

**Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”
Faculdade De Ciências Farmacêuticas De Araraquara**

Patricia Akemi Assato

**“Estudo das interações moleculares da proteína 14-3-3 de
Paracoccidioides brasiliensis”**

**Araraquara
2018**

**Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”
Faculdade De Ciências Farmacêuticas De Araraquara**

Patricia Akemi Assato

**“Estudo das interações moleculares da proteína 14-3-3 de
Paracoccidioides brasiliensis”**

Tese 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 Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida

Co orientador: Prof. Dr. Andrei Moroz

**Araraquara
2018**

Ficha Catalográfica

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

A844e Assato, Patricia Akemi
Estudo das interações moleculares da proteína 14-3-3 de *Paracoccidioides brasiliensis* / Patricia Akemi Assato. – Araraquara, 2018.
148 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho".
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e
Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de pesquisa em Microbiologia.

Orientadora: Ana Marisa Fusco Almeida.
Coorientador: Andrei Moroz.

1. *Paracoccidioides brasiliensis*. 2. Proteína 14-3-3. 3. Adesina. I. Almeida, Ana Marisa Fusco, orient. II. Moroz, Andrei, coorient. III. Título.

CAPES: 40500005



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara




Patricia Akemi Assato

Estudo das interações moleculares da proteína 14-3-3 de *Paracoccidioides brasiliensis*

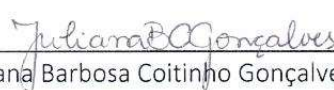
Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Doutor(a) em Biotecnologia e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

Araraquara, 10 de agosto de 2018.

BANCA EXAMINADORA



Ana Marisa Fusco Almeida



Juliana Barbosa Coitinho Gonçalves



Julhiany de Fátima da Silva



Juliana Campos Junqueira



Maria Célia Bertolini

Este trabalho foi desenvolvido na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/SP – UNESP, sendo a doutoranda contemplada com bolsa CAPES.

**“A ciência nunca resolve um problema sem
criar pelo menos outros dez”**

George Bernard Shaw

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer meus pais, Fernando e Luiza, pelo amor incondicional, por todas as lutas que enfrentaram para que eu pudesse chegar aqui e por sempre estarem ao meu lado e entenderem minhas escolhas, este trabalho dedico a vocês, sem vocês eu nada seria!

Às minhas irmãs, Mileine e Fernanda, vocês foram minhas primeiras amigas, sinto muita saudade da convivência diária, mas ainda bem que temos a internet para amenizar um pouco a distância, ne?! rsrs. Obrigada por sempre me apoiarem e me ajudarem! Amo vocês!

Gostaria de expressar minha gratidão à Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida, por acreditar em mim, pela força e suporte todos os dias, especialmente quando eu não acreditava em mim, você me fez levantar e me esforçar para continuar. Má, obrigada pela oportunidade, pelo crescimento profissional e pessoal que você proporcionou!

Agradeço também a Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini pela disposição em conversar e contribuir com este trabalho.

Gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Andrei Moroz por ter me apresentado o mundo da cultura celular e das células tronco e por me incentivar sempre.

Ao Prof. Júlio Borges e ao Dr. Paulo Roberto Dore-Silva pela colaboração nas etapas de purificação e ensaios biofísicos.

Ao Prof. Dr. Bostjan Kobe, que há três anos aceitou iniciar esta colaboração e sempre esteve disposto a nos ajudar durante todas as tentativas de realizar o estágio. Agradeço a supervisão, a confiança e a oportunidade de realizar parte deste trabalho em seu laboratório.

Ao grupo do Prof. Kobe, em especial ao Dr. Jeff Nanson e à Megan Outram, que me auxiliaram nos experimentos e pela confiança que tiveram quando tive a oportunidade de auxiliá-los, aprendi muito com vocês e me encantei com a biologia estrutural. Agradeço a todos pela recepção, paciência e pela oportunidade de não só trabalhar, mas fazer parte do grupo.

Na Austrália, além de estar em um ótimo grupo que me fez crescer muito profissionalmente, também tive muita sorte de encontrar pessoas boas e dispostas a

me ajudar. Entre elas, a Sara e o Amir, que não só alugaram um quarto, mas me fizeram sentir parte da família, sempre dispostos a me ajudar, a conversar e interagir. Agradeço por tudo que fizeram por mim desde do momento que cheguei até a minha partida.

Aos que ajudaram diretamente neste trabalho, Haroldo, Caroline, Junya, Liliana, Cláudia e Paulo, não sei como seria sem vocês, sou muito grata não só pela ajuda nos experimentos, mas pelas discussões sobre experimentos, resultados e técnicas que me fizeram crescer e amadurecer.

Agradeço muito à família Micologia/Núcleo de Proteômica, porque nem todas as pessoas entendem como é fazer pesquisa, mas vocês entendem. Nos últimos anos passei mais tempo com vocês do que com minha família, sem vocês com certeza tudo seria mais difícil. Além do apoio científico, os momentos de descontração, os almoços ou um simples “vamos tomar um café?”, nos dão força para continuar quando as coisas não estão dando certo. Cada um me ajudou de alguma maneira e em algum momento e por isso sou muito grata por fazer parte deste grupo e gostaria de agradecê-los por tornarem essa etapa mais leve.

Agradeço também ao Prof. Rondinelli, seus alunos e aos alunos do Laboratório de Anticorpo Monoclonal que fazem parte do Núcleo de Proteômica e com quem tive a oportunidade de aprender um pouco sobre novas áreas.

À Rô que hoje nesta etapa não fez parte do dia-a-dia como gostaria, mas sempre esteve presente, sempre disposta a ajudar e também a conversar. Amo você, menininha.

Às companheiras de laboratório que se tornaram amigas-irmãs, Su, Carol e Lili, obrigada por todo apoio sempre, amo vocês e sinto muita falta de vocês no meu dia-a-dia.

Ao Haroldo, além da ajuda no trabalho e estar sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis, graças a você fui “adotada” por suas tias, Silvia e Sônia, que me ajudaram e cuidaram de mim nos últimos anos. Te admiro e amo muito!

À Caroline, a amiga que virou companheira de laboratório, minha admiração por você é tão grande, nem sei o que dizer além de obrigada e te amo fow!

Aos amigos queridos que me apoiaram, me escutaram e me ajudaram a descontraír, a ter forças para continuar ou bronca para relaxar.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Unesp, especialmente as funcionárias da Seção Técnica de Pós-graduação por todo auxílio nas questões administrativas.

SUMÁRIO

Resumo	22
Abstract	24
Capítulo 1 – Tese	26
1. Introdução	26
1.1 Complexo <i>Paracoccidioides</i> spp. e paracoccidioidomicose	26
1.2 Interação <i>Paracoccidioides</i> -hospedeiro	33
1.3 Família de proteínas 14-3-3	34
1.4 <i>Galleria mellonella</i> como modelo de estudo <i>in vivo</i>	36
2. Objetivos	40
2.1 Objetivo geral	40
2.2 Objetivos específicos	40
3. Materiais e Métodos	41
3.1. Microrganismos e condições de cultivo.....	41
3.2 Cultura de células	41
3.3 Obtenção da proteína Pb14-3-3 recombinante utilizando o vetor pet32a	42
3.3.1 Extração plasmidial e clonagem em bactéria de expressão	42
3.3.2 Obtenção e purificação da proteína Pb14-3-3 recombinante em <i>E. coli</i> Rosetta	43
3.4 Obtenção da proteína Pb14-3-3 recombinante utilizando o vetor pet28a	46
3.4.1 Extração de RNA e síntese de cDNA.	46
3.4.2 Clonagem e transformação em <i>E. coli</i>	47
3.4.3 Padronização da expressão da proteína Pb14-3-3 utilizando o vetor pet28a	49
3.4.4 Confirmação da obtenção da proteína Pb14-3-3 por espectrometria de massas	49
3.4.5 Confirmação da obtenção da proteína Pb14-3-3 por <i>Western Blot</i>	52
3.4.6 Produção e purificação da proteína Pb14-3-3	52
3.5 Caracterização biofísica da proteína Pb14-3-3	53

3.5.1	Caracterização por dicroísmo circular: estimativa de conteúdo da estrutura secundária e análise da estabilidade térmica	53
3.5.2	Ensaio de fluorescência intrínseca	54
3.6	Caracterização estrutural da proteína Pb14-3-3	54
3.6.1	Obtenção e purificação da proteína Pb14-3-3	54
3.6.2	Triagem das condições de cristalização	55
3.6.3	Otimização das condições de cristalização	56
3.6.5	Análise dos dados.....	57
3.6.6	Identificação do peptídeo ligante da Pb14-3-3.....	58
3.7	Ensaio de interação proteína-proteína	58
3.7.1	Extração total de proteínas de <i>P. brasiliensis</i>	58
3.7.2	Extração total de proteína de células MRC-5.	59
3.7.3	Preparação da coluna para o ensaio de interação proteína-proteína.	59
3.7.4	Ensaio de interação proteína-proteína.....	60
3.8	Avaliação da resposta imune de <i>Galleria mellonella</i> mediante ao tratamento com a proteína Pb14-3-3 recombinante.....	60
3.8.1	Preparação das larvas de <i>G. mellonella</i>	60
3.8.2	Avaliação da toxicidade da proteína Pb14-3-3 em <i>G. mellonella</i>	61
3.8.3	Ensaio de sobrevivência de <i>G. mellonella</i> pré-tratada com Pb14-3-3 e infectada com <i>P. brasiliensis</i>	61
3.8.4	Efeito da proteína Pb14-3-3 na concentração de hemócitos de <i>G. mellonella</i>	62
3.8.5	Avaliação da indução de apoptose em hemócitos mediante ao tratamento com a proteína Pb14-3-3.	62
3.8.5	Efeito da proteína Pb14-3-3 na produção de óxido nítrico em <i>G. mellonella</i>	63
3.8.6	Efeito da proteína Pb14-3-3 na produção de fenoloxidase em <i>G. mellonella</i>	63
3.8.7	Avaliação na expressão de genes codificantes para os peptídeos antimicrobianos galiomicina e galeriomicina mediante ao tratamento com a proteína Pb14-3-3.....	64
4.	Resultados e Discussão	65

4.1 Obtenção da proteína Pb14-3-3 recombinante utilizando o vetor pet32a-14-3-3	65
4.1.1 Confirmação da obtenção de clones positivos de <i>E. coli</i> Rosetta contendo o vetor pet32a-14-3-3	65
4.1.2 Produção e purificação da proteína Pb14-3-3 recombinante	66
4.2 Obtenção da proteína Pb14-3-3 recombinante utilizando o vetor pet28a	70
4.2.1 Clonagem em vetor pet28a	70
4.2.2 Padronização da expressão da Pb14-3-3 recombinante.	72
4.2.3 Confirmação da obtenção da proteína Pb14-3-3	73
4.2.4 Purificação da proteína Pb14-3-3 recombinante	75
4.3 Caracterização biofísica da proteína Pb14-3-3	76
4.3.1. Ensaios de dicroísmo circular: estimativa de estrutura secundária e análise da estabilidade térmica	76
4.3.2 Fluorescência Intrínseca do Triptofano	79
4.4 Caracterização estrutural da proteína Pb14-3-3	81
4.4.1 Cristalização da proteína Pb14-3-3	81
4.5 Estudo das interações proteína-proteína	92
4.5.1 Identificação de proteínas de <i>P. brasiliensis</i> que interagem com a proteína Pb14-3-3	92
4.5.2 Identificação de proteínas do hospedeiro que interagem com a proteína Pb14-3-3	95
4.6 Avaliação da resposta imune de <i>Galleria mellonella</i> mediante ao tratamento com a proteína Pb14-3-3 recombinante	98
4.6.1 Efeito da proteína Pb14-3-3 na sobrevivência de <i>G. mellonella</i>	98
4.6.2 Efeito da proteína Pb14-3-3 na densidade de hemócitos de <i>G. mellonella</i>	99
4.6.3 Avaliação da indução da apoptose mediante ao tratamento com a proteína Pb14-3-3 em <i>G. mellonella</i>	100
4.6.4 Avaliação da produção de óxido nítrico em <i>G. mellonella</i> mediante ao tratamento com a proteína Pb14-3-3.	103
4.6.5 Efeito da proteína Pb14-3-3 na produção de fenoloxidase em <i>G. mellonella</i>	104

4.6.6 Avaliação na expressão de genes antimicrobianos galiomicina e galeriomicina mediante ao tratamento com a proteína Pb14-3-3.	106
5. Conclusões	108
6. Referências	109
Capítulo 2 – Artigos	129
1. Artigo publicados durante o doutorado	130
1.1. Functional analysis of <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> 14-3-3 adhesin expressed in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	130
2 Artigos de coautoria publicados durante o doutorado.....	131
2.1 Evaluation of <i>Caenorhabditis elegans</i> as a host model for <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> and <i>Paracoccidioides lutzii</i>	131
2.2 Anti-apoptotic effects of decyl gallate on the induction of apoptosis in A549 pneumocytes by <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> gp43.	132
2.3 Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis.	133
2.4 Anti-Immune Strategies of Pathogenic Fungi.....	134
2.5 Identification and characterization of elongation factor Tu (EF-Tu), a novel protein involved in <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> -host interaction.	135
2.6 Peptides derived from a phage display library inhibit adhesion and protect the host against infection by <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> and <i>Paracoccidioides lutzii</i>	136
2.7 Advances and challenges in paracoccidioidomycosis serology caused by <i>Paracoccidioides</i> species complex: an update.....	137
2.8 Decreased expression of 14-3-3 in <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> confirms its involvement in fungal pathogenesis	138
2.9 Importance of adhesins in virulence of <i>Paracoccidioides</i> spp.	139
2.10 Influence of <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> 14-3-3 and gp43 proteins on the induction of apoptosis in A549 epithelial cells.	140

