



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 à 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 paracoccidiodomicose: 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 JOSÉ SOARES MENDES GIANNINI



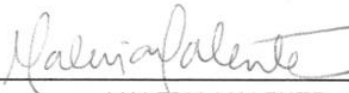
DANIEL DE ASSIS SANTOS



NÁDIA REZENDE BARBOSA RAPOSO



CLAUDIA VIANA MAURER MORELLI



VALÉRIA 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 memoriam*) 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 paracoccidiodomicose 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 <i>Caenorhabditis elegans</i> (A), <i>Galleria mellonella</i> (B) e zebrafish (C).....	32
Figura 3.	Curva de sobrevivência (A) e curva concentração-resposta (B) do <i>C. elegans</i> infectado com <i>C. albicans</i> (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 <i>C. elegans</i> infectado com <i>C. albicans</i> (Ca) tratado com ácido gálico (GAL) e galatos de hexila (HEX), octila (OCT) e dodecila (DOD).	61
Figura 6.	Larvas de <i>C. elegans</i> 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 <i>G. mellonella</i> infectadas com <i>P. brasiliensis</i> (Pb) e <i>P. lutzii</i> (Pl) tratadas com diferentes doses de anfotericina B (AMB) e itraconazol (ITRA).....	70
Figura 10.	Carga fúngica de larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas com <i>P. brasiliensis</i> (Pb) e <i>P. lutzii</i> (Pl) tratadas com 2 mg/Kg de anfotericina B (AMB) e 44 mg/Kg de itraconazol (ITRA).....	73
Figura 11.	Avaliação histopatológica de <i>G. mellonella</i> após 48 h (40x). (A) Larva não infectada; (B) Larva infectada com <i>P. brasiliensis</i> e tratada com (C) anfotericina B 2 mg/Kg e (D) itraconazol 44 mg/Kg; (E) Larva infectada com <i>P. lutzii</i> e tratada com (F) anfotericina B 2 mg/Kg e (G) itraconazol 44 mg/Kg.....	74
Figura 12.	Densidade de hemócitos de larvas de <i>G. mellonella</i> não infectadas (PBS) e infectadas com <i>P. brasiliensis</i> (Pb) e <i>P. lutzii</i> (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 <i>G. mellonella</i> infectadas com <i>P. brasiliensis</i> (Pb) e <i>P. lutzii</i> (Pl) tratadas com 160 mg/Kg dos galatos de octila (OCT) e dodecila (DOD).....	77
Figura 14.	Carga fúngica de larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas com <i>P. brasiliensis</i> (Pb) e <i>P. lutzii</i> (Pl) tratadas com 160 mg/Kg dos galatos de octila (OCT) e dodecila (DOD).....	77
Figura 15.	Densidade de hemócitos de larvas de <i>G. mellonella</i> não infectadas (PBS) e infectadas com <i>P. brasiliensis</i> (Pb) e <i>P. lutzii</i> (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 <i>P. brasiliensis</i> (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 <i>G. mellonella</i> infectadas com <i>P. brasiliensis</i> 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 <i>P. brasiliensis</i> (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 <i>Paracoccidioides</i> 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- <i>Paracoccidioides</i> estão envolvidos.....	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) do ácido gálico e seus derivados ésteres de alquila contra <i>C. albicans</i> e espécies de <i>Paracoccidioides</i>	59
Tabela 2.	Concentração letal 50% ($\mu\text{g/mL}$) 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 - $\mu\text{g/mL}$) do galato de octila (OCT) e galato de dodecila (DOD) associados a um sistema lipídico nanoestruturado (SLN) contra espécies de <i>Paracoccidioides</i>	88
Tabela 6.	Concentração inibitória 50% (CI50 - $\mu\text{g/mL}$) 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 - $\mu\text{g/mL}$) 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 paracoccidioidomicose.....	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 <i>P. lutzii</i> 01.....	117
Tabela 12.	miRNAs diferencialmente expressos em células A549 (pneumócitos) infectados com <i>P. lutzii</i> 02.....	118
Tabela 13.	miRNAs diferencialmente expressos em células A549 (pneumócitos) infectados com <i>P. lutzii</i> 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
°C -	Graus Celsius
Ca -	<i>Candida albicans</i>
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 -	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PBS -	Phosphate buffered saline
PCM -	Paracoccidioidomicose
PCR -	Reação em cadeia da polimerase
PI -	<i>Paracoccidoides lutzii</i>
RENAMA -	Rede Nacional de Métodos Alternativos ao uso de animais
RISC -	Complexo de Indução de silenciamento do RNA

RNA -	Ácido ribonucléico
RNA ^m -	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
μ g -	Microgramas
μ L -	Microlitros
μ M –	Micromolar
vs -	Versus

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	21
1. INTRODUÇÃO	22
1.1. <i>Paracoccidioides</i> 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. <i>Caenorhabditis elegans</i>	34
1.5.2. <i>Galleria mellonella</i>	36
1.5.3. Zebrafish (<i>Danio rerio</i>).....	37
1.6. Pesquisa de microRNAs como potenciais biomarcadores para diagnóstico e tratamento	38
2. JUSTIFICATIVA	41
<i>PARTE I: Avaliação da atividade antifúngica e toxicidade de galatos de alquila em modelos animais alternativos e camundongos</i>	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 <i>C. elegans</i> 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 <i>G. mellonella</i> e fungos e avaliação de fármacos e compostos no modelo	46
4.6. Determinação da carga fúngica em <i>G. mellonella</i>	47
4.7. Avaliação histológica de <i>G. mellonella</i>	47
4.8. Determinação da densidade de hemócitos de <i>G. mellonella</i>	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 <i>in vitro</i> 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 <i>C. elegans</i> do ácido gálico e galatos.....	56
5.3. Toxicidade e eficácia em <i>G. mellonella</i> 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 <i>G. mellonella</i> 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 paracoccidiodomicose	110
9.2. MiRNAs na interação pneumócitos- <i>Paracoccidioides</i>	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-refringentes, 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

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 micelar 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 micelar 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 (BUIRAGO 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/trimetopim) (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 14 α -desmetilase, bloqueando a conversão do lanosterol em ergosterol. Tal fato altera a fluidez da membrana e, conseqüentemente, 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 micron, 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).

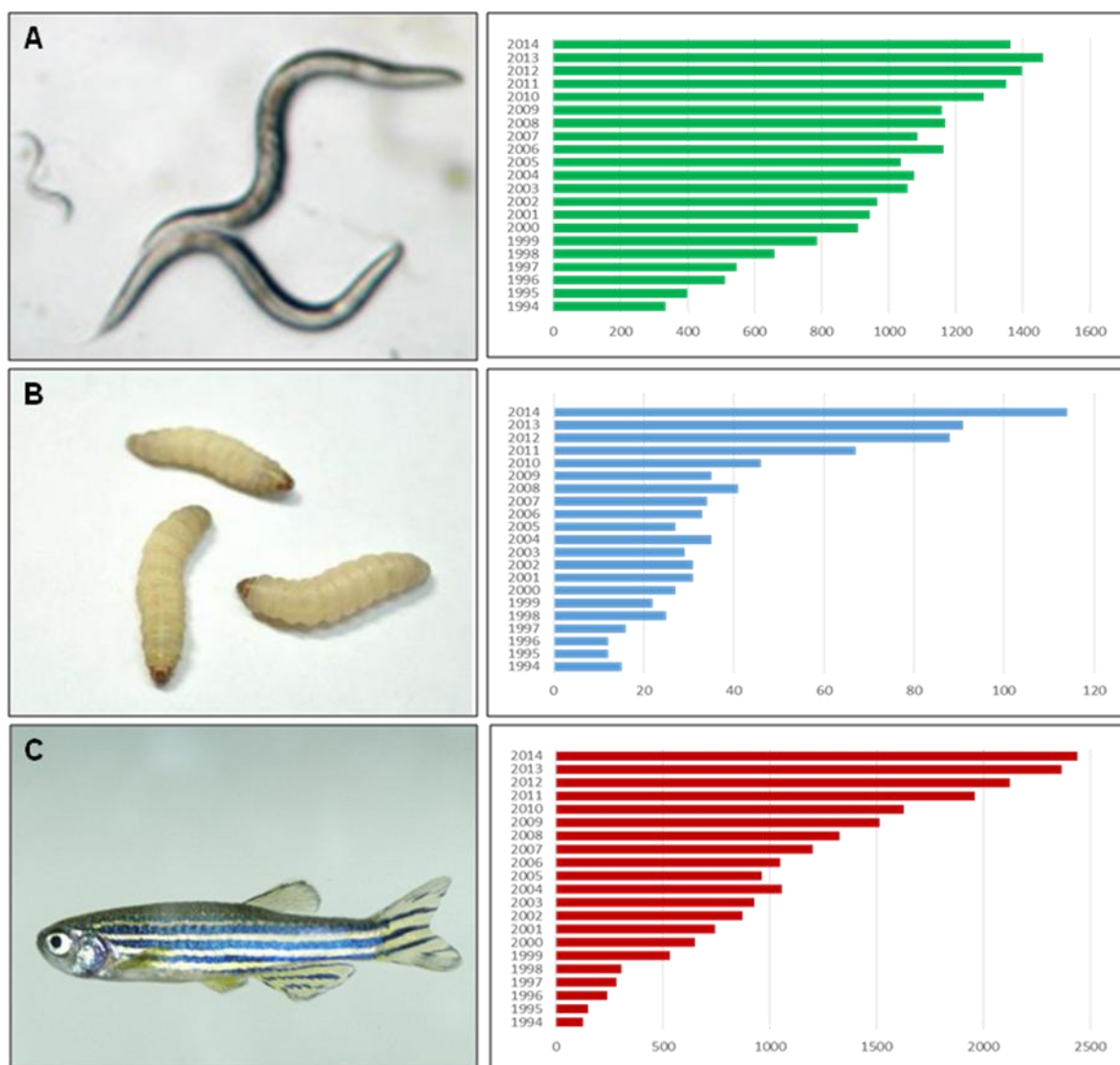
1.5. Pesquisa de modelos animais alternativos para o estudo da infecção fúngica e de antifúngicos

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 marneffe* (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 Cyprinidae, 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.

2. JUSTIFICATIVA

Nota-se que, atualmente, o arsenal de fármacos antifúngicos é limitado. Dessa forma, a pesquisa por compostos com maior segurança e eficácia antifúngica mostra-se promissora. Também se torna necessária a busca por modelos alternativos para análise da interação fungo-hospedeiro e do teste desses novos compostos, visto que o uso de mamíferos tem sido restrito. Além disso, o entendimento do processo de regulação gênica por microRNAs, por exemplo, traz a perspectiva de novos biomarcadores para diagnóstico e também de novas terapias nas doenças fúngicas sistêmicas como a PCM.

Para melhor compreensão, os dados resultantes desta tese foram divididos em duas partes: a primeira relacionada ao doutorado no Brasil, com foco no tratamento da PCM, sob a orientação da Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini e a segunda, referente ao doutorado sanduíche, com foco no diagnóstico da PCM, realizado no Instituto de Medicina Molecular da Universidade de Lisboa, Portugal, sob orientação do Prof. Dr. Francisco Javier Enguita.

PARTE I: Avaliação da atividade antifúngica e toxicidade de galatos de alquila em modelos animais alternativos e camundongos

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

No presente trabalho, pretendeu-se identificar potenciais novos fármacos para tratamento da PCM empregando ácido gálico e seus derivados ésteres de alquila com estudos *in vitro* e *in vivo* em modelos animais alternativos e convencional (camundongo).

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a interação entre fungos do gênero *Paracoccidioides* e o modelo animal alternativo *C. elegans*;
- Verificar a toxicidade e a eficácia antifúngica de fármacos, do ácido gálico e dos galatos de alquila contra *Paracoccidioides* sp no modelo *C. elegans*;
- Verificar a toxicidade do ácido gálico e dos galatos de alquila sobre o desenvolvimento de embriões de zebrafish;
- Desenvolver a interação entre fungos do gênero *Paracoccidioides* e o modelo animal alternativo *G. mellonella*;
- Verificar a toxicidade e a eficácia antifúngica de fármacos, do ácido gálico e dos galatos de alquila contra *Paracoccidioides* sp no modelo *G. mellonella*;

- Verificar a eficácia antifúngica do composto, com melhor atividade antifúngica e menor toxicidade nos modelos animais alternativos, contra *P. brasiliensis* em camundongos;
- Associar os galatos a um sistema lipídico nanoestruturado;
- Avaliar a atividade dos galatos de alquila associados a um sistema lipídico nanoestruturado *in vitro* contra *Paracoccidioides* sp.;
- Avaliar a toxicidade dos galatos de alquila associados a um sistema lipídico nanoestruturado *in vitro* em linhagens celulares pulmonar e hepática;
- Avaliar a toxicidade dos galatos de alquila associados a um sistema lipídico nanoestruturado sobre o desenvolvimento de embriões de zebrafish;
- Avaliar a toxicidade e a eficácia dos galatos de alquila associados a um sistema lipídico nanoestruturado contra *P. brasiliensis* no modelo *G. mellonella*;
- Verificar o peso, a toxicidade hepática e renal, bem como a eficácia de um galato de alquila associados a um sistema lipídico nanoestruturado contra *P. brasiliensis* em camundongos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Fungos e condições de cultivo

P. brasiliensis S1 isolado 18 (PCM crônica/São Paulo) e *P. lutzii*, Pb01-like- cepa ATCC MYA-826 (PCM aguda/Goiânia), foram mantidos em meio Fava-Netto a 37 °C. *C. albicans* ATCC 90028 foi mantida em ágar Sabouraud dextrose a 37 °C.

4.2. Fármacos e compostos

Os fármacos anfotericina B e itraconazol, e o composto ácido gálico foram obtidos comercialmente (Sigma-Aldrich). Os derivados ésteres (galato de hexila, galato de octila e galato de dodecila) foram sintetizados de acordo com Morais e colaboradores (2010) e fornecidos pelo Prof. Dr. Luis Octávio Regasini do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP – São José do Rio Preto. Os fármacos e compostos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) para o preparo das soluções estoque.

4.3. Interação entre *C. elegans* e fungos e avaliação de fármacos e compostos no modelo

Larvas de *C. elegans* cepa *glp-4;sek-1* cresceram em placas com agar NGM (nematode growth media), alimentadas com *E. coli* OP50 e incubadas a 15 °C de acordo com procedimentos padrões (SULSTON; HODGKIN, 1988). Para a realização dos experimentos, as larvas foram sincronizadas por tratamento com hipoclorito de sódio e ao atingirem o estágio L4 foram adicionadas no centro das placas com meio Brain Heart Infusion (BHI) suplementado com canamicina (90 µg/mL) e ampicilina (200 µg/mL) e que continham o inóculo de *P. brasiliensis* ou *P. lutzii* ou *C. albicans*. As placas foram incubadas a 25 °C por 3 h. Posteriormente, as larvas foram lavadas com tampão M9 (KH₂PO₄ 20 mM; Na₂HPO₄ 42 mM; NaCl 86 mM; MgSO₄ 1 mM) e um grupo de 15 a 20 larvas foi adicionado em cada poço da placas de 96 poços contendo tampão M9 60%, BHI 40%, 10 µg/mL de colesterol em etanol, 90 µg/mL de canamicina e 200 µg/mL de ampicilina. Diferentes concentrações do fármaco

controle anfotericina B (0,1; 0,5; 1 e 5 µg/mL), do ácido gálico e de seus derivados galatos de hexila, octila e dodecila (0,1; 1; 5; 10; 15; 30; 60 and 120 µg/mL) foram adicionadas aos poços. As placas foram mantidas a 25 °C e a morte das larvas foi avaliada diariamente por 4 dias, usando como critério sua mobilidade e sua forma (larvas com formato de vara foram consideradas mortas e com formato sinusoidal foram consideradas vivas). Três experimentos independentes foram realizados.

Além disso, no 4º dia, algumas larvas foram coradas com SYTOX® Green (Invitrogen) a uma concentração final de 1 µM e foram incubadas durante 15 min à temperatura ambiente num agitador horizontal a 120 rpm. As imagens foram capturadas no microscópio automatizado In Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare).

4.4. Ensaio de toxicidade dos compostos em embriões de zebrafish

Zebrafish wild type (*Danio rerio*) foram mantidos em um aquário com temperatura controlada ($28 \pm 0,5$ °C), num laboratório com um ciclo de 14 h de luz/10 h de escuro. A alimentação dos peixes foi realizada três vezes ao dia, sendo duas vezes com ração e uma com o crustáceo *Artemia salina*. Os peixes adultos foram colocados para acasalamento (relação macho/fêmea de 1:1 ou 1:2 ou 2:1) e os embriões foram recolhidos na criadeira. Os embriões foram lavados com meio embriônico (NaCl 10 mM; KCl 0,34 mM; CaCl₂.2H₂O 0,66 mM; MgCl₂.6H₂O 0,66 mM) adicionado de azul de metileno 0,00003% e colocados em placas de Petri. Aqueles com fertilização normal foram selecionados para o teste. Os embriões foram transferidos para placas de 96 poços (2 embriões/poço e 8 embriões/concentração) e diferentes concentrações do ácido gálico e dos seus derivados, galatos de hexila,

octila e dodecila foram adicionadas (0,1; 1; 5; 10; 15; 30; 60 e 120 µg/mL). A exposição aos compostos ocorreu 2 a 3 horas pós-fertilização (hpf). As placas foram mantidas a 28 °C e foram observados fenótipos de má formação como coagulação de óvulos fertilizados, falta de formação de somite, falta de desprendimento da cauda e falta de batimentos cardíacos às 5, 24 e 48 hpf (OECD, 2013). Três experimentos independentes foram realizados. O efeito dos compostos sobre o desenvolvimento dos embriões foi avaliado com auxílio de um microscópio invertido e imagens foram capturadas no microscópio automatizado In Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare). Os valores para a concentração letal 50% (CL50) foram calculados a partir da curva concentração-resposta.

4.5. Interação entre *G. mellonella* e fungos e avaliação de fármacos e compostos no modelo

Larvas de *G. mellonella* foram mantidas em recipientes de plástico em incubadoras verticais a 25 °C no escuro, e alimentadas com cera de abelhas e pólen. Grupos de 8 larvas com peso aproximado de 150 mg foram colocados em placas de Petri e incubados a 37 °C, na noite anterior aos experimentos. *P. brasiliensis* 18 e *P. lutzii* 01, cultivados em meio Fava Netto a 37 °C durante 4 - 5 dias, foram transferidos para meio líquido BHI suplementado com glicose 1% e cresceram durante 3 - 4 dias, em agitação a 150 rpm e 37 °C. Suspensões fúngicas de *P. brasiliensis* ou *P. lutzii* foram lavadas três vezes com tampão fosfato salina (PBS) acrescida de ampicilina 20 mg/L e também preparadas nesse tampão para que as concentrações na larva fossem 5×10^6 ; 10^6 e 5×10^5 células. A última pró-pata esquerda das larvas foi limpa

com etanol 70% e 10 µL das suspensões fúngicas foram injetadas nelas com auxílio de uma seringa Hamilton. Após uma hora da infecção, as larvas foram tratadas com 10 µL de diferentes doses de anfotericina B (0,5 a 2 mg/kg), itraconazol (5,5 a 44 mg/kg) e dos galatos de alquila (2 a 160 mg/Kg) através da inoculação na última pró-pata direita. Grupos de larvas não infectadas foram tratados com os fármacos e compostos para testar a toxicidade. As placas foram incubadas a 37 °C por 7 dias. A morte das larvas foi avaliada diariamente por inspeção visual da falta de movimento. No mínimo três experimentos independentes foram realizados.

4.6. Determinação da carga fúngica em *G. mellonella*

Algumas larvas de cada grupo estudado foram coletadas em diferentes tempos após o tratamento (1, 48 e 96 h). Cada larva foi lavada com etanol 70%, cortada em pequenos pedaços com auxílio de uma lâmina de bisturi e suspensa em 1 mL de PBS-ampicilina. Os tecidos foram transferidos para tubos cônicos (Falcon) com pérolas de vidro e foram homogeneizados utilizando um vórtex. Cada amostra foi diluída 100x em PBS e 100 µL da diluição resultante foram plaqueados em meio BHI suplementado com 4% de soro fetal bovino, 5% filtrado de Pb339 e 40 mg/L de gentamicina. As placas foram incubadas durante 10 dias a 37 °C. Após esse período, as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas.

4.7. Avaliação histológica de *G. mellonella*

Algumas larvas, 48 h após o tratamento com anfotericina B ou itraconazol, foram fixadas por imersão em formalina a 4% tamponada com fosfato. Um grupo de

larvas não infectadas e um grupo de larvas infectadas sem tratamento também foram utilizados. As amostras foram incorporadas em parafina, seccionadas em série com uma espessura de 5 microns e coradas utilizando solução de ácido periódico-Schiff (PAS). As imagens foram capturadas utilizando um microscópio óptico (ZEISS AxioCam HRc) (Magnificação: 40x).

4.8. Determinação da densidade de hemócitos de *G. mellonella*

Algumas larvas de cada grupo estudado foram coletadas em diferentes tempos após o tratamento (1 e 48 h). Como as larvas sem tratamento estavam debilitadas ou mortas em 96 h, não foi possível adquirir quantidade suficiente de hemolinfa nesse tempo para a análise. As amostras de hemolinfa foram recolhidas através de corte no abdômen larval e 10 µL foram diluídos em PBS gelado (1:20). A densidade de hemócitos foi estimada por contagem em uma câmara de Neubauer.

4.9. Infecção dos camundongos para a avaliação de um galato de alquila

A utilização de camundongos machos Balb/c no presente projeto foi aprovada pelo Comitê de ética em pesquisa da UNESP-Araraquara (Protocolo CEUA/FCF/CAR nº 21/2013). Os animais foram obtidos do Biotério Central da Universidade de São Paulo (USP – Campus Ribeirão Preto). Durante o experimento, eles foram mantidos com ciclo claro/escuro de 12 h com água e ração *ad libitum*. Para a infecção, animais com cerca de 25 g foram anestesiados por via intramuscular com 80 mg/kg de quetamina e 10 mg/kg de xilazina. Em seguida, 50 µL de uma suspensão fúngica com 3×10^5 células de *P. brasiliensis* 18 foi inoculada via intratraqueal. Trinta dias

após a infecção, os animais foram divididos em 5 grupos: tratado com PBS; tratado com itraconazol 5 mg/kg/dia; tratado com galato de dodecila 5 mg/kg/dia; tratado com galato de dodecila 50 mg/kg/dia. Um grupo não infectado e tratado com PBS também foi utilizado como controle. A administração dos tratamentos foi feita por via intraperitoneal (ip) durante 15 e 30 dias consecutivos. Após esse período, os camundongos foram eutanasiados com uma superdosagem de anestésico, seguida de deslocamento cervical, e seus pulmões retirados para contagem de UFC. Para isso os órgãos foram triturados em PBS com auxílio de um homogeneizador tipo potter e 100 µL foram plaqueados em meio sólido BHI suplementado com 4% de soro fetal bovino, 5% filtrado de Pb339 e gentamicina 40 mg/L. As placas foram incubadas a 37 °C por 10 dias. O número de colônias contadas foi expresso em UFC por grama de tecido.

4.10. Associação dos galatos ao sistema nanoestruturado lipídico

Os galatos de octila e dodecila foram selecionados para serem associados a um sistema lipídico nanoestruturado por motivos posteriormente detalhados na seção Resultados e Discussão.

O sistema nanoestruturado lipídico foi preparado com a seguinte composição: colesterol (fase oleosa), mistura de polioxietileno 23 lauril éter (Brij[®] 35) e fosfatidilcolina de soja (Epikuron[®] 200) 2:1 (tensoativo) e PBS (fase aquosa), baseada no trabalho de Formariz e colaboradores (2005) e Bonifácio e colaboradores (2015) com adaptações. As formulações foram preparadas da seguinte forma: em um frasco transparente transferiu-se a fase oleosa (FO) e o

sistema tensoativo (T). Construiu-se um diagrama de fases, fixando-se a proporção de tensoativo e fase oleosa, e procedendo a titulação com a fase aquosa (FA). A mistura foi preparada num banho de gelo com auxílio de um sonicador em haste (Q500 - QSonica®) com potência de 500 watts, amplitude de 20%, em modo descontínuo durante 10 min, com 30 s de incubação a cada minuto durante o processo de sonicação. Os galatos de octila e dodecila foram associados ao sistema lipídico nanoestruturado com auxílio do sonicador em haste durante 2 min, amplitude de 20% em modo descontínuo, com banho de gelo.

4.11. Caracterização dos galatos associados ao sistema lipídico nanoestruturado

A determinação do diâmetro das gotículas do sistema lipídico nanoestruturado foi realizada segundo metodologia descrita por Silva e colaboradores (2009) de correlação de fótons, usando equipamento de espalhamento dinâmico de radiação laser – Light Scattering – Brookhaven. Este é particularmente sensível para determinar pequenas mudanças no diâmetro médio, tais como aquelas devido às camadas adsorvidas na superfície da partícula ou pequenas variações no processo de manufatura. Quando um feixe de luz passa através de uma dispersão coloidal, as partículas ou gotas espalham a luz em todas as direções. É possível, então, observar flutuações tempo-dependentes na intensidade do espalhamento através de um detector que processa os dados e envia a um computador. A partir dessa técnica, calcula-se o raio hidrodinâmico das partículas coloidais da equação de Einstein-Stokes (Equação 1):

$$D = KT/6\pi\eta R_h$$

sendo: D = coeficiente de difusão das partículas; K = constante de Boltzmann ($1,3807 \times 10^{-23} \text{ Nm K}^{-1}$); T = temperatura absoluta (293,15 K); $\pi = 3,141592$; η = viscosidade ($1,002 \times 10^{-3} \text{ NM}^{-2}\text{s}$); R_h = raio hidrodinâmico.

O sistema lipídico nanoestruturado foi analisado em um analisador de gotículas. As amostras foram colocadas na câmara de análise de modo que o feixe de laser atravessasse a dispersão em toda a sua extensão. A temperatura do sistema foi mantida a 20 °C, o comprimento de onda do laser foi de 532 nm e o índice de refração foi de acordo com o índice observado para cada amostra analisada. Realizou-se 10 determinações do diâmetro e índice de polidispersidade (IPD) das gotículas de cada amostra (n=3), com a duração total de 5 min.

O sistema lipídico nanoestruturado foi também caracterizado quanto ao potencial zeta. A determinação foi realizada a partir da mobilidade eletroforética, utilizando equipamento Zetasizer Nano NS (Malvern Instruments), sendo que as análises foram realizadas 24 h após o preparo das formulações. As amostras foram previamente diluídas (10 $\mu\text{L/mL}$) com solução aquosa de KCl para manter uma constante de força iônica durante a análise. As amostras foram colocadas na célula eletroforética e foram realizadas, para cada amostra, 3 determinações do potencial de superfície, calculando-se a média e o desvio padrão.

