

NÍVEA PEREIRA DE SÁ

Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* de derivados de chalconas e da tiosemicarbazona do lapachol contra isolados do gênero *Paracoccidioides*

UFMG
2013

UFMG

NÍVEA
PEREIRA DE
SÁ

M548
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Microbiologia

NÍVEA PEREIRA DE SÁ

**Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* de derivados de
chalconas e da tiosemicarbazona do lapachol contra isolados do gênero
*Paracoccidioides***

Orientadora: Dra. Susana Johann

Co-orientadora: Dra. Patrícia Silva Cisalpino

Belo Horizonte, 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Microbiologia

NÍVEA PEREIRA DE SÁ

Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* de derivados de chalconas e da tiosemicarbazona do lapachol contra isolados do gênero *Paracoccidioides*

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração: Microbiologia.

Orientadora: Dra. Susana Johann

Co-orientadora: Dra. Patrícia Silva Cisalpino

Belo Horizonte, 2013

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Biologia de microrganismos situado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, força, conforto e alegrias. Por ter me guiado em todos os momentos da minha vida e me amado de forma sublime e maravilhosa.

Ao meu marido Rodrigo pelo amor, incentivo e companheirismo incansável. Por tornar meus dias sempre felizes.

Aos meus pais pelas orações, por sempre cuidarem de mim e pelo amor incondicional. Obrigada por terem acreditado e vivido este sonho comigo.

A Susana, minha querida orientadora, te agradeço por ter me acolhido desde o primeiro momento, pela paciência, confiança e por tudo que me ensinou ao longo destes anos. Você é uma pessoa maravilhosa.

A Patrícia te agradeço pela orientação, apoio e conselhos desde os tempos de graduação.

A Priscila muito obrigada por ter participado da minha vida, por ter sido uma amiga generosa e pelas incansáveis horas de ajuda com meus bichinhos. Você é muito importante pra mim.

Aos meus queridos colegas do laboratório, foi maravilhoso conviver com vocês. Em especial a Rosana, Paty Campi, Ludmila e Talles aprendi muito com vocês, muito obrigada por toda atenção, ajuda e ensinamentos que sempre me passaram. Vocês foram preciosos para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Carlos Rosa e todos do seu laboratório por toda receptividade, amizade e auxílio que sempre me deram.

Ao CNPQ pela bolsa de mestrado.

A todos os amigos e pessoas que compartilharam este período de mestrado comigo.

Agradeço sinceramente a todos vocês.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas.....	iii
Lista de ilustrações.....	v
Lista de Tabelas.....	x
Resumo.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1. Gênero <i>Paracoccidioides</i>	6
2.2. A Paracoccidioidomicose.....	10
2.2.1. Paracoccidioidomicose experimental.....	11
2.3. Epidemiologia.....	12
2.4. Imunologia da Paracoccidioidomicose.....	14
2.5. Alvos de ação de Antifúngicos.....	15
2.6. Estratégias terapêuticas contra a PCM.....	16
2.6.1. Resistência a antifúngicos.....	19
2.6.2. Antifúngicos naturais e Sintéticos.....	20
3. JUSTIFICATIVA.....	23
4. OBJETIVOS.....	24
4.1. Objetivo Geral.....	24
4.2. Objetivos Específicos.....	24
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
5.1. Substâncias Experimentais.....	25
5.1.2. Micro-organismos.....	25
5.2. Preparo do inóculo.....	27
5.2.1. Teste da concentração inibitória mínima.....	27
5.2.2. Teste da concentração fungicida mínima.....	28
5.2.3. Curva de sobrevivência.....	28
5.2.4. Ensaio de interação entre drogas.....	29
5.3. Estudos de Mecanismo de ação.....	29
5.3.1. Estudos microscópicos de alteração na morfologia fúngica.....	29
5.3.2. Ensaio de Parede Celular: Teste com Sorbitol.....	30
5.3.3. Ensaio de apoptose.....	31
5.4. Fungo e preparação do Inóculo.....	32

5.4.1. Grupos de animais.....	32
5.4.2. Infecção.....	33
5.4.3. Tratamento.....	33
5.4.4. Contagem de unidades formadoras de colônias.....	33
5.4.5. Dosagem de citocinas.....	34
5.4.6. Histopatologia.....	35
5.4.7. Análise estatística.....	35
5.5. Ensaio de fagocitose.....	35
6. RESULTADOS.....	38
6.1. Concentração inibitória e fungicida mínima.....	38
6.2. Interação entre drogas.....	42
6.3. Mecanismos de ação.....	43
6.4. Ensaio de fagocitose.....	59
6.5. Atividade antifúngica <i>in vivo</i>	63
7. DISCUSSÃO.....	71
8. CONCLUSÃO.....	82
9. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	84
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
11. ANEXO.....	100
. Certificado do comitê de ética	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI- Brain heart infusion agar
°C - grau Celsius
CEMEL – Centro de microscopia eletrônica
CIM – Concentração inibitória mínima
CIF- Concentração inibitória fracional
CIFI- Índice de concentração inibitória fracional
CFM- Concentração fungicida mínima
DMSO - Dimetilsulfóxido
ELISA- *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
F- Flúor
HE- Hematoxilina-eosina
HEPES – Ácido 4-(2-hidroxi-1-piperazíno)etanosulfônico
IF_%- Índice fagocítico
IL-10- Interleucina 10
IL12- Interleucina 12
INF- γ - Interferon gama
ITRA- Itraconazol
Me- Metila
MMcM- McVeigh & Morton
MTT -3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromido
OMe- Metoxila
PBS- Tampão fosfato
PBS- Tampão fosfato Tween-20 0,05%
IP- Intraperitoneal
IT- Intratraqueal
PCM- Paracoccidiodomicose
pH – Potencial hidrogeniônico
PI- Iodeto de propídeo
p/v- Peso/volume
RPM- Rotações por minuto
SDS – Dodecil sulfato de sódio
SMZ-TMP- Sulfametoxazol-trimetoprima

Sub-CIM- Concentração sub-inibitória mínima

TSC- Tiosemicarbazona do lapachol

YPD – *Yeast peptone dextrose*

UFC- Unidade formadora de colônia

v/v- Volume/volume

% - Porcentagem

> - Maior

< - Menor

≥ - Maior ou igual

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: Distribuição geográfica das espécies do complexo *Paracoccidioides brasiliensis* na América do Sul. Fonte: Richini-Pereira et al., 2009. 7

FIGURA 2: Formas do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. 1) Micélio; 2) levedura. Fonte: http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html. Imagens 1.b e 2.a: Dr. Antonio Bretaña and Dr. Gioconda San-Blas; 1.a e 2b: Dr. Juan McEwen. 8

FIGURA 3: Ciclo biológico hipotético do *Paracoccidioides brasiliensis*. Fonte: Bagagli, 2008. 8

FIGURA 4: Distribuição geográfica da Paracoccidioidomicose. Fonte: Shikanai-Yasuda., 2006. 13

FIGURA 5. Média da Concentração inibitória mínima das substâncias 3b, 4c, 3e, 4e e tiosemicarbazona do lapachol (TSC), sulfametoxazol-trimetoprima (SMZ-TMP) e itraconazol (ITRA) em µg/ml em meio McVeigh&Morton. *Média do itraconazol foi 0,02 µg/ml, barra não visível no gráfico. 38

FIGURA 6. Curva de sobrevivência do isolado Pb18 de *Paracoccidioides brasiliensis* sob tratamento com as substâncias 3b, 4c, 3e, 4e e a tiosemicarbazona do lapachol, expressa pela porcentagem de células viáveis em função do tempo. Legenda: TSC-lapachol=tiosemicarbazona do lapachol; CIM= concentração inibitória mínima. 40

FIGURA 7. Leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado Pb18, em meio McVeigh&Morton com 10 dias de crescimento. Foto por microscopia eletrônica de varredura, 3000 X e 5000 X, respectivamente. 42

FIGURA 8. Leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado Pb18, tratadas com a substância 3b em concentração sub-inibitória (3,9 µg/ml) em meio McVeigh&Morton com 10 dias de crescimento. A) célula murcha e com início de descamação no envelope celular (seta); C) Célula murcha; B e D) Célula com morfologia diferenciada. Foto por microscopia eletrônica de varredura, A, B e C aumento de 3000 X e D 5000 X. 43

FIGURA 9. Leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado Pb18, tratadas com a substância 4c em concentração sub-inibitória (1,95 µg/ml) em meio McVeigh&Morton com 10 dias de crescimento. A) célula com descamação no envelope celular (seta), 5000 X; B) Célula estourada (seta) com extravasamento do conteúdo celular (*), 3000 X; C e D) célula com morfologia diferenciada (*) e extravasamento do conteúdo celular (seta), 3000 X e 10.000X, respectivamente. Microscopia eletrônica de varredura. 44