2.11 <i>Paracoccidioides</i> -host interaction: an overview on recent advances in the paracoccidioidomycosis.	141
2.12 The multifaceted roles of metabolic enzymes in the <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> complex.	142

Lista de Figuras

Figura 1. Áreas endêmicas de PCM na América Latina	27
Figura 2. Distribuição geográficas das diferentes espécies filogenéticas de <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i> (PI).....	29
Figura 3. Morfologia de <i>Paracoccidioides</i> spp.....	30
Figura 4. Mapa do vetor pet32a (Novagen).....	43
Figura 5. Mapa do vetor pet28a (Novagen).....	48
Figura 6. Confirmação da presença da ORF da 14-3-3 no vetor pet32-14-3-3	66
Figura 7. Análise do teste de indução por SDS-PAGE.....	67
Figura 8. Análise da cromatografia de afinidade ao níquel por SDS-PAGE	68
Figura 9. Análise das induções à 30°C e 37°C por SDS-PAGE	69
Figura 10. Análise das cromatografias de troca iônica por SDS-PAGE	69
Figura 11. Análise da cromatografia de troca em hidroxapatita por SDS-PAGE.	70
Figura 12. Análise da amplificação da ORF da 14-3-3 e da extração plasmidial do pet28a por eletroforese em gel de agarose 0,8%	71
Figura 13. Confirmação dos clones por PCR de colônia.	71
Figura 14. Análise dos testes de indução da expressão da Pb14-3-3 nas linhagens de <i>E. coli</i> BL21(DE3), Rosetta e pLysS por SDS-PAGE.....	73
Figura 15. Confirmação da obtenção da Pb14-3-3 por espectrometria de massas..	74
Figura 16. Confirmação da expressão da Pb14-3-3 por <i>Western Blot</i>	75
Figura 17. Produção e purificação da Pb14-3-3 recombinante.....	76
Figura 18. Padrão do espectro das diferentes estruturas secundárias observado por dicroísmo circular.....	77
Figura 19 Estimativa do conteúdo da estrutura secundária analisada por dicroísmo circular.	78
Figura 20. Ensaio de estabilidade térmica por CD _{222nm}	79
Figura 21. Alinhamento e identidade das sequências das proteínas 14-3-3 de <i>P. brasiliensis</i> , humana (isoforma épsilon), <i>S. cerevisiae</i> e <i>C. neoformans</i>	80
Figura 22. Análise da emissão de fluorescência intrínseca do triptofano	81
Figura 23. Cristais da proteína Pb14-3-3 nas condições selecionadas para otimização.....	82
Figura 24. Alinhamento das sequências de Pb14-3-3 e 14-3-3 de <i>Lachancea thermotolerans</i>	83

Figura 25. Cristais obtidos na segunda triagem das condições de cristalização	84
Figura 26. Estrutura da proteína Pb14-3-3	86
Figura 27. Alinhamento e identidade das sequências de aminoácidos de Pb14-3-3 com as isoformas humanas	87
Figura 28. Localização dos resíduos de triptofano da Pb14-3-3.....	88
Figura 29. Análise da estrutura da proteína Pb14-3-3 com densidade eletrônica do peptídeo desconhecido.....	89
Figura 30. Predição da sequência do peptídeo ligante de Pb14-3-3.....	90
Figura 31. Interação do peptídeo com a Pb14-3-3 através dos resíduos de Arg ₅₆ , Arg ₁₂₉ , Asn ₁₇₅ , Asn ₂₂₆ e Trp ₂₃₀	90
Figura 32. Dissociação do peptídeo da proteína Pb14-3-3.	91
Figura 33. Análise por SDS-PAGE do perfil proteico de PB18 e do ensaio de interação proteína-proteína.....	93
Figura 34. Análise por SDS-PAGE do perfil proteico da ATCC-MRC-5 e do ensaio de interação proteína-proteína.....	96
Figura 35. Curva de sobrevivência de larvas de <i>G. mellonella</i>	99
Figura 36. Análise da densidade de hemócitos após tratamento com a Pb14-3-3.	100
Figura 37. Avaliação da indução da apoptose em hemócitos após o tratamento com a proteína Pb14-3-3 recombinante.	102
Figura 38. Dosagem de óxido nítrico em hemolinfa de <i>G. mellonella</i> tratadas com a proteína 14-3-3	104
Figura 39. Dosagem da fenoloxidase em hemolinfa de <i>G. mellonella</i> tratadas com a proteína Pb14-3-3.....	105
Figura 40. Expressão relativa dos genes galiomicina e galeriomicina após tratamento por 3 h com a proteína 14-3-3 recombinante.....	106

Lista de Tabelas

Tabela 1. Sequências dos iniciadores utilizadas para amplificação da região codificadora da Pb14-3-3.	42
Tabela 3. Sequência dos iniciadores para amplificação da região codificadora da proteína Pb14-3-3.	47
Tabela 4. Parâmetros utilizados para identificação de proteínas	51
Tabela 5. Placas comerciais utilizadas para triagem das condições de cristalização	55
Tabela 6. Otimização das condições de cristalização	56
Tabela 7. Sequências dos iniciadores utilizadas para o Real Time	64
Tabela 8. Dados coletados e dados obtidos após o refinamento no Phenix para a construção do modelo tridimensional	85
Tabela 9. Proteínas de <i>P. brasiliensis</i> identificadas por espectrometria de massas	93

Lista de abreviaturas

%	porcentagem
°C	graus Celsius
Å	ångström
λ	comprimento de onda
$\langle \lambda \rangle$	centro de massa espectral
$[\theta]$	elipticidade molar residual
μg	micrograma
μL	microlitros
μM	micro molar
μm	micrometro
14-3-3 α/β	isoforma humana da proteína 14-3-3 alpha/beta
14-3-3 γ	isoforma humana da proteína 14-3-3 gama
14-3-3 ϵ	isoforma humana da proteína 14-3-3 épsilon
14-3-3 η	isoforma humana da proteína 14-3-3 eta
14-3-3 θ	isoforma humana da proteína 14-3-3 theta
14-3-3 ξ	isoforma humana da proteína 14-3-3 zeta
14-3-3F32	iniciador sentido para amplificação da ORF da 14-3-3 para confirmação por PCR no vetor pet32-14-3-3
14-3-3R32	iniciador antessentido para amplificação da ORF da 14-3-3 para confirmação por PCR no vetor pet32-14-3-3
14-3-3F28	iniciador sentido para amplificação da ORF da 14-3-3 para clonagem no vetor pet28a
14-3-3R28	iniciador antessentido para amplificação da ORF da 14-3-3 para clonagem no vetor pet28a
A	absorbância
ACN	acetonitrila
AMP	peptídeos antimicrobianos
ATCC MRC-5	linhagem de fibroblastos de pulmão
BAG3	Bcl-2-associated athanogene 3
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BL21 (DE3)	linhagem de <i>E. coli</i> para expressão de proteínas via promotor T7
bp	par de base
BSA	albumina de soro bovino
BTP	bis tris propano
C	concentração
CEM	cromatografia de exclusão molecular
CD	dicroísmo circular
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid (DNA complementar)

CH ₂ O ₂	ácido fórmico
Cn14-3-3	proteína 14-3-3 de <i>Cryptococcus neoformans</i>
cm	centímetro
CO ₂	dióxido de carbono
DAB	diaminobenzidina
Da	dalton
DEPC	piro carbonato de dietila
DH5 α	linhagem de <i>E. coli</i> para clonagem e subclonagem
DMEM	meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleotídeos fosfatados
DO	densidade óptica
DTT	dithiothreitol
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay
ENO	proteína enolase de <i>P. brasiliensis</i>
GAPDH	proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de <i>P. brasiliensis</i>
GDP	guanosina difosfato
Gnd-HCl	cloridrato de guanidina
gp43	glicoproteína de 43kDa de <i>P. brasiliensis</i>
GPI	glicosilfosfatidilinositol
h	horas
HCl	ácido clorídrico
HEPES	ácido 2-[4-(2-hidroxietil) piperazina-1]etanosulfônico
Hsp	<i>heat shock protein</i>
IPTG	isopropiltiogalactosídeo
ITS	<i>internal transcribed spacers</i>
kb	quilo base
KCl	cloreto de potássio
kDa	quiloDalton
kPa	quiloPascal
L	litro
l	caminho óptico da cubeta
LB	meio Luria-Bertani
LiCl	cloreto de lítio
LPS	lipopolissacarídeo
M	molar
MEC	matriz extracelular
MetOH	metanol
min	minutos
MgCl ₂	cloreto de magnésio

mL	mililitro
MLS	proteína malato sintase de <i>P. brasiliensis</i>
mm	milímetro
mM	milimolar
NaAcet	acetato de sódio
NaCl	cloreto de sódio
NaForm	formiato de sódio
NaI	iodeto de sódio
NaHCO ₃	bicarbonato de sódio
NaMal	malonato de sódio
NO	óxido nítrico
m/z	razão massa/carga
nm	nanômetro
ng	nanograma
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
PAMPS	padrões moleculares associados a patógenos
PEG	polietilenoglicol
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
Pb14-3-3	proteína 14-3-3 de <i>P. brasiliensis</i>
PbEF-Tu	proteína fator de alongação Tu de <i>P. brasiliensis</i>
PBS	solução salina tamponada com fosfatos
PCM	paracoccidioidomicose
PCR	reação da polimerase em cadeia
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PI	iodeto de propídio
PLAAC	mistura de inibidores de protease composto de pepstatina, leupeptina, aprotinina, antipaina e quimiostatina
pLySs	linhagem de <i>E. coli</i> para expressão de proteínas via promotor T7 contendo o vetor pLysS (T7 lisozima)
pmol	picomol
PMSF	fenil-metil-sulfonil fluoreto
PO	fenoloxidase
qsp	quantidade suficiente para
Rm _{ds}	desvio da média quadrática (<i>Root Mean Square Deviation</i>)
RNA	ácido ribonucleico
Rosetta	linhagem de <i>E. coli</i> para expressão de proteínas via promotor T7 contendo o plasmídeo pRARE
ScBmh1	proteína 14-3-3 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , isoforma Bmh1
SDS	dodecil sulfato de sódio
SEC	cromatografia de exclusão molecular

TFA	ácido trifluoroacético
TLR	receptor Toll- <i>like</i>
TPI	proteína triose fosfato isomerase de <i>P. brasiliensis</i>
U	unidade
VC	volume de coluna
x g	força G

Resumo

Paracoccidioides brasiliensis é um dos agentes etiológicos da paracoccidioidomicose, micose sistêmica de grande importância na América Latina devido a incidência. Durante a interação com o hospedeiro, *P. brasiliensis* sintetiza diversas moléculas que auxiliam no processo infeccioso, entre elas, a proteína Pb14-3-3 desempenha um importante papel no estabelecimento da infecção. Este estudo teve como objetivo aprofundar o conhecimento sobre esta proteína através de caracterização biofísica e estrutural, identificar proteínas ligantes tanto de *P. brasiliensis* quanto de células humanas e avaliar seu potencial imunogênico em *G. mellonella*. Para isso, a proteína Pb14-3-3 recombinante foi produzida e purificada por técnicas cromatográficas. O conteúdo de estrutura secundária e a avaliação da estrutura terciária foram avaliados por dicroísmo circular e fluorescência intrínseca do triptofano, respectivamente onde foi observado que a proteína obtida é composta majoritariamente por estruturas α -hélices e apresenta estrutura terciária. A estabilidade térmica também foi avaliada e a Pb14-3-3 recombinante mantém sua estrutura secundária até a temperatura 55°C, temperatura muito superior as utilizadas nos experimentos posteriores. A resolução da estrutura tridimensional por cristalografia de raios-X demonstrou que a proteína é composta por nove estruturas α -hélices dispostas em arranjo antiparalelo, formando um canal de ligação característico das proteínas da família 14-3-3. Curiosamente, observou-se que durante o processo de cristalização a Pb14-3-3 interage com um peptídeo, que se dissocia com a adição de glutaraldeído na solução de cristalização. A sequência do peptídeo foi predita *in silico* e este apresentou o motivo de ligação modo II predito para proteínas 14-3-3. Os ensaios de interação proteína-proteína demonstraram que a Pb14-3-3 interage com um grande número de proteínas tanto de *P. brasiliensis* e quanto de células hospedeiras (ATCC MRC-5). Entre as proteínas de *P. brasiliensis*, identificou-se duas proteínas da família Hsp70 (*heat shock proteins*), Hsp7 e Hsp72, estas proteínas estão envolvidas na patogenicidade de *P. brasiliensis*, porém o papel dessa interação na patogenicidade ainda deve ser elucidado. A α -tubulina de ATCC MRC-5, proteína do citoesqueleto, também foi identificada como ligante de Pb14-3-3, sugerindo o envolvimento desta proteína no rearranjo do citoesqueleto de células hospedeiras mediante a infecção por *P. brasiliensis*, que é considerado um mecanismo de evasão do sistema imune. Adicionalmente, neste trabalho também foi realizada a avaliação do efeito do tratamento da Pb14-3-3 em *G. mellonella* e

observou-se que o pré-tratamento com a proteína promoveu um efeito protetivo contra a infecção por *P. brasiliensis* e que a Pb14-3-3 desempenha um papel imunomodulatório promovendo a diminuição da densidade hemocitária e o aumento na produção de óxido nítrico e na expressão de peptídeos antifúngicos. Desta forma, este estudo reforça a importância desta proteína na interação *Paracoccidioides*-hospedeiro, sugerindo seu envolvimento no rearranjo do citoesqueleto e seu potencial como alvo terapêutico.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, proteína 14-3-3, adesina

