RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 10/02/2018.

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Biocências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

JUNYA DE LACORTE SINGULANI

Pesquisa de novas terapias e de biomarcadores na paracoccidioidomicose: estudo da atividade antifúngica e toxicidade de galatos de alquila em modelos alternativos e camundongos e identificação de microRNAs circulantes

Araraquara

2017

JUNYA DE LACORTE SINGULANI

Pesquisa de novas terapias e de biomarcadores na paracoccidioidomicose: estudo da atividade antifúngica e toxicidade de galatos de alquila em modelos alternativos e camundongos e identificação de microRNAs circulantes

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini
Coorientador: Prof. Dr. Francisco Javier Enguita

Araraquara
2017

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

S617p

Singulani, Junya de Lacorte
Pesquisa de novas terapias e de biomarcadores na paracoccidioidomicose: estudo da atividade antifúngica e toxicidade de galatos de alquila em modelos alternativos e camundongos e identificação de microRNAs circulantes / Junya de Lacorte Singulani. – Araraquara, 2016.
151 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas á Farmácia.

Orientadora: Maria José Soares Mendes Giannini.
Coorientador: Francisco Javier Enguita.

1. *Paracoccidioides* sp. 2. Modelos *In vivo*. 3. MicroRNAs. 4. Toxicidade. 5. Eficácia. 6. Biomarcadores. I. Giannini, Maria José Soares Mendes, orient. II. Enguita, Francisco Javier, coorient. III. Título.

CAPES: 40500005

JUNYA DE LACORTE SINGULANI

Pesquisa de novas terapias e de biomarcadores na paracoccidioidomicose: estudo da atividade antifúngica e toxicidade de galatos de alquila em modelos alternativos e camundongos e identificação de microRNAs circulantes

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

Araraquara, 10 de fevereiro de 2017.

BANCA EXAMINADORA

MARIA JOSE SOARES MENDES GIANNINI

DANIEL DE ASSIS SANTOS

NÁDIA REZENDE BARBOSA RAPOSO

CLAUDIA VIANA MAURER MORELLI

VALERIA VALENTE

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo amor incondicional e graça, e pelas pessoas e oportunidades colocadas em meu caminho.

Aos meus pais Jesus e Antônia (*in memorian*) pelo amor, por terem sido grandes exemplos de humildade e honestidade, e pelos valores deixados para que eu pudesse prosseguir.

À minha família, em especial aos meus irmãos, Cláudia, Emiliana, Roberto e Rafaela, sobrinhos e cunhados pelas orações e torcida para a realização dos meus objetivos e por sempre poder contar com vocês.

Ao meu esposo Rafael pelo companheirismo, paciência e ajuda nas dúvidas da vida e em química.

À profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini pela oportunidade, orientação, ensinamentos e por ser um exemplo de profissional.

À Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida pela colaboração, apoio e disponibilidade em me ajudar.

Ao Prof. Dr. Francisco Javier Enguita e à Dra. Marina Célia Costa por me receberem em seu laboratório na Universidade de Lisboa e por toda ajuda nos experimentos com os microRNAs.

Ao Prof. Luís Octávio Regasini pela síntese e fornecimento dos compostos.

Ao Prof. Marlus Chorilli e a Dra. Patrícia Bento pelo preparo do sistema lipídico nanoestruturado e incorporação dos compostos.

Aos amigos do laboratório de Micologia Clínica e Núcleo de Proteômica: Ana (Espanha), Bruna, Carol (MG), Carol (Panta), Carol (Tatoo), Cláudia, Fernanda Gullo, Fernanda Sangalli, Haroldo, Janaina, Jaqueline, Julhiany, Kaila, Liliana, Luana, Mariana, Mônica, Natália, Nayla, Patrícia (Laranja), Paulo, Priscila, Regina, Rodrigo, Rosana, Rosângela, Suélen, Tatiane e Wanessa. Agradeço-lhes muito por cada palavra, atenção, incentivo, pela cooperação nas dúvidas e nos experimentos, pelas caronas e confraternizações.

Em especial agradeço à Liliana pela amizade e disponibilidade em me orientar e ajudar nos experimentos com os modelos invertebrados. Ao Paulo pelos conselhos e

ajuda com os cuidados e experimentos com zebrafish. À Cláudia pelas conversas, por ser sempre prestativa e pelo preparo das células. À Julhiany pelos direcionamentos, principalmente com os microRNAs. À Rosângela pelos momentos de descontração e colaboração na infecção dos camundongos e na obtenção de soros. Às “Feinhas” Carol (MG) e Luana pela amizade em diferentes circunstâncias e motivação. Às amigas do grupo zebrafish Ana (Espanha), Fernanda Gullo, Mariana e Natália por toda cumplicidade e cooperação. À Rosana que me deu a oportunidade da minha primeira orientação, mas que com enorme gentileza, me ensinou muito também. À Mônica e Priscila pelas conversas, risadas e por sempre me acolherem em sua casa.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP) pelos serviços prestados.

À banca representada pelo Prof. Dr. Daniel de Assis Santos (UFMG), Profa. Dra. Nádia Rezende Barbosa Raposo (UFJF), Profa. Dra. Cláudia Vianna Maurer Morelli (UNICAMP) e Prof. Dra. Valeria Velente (UNESP) pela atenção dispensada na leitura deste trabalho e contribuições.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e, posteriormente, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - processo nº 2014/10446-9) pela bolsa de doutorado no país concedida.

À CAPES/FCT (processo nº 345/13) pela bolsa de doutorado sanduíche concedida.

A todos aqueles que, embora não nomeados, me brindaram com seus inestimáveis apoios em distintos momentos e independente de distância física, o meu reconhecido e carinhoso muito obrigada!

RESUMO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada por fungos do gênero *Paracoccidioides* e endêmica na América Latina. Três aspectos são de grande importância nessa doença: o desenvolvimento de antifúngicos e modelos alternativos para estudo dos mesmos e a busca de biomarcadores para o diagnóstico. O número de antifúngicos disponíveis é restrito, e problemas como efeitos adversos, interações medicamentosas e a ocorrência de isolados fúngicos resistentes são descritos. Neste contexto, a busca por novos compostos tem aumentado. Adicionalmente, modelos animais alternativos como *Caenorhabditis elegans,* zebrafish (*Danio rerio*) e *Galleria mellonella* são utilizados para o estudo de novos fármacos de forma simples e em grande escala. Neste trabalho, utilizou-se desses modelos para avaliação da eficácia antifúngica e toxicidade do ácido gálico e seus derivados ésteres de alquila (galatos). O composto com melhor atividade nesses modelos foi testado em camundongos. O galato de dodecila apresentou melhor eficácia e menor toxicidade no modelo *C. elegans – C. albicans* e menor efeito tóxico em embriões de zebrafish. Entretanto, em *G. mellonella* e camundongos infectados com *Paracoccidioides*, o composto não apresentou eficácia antifúngica, o que pode ser decorrente de sua baixa biodisponibilidade. Para resolver tal problema, os galatos foram associados a um sistema lipídico nanoestruturado. Tal associação foi benéfica, resultando em menor toxicidade em fibroblastos pulmonares e em zebrafish, bem como em maior eficácia em modelo murino. Outro aspecto deste estudo diz respeito à pesquisa de microRNAs para PCM. MicroRNAs são pequenos RNAs não-codificantes que desempenham funções em processos biológicos e doenças. Assim, com auxílio da qPCR-RT, oito microRNAs mostraram-se diferencialmente expressos no soro de pacientes com PCM crônica. Já em células pulmonares, distintos microRNAs foram observados de acordo com a espécie filogenética de *Paracoccidioides* sp. que as infectou. Os microRNAs encontrados parecem estar relacionados a processos de adesão, apoptose e resposta imune à infecção e podem servir como biomarcadores e ferramentas terapêuticas da doença.

Palavras-chave: *Paracoccidioides* sp. Modelos *In vivo*. Eficácia. Toxicidade. MicroRNAs.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by the fungi of the genus *Paracoccidioides*, which is endemic in Latin America. Three aspects are of great importance in this disease: the development of new antifungals and the use of alternative models for their study and also, the search of biomarkers for diagnosis. The number of antifungal agents available is restricted, and problems such as adverse effects, drug interactions and the development of resistance are related to them. In this context, the search for new compounds has increased. In addition, alternative animal models such as *Caenorhabditis elegans*, zebrafish (*Danio rerio*) and *Galleria mellonella* have been used for the study of new drugs in a simple and large scale manner. In this work, these models were used to evaluate the antifungal efficacy and toxicity of gallic acid and its alkyl esters derivatives (gallates). The compound with the best activity in these models was tested in mice. Dodecyl gallate presented better efficacy and lower toxicity in the *C. elegans* - *C. albicans* model and lower toxic effect in zebrafish embryos. However, in *G. mellonella* and in mice infected with *Paracoccidioides* sp., the compound showed no antifungal efficacy, which may be explained due to its low bioavailability. To resolve such a problem, gallates were associated with a nanostructured lipid system. Such association was beneficial, resulting in lower toxicity in lung fibroblasts and zebrafish, as well as in greater efficacy in the murine model. Another aspect of this study concerns the investigation of microRNAs for PCM. MicroRNAs are small non-coding RNAs that perform functions in biological processes and diseases. Thus, with the aid of RT-qPCR, eight microRNAs were differentially expressed in the serum of patients with chronic PCM. In the lung cells, distinct microRNAs were observed according to a phylogenetic species of *Paracoccidioides* sp. that infected them. The microRNAs found in appear to be related to the processes of adhesion, apoptosis and immune response to the infection and can serve as biomarkers and therapeutic tools of the disease.

Keywords: *Paracoccidioides* sp. *In vivo* models. Efficacy. Toxicity. microRNAs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidência da paracoccidioidomicose nas América do Sul e Central..... **23**

Figura 2. Imagens representativas dos animais alternativos e número de publicações entre os anos de 1994 e 2014 na base de dados Pubmed com as palavras chave *Caenorhabditis elegans* (A)*, Galleria mellonella* (B) e zebrafish (C)..... **32**

Figura 3. Curva de sobrevivência (A) e curva concentração-resposta (B) do *C. elegans* infectado com *C. albicans* (Ca) tratado com anfotericina B (AMB) em concentrações variando de 0,1 a 5 µg/mL..... **57**

Figura 4. Estrutura química do ácido gálico e seus derivados ésteres de alquila..... **58**

Figura 5. Curva de sobrevivência e curva concentração-resposta do *C. elegans* infectado com *C. albicans* (Ca) tratado com ácido gálico (GAL) e galatos de hexila (HEX), octila (OCT) e dodecila (DOD). **61**

Figura 6. Larvas de *C. elegans* viáveis e mortas (L4) nas imagens de campo claro e larvas mortas marcadas com SYTOX® Green nas imagens de fluorescência. Larvas infectadas e não tratadas (A e D); larvas infectadas e tratadas com 5 µg/mL de anfotericina B (B e E) e larvas infectadas e tratadas com 30 µg/mL do galato de dodecila (C e F)..... **62**

Figura 7. Curva de sobrevivência e curva concentração-resposta 48 hpf de embriões de zebrafish tratado com ácido gálico (GAL) e galatos de hexila (HEX), octila (OCT) e dodecila (DOD)..... **65**

Figura 8. Imagens representativas do desenvolvimento embriônico de zebrafish às 5 (A), 24 (B) e 48 hpf (C). Exemplo de má formação (coagulação de óvulo fertilizado) causada pela exposição a 15 µg/mL do galato de octila (D)..... **67**