FIGURA 10. Leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado Pb18, tratadas com a substância 3e em concentração sub-inibitória (3,9 µg/ml) em meio McVeigh&Morton com 10 dias de crescimento. A) célula com comprometimento do envelope celular e extravasamento do conteúdo celular, 3000 X; B) Célula estourada (seta) com extravasamento do conteúdo celular (*), 3000 X; B, C e D) células murchas (*), 5000 X e 5000 X. Microscopia eletrônica de varredura. 45

FIGURA 11. Leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado Pb18, tratadas com a substância 4e em concentração sub-inibitória (3,9 µg/ml) em meio McVeigh&Morton com 10 dias de crescimento. A e B) células murchas, 5000 X e 3000 X, respectivamente; C) Célula estourada (*), 3000 X; D) célula murcha e com extravasamento de conteúdo celular (*), 5000 X. Microscopia eletrônica de varredura. 46

FIGURA 12. Leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado Pb18, tratadas com a tiosemicarbazona do lapachol em concentração sub-inibitória (7,8 µg/ml) em meio McVeigh&Morton com 10 dias de crescimento. A, B e C) células murchas e rompidas, 3000 X, 3000X e 5000 X, respectivamente; D) célula murcha e com envelope celular comprometido, 5000 X. Microscopia eletrônica de varredura. 47

FIGURA 13. Leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado Pb18, cultivadas em meio McVeigh&Morton com 10 dias de crescimento na ausência de tratamento (grupo controle). A) célula binucleada (*) com vacúolos (⊗), membrana citoplasmática (seta) e externamente a membrana a parede celular; B) mitocôndrias (seta); C) citoplasma com granuloso (seta branca). Microscopia eletrônica de transmissão. 48

FIGURA 14. Leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado Pb18, tratadas com a substância 3b na concentração de 3,9 µg/ml cultivadas em meio McVeigh&Morton com 10 dias de crescimento. A) membrana plasmática retraída (seta) com núcleo condensado (*); B) formação de vesículas na membrana nuclear (seta); C) citoplasma e membrana retraída (seta) com vacúolo digestivo (*). Microscopia eletrônica de transmissão. 49

FIGURA 15. Leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado Pb18, tratadas com a substância 4c em concentração sub-inibitória (1,95 µg/ml) em meio McVeigh&Morton com 10 dias de crescimento. A) célula com retração da membrana plasmática (seta); B) membrana plasmática ampliada (seta); C e D) célula com muitos vacúolos (*) e citoplasma desorganizado. Microscopia eletrônica de transmissão. 50

FIGURA 16. Leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado Pb18, tratadas com a substância 3e em concentração sub-inibitória (3,9 µg/ml) em meio McVeigh&Morton com 10 dias de crescimento. A) célula com membrana plasmática degradada (seta) e desorganização citoplasmática; B) fragmentos da membrana celular (seta); C) célula-mãe e célula-filha com ausência de membrana plasmática e desorganização citoplasmática; D) ampliação da célula-filha. Microscopia eletrônica de transmissão. 51

FIGURA 17. Leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado Pb18, tratadas com a substância 4e em concentração sub-inibitória (3,9 µg/ml) em meio McVeigh&Morton com 10 dias de crescimento. A e B) células com alteração em parte da membrana celular (seta) e desorganização citoplasmática; C) Célula com morfologia alterada e citoplasma desorganizado. Microscopia eletrônica de transmissão. 52

FIGURA 18. Leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado Pb18, tratadas com a tiosemicarbazona do lapachol em concentração sub-inibitória (7,8 µg/ml) em meio McVeigh&Morton com 10 dias de crescimento. A e B) células com acúmulo de resíduos granulosos (seta); C) grânulos ampliados; D) célula com citoplasma desorganizado. Microscopia eletrônica de transmissão. 53

FIGURA 19. Índice fagocítico de macrófagos murinos tratados com as substâncias 3b, 4c, 3e, 4e e a tiosemicarbazona do lapachol (TSC) nas concentrações igual a CIM e sub-inibitória frente ao isolado Pb18 de *Paracoccidioides brasiliensis*. Teste de comparação múltipla Newman-Keuls, $p < 0.05$. Legenda: 3b= 7,8 µg/ml; 3b.1= 3,9 µg/ml; 4c= 3,9 µg/ml; 4c.1= 1,95 µg/ml; 3e= 7,8 µg/ml; 3e.1= 3,9 µg/ml; 4e= 7,8 µg/ml; 4e.1= 3,9 µg/ml; TSC= 15,6 µg/ml; TSC.1= 7,8 µg/ml. * $p < 0,05$ em relação ao controle. 61

FIGURA 20. Atividade fungicida de macrófagos murinos tratados com as substâncias 3b, 4c, 3e, 4e e a tiosemicarbazona do lapachol (TSC) nas concentrações igual a CIM e sub-inibitória frente ao isolado Pb18 de *Paracoccidioides brasiliensis*. Teste de comparação múltipla Newman-Keuls, $p < 0.05$. Legenda: 3b= 7,8 µg/ml; 3b.1= 3,9 µg/ml; 4c= 3,9 µg/ml; 4c.1= 1,95 µg/ml; 3e= 7,8 µg/ml; 3e.1= 3,9 µg/ml; 4e= 7,8 µg/ml; 4e.1= 3,9 µg/ml; TSC= 15,6 µg/ml; TSC.1= 7,8 µg/ml. * $p < 0,05$. 61

FIGURA 21. Concentração de óxido nítrico (NO) em sobrenadante da cultura de macrófagos murinos tratados com as substâncias 3b, 4c, 3e, 4e e a tiosemicarbazona do lapachol (TSC) nas concentrações igual a CIM e sub-inibitória frente ao isolado Pb18 de *Paracoccidioides brasiliensis*. Teste de comparação múltipla Newman-Keuls, $p < 0.05$. Legenda: 3b= 7,8 µg/ml; 3b.1= 3,9 µg/ml; 4c= 3,9 µg/ml; 4c.1= 1,95 µg/ml; 3e= 7,8 µg/ml; 3e.1= 3,9 µg/ml; 4e= 7,8 µg/ml; 4e.1= 3,9 µg/ml; TSC= 15,6 µg/ml; TSC.1= 7,8 µg/ml. 62

FIGURA 22. Histologia do pulmão, fígado e baço de camundongos BALB/c para avaliação da toxicidade das substâncias 4c e 4e. Os grupos de animais receberam doses diárias de 200 µl das substâncias 4c e 4e com concentração igual a 5mg/kg/dia, via intraperitoneal, por 15 dias. O grupo controle recebeu apenas PBS 1X em condições iguais de tratamento. Os órgãos analisados não apresentaram alterações histológicas significativas que pudessem ser remetidas a ação das substâncias experimentais. Coloração hematoxilina-eosina, 20X. 63

FIGURA 23. Quantidade de UFC/g de pulmão de camundongos BALB/c machos infectados com o isolado Pb18 de *Paracoccidioides brasiliensis*. Os grupos de camundongos foram tratados por 15 dias com doses diárias de 200 µl na dose de

5mg/kg/dia, em condições iguais para os três tratamentos oferecidos. Teste de comparação múltipla Newman-Keuls, $p < 0,05$. N=5. 64

FIGURA 24. Coloração Gomori-grocott. Pulmão e fígado de animais do grupo controle. a) pulmão com acúmulo de infiltrado inflamatório (verde) e presença de leveduras (marrom); b) Fígado com presença de levedura de *P. brasiliensis*; 100X. 65

FIGURA 25. Histopatologia do pulmão, fígado e baço de camundongos BALB/c infectados com o isolado Pb18 de *Paracoccidioides brasiliensis*, tratados com as substâncias 4c e 4e e com o itraconazol (ITRA). Os grupos de animais receberam tratamento por 15 dias com as substâncias 4c e 4e e com itraconazol, na dose de 5 mg/kg/dia, via intraperitoneal. A) Pulmão com excesso de infiltrado inflamatório no parênquima e início de fibrose pulmonar; B) fígado com degeneração hidrópica; C) Baço sem alterações visíveis; D) Pulmão com inflamação focal; E) Fígado normal; F) Baço normal; G) Pulmão com parênquima preservado e áreas de inflamação branda; H) Fígado normal; I) Baço normal; J) Pulmão com inflamação intensa e excesso de granulomas; K) Fígado com degeneração hidrópica; L) Baço normal. Coloração hematoxilina-eosina, 20X. 66

FIGURA 26. Escore do processo inflamatório decorrente da infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) no fígado e pulmão de camundongos BALB/c tratados com as substâncias 4c e 4e e com o itraconazol. Teste de comparação múltipla Newman-Keuls, $p < 0,05$. N=3. 68

FIGURA 27. Concentração da citocina pró-inflamatória INF- γ no pulmão de camundongos BALB/c tratados com as substâncias 4c e 4e, e com itraconazol. Teste de comparação múltipla Neuman-keuls, $p < 0,05$. 70

FIGURA 28. Concentração da citocina pró-inflamatória IL-12 no pulmão de camundongos BALB/c tratados com as substâncias 4c e 4e, e com itraconazol. Teste de comparação múltipla Neuman-keuls, $p < 0,05$. 70