4.12. Atividade fúngica *in vitro* dos galatos associados ao sistema lipídico nanoestruturado

O teste de sensibilidade por microdiluição foi realizado conforme descrito no documento M27 – A3 do The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI,

2008), com algumas modificações (De PAULA; SILVA et al., 2013). *P. brasiliensis* 18 e *P. lutzii* 01 foram cultivados em meio sólido Fava-Netto por 4 dias a 37 °C. A preparação do inóculo foi realizada em tampão fosfato salina (PBS) e ajustado para concentrações de 1×10^6 a 5×10^6 células/mL, com auxílio da câmara de Neubauer. Em seguida, foram realizadas diluições de 1:50 e 1:20 em meio RPMI 1640 com L-glutamina, acrescido de 2% de glicose e tamponado a pH 7,2 com 0,165 M de ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS). Os galatos de octila e dodecila sozinhos ou associados ao sistema lipídico nanoestruturado também foram diluídos em RPMI para obtenção de concentrações de 250 – 0,48 µg/mL nas placas de 96 poços. A suspensão fúngica (100 µL) foi transferida para placas que haviam sido preparadas com os compostos (100 µL). O controle positivo (100 µL de meio RPMI com 100 µL do inóculo) e o controle negativo (200 µL do meio RPMI) foram incluídos nas placas. O fármacos anfotericina B e itraconazol foram utilizados como controles. O solvente DMSO e o sistema lipídico nanoestruturado foram testados nas concentrações correspondentes às dos compostos. As placas foram incubadas com agitação (150 rpm) a 37 °C durante 48 h, protegidas da luz. Após esse período, o revelador Alamar Blue (Invitrogen's BioSource), cujo princípio ativo é a resazurina, foi adicionado e as placas foram incubadas com agitação (150 rpm) a 37 °C por mais 24 h. A leitura espectrofotométrica foi realizada em leitor de microplacas (Biotek) a 570-600 nm e a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada. Os compostos foram testados em duplicata e três experimentos independentes foram realizados.

4.13. Citotoxicidade dos galatos associados ao sistema lipídico nanoestruturado

As linhagens MRC5 (fibroblastos pulmonares) e HepG2 (células de hepatoma humano) foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro e cultivadas em garrafas próprias com meio DMEM enriquecido com 10% de soro fetal bovino e 2% de uma solução de antibióticos (estreptomicina, penicilina, gentamicina e anfotericina B). As garrafas foram incubadas à 37 °C com 5% de CO₂ até atingir a confluência celular. Posteriormente, as células foram retiradas através do uso de solução de tripsina, centrifugadas e contadas. Para o ensaio, as linhagens foram ressuspensas em seus meios de cultura para serem contadas na câmara de Neubauer, de forma a obter uma concentração de 5×10^5 células por poço da placa de microdiluição. Cem microlitros das suspensões de células foram semeados em cada poço de uma placa de 96 poços, a qual foi incubada por 24 h à 37 °C com 5% de CO₂ para permitir a adesão celular antes, obtendo pelo menos 80% de confluência. Soluções dos compostos (100 µL) em concentrações de 500 – 0,48 µg/mL foram adicionadas aos poços. O solvente DMSO e o sistema lipídico nanoestruturado foram testados nas concentrações correspondentes às dos compostos. As células foram expostas aos compostos por 24 e 48 h. Após esse período de tempo, 10 µL de resazurina 0,01% foram adicionados e as placas foram incubadas por 6 h. Após a incubação, a absorbância foi lida em leitor de microplacas (Biotek) e a concentração inibitória 50% (CI50) foi determinada. Os compostos foram testados em duplicata e três experimentos independentes foram realizados.

4.14. Modelos animais alternativos para a avaliação dos galatos associados ao sistema lipídico nanoestruturado

Os galatos de octila e dodecila associados ao sistema lipídico nanoestruturado foram testados em modelo zebrafish conforme o método anteriormente citado e os efeitos foram observados por um maior período de tempo (até 120 hpf).

A eficácia e toxicidade dos galatos de octila e dodecila associados ao sistema lipídico nanoestruturado também foram avaliadas no modelo *G. mellonella* conforme o método anteriormente citado e as curvas de sobrevivência foram construídas.

4.15. Infecção dos camundongos para a avaliação de um galato associado ao sistema lipídico nanoestruturado

Camundongos Balb/c machos com cerca de 25 g foram anestesiados por via intramuscular com 80 mg/kg de quetamina e 10 mg/kg de xilazina. Em seguida, 50 µL de uma suspensão fúngica com 3×10^5 células de *P. brasiliensis* 18 foi inoculada via intratraqueal. Um dia após a infecção, os animais foram divididos em 6 grupos: tratado com PBS; tratado com itraconazol 5 mg/kg/dia; tratado com galato de dodecila 10 mg/kg/dia; tratado com sistema lipídico nanoestruturado; tratado com sistema lipídico nanoestruturado + galato de dodecila 10 mg/kg/dia; um grupo não infectado e tratado com PBS utilizado como controle. A administração dos tratamentos foi feita por via intraperitoneal (ip) durante 20 dias consecutivos. No final do experimento, os camundongos foram eutanasiados com uma superdosagem de anestésico, seguida de deslocamento cervical, e seus pulmões retirados para contagem de UFC. Para isso os órgãos foram triturados em PBS com auxílio de um

potter e 100 µL foram plaqueados em meio sólido BHI suplementado com 4% de soro fetal bovino, 5% filtrado de Pb339 e gentamicina 40 mg/L. As placas foram incubadas a 37 °C por 10 dias. O número de colônias contadas foi expresso em UFC por grama de tecido. Dois experimentos independentes foram realizados com n = 3 a 4 animais/grupo em cada experimento.

4.16. Análise bioquímica e do peso dos animais

O sangue dos animais foi coletado através de punção cardíaca e centrifugado a 3500 rpm por 10 min a 25 °C (Centrifuge 5810R – Eppendorf). O soro obtido foi analisado para os parâmetros hepáticos, alanina aminotransferase (ALT) ou transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) e a aspartato aminotransferase (AST) ou transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e renais, uréia e creatinina. Essas análises bioquímicas foram realizadas no Núcleo de Atendimento à Comunidade (NAC) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, Araraquara, através de análise de química seca pelo equipamento Vitros 250 (Orto Clinical Diagnostics – Johnson & Johnson Company®). Os animais também foram pesados ao final do experimento.

4.17. Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada no programa Graph Pad Prisma 5 (La Jolla CA, EUA). As curvas de sobrevivência foram plotadas pelo método Kaplan-Meier e analisadas por Log-rank (Mantel-Cox). Os resultados de carga fúngica e densidade de hemócitos foram analisados por análise de variância

(ANOVA) com pós-teste de Bonferroni. O valor $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

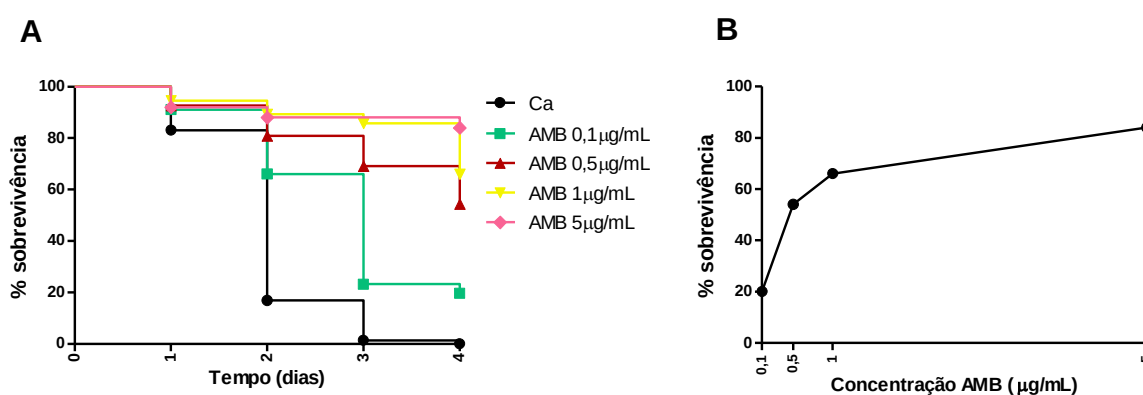
5.1. Toxicidade e eficácia em *C. elegans* do ácido gálico e galatos

O nematóide *C. elegans* tem sido utilizado para avaliação de virulência de vários fungos como *Candida*, *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Histoplasma* e *Penicillium* (HUANG et al., 2014; JONHSON et al., 2009; MYLONAKIS et al., 2002; PUKKILA-WORLEY et al., 2009; SCORZONI et al., 2013), entretanto a interação entre *C. elegans* e fungos do gênero *Paracoccidioides* não foi previamente descrita. Dessa forma, a primeira parte do teste consistiu em realizar esse objetivo. Para a análise da curva de sobrevivência do *C. elegans* com *P. brasiliensis* e *P. lutzii* foi utilizada a cepa AU37 duplo mutante *glp-4*; *sek-1*. Esta cepa mostra-se muito útil nos estudos de interação *C. elegans* – fungo, visto que a mutação *glp-4(bn2)* torna a larva incapaz de produzir progênie a 25 °C e a mutação *sek-1(km4)* aumenta a sensibilidade a vários patógenos (OKOLI et al., 2009). Larvas do *C. elegans* foram colocadas em contato com *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, seguindo os procedimentos utilizados para outros fungos, entretanto não foi observada a morte das larvas nos quatro dias de observação. Dois fatores podem ter dificultado a interação entre o fungo e o nematóide: o fato do fungo ser relativamente grande (5 a 25 µm) e o termodimorfismo, já que a temperatura na infecção em *C. elegans* não pode ser superior a 25 °C, e nessa temperatura o fungo passa para a morfologia filamentosa dificultando a ingestão e com isso, a infecção.

Como o *C. elegans* não se mostrou um modelo animal adequado para o estabelecimento da infecção por *Paracoccidioides* sp e o posterior tratamento com fármacos e com os galatos, optou-se então por utilizar o modelo amplamente descrito *C. elegans* - *C. albicans*, para o cumprimento desse objetivo. Estudos prévios utilizaram o modelo *C. elegans* para a avaliação de compostos antifúngicos convencionais e novos contra espécies de *Candida* (BREGER et al., 2007; COLEMAN et al., 2010; SCORZONI et al., 2013; SUN; LIAO; WANG, 2015). Além disso, uma correlação entre a atividade antifúngica em *C. elegans* e em modelo murino de candidíase foi observada (BREGER et al., 2007). Assim, larvas do *C. elegans* AU37 foram colocadas em contato com *C. albicans* por 3 h e posteriormente em contato com várias concentrações de anfotericina B (usada como controle) e do ácido gálico e dos galatos de hexila, octila e dodecila. As soluções estoque da anfotericina B e dos compostos (preparada em DMSO) foram diluídas em tampão M9, respeitando a concentração máxima de DMSO tolerado pelas larvas que é de 2% (BREGER et al., 2007; COLEMAN et al., 2010; OKOLI et al., 2009). Além disso, o DMSO foi testado como controle no *C. elegans* - *C. albicans*, nas mesmas concentrações presentes nos compostos, e não apresentaram nenhum efeito sobre o modelo (dados não mostrados). Na Figura 3 estão representados os resultados de curva de sobrevivência e curva concentração-resposta quatro dias pós tratamento. A maioria das larvas infectadas com *C. albicans* e não tratadas morreu no 2º dia. A anfotericina B aumentou significativamente o tempo de sobrevivência das larvas em todas as concentrações testadas de forma concentração dependente ($p < 0,0001$ em todos os casos). A porcentagem de sobrevivência das larvas infectadas com *C.*

albicans no 4º dia foi de 20; 54; 66 e 84% tratadas com as concentrações de 0,1; 0,5; 1 e 5 µg/mL de anfotericina B, respectivamente.

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 (n = 45 – 60 larvas/grupo)



Com a padronização do modelo no laboratório, os compostos foram selecionados para o teste: optou-se por utilizar o ácido gálico e os galatos de hexila, octila e dodecila, três derivados ésteres de alquila com diferentes tamanhos de cadeia carbônica (Figura 4). De PAULA; SILVA et al. (2014) testaram esses compostos previamente *in vitro* contra *C. albicans* ATCC 90028, *P. brasiliensis* 18 e *P. lutzii* 01 e os valores de CIM mostraram que o aumento da cadeia carbônica proporcionou um aumento da atividade antifúngica (Tabela 1). Outros estudos demonstraram ainda que o galato de propila apresentou efeito sinérgico com imidazol, itraconazol e fluconazol, reduzindo a concentração inibitória mínima desses fármacos contra *C. albicans* (D'AURIA et al., 2001; STRIPPOLI et al., 2000). Sobre o

mecanismo de ação, é sugerido por Fujita e Kubo (2002) que o galato de nonila é capaz de danificar a membrana plasmática fúngica, o que resulta em seu efeito fungicida. Além disso, o galato de decila parece atuar nas vias de n-glicosilação relacionadas à formação da parede celular fúngica (De PAULA e SILVA, 2016). Assim, no presente estudo pretendeu-se avançar no estudo do ácido gálico e dos galatos através da avaliação da atividade e toxicidade desses compostos em diferentes modelos *in vivo*.

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

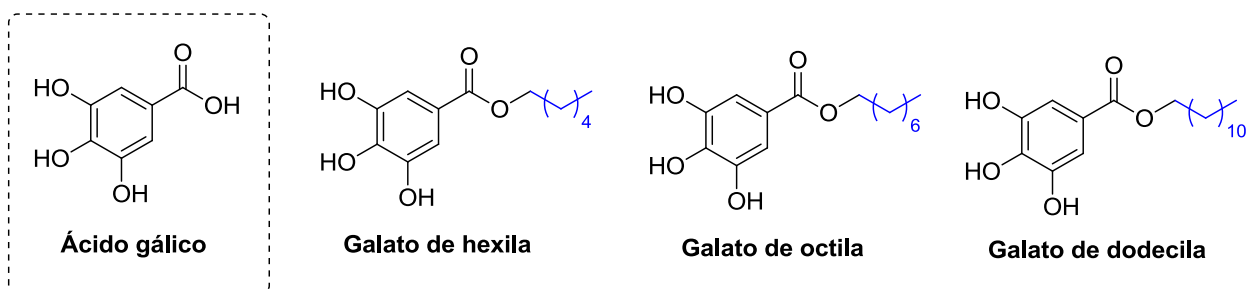


Tabela 1. Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) do ácido gálico e seus derivados ésteres de alquila contra *C. albicans* e espécies de *Paracoccidioides* (adaptado de De PAULA e SILVA et al., 2014)

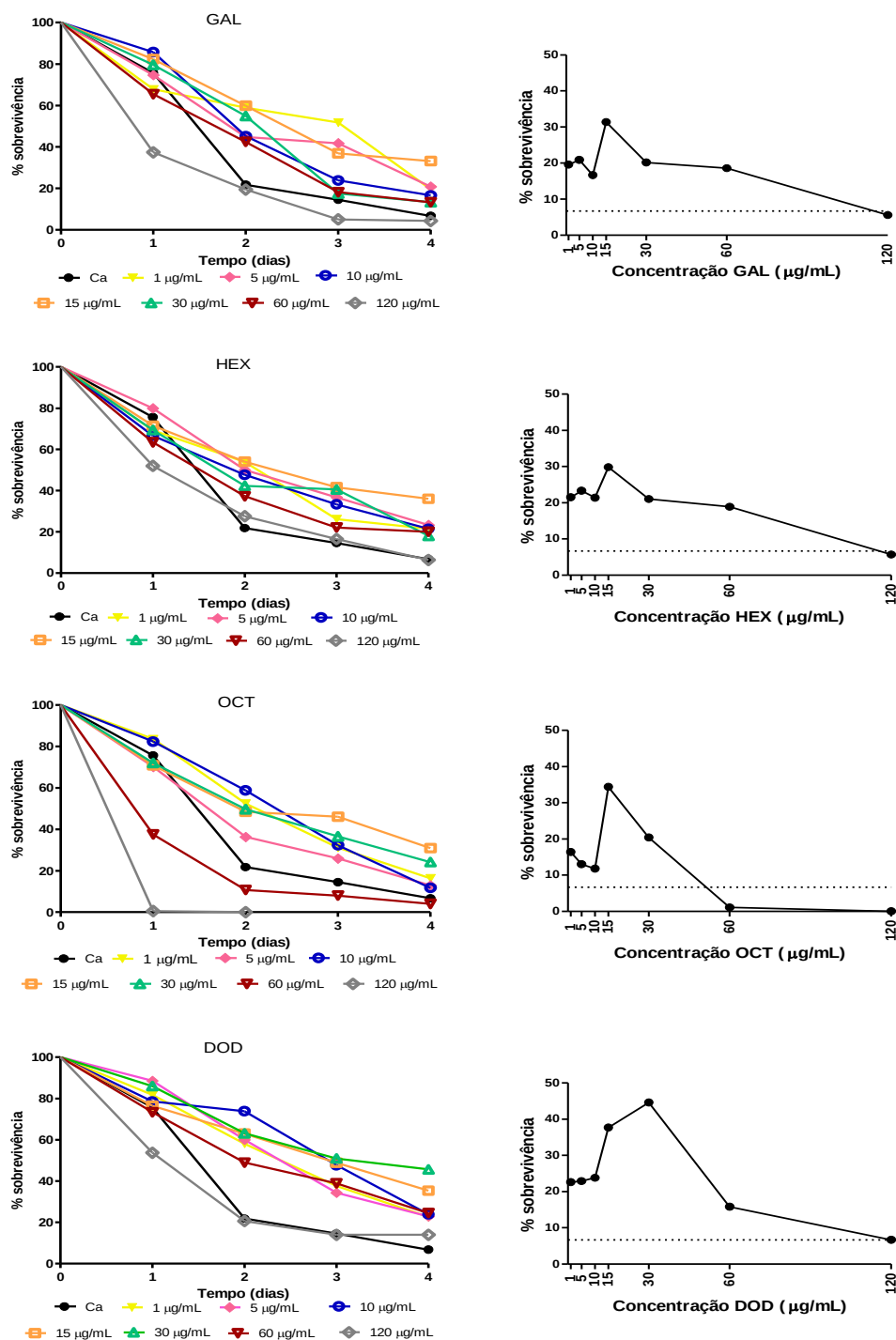
Composto	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	<i>P. brasiliensis</i> 18	<i>P. lutzii</i> 01
Ácido gálico	62,5	4	16
Galato de hexila	62,5	0,25	0,25
Galato de octila	8	0,125	0,015
Galato de dodecila	2	0,125	0,125

Na Figura 5 estão representados os resultados de curva de sobrevivência e curva concentração-resposta dos compostos após quatro dias. O tratamento com a menor concentração ($0,01 \mu\text{g/mL}$) do ácido gálico e dos galatos não protegeu as larvas de *C. elegans* da infecção com *C. albicans* (dados não apresentados). No entanto, nas outras concentrações (1, 5, 10, 15, 30 e $60 \mu\text{g/mL}$) os quatro compostos aumentaram significativamente a taxa de sobrevivência de *C. elegans* infectado com *C. albicans* ($p < 0,05$ em todos os casos). No final de quatro dias, o ácido gálico, o galato de hexila, o galato de octila e o galato de dodecila aumentaram a sobrevivência das larvas para 17-31%, 20-30%, 12-34% e 16-45% nas concentrações testadas, respectivamente. Assim, o galato de dodecila foi o composto mais eficiente para proteger as larvas da infecção fúngica aumentando a sobrevivência das mesmas em 45% a $30 \mu\text{g/mL}$. Estudos prévios mostraram que os galatos possuem propriedades farmacológicas mais favoráveis do que as

observados para o ácido gálico (LOCATELLI et al., 2008; SAVI et al., 2005), as quais foram correlacionadas ao caráter anfipático desses derivados. A fração hidrofóbica parece contribuir para a atividade, presumivelmente pelo aumento da afinidade pelas membranas celulares e consequente aumento da permeabilidade (SAEKI et al., 2000). Além disso, o aumento do comprimento da cadeia carbônica dos galatos resultou num aumento da atividade antifúngica *in vitro*. A CIM para *C. albicans* ATCC 90028 do ácido gálico e do galato de hexila foi de 62,5 µg/mL para ambos os compostos, enquanto que a CIM do galato de octila e do galato de dodecila foi de 8 e 2 µg/mL, respectivamente (De PAULA e SILVA et al., 2014) (Tabela 1). Assim, os perfis de atividades contra *C. albicans* do ácido gálico e dos galatos no modelo *in vivo* *C. elegans* correlacionaram-se muito bem com a atividade observada *in vitro*.

Outro ponto a ser considerado nos gráficos (Figura 5) diz respeito à toxicidade dos compostos. Alguns trabalhos têm descrito que a toxicidade pode ser observada de forma concomitante à eficácia antifúngica no modelo *C. elegans*-*C. albicans* (BREGER et al., 2007; COLEMAN et al., 2010; OKOLI et al., 2009). Nesse caso uma redução da taxa de sobrevivência das larvas em concentrações mais altas do composto testado pode significar que o mesmo seja tóxico nessas concentrações. No presente trabalho, a sobrevivência dos nematóides foi reduzida quando expostos à concentração de 120 µg/mL do ácido gálico e dos galatos de hexila e dodecila e às concentrações de 60 e 120 µg/mL do galato de octila, demonstrando ser esse o composto mais tóxico entre os quatro.

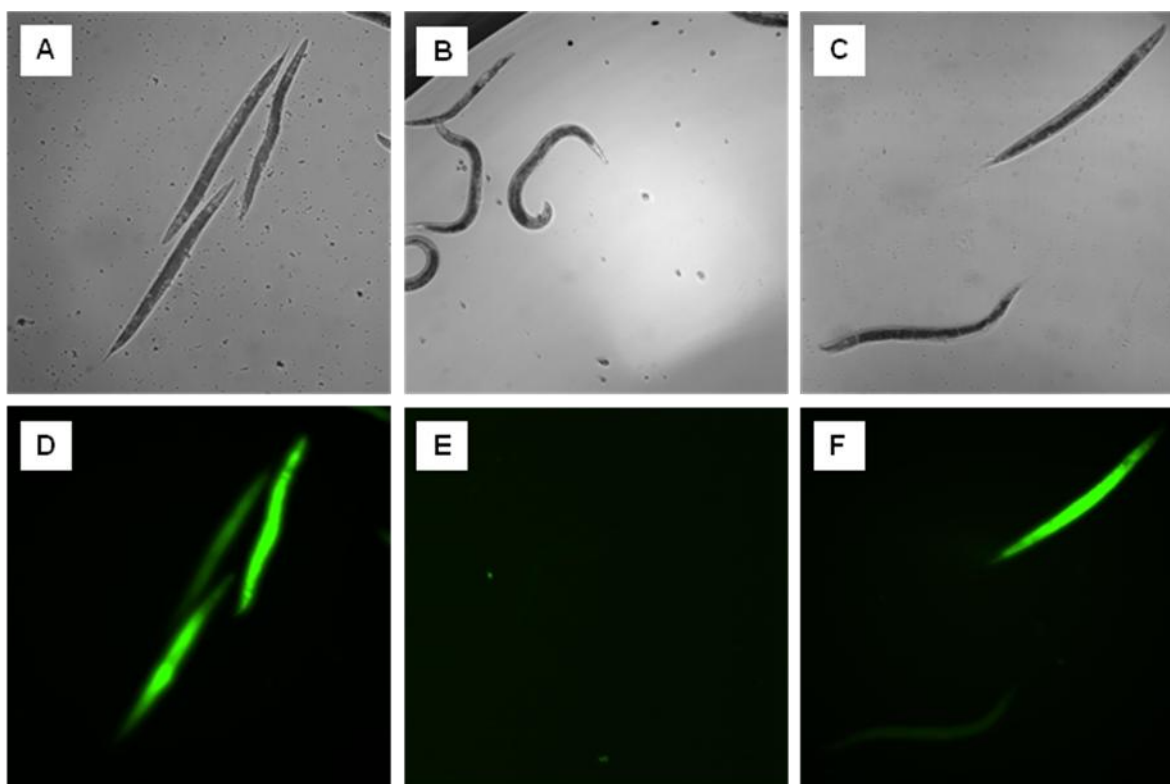
Figura 5. Curva de sobrevivência (esquerda) e curva concentração-resposta (direita) do *C. elegans* infectado com *C. albicans* (Ca) tratado com ácido gálico (GAL) e galatos de hexila (HEX), octila (OCT) e dodecila (DOD). N = 45 - 60 larvas/grupo



A linha tracejada na curva concentração-resposta representa a % de larvas infectadas e não tratadas.

Larvas viáveis com formato sinusoidal e mortas com formato de vara são mostradas na Figura 6. A coloração com SYTOX[®] Green contribuiu para identificar larvas de *C. elegans* mortas pela infecção ou pelo tratamento com concentrações mais elevadas dos compostos. A identificação é possível, pois esse fluoróforo se liga ao ácido nucléico dos organismos mortos, emitindo fluorescência verde (GOSAI et al., 2010).

Figura 6. Larvas de *C. elegans* viáveis e mortas (L4) nas imagens de campo claro (acima) e larvas mortas marcadas com SYTOX[®] Green nas imagens de fluorescência (abaixo). 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). Magnificação: 10 x



5.2. Toxicidade em zebrafish do ácido gálico e galatos

A avaliação da toxicidade reprodutiva e sobre o desenvolvimento também é importante no desenvolvimento de novos fármacos. Neste contexto, o zebrafish tem sido utilizado como um modelo animal rápido, fácil e eficiente para detectar efeitos potencialmente letais e teratogênicos de compostos (HE et al., 2014; RIZZO et al., 2013). Além disso, estudos têm demonstrado que as respostas à toxicidade dos compostos observadas em zebrafish são preditivas das respostas vistas em mamíferos (HE et al., 2014; McGRATH; LI, 2008; PARNG et al., 2002). Devido às vantagens do modelo, neste trabalho também foi avaliado os efeitos do ácido gálico e galatos em embriões de zebrafish.

Para realização do experimento com embriões de zebrafish, primeiro foi realizada uma padronização do número de embriões a ser utilizado em placas de 24 e 96 poços. Foram colocados 3 e 4 embriões com 1 mL de meio embriônico em cada poço da placa de 24; e 2 e 3 embriões com 200 µL de meio embriônico em cada poço da placa de 96. As maiores porcentagens de sobrevivência 48 horas pós-fertilização (hpf), foram alcançadas com 3 embriões em cada poço da placa de 24 e com 2 embriões na placa de 96. Uma taxa de sobrevivência acima de 80% é necessária para a realização adequada dos experimentos. Assim, optou-se por utilizar 2 embriões por poço na placa de 96 para o teste posterior, visto que apresenta uma taxa de sobrevivência dentro da estabelecida e se utiliza de menor volume dos compostos.