Figura 9. Curva de sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com *P. brasiliensis* (Pb) e *P. lutzii* (Pl) tratadas com diferentes doses de anfotericina B (AMB) e itraconazol (ITRA)..... **70**

Figura 10. Carga fúngica de larvas de *G. mellonella* infectadas com *P. brasiliensis* (Pb) e *P. lutzii* (Pl) tratadas com 2 mg/Kg de anfotericina B (AMB) e 44 mg/Kg de itraconazol (ITRA)..... **73**

Figura 11. Avaliação histopatológica de *G. mellonella* após 48 h (40x). (A) Larva não infectada; (B) Larva infectada com *P. brasiliensis* e tratada com (C) anfotericina B 2 mg/Kg e (D) itraconazol 44 mg/Kg; (E) Larva infectada com *P. lutzii* e tratada com (F) anfotericina B 2 mg/Kg e (G) itraconazol 44 mg/Kg..... **74**

Figura 12. Densidade de hemócitos de larvas de *G. mellonella* não infectadas (PBS) e infectadas com *P. brasiliensis* (Pb) e *P. lutzii* (Pl) tratadas com 2 mg/Kg de anfotericina B (AMB) e 44 mg/Kg de itraconazol (ITRA)..... **76**

Figura 13. Curva de sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com *P. brasiliensis* (Pb) e *P. lutzii* (Pl) tratadas com 160 mg/Kg dos galatos de octila (OCT) e dodecila (DOD)..... **77**

Figura 14. Carga fúngica de larvas de *G. mellonella* infectadas com *P. brasiliensis* (Pb) e *P. lutzii* (Pl) tratadas com 160 mg/Kg dos galatos de octila (OCT) e dodecila (DOD)..... **77**

Figura 15. Densidade de hemócitos de larvas de *G. mellonella* não infectadas (PBS) e infectadas com *P. brasiliensis* (Pb) e *P. lutzii* (Pl) tratadas com 160 mg/Kg dos galatos de octila (OCT) e dodecila (DOD)..... **78**

Figura 16. Carga fúngica do pulmão de camundongos Balb/c infectados com *P. brasiliensis* (Pb) e tratados com 5 mg/Kg de itraconazol (ITRA) e 5 mg/Kg e 50 mg/Kg do galato de dodecila (DOD)..... **81**

Figura 17. Diagrama de fases segundo regiões observadas no sistema lipídico nanoestruturado desenvolvido..... **83**

Figura 18. Citotoxicidade do galato de octila (OCT) e galato de dodecila (DOD) associados a um sistema lipídico nanoestruturado (SLN) em fibroblastos pulmonares..... **91**

Figura 19. Citotoxicidade dos galato de octila (OCT) e galato de dodecila (DOD) associados a um sistema lipídico nanoestruturado (SLN) em células de hepatoma humano..... **92**

Figura 20 Curva de sobrevivência e curva concentração-resposta 120 hpf de embriões de zebrafish tratado com galato de octila (OCT) associado a um sistema lipídico (SLN)..... **96**

Figura 21. Curva de sobrevivência e curva concentração-resposta 120 hpf de embriões de zebrafish tratado com galato de dodecila (DOD) associado a um sistema lipídico (SLN)..... **97**

Figura 22. Curva de sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com *P. brasiliensis* tratadas com 20 mg/Kg do galatos de octila (OCT) e galato de dodecila (DOD) associados ao sistema lipídico nanoestruturado (SLN)..... **99**

Figura 23. Carga fúngica do pulmão de camundongos Balb/c infectados com *P. brasiliensis* (Pb18) e tratados com 5 mg/Kg de itraconazol (ITRA), 20 mg/Kg do galato de dodecila (DOD) sozinho e associado ao sistema lipídico nanoestruturado (SLN).. **101**

Figura 24. Volcano plot dos miRNAs circulantes detectados em pacientes com paracoccidioidomicose em comparação com os controles saudáveis. MiRNAs com expressão elevada e com expressão reduzida são mostrados em vermelho e verde, respectivamente. MiRNAs estatisticamente significantes são representadas com os seus nomes descritos no miRBase..... **111**

Figura 25. Interação entre os miRNAs com expressão elevada (indicados pelos quadrados) e genes (indicados pelos círculos) dos soros de pacientes com PCM..... **112**

Figura 26. Diagrama Venn com miRNAs comuns nos pneumócitos infectados com as diferentes linhagens filogenéticas do gênero *Paracoccidioides* com expressão reduzida (à esquerda) e com expressão elevada (à direita)..... **120**

Figura 27. Predição das vias (descritas nos retângulos brancos) e genes (destacados em vermelho) nas quais os microRNAs detectados no processo de interação pneumócitos-*Paracoccidioides* estão envolvidos..... **121**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (µg/mL) do ácido gálico e seus derivados ésteres de alquila contra *C. albicans* e espécies de *Paracoccidioides*..... **59**

Tabela 2. Concentração letal 50% (µg/mL) do ácido gálico e seus derivados ésteres de alquila em modelo de embriões de zebrafish..... **66**

Tabela 3. Valores das médias e desvio-padrão dos tamanhos das partículas e IPD para o sistema lipídico nanoestruturado (SLN), bem como para os compostos galato de octila (OCT) e galato de dodecila (DOD) incorporados no sistema..... **85**

Tabela 4. Valores das médias e desvio-padrão do potencial zeta do sistema lipídico nanoestruturado (SLN), bem como para os compostos galato de octila (OCT) e galato de dodecila (DOD) incorporados no sistema..... **86**

Tabela 5. Concentração inibitória mínima (CIM - µg/mL) do galato de octila (OCT) e galato de dodecila (DOD) associados a um sistema lipídico nanoestruturado (SLN) contra espécies de *Paracoccidioides*..... **88**

Tabela 6. Concentração inibitória 50% (CI50 - µg/mL) do galato de octila (OCT) e galato de dodecila (DOD) associados a um sistema lipídico nanoestruturado (SLN) em fibroblastos pulmonares (MRC5) e células de hepatoma humano (HepG2)..... **93**

Tabela 7. Concentração letal 50% (CL50 - µg/mL) do galato de octila (OCT) e galato de dodecila (DOD) associados ao sistema lipídico nanoestruturado (SLN) em modelo de embriões de zebrafish..... **95**

Tabela 8. Quantificação dos parâmetros hepáticos e renais em soro de camundongos tratados com galato de dodecila (DOD) sozinho e associado ao sistema lipídico nanoestruturado (SLN)..... **103**

Tabela 9. miRNAs diferencialmente expressos em pacientes com paracoccidiodomicose..... **110**
Tabela 10. Vias reguladas pelos miRNAs e genes alvos em pacientes com paracoccidioidomicose..... **113**
Tabela 11. miRNAs diferencialmente expressos em células A549 (pneumócitos) infectados com *P. lutzii* 01..... **117**
Tabela 12. miRNAs diferencialmente expressos em células A549 (pneumócitos) infectados com *P. lutzii* 02..... **118**
Tabela 13. miRNAs diferencialmente expressos em células A549 (pneumócitos) infectados com *P. lutzii* 18..... **119**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT - Alanina aminotransferase

AMB - Anfotericina B

ANOVA - Análise de variância

AST - Aspartato aminotransferase

ATCC - American Type Culture Collection

BHI - Brain Heart Infusion

ºC - Graus Celsius

Ca - *Candida albicans*

cDNA - Ácido desoxirribonucléico complementar

CI50 - Concentração inibitória 50%

CIM - Concentração inibitória mínima

CL50 - Concentração letal 50%

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

DMSO - Dimetilsulfóxido

DOD - Galato de dodecila

EBP - Estradiol binding protein

FA - Fase aquosa

FO - Fase oleosa

G - Gramas

GAL - Ácido gálico

GO - Gene Ontology

gp43 - Glicoproteína de 43kDa

h – Hora

hpf - Horas pós-fertilização

HepG2 - Células de hepatoma humano

HEX - Galato de hexila

IP - Intraperitoneal

IPD - Índice de polidispersidade

ITRA - Itraconazol

KEGG - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

Kg - Kilogramas

L - Litros

M - Molar

MAPKs - Quinases ativadoras de mitógenos

MCTI - Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação

MEC - Matriz extracelular

mg - Miligramas

min - Minutos

mL - Mililitros

MOPS - Ácido morfolinopropanosulfônico

mV - Milivolts

NAC - Núcleo de Atendimento à Comunidade

npcRNAs - Ácido ribonucléico não codificador de proteínas

nm - Nanômetros

NGM - Nematode growth media

OCT - Galato de octila

PAS - Ácido periódico-Schiff

Pb - *Paracoccidioides brasiliensis*

PBS - Phosphate buffered saline

PCM - Paracoccidioidomicose

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PI - *Paracoccidoides lutzii*

RENAMA - Rede Nacional de Métodos Alternativos ao uso de animais

RISC - Complexo de Indução de silenciamento do RNA

RNA -	Ácido ribonucléico
RNAm -	Ácido ribonucléico mensageiro
rpm -	Rotações por minuto
RPMI -	Roswell Park Memorial Institute
s -	Segundos
SF -	Separação de Fases
SLN -	Sistema lipídico nanoestruturado
SLT -	Sistemas Líquido-Transparentes
SVO -	Sistemas Viscosos e Opacos
SVST -	Sistema viscoso semi transparente
SVT -	Sistema viscoso transparente
T -	Tensoativo
TGF-β -	Fator de crescimento transformante β
TGO -	Transaminase glutâmica
TGP -	Transaminase glutâmica
TNF -	Fator de necrose tumoral
UFC -	Unidades formadoras de colônia
µg -	Microgramas
µL -	Microlitros
µM –	Micromolar
vs -	Versus

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 21
1. INTRODUÇÃO 22
1.1. *Paracoccidioides* sp e paracoccidioidomicose (PCM) 22
1.2. Diagnóstico da PCM 26
1.3. Tratamento da PCM 27
1.4. Pesquisa de produtos naturais e seus derivados sintéticos como novos tratamentos 29
1.4.1. Ácido gálico e seus derivados ésteres 30
1.5. Pesquisa de modelos animais alternativos para o estudo da infecção fúngica e de antifúngicos 31
1.5.1. *Caenorhabditis elegans* 34
1.5.2. *Galleria mellonella* 36
1.5.3. Zebrafish (*Danio rerio*) 37
1.6. Pesquisa de microRNAs como potenciais biomarcadores para diagnóstico e tratamento 38
2. JUSTIFICATIVA 41
PARTE I: Avaliação da atividade antifúngica e toxicidade de galatos de alquila em modelos animais alternativos e camundongos 42
3. OBJETIVOS 42
3.1. Objetivo geral 42
3.2. Objetivos específicos 42
4. MATERIAIS E MÉTODOS 43
4.1. Fungos e condições de cultivo 43
4.2. Fármacos e compostos 44
4.3. Interação entre *C. elegans* e fungos e avaliação de fármacos e compostos no modelo 44
4.4. Ensaio de toxicidade dos compostos em embriões de zebrafish 45

