetilglucosamina (Coltri, Casabona-Fortunato *et al.*, 2006; Ganiko, Puccia *et al.*, 2007; Dos Reis Almeida, De Oliveira *et al.*, 2010) e também foi demonstrado que glicosfingolipídeos estariam envolvidos no processo adesivo de *P. brasiliensis* (Ywazaki, Maza *et al.*, 2011). Ainda a malato sintetase de *P. brasiliensis* que atua no ciclo do glioxalato e na via da alantoína, está localizada no citoplasma, além da superfície, principalmente de células em brotamento, sendo secretada e atuando como adesina, o que indica seu papel multifuncional (Da Silva Neto, De Fátima Da Silva *et al.*, 2009; Zambuzzi-Carvalho, Cruz *et al.*, 2009).

O grupo de Da Silva Castro, descreveram outra molécula presente na superfície do fungo que apresenta capacidade de aderir às proteínas da MEC, denominada *PbDfg5p*. Esta proteína foi caracterizada como pertencente à família das glicosil hidrolases e estaria relacionada com a formação e manutenção da parede celular de fungos. Em *P. brasiliensis*, utilizando microscopia eletrônica e a técnica de *imunogold*, foi evidenciada sua presença na parede celular, bem como em extratos protéicos de parede celular, obtidos a partir do tratamento de leveduras com β -1,3 endoglucanase. A *PbDfg5p* recombinante apresentou capacidade de se ligar a laminina, fibronectina, colágeno tipo I e tipo IV, além de apresentar um motivo RGD (Arg-Gly-Asp, motivo de ligação encontrado na fibronectina) em sua sequência predita, característica comum de algumas adesinas (Da Silva Castro, Barbosa *et al.*, 2008).

Em nosso laboratório, a adesina de 30 kDa foi caracterizada por meio de sequenciamento de aminoácidos, mostrando que esta é uma proteína pertencente à família 14-3-3 de *P. brasiliensis* (Andreotti, Monteiro Da Silva *et al.*, 2005). Essa proteína 14-3-3 pode interagir com mais de 200 outras proteínas, apresentando inúmeras funções. Contudo, apesar de já observada à função dessas proteínas em apoptose, transdução de sinal, regulação do ciclo celular e transcrição, seu exato papel nesses processos permanece desconhecido (Fu, Subramanian *et al.*, 2000). Esse grupo de proteínas deve funcionar como acessórias em vários processos, atuar como determinantes específicos que alteram a localização celular de outras proteínas, com as quais interagem e devem estar envolvidas na regulação direta de sua atividade enzimática (Van

Hemert, Steensma *et al.*, 2001). As proteínas 14-3-3 também participam da regulação e organização do citoesqueleto celular por meio da ativação de RhoGTPases (Jin, Smith *et al.*, 2004), como mediadora nas mudanças do citoesqueleto celular via integrinas (Bialkowska, Zaffran *et al.*, 2003). Estudos utilizando queratinócitos demonstraram que proteínas 14-3-3 são capazes de interagir com integrinas e modularem sua capacidade de sinalização do lado extracelular (Santoro, Gaudino *et al.*, 2003; Wilker e Yaffe, 2004; Oh, Jang *et al.*, 2009). Além disso, sugeriram que esta interação induz desarranjos de hemidesmossomos na formação de contato focal, necessário para migração das células. Estes achados sugerem que as proteínas 14-3-3 participam da sinalização mediada por integrinas, tanto intracelular como extracelularmente (Santoro, Gaudino *et al.*, 2003; Wilker e Yaffe, 2004; Oh, Jang *et al.*, 2009).

Fármacos antifúngicos e testes de sensibilidade

A terapêutica empregada em PCM inclui antibióticos (origem microbiana) e quimioterápicos (origem sintética). Anfotericina B é ainda o primeiro fármaco de escolha para essa e outras micoses endêmicas que trazem risco de morte, independentemente do estado imunológico do paciente. No entanto, a sua alta toxicidade dificulta a terapia nessas infecções severas. Embora o itraconazol e cetoconazol sejam eficazes para micoses classificadas como leves ou moderadas (Lorthlary, Denning *et al.*, 1999), uma terapia de longa duração e às vezes uma profilaxia secundária ao longo da vida são necessários especialmente em pacientes com AIDS com altos índices de recaída. Portanto, um fármaco com eficácia superior, que também tem um melhor perfil de segurança do que os fármacos disponíveis atualmente contribuiriam significativamente para um melhor tratamento das infecções causadas, por exemplo, por *P. brasiliensis* (Nakai, Uno *et al.*, 2003).

Nos últimos anos, novos agentes antifúngicos tornaram-se disponíveis, resultando em uma mudança no padrão de cuidado para muitas destas infecções. No entanto, ainda existem algumas limitações dos atuais agentes antifúngicos, além do rápido surgimento de resistência medicamentosa e de que a letalidade causada por alguns fungos, como *P. brasiliensis*, por ser considerada progressiva, puseram em evidência a necessidade da utilização de novas estratégias

terapêuticas e preventivas, além da descoberta de novos agentes antifúngicos, de preferência com novos mecanismos de ação (Babu, Li *et al.*, 2006; Perlroth, Choi *et al.*, 2007).

Por outro lado, para evidenciar-se a presença de cepas resistentes e a descoberta de novos fármacos é necessário ter-se testes padronizados (Cuenca-Estrella e Rodriguez-Tudela, 2010).

Os testes de sensibilidade a antifúngicos passaram por longo e complexo processo de padronização no final do século passado. O instituto norte americano *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI), até 2005, denominado NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*), contribuiu de modo significativo para a normatização de técnicas de referência. Métodos para avaliação da sensibilidade das principais leveduras e fungos filamentosos de interesse médico foram publicados e são continuamente aperfeiçoados (Pfaller, 2012).

Os métodos de referência vêm sendo recomendados para avaliação de atividade de anfotericina B, 5-fluorocitosina, cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, ravuconazol e equinocandinas. Testes com os fungos dimórficos, agentes de micoses endêmicas, não foram recomendados nesses documentos (Mendes-Giannini, Melhem *et al.*, 2012).

Testes de sensibilidade com agentes antifúngicos, no entanto, são fortemente influenciados por uma variedade de fatores, incluindo o tamanho do inóculo, características físico-químicas do agente antifúngico testado, meio utilizado para a análise, temperatura e tempo de incubação. Além disso, uma das principais fontes de variação especialmente para azóis é o fenômeno parcial de inibição do desenvolvimento do fungo, ou *trailing*, que dificulta a determinação do ponto final de leitura da CIM (BARCHIESI *et al.*, 1994).

Foi desenvolvido um método alternativo para determinação da concentração inibitória mínima, que consiste em um teste rápido e quantitativo utilizando o *Alamar Blue* para a detecção do perfil de sensibilidade de micobactérias a diferentes drogas (Yajko, Madej *et al.*, 1995). O *Alamar Blue* cujo princípio ativo é a resazurina (O'Brien, Wilson *et al.*, 2000) é um composto capaz de indicar, através de redox, o crescimento microbiano sendo atualmente muito empregado para determinar o perfil de sensibilidade de micobactérias. Pela preconização da técnica do *Alamar Blue* com microdiluição em placa (*Microplate Alamar Blue Assay* – MABA), e através

da comparação desta técnica frente às outras demonstrou que o MABA, por ser uma técnica rápida, sensível, não radiométrica e ter baixo custo econômico, é de grande utilidade para se determinar a CIM, principalmente quando se investiga um grande número de substâncias e em microrganismos de crescimento lento (Collins e Franzblau, 1997).

O desenvolvimento de um agente antifúngico é um desafio porque os possíveis alvos podem ser compartilhados pelo fungo e a espécie humana, desde que ambos são eucariotos. O antifúngico ideal deve ter um amplo espectro de atividade, ter ação fungicida ao invés de fungistática, estar disponível para administração oral e parenteral, causar poucas interações medicamentosas, ser seguro em doses eficazes, ter baixo custo-efetivo e ser estável à resistência microbiana.

Bioprospecção

Pesquisas que envolvem a bioprospecção podem-se basear em informações etnofarmacológicas e quimiosistemáticas assim como nas tendências atuais da pesquisa de fármacos de origem natural. Estas são as alternativas viáveis, para a bioprospecção, de melhor relação custo-benefício para a descoberta de *hits*, substâncias bioativas que sirvam de protótipos para o desenvolvimento de fármacos novos, especialmente pela diversidade de estruturas químicas, muitas vezes inéditas, que a pesquisa em produtos naturais vem fornecendo (Kato, 2001). Com isso, a biodiversidade brasileira reveste-se de uma importância estratégica ímpar, principalmente para atividade de bioprospecção, que vem a ser exploração da diversidade biológica por aqueles recursos considerados de valor comercial e que, eventualmente, pode fazer uso do conhecimento de comunidades indígenas ou tradicionais (Assad, 2003).

Há dados na literatura de bioprospecção, como os de (Johann, Cisalpino *et al.*, 2010), que estudaram a fração hexânica de um extrato hidroalcoólico de *Piper regnelli* e *Baccharis dracunculifolia* consideradas ativas contra *P. brasiliensis*, com valores de CIM de 7,8 mg/L e 7,8-30 mg/L, respectivamente. Em outro estudo, (Johann, Sá *et al.*, 2010), apresentaram estas frações subdivididas em outras quatro substâncias, e um deles, o esquinol apresentou CIM de 7,5 a 125 mg/L para todos os isolados de *P. brasiliensis* estudados.

Adicionalmente, por meio de nossa inserção no Projeto Temático – BIOTA/FAPESP (Bioprospecta), intitulado “*Conservation and sustainable use of the plant biodiversity from Cerrado and Atlantic Forest: chemical diversity and prospecting for potencial drugs*”, desenvolvido juntamente ao Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) do Instituto de Química – UNESP, tem-se estudado várias espécies vegetais, baseado em bioensaios prévios de prospecção de extratos, frações, substâncias com atividade antifúngica, por meio de metodologias aprovadas pelo CLSI (Scorzoni, Benaducci *et al.*, 2007).

Neste contexto, é possível por meio de métodos normatizados ampliar o arsenal antifúngico já existente com novos produtos, sendo estes provenientes da extração de componentes da biodiversidade brasileira ou da síntese dos mesmos em laboratório a fim de melhorar as características farmacológicas e/ou dos antifúngicos já existentes com a associação de ambos.

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, antiinflamatório, anti-reumático e no tratamento de hanseníase e de outras doenças cutâneas (Conegero, *et al.*, 2003).

A espécie *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae), é uma árvore de 10-20 metros com caules tortuosos, sendo popularmente conhecida como “tapiá” “tanheiro de folha-redonda”, “tanheiro”, “canela-raposa” ou “amor-seco”, sendo encontrada nas regiões sul e sudoeste do Brasil, e principalmente na Mata Atlântica (Pinto, 2002). Estudos químicos da espécie *A. glandulosa*, revelaram a presença de 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 antiinflamatório, antioxidante, antimutagênico, anticarcinogênico, antibacteriana, antiviral, analgésica. Como antioxidante o ácido gálico (Calvo, Lima *et al.*, 2007; Treviño-Cueto, Luis *et al.*, 2007; Lopes, Rocha *et al.*, 2011) poderia atuar como agente antiapoptótico e proteger as células humanas contra danos oxidativos.

Devido à sua variada aplicação comercial, o ácido gálico é uma substância de interesse para as indústrias farmacêuticas e químicas. Ácido gálico (ácido 3,4,5-triidroxibenzóico) pode ser produzido pela hidrólise ácida de taninos, porém este possui como desvantagens, o custo, a produção e a baixa pureza morais (Morais, Luqman *et al.*, 2010; Ximenes, Lopes *et al.*, 2010; Lopes, Rocha *et al.*, 2011).

O ácido gálico é uma substância que ocorre em muitas plantas, como raízes de *Paeonia rockii* (Picerno, Mencherini *et al.*, 2011), espécies de *Astronium* (Da Silva, Napolitano *et al.*, 2011), frutos de *Syzygium cumini* (Tobal, Da Silva *et al.*, 2012), *Euphorbia lunulata* (Yang, Jia *et al.*, 2011), folhas, caules e raízes de variedades diferentes de *Labisa pumila* Benth (Karimi, Jaafar *et al.*, 2011), *Zingiber officinale* Roscoe (Ghasemzadeh, Jaafar *et al.*, 2010), casca de *Klainedoxa gabonensis* (Wansi, Chiozem *et al.*, 2010), e de *Nervilia aragoana* e folhas de *Atlantia monophylla* (Reddy, Sharma *et al.*, 2010), *Lawsonia inermis* (Sultana, Choudhary *et al.*, 2009), *Ardisia chinensis* (Li, Su *et al.*, 2006) e *Alchornea glandulosa* (Calvo, Lima *et al.*, 2007). 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, Regerat *et al.*, 1987; Inoue, Suzuki *et al.*, 1995; Pinto, Leite *et al.*, 2001; Pinto, 2002).

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

Em 2001, (Kubo, Xiao *et al.*, 2001) verificaram que os galatos de propila, octila e dodecila foram selecionados por serem normalmente permitidos para uso como aditivos antioxidantes em produtos alimentícios e cosméticos. A atividade antifúngica foi primeiramente testada contra 16 microrganismos. No geral, bactérias Gram-positivas e os fungos foram sensíveis, enquanto que as bactérias Gram-negativas foram mais resistentes aos galatos. Entre os

três galatos testados, o galato de octila exibiu atividade antifúngica contra *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Candida albicans*, e *Aspergillus niger*. Neste estudo, foi concluído que a atividade fungicida do galato de octila vem da capacidade de atuar como um agente surfactante não iônico, e que o comprimento da cadeia alquila não é a única contribuinte para a atividade antifúngica, mas possui um importante papel nessa atividade.

Da mesma forma, em estudos mais recentes, apresentaram resultados da atividade antifúngica de uma série completa de 15 galatos atuando contra um painel representativo de fungos patogênicos oportunistas, os quais foram estudados no intuito de analisar: o quão importante é considerar o microrganismo testado, a importância das hidroxilas fenólicas, a influência do comprimento da cadeia alifática e a hidrofobicidade destas substâncias (Leal, Mascarello *et al.*, 2009).

Mecanismos de ação antifúngica versus patogenicidade fúngica

Os fungos causadores de micoses sistêmicas utilizam mecanismos de patogenicidade, como capacidade de adesão, colonização, disseminação, sobrevivência em ambientes hostis e escape dos mecanismos de resposta imune, para se estabelecer no hospedeiro e causar doença (Franco, 1987; Kurokawa, Sugizaki *et al.*, 1998; Van De Wouw e Howlett, 2011). Para isso, esses fungos utilizam uma variedade de moléculas de superfície para se ligar a matriz extracelular da célula hospedeira e estabelecer o processo infeccioso (Lengeler, Davidson *et al.*, 2000). Os mecanismos moleculares envolvidos desde o primeiro contato com o agente infeccioso até os estágios subsequentes da doença ainda são pouco conhecidos. Um passo necessário na colonização e, em última instância, no desenvolvimento de doenças por patógenos, está associado à sua habilidade de aderir às superfícies do hospedeiro. A capacidade de aderência é um fenômeno biológico vastamente distribuído, compartilhado por diversos organismos capacitando-os na colonização de seus respectivos habitats. Uma colonização bem sucedida geralmente é um evento complexo e deve envolver proteínas da superfície do fungo e receptores celulares (Sohn, Senyürek *et al.*, 2006; Bhavsar, Auweter *et al.*, 2010). Dessa forma, o desenvolvimento da PCM depende de interações entre o fungo e componentes celulares do hospedeiro.

As proteínas são os principais alvos da descoberta de fármacos. Por meio de técnicas proteômicas é possível identificar a mudança de expressão de um determinado sistema em estado patológico ou quando exposto a uma substância, sendo útil para estudar os alvos e os mecanismos de ação das substâncias (Walgren e Thompson, 2004). Assim as investigações proteômicas podem incluir a identificação de biomarcadores na pesquisa clínica, análise da interação entre as proteínas, modificações pós-traducionais, além da identificação de alvos no estudo de mecanismos de novos fármacos (Westermeyer e Marouga, 2005), como os estudos relatados na literatura em que se utilizaram das ferramentas da técnica de proteômica para avaliar as propriedades antioxidantes do extrato de Alperujo (Rodríguez-Gutiérrez, Duthie *et al.*, 2012).

Em nosso laboratório foi utilizada a análise proteômica para a investigação da ação de substâncias de origem natural com atividade antifúngica, para o qual extratos brutos AcOEt e EtOH derivados de *Kielmeyera rubriflora*, além de fluconazol, contra a levedura *Candida albicans* e *C. krusei* foram submetidos a análise proteica por eletroforese bidimensional. Nas duas leveduras foram observadas várias alterações na expressão de proteínas. Em *C. albicans* tratada com fluconazol foram observadas nove alterações na expressão de proteínas e em *C. krusei* 11 modificações, já com ambos os extratos verificou-se aumento ou diminuição de 66 proteínas. Por outro lado, 44 proteínas não foram expressas após o tratamento. Aparentemente, ambos os extratos foram mais eficientes para inibição da expressão protéica de *C. krusei*, sugerindo a existência de alvos específicos (SCORZONI, 2008).

Em outro trabalho envolvendo a técnica da proteômica no estudo da atividade antifúngica de substâncias avaliaram o crescimento de *P. brasiliensis* na presença de oenotoína B, isolado de *Eugenia uniflora*. À 500µg/mL essa substância foi eficaz com inibição de 74 % *in vitro*. As células fúngicas foram observadas por microscopia eletrônica, e alterações celulares caracterizaram inibição da síntese de glucana, incluindo esmagamento, superfície áspera, ruptura da parede celular e membrana celular. Por meio da análise gênica, foi observado que esta substância inibiu a transcrição do gene 1,2,3,-beta-glucanosintase, o qual esta envolvido na síntese de parede celular (Santos, Ferri *et al.*, 2007).

Os fungos e os seres humanos possuem algumas vias metabólicas homólogas, o que consequentemente dificulta o desenvolvimento de antifúngicos. A partir desse ponto, se destaca a

importância no estudo e identificação de novos e seletivos alvos moleculares para o desenvolvimento de novos antifúngicos com o objetivo de minimizar a toxicidade relacionada a essa homologia e de expandir talvez o espectro de ação antifúngica. Atualmente a biotecnologia auxilia essa pesquisa fornecendo inúmeras ferramentas de análise fenotípica e genotípica, contribuindo para estudos direcionados, como o proposto nesse estudo, no qual substâncias com potencial atividade antifúngica propiciaram um vasto estudo dos alvos moleculares afetados no fungo patogênico *Paracoccidioides* spp.

2. OBJETIVOS

Assim, o objetivo deste estudo foi comparar a atividade antifúngica de anfotericina B, itraconazol e galatos de alquila anti-complexo de *Paracoccidioides* por métodos fenotípicos e proteômicos. Para tanto foi padronizado o teste de sensibilidade para selecionar o galato de maior potência, utilizando o documento M27-A2 (2002), modificado pela adição de *Alamar Blue*. Adicionalmente, análises proteômicas foram realizadas antes e após tratamento com o antifúngico selecionado para verificar o perfil das possíveis proteínas-alvo.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver e padronizar o teste de sensibilidade (microdiluição e macrodiluição) de acordo com o documento M27-A2, CLSI 2002 modificado pela adição do reagente *Alamar blue* para o gênero *Paracoccidioides* sp;

Comparar a atividade antifúngica de anfotericina B e itraconazol com os galatos de alquila;

Avaliar a citotoxicidade dos galatos por ensaio de MTT e de viabilidade celular com o kit LIVE/DEAD®;

Realizar análises proteômicas antes e após tratamento com antifúngicos selecionados para a identificação e entendimento do papel de proteínas-alvos, avaliando mecanismos de interação fármaco-fungo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Isolados e condições de cultivo

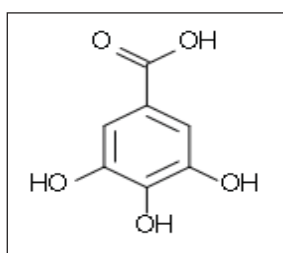
Inicialmente, dois isolados de *Paracoccidioides* foram empregados para a padronização dos testes de microdiluição e em macrodiluição: a espécie filogenética *Paracoccidioides brasiliensis* S1, isolado 18 (Pb18-PCM crônica/São Paulo), na fase leveduriforme, procedente da micoteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP) e *P. lutzii*, Pb01-like – cepa ATCC MYA-826 (Pl01-PCM aguda – pulmão/Goiânia) (procedente da Universidade Federal de Goiás), ambas advindas de casos de paracoccidioidomicose. Posteriormente, o teste de microdiluição foi desenvolvido com as espécies filogenéticas *Paracoccidioides brasiliensis* S1 (D03, 339-PCM crônica/São Paulo), S2 (02 – PCM crônica/Venezuela) e PS3 (Epm83-isolamento humano/Colômbia) e *P. lutzii* Pb01-like (EE, 8334MMT) (cedidos pelo Professor Eduardo Bagagli da Universidade Estadual Paulista – UNESP/Botucatu). Durante a realização deste trabalho, todos isolados utilizados foram mantidos em meio de Fava-Netto (Fava Netto, 1961) em estufa a 37 °C e repicados a cada 3 ou 4 dias. Após 10 repiques, o isolado foi passado em monocamada de células A549 e reisolado em meio de Fava-Netto, para a recuperação da virulência.

3.2. Cultura celular

Para a avaliação da citotoxicidade das substâncias, foram preparadas diferentes placas de 96 poços com $2,5 \times 10^3$ a 5×10^4 células por poço de, queratinócitos normais orais humanos NOK (obtidas do Dr. Karl Hunger do Departamento de Medicina de Harvard Medical School, MA, USA. cultivados em meio KSFM-Gibco), células epiteliais respiratórias - pneumócitos tipo I A549 (cultivadas em meio HAM F-12, suplementado com 10% de soro fetal bovino), células hepáticas transformadas HepG2 e célula de fibroblasto normal de pulmão MRC-5 (ambas cultivadas em meio Demen), células obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro – CR039). As placas foram incubadas a 36,5 °C com 5 % de CO₂, por 24 horas para a formação da monocamada celular (Husøy, Syversen *et al.*, 1993).

3.3. Substâncias antifúngicas

O ácido gálico e os galatos de alquila foram obtidos por meio de nossa colaboração no projeto Biota-FAPESP, Bioprospecta-FAPESP, e SisBiota do Instituto de Química da UNESP–Araraquara, pelos professores Vanderlan da Silva Bolzani, Dulce Helena Siqueira Silva, Luis Octávio Regasini e o doutorando Maicon Segalla Petrônio.



	R
ácido gálico	H
metila	CH ₃
etila	CH ₂ CH ₃
<i>n</i> -propila	(CH ₂) ₂ CH ₃
<i>i</i> -propila	CH(CH ₃) ₂
<i>n</i> -butila	(CH ₂) ₃ CH ₃
<i>i</i> -butila	CH ₂ CH(CH ₃) ₂
<i>n</i> -pentila	(CH ₂) ₄ CH ₃
<i>n</i> -hexila	(CH ₂) ₅ CH ₃
<i>n</i> -heptila	(CH ₂) ₆ CH ₃
<i>n</i> -octila	(CH ₂) ₇ CH ₃
<i>n</i> -decila	(CH ₂) ₉ CH ₃
<i>n</i> -undecila	(CH ₂) ₁₀ CH ₃
<i>n</i> -dodecila	(CH ₂) ₁₁ CH ₃
<i>n</i> -tetradecila	(CH ₂) ₁₃ CH ₃
ácido 3,4,5-triacetoxibenzóico	-

Figura 1: Estrutura molecular do ácido gálico e galatos de alquila

3.4. Teste de sensibilidade antifúngica

3.4.1. Padronização do inóculo

Dada à circunstância de que o gênero *Paracoccidioides* não conta na lista dos fungos padronizados do documento M27-A2, fez-se a necessidade da padronização do teste de acordo com a metodologia descrita a seguir.