O ácido gálico e seus derivados foram testados nas mesmas concentrações utilizadas anteriormente para o modelo *C. elegans* - *C. albicans* (0,1; 1; 5; 10; 15; 30;

60 e 120 $\mu\text{g/mL}$). As soluções estoque dos compostos (preparada em DMSO) foram diluídas no meio embriônico, respeitando a concentração máxima de DMSO tolerado pelos embriões que é de 2% (MAES et al., 2012). Além disso, o DMSO foi testado como controle nos embriões, nas mesmas concentrações presentes nos compostos, e não apresentaram nenhum efeito tóxico sobre o modelo (dados não mostrados). Na Figura 7 estão representados os resultados de curva de sobrevivência e curva concentração-resposta 48 hpf. Além disso, os valores de CL50 (concentração letal 50%) foram calculados (Tabela 2). O ácido gálico não teve efeito tóxico nos embriões de zebrafish até 120 $\mu\text{g/mL}$ e o valor de CL50 não pode ser calculado. Para os outros compostos testados, o número de embriões afetados foi dependente da concentração. O galato de hexila e o galato de octila não demonstraram efeito tóxico sobre os embriões de zebrafish até 1 $\mu\text{g/mL}$ e apresentaram CL50 de 10 e 4,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O galato de dodecila não mostrou efeito tóxico nos embriões de zebrafish até 10 $\mu\text{g/mL}$ e apresentou CL50 de 40 $\mu\text{g/mL}$. Assim, o ácido gálico e o galato de dodecila tiveram a menor embriotoxicidade em comparação com os galatos de hexila e octila.

Figura 7. Curva de sobrevivência (esquerda) e curva concentração-resposta 48 hpf (direita) de embriões de zebrafish tratado com ácido gálico (GAL) e galatos de hexila (HEX), octila (OCT) e dodecila (DOD). N = 24 embriões/grupo

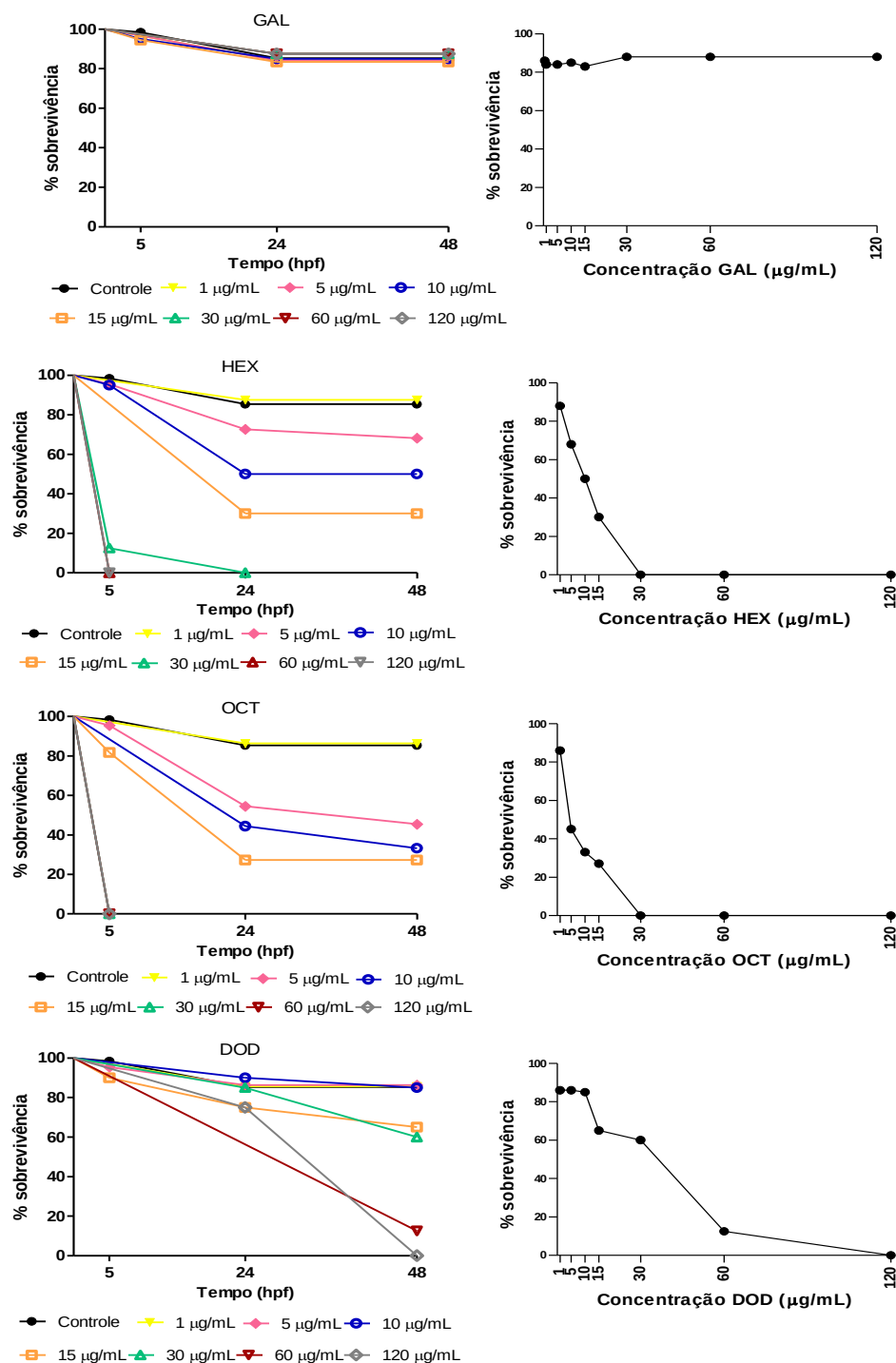


Tabela 2. Concentração letal 50% ($\mu\text{g/mL}$) do ácido gálico e seus derivados ésteres de alquila em modelo de embriões de zebrafish

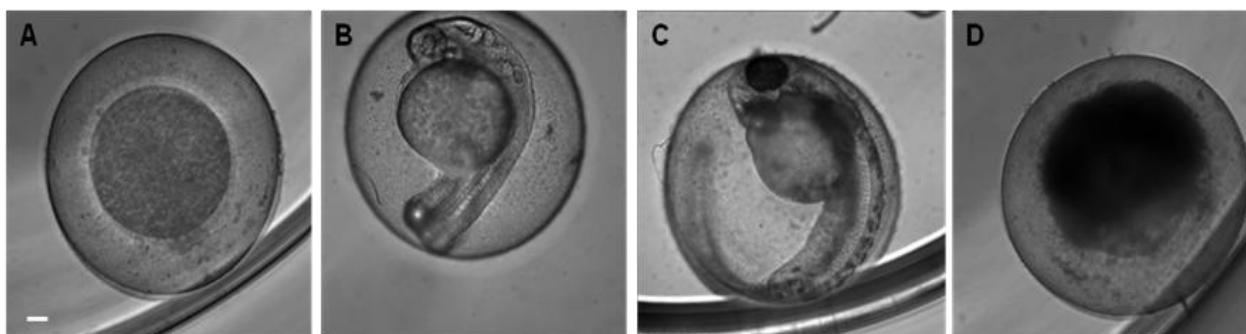
Composto	CL50 ($\mu\text{g/mL}$ - 48 hpf)
Ácido gálico	> 120
Galato de hexila	10
Galato de octila	4,5
Galato de dodecila	40

Assim como no modelo *C. elegans*, o galato de octila se mostrou como o composto mais tóxico em zebrafish. Outro ponto a ser considerado é que os valores de CL50 encontrados para os galatos de hexila e octila foram inferiores aos valores de CIM encontrados contra *C. albicans*, porém a CL50 do galato de dodecila foi de 40 $\mu\text{g/mL}$, o que é 20 vezes maior que a CIM (2 $\mu\text{g/mL}$), permitindo uma boa janela terapêutica e reforçando o potencial desse composto como futuro agente antifúngico. A toxicidade dos galatos nos embriões zebrafish foi influenciada pelo comprimento da cadeia carbônica. O galato com oito átomos de carbono na cadeia lateral (galato de octila) foi mais tóxico que o galato com seis átomos de carbono (galato de hexila) no zebrafish. No entanto, quando a cadeia carbônica foi maior (galato de dodecila), o composto se mostrou menos tóxico, sugerindo um fenômeno “cut-off” para o comprimento da cadeia. Esse fenômeno é observado em séries de compostos homólogos como os galatos, onde nota-se um aumento de determinada atividade ou

toxicidade com os sucessivos homólogos da série, até que em determinado ponto há uma perda desses efeitos (De PAULA e SILVA, 2014; KUBO; XIAO; KUBO, 2001).

O efeito dos compostos foi avaliado na fase de gástrula às 5 hpf e na fase de farínghula às 24 e 48 hpf. Nesses tempos, foram observados os parâmetros preconizados pela OECD (2013): coagulação de óvulos fertilizados, falta de formação de somite, falta de desprendimento da cauda e falta de batimentos cardíacos. Entretanto, os embriões apresentaram apenas o fenômeno de coagulação, um indicador de toxicidade letal, quando em contato com as concentrações tóxicas dos galatos (Figura 8). O estágio de desenvolvimento embrionário que se mostrou mais sensível e crítico à exposição dos compostos foi o de 24 hpf, provavelmente, por ser a fase onde ocorre extensiva proliferação celular e a organogênese, sendo mais passível de apresentar más formações estruturais.

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)



Magnificação: 10 x. A barra de escala representa 100 µm.

5.3. Toxicidade e eficácia em *G. mellonella* do ácido gálico e galatos

Recentemente, o modelo *G. mellonella* demonstrou ser adequado para a avaliação da infecção causada por *P. brasiliensis* ou *P. lutzii* (SCORZONI et al., 2015; THOMAZ et al., 2013). Entretanto, não há estudos prévios com agentes antifúngicos no modelo de *G. mellonella* - *Paracoccidioides*. Uma vantagem importante de *G. mellonella* para o estudo de fungos termodimórficos como *Paracoccidioides* spp. em relação a outros hospedeiros invertebrados tais como *C. elegans*, é a possibilidade de manter as larvas a temperatura de 37 °C. Outra vantagem é que o uso de larvas de *G. mellonella* como modelo permite estudos mais rápidos da doença e seu tratamento. Tipicamente, estudos de virulência e eficácia antifúngica contra *Paracoccidioides* sp têm sido realizados em modelos murinos, mas uma das limitações é o tempo necessário para o experimento (geralmente 30 dias para a infecção e 30 dias para o tratamento).

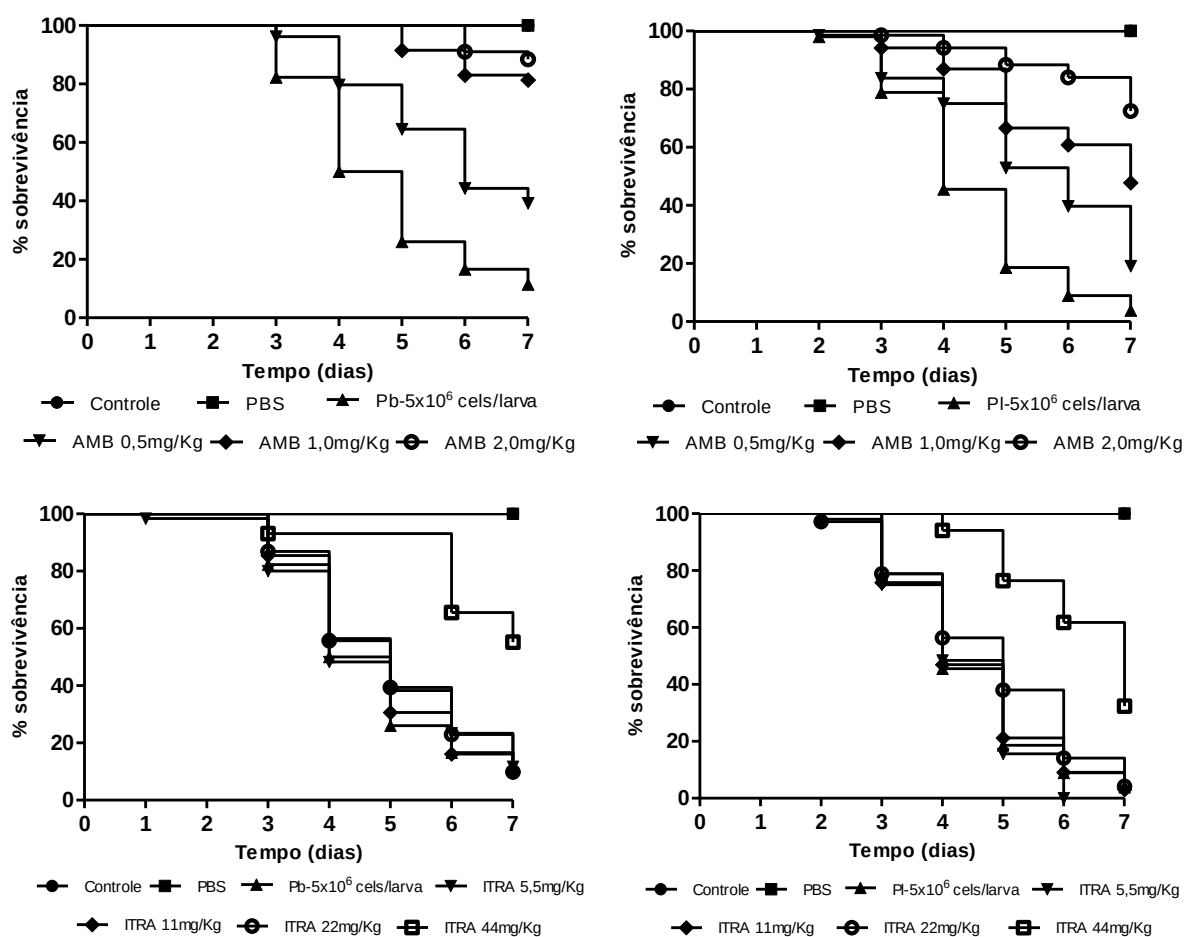
No presente estudo, primeiro foi definida a concentração mais adequada do inóculo fúngico para a infecção das larvas e posterior tratamento com os fármacos e os galatos. As concentrações de 5×10^6 ; 10^6 e 5×10^5 células/larva foram testadas e a morte das larvas mostrou-se dependente do número de células fúngicas injetadas. Durante os sete dias de observação após a infecção, poucas larvas de *G. mellonella* morreram com as concentrações 10^6 e 5×10^5 células/larva. Por outro lado, a maior parte das larvas de *G. mellonella* morreu com 5×10^6 células/larva, sendo que no final de sete dias, observou-se 11% e 4% de sobrevivência das larvas infectadas com *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, respectivamente. Além disso, os perfis das curvas de sobrevivência para ambas as espécies foram semelhantes neste modelo, conforme

descrito em estudo anterior do nosso grupo (SCORZONI et al., 2015). Assim, a concentração de 5×10^6 células/larva foi selecionada para os testes dos tratamentos antifúngicos.

Segundo, os fármacos anfotericina B e itraconazol, já utilizados na clínica contra PCM, foram testados no modelo. As soluções estoque dos fármacos e compostos (preparada em DMSO) foram diluídas em PBS, respeitando a concentração máxima de DMSO tolerado pelas larvas que é de 5% (LI et al., 2013). Além disso, o DMSO foi testado como controle, nas mesmas concentrações presentes nos compostos, e não apresentaram nenhum efeito tóxico sobre o modelo (dados não mostrados). Na Figura 9 estão representados os resultados de curva de sobrevivência de *G. mellonella* infectada com *P. brasiliensis* e *P. lutzii* e tratados com os fármacos. Em estudos prévios, os fármacos antifúngicos foram administrados dentro das primeiras 4 h após a infecção das larvas (FAVRE-GODAL et al., 2014; LI, et al., 2013; MARINÉ et al., 2015; SCORZONI et al., 2013) e aqui, selecionou-se administrar, anfotericina B e itraconazol, 1 h após a infecção. O tratamento com todas as doses de anfotericina B (0,5; 1 e 2 mg/kg) protegeu *G. mellonella* da infecção de ambas as espécies de *Paracoccidioides* de uma forma dose-dependente ($p < 0,0001$). A taxa de sobrevivência das larvas infectadas com *P. brasiliensis* aumentou para 39%, 81% e 88% quando tratadas com as doses de 0,5; 1 e 2 mg/kg de anfotericina B, respectivamente. Para as larvas infectadas com *P. lutzii* observou-se um aumento na sobrevivência para 19%, 48% e 72% quando tratadas com as doses de 0,5; 1 e 2 mg/kg de anfotericina B, respectivamente. O itraconazol não protegeu as larvas da infecção de ambas as espécies de *Paracoccidioides* nas doses

de 5,5; 11 e 22 mg/kg, mas aumentaram a sobrevivência de larvas infectadas com *P. brasiliensis* para 55% e a sobrevivência de larvas infectadas com *P. lutzii* para 32% na dose de 44 mg/kg ($p < 0,0001$). Os fármacos nas doses supracitadas também foram administrados em larvas não infectadas e não apresentaram efeito tóxico sobre as mesmas.

Figura 9. Curva de sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com *P. brasiliensis* (Pb, à esquerda) e *P. lutzii* (Pl, à direita) tratadas com diferentes doses de anfotericina B (AMB, acima) e itraconazol (ITRA, abaixo). N = 40-50 larvas/por grupo

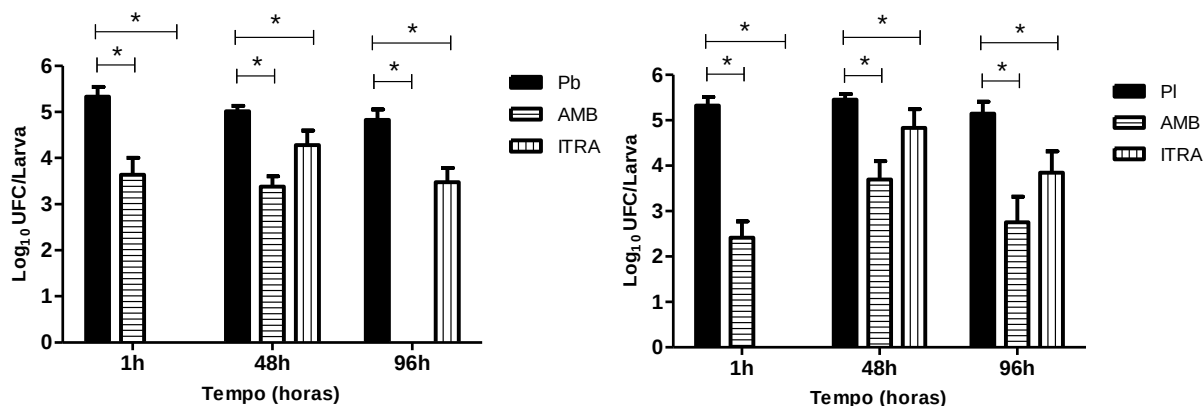


Posteriormente, algumas larvas infetadas com *P. brasiliensis* e *P. lutzii* e tratadas com as doses de 2 mg/Kg para anfotericina B e 44 mg/Kg para o itraconazol foram selecionadas para avaliação da carga fúngica nos tempos de 1; 48 e 96 h após o tratamento. Em estudo prévio com o modelo *G. mellonella*, não foi observado o crescimento de *P. lutzii* a partir das larvas utilizando o meio BHI acrescido de antibióticos (THOMAZ et al., 2013). Neste estudo, soro fetal bovino e filtrado de *P. brasiliensis* 339, fatores importantes para o crescimento de colônias de *Paracoccidioides* em modelos mamíferos (D'AURIA et al., 2001), foram adicionados ao meio BHI e as espécies de *Paracoccidioides* foram recuperadas com sucesso das larvas no final do experimento. Neste aspecto, colônias leveduriformes com aspecto característico: cerebriformes, de coloração creme e não aderente ao meio foram isoladas. Na Figura 10 é possível observar que os tratamentos com anfotericina B e o itraconazol reduziram significativamente o número de UFC das larvas desde a primeira hora após o tratamento ($p < 0,05$ para os dois casos). Além disso, pode-se notar que a anfotericina B apresentou maior efeito sobre a carga fúngica 96 h após o tratamento, na qual o número de UFC foi muito baixo e não pode ser detectada pelo método de plaqueamento. Por outro lado, o itraconazol apresentou UFC não detectável após 1 h de tratamento e nos tempos posteriores há um aumento das UFC.

A anfotericina B demonstrou ser eficaz contra *C. albicans*, *C. krusei* (SCORZONI et al., 2013), *C. neoformans* (MYLONAKIS et al., 2005) e *Fusarium spp* (COLEMAN et al., 2011) no modelo *G. mellonella* numa faixa de dose de 1 a 4 mg/kg, administrada uma única vez. No entanto, nesses estudos, a carga fúngica foi

avaliada em um único período de tempo, enquanto que no presente estudo, a carga fúngica foi avaliada em três tempos diferentes (1, 48 e 96 h) e um efeito fungicida da anfotericina B nas larvas infectadas foi observado. Diferentemente, um estudo anterior não observou efeito fungicida neste modelo contra *C. tropicalis* (MESA-ARANGO et al., 2013). Os azóis, como o fluconazol e o voriconazol, também mostraram atividade contra *C. neoformans* e espécies de *Candida*, respectivamente, em larvas de *G. mellonella* (MYLONAKIS et al., 2005; SCORZONI et al., 2013). Estudo prévio testou o itraconazol em uma dose de 100 mg/kg em combinação com inibidores da sinalização de cálcio contra *A. fumigatus* em *G. mellonella* (LIU et al., 2015). Neste trabalho, a eficácia do itraconazol sozinho na dose de 44 mg/kg foi avaliada em larvas infectadas e observou-se efeito fungistático. Por fim, o perfil dos gráficos de carga fúngica, além de serem justificados pela ação fungicida da anfotericina B e fungistática do itraconazol, podem ser atribuídos ao fato da anfotericina B ter distribuição lenta e do itraconazol ter distribuição mais rápida. No entanto, outros estudos fazem necessários para a compreensão da biodisponibilidade e eficácia destes fármacos no modelo de *G. mellonella*.

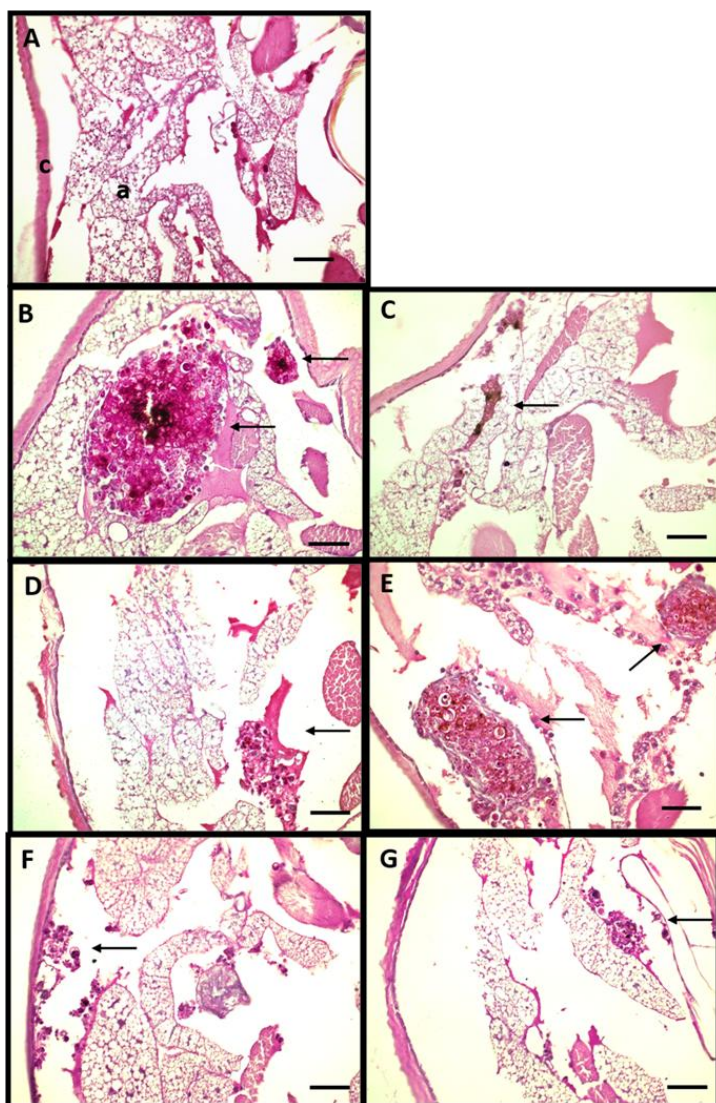
Figura 10. Carga fúngica de larvas de *G. mellonella* infectadas com *P. brasiliensis* (Pb, à esquerda) e *P. lutzii* (PI, à direita) tratadas com 2 mg/Kg de anfotericina B (AMB) e 44 mg/Kg de itraconazol (ITRA). A avaliação foi feita 1, 48 e 96 h após o tratamento. *p < 0,05 vs Pb ou PI



Algumas larvas não infectadas e infectadas com as espécies de *Paracoccidioides* e tratadas com 2 mg/kg de anfotericina B ou 44 mg/kg de itraconazol também foram selecionadas para avaliação histológica 48 h após o tratamento (Figura 11). As seções coradas com PAS mostraram que *P. brasiliensis* e *P. lutzii* estavam presentes principalmente sob a cutícula e nos corpos adiposos periféricos. Foi possível observar grandes agregados de fungos com recrutamento de hemócitos e pontos de melanização e estruturas como granulomas similarmente a outros estudos com *G. mellonella* - *Paracoccidioides* espécies (SCORZONI et al., 2015; THOMAZ et al., 2013) e em pulmões e lesões orais de mamíferos com PCM (BUISSA-FILHO et al., 2008; KAMINAGAKURA et al., 2007; THOMAZ et al., 2008). O tratamento com anfotericina B e itraconazol reduziu o número de UFC e pequenos agregados puderam ser observados nos corpos adiposos periféricos das larvas,

assim também como foi observado em modelos mamíferos (NARANJO et al., 2011; SOUZA et al., 2015).