4.5. Interação entre *G. mellonella* e fungos e avaliação de fármacos e compostos no modelo 46
4.6. Determinação da carga fúngica em *G. mellonella* 47
4.7. Avaliação histológica de *G. mellonella* 47
4.8. Determinação da densidade de hemócitos de *G. mellonella* 48
4.9. Infecção dos camundongos para a avaliação de um galato de alquila 48
4.10. Associação dos galatos ao sistema nanoestruturado lipídico 49
4.11. Caracterização dos galatos associados ao sistema lipídico nanoestruturado 50
4.12. Atividade fúngica *in vitro* dos galatos associados ao sistema lipídico nanoestruturado 51
4.13. Citotoxicidade dos galatos associados ao sistema lipídico nanoestruturado 53
4.14. Modelos animais alternativos para a avaliação dos galatos associados ao sistema lipídico nanoestruturado 54
4.15. Infecção dos camundongos para a avaliação de um galato associado ao sistema lipídico nanoestruturado 54
4.16. Análise bioquímica e do peso dos animais 55
4.17. Análise estatística 55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 56
5.1. Toxicidade e eficácia em *C. elegans* do ácido gálico e galatos 56
5.3. Toxicidade e eficácia em *G. mellonella* do ácido gálico e galatos 69
5.4. Eficácia em modelo murino do galato de dodecila 79
5.5. Caracterização dos galatos associados à nanopartícula 82
5.6. Atividade antifúngica dos galatos associados à nanopartícula 88
5.7. Citotoxicidade dos galatos associados à nanopartícula 90
5.8. Toxicidade em zebrafish dos galatos associados à nanopartícula 94
5.9. Toxicidade e eficácia em *G. mellonella* dos galatos associados à nanopartícula 99
5.10. Toxicidade e eficácia em camundongos do galato de dodecila associados à nanopartícula 101
6. CONCLUSÕES 104
PARTE II: Avaliação da expressão de microRNAs na PCM 107

7. OBJETIVOS 107
7.1. Objetivo geral 107
7.2. Objetivos específicos 107
8. MATERIAIS E MÉTODOS 107
8.1. Extração dos RNAs de soros 107
8.2. Extração dos RNAs das células infectadas 108
8.3. Síntese da primeira fita e análise quantitativa por PCR Real-Time 109
8.4 Análise bioinformática 110
9. RESULTADOS E DISCUSSÃO 110
9.1. MiRNAs no soro de pacientes com paracoccidioidomicose 110
9.2. MiRNAs na interação pneumócitos-*Paracoccidioides* 117
10. CONCLUSÕES 123
REFERÊNCIAS 124
CAPÍTULO 2 142
1. PRODUÇÃO CIENTÍFICA 143
1.1. Artigos publicados como primeira autora 143
1.2. Artigos publicados como co-autora 143

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Paracoccidioides* sp e paracoccidioidomicose (PCM)

O gênero *Paracoccidioides* pertence ao grupo de fungos termo-dimórficos, que podem ser encontrados na forma de micélio a temperaturas próximas a 25 °C e na forma de levedura a temperaturas em torno de 37 °C. As colônias de micélio apresentam, macroscopicamente, coloração branca com micélios aéreos, irregulares e curtos; microscopicamente, notam-se hifas septadas, delgadas e hialinas com raros clamidósporos terminais ou intercalares. Já as colônias leveduriformes têm coloração creme, aspecto cerebriforme e não aderente ao meio; ao microscópio observam-se leveduras esféricas ou ovais com paredes bem definidas e bi-refrigentes, que podem apresentar múltiplos brotamentos (formato de roda de leme) (MARTINEZ, 2004).

O fungo foi isolado pela primeira vez por Adolfo Lutz, em 1908, a partir de lesões orais e linfadenopatia cervical de um paciente. Em 1912, Alfonso Splendore realizou a caracterização morfológica e biológica do fungo e o denominou de *Zymonema brasiliensis*. Posteriormente, em 1930, Floriano Paulo Almeida, propôs o nome de *Paracoccidioides brasiliensis* (MARTINEZ et al., 1996). Em 2006, através de estudos filogenéticos, *P. brasiliensis* pôde ser dividido em três espécies filogenéticas distintas, entre elas S1, PS2 e PS3. S1 (espécie 1) apresenta 38 isolados e encontra-se no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela; PS2 (espécie filogenética 2) possui 6 isolados distribuídos no Brasil e Venezuela; e PS3 (espécie filogenética 3) possui 21 isolados restritos à Colômbia (MATUTE et al.,

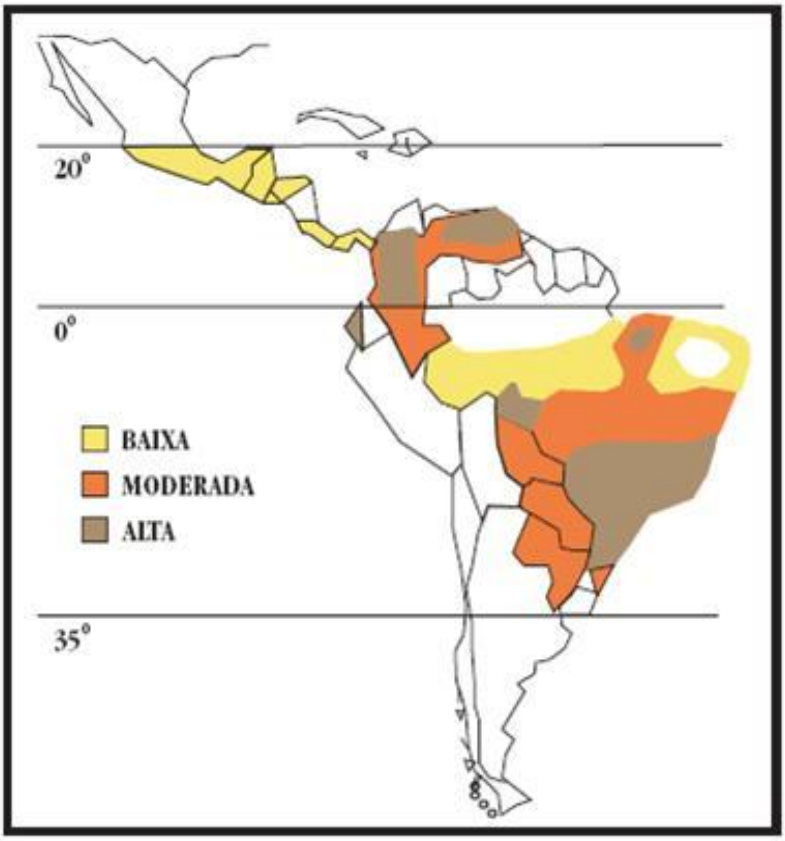
2006). Mais recentemente, a espécie filogenética PS4 foi descrita, sendo composta por isolados clínicos da Venezuela (SALGADO-SALAZAR et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2014a). Além disso, estudos genômicos mostraram que a cepa 01 de *P. brasiliensis* não pôde ser incluída nesses grupos e foi considerada uma nova espécie denominada *Paracoccidioides lutzii*, em homenagem a Adolfo Lutz (CARRERO et al., 2008). As características individuais de cada espécie podem trazer consequências nas manifestações clínicas e para o tratamento e diagnóstico da infecção (TEIXEIRA et al., 2014b).

Espécies de *Paracoccidioides* causam a paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica humana que assume importância clínica cada vez maior, em razão do aumento de sua frequência, da gravidade de suas formas anátomo-clínicas e das taxas de mortalidade. A PCM é endêmica nas Américas do Sul e Central, nos quais Brasil, Venezuela e Colômbia são os países com maior número de casos (Figura 1). Nessas regiões, a taxa de incidência anual varia de 1 a 3 novos casos por 10^5 habitantes. Em países não-endêmicos como os da Europa, Ásia e América do Norte, alguns casos importados foram relatados (BOCCA et al., 2013; COUTINHO et al., 2002; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

No Brasil, a PCM é a oitava causa de mortalidade entre as doenças infecciosas crônicas, com 1,65 óbitos por 10^6 habitantes. Entretanto, vale ressaltar que os dados de incidência podem estar subestimados, pelo fato da doença não ser de notificação compulsória. O país apresenta áreas endêmicas, as quais podem ser divididas segundo o grau de incidência da doença (Figura 1). Dessa forma, as regiões sudeste, sul e centro-oeste são descritas como altamente endêmicas; as

regiões localizadas ao longo da extremidade leste da Amazônia, incluindo os estados do Pará, Maranhão e Tocantins são considerados como moderadamente endêmicas; e as regiões do extremo-oeste da Amazônia, o estado de Rondônia e o Nordeste do país apresentam baixa endemicidade (BOCCA et al., 2013; COUTINHO et al., 2002; MARTINEZ et al., 2015; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

Figura 1. Incidência da paracoccidioidomicose nas Américas do Sul e Central (Adaptado de SHIKANAI-YASUDA et al., 2006)



O habitat do *Paracoccidioides* sp. na natureza parece ser a matéria orgânica presente nos solos de regiões endêmicas, especialmente em áreas de cultivo de café

e cana de açúcar (ARANTES et al., 2016; BONIFAZ et al., 2011; FERREIRA, 2009; SHIKANAI-YASUDA et al.., 2006). A infecção destes fungos ocorre na forma de micélio quando conídios ou fragmentos de hifas são dispersos no meio ambiente e, após inalação pelo hospedeiro, estas estruturas se diferenciam em formas leveduriformes. Esta transição de micélio para levedura mostra-se essencial para o estabelecimento do processo infeccioso, no qual o pulmão é o primeiro sítio de infecção e as leveduras podem se espalhar para outros órgãos (LACAZ, 1994). Os humanos foram os primeiros hospedeiros naturalmente infectados identificados, mas há descrições de outros animais portadores do fungo, como tatus e cães (FERREIRA, 2009; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

As formas clínicas da doença podem ser classificadas em aguda e crônica, dependendo do período e dos órgãos atingidos pela infecção. A forma aguda representa ao redor de 5% dos casos e afeta principalmente crianças, adolescentes e adultos jovens (com idade inferior a 30 anos), sendo homens e mulheres acometidos igualmente. Linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia e lesões cutâneas são manifestações comuns. Já a forma crônica representa mais de 90% dos casos e homens adultos (30 a 50 anos), trabalhadores de zonas rurais e imunodeprimidos são os principais acometidos. Manifestações pulmonares estão presentes na maioria dos pacientes, porém outros órgãos como fígado, baço, mucosas, pele e sistema nervoso central podem ser afetados (FRANCO et al., 1987). De forma geral, os indivíduos acometidos por essa micose estão na fase de maior produtividade, e por isso a doença também possui um impacto social e econômico (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). As mulheres, normalmente, não desenvolvem a PCM graças à proteção

do 17-β-estradiol. Esse hormônio se liga à proteína fúngica EBP (estradiol binding protein) e como consequência, a sinalização ativada por esse processo inibe a transição da fase miceliar para a fase leveduriforme, patogênica, do *Paracoccidioides* sp. (SHANKAR et al., 2011). Além disso, o estradiol afeta a resposta imune, demonstrando que camundongos fêmeas foram mais protegidas da infecção por *P. brasiliensis* (PINZAN et al., 2010).

1.2. Diagnóstico da PCM

O diagnóstico da PCM é baseado nos sintomas clínicos, seguido de exames laboratoriais. A técnica padrão-ouro consiste no exame micológico direto do material recolhido de lesões ou de tecido, no qual é feita a observação dos fungos, especialmente com o seu aspecto multibrotamento típico, bem como, a cultura com a observação do termodimorfismo (MENDES-GIANNINI; FUSCO-ALMEIDA, 2013; BENARD; MENDES-GIANNINI, 2014). Porém, a identificação do agente etiológico da PCM nem sempre é fácil e a confirmação pela reversão de levedura para forma miceliar é lenta (maior que 20 dias) (Da SILVA et al., 2016).

