



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de Araraquara

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Departamento de Análises Clínicas

Efeito de chalconas e/ou anticorpos anti gp43 na infecção por *Paracoccidioides* spp.

Thamires Marson

Araraquara- SP

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de Araraquara

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Departamento de Análises Clínicas

Efeito de chalconas e/ou anticorpos anti gp43 na infecção por *Paracoccidioides* spp.

Thamires Marson

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

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

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

Araraquara- SP

2015

Dedico este trabalho aos meus amados pais **Fernando** e **Márcia**, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando em todas as minhas decisões. Obrigada pelo colo, pelos conselhos e por toda doçura nos meus momentos de fraqueza. Vocês são totalmente responsáveis por me fazer voar tão alto e acreditar que tudo nessa vida possa ser conquistado. A vossa dedicação e esforço são minha motivação para continuar perseguindo meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por ter sido abençoada com uma família exemplar e plena de amor. Sem a fé e a certeza do Teu amparo, jamais haveria conseguido alcançar meus maiores objetivos.

Aos **meus pais**, o que seria de mim sem vocês? Obrigada por serem meus confidentes e me incentivarem não somente nesta batalha, mas em todas que já venci e aquelas que ainda virão.

Agradeço à **Profª Dra. Maria José Soares Mendes Giannini** pela oportunidade de fazer parte da equipe do Laboratório de Micologia Clínica. Obrigada por ser este exemplo de profissionalismo e nos servir de inspiração com todo o seu amor e dedicação à pesquisa. Agradeço a confiança em mim depositada para a execução deste projeto. Sem o seu suporte, conhecimento e orientação nada disso seria possível.

“Un buon insegnante è come una candela – si consuma per illuminare la strada per gli
altri”

(Proverbio turco)

Agradeço à **Profª Dra. Ana Marisa Fusco Almeida** pela confiança e dedicação desde nosso primeiro contato. Graças a sua atenção pude me sentir inspirada a iniciar minha trajetória na Micologia Clínica.

À minha querida co - orientadora **Julhiany de Fátima da Silva**. Obrigada por sempre encontrar tempo e disposição para colaborar na execução deste projeto, ainda que houvesse tantas outras responsabilidades. Seu incentivo e otimismo foram fundamentais para que atingíssemos resultados.

Agradeço à minha doce **avó Valdete**, *in memoriam*, por ter me ensinado tanto sobre a vida e o valor da amizade. Mais do que avó e neta, fomos irmãs, parceiras e confidentes. Você estará para sempre no meu coração!

Tio Ismar, Éna, Tata e Rubão, o que dizer dessa família maluca mas cheia de amor pra dar? O fato de torcermos pela felicidade um dos outros é o que nos torna tão especiais. Obrigada por fazerem parte da minha família.

Um grande obrigada à “**Família Micologia**”. Cada um deixou a sua marca em minha vida e de alguma forma contribuiu para o meu aprendizado.

Juliana Oliveira Vicentin, mais que uma amiga, você é a irmã que nunca tive. Obrigada por ser a minha metade e estar presente durante toda a minha jornada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Meninas da **República Só Caqui**, o que dizer desses presentes que ganhei para toda a vida? Vocês foram essenciais no meu processo de amadurecimento e aquisição de responsabilidade. Obrigada por cada momento compartilhado e por diversas vezes terem sido o meu ponto de apoio em Araraquara. Amo vocês!

Ao **Arthur Flohr Svendsen**, que me impulsionou e tantas vezes acreditou mais em mim do que eu mesma ao longo da minha trajetória acadêmica.

Ao **CNPq**, pelo financiamento deste projeto.

“Se non puoi essere un pino sul monte,
sii una saggina nella valle,
ma sii la migliore piccola saggina
sulla sponda del ruscello.
Se non puoi essere un albero,
sii un cespuglio.
Se non puoi essere una via maestra
sii un sentiero.
Se non puoi essere il sole,
sii una stella.
Sii sempre il meglio
diciòche sei.
Cerca scoprire il disegno
che sei chiamato ad essere,
poi mettiti a realizzarlo nella vita.”

Martin Luther King

RESUMO

Paracoccidioides spp. é considerado um fungo intracelular facultativo que tem a capacidade de aderir e invadir células epiteliais tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Existem diferenças na adesão responsáveis pela maior virulência/patogenicidade de determinados isolados. Algumas adesinas foram descritas e dentre elas, a glicoproteína de 43kDa (gp43) demonstrou grande afinidade pelas matrizes extracelulares (MEC) laminina e fibronectina. O soro anti-gp-43 também foi demonstrado como responsável pela inibição em 85% no processo de adesão do fungo. Moléculas a partir de fontes naturais são alternativas que podem ser usadas na formulação de novos agentes antifúngicos. Para isso, foram estudados extratos, frações e compostos puros de moléculas com atividade antifúngica. Entre as moléculas mais ativas estão as chalconas sintéticas inéditas, modeladas a partir de fontes vegetais que apresentaram atividade frente a várias espécies de fungos patogênicos humanos incluindo *Paracoccidioides* spp. Assim, este trabalho procurou avaliar a associação do anticorpo anti-gp43, que apresenta alto poder de especificidade, à 3'chalcona, com atividade antifúngica, visando um aumento na efetividade na inibição do processo de adesão e invasão de *Paracoccidioides* spp. às células do hospedeiro. Os resultados revelam a influência do diagnóstico para a escolha da terapia devido às diferentes respostas que os isolados apresentaram frente aos diferentes tratamentos testados.

Palavras Chave: *Paracoccidioides* spp., chalcona, interação patógeno-hospedeiro.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 <i>Paracoccidioides</i> spp.e a PCM	13
1.2 Epidemiologia	15
1.3 Adesinas	17
1.3.1 gp43	20
1.4 Alternativas terapêuticas	21
1.4.1 Inibição da tirosina – quinase (PTK)	22
1.4.2 Anti-gp43	22
1.5 Tratamento	24
1.6 Antifúngicos de Origem Natural	25
1.6.1 Chalconas	26
1.7 Objetivos	29
1.7.1 Objetivos gerais	29
1.7.2 Objetivos específicos	30
2. METODOLOGIA	30
2.1 Fungos e condição de cultivo	30
2.2 Substâncias com atividade anti- <i>Paracoccidioides</i>	31
2.3 Cultura de Células Epiteliais	32
2.4 Obtenção da gp43	32
2.5 Obtenção do anticorpo anti-gp43	33
2.6 Ensaio de ELISA para verificar a inibição de ligação de <i>Paracoccidioides</i> spp. às células epiteliais na presença da chalcona e/ou anti-gp43	33
2.7 Ensaio de ELISA para verificar a inibição de ligação de <i>Paracoccidioides</i> spp. aos componentes da matriz extracelular (MEC) na presença da chalcona e/ou anti-gp43	34
2.8 Marcação com faloidina para observação dos filamentos de actina durante a interação de <i>Paracoccidioides</i> spp. com células A549 na presença da chalcona e/ou anti-gp43	34
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
3.1 Obtenção da gp43	36
3.2 Ensaio de ELISA para verificar a inibição de ligação de <i>Paracoccidioides</i> spp. às células epiteliais na presença da chalcona e/ou anti-gp43	36
3.3 Ensaio de ELISA para verificar a inibição de ligação de <i>Paracoccidioides</i> spp. aos componentes da matriz extracelular (MEC) na presença da chalcona e/ou anti-gp43	38
3.4 Marcação com faloidina para observação dos filamentos de actina durante a interação de <i>Paracoccidioides</i> spp. com células A549 na presença da chalcona e/ou anti-gp43	40
3.5 Imunofluorescência para verificar expressão de fosfotirosinas (RAF) durante a interação de <i>Paracoccidioides</i> spp. com células A549 na presença da chalcona e/ou anti-gp43	44
4. CONCLUSÕES	49
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Aspectos das culturas de <i>Paracoccidioides</i> spp. nas fases miceliana (25 °C) e leveduriforme (37 °C).....	14
Figura 2- Estágios da transição conídio-levedura em pulmões de camundongo (corado com técnica de Gomori).....	14
Figura 3- Distribuição geográfica de infecções fúngicas endêmicas na América Latina.....	16
Figura 4- Repertório clássico para o tratamento da PCM.....	25
Figura 5- Estrutura molecular geral das chalconas e suas diferentes atividades biológicas.....	27
Figura 6- Eletroforese Bidimensional demonstrando a purificação da proteína de 30kDa e da gp43. SDS-Page 12,5% corado por Coomassie Blue.....	36
Figura 7- ELISA de inibição demonstrando a interferência da chalcona e/ou associada ao anticorpo anti-gp43 na ligação de Pb18, Pb01 e Pb02 às células A549.....	37

Figura 8A- Imunofluorescência de células epiteliais infectadas com *P. brasiliensis*, isolado 18 não tratado, previamente tratado com anti gp43, previamente tratado com 3`chalcona e previamente tratado com anti gp43 e 3`chalcona, por 2h, 5h, 8h, 24h e 48h usando faloidina-FITC (verde), anti gp43 (vermelho) e DAPI (azul)..... 42

Figura 8B- Imunofluorescência de células epiteliais infectadas com *P. lutzii*, isolado 01 não tratado, previamente tratado com anti gp43, previamente tratado com 3`chalcona e previamente tratado com anti gp43 e 3`chalcona, por 2h, 5h, 8h, 24h e 48h usando faloidina-FITC (verde), anti gp43 (vermelho) e DAPI (azul)..... 43

Figura 9A- Imunofluorescência de células epiteliais infectadas com *P. brasiliensis*, isolado 18 não tratado, previamente tratado com anti gp43, previamente tratado com 3`chalcona e previamente tratado com anti gp43 e 3`chalcona, por 2h, 5h, 8h, 24h e 48h usando anti Raf1 (verde), anti gp43 (vermelho) e DAPI (azul)..... 46

Figura 9B- Imunofluorescência de células epiteliais infectadas com *P.lutzii*, isolado 01 não tratado, previamente tratado com anti gp43, previamente tratado com 3`chalcona e previamente tratado com anti gp43 e 3`chalcona, por 2h, 5h, 8h, 24h e 48h usando anti Raf1 (verde), anti gp43 (vermelho) e DAPI (azul)..... 47

Figura 9C- Imunofluorescência de células epiteliais infectadas com *P. brasiliensis*, isolado 02 não tratado, previamente tratado com anti gp43, previamente tratado com 3`chalcona e previamente tratado com anti gp43 e 3`chalcona, por 2h, 5h, 8h, 24h e 48h usando anti Raf1 (verde), anti gp43 (vermelho) e DAPI (azul)..... 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Isolados utilizados neste experimento.....	31
Tabela 2- Avaliação de citotoxicidade da chalcona (3' chalc) através do ensaio de MTT.....	32
Tabela 3- Ensaio de ELISA mostrando a porcentagem (%) de inibição da adesão dos diferentes isolados em diferentes condições. *OV: tratamento por 24h, Lm: laminina, Fn: fibronectina, CI: colágeno tipo I e CIV: colágeno tipo IV.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	porcentagem
3' chalc	3' chalcona
A549	célula epitelial de adenocarcinoma de pulmão
aRNA	ácido ribonucleico antisense
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	adenosina trifosfato
BALB/c	linhagem de camundongos albinos medianamente suscetíveis à infecção com <i>P. brasiliensis</i>
BIOprospecTA	Rede Biota de Bioprospecção e Bioensaios
CD4	Grupamento de diferenciação 4
CD8	Grupamento de diferenciação 8
CI	concentração inibitória
CIM	concentração inibitória mínima
CIV	colágeno tipo IV
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DC-pMAC/PS-scFv	<i>single chain variable fragment</i>
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
Fase L	fase leveduriforme
Fase M	Fase micelial
FCF-UNESP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
FM- USP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Fn	fibronectina
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato dehidrogenase
GlcNAc	n- acetilglucosamina
gp43	glicoproteína de 43 kDa
h	hora
HepG2	célula epitelial de hepatoma humano
HIV	vírus da imunodeficiência humana
IgG	imunoglobulina G
IL-10	interleucina 10
IL-12	interleucina 12
IL-2	interleucina 2
IL-4	interleucina 4
IL-6,	interleucina 6
INF- γ	interferon- gama
ITS	<i>internal transcribed spacers</i>
kDa	kilodalton
L	litro
Lm	laminina

M	molaridade
MCF-7	linhagem tumoral de adenocarcinoma
MEC	matriz extracelular
mg	miligrama
mL	Mililitro
MLS	malato sintase
MRC-5	fibroblastos de pulmão humano
MTT	brometo de (3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio)
NaCl	cloreto de sódio
NO	óxido nítrico
NOK	célula oral normal imortalizada com o gene <i>h-tert</i>
°C	graus Célcus
OV	<i>overnight</i>
P10	peptídeo 10
P23	Peptídeo 23
P4	Peptídeo 4
P53	Proteína 53
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PbHAD32	hidrolase de 32kDa de <i>P. brasiliensis</i>
PCM	Paracoccidioidomicose
pH	potencial hidrogeniônico
pI	ponto isoelétrico
pIL-12	plasmídeo codificante de interleucina 12
PTK	proteína tirosina-quinase
scFv	<i>single chain variable fragment</i>
SISBIOTA	Sistema Nacional de Pesquisa em Biodiversidade
STA	Saubourad, Tiamina, Asparagina
Th1	<i>Type 1 T helper cell</i>
TK-10	linhagem tumoral de carcinoma renal
TLR2	<i>toll- like receptor 2</i>
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
UACC-62	linhagem tumoral de melanoma
V87	células de glioma humano
yMAgp43	proteína gp43 recombinante

1. INTRODUÇÃO

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 (AP; HOWLETT, 2011; FRANCO, 1987; KUROKAWA; SUGIZAKI; PERACOLI, 1998) e para isso, utilizam uma variedade de moléculas de superfície para se ligar a matriz extracelular da célula hospedeira e estabelecer infecção (LENGELER 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 organismos diversos para capacitá-los a colonizar seus respectivos habitats. Uma colonização bem sucedida geralmente é um evento complexo e deve envolver proteínas da superfície do fungo e receptores celulares (BHAVSAR; AUWETER; FINLAY, 2010; SOHN et al., 2006). Dessa forma, o desenvolvimento da paracoccidioidomicose (PCM) depende de interações entre os fungos do gênero *Paracoccidioides* e componentes celulares do hospedeiro.