FIGURA 29. Concentração da citocina anti-inflamatória IL-10 no pulmão de camundongos BALB/c tratados com as substâncias 4c e 4e, e com itraconazol. Teste de comparação múltipla Neuman-keuls, $p < 0,05$. 71

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Substâncias experimentais.	24
TABELA 2: Isolados de <i>Paracoccidioides</i> sp. utilizados no estudo.	25
TABELA 3: Representação dos grupos de camundongos da linhagem Balb/c.	31
TABELA 4. Atividade antifúngica da tiosemicarbazona do lapachol e das substâncias experimentais 3b, 4c, 3e, 4e, e drogas controle (itraconazol e sulfametoxazol-trimetoprima) contra 14 isolados do gênero <i>Paracoccidioides</i> .	38
TABELA 5. Índices de concentração inibitória fracional (CIFI).	41
TABELA 6. Resultado da concentração inibitória mínima na presença e ausência de sorbitol a 0,8 M das substâncias 3b, 4c, 3e, 4e e da tiosemicarbazona do lapachol (TSC) contra o isolado Pb18 de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .	54
TABELA 7. Ensaio com marcadores apoptóticos. Porcentagem de células coradas com DAPI e Iodeto de propídeo (IP) associadas a características ultra-estruturais do isolado Pb18 de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> quando submetidos a tratamento com as substâncias 3b, 4c, 3e, 4e e tiosemicarbazona do lapachol (TSC) em concentração sub-inibitória (por 5 dias para DAPI e IP e 15 dias para microscopia eletrônica).	56
TABELA 8. Porcentagem de viabilidade de macrófagos murinos tratados com as substâncias 3b, 4c, 3e, 4e e a tiosemicarbazona do lapachol (TSC).	60
TABELA 9. Parâmetros da avaliação histopatológica do pulmão e fígado de camundongos BALB/c com paracoccidioidomicose.	67

RESUMO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença granulomatosa sistêmica causada pelo fungo termo-dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. Esta doença é limitada aos países da América Latina onde é reconhecida como a mais prevalente micose sistêmica. O tratamento da PCM é geralmente prolongado, sendo em muitos casos por um ou dois anos, ou mais; na ausência da terapia a doença é quase sempre fatal. A anfotericina B, as sulfonamidas, e os azólicos podem ser usados no tratamento da PCM. A anfotericina B tem sido associada à forte toxicidade, o que pode dificultar o tratamento das infecções graves. O curso prolongado do tratamento com azólicos é um fator limitante. As sulfonamidas foram a primeira classe de drogas de escolha para o tratamento da PCM, mas o longo período de tratamento, a toxicidade e o custo da terapia desfavoreceram sua utilização. Esta situação leva a necessidade de novos, seguros e efetivos compostos antifúngicos para o tratamento da PCM. Neste contexto, a busca por novos compostos com atividade contra *P. brasiliensis* que apresentem baixa toxicidade e custo acessível é de extrema importância. Moléculas derivadas de chalconas e a tiosemicarbazona do lapachol (TSC) tem demonstrado atividade significativa *in vitro* e *in vivo* contra o fungo *P. brasiliensis*. A partir disto, nós realizamos testes com as substâncias **3b**, **4c**, **3e**, **4e** e TSC para a determinação da concentração inibitória e fungicida mínima, verificação de interação com a anfotericina, itraconazol e sulfametoxazol-trimetoprima, e análise por microscopia eletrônica de varredura e transmissão do isolado Pb18 sob tratamento com estas substâncias. Foram realizados ensaios de parede celular com sorbitol, com os marcadores de morte celular DAPI e iodeto de propídeo e ensaios de fagocitose de macrófagos murinos tratados com estas substâncias. O estudo da *in vivo* das substâncias **4c** e **4e** foram realizados em camundongos BALB/c infectados com o isolado Pb18. Após 15 dias de infecção os animais foram tratados com as substâncias na dose de 5 mg/kg/dia por 15 dias. Neste trabalho verificamos que as substâncias foram ativas contra diferentes isolados representantes das espécies filogenéticas do gênero *Paracoccidioides*, e a **4c** apresentou interação sinérgica com o itraconazol contra o isolado Pb18. Todas as substâncias provocaram alterações morfológicas na célula do isolado Pb18 que em comparação com os marcadores de morte celular DAPI e iodeto de propídeo forneceram indícios de processos de apoptose e necrose. Entretanto, nenhuma das substâncias provocou danos diretos sobre a parede celular fúngica. As substâncias **3b**, **4c** e **4e** foram capazes de aumentar o índice fagocítico e a atividade fungicida de macrófagos murinos *in vitro*. As

substâncias **4c** e **4e** apresentaram atividade *in vivo* semelhante ao itraconazol na dose de 5 mg/kg/dia, demonstrada pela capacidade de reduzir o número de UFC recuperadas do pulmão e de favorecer o desenvolvimento de uma resposta imune, predominantemente, Th1. Contudo apenas a **4c** apresentou características histopatológicas semelhantes ao itraconazol, observadas no pulmão, fígado e baço, enquanto a **4e** apresentou o pulmão e fígado mais comprometido pela infecção semelhante ao grupo controle que não recebeu tratamento. Dessa forma, os resultados apresentados neste trabalho confirmaram o potencial antifúngico das substâncias **3b**, **4c**, **3e**, **4e** e **TSC** apresentando-as como possíveis candidatas a terapêutica da PCM.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, antifúngicos, chalconas, tiosemicarbazona do lapachol, BALB/c, sinergismo, apoptose, fagocitose.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic granulomatous disease caused by thermo-dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. This disease is limited to Latin American countries where it is recognized as the most prevalent systemic mycosis. The treatment of PCM is generally extended, and in many cases by one or two years or more; absence of the therapy is almost always fateful. Amphotericin B, sulfonamides, and azoles may be used in the treatment of PCM. Amphotericin B has been associated with high toxicity, which may hamper the treatment of severe infections. The prolonged course of treatment with azoles is a limiting factor. The sulfonamides were the first class of drugs of choice for the treatment of PCM, but the long treatment period, toxicity and cost of the therapy disadvantage its use. This leads to the need for new, safe and effective antifungal compounds for the treatment of PCM. In this context, the search for new compounds with activity against *P. brasiliensis* that have low toxicity and low cost is paramount. Molecules derived from chalcones and lapachol thiosemicarbazone (TSC) has demonstrated significant activity *in vitro* and *in vivo* against the fungus *P. brasiliensis*. From this, we performed tests with substances **3b**, **4c**, **3e**, **4e** and **TSC** to determine the inhibitory concentration and minimum fungicidal, check interaction with amphotericin, itraconazole and trimethoprim-sulfamethoxazole, and analysis by scanning electron microscopy and transmission the isolated Pb18 under treatment with these substances. Assays were performed with cell wall sorbitol, with markers of cell death DAPI and propidium iodide (PI) assays and phagocytosis of murine macrophages treated with these substances. The *in vivo* study of substances **4c** and **4e** were performed in BALB / c mice infected with isolate Pb18. After 15 days of infection the animals were treated with the substances at a dose of 5 mg / kg / day for 15 days. In this study we found that the substances were active against different isolates representing the phylogenetic species of the genus *Paracoccidioides*, and **4c** showed synergistic interaction with itraconazole against the isolate Pb18. All substances caused morphological changes in the cell isolated from the Pb18 which in comparison with the markers of cell death DAPI and PI provide indications of processes of apoptosis and necrosis. However, none of the substances caused direct damage on the fungal cell wall. Substances **3b**, **4c** and **4e** were able to increase the phagocytic index and fungicidal activity of murine macrophages *in vitro*. The substances **4c** and **4e** showed similar activity *in vivo* to itraconazole dose of 5 mg/kg/day, verified from the ability to reduce the number of CFU recovered from lung and facilitate the development of a Th1

immune response. However, just 4c showed histopathological features similar to itraconazole observed in the lung, liver and spleen, while the 4e showed the lung and liver more compromised by infection similar to the control group that received no treatment. Thus, the results presented in this study confirmed the potential of antifungal substances **3b**, **4c**, **3e**, **4e** and **TSC** presenting them as possible candidates for treatment of PCM.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*, antifungal, chalcones, thiosemicarbazone lapachol, BALB / c, synergism, apoptosis, phagocytosis.

1. INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença granulomatosa sistêmica causada pelo fungo termo-dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. Esta doença é limitada aos países da América Latina onde é reconhecida como a mais prevalente micose sistêmica. Entre os países de maior incidência estão o Brasil, a Venezuela, a Colômbia, o Equador e a Argentina (Ramos-e-silva et al., 2008). A maioria dos indivíduos infectados são habitantes de áreas rurais e regiões montanhosas, sendo a maioria do sexo masculino (Gow et al., 2002).