Inicialmente, *P. brasiliensis* e *P. lutzii* foram cultivados de 4 a 6 dias, a 37 °C, em meio de Fava-Netto sólido. Foi adicionado ao tubo com cultura um volume de 3-4 mL de tampão fosfato, pH 7,2 (PBS) estéril. As colônias foram desprendidas do meio com auxílio de uma alça ou de um pipetador automático com uma pipeta de 5 mL estéril descartável, tomando o cuidado para que não houvesse o desprendimento do meio de cultura. A suspensão de células foi transferida para um tubo estéril com auxílio de um pipetador. Esta suspensão foi deixada

decantar por 5 minutos para que as células maiores e/ou aglomerados celulares depositassem no fundo. O sobrenadante foi transferido para outro tubo estéril e verificada a concentração de células por meio de leitura em hemocitômetro. A leitura da concentração das células presentes na suspensão foi feita em um dos quadrados dos 16 de um quadrante. Nesta leitura foi comum encontrar-se concentração de células entre 10^6 - 10^7 cel/mL (Nakai, Uno *et al.*, 2003). Foi definida também a porcentagem de células vivas e mortas utilizando o corante azul de Tripan.

3.4.2. Teste de sensibilidade

Os testes de sensibilidade, microdiluição e macrodiluição, foram realizados de acordo com o documento M27-A2 padronizado pelo CLSI 2002. Os fármacos antifúngicos itraconazol e anfotericina B foram devidamente preparados, levando a uma concentração final na placa após adição do inóculo, de 1 a 0,002 mg/L no teste de microdiluição para ambos e 0,8 a 0,0015 mg/L para anfotericina B no teste de macrodiluição. O meio RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) foi utilizado com L-glutamina sem bicarbonato de sódio, tamponado com MOPS 0,165 M, pH 7,0, e adicionalmente foi suplementado com 2 % de glicose (RPMI-1640 2 %) de acordo com (Takahagi-Nakaira, Sugizaki *et al.*, 2009).

Com o intuito de avaliar-se o efeito do solvente das substâncias antifúngicas não interferisse na atividade antifúngica dos mesmos, foi feito controle em que se colocou 200 μ L do solvente DMSO nos poços das colunas 2 e linhas B, C e D (triplicata), nos poços subsequentes foram colocados 100 μ L de RPMI-1640 2 %. Em seguida, foram repassados 100 μ L do poço 2 para o 3 e assim consequentemente, obtendo-se uma diluição do DMSO de 50 % a 0,098 %.

3.4.3. Teste de Microdiluição

A partir da suspensão de 10^6 - 10^7 cel/mL, foi feita uma diluição 1:50 em PBS estéril, fazendo o ajuste para a porcentagem de células vivas encontradas. A partir desta foi feita uma diluição 1:20 em RPMI-1640 2% do volume total, que seria utilizado no experimento. O inóculo e as concentrações dos antifúngicos foram diluídos a 1:1, chegando-se à concentração final desejada de inóculo de 5×10^2 - $2,5 \times 10^3$ cel/mL.

3.4.4. Teste de Macrodiluição

A partir da suspensão de 10^6 - 10^7 cel/mL foi feita uma diluição 1:100 em PBS estéril, fazendo o ajuste para a porcentagem de células vivas encontradas. A partir desta foi feita uma diluição de 1:20 em RPMI-1640 2% do volume total que seria utilizado no experimento, resultando em concentração de $5,0 \times 10^2$ - $2,5 \times 10^3$ cel/mL. O inóculo e as concentrações dos antifúngicos foram diluídos a 1:10.

3.4.5. Avaliação da atividade antifúngica

Todos os testes de sensibilidade foram realizados em triplicata. Na microdiluição, o controle do crescimento (controle positivo) foi realizado com 100 μ L de meio RPMI-1640 2% e 100 μ L do inóculo, e o controle negativo do teste apenas com 200 μ L do meio RPMI-1640 2 %, em placas de 96 poços e para a macrodiluição o controle do crescimento (controle positivo) foi realizado com 100 μ L meio RPMI-1640 2 % e 900 μ L do inóculo, e o controle negativo do teste apenas com 1000 μ L do meio RPMI-1640 2 %.

Foi utilizado 100 μ L de cada diluição dos fármacos antifúngicos, sendo adicionado mais 100 μ L de inóculo no caso na microdiluição, e na macrodiluição mais 900 μ L. Foi incubado a 37 °C, em um período total de 72 horas (Takahagi-Nakaira, Sugizaki *et al.*, 2009), com agitação a 150 rpm.

3.4.6. Teste de sensibilidade com adição do reagente *Alamar blue* ® (MABA)

Para a leitura das placas foi empregado o reagente *Alamar blue* ®. Esta técnica é aplicada ao teste no período de incubação. Assim, depois de 48 horas de incubação foi adicionado 20 μ L/poço do reagente *Alamar blue* ® 10X (Invitrogen), o qual não interfere na viabilidade da célula fúngica. Assim, a placa foi incubada por mais 24 horas, completando 72 horas. As leituras das placas foram feitas da maior para a menor concentração, determinando a menor concentração do agente antifúngico que inibe substancialmente o crescimento do organismo visualmente detectado quando não houvesse mudança na cor azul original do reagente *Alamar blue* ®, sendo sempre comparado com o do controle de crescimento, denominado então CIM (concentração inibitória mínima).

De acordo com as especificações do fabricante, quando as células estão vivas elas mantêm um ambiente redutor dentro do citosol da célula. Resazurina, o ingrediente ativo do reagente *Alamar blue*®, é uma substância permeável, de cor azul e virtualmente não-fluorescente. Após entrar nas células, a resazurina é reduzida para resorufina, um composto de cor vermelha e altamente fluorescente. As células viáveis continuamente convertem resazurina a resorufina.

3.5. *Análise morfológica do fungo frente aos antifúngicos*

A placa de sensibilidade foi montada de acordo com o teste de sensibilidade em microdiluição como descrito acima, assim depois de 72 horas de incubação, a placa foi analisada no equipamento *In Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare)*, para a observação preliminar das alterações morfológicas dos isolados em contato com os antifúngicos.

3.6. *Teste de sensibilidade com o ácido gálico e galatos de alquila*

3.6.1. Fonte e preparação

O ácido gálico e os galatos de alquila foram diluídos assepticamente em quantidade de DMSO final na placa de até 1,5625%, quantidade esta previamente testada e fixada para não interferir na viabilidade do fungo.

3.6.2. Teste de sensibilidade

Foram realizados cálculos para determinar a quantidade de cada substância a ser adicionada, para que a faixa de concentração na placa de microdiluição seja 62,5 a 0,12 mg/L. Os testes de sensibilidade utilizando os galatos foram feitos somente em microdiluição, devido a quantidade limitada para a realização em macrodiluição.

3.6.3. Ensaio de viabilidade celular fúngica utilizando o kit LIVE/DEADlight®

O kit de viabilidade celular para leveduras LIVE/DEADlight® permite distinguir células vivas e mortas. Contém soluções do corante de ácido nucleico verde fluorescente SYTO9 e vermelho fluorescente iodeto de propídio. Estes corantes diferem tanto nas suas características espectrais quanto na sua capacidade para penetrar nas células. Quando utilizado isoladamente, o corante SYTO9 cora tanto as células com membrana intacta quanto aquelas com membrana

danificada. Em contraste, iodeto de propídio penetra apenas em células com membrana danificada, provocando uma redução no corante SYTO9 quando ambos os corantes estão presentes.

Dessa maneira placas de 96 poços foram preparadas de acordo com o teste de sensibilidade em microdiluição, como descrito acima, utilizando o galato com melhor atividade antifúngica. Por meio de padronizações em nosso laboratório e de acordo com as especificações do fabricante, as soluções-estoque dos corantes SYTO9 (480/500 nm) e iodeto de propídio (490/635 nm) foram diluídas 1:20 em PBS em quantidade suficiente para adicionar 10 µL de cada solução por poço. O experimento foi incubado a 37 °C de 15 a 30 minutos. A leitura foi realizada no aparelho *In Cell Analyzer 2000* (GE Healthcare).

3.7. Avaliação da citotoxicidade dos galatos

Para o teste de citotoxicidade foram empregadas as células NOK, A549, MRC-5 e HepG2 e preparadas de acordo com o item 3.2.

3.7.1. Ensaio de MTT

A viabilidade celular foi estudada nas concentrações próximas da CIM, concentração em que 80 % de células estão vivas. A citotoxicidade foi avaliada por meio do ensaio do MTT (brometo de (3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma), utilizado na concentração de 5 mg/mL, conforme (Mosmann, 1983) com algumas modificações.

A avaliação da viabilidade celular pelos métodos colorimétricos com sais tetrazólicos, como a reação com o sal de MTT, é determinada pela redução do sal em derivado azul de formazana, o qual é um precipitado formado pela ação da enzima succinato desidrogenase, produto da respiração mitocondrial; desta forma, este método avalia de forma quantitativa a sobrevivência e proliferação celular, uma vez que a conversão do MTT em formazana ocorre somente em células vivas e a quantidade do precipitado é proporcional ao número de células vivas (Denizot e Lang, 1986; Gerlier e Thomasset, 1986; Ferrari, Fornasiero *et al.*, 1990). O precipitado de formazana apresenta coloração azul e com a adição de um solvente orgânico é possível sua solubilização (Denizot e Lang, 1986).

As substâncias foram avaliadas nas concentrações de 1 a 0,002 mg/L. As soluções foram preparadas partindo de uma solução-estoque e foram diluídas no meio específico para cada linhagem celular nas placas previamente preparadas com as células. O meio de cultura foi retirado e foram adicionados, 100 µL de cada diluição de cada substância por poço. As placas foram incubadas a 37 °C, 5 % CO₂ ao abrigo da luz por 24 horas; em seguida as soluções foram retiradas e adicionados 10 µL da solução de MTT; e novamente as placas foram incubadas a 37 °C por um período de 4 horas, conforme descrito Denizot *et al.*, (1986) e Ferrari *et al.*, (1990). Após o tempo de incubação foi observado formação de precipitado escuro nas concentrações nas quais células encontravam-se vivas; a solução MTT foi retirada e foram adicionados 100 µL de isopropanol para diluir o precipitado e desta forma realizar a leitura pela alteração da cor do meio de amarelo para violeta. Como controle positivo do teste foi utilizado, peróxido de hidrogênio.

Foram realizadas as leituras espectrofotométricas das placas em leitor de microplacas ELISA (BioRad modelo 3550) com comprimento de onda de 570 nm. A percentagem de células viáveis foi calculada por meio da fórmula abaixo:

$$\text{Células viáveis \%} = \text{média do teste} \times 100 / \text{média do controle negativo}$$

As análises de citotoxicidade foram realizadas em duplicata com três experimentos independentes. Também foi utilizado um controle negativo com células não-tratadas, sendo esta leitura considerada um total de 100 % de células vivas. Em contrapartida, foi realizado um teste para verificar se pode ocorrer reação das substâncias antifúngicas com o MTT, sendo este realizado em placas sem células, somente com as substâncias e com o MTT. Este ensaio foi realizado nas mesmas condições do ensaio com células; evitando assim que o resultado seja um falso-positivo (dados não mostrados).

Foi calculado também o valor da viabilidade celular (IC₅₀), que consiste na relação do valor de 50 % (viabilidade celular) pela concentração que apresentou aproximadamente este valor, multiplicado pela porcentagem celular encontrada para essa concentração, e do índice de seletividade (IS), que foi determinado pelo cálculo da relação entre o valor do IC₅₀ e do MIC (MFC).

3.7.2. Ensaio de viabilidade celular utilizando o kit LIVE/DEAD®

O ensaio com o kit LIVE/DEAD® oferece a possibilidade de verificar-se a viabilidade de células com fluorescência de duas cores, as quais baseiam-se na determinação simultânea de células vivas e mortas por duas sondas com medidas que reconhecem os parâmetros da viabilidade das células, a calceína AM e o homodímero de etídio (atividade esterase intracelular e integridade da membrana plasmática). O ensaio é aplicável à maioria dos tipos de células eucarióticas, incluindo células aderentes e células de certos tecidos, mas não aplicável a bactérias e fungos. As células vivas são distinguidas pela presença da atividade intracelular da esterase, determinado pela conversão enzimática do não visualmente fluorescente calceína AM para a calceína intensamente fluorescente. O corante polianiônico calceína é bem retido dentro das células vivas, produzindo uma intensa e uniforme fluorescência verde. O EthD-1 entra nas células com membrana danificada e após a ligação a ácidos nucleicos, produz fluorescência vermelha brilhante em células mortas, tal composto é excluído pelas células com membrana plasmática intacta, ou seja, células vivas.

Segundo as instruções do fabricante, foi preparada uma solução-estoque adicionando 20 µL da solução estoque 2 mM EthD-1 em 10 mL de PBS estéril, levando a uma solução 4 µL EthD-1. A essa solução foram adicionados 5 µL de solução 4 mM calceína AM, levando a uma concentração desse reagente de 2 µM.

Após o período de incubação das placas com a monocamada formada, foram distribuídos 100 µL da solução do kit LIVE/DEAD® a cada poço da placa, no qual já continha 100 µL de meio com células, levando a um volume final por poço de 200 µL contendo então 1 µM de calceína AM (~495 nm/~515 nm) e 2 µM de EthD-1 (~495 nm/~635 nm). As placas foram incubadas em temperatura ambiente de 30 a 45 minutos. A leitura foi realizada no aparelho *In Cell Analyzer 2000* (GE Healthcare).

3.8. Análise proteica após contato com as substâncias

3.8.1. Cultivo em caldo

De acordo com o item 3.4.1., foi preparada uma suspensão fúngica com 10^6 - 10^7 cel/mL e feita diluição 1:50 em PBS, fazendo o ajuste para a porcentagem de células vivas encontradas. A

partir desta foi feita diluição 1:20 em meio BHI (*Brain and Heart Infusion*) no volume total de 400 mL em erlenmeyer de 1 L. Foram preparados erlenmeyers para cada situação (sem tratamento, tratado com galato selecionado e com anfotericina B e itraconazol como forma de controle e comparação do teste).

3.8.2. Tempo de incubação

Os Erlenmeyers foram incubados a temperatura de 37 °C em agitador rotativo a 100 rpm, por 48 horas sendo então adicionado o volume do antifúngico referente a concentração de 125 mg/L, concentração esta escolhida de acordo com as CIMs apresentadas pelo antifúngicos.

3.8.3. Extração total de proteínas

O volume de cada Erlenmeyer foi transferido para tubos estéreis de 50 mL e colocados para centrifugar a 2958G (Centrifuge 5804R – *Eppendorf*) por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* resuspendidos em água estéril à baixa temperatura e todos foram colocados em um único tubo. Este foi centrifugado a 2958G por 5 minutos a 4 °C. Foram feitas mais duas lavagens do *pellet* com água estéril à baixa temperatura, sendo centrifugado a 2958G por 5 minutos a 4 °C a cada lavagem. O *pellet* foi ressuspendido em Tris HCl 10 mM pH 8,8, com 1 µL/mL de uma mistura de pepstatina, leupeptina, aprotinina, antipaína, quimiostatina - inibidor de protease (PLAAC-inibidor de protease) e 10 µL/mL de fenil metil sufonil fluoreto (PMSF-inibidor de protease). A essa suspensão foi adicionado quantidade equivalente de pérolas de vidro estéreis, o qual foi alternado em banho de nitrogênio líquido e vortéx e em seguida mais 15 minutos de vortéx (alternando em gelo devido ao possível aquecimento). O tubo foi centrifugado a 2958G por 45 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi recolhido cuidadosamente para não ser recolhido junto ao *pellet*, e separado em um microtubo de 1,5 mL. Essa suspensão apresentou-se um pouco opaca, devido a presença de carboidratos suspensos, assim uma centrifugação de 2958G por 45 minutos a 4 °C foi realizada e o sobrenadante foi recolhido e separado. Dessa suspensão, 50 µL foi separado para um microtubo de 2 mL tipo eppendorf para realizar a dosagem proteica e em outro microtubo de 1,5 mL tipo eppendorf foi aliqotado 64 µL para realizar eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS-PAGE.

3.8.4. Dosagem de proteínas pelo Método de *Bradford*

A concentração proteica foi determinada a partir de microtubo de 2 mL tipo eppendorf com 50 µL de amostra ao qual foi adicionado 1,5 mL do reagente Coomassie (Pierce). Essa suspensão foi homogeneizada por inversão e deixada em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente. Após o tempo determinado, a D.O. foi determinada a 595 nm, e comparada ao gráfico de absorbância versus concentração, já previamente estabelecida.

3.8.5. Análise do perfil proteico por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Os perfis proteicos foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio, SDS-PAGE, sob condições redutoras, utilizando sistema de tampão descontínuo de (Laemmili, 1970) e (Studier, 1973). Os componentes foram primeiramente separados em gel a 10 % e em gel de empilhamento a 5 % de acrilamida. Para a preparação desse gel foi utilizado solução-estoque com 30 % acrilamida e 0,8 % *bis*-acrilamida. Para o gel de separação a polimerização foi feita em solução com 1,5 M de *Tris*-HCl, pH 8,8 e 0,4 % de SDS, em presença de 0,1 % v/v de *N, N, N', N'*- tetrametiletilenodiamida (TMED) e 0,1 % de persulfato de amônio. O gel de empilhamento foi polimerizado em presença de 0,5 M de *Tris*-HCl pH 6,8 e 0,4 % de SDS, além de 0,1 % de persulfato de amônio e 0,05 % v/v de TEMED. Para o preparo da amostra foi utilizado 64 µL da amostra diluído em tampão de amostra (1:4), que é composto de 62,5 mM de *Tris*-HCl [*tris* (hidroxi-metil)-aminometano] pH 6,8, 2 % de SDS, 10 % de glicerol, 0,5 M de ditiotreitol e 0,002 % de bromofenol. As proteínas foram dissociadas em banho-maria por 3 minutos. A corrida eletroforética foi realizada com tampão composto por *Tris* 0,075 M, glicina 0,57 M e SDS 0,1 %, pH 8,3, e a voltagem utilizada foi 10 mA (50 V) até a penetração no gel de separação, e a seguir a 20 mA (120 V) até o final do gel.

3.8.6. Análise Proteica por Eletroforese Bidimensional

Precipitação da amostra

Após a determinação da concentração proteica na amostra, uma alíquota equivalente a 1 mg foi pipetada e adicionada em um microtubo de 1,5 mL tipo eppendorf, a essa alíquota foi acrescido igual volume de TCA 15 % e mantido a 4 °C por pelo menos 45 minutos. Após esse

tempo, a suspensão foi centrifugada a 14000 rpm a 4 °C por 15 minutos. O pellet foi lavado duas vezes com acetona 90 %, centrifugado a 14000 rpm a 4 °C por 15 minutos a cada lavagem. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi secado. O sedimento foi ressuspendido em 250 µL de solução de reidratação, adicionado de 2,8 mg/mL DTT (agente redutor), 12 µL/mL de *streak* e 5 µL/mL de IPG buffer pH 3-10, sendo que essas quantidades foram utilizadas pois foi utilizada a fita de 13 cm linear pH 4-7. Foi colocado no vórtex para homogeneizar.

Reidratação da fita

A película plástica que protege o gel da fita foi retirada do lado positivo para o negativo, e colocada com a face do gel virada para baixo, imersa na solução de reidratação contendo a amostra. A fita foi coberta com *Cover Fluid* novo, aproximadamente 5 mL por canaleta, evitando-se a formação de bolhas. Essa etapa foi deixada de 10 a 20 horas ou *overnight* para que ocorresse a reidratação da fita.

Focalização (IEF)

Os componentes proteicos foram primeiramente submetidos à focalização isoeletrica, utilizando o sistema Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare). O *manifold* foi colocado no IPGhor III e a suas canaletas foi adicionado *Cover Fluid*. A fita foi colocada então com a face do gel virada para cima nas marcações referentes ao tamanho da fita utilizada. Os *pads* foram colocados nas extremidades, os eletrodos em cima dos *pads* na parte mais distante da fita e então travado. A programação para focalização foi ajustada para a fita de 13 cm pH 4-7. No término da focalização, as fitas foram colocadas em tubo de vidro estéreis e armazenadas a -80 °C até o momento de realizar o equilíbrio e a segunda dimensão.

Equilíbrio das fitas

Foi adicionado a cada 10 mL de solução de equilíbrio (volume equivalente a fita de 13 cm) 100 mg de DTT (agente redutor). Essa solução foi homogeneizada e adicionada à fita, a qual foi deixada agitando por 20 minutos. Decorrido este período, a solução foi descartada. Foi adicionado a cada 10 mL de solução equilíbrio 250 mg de iodoacetamida (agente alquilante), a qual foi homogeneizada e adicionada ao tubo com a fita, deixando sob agitação por 20 minutos. A solução foi descartada e a fita levada para o gel da segunda dimensão já polimerizado.

Eletroforese Bidimensional

A segunda dimensão foi realizada para a separação das proteínas de acordo com a massa molecular, em gel de poliacrilamida 12,5 % de acordo com Laemmli, 1970. Os géis foram corados utilizando azul de Coomassie Brilhante R350 segundo (Neuhoff, Arold *et al.*, 1988) (1988). Posteriormente os géis foram analisados pelo programa Imagemaster 2D Platinum.

3.9. Espectrometria de massas por MALDI TOF/TOF

As amostras foram devidamente preparadas para sequenciamento no equipamento AB SCIEX MALDI TOF/TOF 5800 System (*Applied Biosystems*) foi empregado com a colaboração do Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas, do Departamento de Genética da Faculdade Esalq/USP de Piracicaba, sob supervisão do Prof. Dr. Carlos Alberto Labate. Os espectros obtidos foram processados utilizando o *Protein Pilot* e as sequências encontradas foram pesquisadas no NCBI e Swiss *datbank*.

Preparo dos spots

Os *spots* foram retirados dos géis, com auxílio de uma ponteira de 1 mL ou com a ponta de uma gilete / lâminas de bisturi dependendo do tamanho do *spot*. Os mesmos foram picados em fragmentos de aproximadamente 1 mm³ em placas de Petri de vidro e então transferidos para microtubos. Os fragmentos de gel foram lavados três vezes ou até a remoção completa do corante, com solução de descoloração (acetonitrila (ACN) 50 % mais bicarbonato de amônio AmBic 25 mM v/v). Após a descoloração, a solução foi removida. Adicionou-se 200 µL de ACN 100 % por 10 minutos para a desidratação dos fragmentos. O resíduo remanescente do gel evaporou à temperatura ambiente, em capela (15 a 20 minutos). Reidratou-se os fragmentos com 40 µL da solução de redução (ditiotretol (DTT) 20 mM mais AmBic 50 mM), as quais foram mantidas a 56 °C por 40 min. Em seguida os fragmentos foram cobertos com 40 µL da solução de alquilação (iodoacetamida 55 mM mais AmBic 50 mM) e incubados ao abrigo da luz, a temperatura ambiente, por 30 minutos. Após esse período foi feita uma lavagem com 200 µL de AmBic 25 mM seguido de desidratação com 200 µL ACN 100 %. O resíduo remanescente do gel evaporou a temperatura ambiente, em capela (15 a 20 minutos).

Digestão

Foi adicionado a cada microtubo 10 μ L da solução de tripsina (em AmBic 50 mM) sobre os fragmentos de géis desidratados, por 15 minutos a 4 °C para que a tripsina penetre nos fragmentos de gel. Em seguida, 40 μ L de Ambic 50 mM foram adicionados e as amostras foram incubadas a 37 °C, por 14 horas.