1.1 *Paracoccidioides* spp. e a PCM

P. brasiliensis e *P. lutzii* são fungos dimórficos, termo-dependentes, apresentando duas fases: miceliana e leveduriforme (Figura 1). A fase miceliana (M), saprobiótica, ocorre em temperaturas de 25 a 27 °C. O aspecto das culturas nesta fase é cotonoso, esbranquiçado e microscopicamente observa-se a presença de filamentos hialinos, finos e septados. A fase leveduriforme (L) constitui a forma parasitária do fungo, sendo reproduzida em cultivos a 37

°C. Apresenta-se com células arredondadas, de parede dupla e brotamentos múltiplos característicos, formando a denominada “roda-de-leme” (LACAZ,1994).

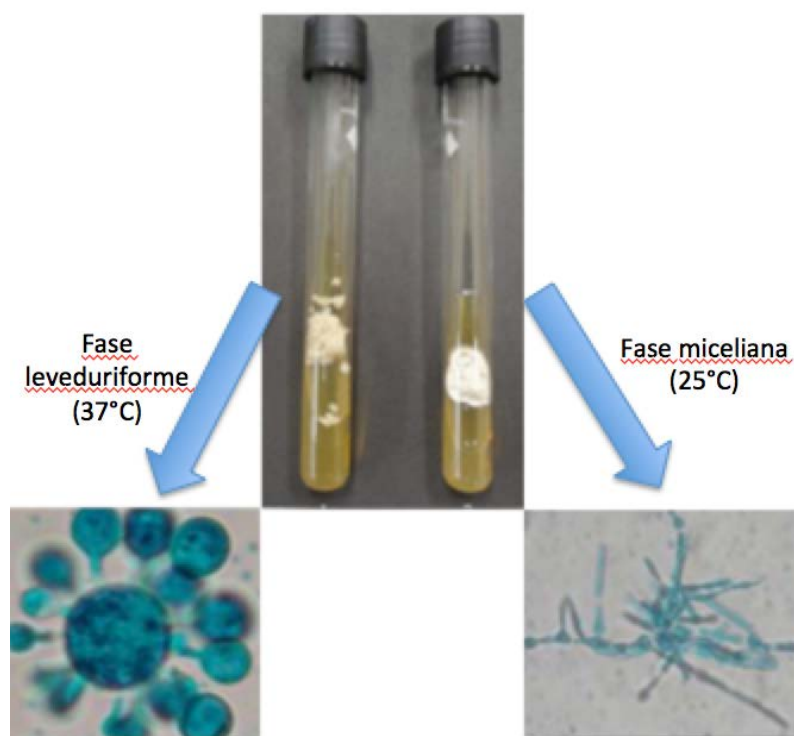


Figura 1- Aspectos das culturas de *Paracoccidioides* spp. nas fases miceliana (25 °C) e leveduriforme (37 °C).

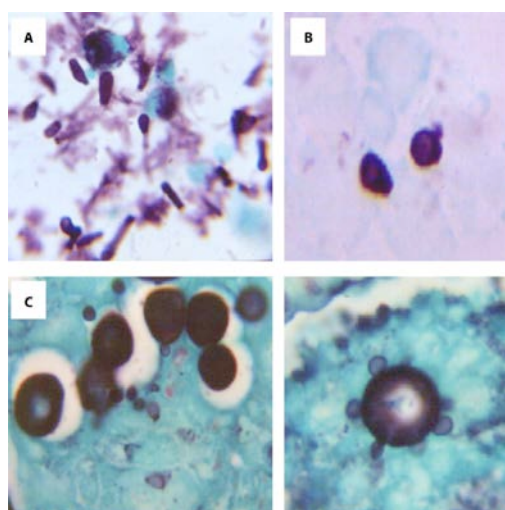


Figura 2- Estágios da transição conídio-levedura em pulmões de camundongo (corado com técnica de Gomori). (A) Conídios. Um inóculo foi obtido da fase micelial, visto em lavagem de fluido broncoalveolar 1h após inoculação. Aumento de 40x.(B) Células intermediárias desenvolvendo-se em cachos em 48h após inoculação. Aumento x100.(C) Células leveduriformes vistas em cachos em 48-96h após inoculação. Aumento x100. **Fonte:** (SHANKAR ET AL., 2011)

A paracoccidioidomicose é uma micose sistêmica granulomatosa causada por *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, que pode infectar hospedeiros via inalação de propágulos do micélio, como artroconídios (SAN-BLAS; NINO-VEGA; ITURRIAGA, 2002).

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 no indivíduo (BENARD et al., 2005; MARQUES, 2013; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

P. brasiliensis foi inicialmente classificado em três diferentes espécies filogenéticas, S1, PS2 e PS3 sendo a espécie S1, um grupo parafilético encontrado no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela e a espécie PS3, um grupo monofilético encontrado apenas na Colômbia (MATUTE et al., 2006). Mais tarde, 21 isolados (7 novos) de *P. brasiliensis* foram reclassificados com base na comparação de seqüências codificantes e não codificantes de diferentes genes, além de regiões ITS (*internal transcribed spacers*). Surge dessa maneira uma nova classificação. Pb01 é considerado uma nova espécie (CARRERO et al., 2008). Este achado foi confirmado por (TEIXEIRA et al., 2009), que descreveram então a espécie *P. lutzii* (Pb 01-like species). A correta taxonomia molecular deste fungo tem aberto novas possibilidades para o estudo e o entendimento de suas relações ecoepidemiológicas com seus hospedeiros (BAGAGLI et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2009). Este fungo apresenta dimorfismo, pois os propágulos uma vez inalados podem sofrer diferenciação celular, assumindo forma de levedura multinucleada.

1.2 Epidemiologia

Paracoccidioides spp. é encontrado em regiões de clima tropical e sub-tropical da América Latina (Figura 3). Essas regiões apresentam temperaturas moderadas que variam de

17-24°C, além de alto índice pluviométrico (>1,400 mm ao ano) (COLOMBO et al., 2011; SAN-BLAS; BURGER, 2011; SHANKAR et al., 2011).

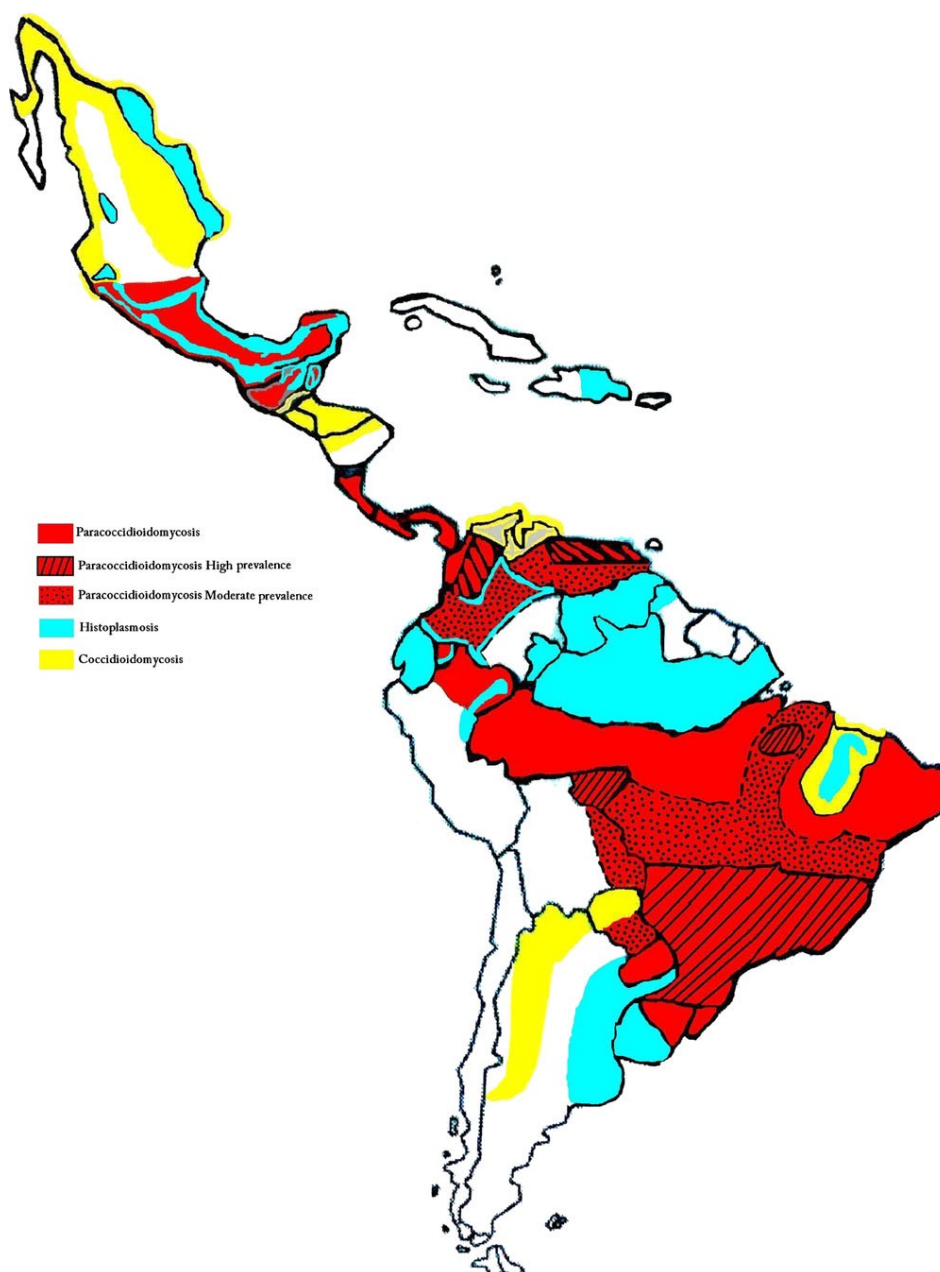


Figura 3- Distribuição geográfica de infecções fúngicas endêmicas na América Latina. **Fonte:** (SIFUENTES-OSORNIO; CORZO-LEON; PONCE-DE-LEON, 2012)

Segundo Prado e colaboradores, (2009), 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. Em 2009 um estudo epidemiológico das micoses sistêmicas no Brasil,

relatou que entre os anos de 1996 a 2006 houveram 3.583 mortes causadas por micoses sistêmicas, sendo a principal causa de morte a infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*. Nas infecções relacionadas à indivíduos imunocomprometidos, mais de 50 % dos casos de morte ocorreram por criptococose, seguido por candidíase e histoplasmose (PRADO et al., 2009).

Pouco se sabe sobre a incidência de *P. lutzii* tanto no Brasil quanto em outros países (THEODORO et al., 2012). Dados epidemiológicos sugerem que *P. lutzii* é endêmica na região Centro- Oeste brasileira, mais especificamente nos estados de Mato Grosso e Goiás. Poucos casos de PCM ocasionada por *P. lutzii* foram relatados fora desta área (JIMÉNEZ, 2015).

O perfil majoritário de pacientes manifestando PCM é adulto, do sexo masculino, trabalhador de zonas rurais e imunodeprimidos (BARROZO et al., 2010; COUTINHO et al., 2002; MIRANDA, E. J.; GONCALVES; FRANCA, 2011; TELES; MARTINS, 2011).

1.3 Adesinas

Atualmente muito da biologia do fungo já é conhecida. *Paracoccidioides* spp. é considerado um fungo intracelular facultativo e este pode aderir e invadir células epiteliais tanto *in vivo* quanto *in vitro* (DE BRITO et al., 1973; HANNA; MONTEIRO DA SILVA; GIANNINI, 2000; MENDES-GIANNINI et al., 2000). A endocitose deste fungo ativa os microfilamentos e microtúbulos, além de induzir apoptose (MENDES-GIANNINI et al., 2004).

Sabe-se que a maior virulência/patogenicidade de um isolado decorre das peculiaridades na adesão, diferenciando-os uns dos outros (ANDREOTTI et al., 2005; MENDES-GIANNINI et al., 2006).

Adesinas foram encontradas em um grande número de diferentes patógenos, estas interagem com componentes da matriz extracelular (MEC) do hospedeiro e muitas vezes são de grande importância na modulação da migração, invasão, diferenciação e proliferação

microbiana. O estudo de moléculas de ligação às células do hospedeiro e adesinas que podem também atuar como invasinas, pode ser um alvo interessante para o desenvolvimento de vacinas e terapias de bloqueio de receptores. Acredita-se que a patogênese causada por *Paracoccidioides* spp. esteja relacionada com algumas adesinas já descritas (BARBOSA et al., 2006; MENDES-GIANNINI et al., 2006; PEREIRA et al., 2007; VICENTINI et al., 1994).

Uma adesina de 30 kDa de *P. brasiliensis*, com capacidade de ligação a laminina foi isolada sendo mais expressa em um isolado de *P. brasiliensis* que apresentava alta capacidade de adesão (ANDREOTTI et al., 2005). Esta adesina pertence à família das proteínas 14-3-3 (DA SILVA et al., 2013), pequenas proteínas multifuncionais presentes em células eucarióticas. Silva et al., (2013) comprovou a inibição da adesão de *P. brasiliensis* à células epiteliais a partir da atuação da proteína 14-3-3 recombinante. Ainda neste estudo sugeriu-se que, a partir da observação de um acúmulo da proteína na parede celular fúngica, a proteína 14-3-3 apresenta importante papel não somente na adesão, mas também em outros processos celulares como apoptose (DA SILVA et al., 2013). Em 2015, Silva e colaboradores confirmaram o importante papel exercido pela proteína 14-3-3 no evento apoptótico celular, atuando na via intrínseca e estando diretamente relacionada ao aumento da expressão de p53 (DA SILVA et al., 2015), proteína envolvida no processo de manutenção da integridade genômica (FUJITA et al., 2002). Dessa maneira, a proteína 14-3-3 está associada não somente a manutenção do fungo na célula hospedeira, como também no processo de disseminação da doença (DA SILVA et al., 2013).

Paracoccidioides spp. também apresenta 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. Ensaio utilizando conídios de *Paracoccidioides* spp., pré-incubados com anticorpo monoclonal anti-32 kDa inibiram, de maneira dose-

dependente, a aderência do fungo as proteínas da MEC (GONZALEZ et al., 2005; HERNANDEZ et al., 2011). A hidrolase de 32 kDa (PbHAD32), identificada por Hernández e colaboradores (2010), é um importante fator de virulência e desempenha função de manutenção do formato celular durante o crescimento. Esta função pôde ser caracterizada através do uso da tecnologia de RNA antisense, ou seja, PbHAD32 aRNA com reduzidos níveis de gene e expressão gênica. Ainda foi possível observar neste estudo, uma diminuição da adesão às células pulmonares (A549) devido a baixa expressão de PbHAD32 (HERNANDEZ et al., 2010).