O tratamento da PCM é geralmente prolongado, sendo em muitos casos por um ou dois anos, ou mais; na ausência da terapia a doença é quase sempre fatal. A anfotericina B, as sulfonamidas, e os azólicos podem ser usados no tratamento da PCM. A anfotericina B tem sido associada à forte toxicidade, o que pode dificultar o tratamento das infecções graves. O curso prolongado do tratamento com azólicos é um fator limitante. As sulfonamidas foram a primeira classe de drogas de escolha para o tratamento da PCM, mas o longo período de tratamento, a toxicidade e o custo da terapia desfavoreceram sua utilização (Brummer et al., 1993; Travassos et al., 2008).

Esta situação leva a necessidade de novos, seguros e efetivos compostos antifúngicos para o tratamento da PCM. As plantas produzem uma variedade de substâncias conhecidas por suas propriedades terapêuticas, tornando-se, desta forma, promissoras fontes de novas drogas (Molina et al., 2008). Com isso as plantas tem sido alvo de inúmeras pesquisas que buscam novas substâncias com potencial antimicrobiano. As Chalconas são compostos de ocorrência natural ou são facilmente sintetizadas. Essas moléculas são alvo de estudos científicos devido à atividade biológica que apresentam frente a diversos agentes patogênicos, dentre eles os fungos (Dhar, 1981). O Lapachol é uma naftoquinona isolada de várias espécies de plantas da família Bignoniáceas e possui diversas atividades biológicas, das quais se destacam as atividades antineoplásica e antimicrobiana (Araújo et al., 2002).

A manipulação sintética de substâncias biologicamente ativas pode melhorar a atividade e reduzir a toxicidade. Em estudos realizados anteriormente, alguns derivados sintéticos das chalconas e do lapachol tem se mostrado potencialmente promissores contra o fungo patogênico *P. brasiliensis*, o que justifica o estudo *in vitro* e *in vivo* da atividade destas substâncias, assim como a elucidação de seu mecanismo de ação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Gênero *Paracoccidioides*

O fungo patogênico *Paracoccidioides brasiliensis* foi identificado pela primeira vez em 1908 por Adolfo Lutz e é o agente causador da paracoccidioidomicose, uma blastomicose endêmica da América do Sul e América central (Lacaz et al., 1991). O *P. brasiliensis* foi recentemente classificado por meio de técnicas moleculares dentro do filo Ascomycota, ordem Onygenales e família Onygenaceae (Bagagli, 2006).

Análises filogenéticas de *P. brasiliensis* revelaram três espécies crípticas: espécie 1 (S1) com 38 isolados amplamente distribuídos geograficamente, espécie filogenética 2 (PS2) com 6 isolados, sendo 5 de origem brasileira e 1 venezuelana, e espécie filogenética 3 (PS3) com 21 isolados colombianos (Matute et al., 2006) (Figura 1). O isolado Pb01 apresenta grande distância das três espécies filogenéticas descritas para *P. brasiliensis*, com isso linhagens semelhantes ao Pb01 foram agrupadas como “Pb01-like” e são consideradas uma espécie filogeneticamente distinta das espécies S1, PS2 e PS3. Baseado em dados moleculares filogenéticos o grupo Pb01-like foi considerado uma nova espécie, o *Paracoccidioides lutzii* em homenagem a Adolfo Lutz (Carrero et al., 2008), contudo uma descrição formal ainda não foi concluída e, dessa forma, neste trabalho continuaremos a utilizar o conceito apenas da espécie *Paracoccidioides brasiliensis*.

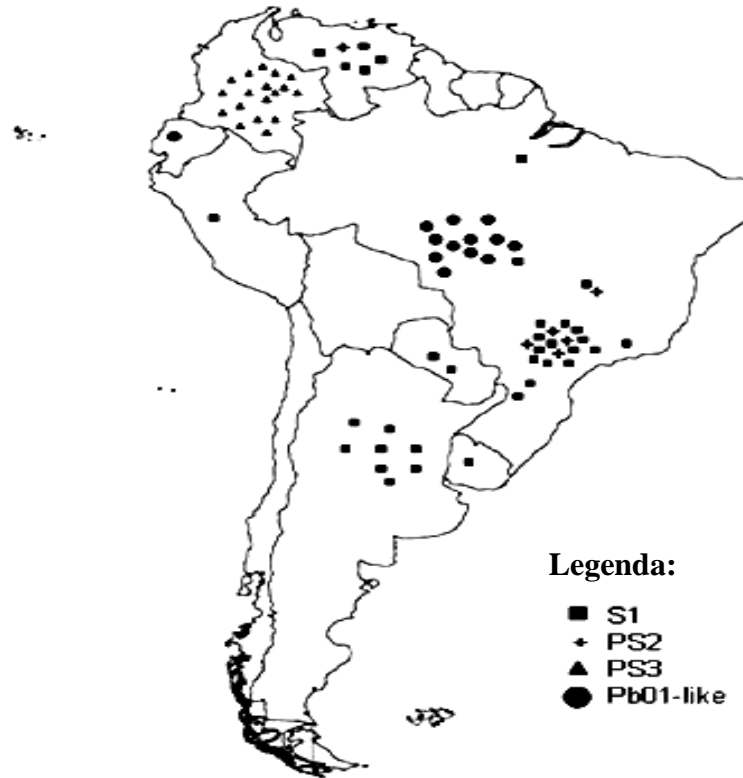


FIGURA 1: Distribuição geográfica das espécies do complexo *Paracoccidioides brasiliensis* na América do Sul. Fonte: Richini-Pereira et al., 2009.

O *Paracoccidioides* sp. é um fungo termo-dimórfico, sua forma leveduriforme é a forma parasitária e cresce em cultura a 37°C apresentando células-mãe de parede espessa birrefringente com múltiplos brotos, a observação dessa estrutura é importante para identificação do fungo em amostras clínicas (Figura 2). A 37°C o *P. brasiliensis* produz colônias de aspecto cerebriformes, são maleáveis, enrugadas e de coloração creme. A observação microscópica revela células esféricas leveduriformes de diferentes tamanhos (4-30 µm) e formato oval. Sua forma micelial, infectante, se desenvolve a temperatura de 25°C produzindo colônias de crescimento lento (3-4 semanas), as quais apresentam hifas septadas com clamidósporos (Lacaz et al., 1991).

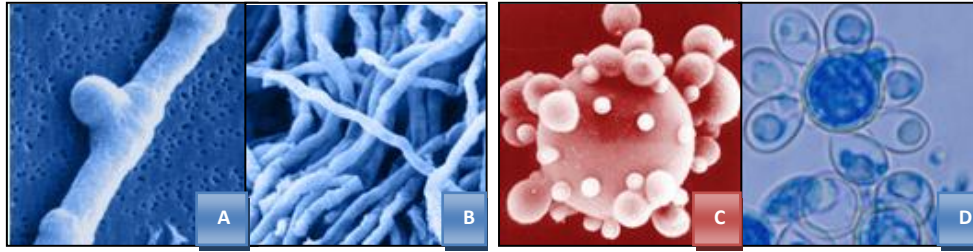


FIGURA 2: Formas do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. A, B) Micélio por microscopia eletrônica de varredura; C,D) levedura por microscopia eletrônica de varredura(C) e microscopia óptica (D). Disponível em: <http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html>. Acesso em: 20/12/2012.

Acredita-se que o micélio seja a forma sapróbia do fungo na natureza, que sob determinadas condições produz conídios – estruturas de reprodução assexuada de propagação da espécie. Contudo, a exata relação entre o *P. brasiliensis* e o meio ambiente ainda não foi elucidada (Restrepo et al., 2001). Os conídios possivelmente se desenvolvem no solo e em plantas, a temperatura ambiente, constituindo as formas infectantes (Brummer et al., 1993; Bagagli et al., 2008) (Figura 3).

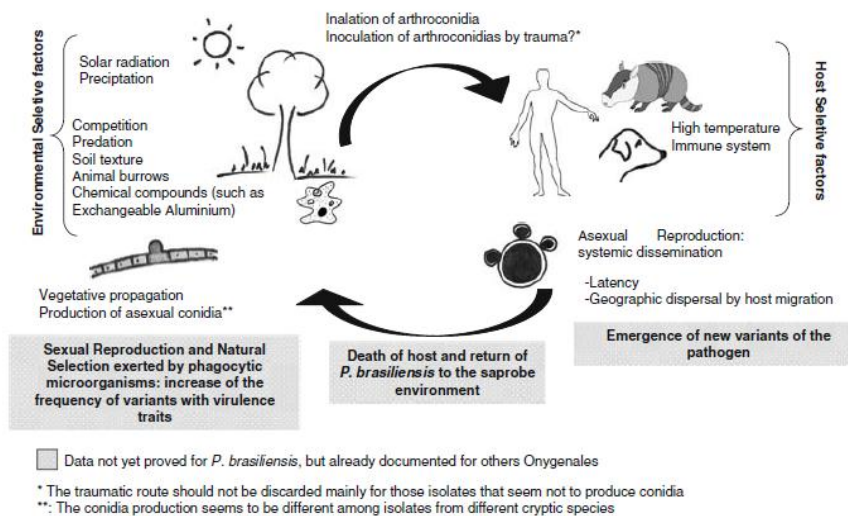


FIGURA 3: Ciclo biológico hipotético do *Paracoccidioides brasiliensis*.