Eluição dos peptídeos

A ação da tripsina foi interrompida pela adição de 15 μ L de solução bloqueadora (ácido fórmico 96 % mais ACN 50 %). O sobrenadante foi recuperado em um microtubo novo. Foram realizados mais dois passos de eluição envolvendo duas soluções diferentes (I: ácido fórmico 96 % mais metanol 100 %, II: ácido fórmico 50 % mais ACN 100 %). Em ambas as etapas, os fragmentos foram cobertos com quantidade suficiente da solução e sonicados por 15 minutos a 40 °C. O sobrenadante foi transferido para o microtubo já reservado. Esse processo foi realizado duas vezes para cada etapa. Uma terceira eluição foi feita adicionando quantidade suficiente de ACN 100 % para a desidratação dos fragmentos. O sobrenadante foi transferido para os microtubos já reservados. A solução reservada nos microtubos contendo os peptídeos eluídos do gel foi concentrada em concentrador a vácuo (*SpeedVac*), a temperatura ambiente.

Desalinização das amostras

No momento da análise, as amostras foram ressuspensas em 10 μ L de TFA 0,1 % em água MilliQ e sonicada a 20-25 °C, por 5 minutos e então passadas por ZipTip_{U-C18} (Millipore) e reservadas em um microtubo novo.

Aplicação das amostras em placa de MALDI

Um microlitro de cada amostra foi transferido para a placa de MALDI, após a secagem da amostra foi transferido mais 1 μ L da amostra. Após a secagem a amostra foi colocada no equipamento de espectrometria de massas para MALDI-TOF/TOF.

3.10. Análise de expressão diferencial de genes por PCR em Tempo Real (Real Time PCR)

3.10.1. Extração de RNA total e síntese de cDNA

As células fúngicas dos isolados Pb18 e Pl01, tratadas ou não com galato de decila a 125 mg/L, de acordo com item 3.8.1., foram maceradas com nitrogênio líquido e rapidamente transferidas para um tubo (tipo Falcon) contendo 3,5 mL de Trizol e pérolas de vidro. A amostra foi agitada vigorosamente em vórtex por 15 minutos e após, centrifugadas a 1620 x g por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, adicionado de 0,2 mL de clorofórmio para cada 0,75 mL de trizol recuperado, agitado vigorosamente e deixado em repouso por 10 minutos. Após o repouso, a amostra foi centrifugada a 1620 x g por 15 minutos e a fase aquosa, transferida para um novo tubo. Foram acrescentados 0,25 mL de isopropanol e 0,25 mL de solução de citrato de sódio 0,4 M e cloreto de sódio 0,8 M para cada 0,75 mL de trizol recuperado inicialmente, agitado gentilmente e deixado em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada a 1620 x g por 30 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado, lavado com etanol a 75 %. Nova centrifugação foi realizada a 1620 x g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco a temperatura ambiente. Finalmente, o precipitado foi ressuspensão em 30 µL de água DEPC (Dietil Pirocarbonato) 0,01 % e armazenado a -70 °C.

3.10.2. Síntese de cDNA

A síntese da primeira fita de cDNA foi feita em uma reação contendo 1 µg de RNA total, 10 pmol/µL da sequência iniciadora (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3') e essa mistura foi aquecida por 2 minutos a 72 °C. Em seguida foi acrescentado 10 pmol/µL do oligo dT modificado (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT₍₃₀₎N₁N, onde N=A, C, G ou T; N₁=A, G ou C), 2 µL de uma mistura de dNTPs (10 mM), 2 µL de RNaseOUT (40 U/µL) (Invitrogen), 0,4 µL de DTT (100mM), 1,2 µL de cloreto de magnésio (50mM), 2 µL da enzima transcriptase reversa (200 U/µL) (RT Superscript II - Invitrogen) e 4 µL de tampão 5 X (Tris-HCl 250 mM pH 8,3; KCl 375 mM; MgCl₂ 15 mM). Esta reação foi incubada a 42 °C durante 1 hora e

trinta minutos. Após este período foi adicionado 80 µL de TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM pH 8,0) e aquecida por mais 7 minutos a 72 °C.

3.10.3. PCR em Tempo Real (Real Time PCR)

Para a análise da expressão diferencial de genes por PCR em Tempo Real (Real Time PCR), foram utilizados iniciadores específicos para genes codificantes de sete proteínas diferencialmente expressas nos experimentos do perfil proteômico, além do gene controle da reação (L34), conforme tabela abaixo (tabela 1).

Tabela 1: Iniciadores específicos para genes codificantes

Gene	Primers
14-3-3-like	F: 5'GTTTCGCTCTTGGAGACAAGC3' R: 5' AGCAACCTCAGTTGCGTTCT3'
RanGTP	F: 5'AAATGCGTGCGAAGCTATTC3' R: 5'GAGTCTTGCCGTTCTCCTTG3'
gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	F: 5'ATCCGCCTACATGTTCTTCG3' R: 5'TCAACGCCTTCCATCTCTCT3'
enolase	F: 5'CCTGCTCCTCAAAGTCAACC3' R: 5'GATGGTGACATCCTCCGTCT3'
malato desidrogenase (MLD)	F: 5'GCTTCCATTGTCCGTGACTT3' R: 5'CGCTTGGGGTTGTAGACATT3'
trancetolase (TCL)	F: 5'ATTGGCTGGATGCGACTATC3' R: 5'TAGGTGCGCTTGGGAATATC3'
14-3-3-like-2	F: 5'GTTTCGCTCTTGGAGACAAGC3' R: 5'AGCAACCTCAGTTGCGTTCT3'
proteína ribossomal L34 (controle)	F: 5'CAAGACTCCAGGCGGCAAC3' R: 5'GCACCGCCATGACTGACG3'

As reações foram realizadas utilizando-se 1 µL de cDNA, 10 µL de Máxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2 x) (Thermo Scientific), e 0,5 µM de cada primer, sendo adicionado a reação água até atingir o volume de 20 µL. As reações foram realizadas com temperatura inicial de 50 °C por 2 minutos, seguido por 10 minutos a 95 °C. Depois, 40 ciclos de 95 °C a 15 segundos, seguidos de anelamento e síntese a 60 °C por um minuto. Em seguida a PCR a análise da curva de melting foi realizada em que foi confirmada a emissão de sinal correspondente a um único produto. As reações foram realizadas em triplicata com o aparelho Applied Biosystems 7500 cycler. Os dados foram analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Para os valores obtidos para as amostras em triplicata foi calculado a média e então o valor $2^{-\Delta\Delta CT}$ (sendo o gene L34 utilizado como referência) em seguida os valores para as amostras foi normalizado a partir da amostra de RNA que não recebeu o tratamento com o galato de decila. Como controle

negativo utilizado continha todos os reagentes exceto a amostra de cDNA sendo substituída por água. Depois de 40 ciclos de amplificação, nenhum produto de amplificação foi detectado para o controle negativo.

4. RESULTADOS

Teste de sensibilidade

Nos ensaios do teste de sensibilidade em macrodiluição, nos quais as concentrações dos antifúngicos estão entre 0,001 a 0,8 mg/L, foram obtidos os valores de CIM 0,05 e 0,1 mg/L de anfotericina B contra os isolados Pb18 e Pl01, respectivamente, e 0,003 e 0,001 mg/L de itraconazol contra os mesmos isolados. As figuras de 2 a 5 mostram as CIM (tubo de cor azul/roxo escuro, anterior ao primeiro de coloração rosa) devido a adição do reagente de viabilidade *Alamar blue*. O controle negativo (controle de esterilidade) foi realizado no primeiro tubo e o controle positivo (controle de crescimento) no ultimo tubo.



Figura 2: Teste de sensibilidade em macrodiluição empregando *Alamar blue* e *P. brasiliensis*. CIM de anfotericina B de 0,05 mg/L contra Pb18.



Figura 3: Teste de sensibilidade em macrodiluição empregando *Alamar blue* e *P. lutzii*. CIM de anfotericina B de 0,1 mg/L contra Pl01.



Figura 4: Teste de sensibilidade em macrodiluição empregando *Alamar blue* e *P. brasiliensis*. CIM de itraconazol de 0,003 mg/L contra Pb18.



Figura 5: Teste de sensibilidade em macrodiluição empregando *Alamar blue* e *P. lutzii*. CIM de itraconazol de 0,001 mg/L contra Pl01.

Em adição, nos testes de sensibilidade em microdiluição, nos quais as concentrações dos antifúngicos estão entre 0,002 a 1 mg/L, foram obtidos os valores de CIM 0,06 mg/L de anfotericina B contra ambos os isolados Pb18 e Pl01 (linhas C e E), e 0,008 e 0,004 mg/L de itraconazol contra os mesmos isolados, respectivamente (linhas D e F). A figura 6 mostra as CIM (poço de cor azul/roxo escuro, anterior ao primeiro de coloração rosa) devido à adição do reagente de viabilidade *Alamar blue*. O controle positivo (controle de crescimento) foi realizado nos poços da coluna 12 e o controle negativo (controle de esterilidade) nos poços da coluna 1.

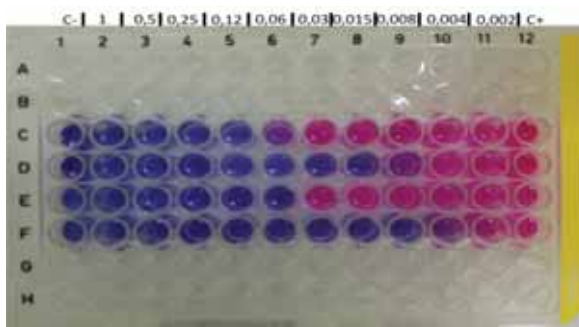


Figura 6: Teste de sensibilidade em microdiluição empregando *Alamar blue* e *P.brasiliensis* e *P. lutzii*. CIM de 0,06 mg/L de anfotericina B contra ambos os isolados Pb18 e Pl01 (linhas C e E), e 0,008 e 0,004 mg/L de itraconazol contra os mesmos isolados, respectivamente (linhas D e F).

Análise morfológica dos isolados contra os antifúngicos.

Em busca de uma melhor caracterização dos efeitos de anfotericina B e itraconazol sobre as células fúngicas de Pb18 e Pl01, foram realizadas avaliações no *In Cell Analyzer 2000* (GE Healthcare), de cada poço da placa de microdiluição, com as diferentes concentrações dos antifúngicos. As figuras 7 e 8 mostram as imagens das células fúngicas dos isolados Pb18 e Pl01 frente aos antifúngicos anfotericina B e itraconazol, nas concentrações de 0,002 a 0,125 mg/L.

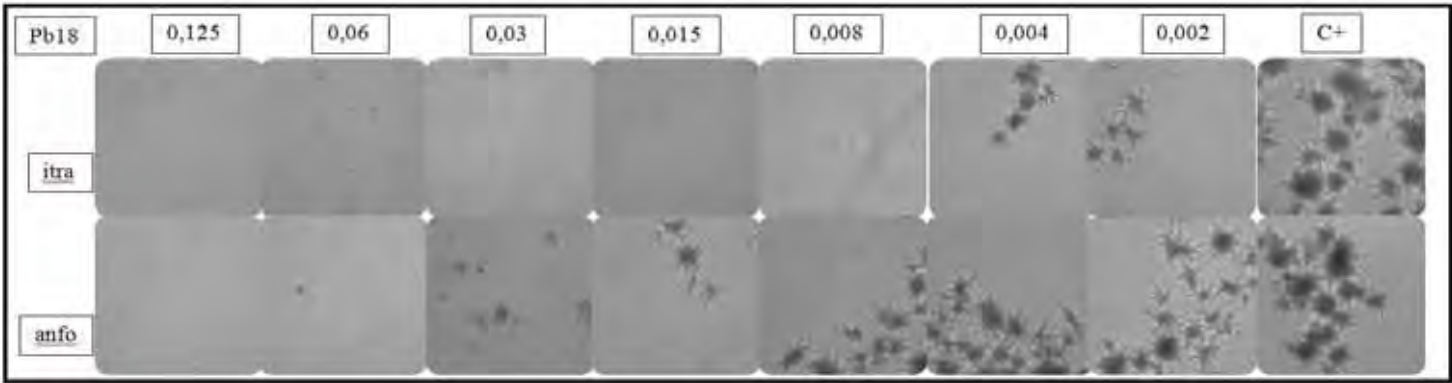


Figura 7: Comparação do efeito dos fármacos antifúngicos sobre *P. brasiliensis* Pb18 de cada poço em diferentes diluições, incluindo os poços com os valores de CIM para itraconazol (0,008 mg/L) e anfotericina B (0,06 mg/L) em relação a concentrações menores e ao controle positivo.

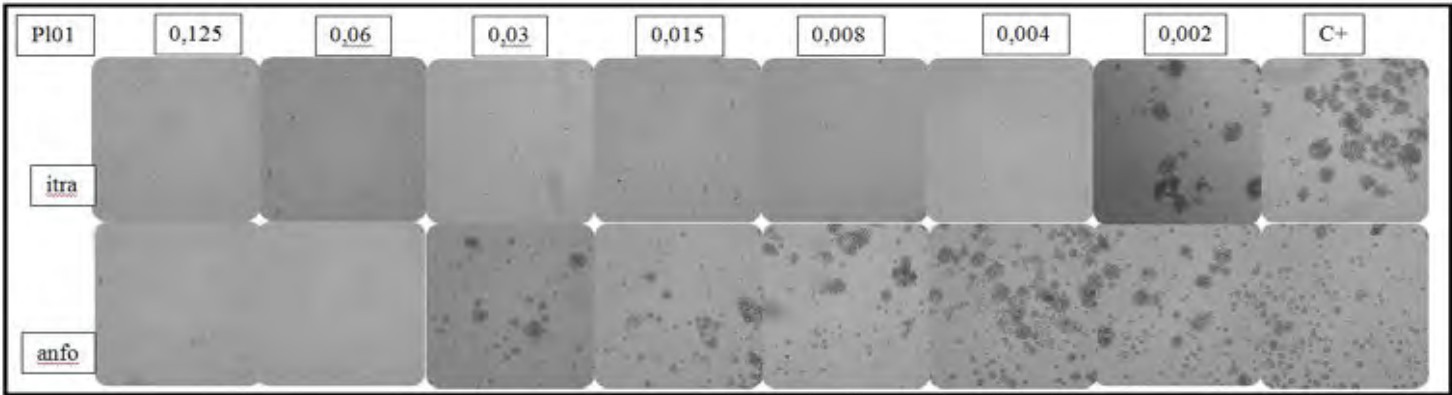


Figura 8: Comparação do efeito dos fármacos antifúngicos sobre *P. lutzii* Pl01 de cada poço em diferentes diluições, incluindo os poços com os valores de CIM para itraconazol (0,004 mg/L) e anfotericina B (0,06 mg/L) em relação a concentrações menores e ao controle positivo.

Teste de sensibilidade com outros isolados de *Paracoccidioides*

Após prévia padronização, o teste de sensibilidade em microdiluição, com aplicação do MABA foi estendido para mais seis isolados, sendo três de *P. lutzii* e cinco de *P. brasiliensis* conforme tabela 2.

Tabela 2: Teste de sensibilidade por micrométodo do complexo *Paracoccidioides*: valores de CIM de anfotericina B e itraconazol em mg/L e μ M.

Tabela 2: Teste de sensibilidade por microdiluição do complexo <i>Paracoccidioides</i> : valores de CIM de anfotericina B e itraconazol em mg/L e μ M.																	
<i>P. lutzii</i> mg/L (μ M)							<i>P. brasiliensis</i> mg/L (μ M)										
01-like							S1					S2		PS3			
	EE		8334MMT		01		18		D03		339		02		Epm83		
anfotericina B	0,244	0,264	0,244	0,264	0,061	0,066	0,122	0,132	0,008	0,009	0,061	0,066	0,122	0,132	0,061	0,066	
itraconazol	0,008	0,011	0,031	0,043	0,008	0,011	0,015	0,021	0,015	0,021	0,015	0,021	0,008	0,011	0,015	0,021	

Obs: valores tabela sem aproximação numérica. Valores aproximados no texto.

Teste de sensibilidade com galatos

Na sequência, por meio de teste de sensibilidade em microdiluição, com aplicação do MABA, foram determinados os valores de CIM do ácido gálico e quinze galatos, os quais apresentam diferentes esqueletos carbônicos, principalmente em relação ao comprimento da cadeia alquílica, contra os oito isolados, como na tabela 3 (valores tabela sem aproximação numérica).

Tabela 3: Valores de CIM do ácido gálico e seus ésteres contra oito isolados do complexo *Paracoccidioides*

	<i>P. lutzii</i> mg/L (µM)						<i>P. brasiliensis</i> mg/L (µM)									
	01-like						S1						S2		PS3	
	EE		8334MMT		01		18		D03		339		02		Epm83	
<u>G1 – ácido gálico</u>	7,813	45,96	> 62,5	>367,6	3,906	22,98	15,625	91,91	> 62,5	>367,6	31,250	183,82	3,906	22,98	3,906	22,98
<u>G2 – metila</u>	3,906	21,23	15,625	84,92	1,953	10,62	15,625	84,92	15,625	84,92	15,625	84,92	15,625	84,92	0,977	5,31
<u>G3 – etila</u>	7,813	39,46	15,625	78,91	0,977	4,93	7,813	39,46	3,906	19,73	7,813	39,46	15,625	78,91	0,977	4,93
<u>G4 - n-propila</u>	1,953	9,21	7,813	36,85	0,977	4,61	7,813	36,85	1,953	9,21	3,906	18,43	3,906	18,43	0,244	1,15
<u>G5 - i-propila</u>	1,953	9,17	3,906	18,34	1,953	9,17	15,625	73,36	1,953	9,17	3,906	18,34	3,906	18,34	0,122	0,57
<u>G6 - n-butila</u>	1,953	8,64	7,813	34,57	1,953	8,64	1,953	8,64	1,953	8,6	3,906	17,29	3,906	17,28	0,122	0,54
<u>G7 - n-pentila</u>	0,488	2,04	1,953	8,14	0,244	1,02	0,488	2,04	0,244	1,02	0,977	4,07	0,977	4,07	0,122	0,51
<u>G8 – ác.3,4,5-triacetoxibenzóico</u>	7,813	18,51	> 62,5	>148,1	1,953	4,63	15,625	37,03	> 62,5	>148,1	> 62,5	>148,1	15,625	37,03	0,977	2,31
<u>G9 - i-butila</u>	3,906	17,21	7,813	34,42	0,977	4,30	1,953	8,60	0,977	4,30	3,906	17,21	1,953	8,60	0,244	1,08
<u>G10 - n-hexila</u>	0,488	1,92	1,953	7,69	0,244	0,96	0,244	0,96	0,244	0,96	0,488	1,92	1,953	7,69	0,977	3,85
<u>G11 - n-heptila</u>	0,122	0,46	0,244	0,91	0,122	0,46	0,122	0,46	0,122	0,46	0,031	0,11	0,488	1,82	0,244	0,91
<u>G12 - n-octila</u>	0,122	0,43	0,244	0,87	0,122	0,43	0,015	0,05	0,122	0,43	0,015	0,05	0,244	0,87	0,122	0,43
<u>G14 - n-decila</u>	0,031	0,1	0,122	0,39	0,122	0,39	0,004	0,01	0,122	0,39	0,004	0,012	0,004	0,01	0,008	0,03
<u>G15 - n-undecila</u>	0,031	0,09	0,031	0,09	0,122	0,38	0,015	0,05	0,122	0,38	0,008	0,02	0,031	0,094	0,122	0,38
<u>G16 - n-dodecila</u>	0,031	0,09	0,031	0,09	0,122	0,36	0,122	0,36	0,122	0,36	0,061	0,18	0,015	0,05	0,488	1,45
<u>G17 - n-tetradecila</u>	0,122	0,35	0,244	0,69	0,122	0,35	0,244	0,69	0,122	0,35	0,122	0,35	0,031	0,09	0,061	0,17

Os galatos de heptila, octila, decila, undecila e dodecila foram os que apresentaram as CIMs menores para a maioria dos isolados, tendo como menor valor 0,004 mg/L e maior 0,5 mg/L, podendo ser considerados como aqueles que tem melhor potencial antifúngico. Destaca-se que o galato de decila foi o que apresentou menor valor de CIM, de 0,004 mg/L.

A figura 9 mostra, como exemplo, uma placa de microdiluição com os valores CIM do galato de decila contra Pl01 (linhas C e D) e Pb18 (E e F). A figura mostra as maiores concentrações começando no poço 2C e 2E, seguido em sequência (diluições seriadas) até os poços 11C e 11E, tendo como sequência do poço 2D e 2F ao poço 11D e 11F, levando a uma faixa de concentração de 0,00012

a 62,5 mg/L (valores aproximados). Os valores da CIM do galato de decila contra Pl01 foi de 0,125 mg/L e contra Pb18 de 0,004 mg/L. Os controles foram dispostos na coluna 1, controle negativo, e na coluna 12, controle positivo.

A figura 10 revela imagens das células de Pb18 e Pl01 frente ao galato de decila, mostrando o comportamento da célula fúngica frente à CIM e concentrações superiores a ela. Pode-se verificar que as células não se desenvolveram e em sua maioria adquiriram a coloração vermelha (mortas). Já no controle de crescimento e na concentração menor que a CIM as células se desenvolveram e foram encontradas em sua maioria coradas de verde.

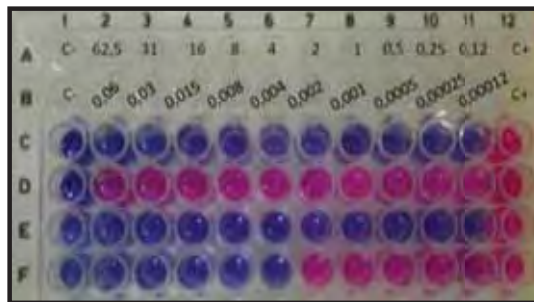


Figura 9: Teste de sensibilidade do galato de decila em placa de microdiluição empregando *Alamar blue* e o complexo *Paracoccidioides*: Linha C e D: Pl01 com valor de CIM de 0,125mg/L; linha E e F, Pb18 com valor de CIM de 0,004 mg/L.

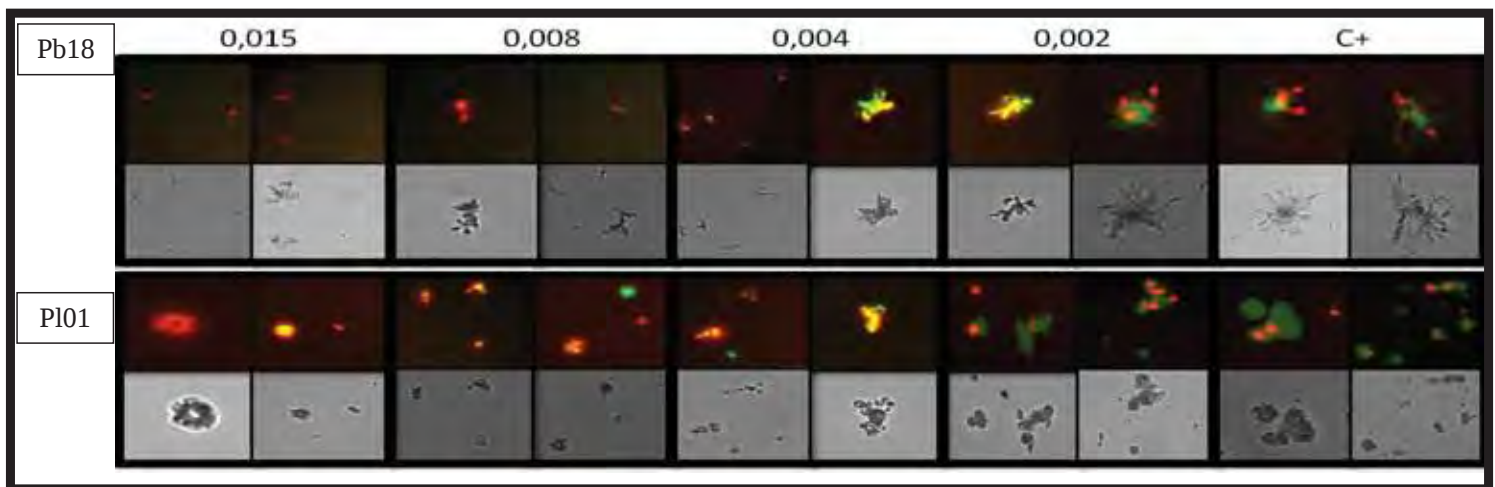


Figura 10: Diferenças no desenvolvimento das células fúngicas nos poços dos valores de CIM para o galato de decila em relação a concentrações menores e controle positivo empregando o kit LIVE/DEAD. As células vivas estão coradas em verde e as células mortas em vermelho. CIMs: 0,004 mg/L para Pb18 e 0,125 mg/L para Pl01.