A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), recombinante, que é um componente de *Paracoccidioides* spp., foi capaz de se ligar à laminina, colágeno tipo I e fibronectina. O tratamento de formas leveduriformes de *Paracoccidioides* spp. com anti-GAPDH e de pneumócitos com GAPDH recombinante promoveu a inibição da infecção do fungo às células epiteliais (BARBOSA et al., 2006).

Coltri et al., 2006 estudaram uma proteína de 70 kDa, que foi designada como Paracoccina, ligante de n- acetilglucosamina (GlcNAc) que se liga à laminina e induz a produção de TNF- α por macrófagos, com aumento de NO (óxido nítrico), suprimindo as células do sistema imunológico e, conseqüentemente, favorecendo a adesão e invasão das células do hospedeiro, sugerindo ser um fator importante na patogênese da PCM (COLTRI et al., 2006).

Outra adesina de expressiva importância no processo de infecção por *Paracoccidioides* spp é a malato sintase (MLS). Encontrada na parede celular fúngica, esta adesina apresenta a capacidade de ligar-se a fibronectina e colágenos tipo I e IV (DA SILVA NETO et al., 2009). Foi também comprovada sua interação com a enolase e a trifosfato isomerase, conferindo uma otimização no processo de adesão celular (OLIVEIRA et al., 2013).

Estudo *in vivo* conduzido por Oliveira *et al.* (2015), avaliou a expressão gênica de uma série de adesinas, após a infecção com *Paracoccidioides* spp. Os resultados demonstraram uma maior taxa de expressão de duas destas adesinas: enolase e 14-3-3. Além disso, também foi observada uma maior expressão de adesinas por *P. brasiliensis* em relação a *P. lutzii*, possibilitando a correlação da capacidade de adesão com a maior virulência de *P. brasiliensis*.

1.3.1 gp43

A glicoproteína de 43 kDa, (gp43), ligante de laminina e fibronectina, tem importante papel na adesão (ANDREOTTI *et al.*, 2005; VICENTINI *et al.*, 1994). Fato este confirmado também pela inibição do soro anti-gp-43 em 85% no processo de adesão do fungo (HANNA *et al.*, 2000). A gp43 foi inicialmente identificada por Yarzabal *et al.* (1977) e, posteriormente, caracterizada por Puccia *et al.* (1986) (PUCCIA *et al.*, 1986; YARZABAL *et al.*, 1977). Trata-se do antígeno mais utilizado para o estudo da resposta imune humoral na PCM, por ser considerado o antígeno imunodominante de *P. brasiliensis*, como demonstrado nos primeiros estudos sorológicos realizados pelo grupo da Micologia da FCF-UNESP Araraquara (MENDES-GIANNINI; MORAES; RICCI, 1990) e por Camargo *et al.* (1991). Esta fração foi majoritariamente reconhecida por praticamente 100% dos soros de pacientes com PCM (CAMARGO *et al.*, 1991; MENDES-GIANNINI *et al.*, 1990). Por outro lado, tem sido demonstrado que diferentes isolados deste fungo podem produzir diferentes isotipos de gp43, variando de pI (ponto isoelétrico) 5,8 a 8,5 (SOUZA *et al.*, 1997) e que estes são diferentemente expressos entre os isolados.

Há uma diferença na expressão de gp43 entre as espécies *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, sendo esta glicoproteína muito mais expressa em *P. brasiliensis* (DE OLIVEIRA, *et al.*, 2015). Este dado é de extrema importância devido a sua função como marcador sorológico para o diagnóstico da PCM (PUCCIA; TRAVASSOS, 1991). Em recente estudo, Oliveira HC e colaboradores (2015) confirmaram um menor envolvimento no processo de adesão da gp43

em *P. lutzii*, e somado à diferença nos níveis de expressão, reforçaram a necessidade da busca por novos marcadores sorológicos para o diagnóstico da PCM ocasionada por esta espécie.

A apoptose pode ser um importante mecanismo de virulência devido a redução dos mecanismos de defesa do hospedeiro (ASHIDA et al., 2011). O processo de apoptose ocorre através de um mecanismo fisiológico de morte celular programada sem ocasionar resposta imune (STRASSER; CORY; ADAMS, 2011). A sobrevivência intracelular de *Paracoccidioides* spp. pode ser garantida devido ao processo de apoptose desencadeado dentro da célula hospedeira após a invasão (MENDES-GIANNINI et al., 2004; MENDES-GIANNINI et al., 2005; SOUTO et al., 2003; VERICIMO et al., 2006).

Em 2008, Silva et al, demonstrou que através da expressão de caspases-2, 3 e 8, *Paracoccidioides* spp. induz a apoptose de macrófagos. Sabe-se que a função da gp43 não limita-se apenas ao processo de adesão. Estudo recente realizado (DA SILVA et al., 2015) confirma sua atuação no processo de apoptose induzido por *Paracoccidioides* spp., através da ativação da caspase-8 que por consequência leva a ativação da caspase-3, contribuindo assim para o processo de indução de apoptose celular.

A gp43 também está correlacionada a modulação da resposta imunológica local e sistêmica. Dois peptídeos derivados da gp43, P4 e P23, são responsáveis pelo processo de *downregulation* de macrófagos e da resposta inflamatória, fatos comprovados através de estudos *in vitro* e *in vivo* (FLAVIA POPI; LOPES; MARIANO, 2002; KONNO, A. Y. et al., 2009; KONNO, F. T. et al., 2012). Em 2012, Konno et al., comprovaram que P4 e P23 têm a capacidade de modular importantes mediadores inflamatórios tais como TNF- α , IL-6, IL-10 e TLR2, podendo agir diretamente no foco inflamatório.

1.4 Alternativas terapêuticas

A interrupção do processo de adesão de *Paracoccidioides* spp. às células hospedeiras por moléculas de fontes diversas, seria de grande interesse científico para o desenvolvimento

de novas drogas antifúngicas, devido a possibilidade de interferência já no início do processo infeccioso.

1.4.1 Inibição da tirosina – quinase (PTK)

Alguns estudos relatam que as células hospedeiras sinalizam algumas vias de modulação quando há uma infecção fúngica. Em estudos realizados por nosso grupo, por exemplo, foi demonstrado que a invasão de *Paracoccidioides* spp. foi associada com a ativação de tirosina - quinase do hospedeiro. A rede de transdução de sinal envolvendo a proteína tirosina - quinase (PTK) e de fosfatases podem modular eventos cruciais durante infecções fúngicas. O envolvimento de PTK foi investigado por Monteiro da Silva et al., (2007) na invasão de *Paracoccidioides* spp. em células epiteliais de mamíferos e uma inibição significativa da infecção fúngica ocorreu após o pré - tratamento das células epiteliais com a genisteína, uma isoflavona inibidora específica de PTK, indicando que a via de PTK está envolvida na internalização de *Paracoccidioides* spp. Assim esta proteína se constitui como um alvo interessante na interferência do processo infeccioso de *Paracoccidioides* spp. (MONTEIRO DA SILVA et al., 2007).

1.4.2 Anti-gp43

O uso de anticorpos produzidos a partir da proteína gp43 também é considerado uma boa estratégia para evitar a adesão a diferentes células do hospedeiro. Há evidências que a administração de anticorpos monoclonais pode modificar o curso da doença em camundongos infectados com diferentes fungos (ALVIANO et al., 2004; CHATURVEDI et al., 2005; DE BERNARDIS et al., 1997; DE MATTOS GROSSO et al., 2003; MORAGUES et al., 2003; MUKHERJEE; SCHARFF; CASADEVALL, 1992; NOSANCHUK et al., 2003). O mecanismo de ação do anticorpo no combate à infecção baseia-se na ativação do complemento, neutralização de antígenos, aumento da eficiência da fagocitose, inibição do crescimento, da aderência e formação de biofilmes ou efeito antimicrobiano direto.

De acordo com estudo realizado (BUISSA-FILHO et al., 2008), o papel protetor de anticorpos específicos contra *P. brasiliensis* foi constatado utilizando-se anticorpos monoclonais da gp43 em modelos de infecção *in vivo* e *in vitro*. A administração passiva de alguns anticorpos monoclonais obtidos a partir de peptídeos derivados da gp43, antes e após a infecção intratraqueal ou intravenosa, levou a uma redução da carga fúngica e ao decréscimo da inflamação pulmonar. A proteção mediada pelo anticorpo monoclonal 3E, o mais eficiente na redução da carga fúngica, esteve associada ao aumento da fagocitose das leveduras de *P. brasiliensis*. Adicionalmente, a reatividade do anticorpo monoclonal 3E contra um painel de peptídeos da gp43 sugeriu que a sequência NHVRIPIGWAV contém o epítipo de ligação específico. Este trabalho revelou novos candidatos para elaboração de vacinas. Portanto esta seria alternativa na terapêutica para esta infecção e adicionalmente poder-se-ia conjugá-la com moléculas antifúngicas envolvidas na interferência do processo adesivo e invasivo deste fungo tendo como alvo também a gp43.

Além do uso de anticorpos para a imunização contra *Paracoccidioides* spp., muito tem sido estudado a respeito do peptídeo P10, sequência de 15 aminoácidos (QTLIAIHTLAIRYAN), epítipo da gp43 responsável pela mediação da resposta imune através da indução da proliferação de linfócitos T- helper produtores de IL-2 e INF- γ . Foi observada uma grande redução do desenvolvimento da infecção pulmonar em camundongos imunizados com o peptídeo quando comparados com aqueles não imunizados (TABORDA et al., 1998). Rittner, et al., (2012) através de testes *in vivo*, realizou a imunização de camundongos através de uma vacina de DNA codificante de P10 com e sem a presença de plasmídeo codificante de IL-12. Os resultados demonstraram redução da carga fúngica nos pulmões dos camundongos posteriormente infectados e a presença de pIL-12 contribuiu para uma maior efetividade da vacina (RITTNER et al., 2012). Em estudo realizado por Magalhães et al., (2012) a associação da P10 a células dendríticas demonstrou-se promissora tanto como

método para imunização quanto para o tratamento de doença já em curso (MAGALHAES et al., 2012).

Estudos recentes vêm demonstrando a importância do sistema imune inato e das células dendríticas no desenvolvimento da paracoccidiodomicose (THIND; TABORDA; NOSANCHUK, 2015). Jannuzzi e colaboradores (2015) demonstraram através de ensaios *in vivo*, indução na produção de IgG, IFN- γ , IL-12 e IL-4 em camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis*, a partir do tratamento dos mesmos com células DC-pMAC/PS-scFv. Estas são células dendríticas transfectadas com plasmídeos codificantes de *single chain variable fragment* (scFv) mimetizadora de anti-gp43. Além disso, verificaram que a imunização com o uso de DC-pMAC/PS-scFv confere proteção contra a PCM experimental, estimulando a produção de linfócitos CD4 e CD8 (JANNUZZI et al., 2015).

Outro estudo recente verificou através de ensaios *in vivo*, a imunização de camundongos a partir da associação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* com a proteína gp43 recombinante (yMAgp43). Através da análise histopatológica dos pulmões dos camundongos infectados sem imunização prévia comparados com os camundongos infectados previamente vacinados, notou-se menor densidade das lesões granulomatosas, granulomas mais compactos e menos frequentes, além da presença de poucas leveduras viáveis nos camundongos vacinados. Essas observações provavelmente decorrem do desenvolvimento de imunidade do tipo Th1 com a presença de níveis aumentados de IL-12 e IFN- γ (ASSIS-MARQUES et al., 2015).

1.5 Tratamento

A terapia antifúngica da PCM é restrita às poucas opções terapêuticas e é utilizada muitas vezes de forma *ad eternum*, pois o critério de cura ainda é discutido clinicamente. Adicionalmente, a disponibilidade de agentes antifúngicos, na prática clínica, é relativamente pequena, ineficiente e, por vezes, com elevada toxicidade. O tratamento de infecções fúngicas

invasivas envolve um repertório clássico de antifúngicos, incluindo anfotericina B, fluconazol e itraconazol e mais recentemente voriconazol, posaconazol e ravuconazol, bem como compostos com um novo mecanismo de ação, tais como as equinocandinas (DE PAUW et al., 2000; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). Assim a demanda por substâncias com potencial terapêutico e novos alvos tornou-se imperativo.

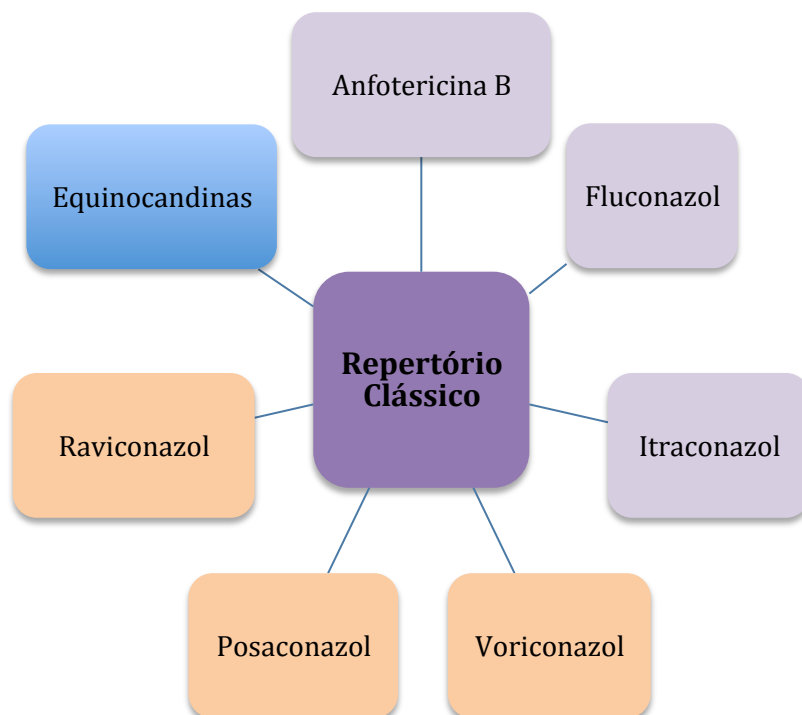


Figura 4- Repertório clássico para o tratamento da PCM.