Fonte: Bagagli et al., 2008.

A transição da forma filamentosa para leveduriforme é resultante da modulação da composição da parede celular durante o ciclo de vida do fungo, na levedura é predominantemente constituída de α -1,3-glucana e no micélio por β -1,3-glucana e galactomananas, esta modificação morfogenética é essencial para a patogenicidade do *P. brasiliensis* (Borges-Walmsley et al., 2002; Andrade et al., 2005). Durante a fase

leveduriforme a α -glucana é o principal constituinte da parede celular, enquanto a β -glucana representa apenas 5% dos polissacarídeos da parede do *P. brasiliensis*. As formas de levedura e micélio também possuem quitina como estrutura polissacarídica comum, sendo que na parede celular da levedura a concentração de quitina equivale a 37-48% dos polissacarídeos, enquanto que no micélio é de apenas 7-18% (San-Blas et al., 2008).

Os isolados de *P. brasiliensis* dispõem de alguns fatores que promovem a virulência desse fungo, tais como a alternância de glucanas na parede celular, o antígeno extracelular gp43 e uma proteína ligante de estrógeno. A gp43 age como um receptor de laminina sendo responsável pela adesão da levedura a membrana basal e também pela invasão das células do hospedeiro que expressam estes receptores (Hogan et al., 1996; Fernandes et al., 2011).

Leveduras e conídios de *P. brasiliensis* podem produzir melanina, o que em plantas e patógenos animais têm sido relacionados com a virulência. Em *Cryptococcus neoformans* a melanina protege os conídios do estresse ambiental e dos mecanismos de defesa do hospedeiro e terapias com antimicrobianos, o que pode ser semelhante com *P. brasiliensis* (Borges-Walmsley et al., 2002).

A infecção por *P. brasiliensis* ocorre por meio da inalação de propágulos infecciosos que nos pulmões se transformam na forma patogênica - levedura. Esta transição da forma infectante para a parasitária pode ser inibida pela ação do estrógeno de mamíferos e isso resulta numa maior incidência da doença em indivíduos do sexo masculino (Niño-Vega et al., 2002). As leveduras de *P. brasiliensis* apresentam alta afinidade por proteínas ligantes de estrógeno e o 17- β -estradiol inibe a transição da forma micelial para levedura (Stover et al., 1986; Murchmore et al., 1974; Clemons et al., 1989).

A ploidia do *P. brasiliensis* não é conhecida com certeza, mas dados sugerem que ele seja diplóide, com 4 ou 5 cromossomos e genoma estimado em 23-30 Mb, indicando a presença de 10 000 – 15 000 genes (Borges-Walmsley et al., 2002; Andrade et al., 2005). O *P. brasiliensis* apresenta uma extensa variabilidade genética quando analisado por ferramentas moleculares, e esta variabilidade está correlacionada com a distribuição geográfica e virulência dos isolados (San-Blas et al., 2011).

2.2. A Paracoccidiodomicose

A paracoccidiodomicose é uma doença endêmica rural e suburbana comumente com manifestações pulmonares de curso crônico, e muitas vezes associado com lesões de pele e mucosas e eventualmente com lesões disseminadas extrapulmonares, e na ausência de terapia seu progresso pode ser letal (Fernandes et al., 2011).

A doença é adquirida por meio de conídios, produzidos pelo fungo na forma filamentosa, que agem como propágulos que são inalados para o interior dos pulmões, onde se transformam na forma invasiva de levedura. O grande fator de risco para a aquisição da infecção são as profissões relacionadas ao manejo do solo contaminado com o fungo, o que caracteriza a PCM como uma doença ocupacional relacionada principalmente a trabalhadores rurais (Shikanai-Yasuda et al., 2006). Quando ocorre progresso a doença é classificada em duas formas mais sérias uma com rápido desenvolvimento e disseminação sistêmica, forma aguda ou subaguda, ou então como uma infecção persistente, forma crônica (Niño-Vega et al., 2002).

A doença crônica ocorre em mais de 90% dos casos, geralmente em homens, e tem um progresso lento de meses a anos. Esta forma atinge primeiramente os pulmões levando a uma significativa morbidade, e subsequentemente pode se disseminar para outros órgãos e tecidos, formando lesões secundárias nas mucosas, pele, linfonodos e adrenais. Entretanto, a forma aguda ou subaguda se desenvolve em um período de semanas a meses e é mais grave, levando a significantes taxas de mortalidade. Quando há tratamento adequado, pode ocorrer melhora satisfatória, mas as lesões normalmente deixam seqüelas, e a remissão é frequentemente acompanhada por fibrose pulmonar resultante do processo inflamatório acarretando disfunções diversas, dependendo do órgão afetado e se as lesões possuem células viáveis do fungo pode ocorrer recidivas (Shikanai-Yasuda et al., 2006).

Pacientes com PCM grave apresentam hipergamaglobulinemia, altos níveis de anticorpos específicos, eosinofilia e imunidade celular antígeno-específica deprimida. Estes pacientes têm altos níveis de citocinas inflamatórias no soro, tais como interleucinas IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF) que podem desempenhar um papel no controle da doença (Peraçoli et al., 2003). A diminuição de células T é diretamente relacionada à gravidade da doença. A resposta Th1 prevalece na fase inicial da doença, e depois é substituída pela resposta Th2, refletindo uma ativação e diferenciação de linfócitos B por plasmócitos e uma elevação da secreção de

imunoglobulinas (Ramos-e-Silva et al., 2008). Uma defesa efetiva contra *P. brasiliensis* depende de um padrão de resposta Th1 predominante e a aquisição da resistência é promovida por células T e citocinas de macrófagos ativadas, enquanto que havendo a predominância de um padrão de resposta Th2 é observada uma maior suscetibilidade e gravidade da doença (Mamoni et al., 2006; Romani et al., 2011).

2.2.1. Paracoccidioidomicose experimental

Muitos estudos têm buscado por novas opções terapêuticas para a paracoccidioidomicose humana, nesse contexto, o estabelecimento de modelos experimentais para o estudo tem permitido uma boa correlação com a doença humana, facilitando o entendimento da relação parasito-hospedeiro e das ações terapêuticas. Correlações significativas entre os níveis de anticorpos em modelo murino e nas doenças humana têm sido confirmadas (Singer-Vermes et al., 1993).

O primeiro estudo utilizando camundongos como modelo experimental foi desenvolvido por Mackinnon, em 1959. Neste trabalho camundongos não isogênicos foram infectados por diferentes vias de inoculação, estudando as possíveis portas de entrada do agente na natureza, sendo que a única via que não induziu a infecção foi a via oral, sugerindo que a contaminação por água e alimentos talvez não fosse a principal forma de transmissão da doença (Mackinnon, 1959).

Camundongos da linhagem BALB/c apresentam susceptibilidade intermediária ao *P. brasiliensis*, por isso são amplamente utilizados como modelo experimental (Restrepo et al., 1992). A utilização de animais BALB/c permite a avaliação dos padrões de resposta imune que envolvem mecanismos efetores menos polarizados do que aqueles observados nas linhagens sensíveis e resistentes, provavelmente imitando a infecção natural (Kipnis et al., 1999). Estes camundongos podem desenvolver doença aguda, crônica ou progressiva, desenvolvendo resposta imune com padrões variados, dependendo da dose de antígeno utilizada. Os macrófagos destes animais apresentam boa capacidade microbicida, capacidade de montar um granuloma epitelióide característico da ativação de células efetoras do tipo Th1 e produzem IFN- γ como citocina efetora, quando em situações de resistência, e IL-4, em situações de susceptibilidade, resposta Th2 (Brummer et al., 1984).

2.3. Epidemiologia

A PCM é a mais importante micose sistêmica no Brasil. Estimativas apontam uma taxa de 3 casos por 100 milhões de habitantes, e os casos de letalidade correspondem a 2-23% (Felipe et al., 2005). Embora a PCM seja a mais prevalente das micoses sistêmicas a sua notificação não é compulsória nos países onde ela é endêmica, o que dificulta uma determinação apurada da incidência e prevalência da doença. De acordo com inquéritos epidemiológicos realizados com paracoccidioidina no Brasil, Venezuela, Colômbia e Argentina, acredita-se que em torno de 50% dos habitantes das zonas endêmicas tenham sido infectados pelo agente desta micose, contudo, apenas uma pequena proporção destes indivíduos desenvolvem manifestações clínicas (Shikanai-Yasuda et al., 2006).

A PCM não é doença de notificação compulsória, por isso não se dispõe de dados precisos sobre sua incidência no país. No entanto, chega-se a aproximadamente há 4241 casos da doença no Brasil, sendo 95% atingido pelo SUS por ano o que resulta em 4030 casos da doença atingido pelo SUS por ano. (Shikanai-Yasuda et al., 2006).