Além disso, o diagnóstico da doença pode ser feito por métodos sorológicos, nos quais a glicoproteína de 43 kDa (gp43) secretada pelo fungo é o principal antígeno detectado no soro dos pacientes (VIDAL et al., 2014). A glicoproteína de 70 kDa, expressa pelo fungo, também é outro importante antígeno para o diagnóstico da PCM (De MATTOS GROSSO et al., 2003). A detecção e quantificação dos antígenos correlacionam também com a progressão da doença e resposta ao tratamento. Por outro lado, variabilidades nos resultados e na sensibilidade dos testes sorológicos,

além de reações cruzadas com outras infecções são observadas (Da SILVA et al., 2016). Assim, quando os métodos microscópico e sorológico falham, uma alternativa pode ser a detecção por métodos moleculares através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Neste contexto, alguns primers para genes alvos como gp43, PbITS1s, PbITS3a e OPG18 foram descritos (BUITRAGO et al., 2009; GOMES et al., 2000; SAN-BLAS et al., 2005).

1.3. Tratamento da PCM

A PCM requer tratamento prolongado, o qual pode ocorrer por mais de um ano. Os pacientes com essa micose são comumente tratados com anfotericina B, azóis (cetoconazol, itraconazol, fluconazol e voriconazol) e sulfonamidas (associação sulfametoxazol/trimetropim) (HAHN et al., 2002).

Os antifúngicos estão disponíveis desde a década de 1950. No entanto, os desafios na descoberta e desenvolvimento de agentes eficazes e seguros, decorrente, sobretudo, da semelhança molecular entre as células de fungos e as de mamíferos, resultaram numa descoberta mais lenta dos antifúngicos em comparação aos antibacterianos ou antivirais. A evolução do limitado arsenal antifúngico disponível inicia-se pelos fármacos altamente tóxicos nistatina e anfotericina B, passando pelos amplamente utilizados triazóis até as recentes equinocandinas (OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2010; PETRIKKOS; SKIADA, 2007).

A anfotericina B pertence ao grupo poliênico dos agentes antifúngicos. Seu mecanismo de ação baseia-se na ligação ao ergosterol da membrana fúngica e conseqüente formação de poros na membrana, que causa distúrbios no equilíbrio

iônico celular (KAUFFMAN, 2006; RANG; DALE, 2007). Outro mecanismo de ação desse fármaco é a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, causando estresse oxidativo e levando a célula à apoptose (FERREIRA et al., 2013; MESA-ARANGO et al., 2014). A anfotericina B apresenta boa eficácia contra *P. brasiliensis* e *P. lutzii* e tem sido utilizado principalmente em casos graves de PCM. Além disso, há poucos episódios de resistência micológica a esse fármaco. Por outro lado, a anfotericina B é administrada por via intravenosa e efeitos adversos importantes, por vezes, requerem a interrupção da terapia. A injeção normalmente resulta em calafrios, febre, zumbido, cefaléia e vômito. Porém, o efeito adverso mais comum e sério é nefrotoxicidade. Neste aspecto, algum grau de comprometimento renal é observado em mais de 80% dos pacientes que utilizam esse fármaco. Outros efeitos adversos como hepatotoxicidade, trombocitopenia e reações anafiláticas também podem ocorrer (KAUFFMAN, 2006; RANG; DALE, 2007).

Os azóis, especialmente o itraconazol, têm sido utilizados em casos leves ou moderados da PCM. Eles inibem a enzima 3A do citocromo P450, lanosterol 14α-desmetilase, bloqueando a conversão do lanosterol em ergosterol. Tal fato altera a fluidez da membrana e, consequentemente, a replicação fúngica é inibida. De forma geral, essa classe de fármacos é eficaz contra vários fungos, podem ser administrados oralmente e apresentam efeitos adversos brandos (RANG; DALE, 2007). Entretanto, além de inibir as enzimas do citocromo P450 nos fungos, os azóis inibem essas enzimas responsáveis pelo metabolismo hepático de fármacos nos seres humanos. Em consequência, os azóis podem interagir com várias classes de fármacos anti-histamínicos, antineoplásicos, esteroides, antimicrobianos,

antirretrovirais, opióides, barbitúricos, agentes cardiovasculares, psicotrópicos e anticoncepcionais orais. Assim, a monitorização do paciente quando esses fármacos forem coadministrados se faz necessária (BATES; YU, 2003). Outro aspecto, é que esses antifúngicos são teratogênicos. Além disso, Hahn e colaboradores (2003) descreveram a ocorrência de isolados de *P. brasiliensis* resistentes ao cetoconazol em pacientes com PCM. Quando não há disponibilidade do itraconazol para o tratamento dos pacientes com PCM, realiza-se o tratamento com a combinação sulfametoxazol/trimetropim.

Visto que o número de agentes antifúngicos é limitado e que os mesmos apresentam inúmeras desvantagens, nos últimos anos, houve um aumento do interesse em estudar novos compostos com potencial antifúngico (DERENGOWSKI et al., 2009).

1.4. Pesquisa de produtos naturais e seus derivados sintéticos como novos tratamentos

Compostos presentes em extratos e óleos essenciais, produzidos pelas plantas como consequência do metabolismo secundário, possuem propriedades antimicrobianas reconhecidas empiricamente há séculos e comprovadas cientificamente nas últimas décadas. Dessa forma, países como o Brasil, que possuem uma flora diversificada e rica e tradição na utilização de plantas medicinais têm se dedicado à pesquisa de plantas nativas com atividades antimicrobianas (SARDI et al., 2016). Especificamente contra *Paracoccidioides* sp., alguns produtos naturais e derivados sintéticos como maitenina, pristimerina, eschinol, metil

linolenato, óxido de cariofileno, trans-nerolidol e curcumina mostraram atividade *in vitro* contra esse fungo (GULLO et al., 2012; JOHANN et al., 2010, 2012; MARTINS et al., 2009). Além desses, outros como 6-quinolinil N-óxido chalcona e ajoeno também apresentaram atividade anti - *Paracoccidioides in vivo* (De SÁ et al., 2015; MALUF et al., 2008).

1.4.1. Ácido gálico e seus derivados ésteres

Um exemplo de um composto derivado do metabolismo secundário de plantas, sendo um produto da hidrólise de taninos, é o ácido gálico. Este composto é distribuído em várias espécies de plantas como *Paeonia rockii*, *Astronium* sp., *Syzygium cumini*, *Euphorbia lunulata*, *Labisa pumila*, *Zingiber officinale*, *Klainedoxa gabonensis*, *Nervilia aragoana, Atlantia monophylla*, *Lawsonia inermis*, *Ardisia chinensis* e *Alchornea glandulosa,* podendo ser extraído de folhas, caules, raízes ou frutos (CHOUBEY et al., 2015; SARDI et al., 2016). O ácido gálico e seus derivados ésteres de alquila (galatos) têm sido descritos por apresentarem potencial antioxidante, antifúngico e antibacteriano (CHOUBEY et al., 2015; VAQUERO; ALBERTO; DE NADRA, 2007) . Kubo, Xiao e Kubo (2001), por exemplo, estudaram três derivados contra 16 microrganismos e observaram que o galato de octila exibiu atividade antifúngica contra *Saccharomyces cerevisae, Zygosaccharomyces bailii, Candida albicans e Aspergillus niger*. Recentemente, nosso grupo publicou a atividade *in vitro* de uma série de galatos de alquila contra fungos patogênicos humanos, incluindo *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, no qual os galatos de hexila, heptila, octila, decila, undecila e dodecila apresentaram um valor baixo de concentração

inibitória mínima - CIM (De PAULA; SILVA et al., 2014). Além disso, vários galatos de alquila também demonstraram atividade contra fungos patogênicos de plantas (ITO et al., 2014). Dessa forma, apesar de se ter conhecimento do potencial antifúngico dos galatos *in vitro*, pouco se tem avançado em estudos *in vivo* com esses compostos.

Além da busca por compostos com potencial antifúngico, novas formulações que garantam o aumento da eficácia e segurança desses compostos em sistemas de infecção *in vitro* e *in vivo* também têm sido estudadas. Diante dos avanços da nanotecnologia, as nanopartículas, as quais são constituídas por um pequeno número de átomos de dimensão menor que um mícron, têm se destacado como ótimos carreadores de moléculas (ISLAM; MIYAZAKI, 2009). Neste contexto, a incorporação de antifúngicos como anfotericina B, azóis e nistatina à nanopartículas contribuem para melhor liberação, biodisponibilidade e menor toxicidade desses fármacos (VOLTAN et al., 2016).

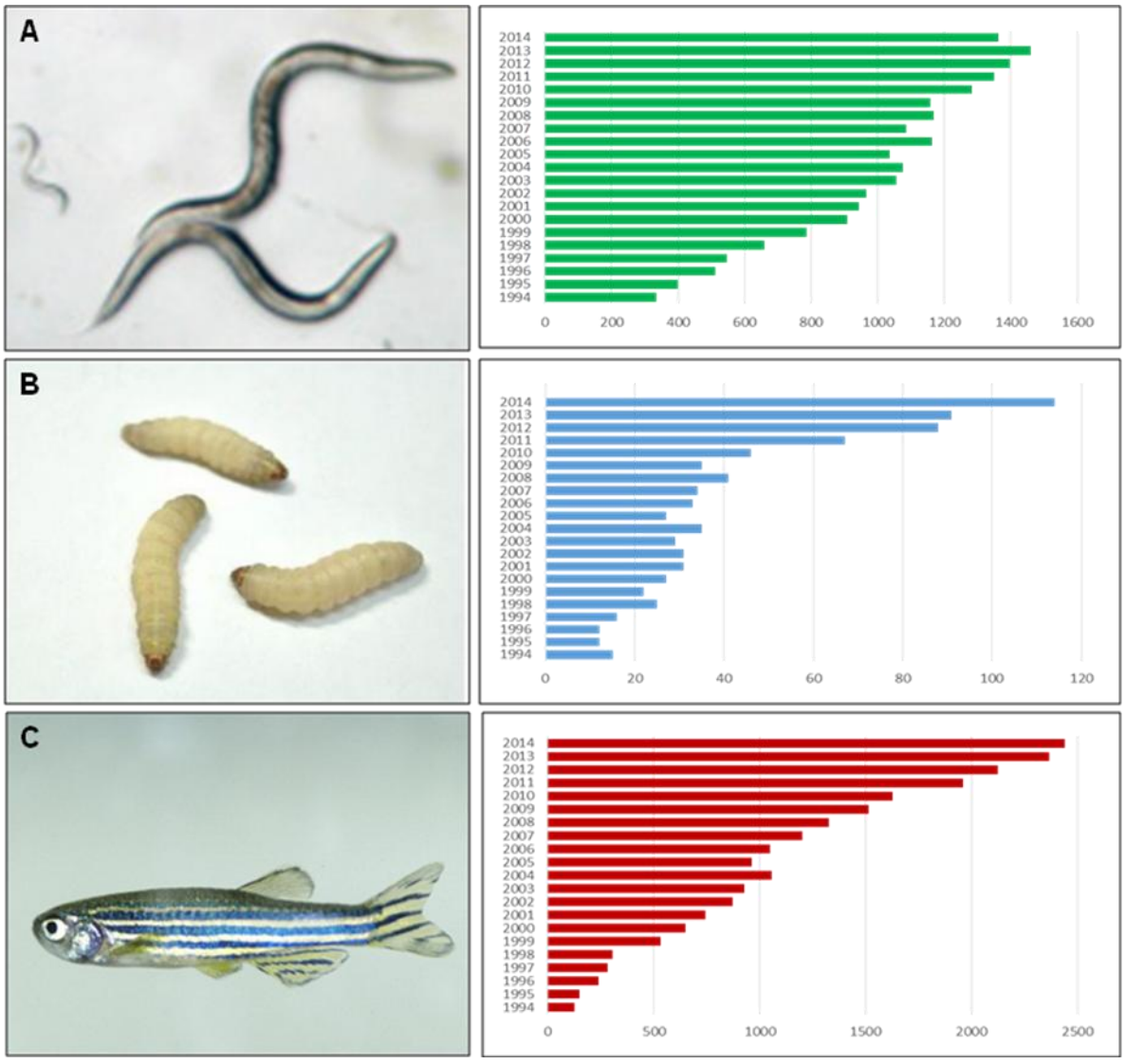
1.5. Pesquisa de modelos animais alternativos para o estudo da infecção fúngica e de antifúngicos