1.6 Antifúngicos de Origem Natural

Moléculas a partir de fontes naturais são alternativas que podem ser usadas na formulação de novos agentes antifúngicos. Nosso laboratório desenvolveu estudos com várias espécies de plantas através do projeto temático - Biota /FAPESP (BIOprospecTA) desenvolvido no Instituto de Química da UNESP e agora está envolvido no projeto SISBIOTA do CNPq. Extratos, frações e compostos puros e moléculas com atividade antifúngica foram estudados baseando-se em metodologias aprovadas pelo CLSI (SARDI; ALMEIDA; MENDES GIANNINI, 2011). Entre as substâncias estudadas em nosso laboratório as mais ativas para *Paracoccidioides* spp. são as chalconas sintéticas inéditas

modeladas a partir de fontes vegetais que apresentaram atividade antifúngica frente às várias espécies de fungos patogênicos humanos incluindo *P. brasiliensis* e isolados resistentes de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* sendo os resultados promissores para o desenvolvimento de pró-fármacos. Adicionalmente estes não apresentaram citotoxicidade para um banco celular expressivo e mostrou atividade inibidora da adesão de *Cryptococcus neoformans* às células de glioma humano (GULLO, 2012).

1.6.1 Chalconas

Chalconas apresentam cadeia aberta e são classificadas como flavonóides (SIMÕES et al., 2006). Estas apresentam grande variedade estrutural no reino vegetal e são caracterizadas pelo seu amplo espectro de atividades biológicas (Figura 5), além de destacarem-se em sua ampla utilização como substrato para novas sínteses orgânicas (BANDAY; IQBAL ZARGAR; GANAIE, 2011; BRANDAO et al., 2010; KATSORI; HADJIPAVLOU-LITINA, 2011).

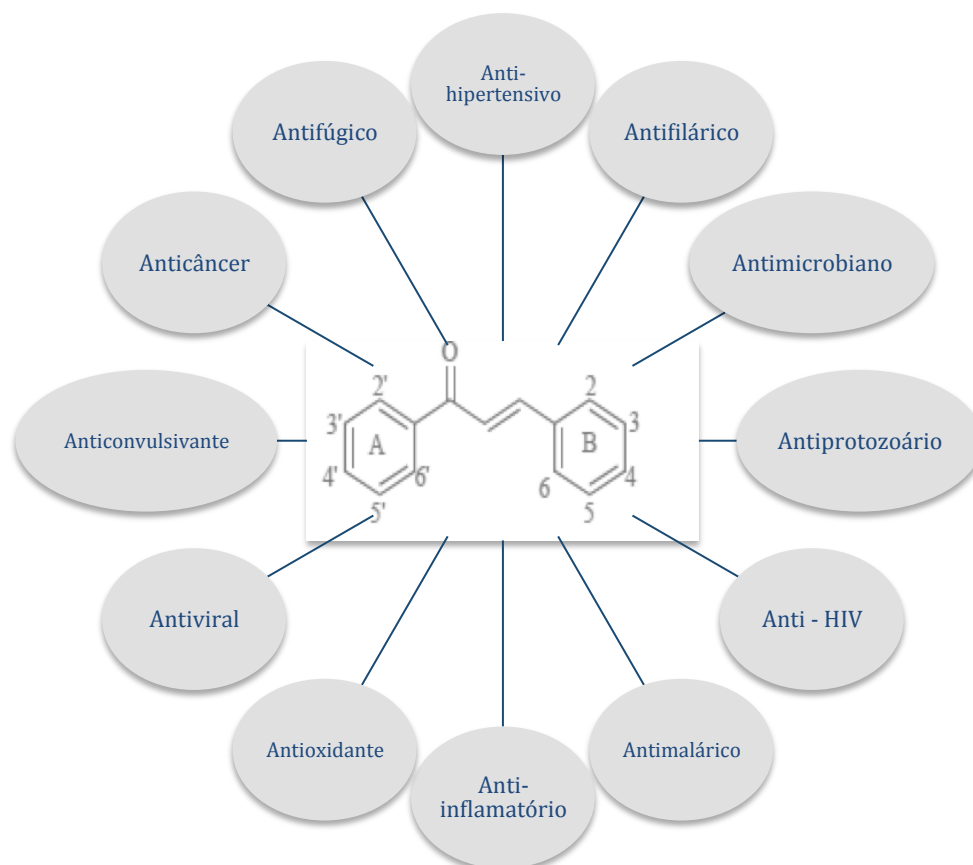


Figura 5- Estrutura molecular geral das chalconas e suas diferentes atividades biológicas.
Fonte:(SINGH; ANAND; KUMAR, 2014).

A atividade antibacteriana, antiviral e citotóxica apresentada pelas chalconas descobertas a partir de um estudo realizado por Brandão e colaboradores decorre da presença de 2'-hidroxi-4',6'-dimetoxichalcona e 2',4'-diidroxi-3',6'-dimetoxichalcona em extratos de *Polygonum spectabile* (*Polygonaceae*), apresentando atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Microsporium canis*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*. (BRANDÃO et al., 2010).

Vários estudos mostraram o seu potencial antimalárico, anti-leishmania, anti-HIV, antifúngico, anti-tuberculose e potencial inibidor da tirosina - quinase (BARUA et al., 2012; BOECK et al., 2006; CHEENPRACHA et al., 2006; HARA et al., 2011; SVETAZ et al., 2004; VALLA et al., 2006; YANG et al., 2007).

O potencial de redução do processo inflamatório desta substância foi demonstrado em vários estudos com chalconas derivadas de plantas dos gêneros *Glycyrrhiza* e *Alpinia*

zingiberaceae (PRASAD et al., 2010). Neste contexto verifica-se o potencial farmacológico destas moléculas derivadas de chalconas e interessante a estrutura molecular destas se assemelham com a substância genisteína, isoflavona já descrita anteriormente como um inibidor de PTK (ORTIZ et al., 2012; ZHANG; ZHANG; SHEN, 2011; ZHAO et al., 2012; ZHU et al., 2012).

Pesquisas recentes têm demonstrado a capacidade da ação antiparasitária das chalconas. Estudo *in vitro* realizado por de Castro e colaboradores (2015) evidenciaram a atividade esquistossomicida exercida pela chalcona cardamonina, proveniente do extrato de *Piper aduncum* L. Comprovaram ainda a atividade inibitória da ATP difosfohidrolase (DE CASTRO et al., 2015). Esta enzima localizada na parede tegumentar externa de *Schistosoma mansoni*, é responsável pela hidrólise de nucleosídeos (DEMARCO et al., 2003; VASCONCELOS et al., 1993). Sendo assim, a cardamonina ocasiona dano e morte tegumentar do parasita sem afetar as células do hospedeiro (DE CASTRO et al., 2015). Outro estudo procurou avaliar a atividade de chalconas sintéticas contra leishmaniose ocasionada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Ensaio *in vivo* utilizando hamsters como modelo murino evidenciaram a atividade anti- *Leishmania* e ausência de toxicidade hepática e renal, além da indução de apoptose das células presentes nas lesões. É interessante ressaltar o fato dos compostos apresentarem atividade tópica, ocasionando assim um melhoramento da lesão quando aplicada diretamente sobre esta. Dessa forma apresentam-se como potenciais alternativas a exclusiva terapia intravenosa (DE MELLO et al., 2015).

O potencial antifúngico e a atividade antitumoral de chalconas foi avaliado por Tavares et al., (2011). Uma série de 6-quinolonil chalconas foi testada contra cinco tipos de fungos patogênicos tendo *P. brasiliensis* apresentado maior susceptibilidade a estas substâncias. Comprovou-se ainda que apesar das chalconas testadas apresentarem-se menos potentes que a anfotericina B em termos de atividade antifúngica, demonstraram maior

potência em relação a sulfametoxazol - trimetoprim. Também foi observada atividade antitumoral, a qual foi avaliada nas linhagens tumorais UACC-62 (melanoma), MCF-7 (adenocarcinoma) e TK-10 (carcinoma renal) (DE CARVALHO TAVARES et al., 2011).

Estudos *in vivo* e *in vitro* conduzidos por de Sá (2015) avaliaram a atividade antifúngica de 6-quinolinil-N-óxido chalconas frente a 14 isolados de *P. brasiliensis* e 3 isolados de *P. lutzii*. Os resultados não somente indicaram que os compostos apresentam atividade contra *P. brasiliensis* mas também promovem alteração morfológica nos estudos *in vitro*. Ainda foi observado nos estudos *in vivo*, realizado com camundongos, uma redução do processo inflamatório e maior preservação do tecido pulmonar quando comparado com a análise histológica dos animais tratados com itraconazol (DE SA et al., 2015).

Devido à variada gama de atividades biológicas, com destaque para o potencial antifúngico demonstrado pelas chalconas, estas apresentam-se como interessantes candidatas ao estudo da inibição da adesão de *Paracoccidioides* spp. a diferentes linhagens celulares.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivos gerais

Este projeto teve por objetivo avaliar novas opções terapêuticas direcionadas a diferentes alvos. Foi realizada a associação de anticorpos anti-glicoproteína de 43 kDa de *Paracoccidioides* spp. às moléculas com atividade antifúngica (3' chalcona), a fim de conjugar a terapia com drogas ao poder específico de anticorpos. Para tanto um conjunto de moléculas sintetizadas a partir de chalconas de fontes vegetais foram utilizadas.

1.7.2 Objetivos específicos

- Verificar, através de ensaios de ELISA, o potencial de inibição da adesão de *Paracoccidioides* spp. às células epiteliais frente aos tratamentos com anti-gp43, 3' chalc isolada e anti-gp43 associada a 3' chalc.
- Verificar, através de ensaios de ELISA, o potencial de inibição da adesão de *Paracoccidioides* spp. aos componentes da matriz extracelular (MEC) frente aos tratamentos com anti-gp43, 3' chalc isolada e anti-gp43 associada a 3' chalc.
- Verificar, através de ensaios de imunofluorescência, a ativação de microfilamentos de actina durante a interação de *Paracoccidioides* spp. com células A549 frente aos tratamentos com anti-gp43, 3' chalc isolada e anti-gp43 associada a 3' chalc.
- Verificar, através de ensaios de imunofluorescência, a expressão de fosfotirosinas (RAF) durante a interação de *Paracoccidioides* spp. com células A549 frente aos tratamentos com anti-gp43, 3' chalc isolada e anti-gp43 associada a 3' chalc.

2. METODOLOGIA

2.1 Fungos e condição de cultivo

Foram utilizadas as células na fase leveduriforme das espécies *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*, como representado na tabela abaixo. Os isolados foram cultivados de 3 a 4 dias a 37°C em meio sólido Fava-Netto.

Tabela 1: Isolados utilizados neste experimento

Espécie	Filogenia	Isolado	Proveniência
<i>P. brasiliensis</i>	S1	18	FM- USP
<i>P. brasiliensis</i>	S1	339	Inst. de Biociências de Botucatu
<i>P. brasiliensis</i>	PS2	02	Inst. de Biociências de Botucatu
<i>P. lutzii</i>	01- like		ATCC (MYA- 826)

2.2 Substâncias com atividade anti-*Paracoccidioides*

Neste trabalho foram utilizadas as Chalconas, que são compostos classificados como flavonóides de cadeia aberta, obtidas através do Projeto SISBIOTA CNPq em colaboração com o Instituto de Química da UNESP de Araraquara sob coordenação da Prof^a. Vanderlan da Silva Bolzani. Estas substâncias foram avaliadas previamente e classificadas como detentoras de forte atividade fungicida (a qual apresentou uma concentração inibitória mínima (CIM) de 0,125 mg/L), além de não apresentarem citotoxicidade nas linhagens celulares normais NOK (células orais normais imortalizadas) cujo valor de viabilidade foi de aproximadamente 60%, MRC-5 (fibroblastos de pulmão humano) com faixa de viabilidade de 70 a 90% e para as linhagens tumorais A549 (células tumorais de pulmão) onde a viabilidade foi de 20 a 65% de células vivas, HepG2 (células de hepatoma humano) com viabilidade variando de 60 a 95% e V87 (células de glioma humano) cuja viabilidade variou de 60 a 80%, através do ensaio do MTT analisado em estudo prévio em nosso laboratório (GULLO, 2012). (Tabela 2).

Tabela 2: Avaliação de citotoxicidade da chalcona (3' chalc) através do ensaio de MTT.

Linhagens celulares	Viabilidade celular (%)
NOK	60
MRC- 5	70- 90
A 549	20- 65
HepG2	60- 95
V87	60- 80

2.3 Cultura de Células Epiteliais

Neste estudo, foi utilizada a linhagem de células epiteliais contínuas A549 (células epiteliais respiratórias - pneumócitos tipo I) obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em meio HAM F-12 suplementado com 10% de soro fetal bovino, e mantidas a temperatura de 36,5°C (5% CO₂).

2.4 Obtenção da gp43

Para a obtenção da gp43, primeiramente foi preparado o antígeno filtrado de cultura (componentes exocelulares) e para isso foi utilizado o isolado 339 de *P. brasiliensis* em fase “L”. As formas leveduriformes, com cinco dias de crescimento em meio de Fava Netto, foram inoculadas em 200mL de meio de STA (Saubourad, Tiamina, Asparagina) e incubado a 37°C por 10 dias, em estufa agitadora. Após este período, as células foram tratadas com Timerosal na concentração final de 0,2 g/L e foram incubadas nas mesmas condições durante quatro dias. A partir daí, o filtrado de cultura foi concentrado utilizando polietilenoglicol 20.000 (Sigma), analisado quanto aos teores protéicos pelo método de Bradford (BioRad) e avaliado por SDS-PAGE. As alíquotas foram armazenadas a -70°C. Em seguida foi realizada a purificação da proteína através de cromatografia de troca iônica (coluna qFF, em gradiente de

tampão tris 0,1M contendo NaCl 1 M pH 8,0) no equipamento AKTA-FPLC (GE Healthcare).

2.5 Obtenção do anticorpo anti-gp43

Após a obtenção da proteína gp43 já purificada, foi produzido anticorpo policlonal em coelho. Para isso, 1,0 mg/mL da proteína foram inoculados por via intradérmica em coelhos machos albino provenientes do Biotério Central da UNESP Botucatu, intercalando as inoculações a cada 7 dias, sendo que na primeira inoculação, a proteína foi emulsificada com adjuvante completo de Freund e nas seguintes com o adjuvante incompleto de Freund. Decorridos 15 dias da última inoculação foi realizada uma sangria de prova e a avaliação do título de anticorpos produzidos foi feita através da técnica de imunoblot. Quando foi obtido um bom título de anticorpos (reatividade superior a 1/100), foi realizada a sangria total e o soro obtido foi precipitado com sulfato de amônio 1,56M, pH6.5, novamente titulado, aliquotado e estocado a -70°C.