No Brasil, estudos epidemiológicos sobre a mortalidade são realizados pelo Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM), criado em 1976 com a implementação em todo o território nacional de um atestado de óbito padronizado. Mesmo que os dados do SIM sejam abundantes e confiáveis para estudos de mortalidade, alguns estados no Brasil ainda possuem uma qualidade da informação incerta, com altas taxas de sub-registro de mortes (Prado et al., 2009). Estudos do Ministério da Saúde mostraram que a informação das mortes no SIM cobrem 94,6% das mortes no Sul, 90,9% no Sudeste, 87,3% no Centro-Oeste e 74,6% no Norte e Nordeste do Brasil, onde o sub-registro é mais comum (MS 2004, 2005).

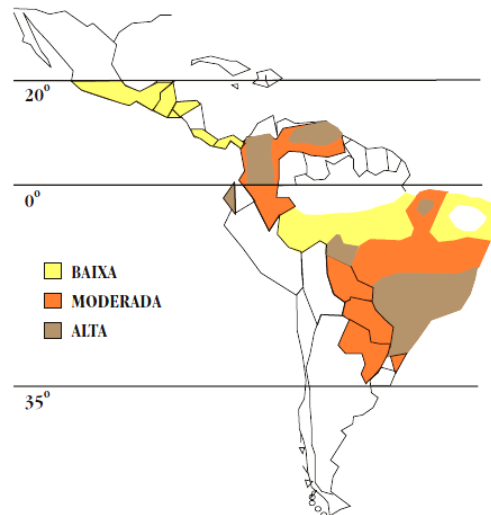


FIGURA 4: Distribuição geográfica da PCM. Fonte: Shikanai-Yasuda et al., 2006.

Dados epidemiológicos da PCM no Brasil entre os anos de 1980 e 1995 mostraram que as maiores taxas de mortalidade ocorrem nas regiões Sul e Sudeste, especificamente em São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Goiás e Rio de Janeiro, mas nas últimas décadas novas áreas têm sido afetadas provavelmente devido à ampliação das fronteiras agrícolas (Coutinho et al., 2002). A doença pode ter um período de latência (até mais de 30 anos) e com isso muitos casos não-autóctones podem surgir muito tempo após a exposição do indivíduo em uma área endêmica (Coutinho et al., 2002).

O nicho ecológico do *P. brasiliensis* é em geral regiões com solos ácidos, temperaturas entre 12 e 30°C, altitudes entre 150 e 2000 metros e índices pluviométricos entre 100 e 400 cm³. O *P. brasiliensis* foi isolado de tatu e diretamente do solo na Amazônia, e morcegos e pequenos macacos do sudeste do Brasil, além de cães, do gado e cavalos também apresentarem anticorpos contra o fungo. Esses achados sugerem que o habitat do *P. brasiliensis* é o solo ou plantas que crescem em regiões geográficas específicas, e que ambos os animais e humanos adquirem o patógeno por aspiração (Lupi et al., 2005). O fungo também foi isolado do fígado, baço e pulmões de tatus (*Dasypus novemcinctus*) residentes do sul do México a Argentina, o que sugere que este animal possa ser o reservatório do *P. brasiliensis* (Niño-Vega et al., 2002).

A incidência da doença antes dos 12 anos de idade é semelhante entre os sexos, mas após essa idade a incidência aumenta progressivamente entre homens. Cerca de 80-90% dos indivíduos afetados são homens entre 29 e 40 anos, predominantemente trabalhadores rurais e em áreas geográficas onde o fungo está presente, com razão entre

homens e mulheres de 15:1 (Shikanai-Yasuda et al., 2006; Ramos-e-Silva et al., 2008). Na Europa a PCM é rara e todos os casos conhecidos têm uma história clínica de pacientes que viveram, trabalharam ou que visitaram países da América latina (Mayayo et al., 2007; Poisson et al., 2007).

2.4. Imunologia da Paracoccidioidomicose

O estabelecimento da PCM, sua disseminação e gravidade dependem de fatores inerentes ao próprio fungo, tais como sua virulência, composição antigênica, das condições ambientais e, principalmente, dos fatores ligados ao hospedeiro relacionados ao desenvolvimento de uma resposta imune eficaz (Bernard et al., 2001). A resposta imune do hospedeiro ao fungo compreende dois componentes principais, que são a capacidade de resistência para limitar a carga fúngica e a tolerância, que envolve a capacidade de limitar os danos causados ao hospedeiro pela resposta imunitária ou outros mecanismos (Romani et al., 2011).

Nesta doença é observado um polimorfismo clínico, o qual depende do perfil de resposta imune que prevalece expresso no hospedeiro e que é observado pelo padrão de citocinas teciduais e circulantes (Peraçoli et al., 2003). Vários mecanismos da imunidade inata, tais como ativação das proteínas do sistema-complemento e atividade microbicida das células natural killer (NK) e dos fagócitos, constituem um fator significativo frente ao combate aos fungos patogênicos (Pagliari et al., 2010).

No processo infeccioso da PCM é conhecido que há interação entre moléculas da superfície do *Paracoccidioides* sp. e receptores presentes na membrana celular das células fagocíticas do hospedeiro modula a fagocitose e entre esses receptores destacam-se os receptores semelhantes a Toll (TLRs, *Toll-like receptors*). Estes receptores constituem uma família de proteínas de membrana que reconhecem padrões moleculares compartilhados por diferentes micro-organismos (Romani et al., 2011). Os TLRs são capazes de reconhecer porções moleculares associadas ao patógeno (PAMPs) e induzir a sinais que resultam na expressão de genes da resposta imune inata e produção de citocinas inflamatórias e antiinflamatórias que regulam a resposta imune adaptativa (Peraçoli et al., 2003).

Além destes, os receptores de lectina tipo C (CLR) são proteínas transmembranas que têm um ou mais domínios de reconhecimento de carboidratos, e incluem os receptores de manose, dectina 1, dectina 2 e DC-SIGN, os quais estão envolvidos na imunidade antifúngica (Romani et al., 2011).

Foi demonstrado por meio de estudos experimentais e em pacientes com PCM que a resistência ao *P. brasiliensis* é dependente das atividades de células T Helper e macrófagos/monócitos, mediadas por IFN- γ e TNF- α (Romano et al., 2002). Pacientes com a doença em atividade apresentam depressão da resposta imune celular, caracterizada por diminuição da síntese de citocinas de padrão Th1, tais como IL-2, IFN- γ e IL-12, e aumento dos níveis de IL-4, IL-5 e IL-10, que corresponde à resposta de padrão Th2 não protetora ao hospedeiro (Bernard et al., 2001; Romani et al., 2011). A resposta Th2 caracteriza-se pela produção de altos títulos de anticorpos das classes IgG4, IgA e IgE, associadas ao predomínio de citocinas supressoras do granuloma (IL-4, IL-5 e TGF- β) (Mamoni et al., 2002; Romani et al., 2011).

2.5. Alvos de ação de Antifúngicos

O aumento na incidência das micoses sistêmicas intensificou a busca por antifúngicos de amplo espectro e fungicidas, causadores de poucos efeitos adversos. Muitos antimicrobianos, principalmente os que apresentam mecanismo de ação sobre a parede celular, exercem atividade exclusiva sobre os fungos, prometendo tratamento eficaz e seguro para as micoses, revolucionando esta classe de medicamentos (Bergold et al., 2004). Já existem diversos alvos dos agentes antifúngicos utilizados na prática clínica, no entanto, as classes de agentes que podem ser usados para tratar micoses são de modo geral direcionadas, direta ou indiretamente, para o envelope celular (parede e membrana plasmática) e, em particular sobre o esterol da membrana fúngica, ergosterol, e sua biossíntese (Odds et al., 2003). Alguns elementos da célula fúngica, tais como as vias de sinalização, o metabolismo e a maquinaria celular, além de genes envolvidos em processos essenciais para a sobrevivência deste organismo, são alvos em potencial para a ação de antifúngicos (Amaral et al., 2005).

No gênero *Paracoccidioides* sp. a parede celular (PC), além de exercer papel de barreira contra mecanismos de defesa do hospedeiro, está intimamente ligada a mudanças morfogênicas associadas ao ciclo de vida desse micro-organismo (Brummer et al., 1990). A construção da PC conta com sintases e enzimas restritas ao espaço periplasmático e que estão associadas a vias biossintéticas essenciais a viabilidade celular (Pereira et al., 2000). Em sua estrutura a PC é constituída de α -glucanas e β -glucanas, as quais são componentes estruturais e influenciam em sua osmolaridade, também conta com manosiltransferases, com ação na adesão e virulência do fungo, e componentes de ligação cruzada dentro da parede celular, tais como as

endotransglicosilases e glucanosiltransferases, os quais são responsáveis pela arquitetura final da parede e a ação de antifúngicos nestes componentes pode resultar em diferentes morfologias celulares (Amaral, 2005).