A diferença de atividade antifúngica dos galatos em relação ao tamanho da cadeia foi disposta em gráfico com os valores das CIM frente os isolados Pb18 e PI01. Foi observado que para o ácido gálico e para mais cinco galatos, os valores de CIM entre os dois isolados foram significativamente discrepantes, e que para os sete últimos galatos, os quais possuem as maiores cadeias carbônicas, os valores de CIM de ambas as espécies foram significativamente baixas, como foi destacado no gráfico B.

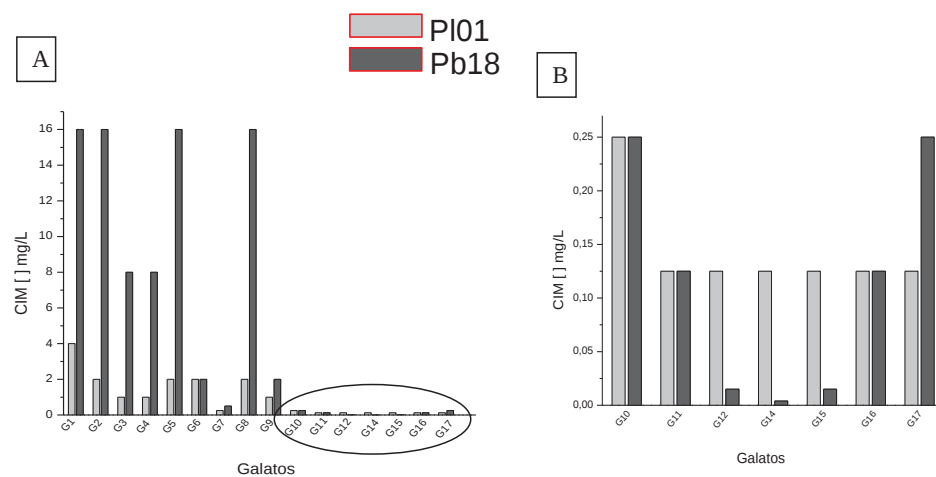


Figura 11: Resultados do teste de sensibilidade com os valores de CIM do ácido gálico e 15 galatos contra PI01 e Pb18 (A) e seleção de sete galatos com os valores menores de CIMs (B).

Ensaio de citotoxicidade

Ensaio de MTT

Foram selecionados para avaliação da citotoxicidade por MTT os três galatos considerados com o melhor potencial antifúngico, os galatos de octila, decila e undecila. Na figura 12 estão apresentadas as porcentagens de células vivas, versus os três galatos com todas as concentrações testadas (1- 1 mg/L, 2- 0,5 mg/L, 3- 0,25 mg/L, 4- 0,125 mg/L, 5- 0,06 mg/L, 6- 0,003 mg/L, 7- 0,0015 mg/L, 8- 0,008 mg/L, 9- 0,004 mg/L, 10- 0,002 mg/L), como controle de morte foi utilizado o peróxido de hidrogênio. Para os três galatos avaliados, as células A549 apresentaram viabilidade celular acima de 60 % a partir da concentração 0,5 mg/L, e para a concentração 1 mg/L a porcentagem de células encontradas foi inferior a 50 %, porém valor acima da porcentagem encontrada para o controle de morte. No caso das células MRC-5 apresentaram viabilidade celular a partir de 40 % para os três galatos nas concentrações de 1 a 0,002 mg/L, com exceção do galato de octila nas concentrações de 1 e 0,5 mg/L, nas quais a porcentagem de células viáveis foi menor que 40 %, porém maior do que o encontrado para o controle de morte. A viabilidade celular se apresentou maior que 60 % para os três galatos em todas as concentrações, com exceção dos galatos de octila e decila na concentração de 1 mg/L, que apresentou porcentagem de células viáveis maior equivalente ao encontrado para o controle de morte, em torno de 40%. A concentração de 1 mg/L também se apresentou menor que 40% para as células NOK frente aos três galatos, porém neste caso, o controle de morte apresentou uma porcentagem de células viáveis maior do que essa concentração, e menor para todas as outras, as quais apresentaram porcentagem de células viáveis acima de 60%.

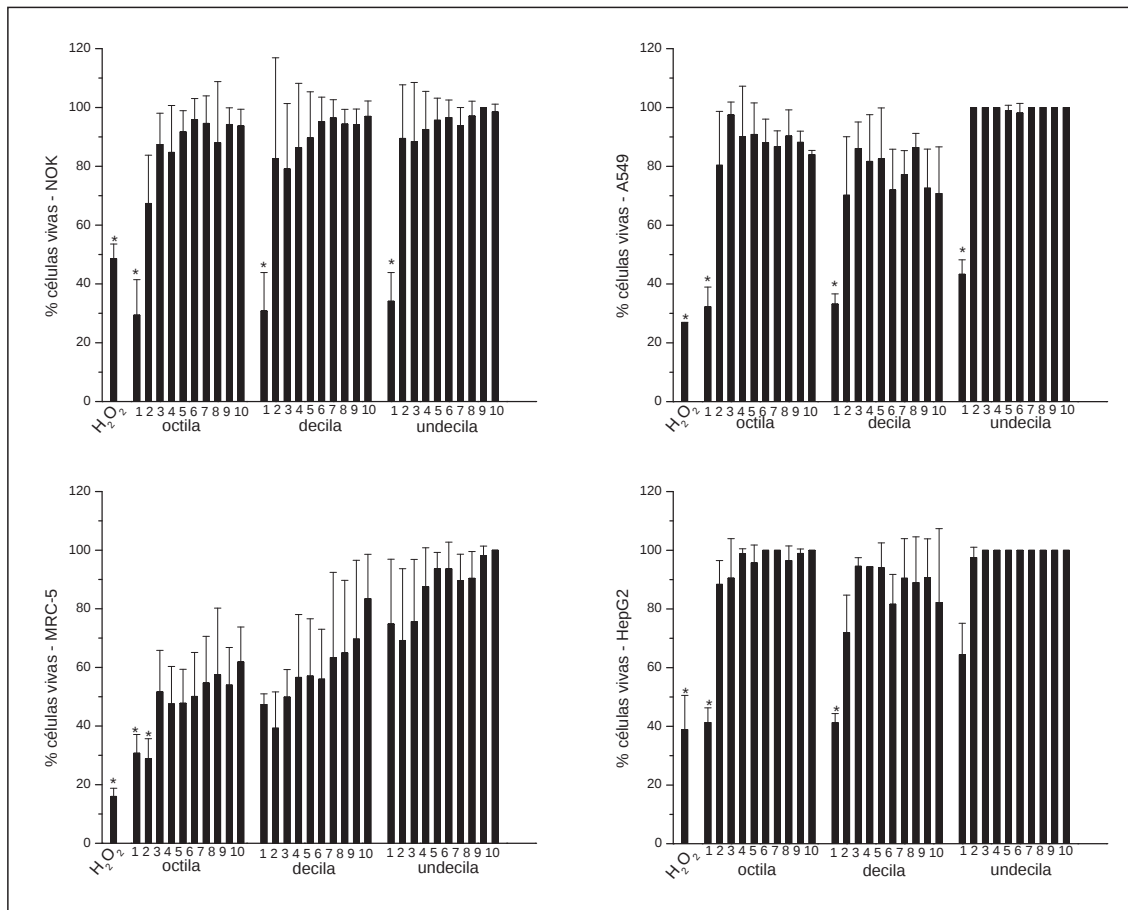


Figura 12: Porcentagem de células viáveis das linhagens celulares A549, HepG2, NOK e MRC-5 em relação a três diferentes concentrações de G12, G14 e G15, respectivamente 1-1mg/L, 2-0,5mg/L, 3-0,25mg/L, 4-0,125mg/L, 5-0,06mg/L, 6-0,003mg/L, 7-0,0015mg/L, 8-0,0008mg/L, 9-0,0004mg/L, 10-0,0002mg/L, determinado pelo método do MTT (*valores não são significativamente diferentes em relação ao controle H_2O_2).

O IC₅₀ foi determinado de acordo com a concentração dos três galatos selecionados que apresentaram viabilidade celular em torno de 50%. Com a IC₅₀ estabelecida para os galatos octila, decila e undecila, o IS foi avaliado pela razão do valor do IC₅₀ de cada galato pelo de MIC de cada isolado pelo IC₅₀ de cada galato, revelando que os três galatos apresentaram valores acima de 10. Foi observado que para os isolados de *P. brasiliensis*, o galato de decila apresentou IS melhor, porém, para os isolados de *P. lutzii*, G15 apresentou IS melhor (tabela 4).

Tabela 4: Avaliação da atividade citotóxica em células de fibroblasto normal de pulmão MRC-5 e o índice de seletividade (IS) da razão entre a IC₅₀ e o MIC (MFC) de isolados de *P. brasiliensis* (18, D03, 339, 02, Emp83) e de *P. lutzii* (EE, 8334MMT, 01)

			IS mg/L (μM)																		
			citotoxicidade		P. lutzii							P. brasiliensis									
					IC ₅₀							01-like				S1				S2	
			mg/L	μM	EE		8334MMT		1			18		D03		339		2		Epm83	
<i>n</i> -octyl	0,510	1,765	4,175	4,077	2,087	2,038	4,175	4,077	33,397	32,615	4,175	4,077	33,397	32,615	2,087	2,038	4,175	4,077			
<i>n</i> -decyl	0,511	1,610	16,744	16,352	4,186	4,088	4,186	4,088	133,954	130,815	4,186	4,088	133,954	130,815	133,954	130,815	66,977	65,407			
<i>n</i> -undecyl	0,635	1,915	20,822	20,334	20,822	20,334	5,206	5,083	41,644	40,668	5,206	5,083	83,288	81,336	20,822	20,334	5,206	5,083			

Ensaio de viabilidade celular: Kit LIVE/DEAD®

Preliminarmente, como observado nos testes de sensibilidade, o galato de decila se mostrou o mais eficaz para a atividade antifúngica. Dessa maneira este galato foi selecionado para o ensaio de viabilidade das células HepG2, para tanto, o ensaio de viabilidade com o kit LIVE/DEAD® foi empregado e a aquisição ocorreu no aparelho *In Cell Analyzer 2000* (GE Healthcare). Na figura 13 observa-se a célula Hep G2 após contato com concentrações variando de 0,003 a 1 mg/L do galato de decila e os controles negativo (células em contato com peróxido de hidrogênio), e positivo (células somente em contato com o meio utilizado). É possível observar que nas diferentes concentrações, incluindo a CIM do galato de decila, as células permaneceram íntegras e coradas de verde, o que representa viabilidade.

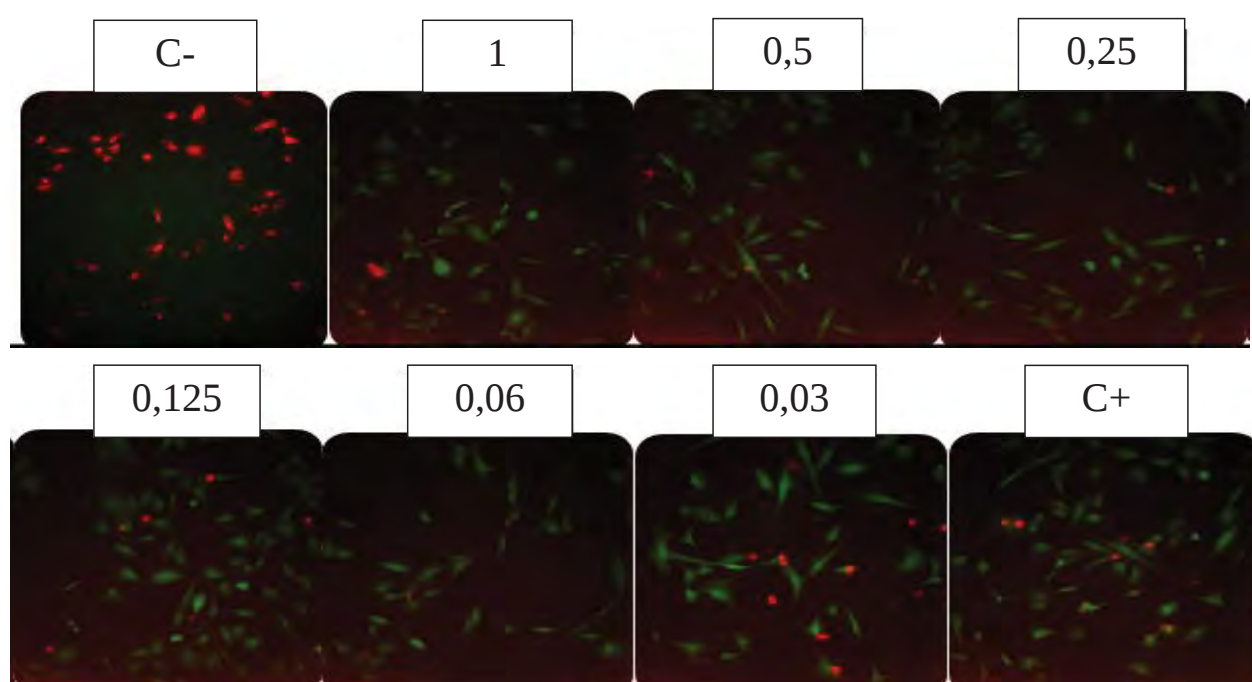


Figura 13: Ensaio de citotoxicidade em células HepG2 empregando o kit LIVE/DEAD contra o galato de decila. As células vivas estão coradas de verde e as células mortas coradas de vermelho.

Perfil proteômico

Os extratos totais de proteínas de cada situação foram submetidos à eletroforese bidimensional, corados por azul de *Coomassie* para a análise da expressão das diversas proteínas de acordo com os pontos isoelétricos e com a massa molecular.

A tabela 5 apresenta o número de *spots* e sua porcentagem em relação ao número total de *spots* dentro de uma condição (ex: sem tratamento). Por meio da tabela é possível correlacionar os *spots* detectados em cada condição demonstrando a faixa de pI e a faixa de massa molecular encontrada.

Tabela 5: Análise de spots após eletroforese bidimensional por faixas de pH e massa molecular relacionado ao número de *spots* de cada condição.

	Condições (tratamento)	Faixas de pI			Total de spots	Faixas de massa molecular (KDa)					Total de spots
		4-5	5,1-6	6,1-7		14-20	20-30	30-43	43-67	67-94	
01 <i>P. lutzii</i>	Sem	49 (37%)	59 (44%)	25 (19%)	<u>133</u>	09 (07%)	21 (16%)	52 (39%)	36 (27%)	15 (11%)	<u>133</u>
	Itraconazol	37 (47%)	28 (36%)	13 (17%)	<u>78</u>	01 (01%)	13 (17%)	20 (26%)	19 (24%)	25 (32%)	<u>78</u>
	galato de decila	26 (20%)	61 (48%)	40 (32%)	<u>127</u>	06 (05%)	27 (21%)	42 (33%)	38 (30%)	14 (11%)	<u>127</u>
	anfotericina B	57 (50%)	46 (41%)	10 (9%)	<u>113</u>	04 (04%)	16 (14%)	30 (26%)	26 (23%)	37 (33%)	<u>113</u>
18 <i>P. brasiliensis</i>	Sem	382 (33%)	429 (38%)	330 (29%)	<u>1141</u>	50 (05%)	130 (11%)	391 (34%)	376 (33%)	194 (17%)	<u>1141</u>
	Itraconazol	174 (34%)	206 (40%)	131 (26%)	<u>511</u>	21 (04%)	54 (11%)	194 (38%)	163 (32%)	79 (15%)	<u>511</u>
	galato de decila	222 (29%)	368 (47%)	188 (24%)	<u>778</u>	44 (06%)	116 (15%)	195 (25%)	280 (36%)	143 (18%)	<u>778</u>
	anfotericina B	312 (36%)	365 (42%)	198 (22%)	<u>875</u>	72 (08%)	139 (16%)	260 (30%)	220 (25%)	184 (21%)	<u>875</u>

Foi possível observar, para ambos os fungos testados, que na condição sem tratamento o número total de *spots* é maior do que nas outras condições. O número de *spots* encontrados nas quatro condições para Pb18 é maior do que em relação ao Pl01.

Em uma análise isolada do perfil protéico do fungo Pb18 e Pl01 em relação ao pI, foi verificado que o maior número de *spots* (em torno de 50%) na faixa de pH 5,1-6 se encontrava no caso de Pb18, em todas as condições, e Pl01 nas condições sem tratamento e tratado com galato de decila, e nas condições com itraconazol e anfotericina B um maior número de *spots* se encontrava na faixa de pI 4-5. Em relação à massa molecular, para o extrato protéico do fungo

Pb18 verifica-se maior número de *spots* (em torno de 30 %) na faixa de massa molecular de 30-43 KDa nas condições sem tratamento e tratado com galato de decila, e na faixa de 67-94 KDa nas condições de tratamento com itraconazol e anfotericina B. Já para o fungo Pl01 nota-se que nas condições sem tratamento, tratado com itraconazol e anfotericina B maior número de *spots* (em torno de 30%) na faixa de massa molecular de 30-43 KDa, e quando tratado com galato de decila na faixa de 43-67 KDa.

As figuras 14 e 15 (Pl01) e 16 e 17 (Pb18) apresentam géis com os perfis protéicos das condições sem tratamento e tratados com itraconazol, galato de decila e anfotericina B, respectivamente.

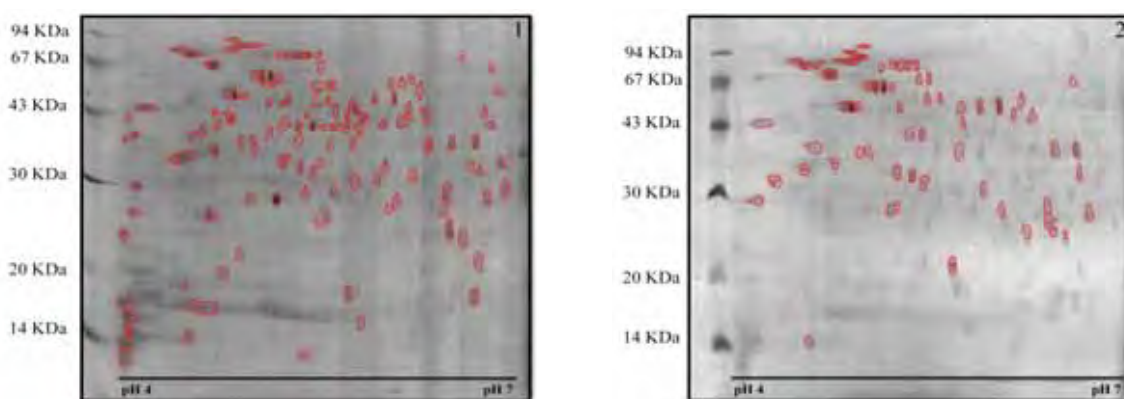


Figura 14: Eletroforese bidimensional de Pl01 1) sem tratamento; 2) tratado com itraconazol

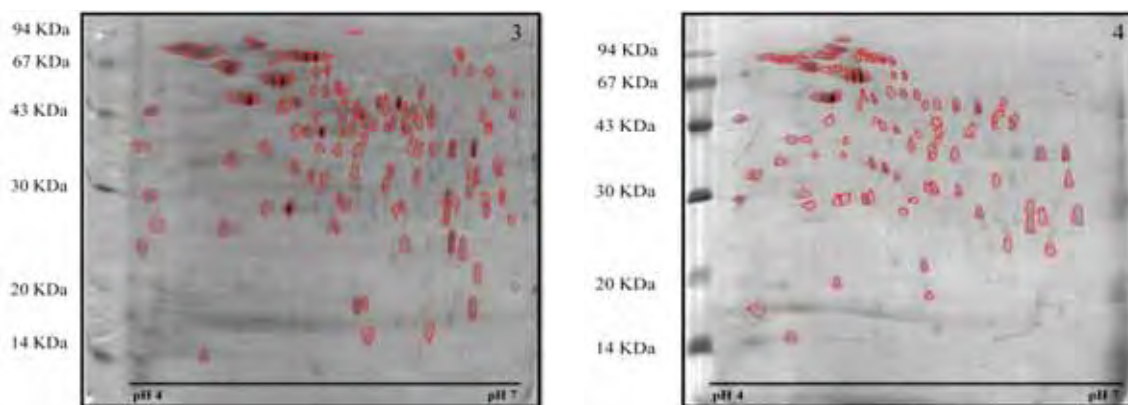


Figura 15: Eletroforese bidimensional de Pl01 3) tratado com galato de decila; 4) tratado com anfotericina B.

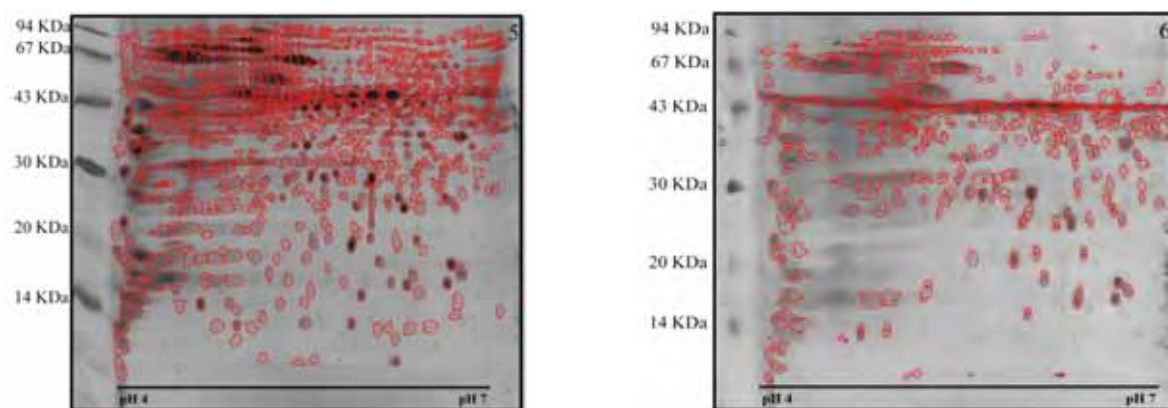


Figura 16: Eletroforese bidimensional de Pb18 5) sem tratamento; 6) tratado com itraconazol.