Abstract

Paracoccidioides brasiliensis is one of the etiological agents of paracoccidioidomycosis, a systemic mycosis of great importance in Latin America due to its incidence. During the interaction with the host, *P. brasiliensis* synthesizes several molecules that assist in the infectious process, among them the Pb14-3-3 plays a crucial role in the establishment of the infection. This study aimed to increase the knowledge about this protein by performing the biophysical and structural characterization, identify binding proteins from *P. brasiliensis* and host cells and evaluate its immunogenic potential in *G. mellonella*. For this, the Pb14-3-3 recombinant protein was produced in *E. coli* and purified by chromatography techniques. The secondary structure content and evaluation of tertiary structure was performed by circular dichroism and intrinsic tryptophan fluorescence, respectively and it was observed that the obtained protein is mainly composed by structures and presents tertiary structure. The thermal stability was also evaluated and the Pb14-3-3 recombinant protein maintains its secondary structure until 55°C, which is higher than the temperatures used in subsequent experiments. The resolution of the 3D structure by X-ray crystallography revealed that the protein is composed by nine α -helix, in antiparallel arrangement, forming a binding groove that is characteristic from 14-3-3 proteins family; Interestingly, it was observed that during the crystallization process the Pb14-3-3 interacts with a peptide, which dissociates when crosslinked with glutaraldehyde. The peptide sequence was predicted *in silico* and presented the binding motif mode II proposed for 14-3-3 proteins. The interactions assays showed that Pb14-3-3 interacts with several proteins from both *P. brasiliensis* and host cells (ATCC MRC-5). Among the binding proteins from *P. brasiliensis*, two proteins from Hsp70 (Heat Shock Proteins) family were identified, Hsp7 and Hsp72, these proteins are involved in *P. brasiliensis* pathogenicity, but its role of this interaction in the pathogenicity is not clear yet. The α -tubulin protein from ATCC MRC-5, a cytoskeleton protein, was also identified as Pb14-3-3 binding partner, suggesting the role of this protein in the cytoskeleton rearrangement promoted by *P. brasiliensis* as an evasion mechanism from host immune system. Additionally, the effect of Pb14-3-3 treatment in *Galleria mellonella* was also evaluated and it was observed that the pre-treatment protects larvae against *P. brasiliensis* infection and Pb14-3-3 has an immunomodulatory effect leading to a decrease of hemocyte density, increases the production of nitric oxide

and the expression of antifungal peptides coding genes. Therefore, this study reinforces the importance of Pb14-3-3 in the *Paracoccidioides*-host interaction, suggests its involvement in the cytoskeleton rearrangement and its potential as therapeutic target.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*, 14-3-3 protein, adhesin

Capítulo 1 – Tese

1. Introdução

1.1 Complexo *Paracoccidioides* spp. e paracoccidioidomicose

Existem 2,2 a 3,8 milhões de espécies de fungos, sendo que, aproximadamente 300 espécies são descritas como patógenos humanos causando alergias, micoses superficiais e invasivas (STOP NEGLECTING FUNGI, 2017; HAWKSWORTH e LÜCKING, 2017).

O aumento da incidência das infecções fúngicas constitui um grande problema de saúde pública mundial. Desde da década de 1980, houve um aumento nos casos de micoses devido ao aumento de indivíduos imunocomprometidos, ao uso de antibióticos e medicamentos imunossupressores. Estima-se que cerca um bilhão de pessoas são acometidas por micoses e que levam cerca de 1,5 milhões de pessoas à morte (HORN *et al.*, 2012; FALCONE *et al.*, 2014; BONGOMIN *et al.*, 2017).

As micoses invasivas são as formas mais graves das infecções fúngicas e estima-se que cerca de 150 milhões de pessoas sejam acometidas. Entretanto, este número pode ser maior devido à falta de visibilidade, ausência de notificação compulsória e a falta de precisão dos métodos diagnósticos (BONGOMIN *et al.*, 2017; ENOCH *et al.*, 2017; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017).

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica que tem como agente etiológico os fungos do complexo *Paracoccidioides*. É uma doença geograficamente restrita a América Latina, com maior prevalência no Brasil, onde cerca de 80% dos casos são relatados, seguido por Venezuela, Colômbia, Equador e Argentina e possuindo uma grande relevância clínica (BRUMMER *et al.*, 1993; MENDES-GIANNINI *et al.*, 2004; AMEEN *et al.*, 2010; MARTINEZ, 2017).

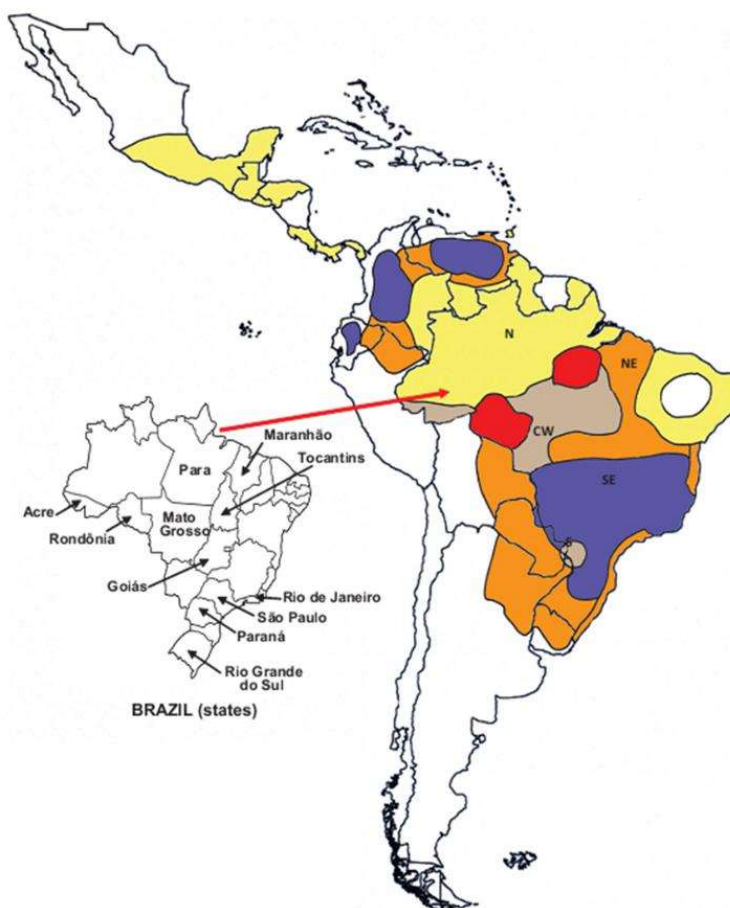
A PCM é considerada a segunda micose sistêmica mais prevalente na América Latina, apresentando incidência de 1-4/100.000 habitantes em áreas endêmicas e taxa de mortalidade de 1,65/milhão de habitantes no Brasil, porém estes dados podem ser maiores, pois são baseados em estudos pontuais (COLOMBO *et al.*, 2011; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017). Em estudo retroativo realizados por Prado *et al.* (2009), entre 1996 a 2006, em casos de doenças fúngicas como causa primária de morte, a PCM foi responsável por cerca de 51% dos casos/ano, seguido de criptococose e candidíase.

Inicialmente considerava-se apenas as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil como regiões endêmicas, porém devido à expansão agropecuária na região

Norte e Nordeste verificou-se um aumento da incidência da PCM nos estados de Tocantins, Pará, Maranhão e Rondônia. Estudos em novas áreas hiperendêmicas no Maranhão mostram que a incidência pode chegar a aproximadamente 40/100.000 habitantes/ ano (MATOS *et al.*, 2012; VIEIRA *et al.*, 2014).

Além da expansão agrícola, alterações nas condições do microambiente, devido à alterações climáticas ou alterações no ambiente, como por exemplo as construções de hidroelétricas, podem estar associadas ao aumento da incidência da PCM em algumas regiões (MANGIATERRA *et al.*, 1999; BARROZO *et al.*, 2009; LOTH *et al.*, 2011). Em estudo realizado por do Valle *et al.* (2017) observou-se um aumento de 5,7 vezes no diagnóstico de PCM na região da Baixa Fluminense no Rio de Janeiro após a construção de uma rodovia.

Figura 1. Áreas endêmicas de PCM na América Latina



(♦) Primeiras áreas de alta endemidade reconhecidas; (♦) áreas de alta endemidade desde as últimas décadas do século 20; (♦) áreas com evidências de aumento de casos; (♦) áreas de endemidade moderada; (♦) baixa endemidade; (♦) ausência ou raros casos de PCM reportados (MARTINEZ, 2017).

O primeiro relato de PCM foi realizado por Adolpho Lutz em 1908, que descreveu os aspectos clínicos, histopatológicos e micológicos da doença e posteriormente realizou o registro de vários casos, iniciando o re-isolamento e caracterização do fungo. Em 1911, após estudos morfológicos de Alfonse Splendore, o fungo recebeu a denominação *Zymonema brasiliensis*. Em 1930, após estudos comparativos entre a doença no Brasil e a doença causada por *Coccidioides immitis*, o gênero *Paracoccidioides* foi criado mantendo-se a espécie *brasiliensis*. (Da SILVA LACAZ, 2002; MARQUES, 2008).

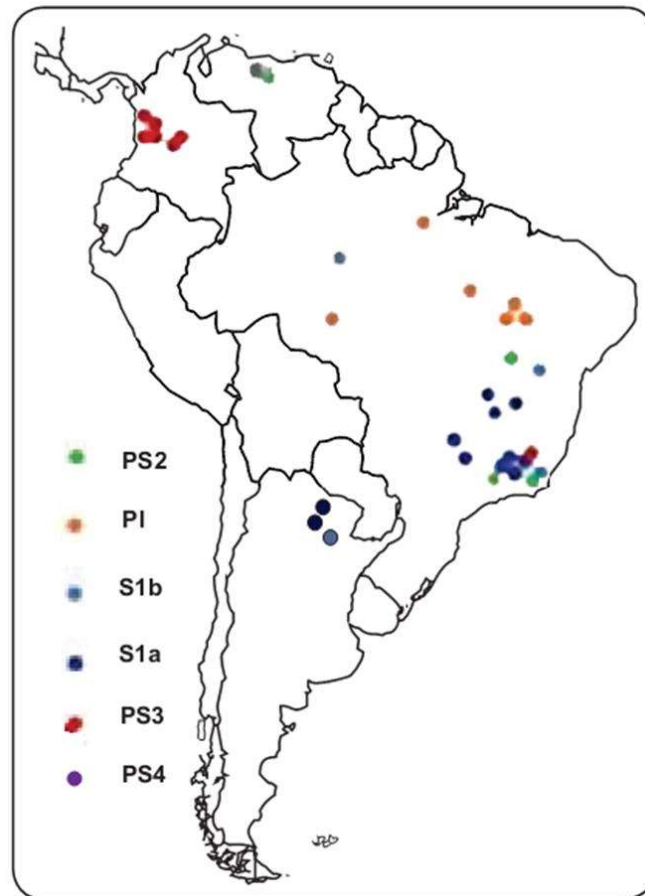
Por muitas décadas considerou-se que o gênero *Paracoccidioides* compreendia apenas uma espécie, porém após um estudo com 65 isolados de *P. brasiliensis* provenientes de seis áreas endêmicas, concluiu-se que *P. brasiliensis* é composto por três espécies filogenéticas, denominadas S1, PS2 e PS3 (MATUTE *et al.*, 2006).

A espécie filogenética S1 constitui um grupo parafilético, contendo isolados provenientes da Argentina, Brasil, Peru e Venezuela; PS2 um grupo monofilético, com isolados encontrados no Brasil e Venezuela e; PS3 grupo monofilético, restrito a Colômbia (MATUTE *et al.*, 2006).

Posteriormente, Carrero *et al.* (2008) realizou outro estudo com as regiões codificadoras e não codificadoras de vários genes da região ITS de 21 isolados, e obteve resultados semelhantes ao estudo anterior, porém devido ao distanciamento genético do isolado Pb01 propôs-se a separação deste em novo grupo filogenético denominado *Pb01-like*.

Em 2009, após estudos comparativos entre isolados *Pb01-like* e as outras espécies filogenéticas sugeriu-se a separação taxonômica e a denominação *Paracoccidioides lutzii* (TEIXEIRA *et al.*, 2009). Posteriormente, um novo grupo restrito à região da Venezuela foi descrito e recebeu a denominação PS4 (TEIXEIRA *et al.*, 2014).

Figura 2. Distribuição geográfica das diferentes espécies filogenéticas de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* (PI)



Fonte: SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017

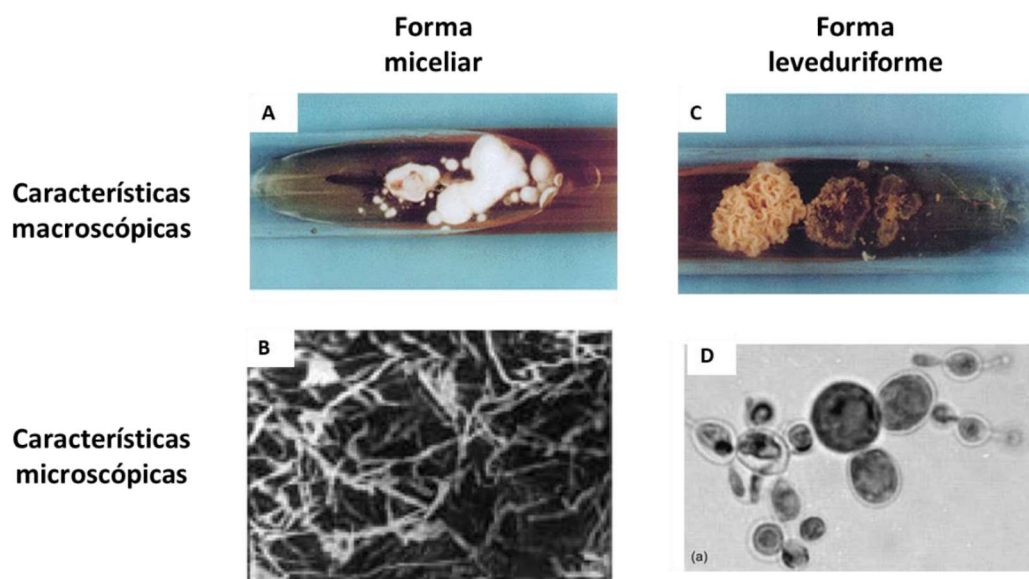
Recentemente, Turissini *et al.* (2017), após estudos moleculares e a observação de diferenças morfológicas da fase leveduriforme entre as quatro espécies filogenéticas, ainda que pequenas, propuseram a diferenciação taxonômica das espécies, sugerindo as denominações: *P. americana*, para PS2; *P. restripiensis*, para PS3; e *P. venezuelensis*, para PS4.