A membrana plasmática (MP) é considerada o alvo mais importante, pois é a principal interface entre a parede celular e o ambiente de desenvolvimento do microorganismo. É composta por ergosterol e esfingolipídeos que determinam sua forma e rigidez, além disso, os esfingolipídeos, em eucariotos, são responsáveis pela manutenção da MP e estão envolvidos em respostas celulares importantes, tais como os processos de endocitose, apoptose e transdução de sinal (Odds et al., 2003).

A maquinaria celular compreende enzimas responsáveis pela síntese de DNA e as topoisomerasas e fatores de alongação são considerados alvos interessantes para os antifúngicos, pois são essenciais para a viabilidade e crescimento celular (Amaral, 2005). A topoisomerase 1 é um fator de virulência e sua deleção culmina na redução do crescimento celular e morfologia anômala, além de danos no DNA e, conseqüente, morte celular (D'Arpa et al., 1989).

Vias metabólicas também são possíveis alvos para antifúngicos visando o impedimento da obtenção de energia e manutenção dos mecanismos celulares. Por exemplo, o ciclo do glioxilato é uma via alternativa para a obtenção de energia quando o fungo está sendo fagocitado, uma vez que o ambiente limita a obtenção de glicose, dessa forma uma droga com ação direcionada a esta via poderia limitar a sobrevivência do fungo no interior das células fagocíticas (Selitrennikoff et al., 2003).

A ação de antifúngicos pode envolver diferentes alvos e vias no interior da célula levando à morte celular, por apoptose ou necrose. A apoptose é caracterizada por um conjunto de alterações fenotípicas, tais como a exposição de fosfatidilserina na superfície celular, a condensação da cromatina, a fragmentação do DNA e a formação de corpos apoptóticos (Madeo et al., 1999). Em uma mesma população de células sob tratamento estressivo pode ocorrer apoptose e necrose, as quais em muitos aspectos apresentam sinais semelhantes, mas são ativadas vias e fatores específicos de cada processo (Leiter et al., 2005).

2.6. Estratégias terapêuticas contra a PCM

Nas últimas décadas o conhecimento sobre as infecções fúngicas tem mudado dramaticamente. Desde 1970 as infecções por fungos têm surgido especialmente em pacientes imunocomprometidos, como resultado de muitos fatores, tais como o uso de

antibióticos e corticosteróides, o aumento de doenças crônicas, em particular diabetes, AIDS e cânceres (Musiol et al., 2010).

Durante muitos anos a anfotericina e a flucitosina foram os únicos antifúngicos disponíveis para o tratamento de micoses invasoras, mas nos últimos anos o arsenal terapêutico tem se ampliado com o surgimento de novos antimicóticos (Catalán et al., 2006). A administração de uma combinação de drogas também tem sido explorada e estudada buscando-se melhores resultados no tratamento infecções fúngicas, baseando-se nos benefícios potenciais de uma terapia combinada, tais como a amplificação do espectro de ação, maior potência que outras drogas utilizadas na monoterapia, somada a segurança e tolerabilidade, e redução no número de organismos resistentes (Mukherjee et al., 2005).

A PCM geralmente não progride para uma cura espontânea, e por isso os pacientes devem ser submetidos ao tratamento, mas apesar da existência de efetivos tratamentos para a PCM a natureza polimórfica das lesões dificulta o diagnóstico, resultando na doença progressiva com seqüelas graves. As drogas clássicas utilizadas para a PCM são as sulfonamidas, anfotericina B e derivados imidazólicos, tais como o cetoconazol, itraconazol e fluconazol. A duração do tratamento relaciona-se à gravidade da doença e ao tipo de droga utilizada. Usualmente, o tratamento é de longa duração, variando de 6 a 24 meses. A escolha da melhor opção terapêutica em PCM deve amparar-se não apenas na eficácia e segurança da droga antifúngica, mas também no acesso do paciente ao medicamento durante toda a duração do tratamento.

Entre as sulfonamidas a combinação sulfametoxazol-trimetoprima (Bactrim®) é uma droga de escolha que tem baixo custo e toxicidade relativamente baixa. A dosagem utilizada é de 1200/320 mg/dia com redução após 30 dias para 400/80 mg/dia durante tempo indeterminado. Contudo, o longo período de tratamento e o abandono da terapia são fatores que implicam no fracasso do tratamento e no surgimento de resistência (Rivitti et al., 1999). No entanto, as sulfonamidas em combinação com a anfotericina B têm sido eficaz em casos graves da doença (Lupi et al., 2005).

A anfotericina B é um macrolídeo produzido pelo actinomiceto *Streptomyces nodosus*, age sobre a membrana eucariota devido a sua afinidade pelo ergosterol presente na membrana fúngica (Odds et al., 2003). Como consequência da sua fixação ao ergosterol alterações são produzidas na estrutura da membrana, provavelmente pela formação de poros compostos de pequenos agregados de anfotericina B e esteróis, que

acabam gerando uma despolarização da membrana e aumento da permeabilidade para prótons e cátions monovalentes (Luna et al., 2000).

A administração da anfotericina é feita via infusão intravenosa de forma lenta por 2-6 horas aproximadamente. A dose utilizada e a duração do tratamento dependem do tipo de anfotericina B utilizada e da indicação clínica. Geralmente a dose é de 0,3-1 mg/Kg/dia com dose acumulada máxima de 4g. Entretanto, a incidência de reações adversas é alta, podendo ser reações imediatas ou tardias. O efeito mais relevante e principal restrição ao tratamento é a nefrotoxicidade (Catalán et al., 2006). Os pacientes com formas graves, necessitando internação hospitalar, devem receber anfotericina B ou associação sulfametoxazol-trimetoprima por via intravenosa. Pacientes com insuficiência renal não podem usar a anfotericina B, além disso, por ser intravenoso somente é utilizado em pacientes que estão hospitalizados (Ostrosky-Zeichner et al., 2010).

Outra classe de agentes antimicóticos são os azóis, os quais também agem via interferência com o ergosterol da membrana fúngica (Elewski et al., 1993; Odds et al., 2003). Embora a anfotericina B permaneça como padrão ouro para as infecções fúngicas mais graves os imidazóis (cetoconazol, miconazol, e outros) e os triazóis (fluconazol e itraconazol) apresentam atividade antifúngica contra muitos patógenos sem causar efeitos nefrotóxicos (Luna et al., 2000).

Os azóis agem primariamente interferindo com a demetilação do lanosterol para ergosterol pela enzima 14 α - demetilase, a qual é dependente do citocromo P-450. A inativação desta enzima leva a acumulação de 14 α -metilesteróis (tais como o lanosterol) e isto combinado com a depleção do ergosterol levam a um decréscimo da síntese e estabilidade da membrana (Mangino et al., 1995). Uma importante diferença entre os triazólicos e os imidazólicos é a grande afinidade dos triazólicos pelos fungos quando comparado com as enzimas do citocromo P-450 de mamíferos. O itraconazol é específico para o citocromo P-450 fúngico, inibindo a biossíntese do ergosterol em concentrações extremamente baixas (Elewski et al., 1993).

O Itraconazol, assim como o cetoconazol, requer um ambiente ácido para sua ótima absorção, dessa forma deve ser administrado via oral junto à alimentação. A concentração plasmática 4 horas após dose única varia entre 43-118 ng/ml, e após dose de 100 mg/dia e 200 mg duas vezes ao dia é de 300-700 ng/ml (Mangino et al., 1995). *In vitro* o itraconazol tem sido ativo contra muitos fungos dimórficos, incluindo *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, *Coccidioides*

immitis, *P. brasiliensis*, leveduras patogênicas, incluído espécies de *Candida* e *C. neoformans*, algumas espécies de *Aspergillus* e muitos dermatófitos. Em modelos animais o itraconazol tem mostrado boa eficácia em relação a outros azóis (Mangino et al., 1995).

Os azólicos também podem ser utilizados no tratamento da PCM, podendo deter a progressão da doença, mas a seqüela fibrótica persiste, provavelmente constituindo recurso para o *P. brasiliensis* causar uma recaída após o termino do tratamento. *P. brasiliensis* possui a habilidade de iniciar a infecção depois de um período prolongado de dormência (Borges-Walmsley et al., 2003).

2.6.1. Resistência a antifúngicos

A resistência e a recorrência de infecções têm sido associadas comumente a tratamentos incompletos e interrompidos. A emergência de novas espécies de fungos patogênicos e o aumento da resistência aos antifúngicos mais utilizados, em decorrência de novas práticas médicas, tem se tornado um sério problema de saúde pública (Cowen et al., 2008). A resistência a antifúngicos tem se tornado fator determinante do resultado da terapia com antimicóticos. Enquanto a incidência de infecções fúngicas sistêmicas tem aumentado a escolha de agentes antifúngicos tem permanecido relativamente limitada. A aquisição da resistência foi relatada na década de 1980, mas somente foi considerada clinicamente importante com o surgimento da epidemia de AIDS. Em pacientes com candidíase associada ao HIV a aquisição da resistência ao fluconazol foi reportada no auge desta epidemia (Rogers et al., 2006).