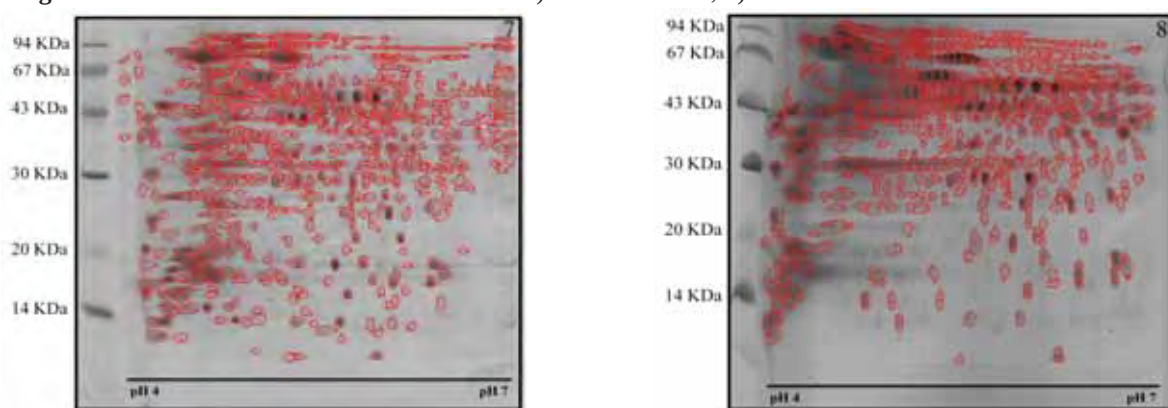


Figura 17: Eletroforese bidimensional de Pb18 7) tratado com galato de decila; 8) tratado com anfotericina B.

A análise comparativa dos géis foi realizada por meio de *software Image Master 2D Platinum*, determinando o número e localização dos *spots*, bem como os valores dos pH e massas moleculares. A tabela 6 demonstra o total de *spots* compatíveis na comparação dos géis sem tratamento com os tratados. Dessa maneira é possível observar que o número de *spots* compatíveis, na condição de tratado com galato de decila, é maior em relação às outras comparações. Tendo em vista o número de *spots* total de 133 de *Pl01* e 1141 de *Pb18*, da condição sem tratamento, é possível afirmar que em torno de 61 % e 43 % dos *spots*, respectivamente, presentes na condição de tratamento com galato de decila estão presentes na condição sem tratamento.

Tabela 6: Análise comparativa preliminar das eletroforeses bidimensionais das células do complexo *Paracoccidioides* sem tratamento e após tratamento com itraconazol, galato de decila e anfotericina B.

Condições		<i>Pl01</i>	<i>Pb18</i>
		números de <i>spots</i> compatíveis	
Sem tratamento	itraconazol	57	229
	galato de decila	81	487
	anfotericina B	70	463

Em vista do grande número de *spots* compatíveis encontrados, foram selecionados 58 e 51 *spots*, dos géis da condição sem tratamento de *Pl01* e *Pb18*, respectivamente, seguindo critérios como *spots* isolados, com definição e em que a expressão estivesse aumentada, diminuída ou ausente, nas condições de tratamento, segundo o programa de análise utilizado. Tais *spots* foram selecionados para a identificação por meio de espectrometria de massas para sequenciamento. A tabela 7 demonstra a ausência e a presença de *spots* em cada condição em relação à condição sem tratamento, mostrando um menor número de *spots* para ambos os isolados em relação à ausência da expressão quando comparado com a situação de não tratado.

Tabela 7: Número de *spots* presentes e ausentes em análise comparativa preliminar das eletroforeses bidimensionais das células do complexo *Paracoccidioides* sem tratamento e após tratamento com itraconazol, galato de decila e anfotericina B.

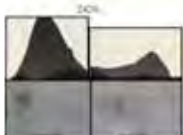
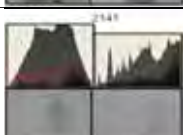
		<i>Pl01</i>	<i>Pb18</i>
		Número de <i>spots</i> em relação a condição sem tratamento	
Presente	anfotericina B	40	39
	Itraconazol	39	23
	galato de decila	44	43
Ausente	anfotericina B	18	13
	Itraconazol	19	28
	galato de decila	14	8

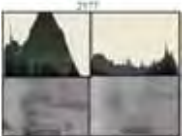
Análise da espectrometria de massas

Os quadros 1 e 2 apresentam as imagem dos spots no gel e em representação 3D nas condições sem tratamento e tratados com galato de decila, assim como suas respectivas identificações e suas descrições, pelo programa de análise NCI e Swiss databank, e as possíveis funções (<http://www.uniprot.org/> e na literatura em relação a *Paracoccidioides* sp). Através de MALDI-TOF/TOF, foi possível a identificação de proteínas com várias funções principalmente envolvendo mecanismos de adesão e produção de energia celular do fungo. Na continuação foram previamente selecionadas oito proteínas de *Pb18* e seis de *Pl01*, as quais foram mais

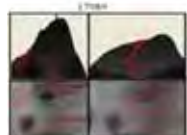
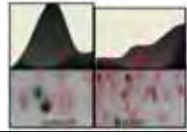
pertinentes a este estudo. As proteínas selecionadas, no programa de análise Image Master Platinum, foram classificadas como sendo não expressas quando o fungo foi tratado com galato em relação à condição sem tratamento, apesar de algumas revelarem na representação 3D alguma forma de expressão. Pesquisas na literatura foram realizadas sobre a descrição da função das mesmas. De acordo com esses dados verifica-se que a proteína igualmente inibida foi a 14-3-3, em ambos os fungos.

Quadro 1: Análises das proteínas destacadas para PI01

Isolado	Site	Código de acesso	MM	Score	Descrição	Função	
PI01	Swiss	PURA_CANGA	48206	41	Adenylosuccinate synthetase <i>Candida glabrata</i>	Crescimento celular (Wang X, Akasaka R <i>et al.</i> , 2011)	
	NCBI	gb AAP22960.1 	33506	303	14-3-3-like protein <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Adesão (Silva, 2011)	
	NCBI	gb AAR24348.1 	29624	132	14-3-3-like protein 2 <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Adesão (Silva, 2011)	
	NCBI	ref XP_002791250.1 	22054	76	conserved hypothetical protein <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb01	-	
	Swiss	AP1G1_YEAST	93566	38	AP-1 complex subunit gamma-1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Formação de vesículas carreadoras (Andreotti, Monteiro Da Silva <i>et al.</i> , 2007)	

	Swiss	G3P2_CANGA	35871	29	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2 <i>Candida glabrata</i>	Adesão (Barbosa, Bão <i>et al.</i> , 2006)	
--	-------	----------------------------	-------	----	---	---	---

Quadro 2: Análises das proteínas destacadas para Pb18

Isolado	Site	Código de acesso	MM	Score	Descrição	Função	
Pb18	NCBI	gb AAR24348.1 	29624	253	14-3-3-like protein 2 <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Adesão (Silva, 2011)	
	Swiss	CD123_YARLI	42479	35	Cell division cycle protein 123 <i>Yarrowia lipolytica</i>	Regulação do crescimento celular (Albuquerque, Nakayasu <i>et al.</i> , 2008)	
	NCBI	ref XP_002795760.1 	18292	64	ran-specific GTPase-activating protein <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb01	Eventos de sinalização (Bischoff, Krebber <i>et al.</i> , 1995),	
	Swiss	CBP6_YEAST	18667	41	Cytochrome B pre-mRNA-processing protein 6 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cadeia respiratória (Gampel e Tzagoloff, 1987)	

	NCBI	gb EEH21738.1 	15837	104	superoxide dismutase <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb03	Auxilia na proteção da mitocôndria contra danos oxidativos (Sturtz, Diekert <i>et al.</i> , 2001)	
	NCBI	gb EEH2022.1 	74613	176	transketolase <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb03	ciclo do ácido tricarboxílico (Rezende, Borges <i>et al.</i> , 2011)	
	NCBI	gb EEH23185.1 	34454	180	malate dehydrogenase <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb03	Via das pentoses fosfato (Rezende, Borges <i>et al.</i> , 2011)	
	NCBI	gb EEH47975.1 	47241	164	enolase <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb18	Adesão Marcos, 2011),	

Análise PCR tempo real

Dessa maneira, estudos de expressão gênica para as mesmas foram iniciados. Para a PCR em tempo Real, foram desenhados oligonucleotídeos específicos para genes codificantes de proteínas que foram diferencialmente expressas nos ensaios de perfil proteômico: 14-3-3-like, 14-3-3-like-2, RanGTP, Enolase, Gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase, Malato desidrogenase (MLD) e tranacetolase (TCL), sendo utilizado o gene da proteína ribossomal L34 como controle. Tais proteínas foram selecionadas primeiramente por pertencerem a grupos de proteínas essenciais para a via de produção de energia do fungo e de adesão às células do hospedeiro.

A expressão relativa indica o número de vezes em que o gene foi variavelmente expresso sob determinada situação. Nestes resultados podemos observar que após os isolados *P. brasiliensis* 18 e *P. lutzii* 01 serem tratados com galato de decila, houve uma diminuição na expressão para todos os genes avaliados (figura 18).

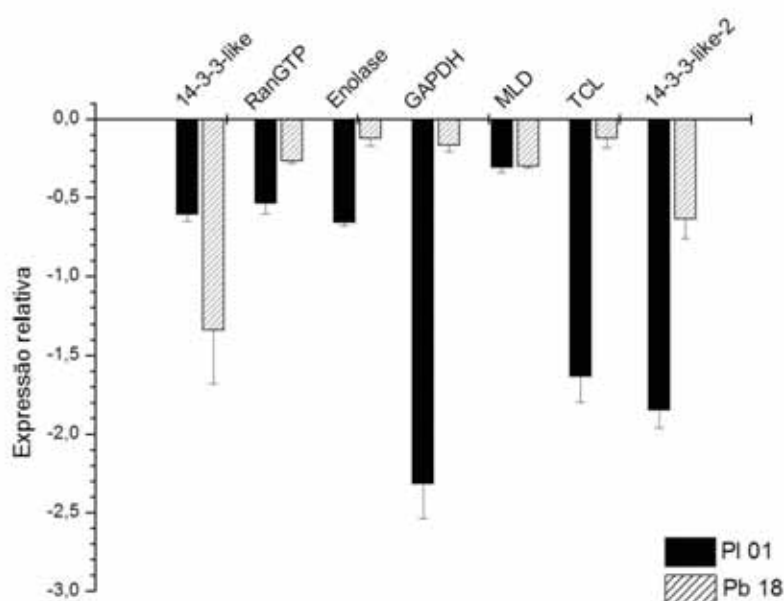


Figura 18: Expressão relativa dos genes 14-3-3-like, RanGTP, Enolase, GAPDH, MLD, TCL e 14-3-3-like-2 de Pb18 e PI01 após tratamento com galato de decila.

5. DISCUSSÃO

Com a necessidade de testes mais confiáveis para a determinação da CIM para o complexo *Paracoccidioides*, este estudo teve como objetivo inicial aplicar o teste de sensibilidade, uma vez que para este fungo não existe normatização no documento M27-A2 padronizado pelo CLSI (2002).

Esse complexo assume importância pelas altas taxas de mortalidade e morbidade, além de se desconhecer se os casos refratários ao tratamento são devidos à presença de cepas resistentes. Isto se deve a falta de aplicação rotineira destes testes. Por outro lado, há problemas metodológicos devido ao crescimento lento do fungo, fator esse que interfere consideravelmente na visualização do valor de CIM e no teste de concentração fungicida mínima (MFC).

Em nosso estudo foi utilizada a metodologia de macrodiluição e microdiluição baseada no documento M27-A2. No entanto, foi verificada dificuldade para a leitura visual da CIM, apesar de na literatura haver relatos desse teste (Nakai, Uno *et al.*, 2003; Johann, Cisalpino *et al.*, 2010; Johann, Sá *et al.*, 2010), porém, esses autores utilizaram modificações díspares da metodologia padronizada pelo documento.

Em uma avaliação preliminar verificou-se falta de crescimento significativo da massa fúngica no teste de microdiluição que confirmasse uma leitura visual fidedigna. Assim, foi padronizado o uso do reagente *Alamar blue*®, durante a realização do teste de sensibilidade, o qual funciona como um indicador de viabilidade celular usando o poder redutor de células vivas para medir quantitativamente a proliferação celular. Portanto, foram feitos testes de macrodiluição e microdiluição com Pb18 e Pl01, empregando o reagente *Alamar blue*® na placa de microdiluição e nos tubos de macrodiluição na mesma proporção.

Realizando a comparação preliminar desses dados pode-se notar que além das leituras visuais da CIM tornarem-se bem mais evidentes, os valores de CIM encontrados na macrodiluição são equivalentes aos da microdiluição (figuras 2 a 6), além de estarem na faixa de CIM desses antifúngicos encontrados na literatura, como mostra a tabela 8. Nesta verifica-se diversos trabalhos utilizando a macrodiluição no teste de sensibilidade para *P. brasiliensis* (Rodero, Canteros *et al.*, 1999; Hahn e Hamdan, 2000b; a; Hahn, Fontes *et al.*, 2002; Hahn,

Morato Conceição *et al.*, 2003), os quais seguiram a metodologia para o teste sugerida por outro autor Shadomy *et al* (1987), e os outros autores seguiram a metodologia sugerida pelo documento M27-A padronizado pelo NCCLS (Mcginnis, Pasarell *et al.*, 1997; Rodero, Canteros *et al.*, 1999). Há também os trabalhos que descrevem o uso do teste de sensibilidade em microdiluição que segue o documento M27-A padronizado pelo NCCLS, com modificações (Nakai, Uno *et al.*, 2003; Johann, Cisalpino *et al.*, 2010; Johann, Sá *et al.*, 2010).

As modificações propostas por NAKAI *et al* (2003), em que descrevem o uso de uma inóculo final com um maior número de células do que descreve o documento M27-A2, as quais alteram de forma significativa o que é preconizado, justificando essa modificação pelo fato do fungo *Paracoccidioides* ser de crescimento lento, contribuiria para a visualização da massa fúngica, melhorando a identificação da CIM. Porém, com a intenção de seguir corretamente o documento M27-A2 padronizado pelo CLSI, o uso do reagente *Alamar blue*® Cell Viability, torna o teste mais sensível e confiável, já que este reagente pode detectar menos de 50 células viáveis por poço.

Por ser um reagente sensível, dispensaria o teste de MFC, considerando que para este caso, tal teste na maioria das vezes é inconclusivo, já que o longo período de incubação da placa, com a alíquota plaqueada, resulta na desidratação do meio de cultura sólido, e consequentemente a morte de células possivelmente viáveis, levando a um falso negativo. No mesmo sentido, podemos avaliar assim, que para o método em microdiluição de sensibilidade de antifúngicos com a adição do reagente *Alamar blue*®, a CIM determinada poderia ser considerada como a CFM, já que é um método sensível para a viabilidade celular fúngica.

Desse modo, a aplicação do teste de sensibilidade ao gênero *Paracoccidioides spp* com a adição do reagente de viabilidade *Alamar blue*® tornou-se um teste confiável e reprodutível.

Caracterizando a aplicação do MABA, como uma ferramenta de agilidade e precisão, o teste foi estendido a mais seis diferentes isolados de *Paracoccidioides spp*, confirmando-se que esta metodologia é aplicável a um grande número de situações.

Comparando os valores de CIM dos agentes antifúngicos testados contra os diferentes isolados de *Paracoccidioides spp* (tabela 1), observa-se que para os agentes antifúngicos

itraconazol e anfotericina B os valores encontram-se dentro das faixas esperadas observadas na literatura (tabela 8). Aparentemente não houve diferença entre as duas espécies estudadas em relação à ação de ambos os antifúngicos.

Tabela 8: Valores de CIM para testes de sensibilidade em microdiluição e macrodiluição encontrados na literatura.

Referências	CIM (mg/L)		Metodologia
	anfotericina B	Itraconazol	
NAKAI, T. <i>et al</i> , 2003	0,25/0,015	<0,0039	Método de microdiluição em caldo de acordo com o documento M27-A do NCCLS
HAHN, R. C. <i>et al</i> , 2002	-	0,125-0,01	Método de macrodiluição em caldo de acordo com Shadomy, S. <i>et al</i> , 1987
HAHN, R. C. <i>ET AL</i> , 2003	1	0,125	
HAHN and HAMDAM, 2000 (a)	1-0,250	0,5-0,0009	
McGINNIS, M. R. <i>et al</i> , 1997	4-0,125	1-0,03	Método de macrodiluição em caldo de acordo com o documento M27-A do NCCLS
RODERO, L. <i>et al</i> , 1999	0,16-<0,02	1,3-0,31	Review
ESPINEL-INGROFF, 2003	0,25/0,015	<0,01	

É possível ainda, observar que o isolado 01 de *P. lutzii* apresentou os menores valores de CIM para os dois antifúngicos, assim é possível inferir que este isolado apresentou maior sensibilidade a estes do que os outros. Estudos mais precisos e direcionados devem ser realizados posteriormente, mas estas discrepâncias nos valores podem ser devido à significativa diferença morfológica entre os isolados da mesma espécie e até entre as duas espécies, revelando o quão diferente é a influencia dos antifúngicos aos diferentes isolados.

Finalizada toda a padronização do teste de sensibilidade para o complexo *Paracoccidioides* foi realizado o teste com ácido gálico e 15 galatos contra os oitos isolados deste gênero. Este estudo contribuiu para o conhecimento da atividade antifúngica dessas substâncias contra os diferentes isolados, já que estes diferem quanto a características morfológicas e biomoleculares (Bagagli, Bosco *et al.*, 2006; Bagagli, Theodoro *et al.*, 2008; Carrero, Niño-Vega *et al.*, 2008; Teixeira, Theodoro *et al.*, 2009).

O ácido gálico possui uma ampla faixa de atividades biológicas, tais como antioxidante, antibacteriana, antiviral, analgésica. Como antioxidante o ácido gálico atua como agente antiapoptótico e ajuda a proteger células humanas contra danos oxidativos (TREVIÑO-CUETO *et al*, 2007). 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. 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 *et al*, 2001), 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*, 2011), *Euphorbia lunulata* (Yang *et al* 2011), folhas, caules e raízes de variedades diferentes de *Labisa pumila Benth* (Karimi *et al*, 2011), *Zingiber officinale* Roscoe (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).

Alchornea glandulosa POEPP. & ENDL. (Euphorbiaceae) é uma árvore de 10-20 m popularmente conhecida como tapiá, tanheiro-de-folha-redonda, tanheiro, ou canela-raposa. Encontrada nas regiões sudeste e sudoeste do Brasil, principalmente na floresta Atlântica. A literatura descreve que a *A. glandulosa* contém, entre outras substâncias, o ácido gálico. (Calvo *et al* 2007).

Há na literatura, trabalhos com ácido gálico e galatos, especialmente estudos focados na relação estrutura atividade destas substâncias. Desde 1995, Kubo *et al*, avaliam a atividade antimicrobiana de uma serie de alcoóis de cadeia longa sintéticos e aqueles naturalmente encontrados. Estes foram testados contra 15 microrganismos, a fim de adquirir novos conhecimentos sobre suas funções estruturais, para os quais 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 e forma da célula, e espessura de parede. Tal estudo, portanto, exibiu uma regra geral aplicável para muitos outros compostos.

Da mesma forma, em 2001, Kubo *et al* em sua pesquisa para agentes antimicrobianos, selecionaram os 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 *S. cerevisiae*, *Z. bailii*, *C. albicans*, e *A. niger*. Por isso, o modo de ação fungicida do galato de octila contra *S. cerevisiae* foi estudada, considerando os estudos já realizados em Kubo *et al*, (1995). A estrutura cabeça polar e cauda apolar, e ainda a não atividade antimicrobiana específica do galato de octila, mostrou-se similar a aquela encontrada com os alcoóis de cadeia longa em muitos aspectos, assim 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. Uma vez que os próprios alcoóis possuem uma atividade antifúngica contra *S. cerevisiae*, pode ser levado em conta também que a esterase presente no interior da célula, a qual irá hidrolisar o galato de alquila para ácido gálico e os correspondentes alcoóis. Neste estudo, foi concluído que a atividade fungicida do galato de octila vem da capacidade de atuar como um agente surfactante não iônico, e que o comprimento da cadeia alquila não é a única contribuinte para a atividade antifúngica, mas possui um importante papel nessa atividade.

Da mesma forma, em estudos mais recentes 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, os quais foram estudados no intuito de analisar: o quão importante é considerar o microrganismo testado, a importância das hidroxilas, a influência do comprimento da cadeia e a hidrofobicidade destas substâncias. Assim, relataram que os dermatófitos são mais sensíveis e que a hidroxila é uma estrutura necessária, mas não única para a atividade (Leal, Mascarello *et al.*, 2009).

Em nosso estudo, o ácido gálico para a maioria dos isolados, apresentaram valores de CIM menores que 62,5 mg/L, atividade antifúngica esta considerada não relevante. A mesma faixa de valores se observa para os galatos de metila e etila, para os quais o processo de esterificação na molécula original de ácido gálico não melhorou a atividade antifúngica, considerando que os valores de CIM encontrados para estes três foram significativamente maiores do que os valores encontrados para outros galatos.

É possível observar que a partir do galato de propila até o galato de hexila, desconsiderando os galatos ácido 3,4,5- triacetoxibenzóico, e os de i-propila e i-butila, observamos que os valores de CIM variaram de 7,81 a 0,244 mg/L para *P. lutzii*, sendo que o

isolado 8334MMT apresentou os maiores valores de CIM para a maioria dos galatos dessa faixa, e valores de CIM de 7,813 a 0,122 mg/L para *P. brasiliensis*, sendo que o isolado Epm83 apresentou os menores valores de CIM para a maioria dos galatos dessa faixa.

Analisando os valores de CIM dos galatos n-propila com i-propila e n-butila com i-butila, observamos que tais valores permanecem constantes ou com diferença de uma casa, o que não é considerado relevante em relação a potencia da atividade antifúngica. Assim, tal situação mostra que a disposição da cadeia nada influenciou, neste caso, na melhora da atividade antifúngica destes galatos.

Ainda é possível observar que para o isolado Epm83, o galato ácido 3,4,5-triacetoxibenzóico apresentou melhor atividade antifúngica do que para os outros isolados, de 6 a 3 vezes melhor, assim este galato tem ação diferenciada para este isolado, podendo inferir, de acordo com a diferença disposição desta molécula, que os alvos influenciados por este são diferentes daqueles influenciados nos outros isolados, e/ou que a morfologia deste isolados, que se diferencia significativamente dos demais, pode interferir de forma relevante na atividade antifúngica desta substância.

Por outro lado, analisando a partir do galato de heptila até dodecila, é possível fazer a associação de quanto maior a cadeia carbônica menor o valor de CIM, assim melhor é a atividade antifúngica, por mais que estes valores sejam razoavelmente discrepantes entre si em relação aos diferentes isolados, variando de 0,244 a 0,031 mg/L para *P. lutzii*, e de 0,488 a 0,004 mg/L para *P. brasiliensis*, com exceção dos isolados 01 e D03 que mantiveram constante o valor em 0,122 mg/L. Apesar da discrepância, foi possível observar que o galato de decila apresenta o valor de CIM mais baixo (0,122 a 0,004 mg/L) para a maioria dos isolados.

Pôde ser analisado ainda, que o padrão que foi observado, ou seja, valor de CIM inversamente proporcional ao tamanho da cadeia, foi interrompido para o galato de tetradecila contra a maioria dos isolados, apresentando valores de CIM maiores, mostrando assim uma relação limite de atividade tamanho da cadeia, o chamado *cutoff*. Tal efeito ainda poderia ser estudado mais profundamente, com o acréscimo de galatos com cadeias carbônicas maiores que o galato de tetradecila, já que o aumento dos valores encontrado foi de apenas uma casa para a maioria dos isolados.

É possível notar ainda que os valores de CIM da maioria dos galatos se encontram iguais, próximos ou menores que os valores dos antifúngicos anfotericina B e itraconazol, o que ressalvam a importância dessas substâncias como promissores agentes antifúngicos.