O habitat dos fungos do gênero *Paracoccidioides* ainda não é claramente definido devido à dificuldade em isolar o fungo no ambiente na forma micelial, porém já foram encontrados solos ricos, água e plantas. Adicionalmente, são frequentemente isolados de tatus, *Dasypus novemcinctus* e *Cabassous centralis*, de áreas endêmicas, provavelmente devido ao grande contato desses animais com o solo, e acredita-se que eles auxiliam na disseminação de esporos (BAGAGLI *et al.*, 2003; BAGAGLI *et al.*, 2008; TEIXEIRA *et al.*, 2014).

Paracoccidioides spp tem como principal característica o dimorfismo, apresentando-se na forma micelial ou leveduriforme, sendo a transição entre as

formas mediada pela mudança de temperatura. Na temperatura ambiente, 25°C a 27°C crescem como micélios produzindo conídios, considerada a fase infectante do fungo, e macroscopicamente, apresenta-se na forma de colônias brancas e cotonosas. A 37°C, em meios enriquecidos ou no hospedeiro, o fungo encontra-se na forma leveduriforme, fase parasitária, apresentando-se como células arredondadas de parede dupla e múltiplos brotamentos, que formam colônias de aparência cerebriforme e levemente amareladas (MCEWEN *et al.*, 1987; FRANCO *et al.*, 1994).

Figura 3. Morfologia de *Paracoccidioides* spp.



Características da macroscópicas da forma miceliar (A) e leveduriforme e características microscópicas da forma miceliar (B) e leveduriforme (D) dos fungos do gênero *Paracoccidioides*. Adaptado de LACAZ *et al.*, 1999; BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002 e CORREDOR *et al.*, 2005.

A aquisição da doença ocorre através da inalação de conídios ou fragmentos de hifa que, em contato com o hospedeiro, sofre a transição para a forma leveduriforme, o estabelecimento e desenvolvimento da doença dependem de vários fatores, tanto do fungo quanto do hospedeiro. A PCM apresenta diversas manifestações clínicas, sendo acometimento pulmonar e lesões na mucosa oral as mais comuns (BELLISSIMO-RODRIGUES *et al.*, 2013; CATAÑO e AGUIRRE, 2013; De OLIVEIRA, H. C., AsSATO, P. A., *et al.*, 2015). Assim, a doença pode-se apresentar nas formas: aguda, crônica e residual.

A forma aguda, também chamada de juvenil por acometer principalmente crianças e jovens, de ambos os sexos, também é a forma mais comum em pacientes imunocomprometidos. Esta é a forma mais grave da PCM, pois possui uma rápida

evolução causando uma infecção disseminada que pode afetar diversos órgãos e apresentando uma alta taxa de mortalidade. As manifestações clínicas mais frequentes são: febre, perda de peso, anemia, lesões cutâneas, acometimento do sistema imune (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017).

A forma crônica acomete principalmente adultos do sexo masculino e é considerada a forma mais comum da doença. Esta forma possui uma evolução mais lenta, as manifestações clínicas podem aparecer depois de anos ou décadas após a infecção. A principal característica desta forma é o acometimento do trato respiratório inferior, podendo se disseminar para outros órgãos e tecidos (RESTREPO *et al.*, 2008; BOCCA *et al.*, 2013; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017).

A menor prevalência em mulheres está relacionada ao fator hormonal, onde o estradiol exerce um fator protetivo através da interação com receptores presentes no fungo que desencadeia a resposta imune. Estudos indicam que esta interação impede a transição da forma miceliar para leveduriforme, fator essencial para o estabelecimento da doença. (LOOSE *et al.*, 1983; SHANKAR *et al.*, 2011; CAIXETA *et al.*, 2018).

A forma residual está relacionada com sequelas de lesões antigas provocadas pela doença, sendo a insuficiência pulmonar crônica devido à fibrose a sequela mais grave (FRANCO *et al.*, 1994; DE ABREU E SILVA *et al.*, 2012; MARQUES, 2013).

O diagnóstico padrão da PCM é realizado através do exame direto em fluidos biológicos ou histopatológicos, mediante a visualização de células com múltiplos brotamentos, característico de *Paracoccidioides* spp, ou através do isolamento dos fungos de espécimes clínicas, porém essa técnica apresenta algumas desvantagens como a dificuldade de re-isolar o fungo, a demora do cultivo e da reversão do fungo para a fase miceliar, importante para confirmação da infecção por fungos dimórficos (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017).

Neste sentido, a fim de obter-se um diagnóstico mais rápido, os exames imunológicos são utilizados para o diagnóstico, e também para o acompanhamento do paciente. Para a o diagnóstico da PCM as técnicas de imunodifusão, contra-imunoeletroforese, imuno-ensaio enzimático (ELISA) e *Immunoblotting*, podem ser utilizadas apresentando uma sensibilidade entre 80-95% (MORETO *et al.*, 2011; DA SILVA, J. F. *et al.*, 2015; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017).

A imunodifusão é o método mais utilizado para o diagnóstico inicial da PCM devido ao baixo custo, a simplicidade de execução, a sensibilidade (>80%), e

especificidade (>90%), também sendo utilizada no acompanhamento de pacientes. Enquanto a contra-imunoeletroforese por possuir um custo maior é mais utilizado para o acompanhamento de pacientes (DEL NEGRO *et al.*, 1991; MORETO *et al.*, 2011; GEGEMBAUER *et al.*, 2014; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017).

A utilização de imuno-ensaios enzimáticos (ELISA) no diagnóstico de infecções, inclusive da PCM, tem aumentado devido à fácil execução e obtenção de resultados, porém possui um custo maior e reações cruzadas em pacientes com histoplasmose ou com a doença de Jorge Lobo já foram relatadas (Da Silva, J. F. *et al.*, 2015; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2017). O *Imunoblotting* normalmente é utilizado como exame comprobatório e para monitoramento da doença, sendo a glicoproteína de 43 kDa (gp43 kDa) o principal marcador da PCM (MENDES-GIANNINI *et al.*, 1989; DE CAMARGO, 2008).

Antígenos contendo alta concentração de gp43 kDa são muito utilizados devido à alta reatividade em pacientes acometidos com PCM por *P. brasiliensis*, porém, pacientes infectados por *P. lutzii* podem apresentar um resultado falso negativo, por isso o estudo de novos marcadores de PCM são de grande importância (LEITÃO *et al.*, 2014; DA SILVA *et al.*, 2016).

Em relação ao tratamento, a terapêutica varia de acordo com a severidade da doença, do sistema imune do paciente e da disponibilidade do medicamento. Para as formas mais leves e moderadas, o itraconazol é o fármaco de escolha e o tempo de tratamento pode variar de 9-18 meses dependendo da severidade da doença e resposta ao tratamento. Os novos derivados azólicos, voriconazol, posiconazol e isavuconazol, também são utilizados no tratamento destas formas (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017).

Entretanto, a associação sulfametoxazol-trimetropim, apesar de possuir uma ação fungistática e exigir um período de tratamento mais prolongado, é amplamente utilizada, devido sua disponibilidade no sistema de saúde público por apresentar um menor custo (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017).

Em casos mais severos, a utilização da anfotericina B em deoxicolato ou na forma lipossomal são indicadas e o tempo de tratamento pode variar de acordo com a resposta do paciente, que devem ser monitorados não apenas em relação a regressão da doença, mas também quanto aos efeitos tóxicos da anfotericina B (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017).

Entretanto, a alta toxicidade associada à anfotericina B, os longos períodos de tratamento com itraconazol que, muitas vezes, levam ao abandono do tratamento pelo paciente, o aumento de pacientes imunodeprimidos ou que apresentam coinfeção e por isso apresentam maiores problemas em relação à terapia devido a interações medicamentosas e/ou efeitos adversos, despertam a necessidade de novas alternativas terapêuticas (GHANNOUM E RICE, 1999; KRCMERY, 2005; DI SANTO, 2010; MARQUES, 2013).

1.2 Interação *Paracoccidioides*-hospedeiro

Paracoccidioides spp. dispõe de mecanismos que auxiliam na adaptação, estabelecimento e disseminação no hospedeiro, como dimorfismo, síntese de melanina, adesinas, invasinas, secreção de vesículas extracelulares e mecanismos de evasão do sistema imune, como prevenção da fagocitose, indução da apoptose, produção de enzimas antioxidantes (MARCOS, DE OLIVEIRA, DE MELO, *et al.*, 2016; CAMACHO e NIÑO-VEGA, 2017).

Assim, o estabelecimento da PCM depende tanto dos fatores de virulência de *Paracoccidioides* quanto do estado imunológico do hospedeiro e da capacidade do fungo de evadir o sistema imune. (LENZI *et al.*, 2000; MENDES-GIANNINI *et al.*, 2000; MENDES-GIANNINI *et al.*, 2004; DE OLIVEIRA, H. C., ASSATO, P. A., *et al.*, 2015).

A produção de adesinas é o maior fator de virulência de fungos e possui um grande papel na patogênese, inclusive em *Paracoccidioides* spp.. As adesinas participam da etapa inicial do estabelecimento do fungo no hospedeiro, pois são responsáveis por promover a adesão à células hospedeiras e a matriz extracelular (MEC), composto principalmente por fibronectina, laminina, fibrinogênio e colágenos do tipo I e IV, (MENDES-GIANNINI *et al.*, 2006; DE GROOT *et al.*, 2013; DE OLIVEIRA, H. C., DA SILVA, J.E F, *et al.*, 2015).

Diversas adesinas já foram descritas para os fungos do complexo *Paracoccidioides* spp. entre elas a gp43 , a proteína 14-3-3 (Pb14-3-3), gliceraldeído-3-fostato desidrogenase (GAPDH), triose fosfato isomerase (TPI), malato sintase (MLS), enolase (ENO), e o fator de alongação Tu (PbEF-Tu), sendo as proteínas gp43 e Pb14-3-3 as adesinas mais expressas durante a infecção (VICENTINI *et al.*, 1994; ANDREOTTI *et al.*, 2005; BARBOSA *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2007; DA SILVA NETO *et al.*, 2009; DONOFRIO *et al.*, 2009; DE OLIVEIRA,

H. C., DA SILVA, J.E F, *et al.*, 2015; MARCOS, DE OLIVEIRA, DA SILVA, *et al.*, 2016).

A maioria das adesinas descritas são proteínas *moonlighting*, que se caracterizam por serem normalmente expressas pelo organismo, porém podem apresentar funções adicionais independentes de sua função principal. As proteínas envolvidas GAPDH, TPI e ENO, que possuem funções canônicas na via glicolítica e durante a infecção, são superexpressas e possuem um papel na virulência, este seria um mecanismo de adaptação, resultando em um aumento de habilidades funcionais de um organismo sem a necessidade de expansão do genoma (KARKOWSKA-KULETA e KOZIK, 2014; MARCOS *et al.*, 2014).

1.3 Família de proteínas 14-3-3

As proteínas 14-3-3 constituem uma família de proteínas altamente conservadas, pequenas, diméricas e ácidas, podendo apresentar múltiplas isoformas, como por exemplo, em mamíferos foram descritas sete isoformas; em plantas, como *Arabidopsis thaliana* que possui 13 isoformas e *Saccharomyces cerevisiae* possui 2 isoformas (OBSIL e OBSILOVA, 2011).

As proteínas 14-3-3 são proteínas multifuncionais que participam na regulação de diversos processos celulares, como apoptose, transdução de sinal, regulação de ciclo celular e de transcrição e rearranjo do citoesqueleto. O envolvimento das proteínas 14-3-3s nos processos celulares deve-se à capacidade de interagir com inúmeras proteínas promovendo a alteração estrutural das proteínas alvo, a regulação da localização sub celular de proteínas ligantes e ao impedimento ou estabilização da formação de complexos multiproteicos (FU *et al.*, 2000; OTTMANN, 2013; SLUCHANKO *et al.*, 2017).

Estudos de interação proteína-proteína sugerem que as 14-3-3s podem interagir com mais de 2000 proteínas, porém pouco se sabe sobre a implicação destas na interação fungo-hospedeiro. As proteínas 14-3-3 interagem, preferencialmente, com proteínas que apresentam fosforilação nos resíduos de serinas ou treoninas, apresentando os motivos de ligação: RSXpS/pTXP (modo 1) e RXXXpS/pTXP (modo 2), onde pS representa uma serina e pT uma treonina fosforiladas e X representa qualquer aminoácido. A interação com a região C-terminal da proteína alvo também já foi relatada e denominada como modo III (pS/pTX-COOH) (YAFFE *et al.*, 1997; RITTINGER *et al.*, 1999; YANG *et al.*, 2006).

Em humanos, as proteínas 14-3-3 são amplamente estudadas, principalmente devido ao seu potencial terapêutico devido à sua relação com o desenvolvimento de diversos tipos de câncer e doenças neurodegenerativas, como Creutzfeldt-Jakob, doença de Alzheimer e doença de Parkinson (STEINACKER *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2011; AGHAZADEH e PAPADOPOULOS, 2016).