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

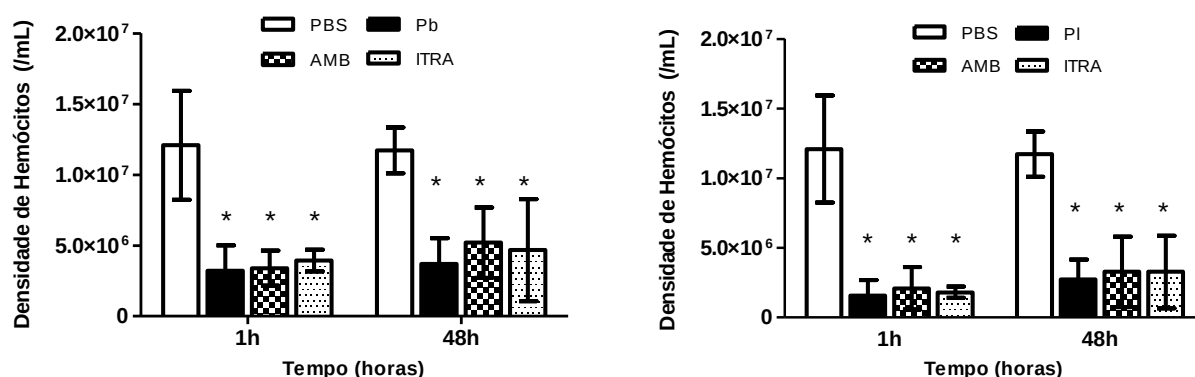


Barras indicam 50 μ m. Setas pretas indicam as células fúngicas; a = corpos adiposos; c = cutícula

Outra avaliação feita no presente estudo foi a quantificação dos hemócitos. A função dos hemócitos na resposta imune de *G. mellonella* é semelhante a das células da resposta imune inata dos mamíferos contra patógenos. Variação na densidade de hemócitos relaciona-se com a patogenicidade do fungo (BERGIN; BRENNAN; KAVANAGH, 2003). Na Figura 12 pode-se perceber que a infecção com 5×10^6 células/larva de *P. lutzii* e *P. brasiliensis* reduziu significativamente a densidade de hemócitos em comparação com larvas não infectadas pouco tempo após a infecção (1 h) e se manteve mesmo depois de 48 h. Tal comportamento também foi observado quando *G. mellonella* é infectada com *C. albicans* e *C. krusei* e pode ser justificado por dois motivos: os hemócitos migram da hemolinfa para os tecidos e a infecção por parasitas intracelulares leva à fagocitose e consequente rompimento dessas células (SCORZONI et al., 2013). Foi avaliado ainda o efeito dos tratamentos sobre a densidade de hemócitos, visto que alguns estudos têm demonstrado o papel imunomodulatório de antifúngicos como a caspofungina e a anfotericina B (KELLY; KAVANAGH, 2011; MESA-ARANGO, SCORZONI; ZARAGOZA, 2012). Entretanto, no presente trabalho, o tratamento com 2 mg/Kg de anfotericina B, 44 mg/Kg de itraconazol não alterou o número de hemócitos nos tempos avaliados (1 e 48 h).

Por fim, embora seja conhecido que *P. brasiliensis* e *P. lutzii* apresentam características morfológicas e genéticas diferentes, e que esses fatores trazem consequências no padrão da interação fungo-hospedeiro e no diagnóstico da PCM, a resposta aos tratamentos testados no modelo *G. mellonella* foi semelhante para as duas espécies.

Figura 12. Densidade de hemócitos de larvas de *G. mellonella* não infectadas (PBS) e infectadas com *P. brasiliensis* (Pb, à esquerda) e *P. lutzii* (PI, à direita) tratadas com 2 mg/Kg de anfotericina B (AMB) e 44 mg/Kg de itraconazol (ITRA). A avaliação foi feita 1 e 48 h após o tratamento. *p < 0,05 vs PBS



Após a padronização de *G. mellonella*, quanto às características da infecção e do tratamento com fármacos, os galatos de octila e dodecila foram selecionados para os testes nesse modelo. A escolha desses compostos ocorreu por apresentaram os melhores resultados quanto à eficácia antifúngica *in vitro* (De PAULA e SILVA et al., 2014). Ambos foram testados em várias doses desde 2 mg/kg (dados não apresentados), mas mesmo com 160 mg/kg não protegeram as larvas de *G. mellonella* da infecção por *Paracoccidioides* (Figura 13). Além disso, ambos os compostos não foram eficazes na redução das UFC (Figura 14) e não alteraram a densidade de hemócitos (Figura 15). Por outro lado, as mesmas doses dos compostos foram administradas em larvas não infectadas e não apresentaram efeito tóxico sobre as mesmas. Um estudo recente demonstrou que *G. mellonella* também

pode ser um modelo adequado e sensível para a avaliação da toxicidade de compostos (MEGAW et al., 2015).

Figura 13. Curva de sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com *P. brasiliensis* (Pb, à esquerda) e *P. lutzii* (Pl, à direita) tratadas com 160 mg/Kg dos galatos de octila (OCT) e dodecila (DOD). N = 40-50 larvas/grupo

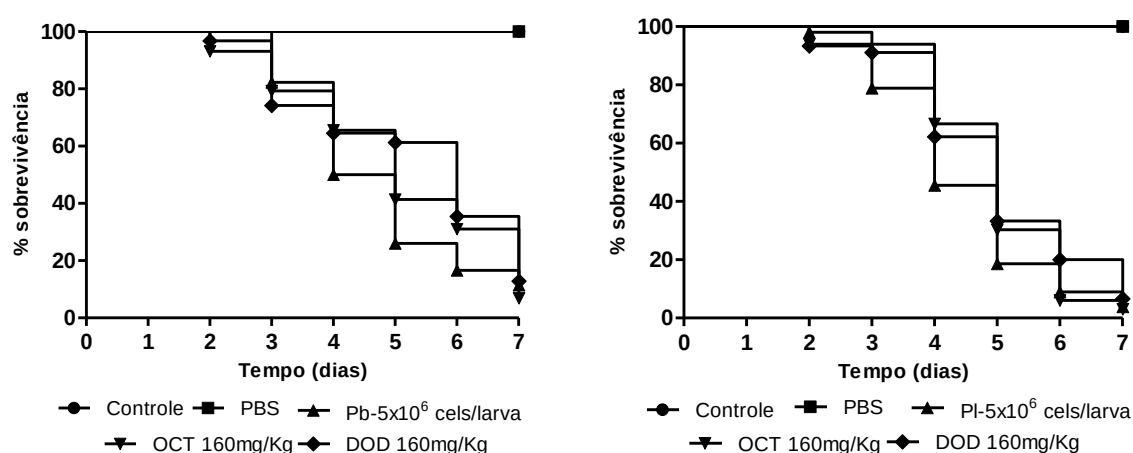


Figura 14. Carga fúngica de larvas de *G. mellonella* infectadas com *P. brasiliensis* (Pb, à esquerda) e *P. lutzii* (Pl, à direita) tratadas com 160 mg/Kg dos galatos de octila (OCT) e dodecila (DOD). *p < 0,05 vs Pb ou Pl

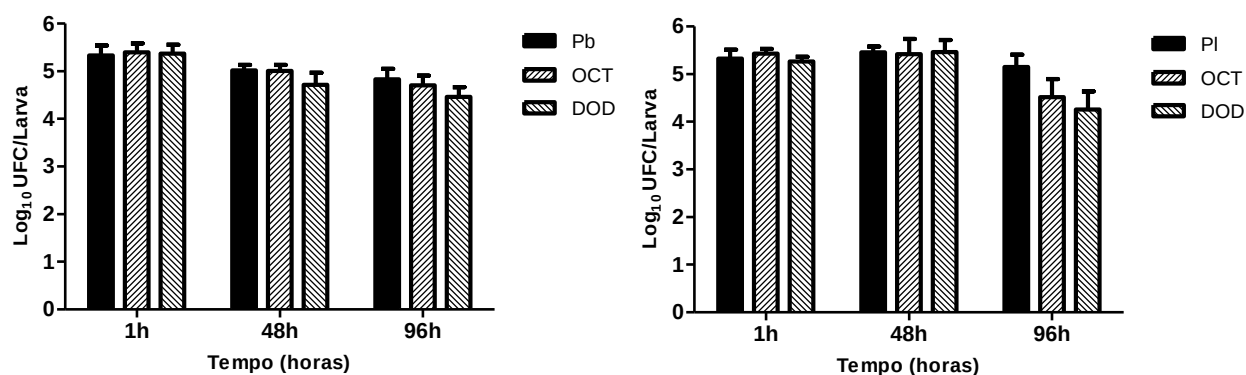
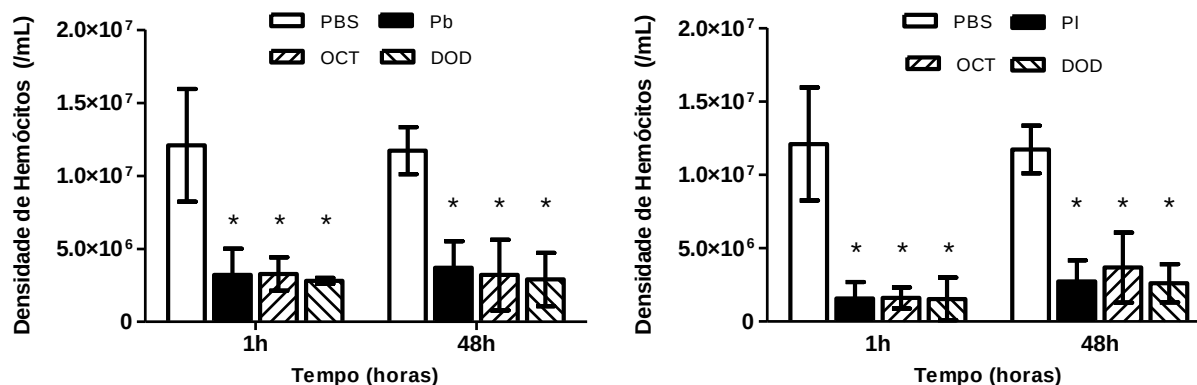


Figura 15. Densidade de hemócitos de larvas de *G. mellonella* não infectadas (PBS) e infectadas com *P. brasiliensis* (Pb, à esquerda) e *P. lutzii* (PI, à direita) tratadas com 160 mg/Kg dos galatos de octila (OCT) e dodecila (DOD). A avaliação foi feita 1 e 48 h após o tratamento. * $p < 0,05$ vs PBS



5.4. Eficácia em modelo murino do galato de dodecila

Com a percepção da necessidade de redução do número de mamíferos para a experimentação e então a consequente utilização de modelos animais alternativos para a triagem de novos compostos antifúngicos, a próxima etapa desse projeto consistiu na seleção de um dos compostos testados nos modelos anteriormente citados para o teste em modelo mamífero, a fim de se observar alguma correlação entre eles. No modelo *G. mellonella* – *Paracoccidioides*, os galatos de octila e dodecila não apresentaram eficácia antifúngica e nem toxicidade. Por outro lado, entre os compostos testados, o galato de dodecila apresentou melhor atividade *in vitro* contra *P. brasiliensis* e *P. lutzii*; melhor eficácia e menor toxicidade no modelo *C. elegans* – *C. albicans*; bem como, menor toxicidade no modelo de embriões de

zebrafish, sendo por esses critérios selecionado para realização de testes em modelo murino.

Neste estudo, utilizou-se a linhagem de camundongos BALB/c, que possui uma susceptibilidade intermediária à doença - PCM (CALICH et al., 1985). Os camundongos foram infectados com *P. brasiliensis* via intratraqueal e após 30 dias de infecção, o tratamento foi iniciado. No 15º dia após o início do tratamento, o pulmão dos animais foi retirado e a carga fúngica determinada, considerando o peso do órgão. Na Figura 16 pode-se notar que a média de UFC no animal infectado foi de $1,6 \times 10^4$. Esse valor não foi alterado com o tratamento com o fármaco controle itraconazol 5 mg/Kg ($1,5 \times 10^4$) e nem com o galato de dodecila 5 mg/Kg ($1,5 \times 10^4$). Entretanto, a média de UFC aumentou significativamente quando os animais foram tratados com galato de dodecila 50 mg/Kg ($3,9 \times 10^4$, $p=0,007$). No 30º dia de tratamento, a média de UFC reduziu para todos os grupos em comparação com o 15º dia, provavelmente em função da resposta imune do animal, entretanto o mesmo padrão de resposta pode ser observado: média de UFC de $8,8 \times 10^3$ para o grupo infectado tratado com PBS; $8,7 \times 10^3$ para o grupo tratado com itraconazol 5 mg/Kg; $7,3 \times 10^3$ para galato de dodecila 5 mg/Kg e $2,5 \times 10^4$ para galato de dodecila 50 mg/Kg.

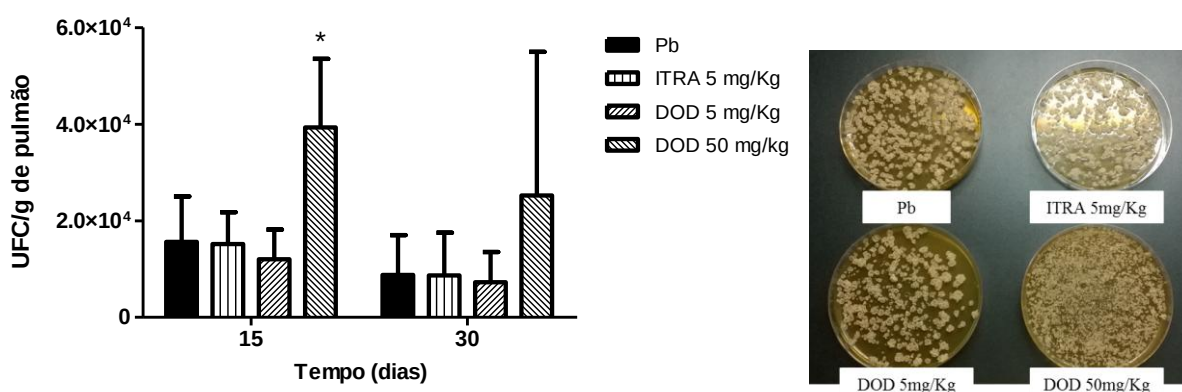
O tratamento com itraconazol não foi capaz de reduzir a carga fúngica do pulmão dos animais, embora o estudo de De Sá e colaboradores (2015) tenha mostrado que a administração do fármaco na dose de 5 mg/Kg por 2 semanas tenha esse efeito. Assim, pode ser que a diferença encontrada esteja relacionada ao início do tratamento, uma vez que no presente trabalho este ocorreu 30 dias após a

infecção e no outro estudo, a administração ocorreu um dia após a infecção. Além disso, talvez os animais apresentassem uma forma severa da doença e portanto, houvesse a necessidade da administração de uma dose de ataque de anfotericina B antes da administração do azol, como é realizado na clínica.

Em relação ao galato de dodecila, a falta de efetividade nos camundongos infectados por *Paracoccidioides* corrobora com o resultado encontrado no modelo *G. mellonella*. Além disso, pode-se perceber um efeito paradoxal, visto que na mais alta dose, um crescimento fúngico é apresentado. Esse efeito tem sido mostrado, por exemplo, em fungos como *C. albicans* e *A. fumigatus* após tratamento com caspofungina (LEWIS; ALBERT; KONTOYIANNIS, 2008; RUEDA; CUENCA-ESTRELLA; ZARAGOZA, 2014). Outro fato que pode ter contribuído para o aumento da carga fúngica quando foi administrada a maior dose do galato, pode ser a ocorrência de algum efeito imunomodulatório pelo composto. Entretanto, há necessidade de novos ensaios para verificar tal resultado. Embora existam relatos da atividade antifúngica dos galatos *in vitro* (De PAULA e SILVA et al., 2014; KUBO; XIAO; KUBO, 2001), não há informações sobre sua eficácia *in vivo*. Em um estudo realizado em ratos infectados com a bactéria *Chlamydia pneumoniae*, o galato de octila administrado na dose de 20 mg/kg durante 20 dias, também não se mostrou eficaz na redução da carga fúngica no modelo (TÖRMÄKANGAS et al., 2005). O entendimento da falta de eficácia do galato de dodecila em modelo murino vai além do escopo do presente estudo, porém é possível sugerir que esse resultado pode ser em decorrência de características farmacocinéticas do composto como baixa distribuição corpórea em função da sua alta lipossolubilidade (o log do coeficiente de

partição óleo/água é igual a 7,38) e como metabolismo, sendo convertido a ácido gálico (OW; STUPANS, 2003), o qual apresenta valor de CIM elevada.

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). A avaliação foi feita 15 e 30 dias após o tratamento. Dados expressos como média e desvio padrão. *p < 0,05 vs Pb. N = 4-5/grupo



Finalmente, visto que os galatos de octila e dodecila apresentaram boa atividade antifúngica *in vitro*, os compostos foram incorporados a um sistema lipídico nanoestruturado (SLN) para verificar se a formulação seria capaz de melhorar sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, sua eficácia nos modelos *in vivo*.

5.5. Caracterização dos galatos associados à nanopartícula

Nos últimos anos, o número de compostos candidatos a fármacos com problemas de solubilidade tem aumentado devido à utilização de técnicas “high-throughput screening”. Neste contexto, estima-se que cerca de 70% dos novos

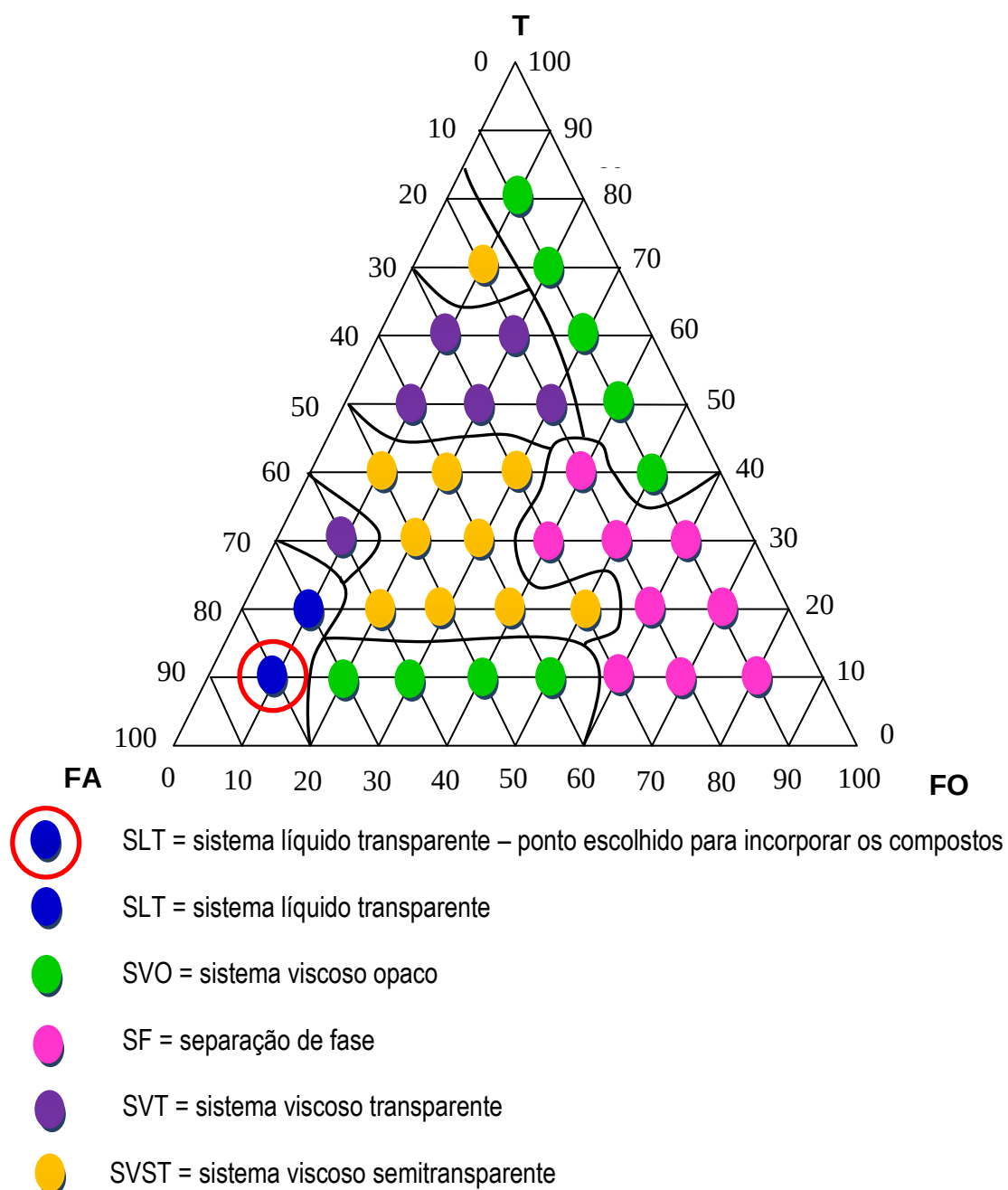
fármacos são pouco solúveis em meio aquoso e cerca de 40% dos fármacos comercializados são praticamente insolúveis em meio aquoso. Como consequência, um composto com baixa solubilidade em água frequentemente apresenta baixa biodisponibilidade nos modelos *in vivo* e dificulta a sua administração via parenteral (BUNJES, 2010; LIPINSKI, 2000; LU; PARK, 2013; MERISKO-LIVERSIDGE; LIVERSIDGE, 2008). Tal fato pode justificar a falta de eficácia dos galatos nos modelos *G. mellonella* e murino. Modificações moleculares ou incorporação a uma nanopartícula são estratégias utilizadas para melhorar a biodisponibilidade dos compostos (LU; PARK, 2013). No presente trabalho, optou-se por incorporar os galatos a um sistema lipídico nanoestruturado.

As nanopartículas lipídicas podem incorporar tanto moléculas lipofílicas, quanto hidrofílicas e possuem a capacidade de aumentar a estabilidade física e de controlar a liberação das mesmas, podendo ser administrada topicamente ou por via intravenosa. Além disso, possuem outras vantagens como facilidade de preparação, são biocompatíveis e biodegradáveis, e possuem baixa toxicidade (BUNJES 2010; MULLER; MADER; GOHLA, 2000; PARDEIKE et al., 2011; WEYHERS et al., 2006).

Diante das vantagens das nanopartículas lipídicas e dos resultados encontrados para os compostos aqui estudados, decidiu-se realizar a incorporação dos galatos de octila e dodecila ao sistema lipídico nanoestruturado, a qual foi realizada por sonicação e caracterizada através da dispersão de luz dinâmica e potencial zeta.

A Figura 17 apresenta o diagrama de fases segundo regiões observadas no sistema desenvolvido.

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



O sistema desenvolvido foi constituído de colesterol como fase oleosa, PBS como fase aquosa e a mistura de polioxietileno 23 lauril éter (Brij[®] 35) e fosfatidilcolina de soja (2:1) como tensoativo em diferentes concentrações. Foram obtidos pontos com diferentes características estruturais de acordo com a variação do óleo e água. O diagrama de fases (Figura 17) mostra as características de pontos com SLT, SVO, SF, SVT e SVST. Observaram-se regiões chamadas SLT (Sistemas Líquido-Transparentes), onde há baixa concentração de óleo (10%) e tensoativo (10-20%), SVO (Sistemas Viscosos e Opacos) encontrados na região inferior e superior do diagrama com baixa e média concentração de óleo (10-50%); SF (Separação de Fases) em concentrações baixas de água (10-30%) e de média a alta concentração de fase oleosa (40-80%); SVT (Sistemas Viscosos Transparentes) com a concentração de tensoativo entre 50 a 60% e a fase de óleo com 10-40% e SVST encontra-se na região central do diagrama com baixa-média concentração de fase oleosa (10-50%) e baixa concentração de tensoativo (20-40%) nas formulações. A formulação com 10% de fase oleosa, 10% de tensoativo e 80% de fase aquosa foi selecionada para incorporar os compostos estudados, uma vez que foi o ponto mais líquido transparente obtido. Posteriormente, foi realizada a caracterização do sistema desenvolvido.

A Tabela 3 apresenta os valores médios dos tamanhos das partículas e o índice de polidispersidade (IPD) para o sistema lipídico nanoestruturado, bem como para os compostos incorporados ao sistema. O IPD mede a homogeneidade entre a média dos tamanhos das partículas, onde quanto menor for o IPD maior é a uniformidade apresentada pelas partículas.

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

	Tamanho das Partículas (nm)	Índice de Polidispersidade
SLN	117,9 ± 2,196	0,153 ± 0,002
SLN+OCT	132,1 ± 2,673	0,200 ± 0,009
SLN+DOD	154,4 ± 2,829	0,255 ± 0,008

De acordo com a Tabela 3, o tamanho das partículas do sistema lipídico nanoestruturado foi 117,9 ± 2,196 nm. A incorporação dos galatos de octila e dodecila causou uma pequena variação no tamanho das partículas, 132,1 ± 2,673 e 154,4 ± 2,829 nm, respectivamente. Todos os valores obtidos estão na faixa de 10-250 nm (100-2500 Å), intervalo ideal para o sistema lipídico nanoestruturado (FORMARIZ et al., 2005). Quando se compara o sistema base e as formulações contendo os compostos, observa-se um pequeno aumento no tamanho das partículas, sendo esse um forte indício de que realmente ocorreu a incorporação dos respectivos compostos no sistema lipídico. O índice de polidispersidade (IPD) é o índice que mostra a homogeneidade relativa entre os tamanhos das partículas distribuídos na amostra medida. Os valores de IPD variaram entre 0,153 ± 0,002 e 0,255 ± 0,008 apresentando uma média faixa de variação entre a base e as

formulações com os compostos incorporados, esses dados permitem inferir que as amostras apresentam certa homogeneidade.

A Tabela 4 apresenta a média e desvio padrão do potencial zeta do sistema lipídico nanoestruturado sozinho, bem como das formulações contendo os compostos galatos de octila e dodecila incorporados nesse sistema.

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.

	Potencial Zeta (mV)
SLN	- 2,610 ± 0,300
SLN+OCT	- 3,790 ± 0,302
SLN+OCT	- 2,731 ± 0,310

O valor do potencial zeta indica a carga global que uma partícula adquire em um meio específico e pode prever a estabilidade da nanopartícula durante o armazenamento (DAS; CHAUDHURY, 2011). Os resultados das amostras para o potencial zeta variaram entre os valores de -2,610 ± 0,300 mV a -3,790 ± 0,302 mV (Tabela 4), demonstrando que houve pequeno aumento do valor absoluto do potencial zeta do sistema lipídico nanoestruturado quando os compostos foram incorporados. A carga negativa é proveniente dos componentes das formulações. A

fosfatidilcolina de soja possui grupamentos ésteres livre $[-COO-]^-$ que contribuem para a carga negativa do sistema, bem como o colesterol que em sua estrutura possui um grupamento hidroxila livre $[OH-]^-$ (Da SILVA et al., 2016).