Há dados na literatura de bioprospecção de novas substâncias, como os de JOHANN *et al* 2010(a), no qual apresentam que a fração hexânica de um extrato hidroalcoólico de *Piper regnelli* e *Baccharis dracunculifolia* foram considerados ativos contra *P. brasiliensis*, com valores de CIM de 7,8 µg/mL e 7,8-30 µg/mL, respectivamente. Em outro estudo, JOHANN *et al* 2010(b), apresentam estas frações subdivididas em outros quatro compostos, por meio de vários procedimentos cromatográficos, e mostra que um deles, o composto denominado de esquinol apresentou CIM de 7,5 a 125 µg/mL para todos os isolados de *P. brasiliensis* estudados. Além disso, todas essas substâncias foram testadas com agentes antifúngicos comerciais, e o único que se destacou nos testes de sinergismo foi o composto esquinol.

Considerando o fato da bioprospecção de novas substâncias antifúngicas, podemos fazer uma análise comparativa, sem levar em conta a estrutura-atividade, mas sim que os galatos apresentaram melhor atividade anti-*Paracoccidioides* do que as substâncias trabalhadas por JOHANN *et al* (2010 a e b), ou seja, os galatos apresentam valores de CIM consideravelmente menores para a maioria dos isolados testados, relevando a importância do estudo desses galatos.

A literatura ainda apresenta valores de CIM de alguns galatos contra outros gêneros, como mostra a tabela 9, a qual relaciona o trabalho de diversos autores com o uso de galatos e outros microrganismos. Assim, deve-se destacar que neste estudo foram avaliados pela primeira vez os galatos no complexo *Paracoccidioides*.

Tabela 9: Valores de CIM de diversos fungos contras alguns galatos.

	Zb	Ca	Na	Sc	Zb	Ca	Sc	Sc	Zb	Ca	Ct	Sc	Cn	Afu	Afl	An	Mg	Ef	Tr	Tm
ácido gálico	-	-	-	-	-	-	>3200	>3200	>3200	-	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	100	100	50
metila	-	-	-	-	-	-	>3200	-	-	-	>250	>250	>250	>250	>250	>250	100	100	100	100
etila	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>250	>250	>250	>250	>250	>250	100	100	100	100
propila	-	400	3200	3200	>3200	3200	3200	3200	3200	400	>250	>250	>250	>250	>250	>250	75	100	50	100
butila	-	-	-	--	-	-	-	-	-	-	>250	>250	>250	>250	>250	>250	50	100	50	100
pentila	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>250	>250	>250	>250	>250	>250	50	100	50	50
hexila	800	-	-	-	-	--	400	-	-	-	>250	>250	>250	>250	>250	>250	25	25	25	25
heptila	400	-	-	-	-	-	100	-	-	-	100	100	62,5	100	100	100	6,25	6,25	6,25	12,5
octila	100	-	50	25	50	25	12,5	12,5	50	-	62,5	50	50	62,5	62,5	62,5	6,25	6,25	6,25	12,5
nonila	25	-	-	-	-	-	6,25	-	-	-	8	8	8	62,5	62,5	125	8	25	8	8
decila	-	-	-	-	-	-	12,5	12,5	-	-	100	100	50	100	>250	>250	50	25	12,5	100
undecila	-	-	-	-	-	-	50	-	-	-	200	200	100	>250	>250	>250	125	-	12,5	100
dodecila	-	-	>400	>1600	>1600	>400	>1600	>1600	>1600	-	>250	>250	>250	>250	>250	>250	100	-	50	50
tetradecila	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>250	>250	>250	>250	>250	>250	100	>250	50	50
Autores	1	2	3				4	5		6	7									

Zb: *Zygosaccharomyces bailii*, Ca: *Candida albicans*, An: *Aspergillus niger*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Ct: *Candida tropicalis*, Cn: *Cryptococcus neoformans*, Afu: *Aspergillus fumigatus*, Mg: *Microsporum gypseum*, Ef: *Epidermophyton floccosum*, Tr: *Trichophyton rubrum*, Tm: *Trichophyton mentagrophytes*. 1- (Kubo, 1999), 2- (Strippoli, Dauria et al., 2000), 3- (Kubo, Xiao et al., 2001), 4- (Fujita e Kubo, 2002a), 5- (Fujita e Kubo, 2002b), 6- (Xu, Pang et al., 2006), 7- (Leal, Mascarello et al., 2009).

Ao realizar uma análise dos dados da literatura em que os galatos frente a outros microrganismos apresentaram CIM consideravelmente superiores aos encontrados neste trabalho, conclui-se que para o complexo *Paracoccidioides*, tais galatos são promissores como antifúngicos, fato este que ressalva a importância de estudos mais específicos para o correto mecanismo de ação destas substâncias.

De acordo com os testes realizados de citotoxicidade MTT, os três galatos com melhor atividade antifúngica não apresentaram citotoxicidade contra as quatro linhagem celulares a partir da concentração 0,5 mg/L. Outro fato destacável é o índice de seletividade (IS) encontrado, pois a maior segurança de uma substância está relacionada ao seu IS. Nesse sentido, observa mos que os três galatos com melhores valores de CIM apresentaram IS acima de 10 para todos os isolados testados, revelando que todos são relativamente seguros, afirmando ainda que o galato de decila pode ser considerado o antifúngico mais eficaz e mais seguro.

No teste de citotoxicidade utilizando o kit LiveDead, o qual avalia atividade das enzimas esterases, verifica-se que o galato de decila, para linhagem celular hepática Hep-G2, não apresentou citotoxicidade, já que nas concentração acima e no CIM , as células mantiveram a atividade desta enzima, ou seja, as células foram coradas de verde.

Já no teste de MTT, que avalia atividade mitocondrial, pode-se observar que na concentração de 1 mg/L dos três galatos testados, incluindo o galato de decila, apresentam citotoxicidade, já que é conhecido que galatos tem como principal alvo a inibição da atividade mitocondrial (Nakagawa, Nakajima *et al.*, 1995; Nakagawa, Moldéus *et al.*, 1996), por outro lado, nas concentrações seguintes (menores), envolvendo os valores de CIM de todos os isolados para estes galatos, não foi observado citotoxicidade, o que ressalva a importância do desenvolvimento de novos estudos com este galato.

Vincular substâncias bioativas aos seus alvos celulares e moleculares é um desafio central na descoberta e desenvolvimento novos fármacos. Dessa maneira, estudamos aqui o ácido gálico e galatos de alquila, substâncias estes com ampla atividade biológica e potente atividade anti-*Paracoccidioides*, revelando um bom candidato para o desenvolvimento de um antifúngico. Neste cenário, a identificação de alvos celulares de produtos naturais torna-se crucial para definir o seu efeito e o exato mecanismo de ação. Além disso, produtos naturais podem servir como

ponte entre a química, biologia e medicina, desempenhando o papel de sondas moleculares para o estudo de diferentes processos celulares em virtude da sua capacidade de se ligar a proteínas-alvos específicas e interferir nas funções celulares. Atualmente, o constante progresso na tecnologia analítica, e, sobretudo da espectrometria de massas, está abrindo caminho para o desenvolvimento de novas abordagens desempenhando um papel importante no campo de prospecção de alvos (Margarucci, Monti *et al.*, 2012).

Dessa maneira, as ferramentas proteômicas auxiliaram, preliminarmente, no estudo e compreensão da ação do galato de decila na via metabólica do fungo.

Dentre as várias proteínas identificadas, algumas se destacaram por já serem descritas na literatura e estarem envolvidas nos principais fatores de virulência e patogenicidade do complexo *Paracoccidoides*. Pela análise dessas proteínas foi possível observar que há uma diferença de expressão entre as células tratadas das não tratadas. Dessa maneira, a partir do quadro 1 e 2, foram selecionadas sete proteínas que apresentaram uma baixa expressão da proteína, redução esta suficiente para determinar que houve uma perda de expressão pós tratamento e então uma análise da expressão gênica foi realizada por PCR em tempo real (Real Time PCR), no intuito de analisar o efeito do galato de decila na regulação da expressão dos genes codificantes para estas proteínas.

Dessa maneira, vemos que os genes das proteínas RanGTP, enolase, GAPDH, TCL e 14-3-3-like-2 tiveram sua expressão diminuída após o tratamento com o galato de decila, sendo que os menores valores de expressão relativa foram observados para Pl01 em relação ao Pb18, sendo que GAPDH, TCL e 14-3-3-like-2 foram os que apresentaram a menor expressão, mostrando que tal galato pode interferir na expressão destes genes, interferindo assim na expressão proteica. Para Pb18, o gene codificante da proteína 14-3-3-like foi o que apresentou menor expressão relativa em relação ao Pl01 e a todos os outros genes, podendo concluir que para este isolado o galato de decila possui uma atividade diferente daquela exercida sob o isolado Pl01. MLD apresentou diminuição da expressão relativa equivalente para os dois isolados, podendo inferir que este galato influencia da mesma maneira nos dois isolados, apesar do valor da perda de expressão relativa desta proteína ter sido baixa.

Apesar da diminuição da expressão observada na PCR em tempo real ter sido baixa para todos os genes, este ensaio permite inferir que o galato de decila pode de fato interferir na regulação da expressão gênica, porém provavelmente o maior efeito observado seria diretamente nas proteínas, já que a maior diminuição de expressão observada foi para os experimentos de proteômica e não para PCR em tempo real.

Na tentativa de compreender a ação do galato na expressão de superóxido dismutase do complexo *Paracoccidioides* pode-se inferir que ou o galato age como um agente competidor (já que é um agente antioxidante) desta enzima, fazendo com que a célula expresse menos, ou que este galato interfere diretamente na via de produção desta enzima.

Em *Paracoccidioides*, superóxido dismutase é altamente expresso na fase leveduriforme, o qual protege a célula contra espécies reativas de oxigênio, que são produzidas durante a aceleração metabólica dos conídios, indicando um papel importante desta forma patogênica (Hernandez, Garcia *et al.*, 2011). Assim, a baixa expressão da enzima superóxido dismutase quando do tratamento com o galato, pode levar a danos na cadeia respiratória capaz de prejudicar a viabilidade do fungo.

A proteína de processamento do pre-mRNA citocromo B, que também está envolvida na cadeia respiratória (Gampel e Tzagoloff, 1987), pode ter sua expressão reduzida devido a influência do galato diretamente na produção dessa proteína ou pela influência dessa substância na cadeia respiratória e assim inibiria a produção dessa proteína.

Adenilsuccinato sintase é uma enzima ubíqua que catalisa o primeiro passo na conversão da inosina monofosfato para adenosina monofosfato na via biosintética de purina, considerado um passo crítico, pois esta enzima pode ser essencial para o desenvolvimento do microrganismo (Wang X, Akasaka R *et al.*, 2011). Considerando o complexo *Paracoccidioides*, a baixa expressão dessa enzima poderia então influenciar na viabilidade do fungo e/ou na sua patogenicidade.

A enzima do ciclo de divisão celular, identificada neste trabalho, também está envolvida na regulação do crescimento da célula fúngica, do ciclo de divisão celular (Albuquerque,

Nakayasu *et al.*, 2008), a qual também poderia inviabilizar a célula no caso de perda ou baixa expressão.

Estudos realizados em nosso laboratório mostraram que a proteína 30 kDa foi caracterizada por meio de sequenciamento de aminoácidos, como uma proteína pertencente à família 14-3-3 de *P. brasiliensis* (Andreotti, Monteiro Da Silva *et al.*, 2005), que interage com mais de 200 outras proteínas, apresentando assim uma ampla gama de funções. Contudo, apesar de já observada a função dessas proteínas em apoptose, transdução de sinal, regulação do ciclo celular e transcrição, seu exato papel nesses processos permanece desconhecido (Fu, Subramanian *et al.*, 2000). Esse grupo de proteínas deve funcionar como acessórias em vários processos, atuar como determinantes específicos que alteram a localização celular de outras proteínas, com as quais interagem e devem estar envolvidas na regulação direta de sua atividade enzimática (Van Hemert, Steensma *et al.*, 2001).

As proteínas 14-3-3 também participam da regulação e organização do citoesqueleto celular através da ativação de RhoGTPases (Jin, Smith *et al.*, 2004), como mediadora nas mudanças do citoesqueleto celular via integrinas, com importante papel na ativação de Rac e Cdc42 (Bialkowska, Zaffran *et al.*, 2003).

Estudos utilizando queratinócitos demonstraram que proteínas 14-3-3 são capazes de interagir com integrinas e modular sua capacidade de sinalização do lado extracelular (Santoro, Gaudino *et al.*, 2003; Wilker e Yaffe, 2004; Oh, Jang *et al.*, 2009). Além disso, sugeriram que esta interação induz desarranjos de hemidesmossomos na formação de contato focal, necessário para migração das células. Estes dados sugerem que as proteínas 14-3-3 participam da sinalização mediada por integrinas, tanto intracelular como extracelularmente (Santoro, Gaudino *et al.*, 2003; Wilker e Yaffe, 2004; Oh, Jang *et al.*, 2009). Esta proteína foi estudada também por (Arulpragasam, Magno *et al.*, 2012), que relatam que a mesma desempenha papel fundamental na reorganização da actina do citoesqueleto por meio de efeitos regulatórios sobre a sinalização de Rho e do seu receptor sensível a cálcio. Recentes estudos em nosso laboratório, também descrevem a proteína 14-3-3-like como uma adesina, sendo uma importante ferramenta de virulência do fungo, além de estar envolvida em processos biológicos

no interior da célula, elucidando mais uma vez que o galato de decila interfere em vias nas quais o fungo perde viabilidade (Silva, 2011).

Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é outra proteína identificada e caracterizada como adesina (Hernandez, Garcia *et al.*, 2011), que além de ser importante em diferentes processos celulares do fungo, como da via glicolítica e da gliconeogênese, desempenhando papel no catabolismo e anabolismo de carboidratos (Baynes & Dominiczak, 2000), e papel na glicólise (Sirover, 1999), esta molécula também pode estar localizada na parede celular e intervir na ligação *Paracoccidioides* com a matriz celular do hospedeiro, tendo um importante papel nos estágios iniciais de infecção, ou seja, na aderência e na colonização do *Paracoccidioides*, sendo consideradas então adesinas-like, ligantes de laminina, fibronectina e colágeno tipo I (Barbosa, Bão *et al.*, 2006).

Rezende *et al* (2011), sugeriram que na fase de transição micelial para leveduriforme, o fungo superexpressa a via pentose fosfato, a qual é a principal via de reciclagem de NADP⁺ para NADPH e para a produção de ribose-5-fosfato. As enzimas transdolase e transcetolase são induzidas durante a transição micélio-levedura, indicando a produção de frutose-6P e gliceraldeído-3P, os quais são utilizados pela célula para a produção de ATP via glicólise. Deduziram que a mudança na quantidade de enzima envolvida na glicólise e na via pentose fosfato deveria ser pelo acúmulo da molécula precursora na forma leveduriforme. A principal função da via fosfato pentose é proteger a célula contra intermediários reativos de oxigênio, uma função que é especialmente importante para a forma parasitária do fungo. Transdolase é a enzima-chave no percurso não-oxidativo da via que é responsável pela produção de NADPH. Notavelmente, a função primária desta via é manter a glutatona na forma reduzida, a qual providencia a proteção de grupos sulfídricos e a integridade celular de radicais de oxigênio. A enzima glutatona redutase foi constitutivamente expressa em todas as análises das fases do fungo. Analisando estas informações, podemos deduzir que o galato de decila bloqueando a expressão da transcetolase, interfere na via das pentoses fosfato, que como descrito acima, é uma via importante na forma parasitária do fungo.

A malato desidrogenase faz parte do ciclo do ácido cítrico, precursor do ciclo do ácido tricarboxílico, essenciais para a produção de energia pela célula. Em *P. brasiliensis* este ciclo

está envolvido diretamente com a via do glioxalato, que possui como enzimas-chaves a isocitrato liase e malato sintase, que possuem papel na patogenicidade e virulência (Zambuzzi-Carvalho et al., 2009). Além do seu papel no ciclo do glioxalato, também foi atribuído a malato sintase papel na viabilidade e crescimento de fungos no interior de macrófagos consequentemente no desenvolvimento da infecção fúngica disseminada (Olivas et al., 2007).

Enolase é uma enzima que está envolvida na desidratação reversível de 2-fosfo-D-glicerato à fosfoenolpiruvato nas vias glicolítica e gliconeogênese (PalBhowmick et al., 2004). Esta participa do metabolismo energético e a reação é dependente de Mg^{2+} . Entretanto, numerosas propriedades não-glicolíticas foram descritas para esta proteína, como a capacidade de interagir com actina e tubulina humana (Bhowmick et al., 2009). Possui alta afinidade pela fibronectina e laminina (Jolodar et al., 2003), ligação esta que facilita a adesão de alguns microrganismos às células do hospedeiro, e também se liga ao plasminogênio facilitando a invasão e disseminação de alguns patógenos.

Donofrio et al., (2009) identificaram em nosso laboratório uma molécula de 54 kDa, pI 5,6 que foi parcialmente caracterizada como enolase ligante de fibronectina, com o intuito de definirem a localização celular da enolase de *P. brasiliensis* durante a sua interação com pneumócitos sugeriram que esta encontra-se distribuída por toda a célula fúngica e desarranjos na conformação de actina, tubulina e citoqueratina foram observados em todos os períodos de infecção avaliados. Sugere-se que estas alterações estejam associadas ao mecanismo de adesão e invasão do patógeno à célula do hospedeiro (da Silva Monteiro, 2004). Posteriormente, a localização da enolase foi confirmada por meio da realização de experimentos de microscopia eletrônica, mostrando que esta proteína encontra-se tanto na parede celular como no citoplasma de *P. brasiliensis*, porém é mais abundante na parede celular, principalmente na situação de infecção aos pneumócitos e também quando o fungo foi cultivado em meio com acréscimo de sangue (Marcos, 2011).

O complexo AP-1 foi descrita por (Andreotti, Monteiro Da Silva et al., 2007), como sendo uma proteína de revestimento envolvida na formação de vesículas de transporte, sugerindo ser uma importante proteína da via e fator de virulência de *Paracoccidioides*.

A proteína RanGTPase ativa a RanGAP1 que tem funções essenciais tanto no transporte núcleo-citoplasmático quanto na mitose. Dessa maneira, pode-se acreditar que o galato de decila influencia em vias metabólicas importantes do fungo, inviabilizando-o. Importante ressaltar, que tais vias, também existentes nas células humanas não são afetadas, ou pelo menos, não são afetadas na concentração considerada como inibitória para o fungo, já que nos testes de citotoxicidade, foi alta a porcentagem de células viáveis até duas diluições acima da CIM. Contudo, foram encontradas proteínas alvos que podem ser promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos que possuam novos mecanismos de ação antifúngica.

6. CONCLUSÃO

1. Foi padronizado o teste de sensibilidade pelo método do micrométodo com adição do reagente *Alamar blue*, contribuindo assim para um teste mais rápido e eficaz;
2. Foi comparada atividade antifúngica, de anfotericina B (0,25-0,008 mg/L) e itraconazol (0,03-0,008 mg/L) com os ésteres semi-sintéticos de ácido gálico, mostrando que alguns galatos, como o galato de decila (0,125-0,004 mg/L) possui atividade antifúngica promissora;
3. A avaliação da citotoxicidade dos galatos, por ensaio de MTT e de viabilidade celular com o kit LIVE/DEAD®, mostrou que os três galatos com melhor atividade antifúngica não são citotóxicos às quatro linhagens de células estudadas;
4. A análise proteômica de *Pb* 18 e *Pl* 01 antes e após tratamento com o galato de decila, comparado com o tratamento dos mesmos com anfotericina B e itraconazol, demonstrou diferenças no perfil proteico, que podem sugerir diferentes mecanismos de ação induzidos por este galato;
5. A identificação de proteínas ausentes no tratamento com galato de decila levou a um parcial entendimento do papel dessas nos mecanismos de interação fármaco-fungo, e aparentemente, os galatos, como agentes antioxidantes, podem interferir em vias que se utilizam de reação de redox, e na interação inicial fungo-célula (adesão).

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ASSAD, A. L. D. O Contexto Brasileiro para a Bioprospecção: A competência Científico-Tecnológica Brasileiro. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, n. 29, p. 40-45, 2003.

ALBUQUERQUE, P. C. et al. Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. **Cell Microbiol**, v. 10, n. 8, p. 1695-710, Aug 2008. ISSN 1462-5822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18419773> >.

ANDREOTTI, P. F. et al. Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect**, v. 7, n. 5-6, p. 875-81, May 2005. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15862780> >.

_____. Identification of a gene encoding adaptin-like protein in the *Paracoccidioides brasiliensis* genome by random amplified polymorphic DNA analysis. **J Med Microbiol**, v. 56, n. Pt 7, p. 884-7, Jul 2007. ISSN 0022-2615. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17577051> >.

ANDRÉ, D. C. et al. Binding of laminin to *Paracoccidioides brasiliensis* induces a less severe pulmonary paracoccidioidomycosis caused by virulent and low-virulence isolates. **Microbes Infect**, v. 6, n. 6, p. 549-58, May 2004. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15158188> >.

ARULPRAGASAM, A. et al. The adaptor protein 14-3-3 binds to the calcium-sensing receptor and attenuates receptor-mediated Rho kinase signalling. **Biochem J**, v. 441, n. 3, p. 995-1006, Feb 2012. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22010828> >.

BABU, K. S. et al. Synthesis, antifungal activity, and structure-activity relationships of coruscanone A analogues. **J Med Chem**, v. 49, n. 26, p. 7877-86, Dec 2006. ISSN 0022-2623. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17181171> >.

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 2006. ISSN 1567-1348. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16473563> >.

_____. *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> >.

BAILÃO, A. M. et al. Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: representational difference analysis identifies candidate genes associated

with fungal pathogenesis. **Microbes Infect**, v. 8, n. 12-13, p. 2686-97, Oct 2006. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16962356> >.

BARBOSA, M. S. et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. **Infect Immun**, v. 74, n. 1, p. 382-9, Jan 2006. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16368993> >.

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> >.

BENARD, G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 209-21, 2008 Apr-May 2008. ISSN 0301-486X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18777630> >.

BENARD, G.; MENDES GIANNINI, M. J. **Textbook of Pediatric Infections Diseases - Paracoccidioidomycosis**. 6. Philadelphia: 2009. 2762-2776

BHAVSAR, A. P.; AUWETER, S. D.; FINLAY, B. B. Proteomics as a probe of microbial pathogenesis and its molecular boundaries. **Future Microbiol**, v. 5, n. 2, p. 253-65, Feb 2010. ISSN 1746-0921. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20143948> >.

BIALKOWSKA, K. et al. 14-3-3 zeta mediates integrin-induced activation of Cdc42 and Rac. Platelet glycoprotein Ib-IX regulates integrin-induced signaling by sequestering 14-3-3 zeta. **J Biol Chem**, v. 278, n. 35, p. 33342-50, Aug 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12810725> >.

BISCHOFF, F. R. et al. Human RanGTPase-activating protein RanGAP1 is a homologue of yeast Rna1p involved in mRNA processing and transport. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 5, p. 1749-53, Feb 1995. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7878053> >.

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> >.

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> >.

CARNEIRO, L. C. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* presents two different cDNAs encoding homologues of the fructose 1,6-biphosphate aldolase: protein isolation, cloning of the cDNAs and genes, structural, phylogenetic, and expression analysis. **Fungal Genet Biol**, v. 42, n. 1, p.

51-60, Jan 2005. ISSN 1087-1845. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15588996> >.

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> >.

CASOTTO, M. Characterization of the cellular antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form. **J Clin Microbiol**, v. 28, n. 6, p. 1188-93, Jun 1990. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2380351> >.

CHENG, S. et al. The role of *Candida albicans* NOT5 in virulence depends upon diverse host factors in vivo. **Infect Immun**, v. 73, n. 11, p. 7190-7, Nov 2005. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16239513> >.