As proteínas 14-3-3 de parasitas, como *Echinococcus* spp., *Toxoplasma gondii*, *Schistosoma* sp., também têm sido estudadas como potencial alvo terapêutico e diagnóstico pois estão envolvidas na interação parasito-hospedeiro (SILES-LUCAS *et al.*, 2003; SILES-LUCAS e GOTTSTEIN, 2003; ANDRADE *et al.*, 2004; SILES-LUCAS *et al.*, 2007; SILES-LUCAS *et al.*, 2008; MENG *et al.*, 2012; WEIDNER *et al.*, 2016).

A primeira descrição de proteínas 14-3-3 em fungos foi realizada por Van Heusden *et al.* (1992), através da caracterização do gene *BMH1* de *S. cerevisiae*. Posteriormente outra isoforma foi identificada, *Bmh2*, e ambas são responsáveis pela regulação de diversos processos celulares, como transporte celular, síntese de quitina e ergosterol, citoesqueleto (VAN HEUSDEN *et al.*, 1995; BRUCKMANN *et al.*, 2004; VAN HEUSDEN e STEENSMA, 2006; KLUG e DAUM, 2014; PARUA *et al.*, 2014; KUMAR, 2017).

O envolvimento das proteínas 14-3-3 de fungos patogênicos na virulência já foi demonstrada em *Candida albicans*, *Paracoccidioides* spp. e mais recente *Cryptococcus neoformans*, onde a proteína também está envolvida na adesão à células hospedeiras (KELLY *et al.*, 2009; DE OLIVEIRA, HAROLDO C. *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2015).

Em *P. brasiliensis*, a proteína *Pb14-3-3* foi primeiramente identificada por Andreotti *et al.* (2005) através de uma análise de proteínas diferencialmente expressas após o re-isolamento do fungo em camundongo. Neste estudo, observou-se o aumento da expressão de uma proteína de aproximadamente 30 kDa, que foi isolada e caracterizada como uma adesina, ligante de laminina. Em estudo posterior, através de sequenciamento de aminoácidos esta proteína foi identificada como uma proteína 14-3-3 (DA SILVA *et al.*, 2013).

A proteína *Pb14-3-3* possui um importante papel na patogênese sendo uma das proteínas mais expressas durante a infecção por *Paracoccidioides* spp. Em ensaios de infecção *in vitro* e *in vivo*, foi observado que a *Pb14-3-3* está relacionada ao processo de adesão às células hospedeiras e durante a infecção acumula-se na

parede do fungo, é secretada para o meio extracelular e promove o rearranjo do citoesqueleto de células hospedeiras (ANDREOTTI *et al.*, 2005; SILVA, 2011; DA SILVA *et al.*, 2013; DE OLIVEIRA, HAROLDO C. *et al.*, 2015).

Além do processo de adesão, a Pb14-3-3 também está envolvida na indução da apoptose de células hospedeiras, considerado um mecanismo de evasão do sistema imune de *Paracoccidioides* spp., que favorece a sobrevivência e o crescimento do fungo no hospedeiro (MENDES-GIANNINI *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2015).

Em *Paracoccidioides* spp., a participação da proteína nos processos de crescimento, morfologia e transição entre as formas micelial e leveduriforme, foi demonstrado através de silenciamento gênico da Pb14-3-3 (MARCOS, SILVA, *et al.*, 2016). Adicionalmente, em estudos de análise funcional utilizando como modelo *S. cerevisiae* foi sugerido a participação da Pb14-3-3 na biossíntese de ergosterol, uma via alvo de antifúngicos utilizados, como itraconazol e anfotericina B (ASSATO *et al.*, 2015).

O mutante silenciado, Pb14-3-3 aRNA, também apresentou diminuição na ligação a laminina, menor interação com pneumócitos e menor virulência nos modelos murinho (dados não publicados) e *Galleria mellonella* confirmando sua importância na interação *Paracoccidioides*-hospedeiro (MARCOS, SILVA, *et al.*, 2016).

Estes estudos demonstram a importância da Pb14-3-3 na virulência e no estabelecimento de *P. brasiliensis* no hospedeiro. Assim, estudos de caracterização estrutural e da sua interação com proteínas associadas a mecanismos de patogenicidade, bem como sua interação com proteínas do hospedeiro, podem auxiliar na busca por alternativas terapêuticas para o tratamento da PCM.

1.4 *Galleria mellonella* como modelo de estudo *in vivo*

Em 1959, Russel e Burch, com o intuito de conscientizar a comunidade científica sobre a utilização de animais mamíferos na pesquisa propuseram a teoria dos 3R (*Reduction, Refinement e Replacement*). Esta teoria incentivou a busca de metodologias para a redução e substituição de modelos animais mamíferos e o refinamento dos experimentos para reduzir o estresse e sofrimento destes animais (BULGER, 1987; ANDERSEN e WINTER, 2017).

Diversas técnicas são sugeridas com o objetivo de aplicar a teoria dos 3R, como técnicas físico-químicas, modelos computacionais, testes *in vitro*, utilização de *microarrays* e o uso de animais inferiores. Entretanto a substituição total da utilização de animais mamíferos ainda possui controvérsias, uma vez que há um consenso de que a utilização desses modelos ainda é a melhor maneira de mimetizar as condições do organismo humano (ARORA *et al.*, 2011; TREVIJANO-CONTADOR e ZARAGOZA, 2014).

O modelo murino é amplamente usado devido à semelhança morfológica e imunológica com os humanos, entretanto existem problemas de reprodução, manutenção, custo e principalmente problemas éticos em relação ao uso de mamíferos para testes laboratoriais (GLAVIS-BLOOM *et al.*, 2012; HARWOOD e RAO, 2014). Assim, a utilização de animais invertebrados para ensaios *in vivo* tem sido avaliada como uma alternativa aos modelos mamíferos.

Os modelos invertebrados apresentam diversas vantagens, como exigências éticas, manutenção e custos menores, rápido ciclo de vida quando comparado com modelos mamíferos, e uma grande quantidade de animais podem ser usados por experimento. Adicionalmente, estes animais apresentam um alto grau de conservação evolutiva do sistema imune inato com mamíferos (ARVANITIS *et al.*, 2013; HARWOOD e RAO, 2014).

Alguns modelos propostos para o estudo de interação fungo-hospedeiro *in vivo* como *Acanthamoeba castellanii*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* e *Galleria mellonella*, podem ser utilizados em estudos de virulência, resposta imune inata, atividade e toxicidade de compostos, entre outros (FUCHS e MYLONAKIS, 2006; MYLONAKIS *et al.*, 2007; DESALERMOS *et al.*, 2012; GLAVIS-BLOOM *et al.*, 2012; ARVANITIS *et al.*, 2013).

Além das vantagens citadas acima, *Galleria mellonella* (Lepdoptera, Pyralidae) possui uma importante vantagem no estudo da interação fungo-hospedeiro, a variação da temperatura em que os experimentos podem ser conduzidos, de 25 a 37°C, que permite a simulação da temperatura do fungo no habitat, a temperatura ambiente, bem como na situação de infecção. Este fator é especialmente interessante para o estudo de fungos termodimórficos (FUCHS, O'BRIEN, *et al.*, 2010; FALLON *et al.*, 2012).

Galleria mellonella possui uma resposta imune inata complexa, celular e humoral. A resposta celular é mediada principalmente por células presente na

hemolinfa denominadas hemócitos, que podem ser divididos em cinco tipos celulares: prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos e oenocitóides (LAVINE e STRAND, 2002; WOJDA, 2017).

Os granulócitos e plasmatócitos encontram-se em maior abundância e são responsáveis pela fagocitose, nodulação (capacidade de agregação das células para captura do microrganismo) e encapsulação (formação de camadas ao redor do microrganismo). Os esferulócitos são responsáveis pelo transporte de componentes da cutícula e os oenocitóides são carreadores de precursores da fenoloxidase e também estão envolvidos na fagocitose (FUCHS, O'BRIEN, *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2016; WOJDA, 2017).

A resposta humoral está relacionada a síntese de moléculas de defesa como as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, opsoninas e peptídeos antimicrobianos (AMPs) e melanina. As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio promovem o estresse oxidativo que causa danos na membrana e/ou parede do microrganismo levando a eliminação. As opsoninas são proteínas que reconhecem e se ligam à padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e ativam a resposta imune (FALLON *et al.*, 2012; TSAI *et al.*, 2016; WOJDA, 2017).

Os AMPs são sintetizados em diferentes tecidos, porém durante a infecção são secretados na hemolinfa e possuem atividade antibacteriana e/ou antifúngica e produção de melanina que através da ativação da cascata de fenoloxidase e resulta na encapsulação do patógeno, coagulação da hemolinfa e opsonização, assemelhando-se ao processo de formação de abscessos em mamíferos (AGNIESZKA *et al.*, 2014; TSAI *et al.*, 2016; WOJDA, 2017).

Cerca de 18 AMPs já foram descritos para *G. mellonella*, e a expressão destes peptídeos depende do tipo de infecção, fúngica ou bacteriana (Wojda *et al.*, 2009; Mak *et al.*, 2010; Bolouri Moghaddam *et al.*, 2016). Entre os peptídeos com ação antifúngica, estão a galiomicina, uma defensina (S. *et al.*, 2004) e galeriomicina, uma defensina-like rica em cisteína (BERIT *et al.*, 2003).

Galleria mellonella mostrou-se eficiente para o estudo de diversos fungos patogênicos, como *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium* spp, *Aspergillus* spp. e os fungos dimórficos *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides* spp., mostrando-se como um bom modelo a ser utilizado para estudos de infecção, virulência, mecanismos de resposta imune inata, toxicidade e eficácia de compostos com potencial antifúngico, apresentando correlação com estudos realizados em

modelos mamíferos (FUCHS, EBY, *et al.*, 2010; FUCHS, O'BRIEN, *et al.*, 2010; COLEMAN *et al.*, 2011; FALLON *et al.*, 2011; GARCÍA-RODAS *et al.*, 2011; THOMAZ *et al.*, 2013; SCORZONI, DE PAULA E SILVA, SINGULANI, LEITE, DE OLIVEIRA, MORAES DA SILVA, *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2015; BENADUCCI *et al.*, 2016; DE LACORTE SINGULANI *et al.*, 2016; FUCHS *et al.*, 2016; SHEEHAN e KAVANAGH, 2018).

Assim, este modelo foi escolhido para a realização do estudo *in vivo* da resposta imunológica do hospedeiro mediada pela Pb14-3-3 e para a avaliação do seu potencial terapêutico.

5. Conclusões

- ❖ A proteína Pb14-3-3 foi produzida e purificada a partir de duas estratégias, onde foi observado que a utilização do vetor pet28a proporcionou um maior rendimento na produção da proteína purificada.
- ❖ Os ensaios de caracterização biofísica demonstram que a proteína foi obtida na sua conformação nativa, apresentando estrutura secundária e terciária. Adicionalmente, a proteína apresenta uma estabilidade térmica até aproximadamente 50°C, temperatura superior às utilizadas nos experimentos posteriores.
- ❖ A resolução da estrutura tridimensional demonstrou que a proteína é composta por nove estruturas α -hélices em arranjos antiparalelos, formando um canal de ligação, porém não foi possível resolver o domínio C-terminal.
- ❖ Os ensaios de interação proteína-proteína demonstraram que um grande número de proteínas, tanto de *P. brasiliensis* quanto ATCC MRC-5, interagem in vitro com a Pb14-3-3. Entre as proteínas de *P. brasiliensis*, as proteínas hsp7 e hsp72 de *P. brasiliensis* foram identificadas como ligantes de Pb14-3-3, e estudos devem ser conduzidos para desvendar a relação dessa interação na patogenicidade de *P. brasiliensis*.
- ❖ A proteína α -tubulina de MRC-5 foi identificada como ligante de 14-3-3, reforçando o papel desta proteína no rearranjo do citoesqueleto de células hospedeiras.
- ❖ O tratamento com a proteína Pb14-3-3 não apresentou toxicidade em *G. mellonella*, promoveu o aumento da sobrevivência das larvas infectadas com *P. brasiliensis*, bem como a modulação do sistema imune da larva, apresentando-se como uma potencial molécula terapêutica.
- ❖ Os dados obtidos neste trabalho reforçam a importância da Pb14-3-3 na interação *Paracoccidioides*-hospedeiro bem como seu potencial como alvo terapêutico na busca de inibidores da proteína ou como sua utilização terapêutica.

6. Referências

ADAMS, P. D. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Crystallographica Section D**, v. 66, n. 2, p. 213-221, 2010. ISSN 0907-4449. Disponível em: < <https://doi.org/10.1107/S0907444909052925> >.

AGHAZADEH, Y.; PAPADOPOULOS, V. The role of the 14-3-3 protein family in health, disease, and drug development. **Drug Discov Today**, v. 21, n. 2, p. 278-87, Feb 2016. ISSN 1878-5832. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26456530> >.

AGNIESZKA, Z.-B. et al. LYSOZYME AND DEFENSE PEPTIDES AS SUPPRESSORS OF PHENOLOXIDASE ACTIVITY IN *Galleria mellonella*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 87, n. 1, p. 1-12, 2014. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/arch.21175> >.

ALI NOORAFSHAN AND SOHEIL, A.-E. A Review of Therapeutic Effects of Curcumin. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 11, p. 2032-2046, 2013. ISSN 1381-6128/1873-4286. Disponível em: < <http://www.eurekaselect.com/node/107240/article> >.

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

ANDERSEN, M. L.; WINTER, L. M. F. Animal models in biological and biomedical research - experimental and ethical concerns. **An Acad Bras Cienc**, p. 0, Sep 2017. ISSN 1678-2690. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28876358> >.