2.6 Ensaios de ELISA para verificar a inibição de ligação de *Paracoccidioides* spp. às células epiteliais na presença da chalcona e/ou anti-gp43

Foi realizado o ensaio de ELISA de inibição para demonstrar a interferência da chalcona e do anticorpo na ligação de *Paracoccidioides* spp. às células A549. Antes da adição do fungo às células, os inóculos (10^4 cels/mL) foram previamente tratados com anti-gp43 (1:100), ou com a chalcona na concentração de 0,5mg/L (3x CIM), ou com a chalcona associada ao anti-gp43 (1:100) por 1h a 37°C. Após o tempo de tratamento, os inóculos foram lavados e ressuspensos no volume original para então ser adicionados às células. O tempo de incubação fungo-célula foi de 24h e em seguida foi realizado o ensaio de ELISA utilizando anti-cell free (1:100) como anticorpo primário e anti-rabbit IgG conjugado com peroxidase (1:3000) como secundário. Foram realizados os devidos controles para o ensaio de ELISA,

bem como foram utilizadas células não infectadas e células infectadas com os fungos sem tratamento prévio, como controles experimentais.

2.7 Ensaio de ELISA para verificar a inibição de ligação de *Paracoccidioides* spp. aos componentes da matriz extracelular (MEC) na presença da chalcona e/ou anti-gp43

Foi realizado o ensaio de ELISA de inibição para demonstrar a interferência da chalcona e do anticorpo na ligação de *Paracoccidioides* spp. aos componentes da MEC, laminina, fibronectina, colágeno tipo I e colágeno tipo IV. Para isso, placas foram devidamente sensibilizadas com 10 µg/mL de cada MEC, em tampão carbonato, overnight a 4°C. Em seguida, os inóculos (10^4 cels/mL) foram previamente tratados com anti-gp43 (1:100), ou com a chalcona na concentração de 0,5mg/L (3x CIM), ou com a chalcona associada ao anti-gp43 (1:100) por 1h a 37°C. Após o tempo de tratamento, os inóculos foram lavados e resuspendidos no volume original para então ser adicionados às placas sensibilizadas com a MEC. O tempo de incubação fungo-MEC foi de 24h e em seguida foi realizado o ensaio de ELISA utilizando anti-cell free (1:100) como anticorpo primário e anti-rabbit IgG conjugado com peroxidase (1:3000) como secundário. Foram realizados os devidos controles para o ensaio de ELISA, utilizando os fungos sem tratamento prévio, como controles experimentais.

2.8 Marcação com faloidina para observação dos filamentos de actina durante a interação de *Paracoccidioides* spp. com células A549 na presença da chalcona e/ou anti-gp43

Para verificar a influência da chalcona e/ou anti-gp43 sobre o citoesqueleto de actina durante a interação de *Paracoccidioides* spp. com células A549 foram realizados ensaios de imunofluorescência utilizando faloidina. A faloidina é uma toxina que se liga à actina polimérica, estabilizando-a interferindo com o retículo endoplasmático e outras estruturas ricas em actina. Para a reação de imunofluorescência, foram preparadas placas de 96 orifícios contendo as células epiteliais que foram infectadas com o inóculo (10^4 cels/mL) de

Paracoccidioides spp. previamente tratado como descrito nos itens anteriores (2.6 e 2.7) e incubadas a 37°C por 2h, 5h, 8h, 24h e 48h. Após os períodos de incubação, as células foram lavadas e fixadas com paraformaldeído 4%. Após a fixação, as células foram permeabilizadas, bloqueadas e incubadas com Faloidina FITC (1:50) em Azul de Evans por 50 minutos a 37°C. A seguir foi adicionado o soro anti gp43 (1:100) a temperatura ambiente. Passada 1 hora, adicionou-se o anti IgG conjugado com Alexa Fluor 549 (1:400) a temperatura ambiente por um período de 1h. Em seguida realizou-se a marcação do núcleo celular com DAPI 1µg/mL e então as placas foram analisadas no In Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare).

2.9 Imunofluorescência para verificar expressão de fosfotirosinas (RAF) durante a interação de *Paracoccidioides* spp. com células A549 na presença da chalcona e/ou anti-gp43

Para estas reações de imunofluorescência, foram preparadas placas de 96 orifícios contendo as células epiteliais que foram infectadas com o inóculo (10^4 cels/mL) de *Paracoccidioides* spp. previamente tratado como descrito nos itens anteriores (2.6 e 2.7) e incubadas a 37°C por 2h, 5h, 8h, 24h e 48h. Após os períodos de incubação, as células foram lavadas e fixadas com paraformaldeído 4%. Após a fixação, as células foram permeabilizadas, bloqueadas e incubadas com anti-Raf (1:100), a 37°C por 1h. A seguir foi adicionado o anti IgG conjugado com Alexa Fluor 488 (1:400) a 37°C. Passada 1 hora, adicionou-se o soro anti gp43 (1:100) a temperatura ambiente por 1h. Consecutivamente, foi adicionado o anti IgG conjugado com Alexa Fluor 549 (1:400) a 37°C por 1h. Em seguida realizou-se a marcação do núcleo celular com DAPI 1µg/mL e então as placas foram analisadas no In Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Obtenção da gp43

A proteína gp43 foi purificada a partir de filtrado de cultura de *P. brasiliensis* (339) utilizando cromatografia de troca aniônica. Para avaliar esse processo de purificação foi utilizada eletroforese bidimensional corada por Coomassie Blue (Figura 6). Essa metodologia de acordo com Puccia et al., 1991, possibilitou a obtenção de uma fração purificada da gp43.

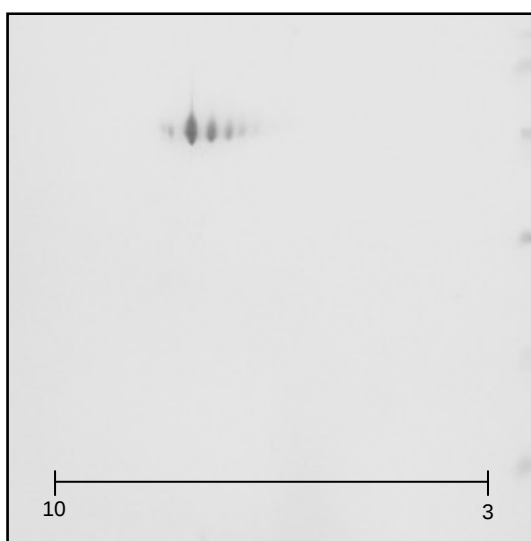


Figura 6: Eletroforese Bidimensional demonstrando a purificação da proteína de 43kDa e da gp43. SDS-Page 12,5% corado por Coomassie Blue.

3.2 Ensaios de ELISA para verificar a inibição de ligação de *Paracoccidioides* spp. às células epiteliais na presença da chalcona e/ou anti-gp43

Foi realizado o ensaio de ELISA de inibição para demonstrar a interferência da chalcona e do soro anti-gp43 na ligação de *Paracoccidioides* spp. às células A549. O controle com o soro pré-imune de coelho foi previamente realizado em nosso laboratório e a taxa de inibição de ligação às células epiteliais foi de 10%.

Os dados apresentados na figura 7 demonstram que tanto a chalcona isolada (0,5mg/L), quanto associada a anti-gp43 (1:100) apresentou resultado satisfatório para a inibição da

ligação de Pb18, Pb01 e Pb02 às células epiteliais. A associação anti-gp43 e chalcona só foi efetiva para o isolado Pb02 e para os demais isolados, a chalcona isolada promoveu uma maior inibição da interação (25%) quando comparado ao efeito produzido pelo anticorpo anti-gp43 inibição em torno de 15%. Estes resultados podem sugerir que a chalcona atue no bloqueio de algum receptor ou mecanismo intracelular, diminuindo a capacidade de adesão à célula ou apresente algum mecanismo semelhante ao da anti gp43, bloqueando a gp43 externalizada. Embora os valores fossem relativamente baixos, essa abordagem é inédita, não se encontrando na literatura, dados comparativos. O uso de substâncias derivadas de produtos naturais tem sido empregado em nosso laboratório como os derivados de ácido gálico que tem mostrado bons resultados em relação aos agentes da paracoccidiodomicose (De Paula e Silva et al., 2014).

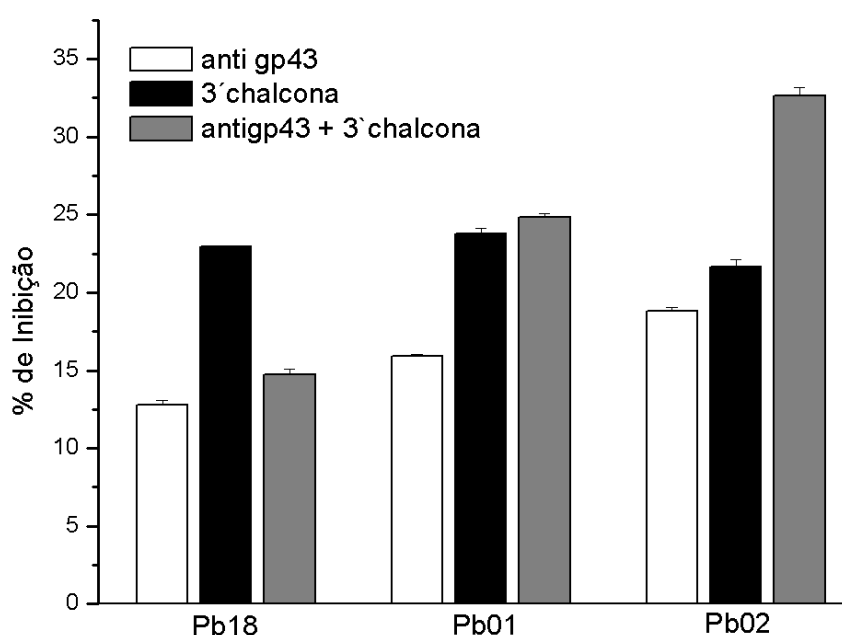


Figura 7- ELISA de inibição demonstrando a interferência da chalcona e/ou associada ao anticorpo anti-gp43 na ligação de Pb18, Pb01 e Pb02 às células A549.

3.3 Ensaios de ELISA para verificar a inibição de ligação de *Paracoccidioides* spp. aos componentes da matriz extracelular (MEC) na presença da chalcona e/ou anti-gp43

Também foi realizado o ensaio de ELISA de inibição para demonstrar a interferência da chalcona (0,5mg/L), e da chalcona associada ao soro anti-gp43 (1:100) na ligação de *Paracoccidioides* spp. aos componentes da MEC (10ug/mL) e esses dados estão apresentados na Tabela 3. O controle com o soro pré-imune de coelho foi previamente realizado em nosso laboratório e a taxa de inibição de ligação às células epiteliais foi de 10%. Em nosso laboratório tem-se mostrado a importância da matriz extracelular na relação fungo-hospedeiro (MENDES-GIANNINI et al.,2000; 2006). Portanto, a escolha deste alvo para inibir a ligação de *Paracoccidioides* spp reveste-se de grande importância e mostra que se podem obter resultados com essa abordagem.

Tabela 3: Ensaio de ELISA mostrando a porcentagem (%) de inibição da adesão dos diferentes isolados em diferentes condições.*OV: tratamento por 24h, Lm: laminina, Fn: fibronectina, CI: colágeno tipo I e CIV: colágeno tipo IV

		<u>Lm</u>	<u>Fn</u>	CI	CIV
3' <u>chalc</u> OV	<u>Pb</u> 18	13.1%	10.1%	14.8%	8.7%
3' <u>chalc</u> OV	<u>Pb</u> 01	x	14.5%	12.9%	10.8%
3' <u>chalc</u> OV	<u>Pb</u> 02	x	x	x	9.4%
<u>Anti gp43</u> + 3' <u>chalc</u>	<u>Pb</u> 18	x	16.4%	x	x

Adesinas foram encontradas em um grande número de diferentes patógenos, que interagem com componentes da matriz extracelular (MEC) do hospedeiro e muitas vezes são de grande importância na modulação da migração, invasão, diferenciação e proliferação microbiana. Fortes indícios apontam que a patogênese causada por *Paracoccidioides* spp.

esteja relacionada com algumas adesinas já descritas (BARBOSA et al., 2006; MENDES-GIANNINI et al., 2006; PEREIRA et al., 2007; VICENTINI et al., 1994).

Observou-se que a 3'chalc promoveu a inibição da ligação do isolado 18 à todos os componentes da MEC testados; inibiu a ligação do isolado 01 à fibronectina, colágeno tipo I e colágeno tipo IV e inibiu a ligação do isolado 02 apenas ao colágeno tipo IV. Além disso, a associação com anti-gp43 foi efetiva somente para a ligação de Pb18 à fibronectina, aumentando essa inibição em 6,3%. Deve-se destacar a variabilidade de resultados dependendo do isolado. *Paracoccidioides* não é um gênero homogêneo e já foi mostrado que tem variabilidade em vários aspectos inclusos em sua virulência (Hanna et al., 2000).

Devido a resultados prévios com o soro anti gp43, foram apresentados somente os dados referentes aos tratamentos realizados com a chalcona isolada e associada ao anticorpo.

Observou-se que a porcentagem de inibição da adesão do isolado 18 caiu consideravelmente quando realizada a associação da chalcona com o anticorpo, gerando a hipótese de que haja alguma interação prejudicial à atuação da chalcona. Contudo, estudos devem ser realizados para comprovar tais sugestões

3.4 Marcação com faloidina para observação dos filamentos de actina durante a interação de *Paracoccidioides* spp. com células A549 na presença da chalcona e/ou anti-gp43

Filamentos de actina estão presentes em todas as espécies eucarióticas, sendo mais abundantes no citoesqueleto. Integrinas estão ligadas ao sistema de microfilamentos de actina através de diversas moléculas. Estas ligações formam estruturas semelhantes a âncoras, permitindo à célula eucariótica aderir às outras células ou à matriz extracelular. Estes sistemas são utilizados por parasitas intracelulares para entrar na célula hospedeira (ALAEI et al., 1993). A invasão de microrganismos em células epiteliais evidencia-se pela alteração de filamentos da célula hospedeira que fica deformada. A internalização e o efeito de enrugamento são acompanhados pelo rearranjo de actina. Após a entrada da bactéria, a polimerização do filamento da actina retorna ao normal (FINLAY et al., 1992; SALYERS & WHITT, 1994).

Rho, Rac e Cdc42 fazem parte da família das GTPases e são proteínas envolvidas no processo de regulação dos filamentos de actina, assim controlando processos celulares como por exemplo motilidade e adesão (COOPER, 2000). Estudo realizado em nosso laboratório (MIRANDA, E. T., 2006) confirmou aumento na expressão de Rho durante a interação de *P. brasiliensis* tanto em células epiteliais tratadas com o a gp43 quanto com o controle, sugerindo a ocorrência de rearranjo estrutural dos microfilamentos de actina.