Por questões éticas, custo elevado, novas exigências de proteção e consideração ao princípio dos 3 Rs (*Refinement, Reduction, Replacement*), o uso de animais mamíferos de experimentação está cada vez mais restrito ao mínimo necessário, o que gera a necessidade de padronização de modelos alternativos (RUSSELL; BURCH, 1959; HARTUNG, 2010). A promoção e validação dos modelos alternativos são bem difundidas na Europa, Estados Unidos e Japão. Já no Brasil, a

iniciativa é mais recente e merece destaque a implantação da Lei Arouca de 2008, cujo principal objetivo é zelar pela ética na utilização de animais em pesquisa e ensino, bem como preconizar o desenvolvimento de métodos alternativos. Além disso, o Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) criou a Rede Nacional de Métodos Alternativos ao uso de animais (RENAMA) em 2012.

Métodos ou modelos alternativos têm por objetivo complementar ou substituir, os tradicionais testes com mamíferos na pesquisa biomédica ou ensino. Além de ensaios *in vitro* com células e *in silico*, eles incluem o uso de animais inferiores (HARTUNG, 2011). Neste contexto, cresce a importância da utilização de modelos experimentais como *Caenorhabditis elegans, Galleria mellonella* e zebrafish (*Danio rerio*), para estudo da interação patógeno-hospedeiro e de novos fármacos, os quais são objetos de estudo da presente tese. Tal fato pode ser evidenciado pelo aumento do número de publicações, a cada ano, em bases de dados como o Pubmed (Figura 2).

Figura 2. Imagens representativas dos animais alternativos e número de publicações entre os anos de 1994 e 2014 na base de dados Pubmed com as palavras chave *Caenorhabditis elegans* (A)*, Galleria mellonella* (B) e zebrafish (C). Imagens adaptadas de ADAMS, 2008; BOTTHOF, 2015; ULAAH e colaboradores, 2014



1.5.1. *Caenorhabditis elegans*

C. elegans é um nematóide de vida livre encontrado no solo, cujo uso apresenta uma série de vantagens em ensaios experimentais. Seu pequeno tamanho (1 mm de comprimento), o tempo de geração rápida e a facilidade de manutenção em laboratório permite sua produção barata e rápida (KALETTA; HENGARTNER, 2006). Outra vantagem é que seu genoma já foi totalmente sequenciado (PETERSON et al., 2008). Nesse aspecto, uma alta homologia genética e a conservação de aspectos biológicos como da resposta imune inata são observados entre esse nematóide e mamíferos (MILLET; EWBANK, 2004). Em relação aos fungos, a utilização do *C. elegans* como hospedeiro também é possível, desde que o fungo substitua adequadamente à sua fonte normal de alimentação, *Escherichia coli* OP50. Além disso, fenótipos como sobrevivência e motilidade do animal e a carga do patógeno podem ser facilmente examinados. Embora o *C. elegans* não possua nenhuma imunidade mediada por células, vários trabalhos revelaram uma abordagem complexa da imunidade inata para resistência a doenças, compreendendo barreiras físicas, moléculas antimicrobianas e vias reguladas por quinases ativadoras de mitógenos (MAPKs) e pelo fator de crescimento transformante β (TGF-β) (MARSH; MAY, 2012).

A resposta à infecção por agentes patogênicos naturais do *C. elegans* tem sido descrita para o fungo *Drechmeria coniospora,* cuja rápida proliferação e formação de filamentos levam a morte do animal (JANSSON, 1994). Além disso, estudos têm demonstrado que fungos patogênicos humanos como *C. albicans, C. krusei* (PUKKILA-WORLEY et al., 2009; SCORZONI et al., 2013), *C. neoformans*

(MYLONAKIS et al., 2002), *H. capsulatum* (JONHSON et al., 2009) e *Penicillium marneffei* (HUANG et al., 2014) também podem infectar letalmente o *C. elegans*.

Além do estudo da interação entre *C. elegans* e fungos, esse modelo também podem ajudar a identificar compostos que provavelmente não seriam identificados em ensaios *in vitro* ou seria dispendioso na utilização de mamíferos (BREGER et al., 2007).

Alguns estudos utilizaram o modelo *C. elegans* para a triagem de compostos com potencial antifúngico contra *C. albicans*. Um estudo utilizou 1.266 compostos com atividades farmacêuticas conhecidas e identificou 15 que prolongaram a sobrevivência de nematóides infectados com *C. albicans* e inibiram a filamentação do fungo *in vivo*. Dois desses compostos, ácido cafeico fenetil éster e fluoroquinolona enoxacina, foram selecionados e posteriormente testados num modelo murino de candidíase e apresentaram atividade antifúngica também nesse modelo (BREGER et al., 2007). Outra triagem de produtos naturais também foi realizada com a utilização do modelo de *C. elegans* e *C. albicans*, no qual 12 saponinas derivadas de plantas revelaram ter propriedades antifúngicas. Duas delas interromperam a formação de hifas e de biofilme de cepas de *C. albicans* resistentes a antifúngicos (COLEMAN et al., 2010). Recentemente, dois produtos naturais, magnolol e ronokiol mostraram ser capazes de prolongar a sobrevivência do *C. elegans* infectado com *C. albicans* (SUN; LIAO; WHANG, 2015). Além disso, o produto natural timol mostrou potencial atividade contra *C. albicans* no modelo *C. elegans* (SHU et al., 2016).

1.5.2. *Galleria mellonella*

G. mellonella é um inseto encontrado no ambiente, onde se alimenta de mel, pólen e cera de abelha. Ela também apresenta vantagens importantes como modelo de estudo fungo-hospedeiro: as larvas podem ser incubadas numa temperatura entre 25 e 37 °C, o que possibilita simular o habitat e também as condições de infecção em mamíferos; possuem seis tipos de células fagocíticas importantes no sistema de defesa denominadas hemócitos; e quantidades exatas dos patógenos podem ser administradas. Além disso, a viabilidade das larvas pode ser facilmente constatada pela falta de movimento e melanização induzida em resposta à infecção (DESALERMOS; FUCHS; MYLONAKIS, 2012; FUCHS et al., 2010; FUCHS; MYLONAKIS, 2006).

O estudo da virulência de diferentes fungos como *P. brasiliensis* (SCORZONI et al., 2015)*, P. lutzii, Histoplasma capsulatum* (THOMAZ et al., 2013), *Cryptococcus neoformans* (GARCÍA-RODAS et al., 2011), *Fusarium* spp (COLEMAN et al., 2011), *Candida krusei, C. albicans* (SCORZONI et al., 2013), *Sporothrix schenckii, Sporothrix brasiliensis* (CLAVIJO-GIRALDO et al., 2016) e espécies de *Trichosporon* (MARINÉ et al., 2015) tem sido realizado em *G. mellonella* com sucesso.

No modelo *G. mellonella, C. neoformans* foi avaliado para os tratamentos com anfotericina B e fluconazol (MYLONAKIS et al., 2005). O tratamento de *Fusarium* spp com anfotericina B também foi eficaz nesse modelo animal não convencional (COLEMAN et al., 2011). A eficácia de fármacos antifúngicos contra *C. albicans* e *C. krusei* em *G. mellonella* também foi descrita (KELLY; KAVANAGH, 2011; SCORZONI et al., 2013). Recentemente, Favre-Godal e colaboradores (2014) testaram alguns

produtos naturais da classe das antraquinonas em larvas de *G. mellonella* infectadas com *C. albicans*, e embora os compostos tenham apresentado previamente atividade antifúngica *in vitro*, eles não foram eficazes nesse modelo *in vivo*. A combinação do produto natural pedaltina com anfotericina B se mostrou eficaz contra *C. neoformans* no modelo *G. mellonella* e em modelo murino (SANGALLI-LEITE et al., 2016).

1.5.3. Zebrafish (*Danio rerio*)

Outro modelo animal alternativo utilizado neste trabalho é o zebrafish *(Danio rerio)*, conhecido popularmente como “paulistinha”. Ele é um peixe nativo da Índia, pertencente à família Crypinidae, e que possui de 3 a 4 cm. Entre várias aplicações, esse modelo tem se mostrado conveniente para avaliar potenciais efeitos tóxicos de novos compostos sobre o desenvolvimento embrionário. A utilização de embriões de zebrafish mostra-se vantajosa porque os mesmos são pequenos, de forma que os testes podem ser feitos em placas de 24, 96 e até 384 poços e os embriões conseguem sobreviver por até sete dias nessas placas. Além disso, embriões e larvas absorvem com facilidade os compostos com os quais são colocados em contato. Outras vantagens é que os embriões são transparentes, o que permite a visualização do seu desenvolvimento, e a postura de um casal gera até 200 embriões (KANUNGO et al., 2014). Também é válido ressaltar que o genoma desse vertebrado já foi totalmente sequenciado, sendo demonstrado que 71,4% dos genes de zebrafish são ortólogos com os de humanos (HOWE et al., 2013). Assim, embora modelos mamíferos ainda sejam considerados padrão ouro para o estudo de efeitos teratogênicos, o zebrafish tem sido cada vez mais aceito como um modelo para

predição desses efeitos, sendo utilizado para nanopartículas e novos fármacos (KANUNGO et al., 2014). Neste aspecto, vários antifúngicos da classe dos azóis foram testados em embriões de zebrafish, onde, assim como em humanos, também se observou o potencial teratogênico dessa classe de fármacos (HERMSEN et al., 2012; JONG et al., 2011)

No presente trabalho, pretendeu-se desenvolver os modelos *C. elegans* e *G. mellonella* para as espécies *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. Além disso, pretendeu-se testar o ácido gálico e seus derivados ésteres de alquila nesses modelos e no zebrafish, a fim de se fazer uma triagem, para posteriormente selecionar um deles para ser testado em mamífero.

1.6. Pesquisa de microRNAs como potenciais biomarcadores para diagnóstico e tratamento

O reconhecimento do próprio fungo, de seus fatores de virulência e dos mecanismos de defesa do hospedeiro auxiliam no diagnóstico e terapia da PCM. Nesse contexto, a ação e interação de processos complexos, inclusive de regulação gênica por microRNAs, permitirá a melhor compreensão da patogenia.