ANDRADE, M. A. et al. Echinococcus multilocularis laminated-layer components and the E14t 14-3-3 recombinant protein decrease NO production by activated rat macrophages in vitro. **Nitric Oxide**, v. 10, n. 3, p. 150-5, May 2004. ISSN 1089-8603. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15158694> >.

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> >.

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

ARTEAGA BLANCO, L. A. et al. Differential cellular immune response of *Galleria mellonella* to *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Cell Tissue Res**, v. 370, n. 1, p. 153-168, 10 2017. ISSN 1432-0878. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28687931> >.

ARVANITIS, M.; GLAVIS-BLOOM, J.; MYLONAKIS, E. Invertebrate models of fungal infection. **Biochim Biophys Acta**, v. 1832, n. 9, p. 1378-83, Sep 2013. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23517918> >.

ASHIDA, H.; KIM, M.; SASAKAWA, C. Manipulation of the host cell death pathway by Shigella. **Cell Microbiol**, v. 16, n. 12, p. 1757-66, Dec 2014. ISSN 1462-5822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25264025> >.

ASSATO, P. A. et al. Functional analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* 14-3-3 adhesin expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. **BMC Microbiol**, v. 15, n. 1, p. 256, 2015. ISSN 1471-2180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26537993> >.

BAGAGLI, E. et al. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. **Med Mycol**, v. 41, n. 3, p. 217-23, Jun 2003. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12964713> >.

_____. *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> >.

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. Climate and acute/subacute paracoccidioidomycosis in a hyper-endemic area in Brazil. **Int J Epidemiol**, v. 38, n. 6, p. 1642-9, Dec 2009. ISSN 1464-3685. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19433518> >.

BARTEL, M. et al. Small molecules, peptides and natural products: getting a grip on 14-3-3 protein-protein modulation. **Future Med Chem**, v. 6, n. 8, p. 903-21, May 2014. ISSN 1756-8927. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24962282> >.

BATTYE, T. G. G. et al. iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. **Acta Crystallographica Section D**, v. 67, n. 4, p. 271-281, 2011. ISSN 0907-4449. Disponível em: < <https://doi.org/10.1107/S0907444910048675> >.

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

BENADUCCI, T. et al. Virulence of *Cryptococcus* sp. Biofilms In Vitro and In Vivo using *Galleria mellonella* as an Alternative Model. **Front Microbiol**, v. 7, p. 290, 2016. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27014214> >.

BERGIN, D.; BRENNAN, M.; KAVANAGH, K. Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*. **Microbes Infect**, v. 5, n. 15, p. 1389-95, Dec 2003. ISSN 1286-4579 (Print)

1286-4579 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14670452> >.

BERGIN, D. et al. Pre-exposure to yeast protects larvae of *Galleria mellonella* from a subsequent lethal infection by *Candida albicans* and is mediated by the increased expression of antimicrobial peptides. **Microbes Infect**, v. 8, n. 8, p. 2105-12, Jul 2006. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16782387> >.

BERIT, S. et al. Cloning and expression of gallerimycin, an antifungal peptide expressed in immune response of greater wax moth larvae, *Galleria mellonella*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 53, n. 3, p. 125-133, 2003. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/arch.10091> >.

BIDLA, G. et al. Hemolymph coagulation and phenoloxidase in *Drosophila* larvae. **Dev Comp Immunol**, v. 29, n. 8, p. 669-79, 2005. ISSN 0145-305X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15854679> >.

BISIO, L. C. et al. A new *Paracoccidioides brasiliensis* 70-kDa heat shock protein reacts with sera from paracoccidioidomycosis patients. **Med Mycol**, v. 43, n. 6, p. 495-503, Sep 2005. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16320493> >.

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

BOLOURI MOGHADDAM, M. R. et al. The potential of the *Galleria mellonella* innate immune system is maximized by the co-presentation of diverse antimicrobial peptides. **Biol Chem**, v. 397, n. 9, p. 939-45, Sep 2016. ISSN 1437-4315. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27105487> >.

BONGOMIN, F. et al. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. **J Fungi (Basel)**, v. 3, n. 4, Oct 2017. ISSN 2309-608X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29371573> >.

BORGES-WALMSLEY, M. I. et al. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends in Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 80-87, 2002/02/01/ 2002. ISSN 0966-842X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X01022922> >.

BRUCKMANN, A. et al. Regulation of transcription by *Saccharomyces cerevisiae* 14-3-3 proteins. **Biochem J**, v. 382, n. Pt 3, p. 867-75, Sep 2004. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15142031> >.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin Microbiol Rev**, v. 6, n. 2, p. 89-117, Apr 1993. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8472249> >.

BULGER, R. E. Use of animals in experimental research: a scientist's perspective. **Anat Rec**, v. 219, n. 3, p. 215-20, Nov 1987. ISSN 0003-276X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3322107> >.

CAIXETA, C. A. et al. Estrogen Receptor- α Correlates with Higher Fungal Cell Number in Oral Paracoccidioidomycosis in Women. **Mycopathologia**, May 2018. ISSN 1573-0832. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29796757> >.

CAMACHO, E.; NIÑO-VEGA, G. A. Spp.: Virulence Factors and Immune-Evasion Strategies. **Mediators Inflamm**, v. 2017, p. 5313691, 2017. ISSN 1466-1861. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28553014> >.

CAO, X. et al. The immune signaling pathways of *Manduca sexta*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 62, p. 64-74, 04/07 2015. ISSN 0965-1748 1879-0240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4476939/> >.

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> >.

CARUSO, M. et al. Heat shock 70 gene is differentially expressed in *Histoplasma capsulatum* strains with different levels of thermotolerance and pathogenicity. **Mol Microbiol**, v. 1, n. 2, p. 151-8, Sep 1987. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2835579> >.

CATAÑO, J. C.; AGUIRRE, H. D. Disseminated paracoccidioidomycosis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 88, n. 3, p. 407-8, Mar 2013. ISSN 1476-1645. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23468353> >.

CAU, Y. et al. Molecular Dynamics Simulations and Structural Analysis of *Giardia duodenalis* 14-3-3 Protein-Protein Interactions. **J Chem Inf Model**, v. 55, n. 12, p. 2611-22, Dec 2015. ISSN 1549-960X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26551337> >.

CHÂTEAU, A.; SEIFERT, H. S. *Neisseria gonorrhoeae* survives within and modulates apoptosis and inflammatory cytokine production of human macrophages. **Cell Microbiol**, v. 18, n. 4, p. 546-60, Apr 2016. ISSN 1462-5822. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26426083> >.

COLEMAN, J. J. et al. Fusarium pathogenesis investigated using *Galleria mellonella* as a heterologous host. **Fungal Biol**, v. 115, n. 12, p. 1279-89, Dec 2011. ISSN 1878-6146. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22115447> >.

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

CORREDOR, G. G. et al. The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. **Medical Mycology**, v. 43, n. 3, p. 275-280, 2005/05/01 2005. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13693780412331271090> >.

COTTER, G.; DOYLE, S.; KAVANAGH, K. Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 27, n. 2, p. 163-9, Feb 2000. ISSN 0928-8244. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10640612> >.

COURTIADÉ, J. et al. A comprehensive characterization of the caspase gene family in insects from the order Lepidoptera. **BMC Genomics**, v. 12, p. 357-357, 07/08 ISSN 1471-2164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3141678/> >.

DA SILVA, J. D. F. et al. Advances and challenges in paracoccidioidomycosis serology caused by *Paracoccidioides* species complex: an update. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 84, n. 1, p. 87-94, JAN 2016 2016. ISSN 0732-8893;1879-0070.

_____. Influence of the *Paracoccidioides brasiliensis* 14-3-3 and gp43 proteins on the induction of apoptosis in A549 epithelial cells. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 476-484, JUN 2015 2015. ISSN 0074-0276;1678-8060.

DA SILVA, J. E. 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. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23638109> >.

DA SILVA, J. F. et al. Advances and challenges in paracoccidioidomycosis serology caused by *Paracoccidioides* species complex: an update. **Diagn Microbiol Infect Dis**, Jun 2015. ISSN 1879-0070. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26494541> >.

DA SILVA LACAZ, C. U. H. B. G. C. B. B. I. U. **Tratado de micologia médica Lacaz**. São Paulo: Sarvier, 2002.

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, S. P. et al. Differential expression of an hsp70 gene during transition from the mycelial to the infective yeast form of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mol Microbiol**, v. 31, n. 4, p. 1039-50, Feb 1999. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10096073> >.

DASHZEVEG, N.; YOSHIDA, K. Cell death decision by p53 via control of the mitochondrial membrane. **Cancer Lett**, v. 367, n. 2, p. 108-12, Oct 2015. ISSN 1872-7980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26231733> >.

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

DE CAMARGO, Z. P. Serology of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 289-302, 2008 Apr-May 2008. ISSN 0301-486X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18777635> >.

DE GROOT, P. W. et al. Adhesins in human fungal pathogens: glue with plenty of stick. **Eukaryot Cell**, v. 12, n. 4, p. 470-81, Apr 2013. ISSN 1535-9786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23397570> >.

DE LACORTE SINGULANI, J. et al. Evaluation of the efficacy of antifungal drugs against *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* in a *Galleria mellonella* model. **Int J Antimicrob Agents**, v. 48, n. 3, p. 292-7, Sep 2016. ISSN 1872-7913. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27444116> >.

DE OLIVEIRA, H. C. et al. *Paracoccidioides*-host Interaction: An Overview on Recent Advances in the Paracoccidioidomycosis. **Front Microbiol**, v. 6, p. 1319, 2015. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26635779> >.

_____. Importance of adhesins in virulence of *Paracoccidioides* spp. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, APR 10 2015 2015. ISSN 1664-302X.

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

DEL NEGRO, G. M. et al. The sensitivity, specificity and efficiency values of some serological tests used in the diagnosis of paracoccidioidomycosis. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 33, n. 4, p. 277-80, 1991 Jul-Aug 1991. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1844949> >.

DEL VECCHIO, A. et al. Induction of apoptosis in A549 pulmonary cells by two *Paracoccidioides brasiliensis* samples. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 5, p. 749-54, Aug 2009. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19820837> >.

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

DI SANTO, R. Natural products as antifungal agents against clinically relevant pathogens. **Nat Prod Rep**, v. 27, n. 7, p. 1084-98, Jul 2010. ISSN 1460-4752. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20485730> >.

DO VALLE, A. C. F. et al. Paracoccidioidomycosis after Highway Construction, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 23, n. 11, p. 1917-1919, 11 2017. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29048286> >.

DODERO, V. I.; QUIROLO, Z. B.; SEQUEIRA, M. A. Biomolecular studies by circular dichroism. **Front Biosci (Landmark Ed)**, v. 16, p. 61-73, Jan 2011. ISSN 1093-4715. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21196159> >.

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> >.

DURBIN, S. D.; FEHER, G. Protein crystallization. **Annu Rev Phys Chem**, v. 47, p. 171-204, 1996. ISSN 0066-426X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8983237> >.

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: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11825942> >.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol**, v. 35, n. 4, p. 495-516, Jun 2007. ISSN 0192-6233. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17562483> >.

EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica Section D**, v. 60, n. 12 Part 1, p. 2126-2132, 2004. ISSN 0907-4449. Disponível em: < <https://doi.org/10.1107/S0907444904019158> >.

ENOCH, D. A. et al. The Changing Epidemiology of Invasive Fungal Infections. **Methods Mol Biol**, v. 1508, p. 17-65, 2017. ISSN 1940-6029. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27837497> >.

EVANS, P. R.; MURSHUDOV, G. N. How good are my data and what is the resolution? **Acta Crystallographica Section D**, v. 69, n. 7, p. 1204-1214, 2013. ISSN 0907-4449. Disponível em: < <https://doi.org/10.1107/S0907444913000061> >.

FALCONE, M. et al. Identification and management of invasive mycoses in internal medicine: a road-map for physicians. **Intern Emerg Med**, May 2014. ISSN 1970-9366. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24871636> >.

FALLON, J.; KELLY, J.; KAVANAGH, K. *Galleria mellonella* as a model for fungal pathogenicity testing. **Methods Mol Biol**, v. 845, p. 469-85, 2012. ISSN 1940-6029. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22328396> >.

FALLON, J. P.; TROY, N.; KAVANAGH, K. Pre-exposure of *Galleria mellonella* larvae to different doses of *Aspergillus fumigatus* conidia causes differential activation of cellular and humoral immune

responses. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 413-21, 2011 Sep-Oct 2011. ISSN 2150-5608. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21921688> >.

FRANCO, M. et al. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Ráton: CR Press Inc., 1994.

FRUITWALA, S.; EL-NACCACHE, D. W.; CHANG, T. L. Multifaceted immune functions of human defensins and underlying mechanisms. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, 2018/03/13/2018. ISSN 1084-9521. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1084952117304159> >.

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> >.

FUCHS, B. B. et al. Role of filamentation in *Galleria mellonella* killing by *Candida albicans*. **Microbes Infect**, v. 12, n. 6, p. 488-96, Jun 2010. ISSN 1769-714X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20223293> >.

_____. Micafungin Elicits an Immunomodulatory Effect in *Galleria mellonella* and Mice. **Mycopathologia**, v. 181, n. 1-2, p. 17-25, Feb 2016. ISSN 1573-0832 (Electronic) 0301-486X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26384671> >.

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

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

GARCÍA-RODAS, R. et al. Cryptococcus neoformans capsular enlargement and cellular gigantism during *Galleria mellonella* infection. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e24485, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21915338> >.

GEGEMBAUER, G. et al. Serology of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 7, p. e2986, Jul 2014. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25032829> >.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clin Microbiol Rev**, v. 12, n. 4, p. 501-17, Oct 1999. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10515900> >.