As células A549 foram infectadas com *P. brasiliensis* e *P. lutzii* previamente tratados (anti gp 1:100 e/ou chalcona 0,5mg/L) e incubadas por diferentes períodos de tempo. Foi possível detectar que não houve alteração do padrão de distribuição de actina das células infectadas tanto com Pb18 (Figura 8A) quanto com Pb01 (Figura 8B) que receberam o tratamento prévio, reforçando os resultados do estudo previamente citado. A não alteração no padrão de actina pode ser melhor observada nos tempos 5h da Figura 8A e 24h da Figura 8B, onde as

células fúngicas previamente tratadas apresentam uma maior intensidade na fluorescência verde, que sinaliza o citoplasma celular, onde estão localizados os filamentos de actina. É importante enfatizar que devido ao aumento utilizado na imagem, a visualização do padrão de distribuição fica comprometida, no entanto foi possível verificar que o prévio tratamento diminuiu a quantidade de células infectadas, comprovando os achados anteriores em relação a inibição da adesão com os tratamentos testados.

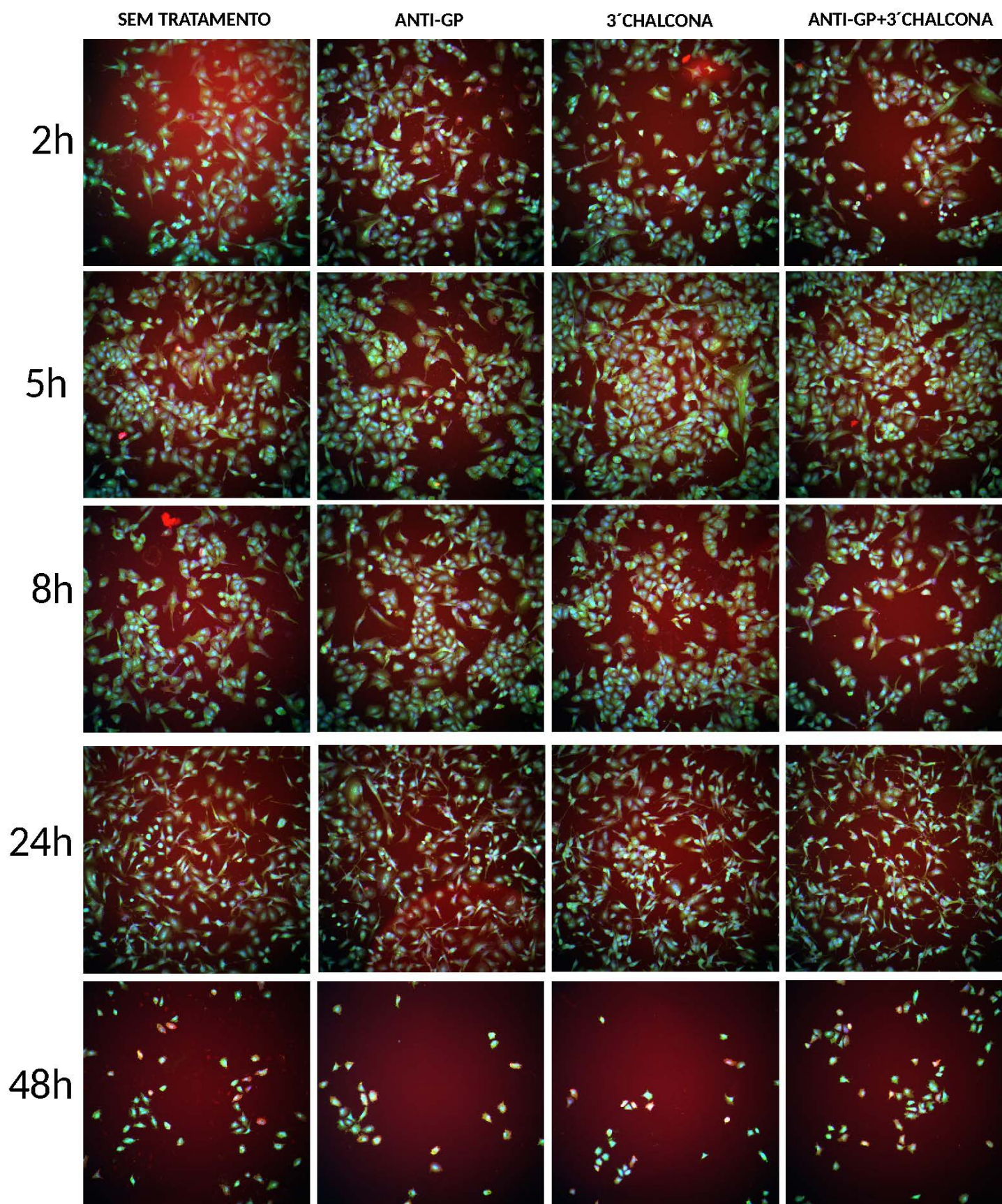


Figura 8A- Imunofluorescência de células epiteliais infectadas com *P. brasiliensis*, isolado 18 não tratado, previamente tratado com anti gp43, previamente tratado com 3`chalcona e previamente tratado com anti gp43 e 3`chalcona, por 2h, 5h, 8h, 24h e 48h usando faloidina-FITC (verde), anti gp43 (vermelho) e DAPI (azul).

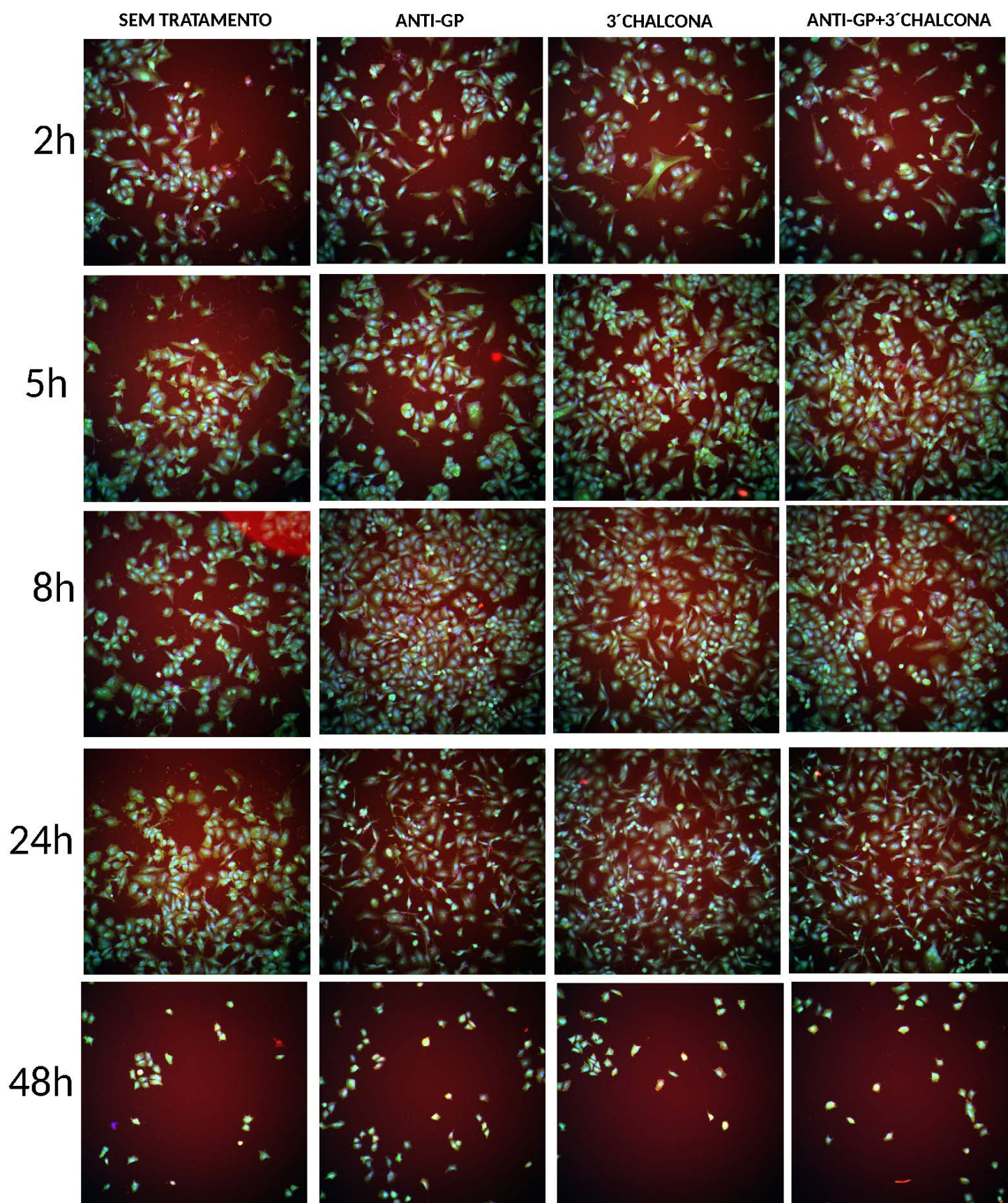


Figura 8B- Imunofluorescência de células epiteliais infectadas com *P. lutzii*, isolado 01 não tratado, previamente tratado com anti gp43, previamente tratado com 3'chalcona e previamente tratado com anti gp43 e 3'chalcona, por 2h, 5h, 8h, 24h e 48h usando faloidina-FITC (verde), anti gp43 (vermelho) e DAPI (azul).

3.5 Imunofluorescência para verificar expressão de fosfotirosinas (RAF) durante a interação de *Paracoccidioides* spp. com células A549 na presença da chalcona e/ou anti-gp43

Raf são proteínas serina/treonina quinase importantes nos sinais de transdução. Raf 1 é um membro desta família, e é uma proteína citoplásmica de massa molecular de 72-76 kDa com atividade intrínseca de serina/treonina quinase, é expressa em muitos tipos de células. Esta via de quinases está envolvida, entre outras vias, na ativação de citoesqueleto. Em trabalhos prévios de nosso grupo (MIRANDA., 2006) foi demonstrado um aumento na expressão da proteína Raf fosforilada tanto em células controle como nas infectadas com *P. brasiliensis* avirulento e virulento e nas tratadas com gp43. Já neste trabalho, observamos que o tratamento prévio dos fungos Pb18 (Figura 9A), Pb01 (Figura 9B) e Pb02 (Figura 9C) com anti gp43 demonstrou uma menor ativação desta via principalmente para o isolado Pb18 no tempo de 8h e 24h. No entanto, observa-se também uma menor ativação da via de Raf para os isolados 01 e 02 nos tempos 8h e 24h respectivamente. Foi possível observar uma menor intensidade da fluorescência verde nos tempos indicados, sugerindo a importância desta via na interação da gp43 com as células epiteliais. Esses dados deverão ser confirmados por *Western blot* e PCR em tempo real em estudos futuros. Além disso, o prévio tratamento com a 3'-chalcona parece não interferir nessa via e também foi possível verificar que o prévio tratamento diminuiu a quantidade de células infectadas.

Portanto, a escolha de alvos específicos como foi realizado nesse trabalho é extremamente atual e poucos trabalhos tem dividido essa abordagem na paracoccidioidomicose. De Freitas et al., (2014) procurou também alvo específico para estudar como parte das análises biológicas de novos alcalóides, juntamente com compostos conhecidos como epicatequina, ácido ursólico, ácido oleanólico e, a partir de *Galianthe ramosa*. O alcalóide 2 inibiu a malato sintetase de *Paracoccidioides* spp. Em nosso estudo resultados promissores foram

encontrados quando se associou chalconas com anticorpo anti-adesina contra alvos específicos, demonstrando uma interferência no processo invasivo.

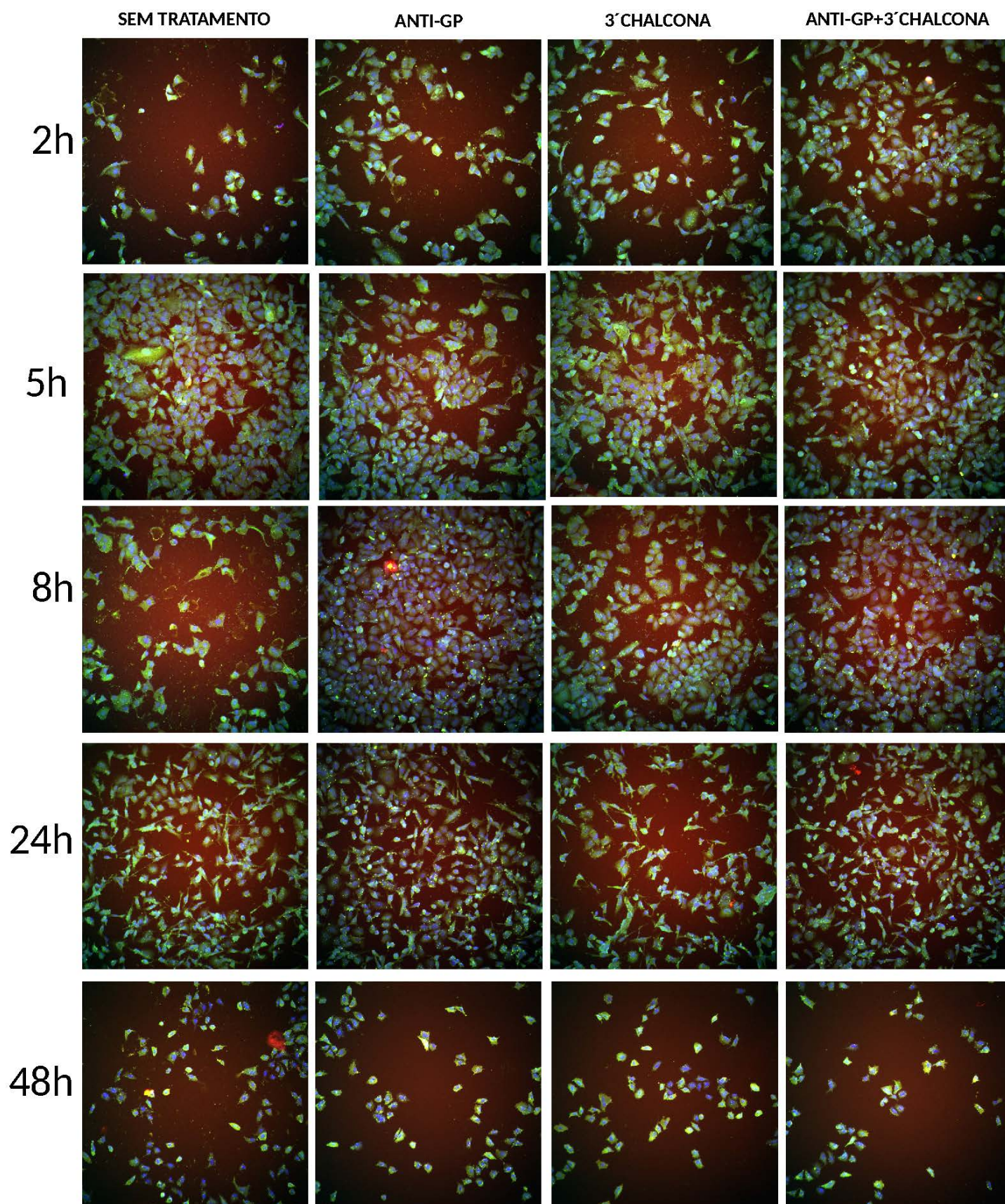


Figura 9A: Imunofluorescência de células epiteliais infectadas com *P. brasiliensis*, isolado 18 não tratado, previamente tratado com anti gp43, previamente tratado com 3`chalcona e previamente tratado com anti gp43 e 3`chalcona, por 2h, 5h, 8h, 24h e 48h usando anti Raf1 (verde), anti gp43 (vermelho) e DAPI (azul).