5.6. Atividade antifúngica dos galatos associados à nanopartícula

A Tabela 5 mostra os valores de CIM para os galatos de octila e dodecila dissolvidos em DMSO ou associados ao sistema lipídico nanoestruturado. A CIM do galato de octila foi 0,06 $\mu\text{g/mL}$ para *P. brasiliensis* 18 e *P. lutzii* 01, enquanto o galato de dodecila apresentou CIM de 0,12 $\mu\text{g/mL}$ para ambas as espécies. Tais valores corroboram com os encontrados por De PAULA e SILVA e colaboradores (2014). Quando incorporado a nanopartícula, houve um aumento do valor da CIM dos compostos, de forma que o galato de octila associado ao sistema lipídico nanoestruturado apresentou CIM de 0,24 $\mu\text{g/mL}$ para ambas as espécies, e o galato de dodecila associado ao sistema lipídico nanoestruturado apresentou CIM de 0,24 $\mu\text{g/mL}$ para *P. brasiliensis* e de 0,49 $\mu\text{g/mL}$ para *P. lutzii*. O DMSO e o sistema lipídico nanoestruturado não apresentaram atividade antifúngica nas concentrações testadas. O fármaco anfotericina B apresentou CIM de 0,03 $\mu\text{g/mL}$ para ambas as espécies.

A literatura científica apresenta resultados variáveis sobre o efeito dos carreadores lipídicos nanoestruturados sobre a atividade antimicrobiana *in vitro*. Alguns fármacos como miconazol e clotrimazol tiveram seu efeito antifúngico potencializado quando associado a sistemas lipídicos nanoestruturados (ESPOSITO

et al., 2013; MENDES et al., 2013; SINGH et al., 2016). Por outro lado, similarmente ao observado no presente trabalho, a atividade antimicrobiana foi mantida quando tetraciclina e compostos de rutênio foram associados a esses sistemas (FREITAS et al., 2014; LIN et al., 2013). Os mecanismos pelos quais tal variação ocorre, vão além do escopo deste trabalho, entretanto, pode ser sugerido que as diferentes interações entre o fármaco/composto e o carreador, ou entre o sistema e a membrana do microorganismo, possam influenciar na resposta antifúngica.

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*

	<i>P. brasiliensis</i> 18	<i>P. lutzii</i> 01
	CIM (µg/mL)	CIM (µg/mL)
OCT	0,06	0,06
SLN+OCT	0,24	0,24
DOD	0,12	0,12
SLN+DOD	0,24	0,49
DMSO	> 250	> 250
SLN	> 250	> 250
Anfotericina B	0,03	0,03
Itraconazol	0,008	0,015

5.7. Citotoxicidade dos galatos associados à nanopartícula

Antes de avaliar a toxicidade dos galatos de octila e dodecila sozinhos e associados ao sistema lipídico nanoestruturado nos modelos *in vivo*, o efeito da exposição a esse sistema foi testado em duas linhagens celulares. Os fibroblastos de pulmão (MRC5) foram selecionados, pois esse órgão é o principal sítio de infecção da PCM. Células de hepatoma humano (HepG2) também foram escolhidas, pois a hepatotoxicidade mostra-se como um dos principais parâmetros para a rejeição de um composto candidato a fármaco. O efeito da exposição dessas células aos tratamentos foi avaliado após 24 e 48 h.

Através dos gráficos (Figuras 18 e 19) e dos valores de CI50 (Tabela 6), de forma geral, é possível observar em ambas as linhagens celulares estudadas (fibroblastos pulmonares e células de hepatoma humano), um efeito tóxico dos compostos sozinhos e associados às nanopartículas mais pronunciado às 48 h em comparação às 24 h de tratamento. Também é possível observar uma redução da viabilidade de ambas com o aumento da concentração dos galatos de octila e dodecila (0,48 a 500 µg/mL).

Na linhagem MRC5, pode-se notar ainda que a associação com o sistema lipídico nanoestruturado contribuiu substancialmente para uma redução da toxicidade dos galatos de octila e dodecila. Nesse sentido, após ser incorporado à nanopartícula, a CI50 do galato de octila aumentou de 93,0 para 454,7 µg/mL com 24 h de tratamento e de 96,8 para 237,6 µg/mL com 48 h de tratamento. Para o galato de dodecila, o aumento da CI50 com a incorporação à nanopartícula foi ainda mais pronunciado: de 103,9 para > 500 µg/mL com 24 h de tratamento; e de 63,4 para

320,3 $\mu\text{g/mL}$ com 48 h de tratamento. O sistema lipídico nanoestruturado não demonstrou efeito tóxico nas concentrações testadas. O DMSO em altas concentrações dos compostos reduziu 50% da viabilidade celular com 48 h de tratamento.

Por outro lado, na linhagem HepG2, o sistema lipídico nanoestruturado mostrou toxicidade nas concentrações mais altas. Dessa forma, os valores de CI50 para o sistema sozinho ou com os compostos foram similares: 56,5, 56,3 e 57,9 para o sistema com galato de octila, sistema com galato de dodecila e sistema sozinho, respectivamente, com 24 h de tratamento; e 30,5, 31,8 e 35,7 para o sistema com galato de octila, sistema com galato de dodecila e sistema sozinho, respectivamente, com 48 h de tratamento. Os valores de CI50 encontrados para os compostos e o sistema sozinhos e para a combinação dos mesmos em ambas as linhagens celulares foram substancialmente superiores aos valores da CIM demonstrados anteriormente.

A seletividade de ação do sistema lipídico nanoestruturado pode ser explicada pela presença do colesterol em sua composição, bem como na membrana plasmática das células testadas. Varshosaz e colaboradores (2014) demonstraram que um sistema lipídico nanoestruturado com colesterol teve maior acúmulo e toxicidade na linhagem HepG2 comparado com sistemas que continham outros esteróis, como estigmasterol e estigmastanol. No presente trabalho, uma maior interação e acúmulo do colesterol da formulação do sistema pode ter ocorrido, e, consequentemente, uma maior toxicidade na linhagem tumoral HepG2, possivelmente por ela possuir uma maior expressão de colesterol em sua membrana

plasmática do que a linhagem normal MRC5. Isso também pode justificar o porquê do sistema lipídico nanoestruturado ter reduzido a atividade anti - *Paracoccidioides* dos compostos. Como a membrana fúngica possui como principal estero, o ergosterol, ocorreu uma interação menor e acúmulo do colesterol da formulação do sistema.

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

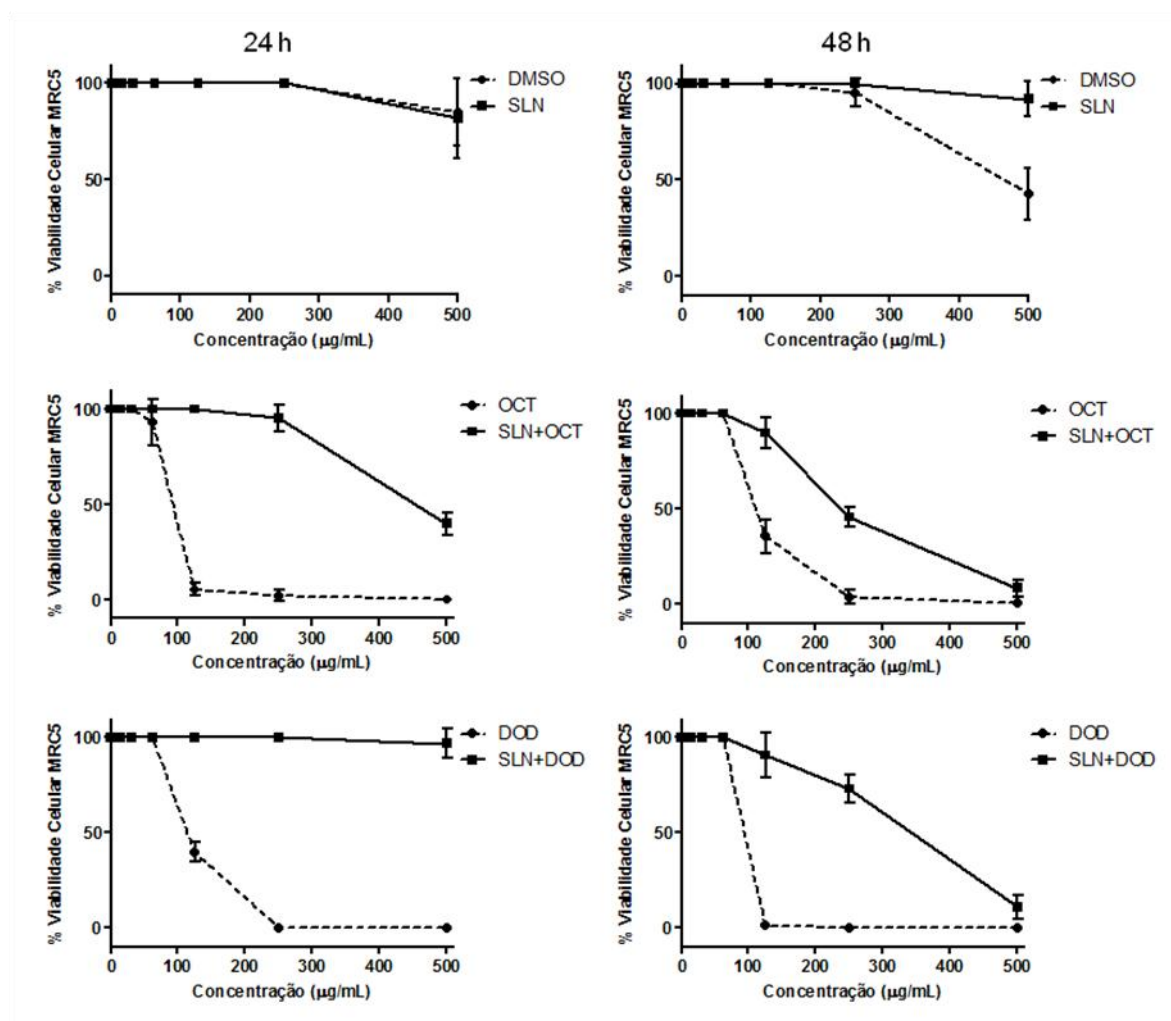


Figura 19. Citotoxicidade dos galato de octila (OCT) e galato de dodecila (DOD) associados a um sistema lipídico nanoestruturado (SLN) em células de hepatoma humano

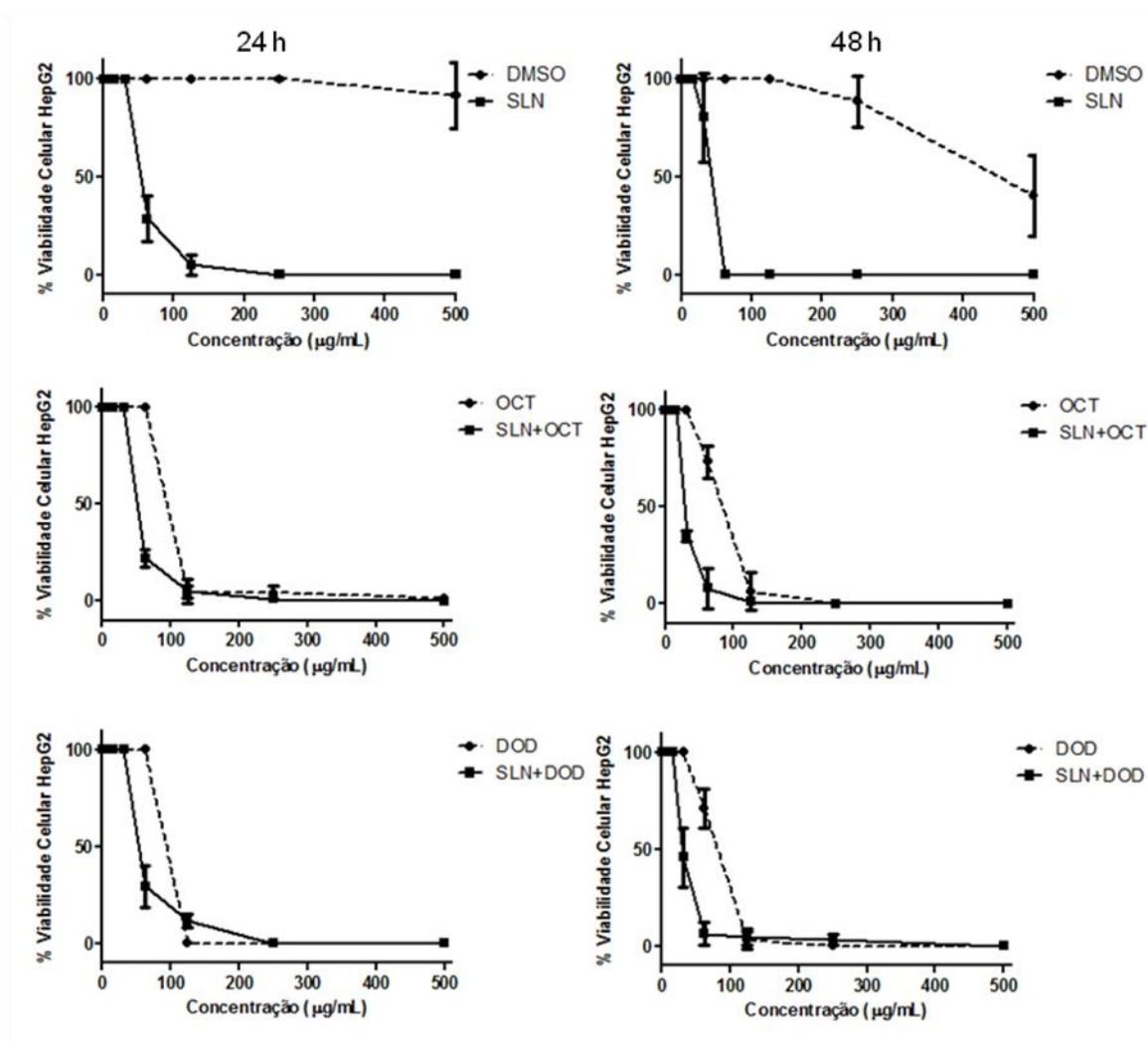


Tabela 6. Concentração inibitória 50% (CI50 - µg/mL) do galato de octila (OCT) e galato de dodecila (DOD) associados a um sistema lipídico nanoestruturado (SLN) em fibroblastos pulmonares (MRC5) e células de hepatoma humano (HepG2)

	MRC5		HepG2	
	CI50 - 24h	CI50 - 48h	CI50 - 24h	CI50 - 48h
OCT	93,0	96,8	100,0	82,7
SLN+OCT	454,7	237,6	56,5	30,5
DOD	103,9	63,4	99,0	80,8
SLN+DOD	> 500	320,3	56,3	31,8
DMSO	> 500	410	> 500	454,6
SLN	> 500	> 500	57,9	35,7

5.8. Toxicidade em zebrafish dos galatos associados à nanopartícula

Os galatos de octila e dodecila associados ao sistema lipídico nanoestruturado também foram testados nos embriões de zebrafish em algumas concentrações utilizadas anteriormente para o teste de sensibilidade e a citotoxicidade (0,005; 0,03; 0,12; 0,49; 1,95; 7,8; 31,25; 62,5 e 125 µg/mL). Visto que as nanopartículas podem possuir a propriedade de promover uma liberação controlada dos compostos, optou-se por observar a exposição aos tratamentos no período de 120 hpf, em que o zebrafish encontra-se em sua fase larvária, além das 48 hpf já observadas no experimento anterior com os galatos. A CL50 encontrada às 120 hpf para os galatos de octila e dodecila foi de 1,20 e 16,58 µg/mL (Tabela 7), respectivamente, os quais

são valores inferiores aos encontrados no período de 48 hpf. Dessa forma, pode-se dizer que uma maior toxicidade foi notada quando se avaliou um maior período de tempo. Também se pode observar que há uma relação diretamente proporcional da toxicidade em relação à concentração dos compostos (Figuras 20 e 21). A associação ao sistema lipídico nanoestruturado reduziu substancialmente a toxicidade dos compostos e a CL50 encontrada foi de 5,80 e > 125 µg/mL para os galatos de octila e dodecila, respectivamente. O sistema lipídico nanoestruturado, individualmente, não apresentou toxicidade nos embriões de zebrafish nas concentrações testadas.

O zebrafish apresenta várias vantagens, já descritas anteriormente, como modelo. A análise da toxicidade de nanopartículas e de antifúngicos como azóis tem sido realizada em embriões e larvas de zebrafish de forma individual (JONG et al., 2011; KANUNGO et al., 2014). Entretanto, a associação de compostos antifúngicos com um sistema lipídico nanoestruturado tem sido avaliada pela primeira vez neste trabalho. Os galatos de octila e dodecila apresentam valores de CL50 em zebrafish superiores em mais de 20 vezes à CIM desses compostos contra *Paracoccidioides* sp, ou seja, permitem uma ampla janela terapêutica. Porém, a associação com o sistema lipídico nanoestruturado permitiu ainda uma maior segurança para a administração desses compostos, especialmente para o galato de dodecila. O baixo potencial teratogênico encontrado mostra-se como uma grande vantagem para o desenvolvimento dos galatos de octila e dodecila associados ao sistema lipídico nanoestruturado como novos agentes antifúngicos principalmente em relação aos azóis. Essa classe de fármacos não tem indicação para ser usado em gestantes com

micoses, por possuir efeitos tóxicos aos embriões, causando especialmente más formações esqueléticas e craniofaciais. O mecanismo pelo qual os azóis causam esses efeitos passa pela inibição do CYP26 e conseqüente aumento do ácido retinóico. Tal fato leva a inibição da expressão de TGF- β , o qual é um importante regulador no desenvolvimento embrionário inicial por mediar várias atividades biológicas, como proliferação celular, diferenciação e formação da matriz extracelular. Portanto, a inibição de TGF- β resulta numa variedade de más formações, incluindo craniofacial, cardíaca, pulmonar, urogenitais, na coluna vertebral, no olho e no ouvido (JONG et al., 2011).

Tabela 7. Concentração letal 50% (CL50 - $\mu\text{g/mL}$) do galato de octila (OCT) e galato de dodecila (DOD) associados ao sistema lipídico nanoestruturado (SLN) em modelo de embriões de zebrafish

	CL50 (120 hpf)
OCT	1,20
SLN+OCT	5,80
DOD	16,58
SLN+DOD	> 125
SLN	> 125

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). N = 24 embriões/grupo

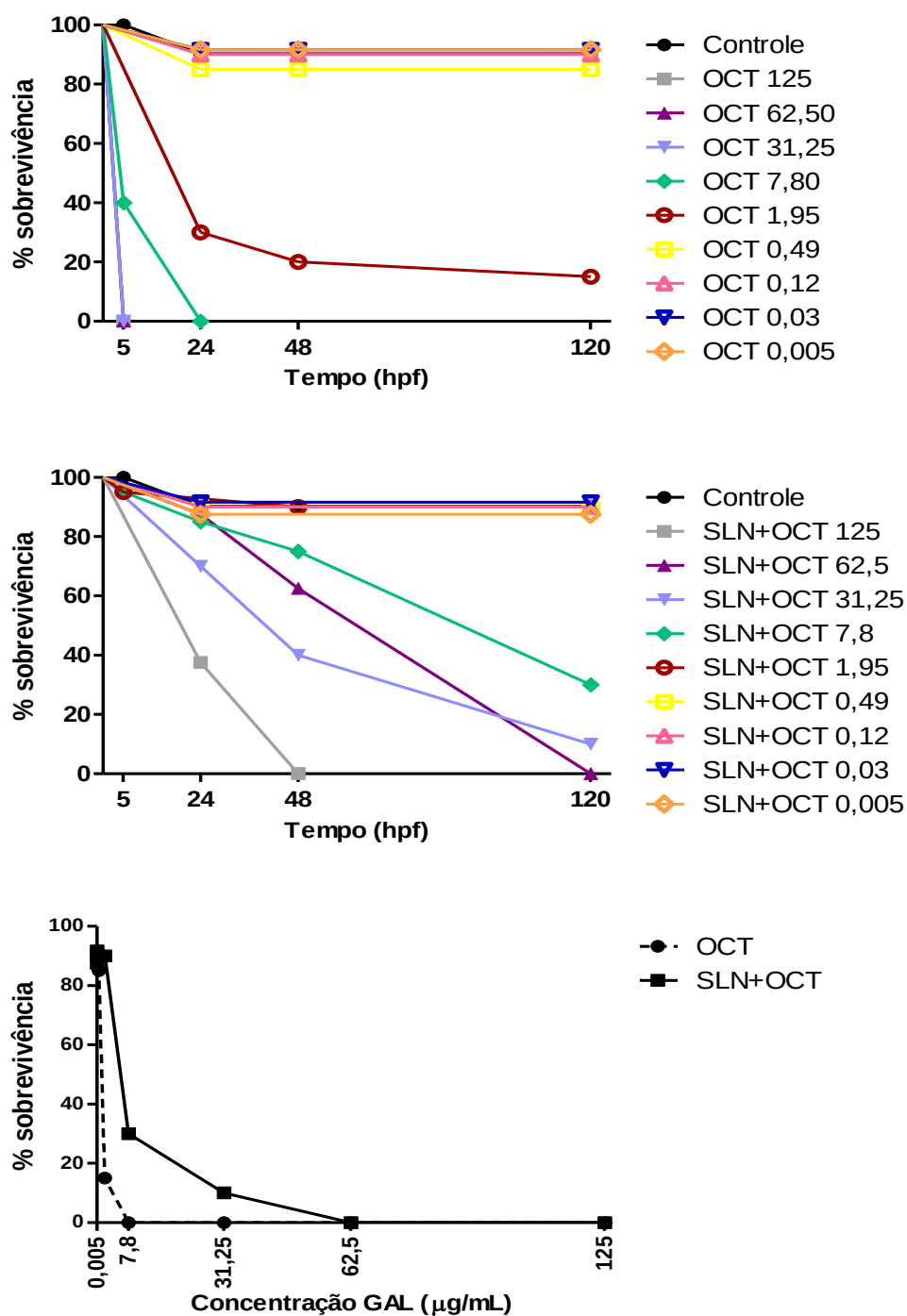
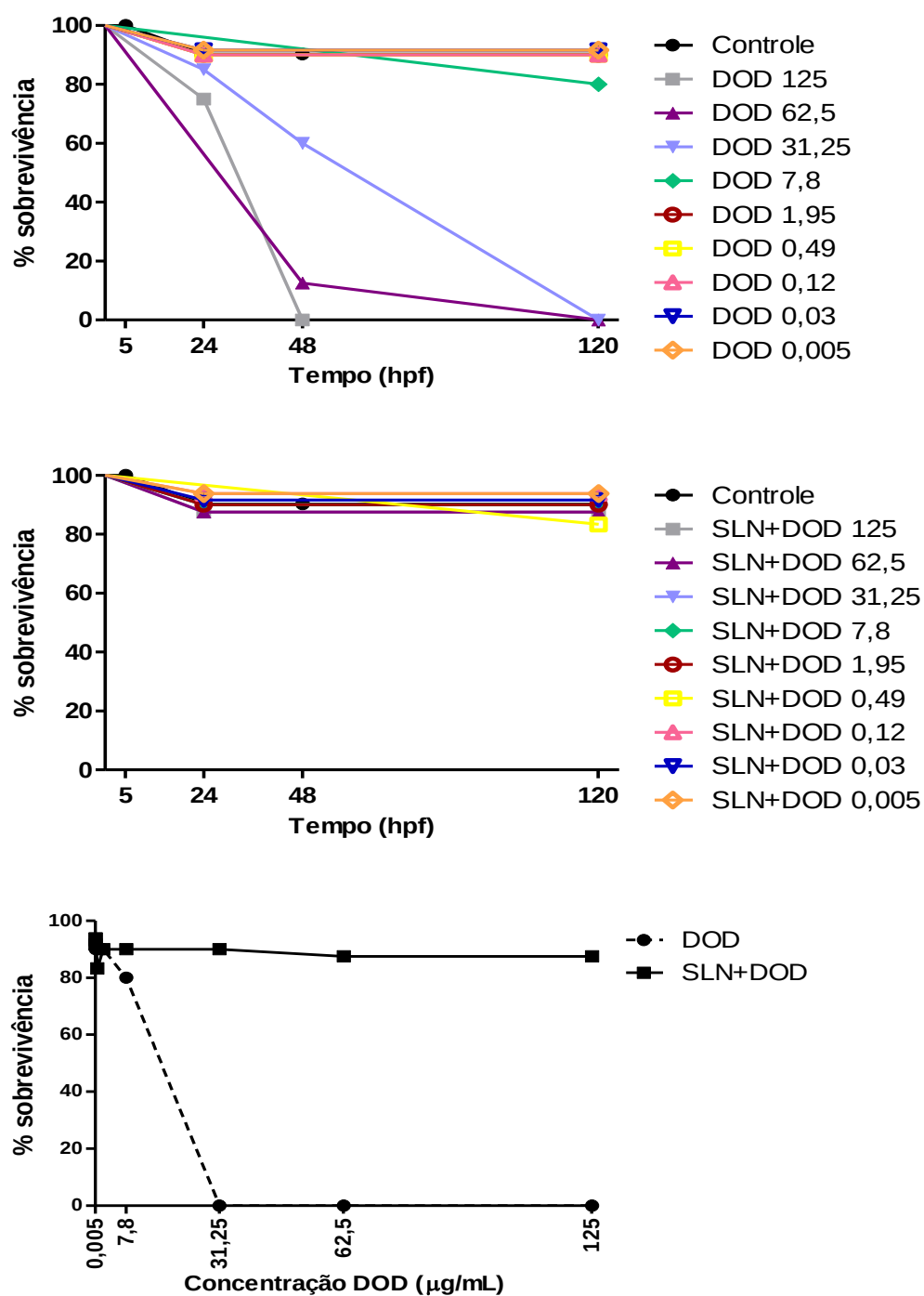


Figura 21. Curva de sobrevivência e curva concentração-resposta 120 hpf de embriões de zebrafish tratado com galato de dodecila (DOD) associado a um sistema lipídico (SLN). N = 24 embriões/grupo