Nos últimos anos, a análise do transcriptoma tem gerado uma ampla gama de informações sobre RNAs relacionadas com diferentes mecanismos de regulação gênica, incluindo mecanismos epigenéticos. Tais RNAs não codificam proteínas (non-protein or peptide-coding ou npcRNAs), embora não seja possível excluir a possibilidade de que alguns deles codifiquem pequenos peptídeos (MERCER; DINGER; MATTICK, 2009; SHARP, 2009). Dados gerados por sequenciamento em

larga escala revelaram que npcRNAs excedem o número de genes codificadores de proteínas, indicando que o genoma humano é transcricionalmente muito mais ativo que foi anteriormente previsto. Os microRNAs ou miRNAs são pequenos RNAs (19 a 24 nucleotídeos) pertencentes a essa classe de npcRNAs pequenos e que regulam a expressão do gene, quer por degradação do RNA mensageiro ou por inibição da tradução de proteínas (HU; DRESCHER; CHEN, 2012).

MiRNAs são sintetizados por uma via específica que inicia a transcrição dentro do locus genômico selecionado, que vai codificar para os precursores de miRNAs. Esses precursores serão cortados duas vezes; em primeiro lugar no núcleo pelo conjunto de proteínas DGCR8 e Drosha para gerar um pré-miRNA, e subsequentemente no citoplasma por uma nuclease especializada chamada Dicer, que irá gerar o miRNA maduro. MiRNAs maduros serão então envolvidos em um complexo de alta massa molecular chamado RISC (Complexo de Indução de silenciamento do RNA), e eles vão exercer sua ação reguladora negativa pela ligação às regiões 3'-UTR de transcritos de RNAm nascentes (SHUKLA; SINGH; BARIK, 2011). A atividade de regulação dos miRNAs é exercida no nível pós-transcricional e estima-se que regula até 1/3 dos genes que codificam proteínas (HU; DRESCHER; CHEN, 2012).

Os perfis de expressão dos miRNAS variam entre diferentes tipos celulares. Além disso, as células também são capazes de secretar ativamente miRNAs, sendo possível detectá-los em todos os fluidos biológicos. Evidências das funções desses miRNAs celulares e circulantes têm sido descritas em várias doenças humanas e em processos fisiológicos normais (HU; DRESCHER; CHEN, 2012).

Estudos anteriores têm demonstrado que os miRNAs possuem papel fundamental nas infecções causadas por bactérias, vírus e protozoários (VERMA et al., 2016). Por outro lado, um número reduzido de trabalhos tem focado em infecções fúngicas. Neste contexto, em monócitos e células dendríticas infectados com *Aspergillus fumigatus*, os miR-132 e miR-155 mostraram-se diferencialmente expressos (Das GUPTA et al., 2014). Já em macrófagos infectados com *C. albicans*, foi demonstrado que miR-155, miR-146, miR-146b, miR-125a e miR-455 podem ser regulados por LPS e TLR4. Estudos *in silico* para miR-125A e miR-455 mostraram que eles podem atingir proteínas envolvidas na sinalização inflamatória em resposta à infecção fúngica (MONK; HUTVAGNER; ARTHUR, 2010). Também em tecidos epiteliais respiratórios humanos infectados por *C. albicans*, 55 microRNAs mostraram diferencialmente expressos comparados com os tecidos controle, sendo que o miR-16-1 e miR-17-3p apresentaram substancial aumento e redução na expressão, respectivamente (MUHAMMAD et al., 2015).

A identificação de miRNAs diferencialmente expressos no hospedeiro pode ajudar na compreensão dos mecanismos de regulação envolvidas na interação parasito-hospedeiro. Além disso, os miRNAs circulantes podem ser úteis tanto como biomarcadores no diagnóstico quanto para o tratamento de doenças (MADHAVAN et al., 2013). Por esses motivos devem ser identificados em infecções fúngicas como a PCM.

10. CONCLUSÕES

- Oito miRNAs foram identificados no soro de pacientes com PCM crônica, relacionados a processos de adesão, apoptose e resposta imune à infecção;
- Os miRNAS diferencialmente expressos nas células pulmonares foram distintos de acordo com a espécie filogenética que a infectou. Porém as vias reguladas por eles parecem ser comuns e relacionam-se ao processo de adesão e invasão do fungo na célula, indução de apoptose e inflamação.

Essa é primeira descrição da participação do miRNAs na PCM, os quais trazem perspectiva de serem utilizados no diagnóstico e no tratamento da doença.

REFERÊNCIAS

ADAMS, J. *C. elegans*: Model organism in the discovery of PKD. **Nature Educ**, v. 1, n. 1, p. 196, 2008. 1 fotografia.

ALLEN, H. L.; DEEPE, Jr G. S. Apoptosis modulates protective immunity to the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum.* **J Clin Invest,** v. 115, p. 2875-85, 2005.

ARANTES, T. D. et al. Environmental mapping of *Paracoccidioides* spp. in Brazil reveals new clues into genetic diversity, biogeography and wild host association. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 4, p. e0004606, 2016.

BATES, D. W.; YU, D. T. Clinical impact of drug-drug interactions with systemic azole antifungals. **Drugs Today**, v. 39, n. 10, p. 801-13, 2003.

BATISTA, J. et al. Is the geographical origin of a *Paracoccidioides brasiliensis* isolate important for antigen production for regional diagnosis of paracoccidioidomycosis? **Mycoses,** v. 53, p. 176-80, 2010.

BENARD, G.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Paracoccidioidomycosis. In: FEIGIN, R.D.; CHERRY, J.D. eds. **Textbook of Pediatric Infections Diseases**. 7th. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2014. p. 2780-2795.

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, 2003.

BOCCA, A. L. et al. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. **Future Microbiol,** v. 8, p. 1177-91, 2013.

BONIFÁCIO, B. V. et al. Nanostrucutured lipid systems a strategy to improve the anti-*Candida albicans* activity of *Astronium* sp. **Int J Nanomedicine,** v. 10, p. 5081-92, 2015.

BONIFAZ, A.; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, D.; PERUSQUÍA-ORTIZ, A. M. Endemic systemic mycoses: coccidioidomycosis, histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and blastomycosis. **J Dtsch Dermatol Ges**, v. 9, n. 9, p. 705-14, 2011.

BOTTHOF, J. Zebrafish: the rising star of animal models. 2015. 1 fotografia. Disponível em:< https://speakingofresearch.com/2015/05/11/zebrafish_rising_star_animal_model/>

BREGER, J. et al. Antifungal chemical compounds identified using a *C. elegans* pathogenicity assay. **PLoS Pathog**, v. 3, n. 2, p. e18, 2007.

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

BUITRAGO, M. J. et al. Utility of real-time PCR for the detection of *Paracoccidioides brasiliensis* DNA in the diagnosis of imported paracoccidioidomycosis. **Med Mycol**, v. 47, p. 879-82, 2009.

BUNJES, H. Lipid nanoparticles for the delivery of poorly water-soluble drugs. **J Pharm Pharmacol**, v. 62, p. 1637-45, 2010.

CACERE, C. R. et al. The role of apoptosis in the antigen-specific T cell hyporesponsiveness of paracoccidioidomycosis patients. **Clin Immunol**, v. 105, p. 215-22, 2002.

CALDINI, C. P. et al. Synthetic peptides mimic gp75 from *Paracoccidioides brasiliensis* in the diagnosis of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia,** v. 174, p. 1-10, 2012.

CALICH, V. L. et al. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Br J Exp Pathol,** v. 66, n. 5, p. 585-94, 1985.

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, 2008.

CARVALHO, K. C. et al. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* and gp43 expression in isolates bearing known PbGP43 genotype. **Microbes Infect**, v. 7, p. 55–65, 2005.

CHOUBEY, S. et al. Medicinal importance of gallic acid and its ester derivatives: a patent review. **Pharm Pat Anal,** v. 4, n. 4, p. 305-15, 2015.

CLAVIJO-GIRALDO, D. M. et al. Analysis of *Sporothrix schenckii* sensu stricto and *Sporothrix brasiliensis* virulence in *Galleria mellonella*. **J Microbiol Methods**, v. 122, p. 73-7, 2016.

CLSI. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**; aproved standard. 3rd. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008. (CLSI document M27 - A3).

COLEMAN, J. J. et al. Characterization of plant-derived saponin natural products against *Candida albicans*. **ACS Chem Biol**, v. 5, p. 321-32, 2010.

COLEMAN, J. J. et al. Fusarium pathogenesis investigated using *Galleria mellonella* as a heterologous host. **Fungal Biol**, v. 115, n. 12, p. 1279-89, 2011.

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

CREEMERS, E. E; TIJSEN, A. J.; PINTO, Y. M. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? **Circ Res**, v. 110, p. 483-95, 2012.

Da SILVA, P. B. et al. *In vitro* activity of copper(II) complexes loaded or unloaded into a nanostructured lipid system against *Mycobacterium tuberculosis*. **Int J Mol Sci**, v. 17, p. 745-56, 2016.

Da SILVA, J. F. et al. Advances and challenges in paracoccidioidomycosis serology caused by *Paracoccidioides* species complex: an update. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 84, p. 87-94, 2016.

Das GUPTA, M. et al. *Aspergillus fumigatus* induces microRNA-132 in human monocytes and dendritic cells. **Int J Med Microbiol,** v. 304, n. 5-6, p. 592-6, 2014.

DAS, S.; CHAUDHURY, A. Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, p. 62–76, 2011.

D'AURIA, F. D. et al. *In vitro* activity of propyl gallate-azole drug combination against fluconazole- and itraconazole-resistant *Candida albicans* strains. **Lett Appl Microbiol**, v. 32, n. 4, p. 220-3, 2001.

De MATTOS GROSSO, D. et al. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. **Infect Immun**, v. 71, n. 11, p. 6534–42, 2003.

De OLIVEIRA H. C. et al. *Paracoccidioides*-host Interaction: An overview on recent advances in the Paracoccidioidomycosis. **Front Microbiol**, v. 6: 1319, 2015.

De PAULA e SILVA, A. C. A et al. Microplate alamarBlue Assay for *Paracoccidioides* Susceptibility Testing. **J Clin Microbiol**, v. 51, n. 4, p. 1250, 2013.

De PAULA e SILVA, A. C. A. et al. Antifungal activity of decyl gallate against several species of pathogenic fungi. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2014, Article ID 506273, 8 p., 2014.

De PAULA e SILVA, A. C. A. **Estudo da atividade anti-*Paracoccidioides* do composto galato de decila: mecanismo de ação e interação fungo-hospedeiro**. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016.

De SÁ, N. P. et al. Antifungal activity of 6-quinolinyl N-oxide chalcones against *Paracoccidioides*. **Antimicrob Chemother,** v. 70, n. 3, p. 841-5, 2015.

DEACON, J. et al. Antimicrobial efficacy of tobramycin polymeric nanoparticles for Pseudomonas aeruginosa infections in cystic fibrosis: Formulation, characterisation and functionalisation with dornase alfa (DNase). **J Control Release**, v. 198, p. 55–61, 2015.

DEL VECCHIO, A. et al. Induction of apoptosis in A549 pulmonary cells by two *Paracoccidioides brasiliensis* samples. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 749-54, 2009.

DERENGOWSKI, L. S. et al. Antimicrobial effect of farnesol, a *Candida albicans* quorum sensing molecule, on *Paracoccidioides brasiliensis* growth and morphogenesis. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v. 8, p. 1-9, 2009.

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, 2012.

DWEEP, H. et al. MiRWalk - database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of 3 genomes. **J Biomed Inform**, v. 44, p. 839-7, 2011.

ESPOSITO, E. et al. Clotrimazole nanoparticle gel for mucosal administration. **Mater Sci Eng *C***, v. 33, p. 411–18, 2013.

FAVRE-GODAL, Q. et al. Comprehensive approach for the detection of antifungal compounds using a susceptible strain of *Candida albicans* and confirmation of *in vivo* activity with the *Galleria mellonella* model. **Phytochemistry**, v. 105, p. 68-78, 2014.