CHIARELLA, A. P. et al. The relative importance of CD4+ and CD8+T cells in immunity to pulmonary paracoccidioidomycosis. **Microbes Infect**, v. 9, n. 9, p. 1078-88, Jul 2007. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17692551> >.

COLLINS, L. A.; FRANZBLAU, S. G. **Microplate Alamar Blue Assay versus BACTEC 460 System for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium***. : Antimicrob. Agents Chemother. 41: 1004-1009 p. 1997.

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> >.

COSTA, A. A. et al. Characterization of a gene which encodes a mannosyltransferase homolog of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect**, v. 4, n. 10, p. 1027-34, Aug 2002. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12191652> >.

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> >.

CRUZ, A. H. et al. Phosphorylation is the major mechanism regulating isocitrate lyase activity in *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. **FEBS J**, v. 278, n. 13, p. 2318-32, Jul 2011. ISSN 1742-4658. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21535474> >.

CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. The current role of the reference procedures by CLSI and EUCAST in the detection of resistance to antifungal agents in vitro. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 8, n. 3, p. 267-76, Mar 2010. ISSN 1744-8336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20192681> >.

CUNHA, D. A. et al. Heterologous expression, purification, and immunological reactivity of a recombinant HSP60 from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 9, n. 2, p. 374-7, Mar 2002. ISSN 1071-412X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11874881> >.

DA FONSECA, C. A. et al. Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect**, v. 3, n. 7, p. 535-42, Jun 2001. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11418327> >.

DA SILVA CASTRO, N. et al. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* PbDfg5p, a cell-wall protein implicated in filamentous growth. **Yeast**, v. 25, n. 2, p. 141-54, Feb 2008. ISSN 0749-503X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18098122> >.

DA SILVA, F. C. et al. Morphologic organization of pulmonary granulomas in mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 80, n. 5, p. 798-804, May 2009. ISSN 1476-1645. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19407127> >.

DA SILVA NETO, B. R. et al. The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a linked surface protein that behaves as an anchorless adhesin. **BMC Microbiol**, v. 9, p. 272, 2009. ISSN 1471-2180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20034376> >.

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 MATTOS GROSSO, D. et al. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. **Infect Immun**, v. 71, n. 11, p. 6534-42, Nov 2003. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14573675> >.

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> >.

DONOFRIO, F. C. et al. Enolase from *Paracoccidioides brasiliensis*: isolation and identification as a fibronectin-binding protein. **J Med Microbiol**, v. 58, n. Pt 6, p. 706-13, Jun 2009. ISSN 0022-2615. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19429745> >.

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> >.

DÍEZ, S. et al. Paracoccidioides brasiliensis 87-kilodalton antigen, a heat shock protein useful in diagnosis: characterization, purification, and detection in biopsy material via immunohistochemistry. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 2, p. 359-65, Feb 2002. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11825942> >.

FAVA NETTO, C. **Contribuição para o estudo imunológico da blastomicose de Lutz (Blastomycosesulamericana)**. São Paulo: Rev. Inst. A. Lutz. 21: 99-194 p. 1961.

FELIPE, M. S. et al. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus Paracoccidioides brasiliensis by EST analysis. **Yeast**, v. 20, n. 3, p. 263-71, Feb 2003. ISSN 0749-503X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12557278> >.

FERNANDES, L. et al. Transcriptional profile of ras1 and ras2 and the potential role of farnesylation in the dimorphism of the human pathogen Paracoccidioides brasiliensis. **FEMS Yeast Res**, v. 8, n. 2, p. 300-10, Mar 2008. ISSN 1567-1356. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17927766> >.

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-DA-CRUZ, M. F.; GALVÃO-CASTRO, B.; DANIEL-RIBEIRO, C. Isolation and antigenicity of a 45-kilodalton Paracoccidioides brasiliensis immunodominant antigen. **Infect Immun**, v. 60, n. 7, p. 2667-71, Jul 1992. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1612736> >.

FLAVIA POPI, A. F.; LOPES, J. D.; MARIANO, M. GP43 from Paracoccidioides brasiliensis inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. **Cell Immunol**, v. 218, n. 1-2, p. 87-94, 2002 Jul-Aug 2002. ISSN 0008-8749. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12470616> >.

FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **J Med Vet Mycol**, v. 25, n. 1, p. 5-18, Feb 1987. ISSN 0268-1218. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3553526> >.

FRANCO, M. et al. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **Curr Top Med Mycol**, v. 5, p. 115-49, 1993. ISSN 0177-4204. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8242798> >.

FU, H.; SUBRAMANIAN, R. R.; MASTERS, S. C. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 40, p. 617-47, 2000. ISSN 0362-1642. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10836149> >.

FUJITA, K.; KUBO, I. Antifungal activity of octyl gallate. **Int J Food Microbiol**, v. 79, n. 3, p. 193-201, Dec 2002a. ISSN 0168-1605. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12371654> >.

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

GAMPEL, A.; TZAGOLOFF, A. In vitro splicing of the terminal intervening sequence of *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome b pre-mRNA. **Mol Cell Biol**, v. 7, n. 7, p. 2545-51, Jul 1987. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3302680> >.

GANIKO, L. et al. Paracoccin, an N-acetyl-glucosamine-binding lectin of *Paracoccidioides brasiliensis*, is involved in fungal growth. **Microbes Infect**, v. 9, n. 6, p. 695-703, May 2007. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17400504> >.

GARCÍA BLANCO, S. et al. Differential PbP27 expression in the yeast and mycelial forms of the *Paracoccidioides brasiliensis* species complex. **Fungal Genet Biol**, Sep 2011. ISSN 1096-0937. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21945996> >.

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> >.

GOLDMAN, G. H. et al. Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. **Eukaryot Cell**, v. 2, n. 1, p. 34-48, Feb 2003. ISSN 1535-9778. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12582121> >.

GONZÁLEZ, A. et al. Purification and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* protein with capacity to bind to extracellular matrix proteins. **Infect Immun**, v. 73, n. 4, p. 2486-95, Apr 2005. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15784595> >.

_____. Involvement of extracellular matrix proteins in the course of experimental paracoccidioidomycosis. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 53, n. 1, p. 114-25, Jun 2008. ISSN 0928-8244. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18400008> >.

GÓMEZ, B. L. et al. Antigenemia in patients with paracoccidioidomycosis: detection of the 87-kilodalton determinant during and after antifungal therapy. **J Clin Microbiol**, v. 36, n. 11, p. 3309-16, Nov 1998. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9774584> >.

HAHN, R. C. et al. In vitro comparison of activities of terbinafine and itraconazole against *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 8, p. 2828-31, Aug 2002. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12149337> >.

HAHN, R. C.; HAMDAN, J. S. Effects of amphotericin B and three azole derivatives on the lipids of yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 7, p. 1997-2000, Jul 2000a. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10858371> >.

_____. In vitro susceptibilities of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form to antifungal drugs. **Mycoses**, v. 43, n. 11-12, p. 403-7, 2000b. ISSN 0933-7407. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11204357> >.

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> >.

HANNA, S. A.; MONTEIRO DA SILVA, J. L.; GIANNINI, M. J. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. **Microbes Infect**, v. 2, n. 8, p. 877-84, Jul 2000. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10962270> >.

HERNANDEZ, O. et al. Gene expression during activation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Yeast**, Aug 2011. ISSN 1097-0061. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21960298> >.

HERNÁNDEZ, O. et al. A 32-kilodalton hydrolase plays an important role in *Paracoccidioides brasiliensis* adherence to host cells and influences pathogenicity. **Infect Immun**, v. 78, n. 12, p. 5280-6, Dec 2010. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20876288> >.

_____. The hydrolase PbHAD32 participates in the adherence of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to epithelial lung cells. **Med Mycol**, Oct 2011. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21988701> >.

HUSØY, T.; SYVERSEN, T.; JENSSEN, J. Comparisons of four in vitro cytotoxicity tests: The MTT assay, NR assay, uridine incorporation and protein measurements. **Toxicol In Vitro**, v. 7, n. 2, p. 149-54, Mar 1993. ISSN 0887-2333. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20732183> >.

HWANG, L. et al. Identifying phase-specific genes in the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum* using a genomic shotgun microarray. **Mol Biol Cell**, v. 14, n. 6, p. 2314-26, Jun 2003. ISSN 1059-1524. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12808032> >.

IDNURM, A. et al. Cryptococcus neoformans virulence gene discovery through insertional mutagenesis. **Eukaryot Cell**, v. 3, n. 2, p. 420-9, Apr 2004. ISSN 1535-9778. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15075272> >.

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> >.

IZACC, S. M. et al. Molecular cloning, characterization and expression of the heat shock protein 60 gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol**, v. 39, n. 5, p. 445-55, Oct 2001. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12054056> >.

JIN, J. et al. Proteomic, functional, and domain-based analysis of in vivo 14-3-3 binding proteins involved in cytoskeletal regulation and cellular organization. **Curr Biol**, v. 14, n. 16, p. 1436-50, Aug 2004. ISSN 0960-9822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15324660> >.

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> >.

_____. 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> >.

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> >.

KASHINO, S. S. et al. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production. **J Interferon Cytokine Res**, v. 20, n. 1, p. 89-97, Jan 2000. ISSN 1079-9907. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10670655> >.

KATO, M. J. Global phytochemistry: the Brazilian approach. **Phytochemistry**, v. 57, n. 5, p. 621-3, Jul 2001. ISSN 0031-9422. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11397426> >.

KUBO, I. **CHEMTECH**: Bioorganic & medical chemistry. 29 1999.

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> >.

KUROKAWA, C. S.; SUGIZAKI, M. F.; PERAÇOLI, M. T. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 40, n. 3, p. 125-35, 1998 May-Jun 1998. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9830725> >.

LACAZ, C. S. **Paracoccidioides brasiliensis: morphology, evolutionary cycle, maintenance during saprophytic life, biology, virulence, taxonomy.** 1994.

LAEMMILI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. 227: 680-5 p. 1970.

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> >.

LENGELER, K. B. et al. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 64, n. 4, p. 746-85, Dec 2000. ISSN 1092-2172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11104818> >.

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> >.

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> >.

LORTHLARY, O.; DENNING, D. W.; DUPONT, B. Endemic mycosis: a treatment update: J. Antimicrob. Chemother. . 43: 321–331 p. 1999.

LOURES, F. V. et al. MyD88 signaling is required for efficient innate and adaptive immune responses to Paracoccidioides brasiliensis infection. **Infect Immun**, v. 79, n. 6, p. 2470-80, Jun 2011. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21422180> >.

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> >.

MARCOS, C. M. “**CARACTERIZAÇÃO DA ENOLASE DE *Paracoccidioides brasiliensis* E IDENTIFICAÇÃO PROTEÔMICA DE NOVAS MOLÉCULAS**”. 2011. 133 (Mestre). DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS, UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, ARARAQUARA.

MARGARUCCI, L. et al. Heat shock proteins as key biological targets of the marine natural cyclopeptide perthamide C. **Mol Biosyst**, v. 8, n. 5, p. 1412-7, Apr 2012. ISSN 1742-2051. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22327116> >.

MARION, C. L. et al. An alpha-(1,4)-amylase is essential for alpha-(1,3)-glucan production and virulence in *Histoplasma capsulatum*. **Mol Microbiol**, v. 62, n. 4, p. 970-83, Nov 2006. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17038119> >.

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> >.

MCGINNIS, M. R. et al. In vitro evaluation of voriconazole against some clinically important fungi. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 41, n. 8, p. 1832-4, Aug 1997. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9257773> >.

MENDES-GIANNINI, M. J. et al. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect**, v. 8, n. 6, p. 1550-9, May 2006. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16698299> >.

_____. 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> >.

_____. Pathogenesis II: fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. **Med Mycol**, v. 38 Suppl 1, p. 113-23, 2000. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11204137> >.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; MELHEM, M. S. C.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. Infecções fúngicas. In: FERREIRA, A. W. e ÁVILA, S. (Ed.). **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan v.3, 2012.

MIRANDA, E. J.; GONÇALVES, L. G.; FRANÇA, F. O. Chronic pulmonary paracoccidioidomycosis in an AIDS patient and *Mycobacterium gordonae* as confounding factor. **Braz J Infect Dis**, v. 15, n. 1, p. 92-3, 2011 Jan-Feb 2011. ISSN 1678-4391. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21412599> >.

MORAIS, M. C. et al. Suppression of TNF- α induced NF κ 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> >.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 1983. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682> >.

NAKAGAWA, Y.; MOLDEUS, P.; MOORE, G. A. Relationship between mitochondrial dysfunction and toxicity of propyl gallate in isolated rat hepatocytes. **Toxicology**, v. 114, n. 2, p. 135-45, Dec 1996. ISSN 0300-483X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8947612> >.

NAKAGAWA, Y. et al. Metabolism and cytotoxicity of propyl gallate in isolated rat hepatocytes: effects of a thiol reductant and an esterase inhibitor. **Mol Pharmacol**, v. 47, n. 5, p. 1021-7, May 1995. ISSN 0026-895X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7746268> >.

NAKAI, T. et al. In vitro antifungal activity of Micafungin (FK463) against dimorphic fungi: comparison of yeast-like and mycelial forms. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 4, p. 1376-81, Apr 2003. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12654673> >.

NEUHOFF, V. et al. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. 9, n. 6, p. 255-62, Jun 1988. ISSN 0173-0835. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2466658> >.

NITTLER, M. P. et al. Identification of Histoplasma capsulatum transcripts induced in response to reactive nitrogen species. **Mol Biol Cell**, v. 16, n. 10, p. 4792-813, Oct 2005. ISSN 1059-1524. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16030248> >.

OH, J. E. et al. alpha3beta1 integrin promotes cell survival via multiple interactions between 14-3-3 isoforms and proapoptotic proteins. **Exp Cell Res**, v. 315, n. 18, p. 3187-200, Nov 2009. ISSN 1090-2422. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19683525> >.

ORTIZ, B. L. et al. Immunological characterization of a recombinant 27-kilodalton antigenic protein from Paracoccidioides brasiliensis. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 3, n. 2, p. 239-41, Mar 1996. ISSN 1071-412X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8991645> >.

O'BRIEN, J. et al. **Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity.** : Eur. J. Biochem., 267: 5421-5426 p. 2000.

PAES, H. C. et al. Characterisation of the heat shock factor of the human thermomorphic pathogen Paracoccidioides lutzii. **Fungal Genet Biol**, v. 48, n. 10, p. 947-55, Oct 2011. ISSN 1096-0937. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21708278> >.

PEREIRA, L. A. et al. Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. **FEMS Yeast Res**, v. 7, n. 8, p. 1381-8, Dec 2007. ISSN 1567-1356. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17714474> >.

PERLROTH, J.; CHOI, B.; SPELLBERG, B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. **Med Mycol**, v. 45, n. 4, p. 321-46, Jun 2007. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17510856> >.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **Am J Med**, v. 125, n. 1 Suppl, p. S3-13, Jan 2012. ISSN 1555-7162. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22196207> >.

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> >.

PINA, A.; BERNARDINO, S.; CALICH, V. L. Alveolar macrophages from susceptible mice are more competent than those of resistant mice to control initial *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **J Leukoc Biol**, v. 83, n. 5, p. 1088-99, May 2008. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18281437> >.

PINTO, A. C. E. A. **Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas.** . 2002. 45-51

PINTO, G. A. S. et al. **Selection of tannase-producing *Aspergillus niger* strains.** . 32: 24-26 p. 2001.

POURRAT, H. et al. **Production of gallic acid from *Rhus coriaria* L.** . 9: 731-734 p. 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> >.

RAPPLEYE, C. A.; GOLDMAN, W. E. Defining virulence genes in the dimorphic fungi. **Annu Rev Microbiol**, v. 60, p. 281-303, 2006. ISSN 0066-4227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16753032> >.

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*. 23: 323-34 p. 1985.

REZENDE, T. C. et al. A quantitative view of the morphological phases of *Paracoccidioides brasiliensis* using proteomics. **J Proteomics**, Sep 2011. ISSN 1876-7737. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21920475> >.

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> >.

RODERO, L. et al. [In vitro sensitivity of *Paracoccidioides brasiliensis* to systemically used antifungal agents]. **Rev Argent Microbiol**, v. 31, n. 2, p. 78-81, 1999 Apr-Jun 1999. ISSN 0325-7541. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10425663> >.

RODRÍGUEZ-GUTIÉRREZ, G. et al. Alperujo extract, hydroxytyrosol, and 3,4-dihydroxyphenylglycol are bioavailable and have antioxidant properties in vitamin E-deficient rats-a proteomics and network analysis approach. **Mol Nutr Food Res**, May 2012. ISSN 1613-4133. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22648667> >.

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> >.

SANTORO, M. M.; GAUDINO, G.; MARCHISIO, P. C. The MSP receptor regulates alpha6beta4 and alpha3beta1 integrins via 14-3-3 proteins in keratinocyte migration. **Dev Cell**, v. 5, n. 2, p. 257-71, Aug 2003. ISSN 1534-5807. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12919677> >.

SANTOS, G. D. et al. Oenothien B inhibits the expression of PbFKS1 transcript and induces morphological changes in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol**, v. 45, n. 7, p. 609-18, Nov 2007. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18033615> >.

SCORZONI, L. et al. **The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp.** *Brazilian Journal of Microbiology*. 38: 391-397 p. 2007.

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

SILVA, J. D. F. D. “Clonagem e caracterização da proteína 14-3-3 de *Paracoccidioides brasiliensis* durante sua interação com células epiteliais”. 2011. 132 (Doutorado). Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP, Araraquara, Brasil.

SILVA, M. F. et al. Phenotypic and functional characterization of pulmonary macrophages subpopulations after intratracheal injection of *Paracoccidioides brasiliensis* cell wall components.

Immunobiology, v. 216, n. 7, p. 821-31, Jul 2011. ISSN 1878-3279. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21257226> >.

SINGER-VERMES, L. M. et al. Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. **J Med Vet Mycol**, v. 27, n. 2, p. 71-82, 1989. ISSN 0268-1218. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2746437> >.

SOHN, K. et al. An in vitro assay to study the transcriptional response during adherence of *Candida albicans* to different human epithelia. **FEMS Yeast Res**, v. 6, n. 7, p. 1085-93, Nov 2006. ISSN 1567-1356. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17042758> >.

STRIPPOLI, V. et al. Propyl gallate increases in vitro antifungal imidazole activity against *Candida albicans*. **Int J Antimicrob Agents**, v. 16, n. 1, p. 73-6, Sep 2000. ISSN 0924-8579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11185418> >.

STUDIER, F. W. **Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels.** . **J. Mol. Biol.** 79: 237-48 p. 1973.

STURTZ, L. A. et al. A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. **J Biol Chem**, v. 276, n. 41, p. 38084-9, Oct 2001. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11500508> >.

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> >.

TAKAHAGI-NAKAIRA, E.; SUGIZAKI, M. F.; PERAÇOLI, M. T. S. **Microdilution produce for antifungal susceptibility testing of *Paracoccidioides brasiliensis* to amphotericin B and itraconazole.** **J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.** 15: 719 p. 2009.

TAVARES, A. H. et al. Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages. **Microbes Infect**, v. 9, n. 5, p. 583-90, Apr 2007. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17387029> >.

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> >.

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> >.

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> >.

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 DE WOUW, A. P.; HOWLETT, B. J. Fungal pathogenicity genes in the age of 'omics'. **Mol Plant Pathol**, v. 12, n. 5, p. 507-14, Jun 2011. ISSN 1364-3703. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21535355> >.

VAN HEMERT, M. J.; STEENSMA, H. Y.; VAN HEUSDEN, G. P. 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. **Bioessays**, v. 23, n. 10, p. 936-46, Oct 2001. ISSN 0265-9247. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11598960> >.

VERSTREPEN, K. J.; FINK, G. R. Genetic and epigenetic mechanisms underlying cell-surface variability in protozoa and fungi. **Annu Rev Genet**, v. 43, p. 1-24, 2009. ISSN 1545-2948. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19640229> >.

VICENTINI, A. P. et al. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infect Immun**, v. 62, n. 4, p. 1465-9, Apr 1994. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8132354> >.

WALGREN, J. L.; THOMPSON, D. C. Application of proteomic technologies in the drug development process. **Toxicol Lett**, v. 149, n. 1-3, p. 377-85, Apr 2004. ISSN 0378-4274. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15093284> >.

WANG X et al. **Overexpression, purification, crystallization and preliminary crystallographic studies of a hyperthermophilic adenylosuccinate synthetase from *Pyrococcus horikoshii* OT3.** *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 1: 1551-5 p. 2011.

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> >.

WESTERMEIER, R.; MAROUGA, R. **Protein detection methods in proteomics research.** *Biosci. Rep.* 25: 19-32 p. 2005.

WILKER, E.; YAFFE, M. B. 14-3-3 Proteins--a focus on cancer and human disease. **J Mol Cell Cardiol**, v. 37, n. 3, p. 633-42, Sep 2004. ISSN 0022-2828. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15350836> >.

XIDIEH, C. F. et al. Influence of the genetic background on the pattern of lesions developed by resistant and susceptible mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Microbiol Immunol**, v. 188, n. 1, p. 41-9, Aug 1999. ISSN 0300-8584. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10691092> >.

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> >.

XU, Y. et al. [The effect of propyl gallate on the activity of various antifungal drugs against filamentous fungi in vitro]. **Zhonghua Yan Ke Za Zhi**, v. 42, n. 4, p. 309-312, 2006. ISSN 0412-4081. Disponível em: < <http://pubget.com/paper/16762206> >.

YAJKO, D. M. et al. Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol**, v. 33, n. 9, p. 2324-7, Sep 1995. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7494021> >.

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> >.

YWAZAKI, C. Y. et al. Role of host glycosphingolipids on *Paracoccidioides brasiliensis* adhesion. **Mycopathologia**, v. 171, n. 5, p. 325-32, May 2011. ISSN 1573-0832. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21057877> >.

ZAMBUZZI-CARVALHO, P. F. et al. The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb01 is required in the glyoxylate cycle and in the allantoin degradation pathway. **Med Mycol**, v. 47, n. 7, p. 734-44, Nov 2009. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19888806> >.

Capítulo 2

Research Article

Antifungal Activity of Maytenin and Pristimerin

Fernanda P. Gullo,¹ Janaina C. O. Sardi,¹ Vânia A. F. F. M. Santos,² Fernanda Sangalli-Leite,¹ Nayla S. Pitangui,¹ Suílen A. Rossi,¹ Ana C. A. de Paula e Silva,¹ Luciana A. Soares,¹ Julhiany F. Silva,¹ Haroldo C. Oliveira,¹ Maysa Furlan,² Dulce H. S. Silva,² Vanderlan S. Bolzani,² Maria Jos'e S. Mendes-Giannini,¹ and AnaMarisa Fusco-Almeida¹

¹ Laboratory of Clinical Mycology, Department of Clinical Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences, UNESP, Rua Expedicionários do Brasil 1621, 14801-902 Araraquara, SP, Brazil

² Institute of Chemistry, UNESP, Rua Professor Francisco Degni 55, 14800-900 Araraquara, SP, Brazil

Correspondence should be addressed to Ana Marisa Fusco-Almeida, ana.marisa@uol.com.br

Received 5 January 2012; Revised 17 February 2012; Accepted 23 March 2012

Academic Editor: Guillermo Schmeda-Hirschmann

Copyright © 2012 Fernanda P. Gullo et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Fungal infections in humans have increased alarmingly in recent years, particularly in immunocompromised individuals. Among the infections systemic candidiasis, aspergillosis, cryptococcosis, paracoccidioidomycosis, and histoplasmosis mortality are more prevalent and more severe in humans. The current high incidence of dermatophytosis is in humans, especially as the main etiologic agents *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. Molecules pristimerin and maytenin obtained from the plant *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) are known to show various pharmacological activities. This study aimed to evaluate the spectrum of antifungal activity of maytenin and pristimerin and their cytotoxicity in human keratinocytes (NOK cells of the oral mucosa). It was concluded that the best spectrum of antifungal activity has been shown to maytenin with MIC varying from 0.12 to 125 mg/L, although it is also active with pristimerin MIC ranging between 0.12 and 250 mg/L. Regarding the toxicity, both showed to have high IC₅₀. The SI showed high pristimerin against some species of fungi, but SI maytenin was above 1.0 for all fungi tested, showing a selective action of fungi. However, when comparing the two substances, maytenin also showed better results. The two molecules can be a possible prototype with a broad spectrum of action for the development of new antifungal agents.