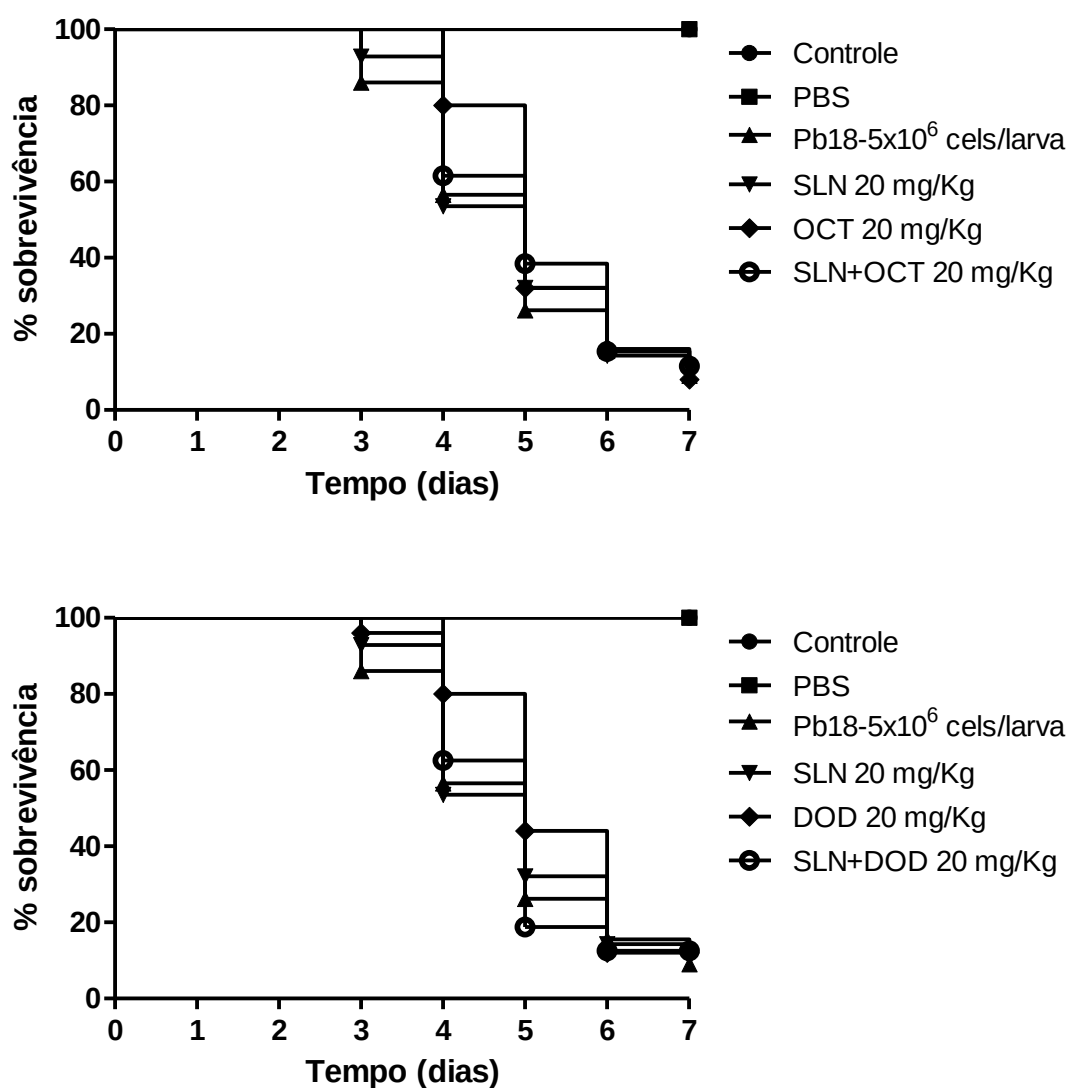


5.9. Toxicidade e eficácia em *G. mellonella* dos galatos associados à nanopartícula

A toxicidade de 20 mg/Kg dos galatos de octila e dodecila associados ao sistema lipídico nanoestruturado foi também avaliada no modelo *G. mellonella*. Nenhuma diferença significativa na sobrevivência das larvas foi encontrada entre os grupos tratados e o não tratado. Assim, posteriormente, a eficácia contra *P. brasiliensis* 18 dos compostos associados ao sistema lipídico nanoestruturado também foi verificada. O sistema lipídico nanoestruturado, por si só, não apresentou toxicidade e nem eficácia antifúngica no modelo *G. mellonella*. Os galatos não aumentaram a sobrevivência das larvas infectadas, como demonstrado anteriormente. A associação com a nanopartícula resultou em efeito similar ao dos compostos sozinhos (Figura 22). Similarmente, a incorporação da tobramicina a uma nanopartícula polimérica não melhorou a atividade desse antibiótico contra *Pseudomonas aeruginosa* em *G. mellonella*, quando esse tratamento foi administrado pouco tempo após a infecção. Porém, ao alterar o esquema de tratamento, realizando-o 96 h antes da infecção, pode-se observar um aumento significativo da sobrevivência das larvas tratadas com a tobramicina incorporada à nanopartícula em comparação ao antibiótico livre (DEACON et al., 2015). Dessa forma, pode-se sugerir que o esquema de tratamento utilizado no presente trabalho, bem como o tempo curto de análise nesse modelo (sete dias) não permitiu a detecção de um melhor resultado dos galatos com o sistema lipídico nanoestruturado. Novos esquemas de tratamento podem ser futuramente considerados para teste. Apesar disso, o modelo *G. mellonella* apresenta inúmeras

vantagens descritas anteriormente e se mostrou muito útil para a realização de triagem dos compostos aqui estudados, visto que o galato de dodecila não apresentou atividade nesse modelo, bem como nos camundongos.

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). n=40-50 por grupo

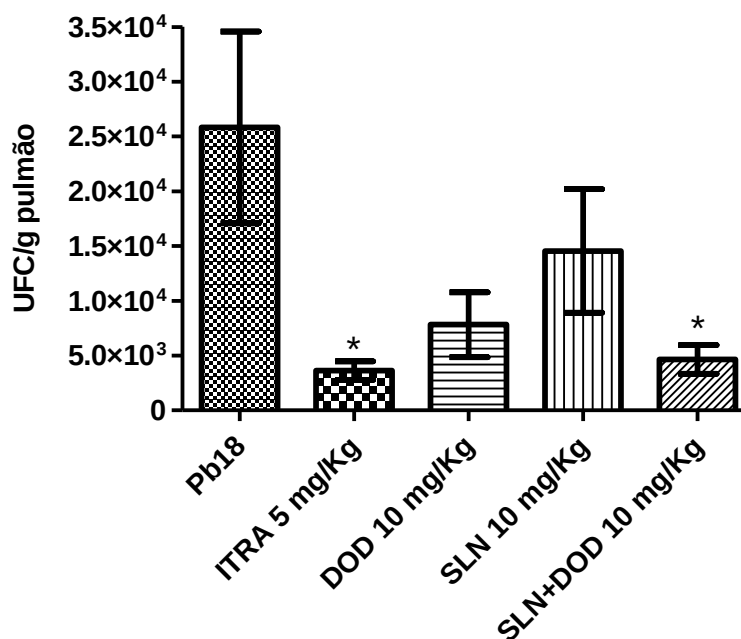


5.10. Toxicidade e eficácia em camundongos do galato de dodecila associados à nanopartícula

Como o fármaco controle itraconazol não se mostrou eficaz no modelo murino com o desenho experimental anteriormente utilizado, optou-se por iniciar o tratamento 24 h após a infecção dos camundongos com *P. brasiliensis* 18. No 20º dia após o início do tratamento, o pulmão dos animais foi retirado e a carga fúngica determinada, considerando o peso do órgão. Na Figura 23 pode-se notar que a média de UFC/g de pulmão no animal infectado foi de $2,5 \times 10^4$. O tratamento com o fármaco controle itraconazol 5 mg/Kg reduziu significativamente o número de UFC/g de pulmão para $3,6 \times 10^3$. O galato de dodecila 10 mg/Kg não reduziu a média de UFC/g de pulmão ($7,8 \times 10^3$) quando comparado com o grupo infectado e não tratado. A incorporação do galato de dodecila 10 mg/Kg ao sistema lipídico nanoestruturado promoveu, por sua vez, uma redução significativa no número de UFC/g de pulmão ($4,7 \times 10^3$). O sistema lipídico nanoestruturado também não demonstrou atividade antifúngica no modelo murino ($1,4 \times 10^4$ UFC/g de pulmão).

A estratégia de utilizar nanopartículas para o carreamento de agentes antifúngicos comercializados tem sido explorada. Nasti; Khan e Owais (2006), por exemplo, utilizaram uma formulação lipossomal para associar o antifúngico nistatina e observou um aumento da sobrevivência e redução da carga fúngica de camundongos infectados com *C. neoformans*. Já Gupta e Vyas (2012) demonstraram que a carga de *C. albicans* numa infecção cutânea em camundongos foi mais reduzida quando nanopartículas lipídicas carregaram o fluconazol em comparação com o fármaco livre.

Figura 23. Carga fúngica do pulmão de camundongos Balb/c infectados com *P. brasiliensis* (Pb18) e tratados com 5 mg/Kg de itraconazol (ITRA), 10 mg/Kg do galato de dodecila (DOD) sozinho e associado ao sistema lipídico nanoestruturado (SLN). A avaliação foi feita 20 dias após o tratamento. Dados expressos como média e erro padrão médio. *p < 0,05 vs Pb. N = 6-7/grupo



Os camundongos também foram submetidos à coleta de sangue para a avaliação dos parâmetros de toxicidade, AST (ou TGO), ALT (ou TGP), uréia e creatinina. AST e ALT são considerados indicadores bioquímicos da função hepática, de forma que o aumento deles pode representar a presença de lesões dos hepatócitos ou fibrose hepática. Já uréia e creatinina relacionam-se com a função renal e uma elevação em seus níveis podem indicar uma lesão ou disfunção dos rins. A média dos quatro parâmetros analisados não se mostrou alterada no grupo

infectado com *P. brasiliensis* 18 em comparação com o grupo não-infectado (controle). Além disso, o tratamento dos animais por 20 dias com 5 mg/Kg de itraconazol e com 10 mg/Kg do galato de dodecila sozinho ou associado com o sistema lipídico nanoestruturado não alteraram os valores de AST, ALT, uréia e creatinina comparados com os do grupo controle (Tabela 8).

O peso corpóreo dos camundongos, o qual é considerado como outro indicador para avaliar a toxicidade *in vivo* do galato de dodecila sozinho e associado ao sistema lipídico nanoestruturado, foi também analisado neste estudo. Os animais de todos os grupos foram pesados no final do experimento e não se observou diferença nos pesos corporais médios entre eles (Tabela 8).

Em resumo, ensaios *in vitro* e *in vivo* foram realizados para avaliação da eficácia contra *P. brasiliensis* e toxicidade da associação do galato de octila, e principalmente do galato de dodecila, a um sistema lipídico nanoestruturado. Os resultados mostraram que tal associação se mostrou muito benéfica, visto que contribuiu para redução da toxicidade desses compostos sobre fibroblastos pulmonares e sobre o modelo zebrafish, além de resultar em aumento de eficácia antifúngica no modelo murino, possivelmente por melhorar a biodisponibilidade do composto.

Tabela 8. Peso e parâmetros hepáticos e renais em soro de camundongos tratados com galato de dodecila (DOD) sozinho e associado ao sistema lipídico nanoestruturado (SLN). Dados expressos como média e erro padrão médio

Grupo	Peso corpo (g)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
Controle	24,5±0,8	199,0 ± 38,5	55,2 ± 6,6	56,6 ± 2,8	0,18 ± 0,02
Pb18	24,6±0,2	133,3 ± 31,5	58,2 ± 7,1	61,1 ± 2,5	0,15 ± 0,01
ITRA	24,8±0,5	128,4 ± 23,2	49,6 ± 8,0	60,9 ± 4,0	0,16 ± 0,01
DOD	23,3±0,5	204,6 ± 43,2	66,4 ± 3,6	58,3 ± 2,9	0,15 ± 0,01
SNL	24,9±0,5	122,8 ± 50,1	57,8 ± 3,6	61,4 ± 3,0	0,18 ± 0,02
SNL+DOD	24,4±0,4	210,3 ± 67,2	52,7 ± 4,3	55,8 ± 3,0	0,15 ± 0,01

AST: Aspartato aminotransferase; ALT: Alanina aminotransferase

6. CONCLUSÕES

- O modelo *C. elegans* não se mostrou adequado para o estabelecimento da infecção por *Paracoccidioides* sp. Foi então utilizado o modelo infectado com *C. albicans*, como demonstrativo de que o tamanho das estruturas pode ser um dos fatores impeditivos;
- O tratamento com o ácido gálico e seus derivados galatos de hexila, octila e dodecila prolongaram o tempo de sobrevivência de *C. elegans* infectado com

C. albicans, sendo que o galato de dodecila apresentou os melhores resultados quanto à eficácia e toxicidade;

- O ácido gálico e o galato de dodecila apresentaram menos efeitos tóxicos no modelo de embriões de zebrafish;
- O modelo *G. mellonella* se mostrou adequado para o estabelecimento da infecção por *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, bem como para a avaliação antifúngica dos fármacos anfotericina B e itraconazol. Esses fármacos aumentaram a sobrevivência e reduziram a carga fúngica das larvas e estes efeitos foram independentes da alteração do número de hemócitos na hemolinfa;
- Os galatos de octila e dodecila não apresentaram eficácia antifúngica e nem toxicidade no modelo *G. mellonella* infectado por *Paracoccidioides* spp;
- Com a triagem nos modelos animais alternativos, o galato de dodecila foi selecionado para o teste em camundongos infectados com *P. brasiliensis*, mas não se mostrou eficaz na redução da carga fúngica no modelo;
- A associação dos galatos de octila e dodecila ao sistema lipídico nanoestruturado manteve a atividade antifúngica *in vitro* e reduziu a toxicidade em fibroblastos pulmonares e em embriões de zebrafish;
- A associação dos galatos de octila e dodecila ao sistema lipídico nanoestruturado não alterou a eficácia antifúngica em *G. mellonella* infectada com *P. brasiliensis* e não foi tóxica no modelo;
- A associação do galato de dodecila ao sistema lipídico nanoestruturado resultou em aumento da eficácia antifúngica em camundongos infectados com

P. brasiliensis e não alterou o peso, nem apresentou toxicidade hepática e renal nos animais.

Diante dessas conclusões, a formulação galato de dodecila com sistema lipídico nanoestruturado mostra-se promissora na terapia da PCM e por não ser nefrotóxica e teratogênica, apresenta-se vantajosa frente aos fármacos anfotericina B e itraconazol.

PARTE II: Avaliação da expressão de microRNAs na PCM

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo geral

No presente trabalho, pretendeu-se verificar a expressão diferencial de microRNAs que podem atuar na PCM.

7.2. Objetivos específicos

- Identificar microRNAs circulantes em humanos com PCM;
- Identificar microRNAs em células epiteliais pulmonares infectadas com *P. lutzii* 01, *P. brasiliensis* 02 e *P. brasiliensis* 18;
- Avaliar *in silico* as vias e genes regulados pelos microRNAs detectados.

8. MATERIAIS E MÉTODOS

8.1. Extração dos RNAs de soros

Quatro pacientes do sexo masculino diagnosticados com PCM crônica e quatro pacientes do sexo masculino livres de infecção por PCM e livres de quaisquer sintomas clínicos de qualquer doença infecciosa foram incluídos neste estudo. O sangue venoso foi coletado de cada paciente e as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm durante 10 min a 25 °C (Centrifuge 5810R – Eppendorf). O soro sobrenadante foi rapidamente removido e congelado a -80 °C até a realização dos experimentos. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Ciências

Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista-UNESP, número 33397114.5.0000.5426. A extração dos RNAs de 200 µL dos soros foi realizada com a utilização do kit isolation miRCURY RNA for biofluids (Exiqon), de acordo com as instruções do fabricante.

8.2. Extração dos RNAs das células infectadas

P. lutzii 01 e dois representantes de diferentes espécies filogenéticas, *P. brasiliensis* 02 (PS2) e *P. brasiliensis* 18 (S1), foram utilizados. Os fungos foram mantidos em meio Fava-Netto a 37 °C e repicados a cada 3 ou 4 dias.

A linhagem A549, células epiteliais respiratórias - pneumócitos tipo I (obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro) foi utilizada. As células foram cultivadas em meio HAM F-12, suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas a 37 °C com 5% de CO₂.

As células A549 foram incubadas por 5 h a 37 °C com os fungos (10⁶ células/mL). Após o período de incubação, as células foram lavadas com PBS para remoção dos patógenos extracelulares e congeladas em Trizol a -80 °C até a realização dos experimentos. A extração de RNAs foi realizado utilizando Trizol seguido do Kit Qiagen RNeasy, de acordo com as instruções do fabricante. Os RNAs extraídos foram quantificados a 260 nm em um espectrofotômetro NanoDrop 2000/2000c e analisados quanto a integridade (Bioanalyzer Agilent 2100).

8.3. Síntese da primeira fita e análise quantitativa por PCR Real-Time

Tanto para o soro, quanto para as células infectadas, a primeira fita referente ao cDNA foi gerada a partir dos RNAs com a utilização de um kit Universal cDNA synthesis (Exiqon) segundo as instruções do fabricante. A reação de síntese de cDNA ocorreu em termociclador com ciclos de 60 min a 42 °C e 5 min a 95 °C. Os cDNAs gerados foram adicionadas às placas miRCURY LNA Universal RT microRNA Ready-to-Use PCR, Human panel, as quais continham primers específicos para a triagem de 752 miRNAs humanos. A mistura da reação continha 40 µL de cDNA, 40 mL de SYBR-Green PCR Master Mix (Exiqon) e 40 mL de água isenta de RNase. Em seguida, 10 µL dessa mistura foram adicionados em cada poço das placas. A amplificação foi realizada por PCR em tempo real quantitativa PCR (ViiA™ 7 Real-Time PCR System, Thermo Scientific) seguida de curva de melting de acordo com as seguintes condições: ciclo a 95 °C durante 10 min, e em seguida, 95 °C durante 10 s, e 60 °C durante 60 s por 40 (para células) ou 45 ciclos (para soro). Para os soros, os valores brutos de Ct foram normalizados pelo método de normalização global em cada amostra. Para o sistema célula-fungo, os valores brutos de Ct foram normalizados com a utilização de controles internos. Em seguida, os valores de expressão das células infectadas foram comparados com os das células não infectadas. Os níveis de todos os miRNAs foram calculados pelo método de delta-delta-Ct de expressão (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) tal como implementados no software DataAssist v2. As análises estatísticas também foram realizadas com a utilização do software DataAssist e considerou-se que um valor de $p < 0,05$ era estatisticamente significativo.

8.4 Análise bioinformática

Os miRNAs diferencialmente expressos tanto nos soros, quanto nas células infectadas foram submetidos a análise *in silico* de genes e vias relacionados para a Gene Ontology (GO) e Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), por meio de ferramentas de bioinformática como os bancos de dados:

- miRBase (<http://www.mirbase.gov/>) (GRIFFITHS-JONES et al., 2006);
- miRSystem (<http://mirsystem.cgm.ntu.edu.tw/>) (TZU-PIN et al., 2012);
- miRWalk (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/index.html>) (DWEED et al., 2011);
- DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) (HUANG; SHERMAN; LEMPICKI, 2009).

9. RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1. MiRNAs no soro de pacientes com paracoccidiodomicose

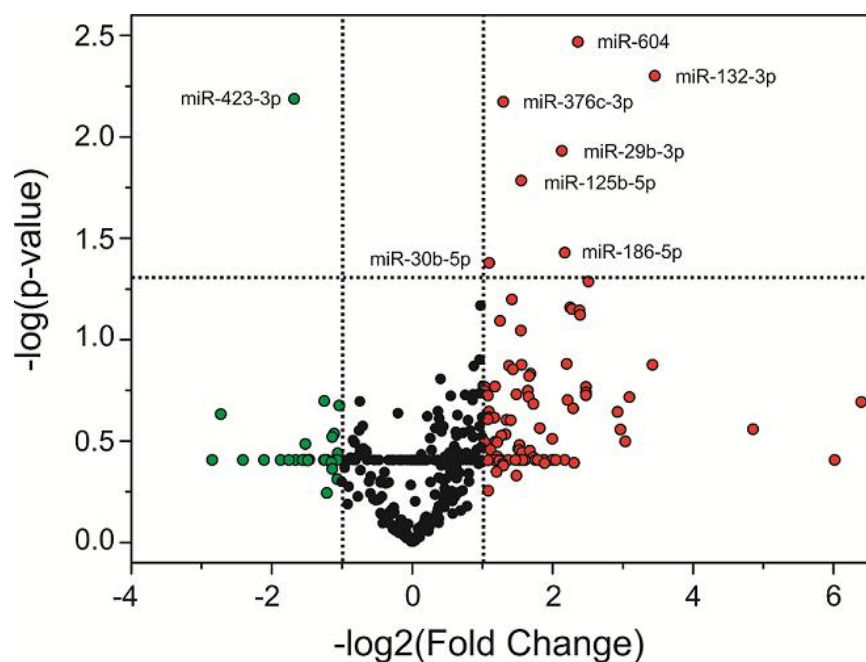
Outra vertente do presente trabalho diz respeito à identificação de miRNAs relacionados a PCM. Alguns estudos prévios têm mostrado a participação de miRNAs circulantes em algumas doenças infecciosas e não infecciosas (REID; KIRSCHNER; VAN ZANDWIJK, 2011; VERMA et al., 2016). Neste contexto, miRNAs podem ser usados para o diagnóstico, bem como para a monitorização da progressão da doença e eficácia do tratamento (WEILAND et al., 2012). No presente trabalho, dos 752 miRNAs analisados, sete encontravam-se com uma expressão elevada (miR-132-3p, miR-604, miR-186-5p, miR-29b-3p, miR-125b-5p, miR-376c-3p

e miR-30b-5p) e um encontrava-se com a expressão reduzida (miR-423-3p) no soro dos pacientes com PCM comparado com os pacientes controle, como demonstrado na Tabela 9. Os dados foram considerados como significativamente diferentes quando $p < 0,05$ e com uma quantificação relativa ≥ 2 . Além disso, o perfil de expressão dos microRNAs estudados foi semelhante entre os indivíduos de cada grupo. Tais miRNAs diferencialmente expressos em pacientes com PCM também são mostrados por uma distribuição não simétrica em um volcano plot (Figura 24), no qual o eixo x representa o log 2 da diferença de expressão de miRNA entre os grupos e o eixo y, os valores de $-\log$ do valor de p.

Tabela 9. miRNAs diferencialmente expressos em pacientes com paracoccidiodomicose

MicroRNA - expressão elevada	Quantificação relativa	Valor p
hsa-miR-604	5,13	0,0034
hsa-miR-132-3p	10,97	0,0050
hsa-miR-376c-3p	2,45	0,0067
hsa-miR-29b-3p	4,38	0,0117
hsa-miR-125b-5p	2,93	0,0164
hsa-miR-186-5p	4,51	0,0372
hsa-miR-30b-5p	2,14	0,0418
MicroRNA - expressão reduzida		
hsa-miR-423-3p	3,23	0,0065

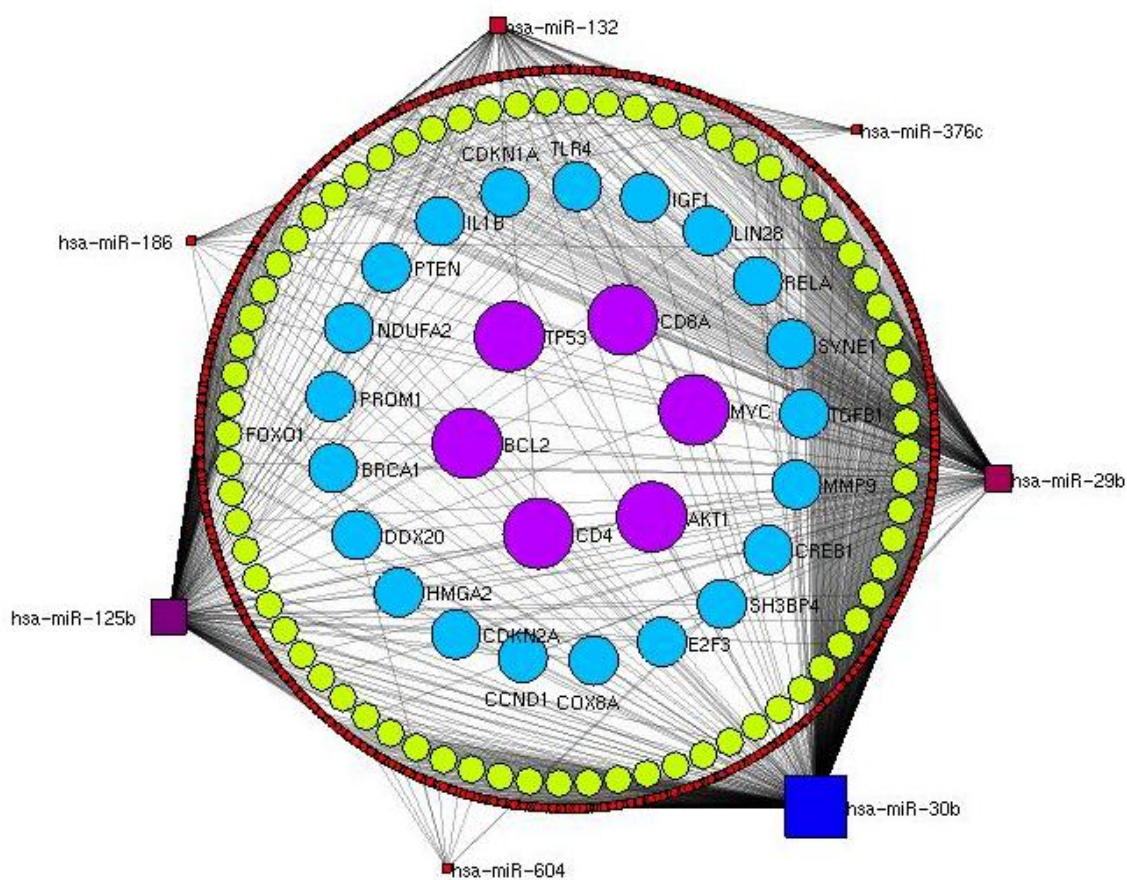
Figura 24. Volcano plot dos miRNAs circulantes detectados em pacientes com paracoccidiodomicose em comparação com os controles saudáveis. MiRNAs com expressão elevada e com expressão reduzida são mostrados em vermelho e verde, respectivamente. MiRNAs estatisticamente significantes são representadas com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



A partir da identificação dos miRNAs, foi realizada uma busca dos seus genes alvos validados no software online miRWalk e um interactoma foi construído no software Navigator. A complexidade dessa rede é mostrada na Figura 25. Como esperado, um único miRNA afetou a regulação de muitos genes, dentro os quais o miR-30b parece atuar em um maior número de alvos. Além disso, no interactoma é possível observar que os miRNAs trabalharam sinergicamente para regular um grande número de genes e, conseqüentemente de vias. Dessa forma, para realizar uma predição das vias reguladas pelos miRNAs foi utilizada a ferramenta de

anotação gênica DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery). Na Tabela 10, é possível notar que o conjunto dos miRNAs diferencialmente expressos na PCM podem regular genes incluídos na cascata das MAPKs, resposta inflamatória, ativação de leucócitos, células T e B, regulação da produção de citocinas, regulação da adesão à MEC (matriz extracelular) e endocitose.