GHISAIDOOBE, A. B.; CHUNG, S. J. Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: a focus on Förster resonance energy transfer techniques. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 12, p. 22518-38, Dec 2014. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25490136> >.

GIANNOULI, M. et al. Use of larvae of the wax moth *Galleria mellonella* as an in vivo model to study the virulence of *Helicobacter pylori*. **BMC Microbiology**, London, v. 14, p. 228, 2014. ISSN 1471-2180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4148543/> >.

GLAVIS-BLOOM, J.; MUHAMMED, M.; MYLONAKIS, E. Of model hosts and man: using *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* and *Galleria mellonella* as model hosts for infectious disease research. **Adv Exp Med Biol**, v. 710, p. 11-7, 2012. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22127881> >.

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

GONZALEZ, A.; RESTREPO, A.; CANO, L. E. Role of iron in the nitric oxide-mediated fungicidal mechanism of IFN-gamma-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 49, n. 1, p. 11-6, 2007 Jan-Feb 2007. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17384814> >.

GREEN, D. R.; LLAMBI, F. Cell Death Signaling. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 7, n. 12, 2015. ISSN 1943-0264. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26626938> >.

HARDWIDGE, P. R. et al. Modulation of Host Cytoskeleton Function by the Enteropathogenic *Escherichia coli* and *Citrobacter rodentium* Effector Protein EspG. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 5, p. 2586-2594, 2005. ISSN 0019-9567/1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1087329/> >.

HARWOOD, C. G.; RAO, R. P. Host pathogen relations: exploring animal models for fungal pathogens. **Pathogens**, v. 3, n. 3, p. 549-62, Jun 2014. ISSN 2076-0817. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25438011> >.

HAWKSWORTH, D. L.; LÜCKING, R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. **Microbiol Spectr**, v. 5, n. 4, Jul 2017. ISSN 2165-0497. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28752818> >.

HE, Y.; AMER, A. O. Microbial modulation of host apoptosis and pyroptosis. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 4, p. 83, 2014. ISSN 2235-2988. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24995165> >.

HILLYER, J. F. Insect immunology and hematopoiesis. **Developmental and comparative immunology**, v. 58, p. 102-118, 12/13 2016. ISSN 0145-305X 1879-0089. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4775421/> >.

HORN, F. et al. Systems biology of fungal infection. **Front Microbiol**, v. 3, p. 108, 2012. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22485108> >.

J., B. H. et al. The binding of 14-3-3 γ to membranes studied by intrinsic fluorescence spectroscopy. **FEBS Letters**, v. 585, n. 8, p. 1163-1168, 2011. Disponível em: < <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/j.febslet.2011.03.027> >.

JANKE, C. The tubulin code: Molecular components, readout mechanisms, and functions. **The Journal of Cell Biology**, v. 206, n. 4, p. 461, 2014. Disponível em: < <http://jcb.rupress.org/content/206/4/461.abstract> >.

JIA, B.; WU, Y.; ZHOU, Y. 14-3-3 and aggresome formation: implications in neurodegenerative diseases. In: (Ed.). **Prion**. United States, v.8, 2014. ISBN 1933-690X (Electronic) 1933-6896 (Linking).

JORJÃO, A. L. et al. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* on the response of *Galleria mellonella* against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* infections. **Archives of Microbiology**, v. 200, n. 3, p. 383-389, April 01 2018. ISSN 1432-072X. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1441-7> >.

KAISER, V.; DIAMOND, G. Expression of mammalian defensin genes. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 68, n. 6, p. 779-784, 2000/12/01 2000. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <https://doi.org/10.1189/jlb.68.6.779> >. Acesso em: 2018/07/09.

KARKOWSKA-KULETA, J.; KOZIK, A. Moonlighting proteins as virulence factors of pathogenic fungi, parasitic protozoa and multicellular parasites. **Mol Oral Microbiol**, v. 29, n. 6, p. 270-83, Dec 2014. ISSN 2041-1014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25131723> >.

KELLY, M. N. et al. Bmh1p (14-3-3) mediates pathways associated with virulence in *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 155, n. Pt 5, p. 1536-46, May 2009. ISSN 1350-0872. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19372164> >.

KLUG, L.; DAUM, G. Yeast lipid metabolism at a glance. **FEMS Yeast Res**, v. 14, n. 3, p. 369-88, May 2014. ISSN 1567-1364. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24520995> >.

KRCMERY, V. C. Antifungal chemotherapeutics. **Med Princ Pract**, v. 14, n. 3, p. 125-35, 2005 May-Jun 2005. ISSN 1011-7571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15863983> >.

KREGEL, K. C. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. **J Appl Physiol (1985)**, v. 92, n. 5, p. 2177-86, May 2002. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11960972> >.

KRISHNAN, N.; HYRSL, P.; SIMEK, V. Nitric oxide production by hemocytes of larva and pharate prepupa of *Galleria mellonella* in response to bacterial lipopolysaccharide: Cytoprotective or cytotoxic? **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 142, n. 1-2, p. 103-10, 2006 Jan-Feb 2006. ISSN 1532-0456. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16316786> >.

KUMAR, R. An account of fungal 14-3-3 proteins. **Eur J Cell Biol**, v. 96, n. 2, p. 206-217, Mar 2017. ISSN 1618-1298. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28258766> >.

LACAZ, C. D. S. et al. *Paracoccidioides brasiliensis*: A MYCOLOGIC AND IMMUNOCHEMICAL STUDY OF TWO STRAINS. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41, p. 79-86, 1999. ISSN 0036-4665. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46651999000200004&nrm=iso >.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680, 08/15/online 1970. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/227680a0> >.

LAUGHTON, A. M.; SIVA-JOTHY, M. T. A standardised protocol for measuring phenoloxidase and prophenoloxidase in the honey bee, *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 42, n. 2, p. 140-149, March 01 2011. ISSN 1297-9678. Disponível em: < <https://doi.org/10.1051/apido/2010046> >.

LAVINE, M. D.; STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 32, n. 10, p. 1295-309, Oct 2002. ISSN 0965-1748. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12225920> >.

LEITÃO, N. P. et al. *Paracoccidioides lutzii* Plp43 is an active glucanase with partial antigenic identity with *P. brasiliensis* gp43. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 8, p. e3111, Aug 2014. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25166744> >.

LENZI et al. **Two patterns of extracellular matrix expression in experimental paracoccidioidomycosis**. *Medical Mycology*, p.115-9. 2000

LI, J. et al. The 14-3-3 gene function of *Cryptococcus neoformans* is required for its growth and virulence. **J Microbiol Biotechnol**, Oct 2015. ISSN 1738-8872. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26437944> >.

LIU, C.-C. et al. 14-3-3 σ induces heat shock protein 70 expression in hepatocellular carcinoma. **BMC Cancer**, v. 14, p. 425-425, 2014. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4061114/> >.

LOOSE, D. S. et al. Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 80, n. 24, p. 7659-63, Dec 1983. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6584880> >.

LOTH, E. A. et al. Occurrence of 102 cases of paracoccidioidomycosis in 18 months in the Itaipu Lake region, Western Paraná. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, n. 5, p. 636-7, Oct 2011. ISSN 1678-9849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22031083> >.

LUSTY, C. A gentle vapor-diffusion technique for cross-linking of protein crystals for cryocrystallography. **Journal of Applied Crystallography**, v. 32, n. 1, p. 106-112, 1999. ISSN 0021-8898. Disponível em: < <https://doi.org/10.1107/S002188989801053X> >.

MAK, P.; ZDYBICKA-BARABAS, A.; CYTRYŃSKA, M. A different repertoire of *Galleria mellonella* antimicrobial peptides in larvae challenged with bacteria and fungi. **Dev Comp Immunol**, v. 34, n. 10,

p. 1129-36, Oct 2010. ISSN 1879-0089. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20558200> >.

MANGIATERRA, M. L. et al. [*Paracoccidioides brasiliensis* infection in a subtropical region with important environmental changes]. **Bull Soc Pathol Exot**, v. 92, n. 3, p. 173-6, Jul 1999. ISSN 0037-9085. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10472444> >.

MARCOS, C. M. et al. The multifaceted roles of metabolic enzymes in the *Paracoccidioides* species complex. **Front Microbiol**, v. 5, p. 719, 2014. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25566229> >.

_____. Identification and characterisation of elongation factor Tu, a novel protein involved in *Paracoccidioides brasiliensis*-host interaction. **FEMS Yeast Res**, v. 16, n. 7, Nov 2016. ISSN 1567-1364. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27634774> >.

_____. Anti-Immune Strategies of Pathogenic Fungi. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 6, p. 142, 2016. ISSN 2235-2988. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27896220> >.

_____. Decreased expression of 14-3-3 in *Paracoccidioides brasiliensis* confirms its involvement in fungal pathogenesis. **Virulence**, v. 7, n. 2, p. 72-84, 2016. ISSN 2150-5608. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26646480> >.

MARQUES, S. A. Paracoccidioidomicose: centenário do primeiro relato de caso. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, p. 271-273, 2008. ISSN 0365-0596. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962008000300014&nrm=iso >.

_____. **Paracoccidioidomycosis: epidemiological, clinical, diagnostic and treatment up-dating.** *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 88(5): 700-11 p. 2013.

MARTINEZ, R. New Trends in Paracoccidioidomycosis Epidemiology. **J Fungi (Basel)**, v. 3, n. 1, Jan 2017. ISSN 2309-608X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29371520> >.

MATOS, W. B. et al. Paracoccidioidomycosis in the state of Maranhão, Brazil: geographical and clinical aspects. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 45, n. 3, p. 385-9, Jun 2012. ISSN 1678-9849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22760141> >.

MATUTE, D. R. et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol Biol Evol**, v. 23, n. 1, p. 65-73, Jan 2006. ISSN 0737-4038. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16151188> >.

MCCOY, A. J. et al. Phaser crystallographic software. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, n. 4, p. 658-674, 2007. ISSN 0021-8898. Disponível em: < <https://doi.org/10.1107/S0021889807021206> >.

MCEWEN, J. G. et al. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **J Med Vet Mycol**, v. 25, n. 3, p. 165-75, Jun 1987. ISSN 0268-1218. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3612432> >.

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> >.

_____. Detection of the 43,000-molecular-weight glycoprotein in sera of patients with paracoccidioidomycosis. **J Clin Microbiol**, v. 27, n. 12, p. 2842-5, Dec 1989. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2592544> >.

_____. 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> >.

MENG, M. et al. Evaluation of protective immune responses induced by DNA vaccines encoding *Toxoplasma gondii* surface antigen 1 (SAG1) and 14-3-3 protein in BALB/c mice. **Parasit Vectors**, v. 5, p. 273, 2012. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23181694> >.

MIZERSKA-DUDKA, M.; ANDREJKO, M. *Galleria mellonella* hemocytes destruction after infection with *Pseudomonas aeruginosa*. **J Basic Microbiol**, v. 54, n. 3, p. 232-46, Mar 2014. ISSN 1521-4028. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23456635> >.

MORETO, T. C. et al. Accuracy of routine diagnostic tests used in paracoccidioidomycosis patients at a university hospital. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 105, n. 8, p. 473-8, Aug 2011. ISSN 1878-3503. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21684567> >.

MORI, M.; VIGNAROLI, G.; BOTTA, M. Small molecules modulation of 14-3-3 protein-protein interactions. **Drug Discov Today Technol**, v. 10, n. 4, p. e541-7, Dec 2013. ISSN 1740-6749. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24451646> >.

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

NAPPI, A. J.; OTTAVIANI, E. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. **Bioessays**, v. 22, n. 5, p. 469-80, May 2000. ISSN 0265-9247. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10797487> >.

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

OBSIL, T.; OBSILOVA, V. Structural basis of 14-3-3 protein functions. **Semin Cell Dev Biol**, v. 22, n. 7, p. 663-72, Sep 2011. ISSN 1096-3634. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21920446> >.

ORZALLI, M. H.; KAGAN, J. C. Apoptosis and Necroptosis as Host Defense Strategies to Prevent Viral Infection. **Trends Cell Biol**, v. 27, n. 11, p. 800-809, 11 2017. ISSN 1879-3088. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28642032> >.

OTTMANN, C. Small-molecule modulators of 14-3-3 protein-protein interactions. **Bioorg Med Chem**, v. 21, n. 14, p. 4058-62, Jul 2013. ISSN 1464-3391. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23266179> >.

PARENTE, A. F. et al. The response of *Paracoccidioides* spp. to nitrosative stress. **Microbes Infect**, v. 17, n. 8, p. 575-85, Aug 2015. ISSN 1769-714X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25841799> >.

PARISI, K. et al. The evolution, function and mechanisms of action for plant defensins. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, 2018/02/23/ 2018. ISSN 1084-9521. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S108495211730469X> >.

PARUA, P. K.; DOMBEK, K. M.; YOUNG, E. T. Yeast 14-3-3 protein functions as a comodulator of transcription by inhibiting coactivator functions. **J Biol Chem**, v. 289, n. 51, p. 35542-60, Dec 2014. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25355315> >.

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> >.

PERSKVIST, N. et al. Mycobacterium tuberculosis promotes apoptosis in human neutrophils by activating caspase-3 and altering expression of Bax/Bcl-xL via an oxygen-dependent pathway. **J Immunol**, v. 168, n. 12, p. 6358-65, Jun 2002. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12055253> >.

POLLARD, T. D.; GOLDMAN, R. D. Overview of the Cytoskeleton from an Evolutionary Perspective. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 10, n. 7, Jul 2018. ISSN 1943-0264. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29967009> >.

POZUELO RUBIO, M. et al. 14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking. **Biochemical Journal**, v. 379, n. Pt 2, p. 395-408, 2004. ISSN 0264-6021 1470-8728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1224091/> >.

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> >.

PUSEY, M. L. et al. Life in the fast lane for protein crystallization and X-ray crystallography. **Prog Biophys Mol Biol**, v. 88, n. 3, p. 359-86, Jul 2005. ISSN 0079-6107. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15652250> >.