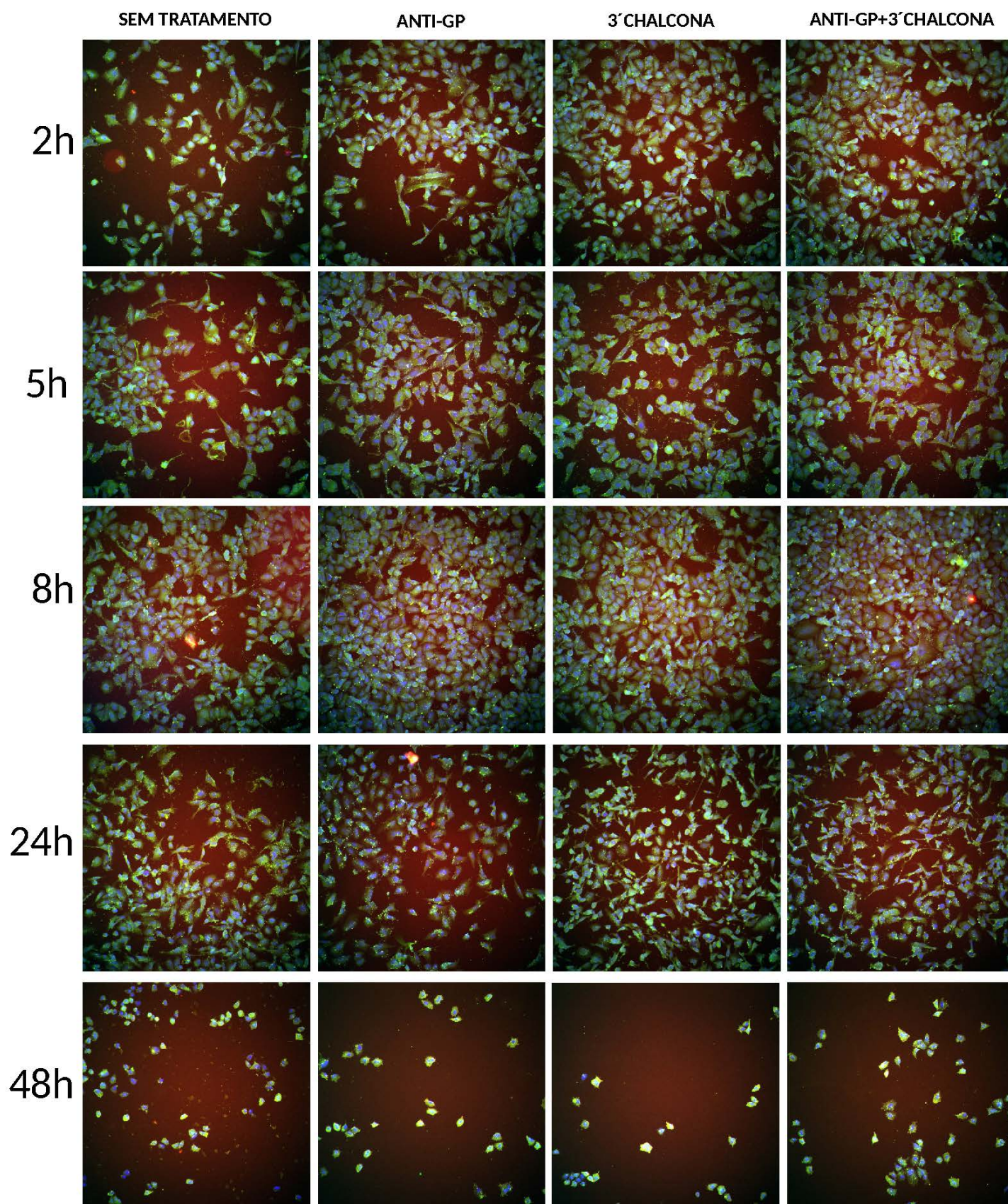


Figura 9B- Imunofluorescência de células epiteliais infectadas com *P. lutzii*, isolado 01 não tratado, previamente tratado com anti gp43, previamente tratado com 3' chalcona, e previamente tratado com anti gp43 e 3' chalcona, por 2h, 5h, 8h, 24h e 48h usando anti Raf1 (verde), anti gp43 (vermelho) e DAPI (azul).

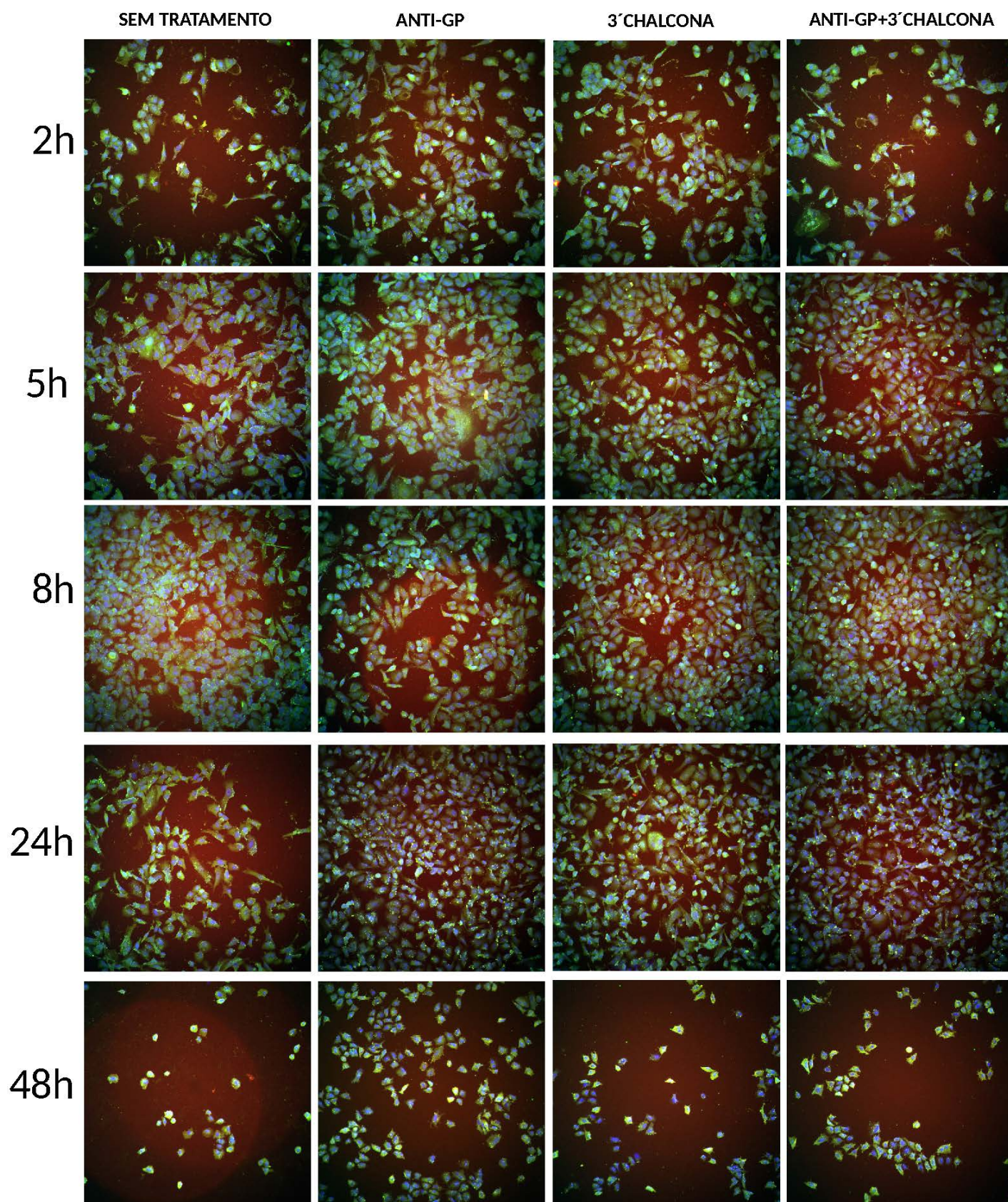


Figura 9C- Imunofluorescência de células epiteliais infectadas com *P. brasiliensis*, isolado 02 não tratado, previamente tratado com anti gp43, previamente tratado com 3`chalcona e previamente tratado com anti gp43 e 3`chalcona, por 2h, 5h, 8h, 24h e 48h usando anti Raf1 (verde), anti gp43 (vermelho) e DAPI (azul).

4. CONCLUSÕES

A associação entre substâncias naturais e anticorpos demonstrou-se promissora. Tanto a chalcona isolada, quanto associada a anti-gp43 apresentou resultado satisfatório na inibição da adesão do fungo às células epiteliais para os diferentes isolados.

A chalcona 3'chalc promoveu a inibição da ligação do isolado 18 à todos os componentes da MEC testados; inibiu a ligação do isolado 01 à fibronectina, colágeno tipo I e colágeno tipo IV e inibiu a ligação do isolado 02 apenas ao colágeno tipo IV. A associação com anti-gp43 foi efetiva somente para a ligação de Pb18 à fibronectina, aumentando essa inibição em 6,3%. Estudos posteriores seriam interessantes para investigar a atuação principalmente da chalc 3' na inibição de adesinas específicas, como por exemplo a MLS.

A associação anti-gp43 e chalcona foi efetiva somente para o isolado Pb02 (aproximadamente 33% de inibição). Para os demais isolados, a chalcona isolada promoveu uma maior inibição da interação (25%) quando comparado ao efeito produzido pelo anticorpo anti-gp43 (inibição em torno de 15%). Como não se sabe o mecanismo de ação desta chalcona, ficam levantadas as hipóteses de a mesma atue no bloqueio de algum receptor ou mecanismo intracelular, diminuindo a capacidade de adesão à célula ou ainda, apresente algum mecanismo semelhante ao da anti gp43.

Os achados acima citados reforçam a necessidade da busca por diagnósticos cada vez mais específicos, visto que diferentes isolados responderam de diferentes maneiras frente aos tratamentos testados neste estudo. Assim, a terapia poderia ser otimizada quando detectado o isolado responsável pela infecção.

Quanto ao estudo de citoesqueleto, alterações na distribuição de actina não foram observadas, o que confirma o estudo prévio realizado pelo nosso grupo. O estudo da via de ativação de Raf demonstrou uma menor ativação da mesma, principalmente para o isolado Pb18 no tempo de 8h e 24h. Foi possível observar uma menor intensidade da fluorescência

nos tempos indicados, sugerindo a importância desta via na interação de *Paracoccidioides* spp. com células epiteliais e complementa o resultado previamente citado. Esses dados deverão ser confirmados por *Western blot* e PCR em tempo real em estudos futuros

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAEI, S. et al. Isolation and biochemical characterization of the iC3b receptor of *Candida albicans*. **Infect Immun**, v. 61, n. 4, p. 1395-9, Apr 1993.
- ALVIANO, D. S. et al. Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* induces production of human antifungal antibodies and enhances the antimicrobial efficacy of phagocytes. **Infect Immun**, v. 72, n. 1, p. 229-37, Jan 2004.
- 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.
- AP, V. D. W.; HOWLETT, B. J. Fungal pathogenicity genes in the age of 'omics'. **Mol Plant Pathol**, v. 12, n. 5, p. 507-14, Jun 2011.
- ASHIDA, H. et al. Cell death and infection: a double-edged sword for host and pathogen survival. **J Cell Biol**, v. 195, n. 6, p. 931-42, Dec 12 2011.
- ASSIS-MARQUES, M. A. et al. *Saccharomyces cerevisiae* expressing Gp43 protects mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0120201, 2015.
- 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.
- BANDAY, A. H.; IQBAL ZARGAR, M.; GANAIE, B. A. Synthesis and antimicrobial studies of chalconyl pregnenolones. **Steroids**, v. 76, n. 12, p. 1358-62, Nov 2011.
- 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.
- 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.
- BARUA, N. et al. DFT-based QSAR models to predict the antimycobacterial activity of chalcones. **Chem Biol Drug Des**, v. 79, n. 4, p. 553-9, Apr 2012.
- BENARD, G. et al. Contribution to the natural history of paracoccidioidomycosis: identification of the primary pulmonary infection in the severe acute form of the disease--a case report. **Clin Infect Dis**, v. 40, n. 1, p. e1-4, Jan 1 2005.
- 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.
- BOECK, P. et al. Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. **Bioorg Med Chem**, v. 14, n. 5, p. 1538-45, Mar 1 2006.

BRANDAO, G. C. et al. Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of extracts and constituents from *Polygonum spectabile* Mart. **Phytomedicine**, v. 17, n. 12, p. 926-9, Oct 2010.

BUISSA-FILHO, R. et al. The monoclonal antibody against the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* mediates immune protection in infected BALB/c mice challenged intratracheally with the fungus. **Infect Immun**, v. 76, n. 7, p. 3321-8, Jul 2008.

CAMARGO, Z. P. et al. The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. **J Med Vet Mycol**, v. 29, n. 1, p. 31-8, 1991.

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.

CHATURVEDI, A. K. et al. Monoclonal immunoglobulin G1 directed against *Aspergillus fumigatus* cell wall glycoprotein protects against experimental murine aspergillosis. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 12, n. 9, p. 1063-8, Sep 2005.

CHEENPRACHA, S. et al. Anti-HIV-1 protease activity of compounds from *Boesenbergia pandurata*. **Bioorg Med Chem**, v. 14, n. 6, p. 1710-4, Mar 15 2006.

COLOMBO, A. L. et al. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. **Med Mycol**, v. 49, n. 8, p. 785-98, Nov 2011.