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



O tamanho dos quadrados é proporcional ao número de genes que o microRNA regula.

O tamanho dos círculos é proporcional ao número de microRNAs que regulam determinado gene.

Tabela 10. Vias reguladas pelos miRNAs e genes alvos em pacientes com paracoccidioidomicose

Via	Valor p
Regulação de apoptose	1.8E-28
Regulação negativa da transcrição	3.2E-16
Regulação do metabolismo de proteínas celulares	2.3E-18
Regulação da ligação do DNA	1.7E-18
Regulação da cascata das proteínas quinases	3.8E-12
Regulação da migração celular	8.9E-15
Resposta inflamatória	2.3E-8
Cascata da MAPK	2.4E-5
Ativação de leucócitos	1.1E-9
Ativação de células T	4.5E-6
Ativação de células B	2.7E-3
Regulação da produção de citocinas	8.5E-10
Regulação da adesão à MEC	8.2E-7
Endocitose	2.7E-5
Ligação à superfamília do receptor TNF	3.6E-6

Alguns trabalhos também têm descrito a participação dos miRNAs identificados neste estudo, nos processos de apoptose e resposta imune em outras infecções. Mir-132 e mir-186, por exemplo, têm sido descritos por estarem relacionados a apoptose através da via de sinalização dependente de caspases (ZHANG et al., 2010; ZHANG et al., 2013). MiR-132 também tem sido recentemente descrito por participar da resposta imune contra *A. fumigatus*, sendo diferencialmente expresso em monócitos e células dendríticas (Das GUPTA et al., 2014), e contra *Mycobacterium tuberculosis*, sendo diferencialmente expresso em macrófagos humanos (NI et al., 2014). Membros da família miR-29 podem agir na via de sinalização Wnt, o qual é reconhecida por regular a ativação de macrófagos no processo inflamatório. Além disso, miR-29 foi super expresso no soro e no escarro de pacientes com tuberculose pulmonar ativa (FU et al., 2011). O miR-125 pode também estar envolvido na resposta imune às infecções. Foi demonstrado que *M. tuberculosis* induz a expressão do miR-125b, o qual bloqueia a biossíntese do TNF, um importante processo na resposta à infecção bacteriana (RAJARAM et al., 2011). O miR-376c foi recentemente descrito por estar diferencialmente expresso em soros de pacientes com tuberculose ativa (ZHANG et al., 2014). O miR-30 também pode estar relacionado ao processo da resposta imune, visto que foi demonstrado que miR-30d é capaz de suprimir o gene GALNT7, o que leva ao aumento da IL-10 (GAZIEL-SOVRAN et al., 2011). Por outro lado, dois miRNAs (miR-604 e miR-423-3p) foram descritos em outros trabalhos, mas não relacionados com doenças infecciosas (GUAN et al., 2014; SABINA et al., 2013).

A identificação dos miRNAs circulantes diferencialmente expressos na PCM é importante, em primeiro lugar, porque pode ajudar na compreensão dos mecanismos reguladores envolvidos na interação fungo-hospedeiro e no processo infeccioso. A análise *in silico* dos genes e vias mostrou, pela primeira vez, que a apoptose, a resposta imune e a adesão de fungos às células hospedeiras são vias importantes reguladas pelo conjunto dos miRNAs diferencialmente expressos na PCM. Após inalação pelo hospedeiro, *Paracoccidioides* sp. são capazes de aderir a componentes da MEC tais como colágeno, fibronectina e laminina. Este processo evita a eliminação dos fungos pelas células ciliares pulmonares e contribui para o estabelecimento da infecção (De OLIVEIRA et al., 2015). A apoptose é um mecanismo importante, como descrito em algumas infecções, incluindo a PCM, e tem sido implicada em eventos imunossupressores, que funciona em favor do parasita para limitar a resposta inflamatória exagerada. O processo de apoptose tem sido descrito em pacientes e em um modelo murino com PCM (CACERE et al., 2002; VERÍCIMO et al., 2006). *P. brasiliensis* é capaz de induzir apoptose em macrófagos através de caspases (DEL VECCHIO et al., 2009; SILVA et al., 2008). Além disso, a participação de macrófagos, citocinas, interleucinas e fator de necrose tumoral (TNF) é observada na PCM (De OLIVEIRA et al., 2015; FORTES et al., 2011). A participação dos miRNAs em diferentes aspectos da PCM, traz também a perspectiva de que possam ser uma nova modalidade de tratamento para a infecção.

Em segundo lugar, os miRNAs detectados no soro de pacientes com PCM podem ser utilizados como biomarcadores. O diagnóstico da PCM é baseado em achados clínicos e laboratoriais. No entanto, a cultura é relativamente difícil de obter

e o tempo de crescimento do fungo é lento. Testes sorológicos também podem ajudar no diagnóstico, mas a maioria deles para PCM pode levar a reações cruzadas com outras infecções (CALDINI et al., 2012). A glicoproteína Gp43 tem sido usada no diagnóstico da PCM, mas, recentemente, demonstraram-se elevadas porcentagens de resultados falsos negativos para PCM causada por *P. lutzii* (BATISTA et al., 2010). Assim, mostra-se necessário o achado de novos biomarcadores para o diagnóstico da PCM. Neste contexto, miRNAs tem vantagens como a estabilidade em fluidos corporais, porque são normalmente envolvidos por micropartículas de exossoma que podem protegê-los contra a atividade da RNase endógena. Dessa forma, os miRNAs circulantes mostraram-se estáveis a processos repetidos de congelamento e descongelamento, bem como a meios ácidos e alcalinos (KIM; REITMAIR, 2013). Além disso, técnicas de detecção como PCR são muito sensíveis (HU; DRESCHER; CHEN, 2012; MADHAVAN et al., 2013).

Em suma, embora o pequeno tamanho da mostra seja uma limitação do estudo, a identificação de miRNAs circulantes envolvidos na PCM pode expandir a nossa visão sobre o papel dos mesmos dentro do hospedeiro eucariótico diante da infecção.

9.2. MiRNAs na interação pneumócitos-*Paracoccidioides*

Além da participação de miRNAs circulantes em processos infecciosos, a expressão diferencial de miRNAs em células como resposta a infecção por fungos como *C. albicans* e *A. fumigatus* (Das GUPTA et al., 2014; MONK; HUTVAGNER;

ARTHUR, 2010) tem sido descrita. No presente trabalho, vários miRNAs foram encontrados nos pneumócitos no processo de interação com os fungos do gênero *Paracoccidioides*. Esses miRNAs mostraram-se distintos de acordo com a espécie ou espécie filogenética do fungo. Na linhagem celular infectada com *P. lutzii* 01, a maioria dos miRNAs (8) estavam com expressão reduzida em relação ao controle (Tabela 11), enquanto que nas células infectadas com *P. brasiliensis* 02 (Tabela 12), a maioria dos miRNAs (21) apresentavam expressão elevada. Já para células em interação com *P. brasiliensis* 18, foram observados 8 miRNAs com expressão elevada e 10 com expressão reduzida (Tabela 13).

Tabela 11. miRNAs diferencialmente expressos em células A549 (pneumócitos) infectados com *P. lutzii* 01

MicroRNA com expressão elevada	Quantificação relativa	Valor p
hsa-miR-1911-3p	2,12	0,0496
MicroRNA com expressão reduzida		
hsa-miR-379-5p	0,49	0,0020
hsa-miR-146a-5p	0,47	0,0104
hsa-miR-17-5p	0,41	0,0178
hsa-miR-185-5p	0,39	0,0304
hsa-miR-454-3p	0,31	0,0441
hsa-miR-24-1-5p	0,29	0,0331

Tabela 12. miRNAs diferencialmente expressos em células A549 (pneumócitos) infectados com *P. brasiliensis* 02

MicroRNA com expressão elevada	Quantificação relativa	Valor p
hsa-miR-92a-1-5p	5,80	0,0075
hsa-miR-20a-3p	3,47	0,0076
hsa-miR-125b-1-3p	2,84	0,0342
hsa-miR-181a-3p	2,83	0,0305
hsa-miR-125a-3p	2,63	0,0224
hsa-miR-941	2,60	0,0053
hsa-miR-542-5p	2,51	0,0345
hsa-miR-1245	2,45	0,0265
hsa-miR-18a-5p	2,44	0,0343
hsa-miR-187-3p	2,37	0,0262
hsa-miR-639	2,27	0,0322
hsa-miR-506-3p	2,27	0,0322
hsa-miR-195-3p	2,26	0,0216
hsa-miR-153	2,24	0,0332
hsa-miR-432-3p	2,21	0,004
hsa-miR-200a-3p	2,20	0,0395
hsa-miR-1267	2,20	0,0402
hsa-miR-769-5p	2,17	0,0148
hsa-miR-7-2-3p	2,13	0,0428
hsa-miR-936	2,11	0,0284
hsa-miR-450b-5p	2,07	0,0118
MicroRNA com expressão reduzida		
hsa-miR-9-5p	0,47	0,0341

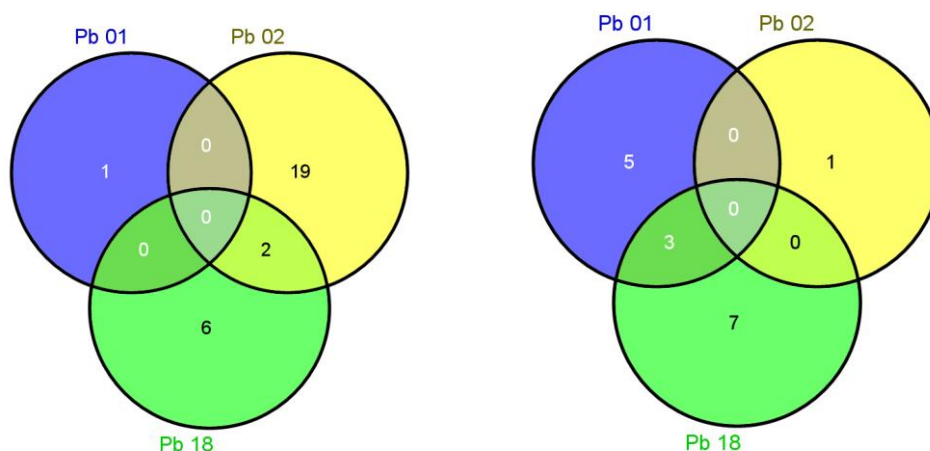
Tabela 13. miRNAs diferencialmente expressos em células A549 (pneumócitos) infectados com *P. brasiliensis* 18

MicroRNA com expressão elevada	Quantificação relativa	Valor p
hsa-miR-26b-3p	3,81	0,0324
hsa-miR-27a-5p	3,50	0,0388
hsa-miR-92a-1-5p	3,43	0,0015
hsa-miR-149-3p	3,17	0,0071
hsa-miR-550a-3p	2,40	0,0109
hsa-miR-145-5p	2,35	0,0030
hsa-miR-181a-2-3p	2,34	0,0209
hsa-miR-941	2,24	0,0293
MicroRNA com expressão reduzida		
hsa-miR-27a-3p	0,50	0,0185
hsa-miR-185-5p	0,44	0,0215
hsa-miR-30a-5p	0,44	0,0301
hsa-miR-379-5p	0,42	0,0118
hsa-miR-26b-5p	0,42	0,0031
hsa-miR-590-5p	0,35	0,0338
hsa-miR-30e-5p	0,34	0,0381
hsa-miR-324-5p	0,22	0,0371
hsa-miR-1538	0,15	0,0473

Do conjunto de miRNAs identificados apenas hsa-miR-92a-1-5p e hsa-miR-941 foram comuns entre as células infectadas com *P. brasiliensis* 02 e *P. brasiliensis* 18 e hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-379-5p e hsa-miR-185-5p foram comuns entre as células infectadas com *P. lutzii* 01 e *P. brasiliensis* 18 (Figura 26). Tal discrepância

pode ser justificada pelo fato das distintas espécies e espécies filogenéticas do gênero *Paracoccidioides* apresentar variação na virulência, adaptação e indução da resposta imune na célula hospedeira (CARVALHO et al., 2005; MATUTE et al., 2006).

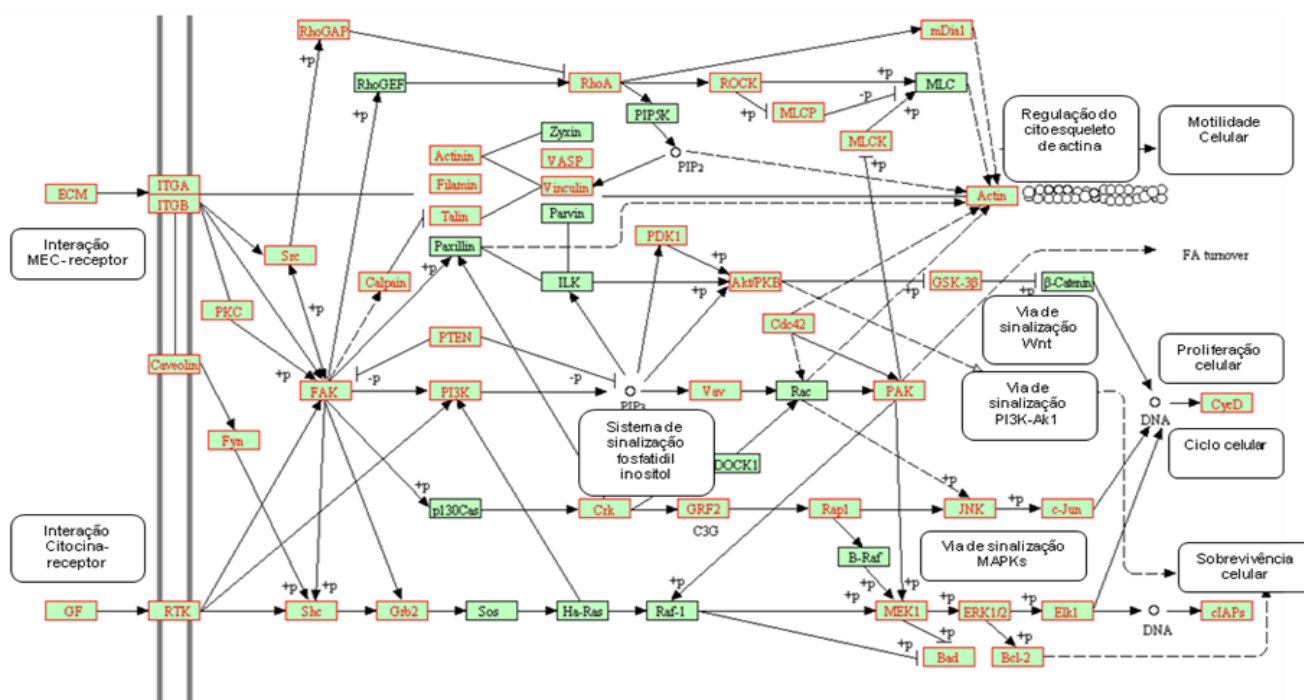
Figura 26. Diagrama Venn com miRNAs comuns nos pneumócitos infectados com as diferentes linhagens filogenéticas do gênero *Paracoccidioides* com expressão reduzida (à esquerda) e com expressão elevada (à direita)



Embora ocorra distinção entre os tipos de miRNAs encontrados no presente trabalho, a análise no programa miRSystem, anotação KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), mostraram que as vias reguladas por eles parecem ser comuns. Nesse contexto, as principais vias encontradas relacionam-se ao processo de adesão entre o fungo e a célula (adesão focal, interação com matriz extracelular, junção GAP, junção tight); ao processo de invasão (endocitose, rearranjo do citoesqueleto de actina); inflamação (via de sinalização Wnt) e indução da apoptose

(via de sinalização MAPK, do p53 e do TGF- β). As vias, bem como os genes regulados pelos miRNAs encontrados estão representados na Figura 27.

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



Algumas das vias encontradas já foram descritas no processo de interação *Paracoccidioides* - células epiteliais e endoteliais, entretanto o presente trabalho traz o primeiro relato da participação dos miRNAs nessas vias. O processo de adesão a componentes da MEC como colágenos tipos I e IV, laminina e fibronectina, por exemplo, caracteriza-se como uma etapa crucial na interação. Além disso, a entrada de *P. brasiliensis* em células epiteliais A549 e Vero envolve rearranjo dos componentes do citoesqueleto das células hospedeiras, como actina e tubulina, com

a intenção de induzir pseudopodia (MENDES-GIANNINI et al., 2004, 2008). Já no interior das células, fungos do gênero *Paracoccidioides* induzem mecanismos de apoptose por modificarem a expressão de caspase 3, Bak e Bcl 2 e em consequência promover a fragmentação do DNA (DEL VECCHIO et al., 2009; MENDES-GIANNINI et al., 2004). A indução da secreção de interleucinas como IL-6 e IL-8 e a modulação dos níveis de citocinas em células epiteliais pulmonares também foram observadas na interação com fúngicas *P. brasiliensis* (MAZA et al., 2011).

Em resumo, embora os miRNAs encontradas tanto nas células infectadas pelas diferentes espécies de *Paracoccidioides* sp, bem como no soro de pacientes com PCM, sejam distintos, as principais vias reguladas por eles são comuns e relacionam-se ao processo de adesão entre o fungo e a célula, apoptose e resposta imune.

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. Nanostructured 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.

BITRAGO, 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-quinoliny 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 $\alpha 1$ -antitrypsin Z. **PLoS One**, v. 5, n. 11, p. e15460, 2010.

GRIFFITHS-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 marneffe*. **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; maintenance 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 NF κ B activity by gallic acid and its semi-synthetic esters: possible role in cancer chemoprevention. **Nat Prod Res**, v. 24, n. 18, p. 1758–65, 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.

CAPÍTULO 2

1. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Para o cumprimento das normas do Programa de Pós Graduação de Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia (FCFAR – UNESP), o capítulo 2 consitui-se da produção científica obtida durante o doutoramento. A primeira página dos artigos encontra-se na sequência.

1.1. Artigos publicados como primeira autora

SINGULANI, JUNYA DE LACORTE; SCORZONI, LILIANA; DE PAULA E SILVA, ANA CAROLINA ALVES; FUSCO-ALMEIDA, ANA MARISA; MENDES-GIANNINI, MARIA JOSÉ SOARES. Evaluation of the efficacy of antifungal drugs against *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* in a *Galleria mellonella* model. International Journal of Antimicrobial Agents, v. 48, p. 292, 2016.

SINGULANI, JUNYA DE LACORTE; SILVA, JULHIANY DE FÁTIMA; GULLO, FERNANDA PATRICIA; COSTA, MARINA CÉLIA; FUSCO-ALMEIDA, ANA MARISA; ENGUITA, FRANCISCO JAVIER; MENDES-GIANNINI, MARIA JOSÉ SOARES. Preliminary evaluation of circulating microRNAs as potential biomarkers in paracoccidioidomycosis. Biomedical Reports, 2017.

1.2. Artigos publicados como co-autora

MARTINS, CARLOS HENRIQUE GOMES; PIRES, REGINA HELENA; CUNHA, ALINE OLIVEIRA; PEREIRA, CRISTIANE APARECIDA MARTINS; **SINGULANI, JUNYA DE LACORTE**; ABRÃO, FARIZA; MORAES, THAIS DE; MENDES-GIANNINI, MARIA JOSÉ SOARES. Candida/Candida biofilms. First description of dual-species *Candida albicans*/*C. rugosa* biofilm. Fungal Biology, v. 120, p. 530-537, 2016.

SCORZONI, LILIANA; SANGALLI-LEITE, FERNANDA; **SINGULANI, JUNYA DE LACORTE**; DE PAULA E SILVA, ANA CAROLINA ALVES; COSTA-ORLANDI, CAROLINE BARCELOS; FUSCO-ALMEIDA, ANA MARISA; MENDES-GIANNINI, MARIA JOSÉ SOARES. Searching new antifungals: The use of *in vitro* and *in vivo* methods for evaluation of natural compounds. *Journal of Microbiological Methods*, v. 123, p. 68-78, 2016.

SANGALLI-LEITE, FERNANDA; SCORZONI, LILIANA; ALVES DE PAULA E SILVA, ANA CAROLINA; DA SILVA, JULHIANY DE FÁTIMA; DE OLIVEIRA, HAROLDO CESAR; **SINGULANI, JUNYA DE LACORTE**; GULLO, FERNANDA PATRÍCIA; MORAES DA SILVA, ROSANGELA; REGASINI, LUIS OCTÁVIO; SIQUEIRA DA SILVA, DULCE HELENA; DA SILVA BOLZANI, VANDERLAN; FUSCO-ALMEIDA, ANA MARISA; SOARES MENDES-GIANNINI, MARIA JOSÉ. Synergistic effect of pedalitin and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans* by *in vitro* and *in vivo* evaluation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 48, p. 504-511, 2016.

DE OLIVEIRA, HAROLDO C.; ASSATO, PATRÍCIA A.; MARCOS, CAROLINE M.; SCORZONI, LILIANA; DE PAULA E SILVA, ANA C. A.; DA SILVA, JULHIANY DE FÁTIMA; **SINGULANI, JUNYA DE LACORTE**; ALARCON, KAILA M.; FUSCO-ALMEIDA, ANA M.; MENDES-GIANNINI, MARIA J. S. *Paracoccidioides*-host Interaction: An Overview on Recent Advances in the Paracoccidioidomycosis. *Frontiers in Microbiology* (Online), v. 6, p. 1-20, 2015.

SCORZONI, LILIANA; DE PAULA E SILVA, ANA CAROLINA ALVES; **SINGULANI, JUNYA DE LACORTE**; LEITE, FERNANDA SANGALLI; DE OLIVEIRA, HAROLDO CESAR; MORAES DA SILVA, ROSANGELA APARECIDA; FUSCO-ALMEIDA, ANA MARISA; MENDES GIANNINI, MARIA JOSÉ SOARES. Comparison of virulence between *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* using *Galleria mellonella* as a host model. *Virulence*, v. 6, p. 766, 2015.

MARCOS, CAROLINE MARIA; DA SILVA, JULHIANY DE FÁTIMA; DE OLIVEIRA, HAROLDO CESAR; ASSATO, PATRÍCIA AKEMI; **SINGULANI, JUNYA DE LACORTE**; LOPEZ, ANGELA MARIA; TAMAYO, DIANA PATRICIA; HERNANDEZ-RUIZ, ORVILLE; MCEWEN, JUAN G.; MENDES-GIANINNI, MARIA JOSÉ SOARES; FUSCO-ALMEIDA, ANA MARISA. Decreased expression of 14-3-3 in *Paracoccidioides brasiliensis* confirms its involvement in fungal pathogenesis. *Virulence*, v. 7, p. 72, 2015.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijantimicag

Evaluation of the efficacy of antifungal drugs against *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* in a *Galleria mellonella* model



Junya de Lacorte Singulani, Liliana Scorzoni, Ana Carolina Alves de Paula e Silva,
Ana Marisa Fusco-Almeida, Maria José Soares Mendes-Giannini *

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rodovia Araraquara—Jauú Km 1, Araraquara, São Paulo CEP: 14801-902, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 January 2016

Accepted 22 May 2016

Keywords:

Alternative animal model

Antifungals

Efficacy

Paracoccidioidomycosis

ABSTRACT

Paracoccidioides brasiliensis and *P. lutzii* belong to a group of thermomorph fungi and cause paracoccidioidomycosis (PCM), which is a human systemic mycosis endemic in South and Central America. Patients with this mycosis are commonly treated with amphotericin B (AmB) and azoles. The study of fungal virulence and the efficacy and toxicity of antifungal drugs has been successfully performed in a *Galleria mellonella* infection model. In this work, *G. mellonella* larvae were infected with two *Paracoccidioides* spp. and the efficacy and toxicity of AmB and itraconazole were evaluated in this model for the first time. AmB and itraconazole treatments were effective in increasing larval survival and reducing the fungal burden. The fungicidal and fungistatic effects of AmB and itraconazole, respectively, were observed in the model. Furthermore, these effects were independent of changes in haemocyte number. *G. mellonella* can serve as a rapid model for the screening of new antifungal compounds against *Paracoccidioides* and can contribute to a reduction in experimental animal numbers in the study of PCM.

© 2016 Elsevier B.V. and International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

1. Introduction

Paracoccidioides brasiliensis belongs to a group of thermomorph fungi that is found in the form of mycelia at room temperature (25–27 °C) and in yeast form at body temperature (37 °C). Phylogenetic studies showed the existence of three different phylogenetic species of *P. brasiliensis* (S1, PS2 and PS3) [1]. More recently, genomic studies showed that *P. brasiliensis* strain 01 could not be included in these groups and was considered a new species, termed *P. lutzii* [2,3]. The individual characteristics of each species have implications in the diagnosis, clinical manifestations and treatment of the disease [4].

Paracoccidioides spp. causes paracoccidioidomycosis (PCM), a human systemic mycosis whose clinical importance has increased due to the frequency, severity of their anatomical and clinical forms, and mortality rate. PCM is endemic in South and Central America, among which Brazil, Venezuela, Colombia and Argentina are the countries with the highest number of cases. In these regions, the annual incidence rate of new cases ranges from 1 to 3 per 10⁵ inhabitants. In Brazil, PCM is the eighth most important cause of

mortality from chronic infectious diseases, with 1.65 deaths per 10⁶ inhabitants. In non-endemic regions such as the USA, Europe and Asia, some imported cases have been reported. The marked predominance of clinical disease is in adult men, rural workers and the immunocompromised [5–7].

Paracoccidioides infection occurs upon inhalation of propagules by the host. These structures then invade terminal airways, where they differentiate into yeast forms. Temperature is essential for this transformation. The lung is the first site of infection, but the yeast can spread to other organs. It is speculated that modulation of host cell apoptosis is advantageous for the fungi because the micro-organisms can evade the killing activity of the phagocytic antimicrobial machinery in tissues; this would prevent their death, and the fungi could disseminate through the host's circulatory system and stimulate the inflammatory response to invade tissues as a consequence of these injuries [8]. There is evidence that *P. brasiliensis* is able to modulate the chronic inflammatory response through nitric oxide (NO), which improves tissue degradation and/or decreases extracellular matrix synthesis by controlling inflammatory and immune mediators. In the later phase of PCM, the deleterious effects of NO may be associated with loose granulomas and high fungal dissemination [9,10]. Treatment of PCM takes place over long periods of time and depends on the severity in each patient: azoles (itraconazole, fluconazole and voriconazole) and sulfonamides are options for mild-to-moderate clinical forms; and amphotericin B (AmB) is used for severe and disseminated cases [6,7,11].