QUEIROZ-TELLES, F. et al. Neglected endemic mycoses. **Lancet Infect Dis**, v. 17, n. 11, p. e367-e377, Nov 2017. ISSN 1474-4457. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28774696> >.

RADONS, J. The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? **Cell Stress & Chaperones**, Dordrecht, v. 21, n. 3, p. 379-404, 2016. ISSN 1355-8145/1466-1268. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4837186/> >.

RAJENDRAN, R. et al. Acetylcholine Protects against *Candida albicans* Infection by Inhibiting Biofilm Formation and Promoting Hemocyte Function in a *Galleria mellonella* Infection Model. **Eukaryot Cell**, v. 14, n. 8, p. 834-44, Aug 2015. ISSN 1535-9786 (Electronic) 1535-9786 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26092919> >.

RAMACHANDRAN, R. A.; LUPFER, C.; ZAKI, H. The Inflammasome: Regulation of Nitric Oxide and Antimicrobial Host Defence. **Adv Microb Physiol**, v. 72, p. 65-115, 2018. ISSN 2162-5468. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29778217> >.

RESTREPO, A. et al. Pulmonary paracoccidioidomycosis. **Semin Respir Crit Care Med**, v. 29, n. 2, p. 182-97, Apr 2008. ISSN 1069-3424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18366000> >.

RHODES, G. **Crystallography Made Crystal Clear: A Guide for Users of Macromolecular Models**. Academic Press, 2006.

RHODES, G. U. H. B. G. C. B. B. I. W. **Crystallography Made Crystal Clear: A Guide for Users of Macromolecular Models**. Academic, 2000. muito prenomes

RITTINGER, K. et al. Structural analysis of 14-3-3 phosphopeptide complexes identifies a dual role for the nuclear export signal of 14-3-3 in ligand binding. **Mol Cell**, v. 4, n. 2, p. 153-66, Aug 1999. ISSN 1097-2765. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10488331> >.

S., L. Y. et al. Purification, cDNA cloning and expression of an insect defensin from the great wax moth, *Galleria mellonella*. **Insect Molecular Biology**, v. 13, n. 1, p. 65-72, 2004. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2583.2004.00462.x> >.

SATO, J.-I. et al. The 14-3-3 Protein Forms a Molecular Complex with Heat Shock Protein Hsp60 and Cellular Prion Protein. **Journal of Neuro pathology & Experimental Neurology**, v. 64, n. 10, p. 858-868, 2005. ISSN 0022-3069. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/01.jnen.0000182979.56612.08> >.

SCHRÖDINGER, L. **The PyMOL Molecular Graphics System**. Versão 2.0 Schrödinger, LLC.

SCORZONI, L. et al. Comparison of virulence between *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* using *Galleria mellonella* as a host model. **Virulence**, v. 6, n. 8, p. 766-76, 2015. ISSN 2150-5608. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26552324> >.

_____. Comparison of virulence between *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* using *Galleria mellonella* as a host model. **Virulence**, p. 0, Nov 2015. ISSN 2150-5608. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26552324> >.

SEMENOVA, A. D. et al. Quantitative determination of nitric oxide production in haemocytes: nitrite reduction activity as a potential pathway of NO formation in haemolymph of *Galleria mellonella* larvae. **Nitric Oxide**, v. 37, p. 46-52, Feb 2014. ISSN 1089-8611. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24406682> >.

SHANKAR, J. et al. Influence of 17 β -estradiol on gene expression of *Paracoccidioides* during mycelia-to-yeast transition. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e28402, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22194832> >.

SHEEHAN, G.; KAVANAGH, K. Analysis of the early cellular and humoral responses of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 163-172, 01 2018. ISSN 2150-5608. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28872999> >.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 50, n. 5, p. 715-740, 2017 Sep-Oct 2017. ISSN 1678-9849. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28746570> >.

SILES-LUCAS, M.; MERLI, M.; GOTTSTEIN, B. 14-3-3 proteins in *Echinococcus*: their role and potential as protective antigens. **Exp Parasitol**, v. 119, n. 4, p. 516-23, Aug 2008. ISSN 1090-2449. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18316081> >.

SILES-LUCAS, M. et al. The *Echinococcus multilocularis* 14-3-3 protein protects mice against primary but not secondary alveolar echinococcosis. **Vaccine**, v. 21, n. 5-6, p. 431-9, Jan 2003. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12531641> >.

_____. The *Schistosoma bovis* Sb14-3-3zeta recombinant protein cross-protects against *Schistosoma mansoni* in BALB/c mice. **Vaccine**, v. 25, n. 41, p. 7217-23, Oct 2007. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17707955> >.

SILES-LUCAS, M. E. M.; GOTTSTEIN, B. The 14-3-3 protein: a key molecule in parasites as in other organisms. **Trends Parasitol**, v. 19, n. 12, p. 575-81, Dec 2003. ISSN 1471-4922. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14642768> >.

SILHAN, J. et al. 14-3-3 protein C-terminal stretch occupies ligand binding groove and is displaced by phosphopeptide binding. **J Biol Chem**, v. 279, n. 47, p. 49113-9, Nov 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15347690> >.

SILVA, J. D. F. **Clonagem e caracterização da proteína 14-3-3 de *Paracoccidioides brasiliensis* durante sua interação com células epiteliais.** 2011. (Phd). Faculdade de Ciências Farmacêuticas-Unesp -Araraquara

SILVA, J. E. 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. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26038961> >.

SLEPNEVA, I. A. et al. EPR detection of reactive oxygen species in hemolymph of *Galleria mellonella* and *Dendrolimus superans sibiricus* (Lepidoptera) larvae. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 264, n. 1, p. 212-5, Oct 1999. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10527867> >.

_____. Influence of fungal infection on the DOPA-semiquinone and DOPA-quinone production in haemolymph of *Galleriamellonella* larvae. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 300, n. 1, p. 188-91, Jan 2003. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12480541> >.

SLUCHANKO, N. N.; GUSEV, N. B. 14-3-3 proteins and regulation of cytoskeleton. **Biochemistry (Mosc)**, v. 75, n. 13, p. 1528-46, Dec 2010. ISSN 1608-3040. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21417993> >.

SLUCHANKO, N. N. et al. Chimeric 14-3-3 proteins for unraveling interactions with intrinsically disordered partners. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 12014, Sep 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28931924> >.

SOUZA, A. C. et al. *Candida parapsilosis* resistance to fluconazole: molecular mechanisms and in vivo impact in infected *Galleria mellonella* larvae. **Antimicrob Agents Chemother**, Aug 2015. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26259795> >.

SRIDHARAN, H.; UPTON, J. W. Programmed necrosis in microbial pathogenesis. **Trends Microbiol**, v. 22, n. 4, p. 199-207, Apr 2014. ISSN 1878-4380. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24565922> >.

STEIN, N. CHAINSAW: a program for mutating pdb files used as templates in molecular replacement. **Journal of Applied Crystallography**, v. 41, n. 3, p. 641-643, 2008. ISSN 0021-8898. Disponível em: < <https://doi.org/10.1107/S0021889808006985> >.

STEINACKER, P.; AITKEN, A.; OTTO, M. 14-3-3 proteins in neurodegeneration. **Semin Cell Dev Biol**, v. 22, n. 7, p. 696-704, Sep 2011. ISSN 1096-3634. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21920445> >.

STOLP, B.; FACKLER, O. T. How HIV Takes Advantage of the Cytoskeleton in Entry and Replication. **Viruses**, v. 3, n. 4, p. 293-311, 2011. ISSN 1999-4915. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3185699/> >.

STOP neglecting fungi. **Nature Microbiology**, v. 2, p. 17120, 07/25/online 2017. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.120> >.

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> >.

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

THEODORO, R. C. et al. Dimorphism, thermal tolerance, virulence and heat shock protein 70 transcription in different isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathologia**, v. 165, n. 6, p. 355-65, Jun 2008. ISSN 0301-486X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18320348> >.

THEVISSSEN, K. et al. Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. **J Biol Chem**, v. 279, n. 6, p. 3900-5, Feb 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14604982> >.

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

TIAN, A. L. et al. A recombinant *Fasciola gigantica* 14-3-3 epsilon protein (rFg14-3-3e) modulates various functions of goat peripheral blood mononuclear cells. **Parasit Vectors**, v. 11, n. 1, p. 152, 03 2018. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29510740> >.

TOMALKA, J. et al. Beta-defensin 1 plays a role in acute mucosal defense to *Candida albicans*. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 194, n. 4, p. 1788-1795, 2015. ISSN 0022-1767 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4323878/> >.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979. ISSN 0027-8424 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC411572/> >.

TREVIJANO-CONTADOR, N.; ZARAGOZA, O. Expanding the use of alternative models to investigate novel aspects of immunity to microbial pathogens. **Virulence**, v. 5, n. 4, p. 454-6, May 2014. ISSN 2150-5608. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24717215> >.

TSAI, C. J.; LOH, J. M.; PROFT, T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 214-29, Apr 2016. ISSN 2150-5608. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26730990> >.

TURISSINI, D. A. et al. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. **Fungal Genet Biol**, v. 106, p. 9-25, 09 2017. ISSN 1096-0937. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28602831> >.

VAGIN, A. A. et al. REFMAC5 dictionary: organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use. **Acta Crystallographica Section D**, v. 60, n. 12 Part 1, p. 2184-2195, 2004. ISSN 0907-4449. Disponível em: < <https://doi.org/10.1107/S0907444904023510> >.

VALLEJO, M. C. et al. Vesicle and vesicle-free extracellular proteome of *Paracoccidioides* brasiliensis: comparative analysis with other pathogenic fungi. **J Proteome Res**, v. 11, n. 3, p. 1676-85, Mar 2012. ISSN 1535-3907. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22288420> >.

VAN HEUSDEN, G. P. et al. The 14-3-3 proteins encoded by the BMH1 and BMH2 genes are essential in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and can be replaced by a plant homologue. **Eur J Biochem**, v. 229, n. 1, p. 45-53, Apr 1995. ISSN 0014-2956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7744048> >.

VAN HEUSDEN, G. P.; STEENSMA, H. Y. Yeast 14-3-3 proteins. **Yeast**, v. 23, n. 3, p. 159-71, Feb 2006. ISSN 0749-503X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16498703> >.

VAN HEUSDEN, G. P. et al. Characterization of the yeast BMH1 gene encoding a putative protein homologous to mammalian protein kinase II activators and protein kinase C inhibitors. **FEBS Lett**, v. 302, n. 2, p. 145-50, May 1992. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1378790> >.

VEISOVA, D. et al. The C-terminal segment of yeast BMH proteins exhibits different structure compared to other 14-3-3 protein isoforms. **Biochemistry**, v. 49, n. 18, p. 3853-61, May 2010. ISSN 1520-4995. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20384366> >.

VERÍCIMO, 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. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17045508> >.

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> >.

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

WEIDNER, J. M. et al. Migratory activation of parasitized dendritic cells by the protozoan *Toxoplasma gondii* 14-3-3 protein. **Cell Microbiol**, v. 18, n. 11, p. 1537-1550, Nov 2016. ISSN 1462-5822. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27018989> >.

WINN, M. D. et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. **Acta Crystallographica Section D**, v. 67, n. 4, p. 235-242, 2011. ISSN 0907-4449. Disponível em: < <https://doi.org/10.1107/S0907444910045749> >.

WOJDA, I. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. **Insect Sci**, v. 24, n. 3, p. 342-357, Jun 2017. ISSN 1744-7917. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26847724> >.

WOJDA, I.; JAKUBOWICZ, T. Humoral immune response upon mild heat-shock conditions in *Galleria mellonella* larvae. **J Insect Physiol**, v. 53, n. 11, p. 1134-44, Nov 2007. ISSN 0022-1910. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17631308> >.

WOJDA, I.; KOWALSKI, P.; JAKUBOWICZ, T. Humoral immune response of *Galleria mellonella* larvae after infection by *Beauveria bassiana* under optimal and heat-shock conditions. **J Insect Physiol**, v. 55, n. 6, p. 525-31, Jun 2009. ISSN 1879-1611. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19232408> >.

WU, G. et al. Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Galleria mellonella* larva: Cell types and their role in the innate immunity. **Tissue Cell**, v. 48, n. 4, p. 297-304, Aug 2016. ISSN 1532-3072. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27378036> >.

YAFFE, M. B. et al. The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. **Cell**, v. 91, n. 7, p. 961-71, Dec 1997. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9428519> >.

YANG, W. et al. Fungal invasion of epithelial cells. **Microbiological Research**, v. 169, n. 11, p. 803-810, 2014/11/01/ 2014. ISSN 0944-5013. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501314000299> >.

YANG, X. et al. Structural basis for protein-protein interactions in the 14-3-3 protein family. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 46, p. 17237-42, Nov 2006. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17085597> >.

ZAHRÁDKA, J.; VAN HEUSDEN, G. P.; SYCHROVÁ, H. Yeast 14-3-3 proteins participate in the regulation of cell cation homeostasis via interaction with Nha1 alkali-metal-cation/proton antiporter. **Biochim Biophys Acta**, v. 1820, n. 7, p. 849-58, Jul 2012. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22484491> >.

ZHAO, J. et al. 14-3-3 proteins as potential therapeutic targets. **Semin Cell Dev Biol**, v. 22, n. 7, p. 705-12, Sep 2011. ISSN 1096-3634. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21983031> >.

ZHOU, Z. et al. Identification of ABCC2 as a binding protein of Cry1Ac on brush border membrane vesicles from *Helicoverpa armigera* by an improved pull-down assay. **MicrobiologyOpen**, Hoboken, v. 5, n. 4, p. 659-669, 2016. ISSN 2045-8827. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4985599/> >.