COLTRI, K. C. et al. Paracoccin, a GlcNAc-binding lectin from *Paracoccidioides brasiliensis*, binds to laminin and induces TNF- α production by macrophages. **Microbes Infect**, v. 8, n. 3, p. 704-13, Mar 2006.

COOPER, G.M. The cell. A molecular approach. 2 ed. **ASM Press & Sinauer Associates Inc.** Washington D.C., 2000, 689p.

COUTINHO, Z. F. et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad Saude Publica**, v. 18, n. 5, p. 1441-54, Sep-Oct 2002.

DA SILVA JDE, F. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* 30 kDa adhesin: identification as a 14-3-3 protein, cloning and subcellular localization in infection models. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e62533, 2013.

DA SILVA JDE, F. et al. Influence of the *Paracoccidioides brasiliensis* 14-3-3 and gp43 proteins on the induction of apoptosis in A549 epithelial cells. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 476-84, Jun 2015.

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.

DE BERNARDIS, F. et al. Protective role of antimannan and anti-aspartyl proteinase antibodies in an experimental model of *Candida albicans* vaginitis in rats. **Infect Immun**, v. 65, n. 8, p. 3399-405, Aug 1997.

DE BRITO, T. et al. Intraepithelial parasitism as an infection mechanism in human paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis). **Virchows Arch A Pathol Pathol Anat**, v. 361, n. 2, p. 129-38, Nov 12 1973.

DE CARVALHO TAVARES, L. et al. Quinolinyln and quinolinyln N-oxide chalcones: synthesis, antifungal and cytotoxic activities. **Eur J Med Chem**, v. 46, n. 9, p. 4448-56, Sep 2011.

DE CASTRO, C. C. et al. Cardamonin, a schistosomicidal chalcone from *Piper aduncum* L. (Piperaceae) that inhibits *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase. **Phytomedicine**, v. 22, n. 10, p. 921-8, Sep 15 2015.

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.

DE MELLO, T. F. et al. Activity of synthetic chalcones in hamsters experimentally infected with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Parasitol Res**, v. 114, n. 10, p. 3587-600, Oct 2015.

DE OLIVEIRA, H. C. et al. Importance of adhesins in virulence of *Paracoccidioides* spp. **Front Microbiol**, v. 6, p. 303, 2015.

DE PAUW. Is there a need for new antifungal agents? *Clin Microbiol Infect*. 6 Suppl 2:23-8, Aug 2000.

DE OLIVEIRA, K. M. et al. Intermolecular interactions of the malate synthase of *Paracoccidioides* spp. **BMC Microbiol**, v. 13, p. 107, 2013.

DE SA, N. P. et al. Antifungal activity of 6-quinolinyln N-oxide chalcones against *Paracoccidioides*. **J Antimicrob Chemother**, v. 70, n. 3, p. 841-5, Mar 2015.

DEMARCO, R. et al. Molecular characterization and immunolocalization of *Schistosoma mansoni* ATP-diphosphohydrolase. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 307, n. 4, p. 831-8, Aug 8 2003.

FELIPE, M. S. et al. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. **J Biol Chem**, v. 280, n. 26, p. 24706-14, Jul 1 2005.

FINLAY, B.B.; LEUNG, K.Y.; ROSENSHINE, I. *Salmonella* interactions with the epithelial cell. **ASM News.**, v. 58, p. 486-490, 1992.

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, Jul-Aug 2002.

FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **J Med Vet Mycol**, v. 25, n. 1, p. 5-18, Feb 1987.

FUJITA, T. et al. Hydrogen peroxide induces upregulation of Fas in human airway epithelial cells via the activation of PARP-p53 pathway. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 27, n. 5, p. 542-52, Nov 2002.

GONZALEZ, A. et al. Recognition of extracellular matrix proteins by *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. **Med Mycol**, v. 43, n. 7, p. 637-45, Nov 2005.

GULLO F.P. Bioativos Antifúngicos de Fontes Vegetais: Estudo dos Mecanismos de Ação em Sistema de Infecção in vitro. 2012. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

HANNA, S. A.; MONTEIRO DA SILVA, J. L.; GIANNINI, M. J. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. **Microbes Infect**, v. 2, n. 8, p. 877-84, Jul 2000.

HARA, H. et al. Inhibitory effects of chalcone glycosides isolated from *Brassica rapa* L. 'hidabeni' and their synthetic derivatives on LPS-induced NO production in microglia. **Bioorg Med Chem**, v. 19, n. 18, p. 5559-68, Sep 15 2011.

HERNANDEZ, 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.

HERNANDEZ, O. et al. Gene expression during activation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Yeast**, v. 28, n. 11, p. 771-81, Nov 2011.

JANNUZZI, G. P. et al. scFv from Antibody That Mimics gp43 Modulates the Cellular and Humoral Immune Responses during Experimental Paracoccidioidomycosis. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0129401, 2015.

JIMÉNEZ, M. E. U. **Paracoccidioides lutzii: estudo de alguns mecanismos de patogenicidade**: Universidade de São Paulo 2015.

KATSORI, A. M.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. Recent progress in therapeutic applications of chalcones. **Expert Opin Ther Pat**, v. 21, n. 10, p. 1575-96, Oct 2011.

KONNO, A. Y. et al. Peptides from *Paracoccidioides brasiliensis* GP43 inhibit macrophage functions and inflammatory response. **Microbes Infect**, v. 11, n. 1, p. 92-9, Jan 2009.

KONNO, F. T. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* GP43-derived peptides are potent modulators of local and systemic inflammatory response. **Microbes Infect**, v. 14, n. 6, p. 517-27, Jun 2012.

KUROKAWA, C. S.; SUGIZAKI, M. F.; PERACOLI, M. T. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 40, n. 3, p. 125-35, May-Jun 1998.

LACAZ, C.S. Historical evolution of the knowledge on paracoccidioidomycosis and its etiologic agent, *Paracoccidioides brasiliensis*. In: FRANCO M.; LACAZ C.S.; RESTREPO-MORENO A.; DEL-NEGRO G. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, Florida, EUA, p. 1-11, 1994.

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.

MAGALHAES, A. et al. Prophylactic and therapeutic vaccination using dendritic cells primed with peptide 10 derived from the 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Clin Vaccine Immunol**, v. 19, n. 1, p. 23-9, Jan 2012.

MARQUES, S. A. Paracoccidioidomycosis: epidemiological, clinical, diagnostic and treatment up-dating. **An Bras Dermatol**, v. 88, n. 5, p. 700-11, Sep-Oct 2013.

MATUTE, D. R. et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol Biol Evol**, v. 23, n. 1, p. 65-73, Jan 2006.

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.

MENDES-GIANNINI, M. J. et al. Invasion of epithelial mammalian cells by *Paracoccidioides brasiliensis* leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell. **Microbes Infect**, v. 6, n. 10, p. 882-91, Aug 2004.

MENDES-GIANNINI, M. J.; MORAES, R. A.; RICCI, T. A. Proteolytic activity of the 43,000 molecular weight antigen secreted by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 32, n. 5, p. 384-5, Sep-Oct 1990.

MENDES-GIANNINI, M. J. et al. Interaction of pathogenic fungi with host cells: Molecular and cellular approaches. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 45, n. 3, p. 383-94, Sep 1 2005.

MENDES-GIANNINI, M. J. et al. Pathogenesis II: fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. **Med Mycol**, v. 38 Suppl 1, p. 113-23, 2000.

MIRANDA, E. J.; GONCALVES, L. G.; FRANCA, F. O. Chronic pulmonary paracoccidioidomycosis in an AIDS patient and *Mycobacterium gordonae* as confounding factor. **Braz J Infect Dis**, v. 15, n. 1, p. 92-3, Jan-Feb 2011.

MIRANDA, E. T. “ESTUDO COMPARATIVO DE ISOLADOS DE *P. brasiliensis* EM ADESÃO CELULAR. SINALIZAÇÃO CELULAR MEDIADA PELA GP 43”. UNESP 2006.

MONTEIRO DA SILVA, J. L. et al. Epithelial cells treated with genistein inhibit adhesion and endocytosis of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 92, n. 1, p. 129-35, Jul 2007.

MORAGUES, M. D. et al. A monoclonal antibody directed against a *Candida albicans* cell wall mannoprotein exerts three anti-*C. albicans* activities. **Infect Immun**, v. 71, n. 9, p. 5273-9, Sep 2003.

MUKHERJEE, J.; SCHARFF, M. D.; CASADEVALL, A. Protective murine monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 60, n. 11, p. 4534-41, Nov 1992.

NOSANCHUK, J. D. et al. Antibodies to a cell surface histone-like protein protect against *Histoplasma capsulatum*. **J Clin Invest**, v. 112, n. 8, p. 1164-75, Oct 2003.

ORTIZ, C. et al. Protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) deficiency confers resistance to transforming growth factor-beta (TGF-beta)-induced suppressor effects in hepatocytes. **J Biol Chem**, v. 287, n. 19, p. 15263-74, May 4 2012.

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.

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.

PRASAD, S. et al. Targeting inflammatory pathways by flavonoids for prevention and treatment of cancer. **Planta Med**, v. 76, n. 11, p. 1044-63, Aug 2010.

PUCCIA, R. et al. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. **Infect Immun**, v. 53, n. 1, p. 199-206, Jul 1986.

PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L. R. 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. **J Clin Microbiol**, v. 29, n. 8, p. 1610-5, Aug 1991.

RITTNER, G. M. et al. Therapeutic DNA vaccine encoding peptide P10 against experimental paracoccidioidomycosis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 2, p. e1519, 2012.

SALYERS, A.A.; WHITT, D.D. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. **ASM Press**. Washington, D.C., 418 p, 1994.

SAN-BLAS, G.; BURGER, E. Experimental medical mycological research in Latin America - a 2000-2009 overview. **Rev Iberoam Micol**, v. 28, n. 1, p. 1-25, Jan-Mar 2011.

SAN-BLAS, G.; NINO-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med Mycol**, v. 40, n. 3, p. 225-42, Jun 2002.

SARDI, J. C.; ALMEIDA, A. M.; MENDES GIANNINI, M. J. New antimicrobial therapies used against fungi present in subgingival sites--a brief review. **Arch Oral Biol**, v. 56, n. 10, p. 951-9, Oct 2011.

SHANKAR, J. et al. Hormones and the resistance of women to paracoccidioidomycosis. **Clin Microbiol Rev**, v. 24, n. 2, p. 296-313, Apr 2011.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. [Guidelines in paracoccidioidomycosis]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39, n. 3, p. 297-310, May-Jun 2006.

SIFUENTES-OSORNIO, J.; CORZO-LEON, D. E.; PONCE-DE-LEON, L. A. Epidemiology of Invasive Fungal Infections in Latin America. **Curr Fungal Infect Rep**, v. 6, n. 1, p. 23-34, Mar 2012.

SILVA, S. S. et al. Transcriptional response of murine macrophages upon infection with opsonized *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. **Microbes Infect**, v. 10, n. 1, p. 12-20, Jan 2008.

SIMOES, C. M. O. Farmacognosia da planta ao medicamento. 2006. 577 - 609

SINGH, P.; ANAND, A.; KUMAR, V. Recent developments in biological activities of chalcones: a mini review. **Eur J Med Chem**, v. 85, p. 758-77, Oct 6 2014.

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.

SOUTO, P. C. et al. Programmed cell death in thymus during experimental paracoccidioidomycosis. **Med Microbiol Immunol**, v. 192, n. 4, p. 225-9, Nov 2003.

SOUZA, M. C. et al. Differences in reactivity of paracoccidioidomycosis sera with gp43 isoforms. **J Med Vet Mycol**, v. 35, n. 1, p. 13-8, Jan-Feb 1997.

STRASSER, A.; CORY, S.; ADAMS, J. M. Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. **EMBO J**, v. 30, n. 18, p. 3667-83, Sep 14 2011.

SVETAZ, L. et al. Antifungal chalcones and new caffeic acid esters from *Zuccagnia punctata* acting against soybean infecting fungi. **J Agric Food Chem**, v. 52, n. 11, p. 3297-300, Jun 2 2004.

TABORDA, C. P. et al. Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. **Infect Immun**, v. 66, n. 2, p. 786-93, Feb 1998.

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.

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 15 2011.

THEODORO, R. C. et al. Genus *paracoccidioides*: Species recognition and biogeographic aspects. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e37694, 2012.

THIND, S. K.; TABORDA, C. P.; NOSANCHUK, J. D. Dendritic cell interactions with *Histoplasma* and *Paracoccidioides*. **Virulence**, v. 6, n. 5, p. 424-32, 2015.

VALLA, A. et al. New syntheses and potential antimalarial activities of new 'retinoid-like chalcones'. **Eur J Med Chem**, v. 41, n. 1, p. 142-6, Jan 2006.

VASCONCELOS, E. G. et al. Characterization and localization of an ATP-diphosphohydrolase on the external surface of the tegument of *Schistosoma mansoni*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 58, n. 2, p. 205-14, Apr 1993.

VERICIMO, M. A. et al. Increased apoptosis during the early phase of experimental paracoccidioidomycosis as a phenotypic marker of resistance. **Microbes Infect**, v. 8, n. 12-13, p. 2811-20, Oct 2006.

VICENTINI, A. P. et al. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infect Immun**, v. 62, n. 4, p. 1465-9, Apr 1994.

YANG, H. M. et al. Structural requirement of chalcones for the inhibitory activity of interleukin-5. **Bioorg Med Chem**, v. 15, n. 1, p. 104-11, Jan 1 2007.

YARZABAL, L. A. et al. Identification and purification of the specific antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* responsible for immunoelectrophoretic band E. **Sabouraudia**, v. 15, n. 1, p. 79-85, Mar 1977.

ZHANG, X. Z.; ZHANG, Y.; SHEN, W. G. [Effect of genistein on MAPK signal pathway in the collagen-induced arthritis fibroblast-like synoviocytes]. **Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi**, v. 31, n. 10, p. 1405-8, Oct 2011.

ZHAO, L. et al. Cellular mechanism underlying the facilitation of contractile response of vas deferens smooth muscle by sodium orthovanadate. **Mol Cell Biochem**, v. 366, n. 1-2, p. 149-57, Jul 2012.

ZHU, H. et al. Synergistic inhibitory effects by the combination of gefitinib and genistein on NSCLC with acquired drug-resistance in vitro and in vivo. **Mol Biol Rep**, v. 39, n. 4, p. 4971-9, Apr 2012.

De acordo,

Aluno:

Orientador:



Maria José Soares Mendes Giannini

Araraquara, de janeiro de 2016