* Corresponding author. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rodovia Araraquara—Jauú Km 1, Araraquara, São Paulo CEP: 14801-902, Brazil. Fax: +55 16 3322-0073.

E-mail addresses: gianninimj@gmail.com; giannini@fcar.unesp.br (M.J.S. Mendes-Giannini).

Preliminary evaluation of circulating microRNAs as potential biomarkers in paracoccidioidomycosis

JUNYA DE LACORTE SINGULANI¹, JULHIANY DE FÁTIMA DA SILVA¹,
FERNANDA PATRICIA GULLO¹, MARINA CÉLIA COSTA², ANA MARISA FUSCO-ALMEIDA¹,
FRANCISCO JAVIER ENGUITA² and MARIA JOSÉ SOARES MENDES-GIANNINI¹

¹Department of Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, São Paulo 14800-901, Brazil; ²Faculty of Medicine, Institute of Molecular Medicine, University of Lisbon, 1649-004 Lisbon, Portugal

Received September 26, 2016; Accepted January 9, 2017

DOI: 10.3892/br.2017.849

Abstract. MicroRNAs (miRNAs) are small RNAs (19-24 nucleotides) that regulate gene expression through mRNA degradation or translational inhibition of mRNAs. Circulating miRNAs, which are extremely stable and protected from RNase-mediated degradation in body fluids, have appeared as candidate biomarkers for numerous diseases. However, little is known about circulating miRNAs in fungal infections. Paracoccidioidomycosis (PCM) is caused by the *Paracoccidioides* species, and is endemic in Central and South America, with predominance in adult workers from rural areas. The current study aimed to identify a serum miRNA expression profile that could serve as a novel diagnostic biomarker for PCM. Total RNA was isolated and the levels of circulating miRNAs were compared between patients with PCM and healthy control subjects using reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction. Bioinformatic analysis was used to evaluate the potential roles of these miRNAs in PCM. Eight miRNAs were differentially expressed in serum samples from patients with PCM. These miRNAs are associated with apoptosis and immune response. Identified miRNAs facilitate with understanding the regulatory mechanisms involved in the host-parasite interaction of PCM. Furthermore, considering that the diagnosis of PCM presents difficulties, these miRNAs may serve as novel biomarkers for this disease.

Introduction

MicroRNAs (miRNAs) are an abundant class of short regulatory non-coding RNAs (ncRNAs; length, 20-24 nucleotides) that act as post-transcriptional repressors by binding the 3'-untranslated regions (UTRs) of target messenger RNAs (mRNAs). The regulatory activity of miRNAs is exerted at the post-transcriptional level and it is estimated that they act on up to one-third of the protein coding genes. miRNAs have been implicated in various biological and pathological processes, and have emerged as important contributors to cell homeostasis (1).

Cells actively secrete miRNAs, and it is possible to detect those small ncRNAs in all biological fluids. As a consequence, circulating miRNAs have great potential as biomarkers, which has already been reported for various types of human disease, such as cancer (2), metabolic disorders (3) and cardiac conditions (4). In systemic infections, the presence of a pathogenic agent often induces a significant change in the profile of circulating miRNAs that facilitates their use as biomarkers of disease establishment and progression. In certain cases, such as viral infections, these changes in circulating miRNAs are associated with the targeted cell, as demonstrated in the acute and chronic hepatitis C virus infection (5,6). Parasitic flatworms, such as *Schistosoma japonicum* induce a differential expression of circulating miRNAs (7). Furthermore, previous studies have suggested the involvement of circulating miRNAs in response to bacterial infections, including active pulmonary tuberculosis (8). However, the potential use of circulating miRNAs as biomarkers in fungal infections has been investigated comparatively less. In this context, in response to infection with *Candida albicans*, miR-455, miR-125a, miR-146 and miR-155 were upregulated in mouse macrophages and miR-204 and miR-211 were downregulated in renal mice tissues (9,10). In monocytes and dendritic cells infected with *Aspergillus fumigatus*, miR-132 and miR-155 were identified to be differentially expressed (11).

The incidence of fungal infections has increased in recent years and is associated with significant morbidity and mortality (12). Paracoccidioidomycosis (PCM) is a human systemic mycosis that is considered to be clinically important, due to the increase of frequency, the severity of their clinical

Correspondence to: Dr Maria José Soares Mendes-Giannini, Department of Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP), Rodovia Araraquara n° 1, Araraquara, São Paulo 14800-901, Brazil
E-mail: giannini@unesp.br

Keywords: microRNA, serum, *Paracoccidioides* spp., biological marker



British Mycological
Society promoting fungal science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/funbio



Candida/Candida biofilms. First description of dual-species *Candida albicans*/C. rugosa biofilm



Carlos Henrique Gomes MARTINS^{a,1}, Regina Helena PIRES^{a,b,*},
Aline Oliveira CUNHA^a, Cristiane Aparecida Martins PEREIRA^a,
Junya de Lacorte SINGULANI^b, Fariza ABRÃO^a, Thais de MORAES^a,
Maria José Soares MENDES-GIANNINI^b

^aLaboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada, Universidade de Franca, UNIRAN, Av. Dr. Armando Salles de Oliveira, 201, Pq. Universitário, Franca, SP 14404-600, Brazil

^bUniversidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Rodovia Araraquara-Jaú, km 1, Araraquara, SP 14.902-801, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 July 2015

Received in revised form

19 January 2016

Accepted 20 January 2016

Available online 4 February 2016

Corresponding Editor:

Nicholas P. Money

Keywords:

Candida rugosa

Dual-species biofilms

Fungal biofilms

Oral colonization

Prostheses-related infections

ABSTRACT

Denture liners have physical properties that favour plaque accumulation and colonization by *Candida* species, irritating oral tissues and causing denture stomatitis. To isolate and determine the incidence of oral *Candida* species in dental prostheses, oral swabs were collected from the dental prostheses of 66 patients. All the strains were screened for their ability to form biofilms; both monospecies and dual-species combinations were tested. *Candida albicans* (63 %) was the most frequently isolated microorganism; *Candida tropicalis* (14 %), *Candida glabrata* (13 %), *Candida rugosa* (5 %), *Candida parapsilosis* (3 %), and *Candida krusei* (2 %) were also detected. The XTT assay showed that *C. albicans* SC5314 possessed a biofilm-forming ability significantly higher ($p < 0.001$) than non-*albicans* *Candida* strains, after 6 h 37 °C. The total *C. albicans* CFU from a dual-species biofilm was less than the total CFU of a monospecies *C. albicans* biofilm. In contrast to the profuse hyphae verified in monospecies *C. albicans* biofilms, micrographies showed that the *C. albicans*/non-*albicans* *Candida* biofilms consisted of sparse yeast forms and profuse budding yeast cells that generated a network. These results suggested that *C. albicans* and the tested *Candida* species could co-exist in biofilms displaying apparent antagonism. The study provide the first description of *C. albicans*/C. *rugosa* mixed biofilm.

© 2016 The British Mycological Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Candida species inhabit the human oral cavity. *Candida albicans* is the species that is predominantly associated with mucosal and systemic fungal infections elicited by yeasts (Miceli et al.

2011). Nevertheless non-*albicans* *Candida* species have arisen a major opportunistic pathogens. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, and *Candida krusei* have been frequently isolated from the oral cavity and are often related to biofilm formation on the surface of medical devices and

* Corresponding author. Tel.: +55 16 99127 5654.

E-mail addresses: regina.pires@unifran.edu.br, rehepi@gmail.com (R. H. Pires).

¹ Authors contributing equally to this article.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2016.01.013>

1878-6146/© 2016 The British Mycological Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Microbiological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmicmeth

Review

Searching new antifungals: The use of *in vitro* and *in vivo* methods for evaluation of natural compounds

Liliana Scorzoni ^{*}, Fernanda Sangalli-Leite, Junya de Lacorte Singulani, Ana Carolina Alves de Paula e Silva, Caroline Barcelos Costa-Orlandi, Ana Marisa Fusco-Almeida, Maria José Soares Mendes-Giannini ^{*}

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus Araraquara, Departamento de Análises Clínicas, Núcleo de Proteômica, Laboratório de Micologia Clínica, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 November 2015

Received in revised form 29 January 2016

Accepted 3 February 2016

Available online 4 February 2016

Keywords:

Fungi

Natural compounds

Antifungal activity

Efficacy

Methods

ABSTRACT

In the last decades, the increased number of immunocompromised patients has led to the emergence of many forms of fungal infections. Furthermore, there are a restricted arsenal of antifungals available and an increase in the development of resistance to antifungal drugs. Because of these disadvantages, the search for new antifungal agents in natural sources has increased. The development of these new antifungal drugs involves various steps and methodologies. The evaluation of the *in vitro* antifungal activity and cytotoxicity are the first steps in the screening. There is also the possibility of antifungal combinations to improve the therapy and reduce toxicity. Despite that, the application of the new antifungal candidate could be used in association with photodynamic therapy or using nanotechnology as an ally. *In vivo* tests can be performed to evaluate the efficacy and toxicity using conventional and alternative animal models. In this work, we review the methods available for the evaluation of the antifungal activity and safety of natural products, as well as the recent advances of new technology in the application of natural products for antifungal therapy.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	69
2. <i>In vitro</i> Methods	69
2.1. AGAR diffusion	69
2.2. Macrodilution and microdilution assay	70
2.3. Minimum fungicidal concentration assay	70
2.4. Colorimetric assays	70
2.5. Cytotoxicity assay	70
2.6. Combination of substances	71
3. <i>In vivo</i> models	71
3.1. Toxicology	71
3.2. Pharmacokinetics	71
3.3. Alternative animal models	72
3.4. Efficacy in mammalian model	72
4. New strategies to enhance the efficacies of antifungals	73
4.1. Photodynamic therapy (pdt) using natural compounds	73
4.2. The development of antifungal natural products using nanoparticle technology	73
4.3. Combination of PDT and nanoparticles of natural compounds against antifungal infection	74
5. Conclusion	75
Acknowledgments	75
References	75

^{*} Corresponding authors at: Laboratório de Micologia Clínica, Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, Brazil, Rodovia Araraquara - Jauú Km 1, 14801-902.

E-mail addresses: liliscorzoni@yahoo.com.br (L. Scorzoni), giannini@cfar.unesp.br (M.J.S. Mendes-Giannini).



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijantimicagSynergistic effect of pedalitin and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans* by in vitro and in vivo evaluation

Fernanda Sangalli-Leite ^a, Lilita Scorzoni ^a, Ana Carolina Alves de Paula e Silva ^a,
Julhiany de Fátima da Silva ^a, Haroldo Cesar de Oliveira ^a, Junya de Lacorte Singulani ^a,
Fernanda Patrícia Gullo ^a, Rosângela Moraes da Silva ^a, Luis Octávio Regasini ^b,
Dulce Helena Siqueira da Silva ^b, Vanderlan da Silva Bolzani ^b,
Ana Marisa Fusco-Almeida ^a, Maria José Soares Mendes-Giannini ^{a,*}

^a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Departamento de Análises Clínicas, Laboratório de Micologia Clínica, Araraquara, Brazil

^b Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 May 2016

Accepted 30 July 2016

Keywords:

Cryptococcus neoformans

Pedalitin

Amphotericin B

Chequerboard

Galleria mellonella

ABSTRACT

Cryptococcosis is an opportunistic fungal infection responsible for high morbidity and mortality in immunocompromised patients. Combination of antifungal substances is a promising way to increase the percentage of successful treatment. Pedalitin (PED) is a natural substance obtained from *Pterogyne nitens*. The aim of this study was to verify the efficacy of PED alone and in combination with amphotericin B (AmB) in vitro and in vivo against *Cryptococcus* spp. In the in vitro assay, minimum inhibitory concentrations (MICs) of 0.125 mg/L for AmB and 3.9 mg/L for PED were found when the substances were tested alone, whilst in the combination treatment the active concentration of both decreased, with MICs of 0.03 mg/L for AmB and 1 mg/L for PED. In the survival assay, fungal burden study and histopathological assays it was possible to study the efficacy of the substances alone and in combination. The efficacy of combination therapy was considered better than monotherapy as evaluated in a *Galleria mellonella* model and a murine model. Thus, the combination of PED and AmB is an interesting alternative for anticytotoxic fungal treatment. Moreover, a correlation was observed between the invertebrate and murine models for this antifungal treatment combination.

© 2016 Elsevier B.V. and International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

1. Introduction

Cryptococcus neoformans and *Cryptococcus gattii* are the main pathogenic species causing cryptococcosis, an opportunistic fungal infection caused by inhaling basidiospores or dissected yeasts present in the environment, affecting the respiratory tract of the host and causing severe pneumonia and respiratory insufficiency [1,2]. Cryptococcosis mainly affects immunocompromised patients, in whom the yeast can reach other sites of infection such as the central nervous system, causing meningitis and meningoencephalitis. Cryptococcosis is responsible for high morbidity and mortality in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients [3–5].

Therapy for cryptococcosis comprises the combination of 5-flucytosine and amphotericin B (AmB), which presents high toxicity. Maintenance therapy is recommended with fluconazole, but

the development of resistant strains has been described [6–8]. Natural substances have been shown to be an interesting alternative in the search for new antifungals, serving as templates for the synthesis of new compounds with fewer side effects and better biological activity [9].

Pterogyne nitens belongs to the family Fabaceae and is found distributed from the northeast to the south of Brazil as well as in Paraguay, Bolivia and Argentina. The crude extract of its leaves has been studied, culminating in the isolation and characterisation of various pure substances, including the flavonoid pedalitin (PED) [10]. Chromatographic (gel permeation chromatography and high-performance liquid chromatography) and spectroscopic [nuclear magnetic resonance (NMR)] techniques were carried out with crude extract of the leaves of *P. nitens* to afford the isolation and characterisation of the flavonoids kaempferol, afzelin, lespedin or kaempferitrin, pteroginoside, quercetin and isoquercetin and the flavone PED [11]. The PED structure was elucidated by NMR spectrometry and high-resolution mass spectrometry [12].

Combination of antifungal substances is a promising way to increase the percentage of successful treatment [13]. In vitro data showed that low doses of AmB might be used in combination with

* Corresponding author. Rodovia Araraquara-Jaú Km 1, CEP: 14801-902, Araraquara, São Paulo, Brazil.

E-mail address: giannini@fcar.unesp.br (M.J. Soares Mendes-Giannini).



Paracoccidioides-host Interaction: An Overview on Recent Advances in the Paracoccidioidomycosis

Haroldo C. de Oliveira, Patrícia A. Assato, Caroline M. Marcos, Liliana Scorzoni, Ana C. A. de Paula E Silva, Julhiany De Fátima Da Silva, Junya de Lacorte Singulani, Kaila M. Alarcon, Ana M. Fusco-Almeida and Maria J. S. Mendes-Giannini*

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Campus Araraquara, Departamento de Análises Clínicas, Laboratório de Micologia Clínica, São Paulo, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Hector Mora Montes,
Universidad de Guanajuato, Mexico

Reviewed by:

Carlos Pelleschi Taborda,
University of São Paulo, Brazil
Anderson Messias Rodrigues,
Federal University of São Paulo, Brazil

*Correspondence:

Maria J. S. Mendes-Giannini
giannini@fcar.unesp.br

Specialty section:

This article was submitted to
Fungi and Their Interactions,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 01 September 2015

Accepted: 09 November 2015

Published: 25 November 2015

Citation:

de Oliveira HC, Assato PA,
Marcos CM, Scorzoni L, de Paula E
Silva ACA, Da Silva JF, Singulani JL,
Alarcon KM, Fusco-Almeida AM
and Mendes-Giannini MJS (2015)
Paracoccidioides-host Interaction: An
Overview on Recent Advances
in the Paracoccidioidomycosis.
Front. Microbiol. 6:1319.
doi: 10.3389/fmicb.2015.01319

Paracoccidioides brasiliensis and *P. lutzii* are etiologic agents of paracoccidioidomycosis (PCM), an important endemic mycosis in Latin America. During its evolution, these fungi have developed characteristics and mechanisms that allow their growth in adverse conditions within their host through which they efficiently cause disease. This process is multi-factorial and involves host-pathogen interactions (adaptation, adhesion, and invasion), as well as fungal virulence and host immune response. In this review, we demonstrated the glycoproteins and polysaccharides network, which composes the cell wall of *Paracoccidioides* spp. These are important for the change of conidia or mycelial (26°C) to parasitic yeast (37°C). The morphological switch, a mechanism for the pathogen to adapt and thrive inside the host, is obligatory for the establishment of the infection and seems to be related to pathogenicity. For these fungi, one of the most important steps during the interaction with the host is the adhesion. Cell surface proteins called adhesins, responsible for the first contact with host cells, contribute to host colonization and invasion by mediating this process. These fungi also present the capacity to form biofilm and through which they may evade the host's immune system. During infection, *Paracoccidioides* spp. can interact with different host cell types and has the ability to modulate the host's adaptive and/or innate immune response. In addition, it participates and interferes in the coagulation system and phenomena like cytoskeletal rearrangement and apoptosis. In recent years, *Paracoccidioides* spp. have had their endemic areas expanding in correlation with the expansion of agriculture. In response, several studies were developed to understand the infection using *in vitro* and *in vivo* systems, including alternative non-mammal models. Moreover, new advances were made in treating these infections using both well-established and new antifungal agents. These included natural and/or derivate synthetic substances as well as vaccines, peptides, and anti-adhesins sera. Because of all the advances in the PCM study, this review has the objective to summarize all of the recent discoveries on *Paracoccidioides*-host interaction, with particular emphasis on fungi surface proteins (molecules that play a fundamental role in the adhesion and/or dissemination of the fungi to host-cells), as well as advances in the treatment of PCM with new and well-established antifungal agents and approaches.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*, *Paracoccidioides lutzii*, fungi-host interaction, paracoccidioidomycosis, *Paracoccidioides* pathogenicity and virulence

Comparison of virulence between *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* using *Galleria mellonella* as a host model

Liliana Scorzoni*, Ana Carolina Alves de Paula e Silva, Junya de Lacorte Singulani, Fernanda Sangalli Leite, Haroldo Cesar de Oliveira, Rosangela Aparecida Moraes da Silva, Ana Marisa Fusco-Almeida, and Maria José Soares Mendes-Giannini*

Faculdade de Ciências Farmacêuticas; UNESP-Univ Estadual Paulista; Campus Araraquara; Departamento de Análises Clínicas e Núcleo de Proteômica; Laboratório de Micologia Clínica; Araraquara, São Paulo, Brazil

Keywords: adhesion, adhesin, gp43, *Galleria mellonella*, hemocyte, *Paracoccidioides* spp, virulence

Paracoccidioidomycosis is a systemic mycosis, endemic in Latin America. The etiologic agents of this mycosis are composed of 2 species: *Paracoccidioides brasiliensis* and *P. lutzii*. Murine animal models are the gold standard for in vivo studies; however, ethical, economical and logistical considerations limit their use. *Galleria mellonella* is a suitable model for in vivo studies of fungal infections. In this study, we compared the virulence of *P. brasiliensis* and *P. lutzii* in *G. mellonella* model. The deaths of larvae infected with *P. brasiliensis* or *P. lutzii* were similar, and both species were able to reduce the number of hemocytes, which were estimated by microscopy and flow cytometer. Additionally, the phagocytosis percentage was similar for both species, but when we analyze hemocyte-*Paracoccidioides* spp. interaction using flow cytometer, *P. lutzii* showed higher interactions with hemocytes. The gene expression of gp43 as well as this protein was higher for *P. lutzii*, and this expression may contribute to a greater adherence to hemocytes. These results helped us evaluate the behavior of *Paracoccidioides* spp in *G. mellonella*, which is a convenient model for investigating the host-*Paracoccidioides* spp. interaction.

Introduction

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis that is caused by thermally dimorphic fungi from the genus *Paracoccidioides*. This infection is endemic in Latin America and has higher incidences in Brazil, Argentina, Colombia and Venezuela.¹ In Brazil, the annual incidence reaches 30 per million inhabitants, and the mortality rate is 1.4 per million per year.² This mycosis has many clinical presentations, and retrospective studies have demonstrated that some factors, such as the host's immune response, age, gender and ethnicity, may influence the clinical presentation.³ The incidence of chronic infection in the lungs and the upper respiratory tract is more frequent in men older than 30. The sub-acute form is commonly found in children and young adults and in afro-descendant women older than 20 years.^{3,4} The *Paracoccidioides* spp mycelial form is found in nature and its propagules are the infective forms of the disease. The infection occurs upon inhalation of the propagules, and during this process, the fungus converts into a yeast form. The temperature is essential for this transformation.^{1,5}

Genetic studies have revealed the existence of 3 different phylogenetic species in *P. brasiliensis* called S1, PS2 and PS3.⁵ A new species was detected by using molecular approaches; the species started as Pb01-like and has been renamed *P. lutzii*.^{6,7} In Brazil,

a higher incidence of *P. brasiliensis* is found in the south and southeast region and *P. lutzii* predominantly occurs in the western-central part of Brazil.⁸

The *Paracoccidioides* spp. virulence mechanism involves dimorphism,⁹ metalloproteins,¹⁰ adhesins, biofilm formation,^{11,12} and melanin production,¹³ which play important roles in the infection. Fungal-cell interaction is an essential factor in the establishment of the infection, and for this action, the fungus recognizes specific ligands (carbohydrates and proteins) found in the extracellular matrix, thereby initiating infection and its subsequent spread.¹⁴ In *Paracoccidioides* spp, many proteins known as adhesins mediate this process,¹¹ and those with multiple functions are known as 'moonlighting' proteins.¹⁵

Murine models are considered to be the gold standard for the study of fungal pathogenesis and for analyzing the efficacy of antifungal treatments. In 1959, initial studies were conducted in which mice were used as infection models for paracoccidioidomycosis.¹⁶ At present, mice are the standard models for mimicking what occurs in the human disease. Many groups use infection by inhalation routes; however, some studies have described a lack of reproducibility caused by the difficulties the yeast have in reaching the lungs.^{17–19} Another important aspect to consider is long-term survival curves when using mice as models; specifically, *P. brasiliensis* (Pb18) could require 2 to 8 months for each

*Correspondence to: Liliana Scorzoni; Email: liliscorzoni@yahoo.com.br; Maria José Soares Mendes-Giannini; Email: giannini@fcar.unesp.br
Submitted: 05/11/2015; Revised: 07/21/2015; Accepted: 07/23/2015
<http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2015.1085277>

Decreased expression of 14-3-3 in *Paracoccidioides brasiliensis* confirms its involvement in fungal pathogenesis

Caroline Maria Marcos¹, Julhiany de Fátima da Silva¹, Haroldo Cesar de Oliveira¹, Patrícia Akemi Assato¹, Junya de Lacorte Singulani¹, Angela Maria Lopez², Diana Patricia Tamayo², Orville Hernandez-Ruiz^{2,3}, Juan G McEwen^{2,4}, Maria José Soares Mendes-Giannini¹, and Ana Marisa Fusco-Almeida^{1,*}

¹Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara; UNESP - Univ Estadual Paulista; Departamento de Análises Clínicas; Laboratório de Micologia Clínica; Araraquara, São Paulo, Brazil; ²Unidad de Biología Celular y Molecular; Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB) - Medellín, Colombia; ³Escuela de Microbiología; Universidad de Antioquia; Medellín, Colombia; ⁴Facultad de Medicina; Universidad de Antioquia; Medellín, Colombia

Keywords: gene knockdown, morphological alterations, *Paracoccidioides brasiliensis*, virulence, 14-3-3 protein

The interaction between the fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* and host cells is usually mediated by specific binding events between adhesins on the fungal surface and receptors on the host extracellular matrix or cell surface. One molecule implicated in the *P. brasiliensis*-host interaction is the 14-3-3 protein. The 14-3-3 protein belongs to a family of conserved regulatory molecules that are expressed in all eukaryotic cells and are involved in diverse cellular functions. Here, we investigated the relevance of the 14-3-3 protein to the virulence of *P. brasiliensis*. Using antisense RNA technology and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, we generated a 14-3-3-silenced strain (expression reduced by 55%). This strain allowed us to investigate the interaction between 14-3-3 and the host and to correlate the functions of *P. brasiliensis* 14-3-3 with cellular features, such as morphological characteristics and virulence, that are important for pathogenesis.

Introduction

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by fungi of the *Paracoccidioides* species complex (*P. brasiliensis* and *P. lutzii*). PCM is important due to the frequency and severity of the cases.¹ It is geographically confined to Latin America, with more than 10 million people possibly infected in this continent,² and the highest incidence occurs in Brazil (80%).^{3,4}

Fungi from the *Paracoccidioides* genus are thermal dimorphic fungi that grow both in a yeast form (at approximately 37°C) and as mycelia (below 25°C). Infection occurs mainly by inhalation of airborne propagules released by the mycelial form; once in the lungs and in contact with the host body temperature, it transforms to its yeast form, which is responsible for the symptoms and clinical manifestations during disease.^{5,6}

The development and the course of the microbial infection can be considered a multifactorial process that results from the interaction between the virulence factors of pathogen, leading to the pathogen's establishment in the host and causing disease, and the host's ability to prevent and resist microbial colonization or invasion.^{7–10}

The pathogen uses a large repertoire of surface molecules, specifically adhesins, that can bind to the extracellular matrix (ECM) of various cell types in the host, inducing endocytosis in

normally non-phagocytic cells (epithelial and endothelial cells) during the invasion process.^{11,12} This interaction with the ECM has been correlated with the processes of adhesion and invasion. The ECM is composed of components such as collagen, laminin, fibronectin, vitronectin and proteoglycans, which participate in the regulation of physiological processes including cell migration, signaling and the transport of solutes across cellular barriers. The respiratory tract, the primary focus of PCM, is composed of tissues rich in ECM, such as laminin and various types of collagen. Moreover, alveolar fibroblasts in the lungs secrete ECM components.^{12–14}

A required step for colonization and ultimately the development of disease is the ability of pathogens to adhere to host surfaces. The ability to adhere is a biological phenomenon that is widely distributed and shared by many pathogens, enabling the colonization of their respective habitats.^{15,16} Some adhesins have been described for *P. brasiliensis*, such as gp43,^{17,18} glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,¹⁹ triose phosphate isomerase,²⁰ enolase,^{21,22} a 32-Kda hydrolase,^{23,24} malate synthase,²⁵ isocitrate lyase²⁶ and the 14-3-3 protein (30 KDa)^{27,28}; this last adhesin is the focus of the present study.

Strong evidence has resulted in the classification of the 14-3-3 protein of *P. brasiliensis* as an adhesin, including its ability to bind laminin and its association with virulent isolates of the

*Correspondence to: Ana Marisa Fusco-Almeida; Email: ana.marisa@uol.com.br
Submitted: 07/14/2015; Revised: 11/05/2015; Accepted: 11/12/2015
<http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2015.1122166>