1. Introduction

Fungal infections are mainly caused by opportunistic fungi and are usually associated with immunosuppression [1]. Over the past two decades, invasive fungal infections have emerged as a major threat to immunocompromised patients, since species of *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, and *Histoplasma* emerging pathogens such as *Fusarium* and *Trichophyton* can cause infection when defenses of host are broken [1]. Paracoccidioidomycosis

is a fungal infection that is very important, which affects a large percentage of the rural population of Latin America [2].

There is now a great interest in the discovery of new molecules of natural origin for the treatment of various diseases [3]. Natural products have provided a wide variety of drugs and have become an alternative to large demand for new antifungal drugs [4]. In Brazil, the use of medicinal plants in traditional medicine has increased considerably in recent years. The wide distribution of natural resources in Brazilian ecosystems and natural diversity of chemical components and provides the country with potential bioactive materials [5].

Maytenus ilicifolia (Celastraceae), popularly known as “*espinheira santa*,” has been used in traditional medicine since the mid-1920s [6]. The secondary metabolites, maytenin and pristimerin (Figure 1), are classified as quinonemethide triterpenoids and mainly isolated from the bark of the roots of mature *M. ilicifolia* plants [7]. Several studies have shown that maytenin exhibits strong antimicrobial activity against Gram-positive and Gram negative organisms, but there are no studies detailing the effects of these substances on fungi [8].

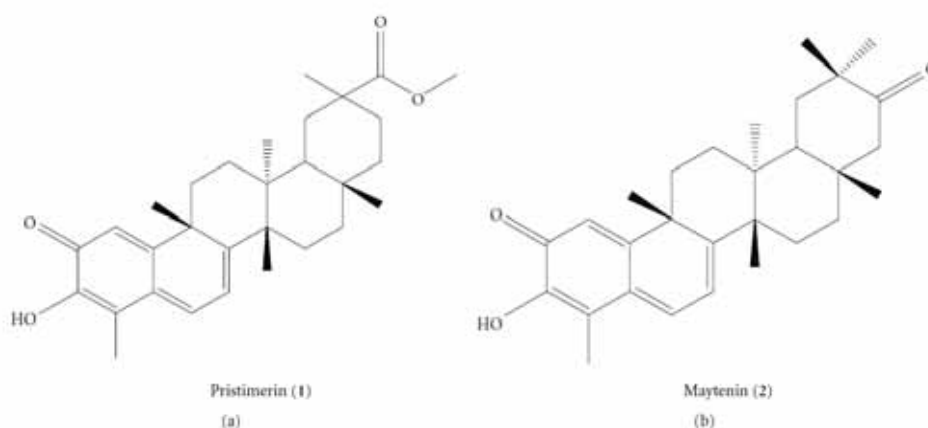


Figure 1: Structures of the isolated quinonemethide triterpenes from *M. ilicifolia*, pristimerin (1) and maytenin (2).

The need to discover new antifungal molecules and natural products is of great importance for the development of new therapeutic tools. This paper proposes the study of the potential antifungal potential of maytenin and pristimerin against fungi, an agent of important mycoses. The potential broad spectrum of these molecules was evaluated, and the cytotoxicity of these substances in cell lines was evaluated, suggesting possible prototypes of a broad spectrum of components for the treatment of mycoses.

2.Methods

2.1. Microorganisms. ATCC strains and clinical isolates belong to the mycology collection of the Laboratory of Clinical Mycology, Department of Clinical Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences, UNESP, Araraquara, were used in the current study. The strains used were: *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019,

Candida glabrata ATCC 90030, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* ATCC 90012, *Histoplasma capsulatum* (G217B), *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Aspergillus fumigatus* ATCC 7100, *Trichophyton interdigitalis* ATCC 40131. Clinical isolates from *Paracoccidioides brasiliensis* (18), *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* (102), *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* resistant to fluconazole (R30), two clinical isolates from *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* susceptible to fluconazole (S26 and S27), and *Cryptococcus gattii* (118) isolate from animals, resistant to fluconazole, and *Histoplasma capsulatum* (M238P) (lung bat) were also used.

2.2. Minimum Inhibitory Concentration (MIC). All microorganisms were tested for susceptibility to specific commercial drugs for the treatment of each gender. The test for yeast was carried out in accordance with the microdilution method described according to the M27-S3 of the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2008), with modifications. The filamentous fungi susceptibility testing was performed according to the M38-A2 of the CLSI (2008) [9] with modifications to determine the minimum inhibitory concentration (MIC). Two pure substances extracted from *Maytenus ilicifolia*, maytenin and pristimerin, were prepared as described by Scorzoni et al. 2007 [10]. The antifungal drugs were diluted according to CLSI M27-S3 [9]. Inoculums were prepared in RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) with L-glutamine, without sodium bicarbonate, supplemented with 2% glucose, and buffered to a pH of 7.0 using 0.165M MOPS, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The yeast suspension was adjusted to a final concentration of 1.0×10^4 CFU/mL in RPMI-1640 and for filamentous fungi, a suspension of microconidia was adjusted to 2.5 to 5.0×10^3 . In the 96-well plates, substances were added in serial dilutions, starting from a concentration of 250 mg/L to 0.48 mg/L. The plates were incubated in a shaker at 37°C/150 rpm to a specific time determined for each microorganism. The reading of MIC was performed by spectrophotometry at 490nm and confirmed using Alamar Blue (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

2.3. Minimum Fungicide Concentration (MFC). A qualitative analysis of fungal viability was performed, by transferring a portion of the wells to a plate with Sabouraud (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA) medium and incubated at 37°C during the time determined for each fungal agent. The MFC was determined as the lowest concentration of the extract that did not allow the growth of any fungal colony on the solid medium after the incubation period [11]. A visual reading was performed to confirm the death or growth inhibition provided by the antifungal substances, maytenin and pristimerin.

2.4. Cell Cytotoxicity Assay. The cytotoxicity of maytenin and pristimerin was assessed by MTT for cell lines NOK (keratinocyte oral mucosa), obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). The cells were grown in own culture medium NOK (Keratinocytes—SFM, GIBCO), and maintained at 36.5°C. A concentration ranging from 2.5 to 5.0×10^4 cells/mL was used for the formation of monolayer cells. The concentrations of pure substances were kept in contact with the cells for 24 hours. After the incubation period, the cells treated with the MTT reagent has an additional 5 mg/mL added, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and the cells were incubated again for another 4 h. After the formation of formazan crystals, 100 μ L of isopropanol was added to solubilize the precipitate and allow the reading of the result by changing the color of the medium [12]. The absorbance of formazan was quantified

using an ELISA reader (enzyme-linked immunosorbent assay) set at 560 nm. As a positive control test, hydrogen peroxide was used.

Table 1: MIC values and quantitative analysis of fungal cellular viability of pure substances maytenin and pristimerin front of the yeasts and filamentous pathogenic strains causing the most mycoses and evaluation of cytotoxic activity in NOK cells and selectivity index from the ratio of the IC₅₀ and MFC.

	Maytenin MIC/MFC	Pristimerin MIC/MFC	Amphotericin B reference values MIC	Itraconazole reference values MIC	Maytenin IC ₅₀ (mg/L)/SI	Pristimerin IC ₅₀ (mg/L)/SI
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	62.50/62.50	250.00/250.00	0.50–2.00	—	265.7/4.25*	*
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	15.62/62.50	7.81/62.50	0.25–2.00	0.12–0.50	78.33/1.25*	24.25/0.38*
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	15.62/31.25	125.00/125.00	0.25–1.00	0.06–0.25	78.33/2.50*	*
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	15.62/31.25	31.25/62.52	0.50–2.00	—	78.33/2.50*	203.98/3.26*
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	31.25/31.25	125.00/125.00	0.25–1.00	—	203.98/6.52*	*
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 90012	0.48/0.48	0.97/0.97	0.50	0.125	2.53/5.29*	3.92/4.04*
<i>Cryptococcus neoformans</i> R30	3.90/3.90	7.81/7.81	1.00	>32.00	22.18/5.68*	24.25/3.10*
<i>Cryptococcus neoformans</i> isolated 26	0.48/0.48	1.95/1.95	0.50	0.125	2.53/5.29*	6.41/3.28*
<i>Cryptococcus neoformans</i> isolated 27	0.48/0.48	3.90/3.90	0.50	0.125	2.53/5.29*	20.10/5.15*
<i>Cryptococcus gattii</i> 118	1.95/1.95	3.90/3.90	1.00	>32.00	9.84/5.05*	20.10/5.15*
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> PB18	<0.12/-	<0.12/-	0.015–0.25	<0.0039	**	**
<i>Histoplasma capsulatum</i> ATCC 06217B	0.97/0.97	0.48/0.48	0.06–0.25	0.25–2.00	3.70/3.81*	6.43/13.40*
<i>Histoplasma capsulatum</i> isolated M238P	0.48/0.48	0.48/0.48	0.06–0.25	0.25–2.00	2.53/5.29*	6.43/13.40*
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 7100	125/-	>250/-	0.12–2.0	0.12–> 16.00	*	*
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	0.97/0.97	250/250	0.12–0.5	0.12–1.00	*3.70/3.81	*
<i>Trichophyton rubrum</i> clinical isolated	1.95/1.95	250/250	—	0.03–4.00	*9.84/5.05	*
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 40131	3.9/3.9	62.5/250	—	0.03–0.25	*22.18/5.68	150.24/0.6*
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> clinical isolated 102	3.9/3.9	125/250	—	0.03–0.25	*22.18/5.68	*

MIC: minimum inhibitory concentration; MFC: minimum fungicide concentration.

* IC₅₀/IS values in NOK cells.

- IC₅₀/IS not apply because the MIC and MFC values are above 62.5mg/L.

** IC₅₀/IS not apply because the MIC and MFC values are below 0.12 mg/L.

IC₅₀: 50% inhibitory concentration. SI: selectivity index obtained from the relationship between the IC₅₀ (NOK) by MFC for each fungi.

3. Results

3.1. Minimum Inhibitory Concentration (MIC). Table 1 present the results of the antifungal activity of maytenin and pristimerin, isolated from *Maytenus ilicifolia*. Maytenin activity was classified as potent for both yeasts and for filamentous fungi, when compared to positive controls itraconazole and amphotericin B; since the MIC ranged between 0.12 and 62.5mg/L. Pristimerin previously showed a significant variation in the action potential. For yeasts, the pristimerin showed potent activity, with the exception of *C. glabrata* ATCC 90030 which showed moderate activity and *C. albicans* ATCC 90028, which presented low antifungal activity. For the filamentous fungi, pristimerin showed moderate activity, with the exception of *Trichophyton*

mentagrophytes ATCC 40131, which showed a MIC of 62.5mg/L and was classified as having potent activity.

3.2. Minimum Fungicide Concentration (MFC). Minimum fungicide concentration was performed to confirm cell death in MIC through observation of no colony growth in a rich medium. The maytenin showed fungicide activity for most yeasts. No growth of *C. albicans* colonies was observed, and the death of yeast occurred in a higher dilution concentration (Table 1). For the filamentous fungi, MFC was confirmed by testing cell viability, which occurs in MIC fungal cell death (Table 1). Pristimerin presented a greater difference between the MIC and MFC. Moreover, the difference between the MIC and the value of qualitative analysis of fungal viability was greater than the difference presented by maytenin (Table 1). For the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* and the filamentous fungi *Aspergillus niger* and *fumigatus*, the qualitative test of fungal viability was flawed, since the growth of colonies cannot be observed on a solid medium.

3.3. Cell Cytotoxicity Assay. The cytotoxicity assay for the NOK cell line showed more than 80% of cell viability in MIC maytenin concentrations. The substance pristimerin showed cell viability above 80% in normal cells (Table 1).

4. Discussion

Plants have been used in medicine for a long period of time, since they are easy to obtain and apply various diseases [4, 13]. Regarding the search for new antifungal agents, the ideal must have a broad spectrum of fungicidal activity without causing toxicity to the host [14]. The treatment of fungal infections is not always effective because of resistance to drugs in addition to presenting high toxicity for human cells. For this reason, there is a continuing search for new drugs which are more potent antifungal, but safer, than existing drugs [15].

The present study showed that pristimerin and maytenin had potente action on the fungi studied (Table 1), but maytenin showed the best results. The exception was *Histoplasma capsulatum* isolated M238P and *Paracoccidioides brasiliensis* which showed MIC equal for both substances.

Alanís-Garza et al., 2007 [16] studied the anti-*Histoplasma* activity of extracts obtained from various plants and showed MICs between 16 and 125 mg/L. This study showed an MIC for ATCC strains of *H. capsulatum* 0.97 and less than 0.48mg/L pristimerin and maytenin respectively, while for clinical isolate, the MIC for the two substances was less than a 0.48 mg/L. Compared with few literary data of natural products active against this fungal, pristimerin and maytenin can be considered prototypes that are excellent anti-*Histoplasma*.

Few studies have searched for new drugs from natural products for *P. brasiliensis* [17, 18]. There are reports of the activity of anti-*Paracoccidioides* of *Piper regnellii* and “*Baccharis dracunulifolia*” 30mg/L [17, 19]. The results expressed in this study were excellent for *P. brasiliensis*, MIC of 0.12 mg/L for both molecules at a concentration 65 times lower than the results of the studies mentioned above.

The systemic mycosis caused by yeasts *Cryptococcus* spp. has increased because of AIDS [20]. In the current results indicate that the molecules had an excellent MIC for the yeasts this genus, ranging from 0.48 to 3.9mg/L for maytenin and 0.97 to 7.8 for pristimerin. Another study revealed the antifungal activity of extracts of *Maytenus undata* against *C. neoformans*, which showed MIC of 0.09 mg/L after 24 h, and 0.18 mg/L after 48 h [21]. The species *Candida*

are classified as the fourth most common pathogen in hospitals and are associated with increased mortality of bloodstream infections due to these fungi having high resistance to existing antifungal [22]. For this yeast, the pristimerin showed potent activity, with the exception of *C. glabrata* ATCC 90030, which showed moderate activity, and *C. albicans* ATCC 90028, which obtained low antifungal activity. Maytenin showed moderate antifungal activity for this specie. For *C. albicans*, maytenin and pristimerin showed fungicide activity; however, the *Candida non-albicans* the result was fungistatic, except for *C. glabrata* in contact pristimerin.

Although dermatophyte infections are restricted to certain areas of the epidermis, they can be invasive and cause serious injury [23]. Due to the high incidence there is a great need to find new drugs which act on the dermatophytes. Maytenin showed potent activity with MIC ranging from 1.95 to 3.9mg/L. For filamentous fungi, the pristimerin showed moderate activity, with the exception of *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 44131, which showed a MIC of 62.5mg/L. Many studies have demonstrated the plant antifungal potential against these dermatophytes [23–25], as the study of Lau et al. 2010 [24], that evaluated extracts *Eucalypti Folium* and *Fructus Psoraleae Globuli*. Both the pure compounds effectively inhibit the growth of *T. mentagrophytes* and *T. rubrum* [25].

Invasive aspergillosis is an important cause of mortality in transplant patients [26]. Maytenin had better results against *Aspergillus niger* with an MIC value of 0.97 mg/L, whereas the MIC for *A. fumigatus* was 125 mg/L and pristimerin was similar for both 250 mg/L. Maytenin showed good fungicide activity for most filamentous fungi, while pristimerin showed high MIC (Table 1).

On the other hand, the cytotoxicity tests performed with NOK (keratinocytes oral mucosa) showed that the experimental substances are not cytotoxic to this cell examined in experiment (Table 1). Although most of the antifungal agents available on the market are of synthetic origin, natural products of the study received the attention of researchers, mainly, due to the occurrence of unwanted factors, such as the resistance of some strains the conventional antifungal agents—especially in immunocompromised individuals—and the presence of these toxic effects. Figueiredo et al. (1998) found antimalarial activity of various substances, including the pristimerin but the cytotoxicity was only for the 17-(methoxycarbonyl)-28-*nor*-isoiguesterin in adenocarcinoma cell line HT-29 [27].

With respect to selectivity index (SI), it is known that the higher the SI of a substance, the greater is its security. In our study we found that the maytenin substance had SI above 1.0 for all species tested, so we can demonstrate the safe use of this. Likewise, the pristimerin presented high SI against some fungal species, as described for *H. capsulatum* (SI 13.40). However, when comparing the two substances, maytenin still showed better results (Table 1).

5. Conclusion

The results of this study indicate the potential use of maytenin and pristimerin for the treatment of fungal infections, which showed a potent antifungal activity against the fungi studied. Therefore, the data obtained are promising. Although the medicinal plant “*Maytenus ilicifolia*” is consolidated in the treatment of gastritis and ulcers more pharmacological studies will be necessary to evaluate these molecules as antifungal prototypes.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Fundação de Amparo Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico and Tecnológico (CNPq)

for their financial support. V. Santos thanks CAPES and is also grateful to Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPe/UNESP) for providing a research fellowship.

References

- [1] S. Shoham and S. M. Levitz, "The immune response to fungal infections," *British Journal of Haematology*, vol. 129, no. 5, pp. 569–582, 2005.
- [2] M. A. Shikanai-Yasuda, F. D.Q. Telles Filho, R. P.Mendes et al., "Guidelines in paracoccidioidomycosis," *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol. 39, no. 3, pp. 297–310, 2006.
- [3] H. Hostettman, *Strategy of the biological and chemical evaluation of plant extracts*, vol. 70, IUPAC, 1998.
- [4] J. C. O. Sardi, A. M. F. Almeida, and M. J. S.Mendes Giannini, "New antimicrobial therapies used against fungi present in subgingival sites—a brief review," *Archives of Oral Biology*, vol. 56, no. 10, pp. 951–959, 2011.
- [5] M. C. T. Duarte, G. M. Figueira, A. Sartoratto, V. L. G. Rehder, and C. Delarmelina, "Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 97, no. 2, pp. 305–311, 2005.
- [6] R. Santos-Oliveira, S. Coulaud-Cunha, and W. Colaço, "Review of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae. Contribution to the studies of pharmacological properties," *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 19, no. 2B, pp. 650– 659, 2009.
- [7] V. A. De Freitas Formenton Macedo Dos Santos, D. P. Dos Santos, I. Castro-Gamboa, M. V. B. Zanoni, and M. Furlan, "Evaluation of antioxidant capacity and synergistic associations of quinonemethide triterpenes and phenolic substances from *maytenus ilicifolia* (celastraceae)," *Molecules*, vol. 15, no. 10, pp. 6956–6973, 2010.
- [8] L. de Le ´ on, M. R. L ´ opez, and L. Moujir, "Antibacterial properties of zeylasterone, a triterpenoid isolated from *Maytenus blepharodes*, against *Staphylococcus aureus*," *Microbiological Research*, vol. 165, no. 8, pp. 617–626, 2010.
- [9] Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI), *Document M38-A2. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi*, Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI), Wayne, Pa, USA, 2nd edition, 2008.
- [10] L. Scorzoni, T. Benaducci, A. M. Fusco-Almeida, D. H. S. Silva, V. S. Bolzani, and M. J. S.Mendes-Giannini, "The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp.," *Brazilian Journal Microbiological*, vol. 38, no. 3, pp. 391–397, 2007.
- [11] L. O. Regasini, M. Pivatto, L. Scorzoni et al., "Antimicrobial activity of *Pterogyne nitens* Tul., Fabaceae, against opportunistic fungi," *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 20, no. 5, pp. 706–711, 2010.
- [12] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays," *Journal of Immunological Methods*, vol. 65, no. 1-2, pp. 55–63, 1983.
- [13] J. J. Rojas, V. J. Ochoa, S. A. Ocampo, and J. F. Muñoz, "Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: a possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 6, article no. 2, 2006.
- [14] A. J. Carrillo-Muñoz, G. Giusiano, P. A. Ezkurra, and G. Quindós, "Antifungal agents: mode of action in yeast cells," *Revista Espanola de Quimioterapia*, vol. 19, no. 2, pp. 130–139,

2006.

- [15] R. Fenner, A. H. Betti, L. A. Mentz, and S. M. K. Rates, "Plants with potencial antifungal activity employed in Brazilian folk medicine," *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 42, no. 3, pp. 369–394, 2006.
- [16] B. A. Alanís-Garza, G. M. González-González, R. Salazar-Aranda, N. Waksman de Torres, and V. M. Rivas-Galindo, "Screening of antifungal activity of plants from the northeast of Mexico," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 114, no. 3, pp. 468–471, 2007.
- [17] S. Johann, N. P. Sá, L. A. Lima et al., "Antifungal activity of schinol and a new biphenyl compound isolated from *Schinus terebinthifolius* against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*," *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, vol. 9, article 30, 2010.
- [18] L. de Carvalho Tavares, S. Johann, T. Maria de Almeida Alves et al., "Quinoliny and quinoliny N-oxide chalcones: synthesis, antifungal and cytotoxic activities," *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 46, no. 9, pp. 4448–4456, 2011.
- [19] C. V. Martins, D. L. da Silva, A. T. Neres et al., "Curcumin as a promising antifungal of clinical interest," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 63, no. 2, pp. 337–339, 2009.
- [20] Md. Sa'ude, "Dados e pesquisas em DST e AIDS," DST/AIDS CPNd editor. Brasília, Brasil, 2002.
- [21] T. A. Mokoka, L. J. McGaw, and J. N. Eloff, "Antifungal efficacy of ten selected South African plant species against *Cryptococcus neoformans*," *Pharmaceutical Biology*, vol. 48, no. 4, pp. 397–404, 2010.
- [22] T. Rossignol, B. Kelly, C. Dobson, and C. d'Enfert, "Endocytosis-mediated vacuolar accumulation of the human 6 Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine ApoE apolipoprotein-derived ApoEdpL-W antimicrobial peptide contributes to its antifungal activity in *Candida albicans*," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 55, no. 10, pp. 4670–4681, 2011.
- [23] N. T. Peres, F. C. A. Maranhão, A. Rossi, and N. M. Martinez-Rossi, "Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance," *Anais Brasileiros de Dermatologia*, vol. 85, no. 5, pp. 657–667, 2010.
- [24] K. M. Lau, L. H. Fu, L. Cheng et al., "Two antifungal components isolated from *fructus psoraleae* and *folium eucalypti globuli* by bioassay-guided purification," *American Journal of Chinese Medicine*, vol. 38, no. 5, pp. 1005–1014, 2010.
- [25] C. Cavaleiro, M. J. Gonçalves, D. Serra et al., "Composition of a volatile extract of *Eryngium duriae* subsp. *juresianum* (M. Lánz) M. Lánz, signalised by the antifungal activity," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 54, no. 3, pp. 619–622, 2011.
- [26] M. C. Z. Novaretti, A. S. Ruiz, F. L. Dulley, P. E. Dorlhiac-Llacer, and D. A. F. Chamone, "Detection of *Aspergillus* sp in bone marrow transplant patients by PCR-nested technique," *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, vol. 30, no. 2, pp. 162–163, 2008.
- [27] J. N. Figueiredo, B. Rãz, and U. Séquin, "Novel quinone methides from *Salacia kraussii* with in vitro antimalarial activity," *Journal of Natural Products*, vol. 61, no. 6, pp. 718–723, 1998.