FERREIRA, G. F. et al. The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azoles and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. **J Antimicrob Chemother,** v. 68, n. 8, p. 1801-11, 2013.

FERREIRA, M. S. Paracoccidioidomycosis. **Paediatr respir rev**, v. 10, n. 4, p. 161-5, 2009.

FORMARIZ, T. P. et al. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Rev Bras Cienc Farm**, v. 41, n. 3, p. 301-13, 2005.

FORTES, M. R. et al. Immunology of paracoccidioidomycosis. **An Bras Dermatol**, v. 86, p. 516-24, 2011.

FRANCO, M. et al. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 20, p. 129-32, 1987.

FREITAS, E. S. et al. Nanostructured Lipid Systems as a Strategy to Improve the *in Vitro* Cytotoxicity of Ruthenium(II) Compounds. **Molecules**, v. 19, p. 5999-6008, 2014.

FU, Y. et al. Circulating microRNAs in patients with active pulmonary tuberculosis. **J Clin Microbiol,** v. 49, n. 12, p. 4246-51, 2011.

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, 2006.

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.

FUJITA, K.; KUBO, I. Plasma membrane injury induced by nonyl gallate in Saccharomyces cerevisiae. **J Appl Microbiol**, v. 92, n. 6, p. 1035–42, 2002.

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.

GAZIEL-SOVRAN, A. et al. miR-30b/30d regulation of GalNAc transferases enhances invasion and immunosuppression during metastasis. **Cancer Cell**, v. 20, p. 104–18, 2011.

GOMES, G. M. et al. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. **J Clin Microbiol**, v. 38, p. 3478-80, 2000.

GOSAI, S. J. et al. Automated high-content live animal drug screening using *C. elegans* expressing the aggregation prone serpin α1-antitrypsin Z. **PLoS One**, v. 5, n. 11, p. e15460, 2010.

GRIFFTHS-JONES, S. et al. MiRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. **Nucleic Acids Res**, v. 34, p. D140-D144, 2006

GUAN, G. et al. microRNA-423-3p promotes tumor progression via modulation of AdipoR2 in laryngeal carcinoma. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 7, p. 5683-91, 2014.

GULLO, F. P. et al. Antifungal activity of maytenin and pristimerin. **Evid Based Complement Alternat Med**, 340787, 2012.

GUPTA, M; VYAS, S. P. Development, characterization and *in vivo* assessment of effective lipidic nanoparticles for dermal delivery of fluconazole against cutaneous candidiasis. **Chem Phys Lipids**, v. 165, p. 454-61, 2012.

HAHN, R. C. et al. *In vitro* comparison of activities of terbinafine and itraconazole against *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Clin Microbiol**, v. 40, p. 2828-31, 2002.

HAHN, R. C. et al. Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and *in vitro* resistance to ketoconazole and trimethoprim sulphamethoxazole. **Mycoses**, v. 46, p. 342-7, 2003.

HARTUNG, T. Lessons learned from alternative methods and their validation for a new toxicology in the 21st century. **J Toxicol Environ Health**, Part B: Critical Reviews, v. 13, p. 277-290, 2010.

HARTUNG, T. From alternative methods to a new toxicology. **Eur J Pharm Biopharm,** v. 77, n. 3, p. 338-49, 2011.

HE, J. H. et al. Zebrafish models for assessing developmental and reproductive toxicity. **Neurotoxicol Teratol**, v. 42, p. 35-42, 2014.

HERMSEN, S. A. B. et al. Triazole-induced gene expression changes in the zebrafish embryo. **Reprod Toxicol**, v. 34, p. 216-24, 2012.

HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498-503, 2013.

HU, G.; DRESCHER, K. M.; CHEN, X. M. Exosomal miRNAs: Biological properties and therapeutic potential. **Front Genet,** v. 3, n. 56, 2012.

HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. **Nature Protoc**, v. 4, n. 1, p. 44-57, 2009.

HUANG, X. et al. *Caenorhabditis elegans*: a simple nematode infection model for *Penicillium marneffei*. **PLoS One**, v. 30, n. 9, p. e108764, 2014.

ISLAM, N.; MIYAZAKI, K. Nanotechnology innovation system: understanding hidden dynamics of nanoscience fusion trajectories. **Technol Forecast Soc Change**, v. 76, p.128-40, 2009.

ITO, S. et al. Antifungal activity of alkyl gallates against plant pathogenic fungi**. Bioorg Med Chem Lett,** v.1; n. 24, p. 1812-4, 2014.

JANSSON, H. B. Adhesion of conidia of *Drechmeria coniospora* to *Caenorhabditis elegans* wild type and mutants. **J Nematol**, v. 26, p. 430-51, 1994.

JOHANN, S. et al. Antifungal activity of schinol and a new biphenyl compound isolated from *Schinus terebinthifolius* against the pathogenic fungus *Paracoccidioides* **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v. 9, n. 30, 2010.

JOHANN, S. et al. Activity of compounds isolated from *Baccharis dracunculifolia* D.C. (*Asteraceae*) against *Paracoccidioides brasiliensis.* **Med Mycol**, v. 50, p. 843-51, 2012.

JONG, E. et al. Comparison of the mouse Embryonic Stem cell Test, the rat Whole Embryo Culture and the Zebrafish Embryotoxicity Test as alternative methods for developmental toxicity testing of six 1,2,4-triazoles. **Toxicol Appl Pharmacol,** v. 253, p. 103–11, 2011.

JONHSON, C. H. et al. *Histoplasma capsulatum* and *Caenorhabditis elegans*: a simple nematode model for an innate immune response to fungal infection. **Med Mycol**, v. 47, p. 808-13, 2009.

KALETTA, T.; HENGARTNER, M. O. Finding function in novel target: *C. elegans* as a model organism. **Nat Rev Drug Discov**, v. 5, p. 387–98, 2006.

KAMINAGAKURA, E. et al. Characterization of inflammatory cells in oral paracoccidioidomycosis. **Oral Dis,** v. 13, p. 434-9, 2007.

KANUNGO, J. et al. Zebrafish model in drug safety assessment. **Curr Pharm Des**, v. 20, p. 5416-29, 2014.

KAUFFMAN, C. A. Fungal infections. **Proc Am Thorac Soc**, v. 3, p. 35-40, 2006.

KELLY, J.; KAVANAGH, K. Caspofungin primes the immune response of the larvae of *Galleria mellonella* and induces a non-specific antimicrobial response. **J Med Microbiol**, v. 60, p. 189-96, 2011.

KIM, T.; REITMAIR, A. Non-Coding RNAs: functional aspects and diagnostic utility in oncology. **Int J Mol Sci**., v. 14, p. 4934-68, 2013.

KUBO, I.; XIAO, P.; KUBO A. Antifungal activity of octyl gallate: structural criteria and mode of action. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 11, n. 3, p. 347-50, 2001.

LACAZ, C. S. *Paracoccidioides brasiliensis*: morphology; evolutionary cycle; maitenance during saprophytic life; biology; virulence; taxonom. In: FRANCO, M.F.; LACAZ, C.S.; RESTREPO, A.; Del NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press, 1994.

LEWIS, R. E.; ALBERT, N. D.; KONTOYIANNIS, D. P. Comparison of the dose-dependent activity and paradoxical effect of caspofungin and micafungin in a neutropenic murine model of invasive pulmonary aspergillosis. **J Antimicrob Chemother**, v. 61, n. 5, p. 1140-4, 2008.

LI, D. D. et al. Using *Galleria mellonella-Candida albicans* infection model to evaluate antifungal agents. **Biol Pharm Bull**, v. 36, n. 9, p. 1482-7, 2013.

LIN, C. H. et al. Percutaneous absorption and antibacterial activities of lipid nanocarriers loaded with dual drugs for acne treatment. **Biol Pharm Bull**, v. 36, n. 2, p. 276-86, 2013.

LIPINSKI C. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 44, n.1, p. 235–49, 2000.

LIU, F. F. et al. Calcium signaling mediates antifungal activity of triazole drugs in the Aspergilli. **Fungal Genet Biol**, v. 81, p. 182-90, 2015.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. **Methods**, v. 25, p. 402-8, 2001.

LOCATELLI, C. et al. Ester derivatives of gallic acid with potential toxicity toward L1210 leukemia cells. **Bioorg Med Chem**, v. 16, n. 7, p. 3791-9, 2008.

LU, Y.; PARK, K. Polymeric micelles and alternative nanonized delivery vehicles for poorly soluble drugs. **Int J Pharm**, v. 453, n. 1, p 198–214, 2013.

MADHAVAN, D. et al. Cancer diagnosis and prognosis decoded by blood-based circulating microRNA signatures. **Front Genet,** v. 4, n. 116, 2013.

MAES, J. et al. Evaluation of 14 organic solvents and carriers for screening applications in zebrafish embryos and larvae. **PLoS One,** v. 7, n. 10, p. e43850, 2012.

MALUF, M. L. et al. Antifungal activity of ajoene on experimental murine paracoccidioidomycosis. **Rev Iberoam Micol***,* v. 25, p. 163-6, 2008.

MARINÉ, M. et al. The development of animal infection models and antifungal efficacy assays against clinical isolates of *Trichosporon asahii*, *T. asteroides* and *T. inkin*. **Virulence**, v. 6, n. 5, p. 476-86, 2015.

MARSH, E. K.; MAY, R. C. *Caenorhabditis elegans*, a model organism for investigating immunity. **Appl Environ Microbiol**, p. 2075–81, 2012.

MARTINEZ, R. Paracoccidioidomicose. In: SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. (eds). **Micologia Médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2004. p. 202-21.

MARTINEZ, R. et al. South American blastomycosis (paracoccidioidomycosis). In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. (eds). **Infectious Diseases**. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 1081–111.

MARTINEZ, R. et al. Epidemiology of paracoccidioidomycosis. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 57, p. 11-20, 2015.

MARTINS, C. V. et al. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. **J Antimicrob Chemother***,* v. 63, p. 337-9, 2009.

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

MAZA, P. K. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* induces secretion of IL-6 and IL-8 by lung epithelial cells. Modulation of host cytokine levels by fungal proteases. **Microbes Infect**, v. 14, p. 1077-85, 2012.

McGRATH, P.; LI, C. Q. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. **Drug Discov Today**, v. 13, p. 394-401, 2008.

MEGAW, J. et al. *Galleria mellonella* as a novel in vivo model for assessment of the toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquids. **Chemosphere**, v. 139, p. 197–201, 2015.

MENDES, A. I. et al. Miconazole-loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for local delivery to the oral mucosa: improving antifungal activity. **Colloids Surf B: Biointerfaces**, v. 111, p. 755–63, 2013.

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

MENDES-GIANNINI, M. J. S. et al. Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: recent advances. **Mycopathologia**, v. 165, p. 237–48, 2008.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. "Infecções Fúngicas". In: FERREIRA, A.W.; MORAES, S.L. eds. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

MERCER, T. R.; DINGER, M. E.; MATTICK, J. S. Long non-coding RNAs: insights into functions. **Nat Rev Genet**, v. 10, n. 3, p. 155-9, 2009.

MERISKO-LIVERSIDGE, E. M.; LIVERSIDGE, G. G. Drug Nanoparticles: Formulating poorly water-soluble compounds. **Toxicol Pathol**, v. 36, p. 1, p. 43–8, 2008.

MESA-ARANGO, A. C., SCORZONI, L.; ZARAGOZA, O. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. **Front Microbiol,** v. 3, p. 286. eCollection 2012.

MESA-ARANGO A. C. et al. The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the virulence of the fungal pathogen *Candida tropicalis* and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast. **Med Mycol**, v. 51, p. 461-72, 2013.

MESA-ARANGO, A. C. et al. The production of reactive oxygen species is a universal action mechanism of Amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 58, n. 11, p. 6627-38, 2014.

MILLET, A. C. M.; EWBANK J. J. Immunity in *Caenorhabditis elegans*. **Curr Opin Immunol**, v. 16, p. 4 –9, 2004.

MONK, C.E.; HUTVAGNER, G.; ARTHUR, J. S. C. Regulation of miRNA transcription in macrophages in response to *Candida albicans*. **PLoS One,** v. 5, n. 10, p. e13669, 2010.

MORAIS, M. C. C. et al. Suppression of TNF-α induced NFκB activity by gallic acid and its semi-synthetic esters: possible role in cancer chemoprevention. **Nat Prod Res**, v. 24, n. 18, p. 1758–65, 2010.

MUHAMMAD, S. A. et al. MicroRNA expression profiling of human respiratory epithelium affected by invasive Candida infection. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0136454, 2015.

MULLER, R. H.; MADER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 50, p. 161–77, 2000.

MYLONAKIS, E. et al. B. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 99, p. 15675-80, 2002.

MYLONAKIS, E. et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Infect Immun**, v. 73, n. 7, p. 3842–50, 2005.

NARANJO, T. W. et al. Combined itraconazole-pentoxifylline treatment promptly reduces lung fibrosis induced by chronic pulmonary paracoccidioidomycosis in mice. **Pulm Pharmacol Ther**, v. 24, p. 81-91, 2011.

NASTI, T. H.; KHAN, M. A.; OWAIS, M. Enhanced efficacy of pH-sensitive nystatin liposomes against *Cryptococcus neoformans* in murine model. **J Antimicrob Chemother**, v. 57, p. 349–52, 2006.

NI, B. et al. *Mycobacterium tuberculosis* decreases human macrophage IFN-γ responsiveness through miR-132 and miR-26a. **J Immunol,** v. 193, n. 9, p. 4537-47, 2014.

OECD. Guidelines for the testing of chemicals. Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France, 2013.

OKOLI, I. et al. Identification of antifungal compounds active against *Candida albicans* using an improved high-throughput *Caenorhabditis elegans* assay. **Plos One,** v. 4, n. 9, p. e7025, 2009.

OSTROSKY-ZEICHNER, L. et al. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. **Nat Rev Drug Discov**, v. 9, p. 719-27, 2010.

OW, Y. Y.; STUPANS, I. Gallic acid and gallic acid derivatives: effects on drug metabolizing enzymes. **Curr Drug Metab,** v. 4, n. 3, p. 241-8, 2003.

PARDEIKE, J. et al. Development of an Itraconazole-loaded nanostructured lipid carrier (NLC) formulation for pulmonary application. **Int J Pharm**, v. 419, p. 329–38, 2011.

PARNG, C. et al. Zebrafish: a preclinical model for drug screening. **Assay Drug Dev Technol**, v. 1, p. 41-8, 2002.

PETERSON, R. T. Use of non-mammalian alternative models for neurotoxicological study. **NeuroToxicol.**, v. 29, p. 546–55, 2008.

PETRIKKOS, G.; SKIADA, A. Recent advances in antifungal chemotherapy. **Int J Antimicrob Agents**, v. 30, n. 2, p. 108-17, 2007.

PINZAN, C. F. et al. Immunological basis for the gender differences in murine *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **PLoS One**, v. 5, n. 5, p. e10757, 2010.

PUKKILA-WORLEY, R. et al. *Candida albicans* hyphal formation and virulence assessed using a *Caenorhabditis elegans* infection model. **Eukaryot Cell**, v. 8, p. 1750-8, 2009.

RANG, H. P.; DALE, M. M. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RAJARAM, M. V. et al. *Mycobacterium tuberculosis* lipomannan blocks TNF biosynthesis by regulating macrophage MAPK-activated protein kinase 2 (MK2) and microRNA miR-125b. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 108, p. 17408–13, 2011.

REID, G.; KIRSCHNER, M. B.; VAN ZANDWIJK, N. Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 80, p. 193-208, 2011.

RIZZO L. Y. et al. *In Vivo* Nanotoxicity Testing using the Zebrafish Embryo Assay. **J Mater Chem B Mater Biol Med**, v. 1, 2013.

RUEDA, C.; CUENCA-ESTRELLA, M.; ZARAGOZA, O. Paradoxical growth of *Candida albicans* in the presence of caspofungin is associated with multiple cell wall rearrangements and decreased virulence. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 2, 1071-83, 2014.

RUSSELL, W.; BURCH, R. **The Principles of Humane Experimental Technique**. London: Methuen, 1959.

SABINA, S. et al. Germline hereditary, somatic mutations and microRNAs targeting-SNPs in congenital heart defects. **J Mol Cell Cardiol**, v. 60, p. 84-89, 2013.

SAEKI, et al. Apoptosis-inducing activity of lipid derivatives of gallic acid. **Biol Pharm Bull**, v. 23, n. 11, p. 1391-4, 2000.

SALGADO-SALAZAR, C. et al. The human fungal *pathogen Paracoccidioides brasiliensis* (Onygenales: Ajellomycetaceae) is a complex of two species: phylogenetic evidence from five mitochondrial markers. **Cladistics**, v. 26, p. 613-24, 2010.

SAN-BLAS, G. et al. Primers for clinical detection of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Clin Microbiol**, v. 43, p. 4255-7, 2005.

SANGALLI-LEITE, F. et al. Synergistic effect of pedalitin and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans* by *in vitro* and *in vivo* evaluation**. Int J Antimicrob Agents**, v. 48, n. 5, p. 504-11, 2016.

SARDI, J. C. O. et al. Substâncias naturais com atividade antifúngica. In: SANTOS, L.C.; FURLAN, M.; AMORIM, M.R.. Eds. **Produtos Naturais Bioativos**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2016. p. 297-328.

SAVI, L. A. et al. Evaluation of anti-herpetic and antioxidant activities, and cytotoxic and genotoxic effects of synthetic alkyl-esters of gallic acid. **Arzneimittelforschung**, v. 55, n. 1, p. 66-75, 2005.

SCORZONI, L. et al. Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility *in vitro*. **Plos One**, v. 8, n. 3, p. e60047, 2013.

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.

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

SHARP, P. A. The centrality of RNA. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 577-80, 2009.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Consenso em paracoccidioidomicose. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39, n. 3, 2006.

SHU, C.; SUN, L.; ZHANG, W. Thymol has antifungal activity against *Candida albicans* during infection and maintains the innate immune response required for function of the p38 MAPK signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. **Immunol Res**, v. 64, p. 1013–24, 2016.

SHUKLA, G. C.; SINGH, J.; BARIK, S. MicroRNAs: Processing, maturation, target recognition and regulatory functions. **Mol Cell Pharmacol**, v. 3, p. 83-92, 2011.

SILVA, J. A. et al. Estudo de liberação e permeação *in vitro* do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão *gel-like*. **Quím Nova**, v. 32, n. 6, p. 1389-93, 2009.

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

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

SINGH, S. et al. Development and evaluation of ultra-small nanostructured lipid carriers: novel topical delivery system for athlete's foot. **Drug Deliv Transl Res**, v. 6, p. 38–47, 2016.

SOUZA, A. C. et al. Activity and in vivo tracking of Amphotericin B loaded PLGA nanoparticles. **Eur J Med Chem**, v. 95, p. 267-76, 2015.

STRIPPOLI, V. et al. Propyl gallate increases *in vitro* antifungal imidazole activity against *Candida albicans*. **Int J Antimicrob Agents**, v. 16, n. 1, p. 73-6, 2000.

SULSTON, J.; HODGKIN J. **The nematode *Caenorhabditis elegans***. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.

SUN, L.; LIAO, K.; WANG, D. Effects of magnolol and honokiol on adhesion, yeast-hyphal transition, and formation of biofilm by *Candida albicans*. **PLoS One,** v. 10, n. 2, p. e0117695, 2015.

TEIXEIRA, M. M. et al. *Paracoccidioides* Species Complex: Ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 10, p. e1004397, 2014a.

TEIXEIRA, M. M. et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. **Med Mycol**, v. 52, p. 19-28, 2014b.

THOMAZ, L. et al. Experimental paracoccidioidomycosis: alternative therapy with ajoene, compound from *Allium sativum*, associated with sulfamethoxazole/trimethoprim. **Med Mycol**, v. 46, p. 113-8, 2008.

THOMAZ, L. et al. *Galleria mellonella* as a model host to study *Paracoccidioides lutzii* and *Histoplasma capsulatum*. **Virulence**, v. 4, n. 2, p139-146, 2013.

TÖRMÄKANGAS, L. et al. *In vivo* treatment of acute *Chlamydia pneumoniae* infection with the flavonoids quercetin and luteolin and an alkyl gallate, octyl gallate, in a mouse model. **Biochem Pharmacol,** v. 70, n. 8, p. 1222-1230, 2005.

TZU-PIN L. et al. MiRSystem: An Integrated System for Characterizing Enriched Functions and Pathways of MicroRNA Targets. **PLoS One**, v. 7, n.8, p. e42390, 2012.

ULAAH, I. et al. Identification and characterization of the insecticidal toxin “makes caterpillars floppy” in *Photorhabdus temperata* M1021 using a cosmid library. **Toxins**, v. 6, n. 7, p. 2024-40, 2014. 1 fotografia.

VAQUERO, M. J.; ALBERTO, M. R.; DE NADRA, M. C. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. **Food Control**, v. 18, n. 2, p. 93-101, 2007.

VARSHOSAZ, J. et al. Comparing different sterol containing solid lipid nanoparticles for targeted delivery of quercetin in hepatocellular carcinoma. **J Liposome Res**, v. 24, n. 3, p. 191–203, 2014.

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

VERMA, P. et al. Circulating MicroRNAs: Potential and Emerging Biomarkers for Diagnosis of Human Infectious Diseases. **Front Microbiol**, v. 7:1274, 2016.

VIDAL, M. S. et al. Serological diagnosis of paracoccidioidomycosis: high rate of inter-laboratorial variability among medical mycology reference centers. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, p. e3174, 2014.

VOLTAN, A. R. et al. Fungal diseases: could nanostructured drug delivery systems be a novel paradigm for therapy? **Int J Nanomedicine**, v.11, p. 3715-30, 2016.

WEILAND, M. et al. Small RNAs have a large impact: circulating microRNAs as biomarkers for human diseases. **RNA Biol**, v. 9, p. 850-59, 2012.

WEYHERS, H. et al. Solid lipid nanoparticles (SLN) - effects of lipid composition on *in vitro* degradation and *in vivo* toxicity. **Pharmazie**, v. 61, p. 539–44, 2006.

ZHANG, B. et al. Hsa-miR-132 regulates apoptosis in non-small cell lung cancer independent of acetylcholinesterase. **J Mol Neurosci**, v. 53, n. 3, p. 335-44, 2013.

ZHANG, H. et al. Identification of serum microrna biomarkers for tuberculosis using RNA-seq. **PloS One**, v. 9, n. 2, p. e88909, 2014.

ZHANG, J. et al. Curcumin promotes apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through miR-186* signaling pathway. **Oncol Rep**, v. 24, p. 1217-23, 2010.