A resistência às drogas tem sido tradicionalmente abordada de uma perspectiva mecanicista, em termos de identificar os determinantes celulares que impedem a droga de entrar na célula, que retiram a droga da célula, inativam a droga ou impedem que a droga iniba seu alvo. Contudo, é evidente que nenhum desses mecanismos age sozinho. O desenvolvimento de resistência é muitas vezes acompanhado por um custo adaptativo ou efeito deletério sobre o crescimento, na ausência da droga (Cowen et al., 2008).

Em *P. brasiliensis* a melanização reduz a suscetibilidade do fungo a anfotericina B e também o protege contra o cetoconazol, fluconazol, itraconazol e o sulfametoxazol-trimetoprima, além de protegê-lo da fagocitose por macrófagos (Silva et al., 2006). O *P. brasiliensis* também possui uma classe de proteínas transportadoras de múltiplas drogas que tem revelado importante papel na sobrevivência, patogênese e na resistência a drogas (Andrade et al., 2005). O uso de anfotericina B é reservado para os casos de

paracoccidiodomicose grave e / ou disseminada e onde é encontrada resistência à sulfonamidas e / ou derivados azólicos (Hahn et al., 2003).

Os mecanismos determinantes da resistência são diversos e complexos. A resistência aos azóis parece envolver a expressão de genes transportadores, causando o efluxo da droga nas células fúngicas. A resistência a anfotericina B é rara e está associada a modificações nos esteróis da membrana do fungo (Bossche et al., 1997; Rogers et al., 2006). A *C. krusei* e *A. fumigatus* apresentam muito baixa suscetibilidade ao fluconazol, itraconazol e voriconazol, com relação ao fluconazol acredita-se que seja causada por uma fraca inibição da enzima 14 α - lanosterol demetilase de ambos os organismos (Sanglard et al., 2002).

2.6.2. Antifúngicos naturais e Sintéticos

O contexto social moderno, as necessidades do mercado farmacêutico e o reconhecimento das pesquisas com plantas medicinais usadas na medicina popular representam uma abordagem compatível com o desenvolvimento de novas drogas. O uso de plantas medicinais no Brasil é bastante difundido, mas na maioria dos casos é feito de modo empírico sem conhecimento do verdadeiro potencial terapêutico. A utilização da fitoterapia deve ser avaliada através da separação dos princípios ativos e posterior verificação de suas propriedades bioativas (Passos et al., 2002).

A influência de produtos naturais sobre a descoberta de droga em todos os campos terapêuticos diminuiu devido à chegada em 1980 da tecnologia química combinatória e da expectativa de que essas técnicas seriam a futura fonte de um enorme número de estruturas de novas drogas que levassem a novas entidades químicas. Como resultado, a pesquisa de produtos naturais em empresas farmacêuticas, com poucas exceções, cessou efetivamente a partir do final da década de 1980 (Di Santo et al., 2010).

Muitos extratos, óleos essenciais e substâncias de origem vegetal têm sido uma ampla fonte de produtos biologicamente ativos, com grande diversidade estrutural, físico-química e de propriedades biológicas, dentre elas a atividade antimicrobiana. O alho (*Allium sativum*) tem sido alvo de estudos há alguns anos, e pesquisas tem isolado diversos compostos com atividade biológica, entre estes o ajoeno (4,5,9-trithiadodeca-1,6,11-triene 9-oxide) é um composto orgânico sulfuroso com importantes propriedades antimicrobianas (Ledzma et al., 2006). Além de já ter sido demonstrada atividades anti-malária, anti-tripanosomal e antifúngica contra leveduras e fungos filamentosos.

Muitos estudos já verificaram ação fungicida do ajoeno contra *P. brasiliensis*, e também sua capacidade de bloquear a transição micélio-levedura deste fungo (Maluf et al., 2008).

Muitas plantas têm sido estudadas com o objetivo de desenvolver novas drogas quimioterapêuticas e quimioproláticas contra infecções por *P. brasiliensis* (Johann, 2010a). A planta *Schinus terebinthifolius*, de ocorrência na costa brasileira, é amplamente utilizada na medicina popular devido a propriedades antioxidante, antitumoral e antimicrobiana. Johann et al., 2010b verificou alta atividade de extratos de *S. terebinthifolius* contra isolados clínicos de *P. brasiliensis*, de acordo com este grupo os extratos desta planta apresentam saponinas, flavonóides, triterpenos, esteróides e taninos (Johann, 2010b).

Agentes quimioterápicos de origem natural, sintética ou semi-sintética têm sido empregados no tratamento de doenças infecciosas, matando ou inibindo o desenvolvimento de micro-organismos (Di Santo et al., 2010). As chalconas são compostos de ocorrência natural e são facilmente sintetizadas. Essas moléculas são alvo de estudos científicos devido à atividade biológica que apresentam frente a diversos agentes patogênicos. As principais bioatividades já verificadas são: citotoxicidade, anticancerígena, antiviral, inseticida, mutagenicidade, antiinflamatória, antimicrobiana, entre outras (Dhar et al., 1981). Muitos estudos têm sido direcionados para a manipulação química destas moléculas originando derivados de chalconas com atividades melhoradas ou modificadas, o que pode interferir em seu mecanismo de ação e até diminuir efeitos tóxicos causados por estas substâncias, assim estes derivados podem servir como base para o desenvolvimento de novos antimicrobianos (Musiol et al., 2010).

O Lapachol (2-hidroxi-3(3-metil-2-butenil)-1,4- naftoquinona) é um pigmento natural originalmente isolado de espécies de plantas da família *Bignoniaceae.*, mas pode ser encontrado em outras famílias. Conhecido por sua atividade antimicrobiana, antiplasmodial, antioxidante, entre outras (Araújo et al., 2002). Souza et al. (2012) testaram modificações químicas do lapachol a tiosemicarbazona e a semicarbazona do lapachol, contra vários micro-organismos de importância clínica e verificaram atividade antifúngica contra *P. brasiliensis* melhor que a do Bactrim® (sulfametoxazol-trimetoprima), droga comumente utilizada no tratamento da PCM.

A partir da manipulação química de moléculas ativas é possível melhorar a atividade biológica por meio de modificações na estrutura química das moléculas,

podendo também diminuir a toxicidade (Musiol et al., 2010). As plantas fornecem abundante fonte de compostos antimicrobianos que podem ser utilizados para a síntese de derivados mais ativos. As modificações produzidas pela introdução ou substituição de um grupamento podem mudar as propriedades físico-químicas das moléculas, tais como hidrofobicidade e densidade eletrônica, podendo fornecer análogos mais ativos, seletivos e menos tóxicos (Johann et al., 2007).

3. JUSTIFICATIVA

A paracoccidiodomicose é uma infecção crônica granulomatosa causada pelo fungo termo-dimórfico *Paracoccidioides*. É uma doença grave que requer tratamento prolongado, variando de 6 a 24 meses, relacionado à gravidade da doença e ao tipo de droga administrada. Contudo, o arsenal de drogas efetivas atualmente utilizadas é muito restrito.

Neste contexto, a busca por novos compostos com atividade contra *Paracoccidioides* sp. que apresentem baixa toxicidade, curto tempo de tratamento e custo acessível é de extrema importância. Com isso, a manipulação sintética de substâncias biologicamente ativas que possam melhorar a atividade e reduzir a toxicidade é uma importante ferramenta para o desenvolvimento de novos fármacos. . A partir disto, o estudo de compostos sintéticos e semi-sintéticos potencialmente promissores contra o *P. brasiliensis* é de grande relevância para elucidar o potencial de atividade destas moléculas *in vitro* e *in vivo*, além da compreensão do mecanismo de ação das mesmas, possibilitando que no futuro estas possam ser utilizadas na terapia da paracoccidiodomicose humana.

Os derivados de chalconas e a tiosemicarbazona do lapachol são substâncias que derivam de moléculas amplamente distribuídas na natureza e que apresentam atividades biológicas, tais como antimicrobiana, antioxidante, antitumoral, antiplasmodial, entre outras. Estas substâncias receberam modificações que potencializaram sua atividade antifúngica contra o fungo *Paracoccidioides* sp. e podem ser facilmente sintetizadas, com isso o estudo destas moléculas poderá abrir um novo caminho para o desenvolvimento de novos antifúngicos para o tratamento da paracoccidiodomicose

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Avaliar por meio de testes *in vitro* e *in vivo* a atividade de derivados de chalconas e da tiosemicarbazona do lapachol contra isolados do gênero *Paracoccidioides*, além de estudar os possíveis efeitos fenotípicos destas substâncias.

4.2. Objetivos Específicos

Experimentos *in vitro*

1- Determinar a concentração inibitória mínima e fungicida mínima dos derivados de chalconas **3b**, **4c**, **3e** e **4e** e da tiosemicarbazona do lapachol (TSC) contra isolados clínicos do gênero *Paracoccidioides*;

2- Avaliar a interação entre as substâncias ativas testadas e o itraconazol, a anfotericina B e a sulfametoxazol-trimetoprima contra o isolado Pb18 de *Paracoccidioides*;

3- Determinar os possíveis alvos de ação das substâncias mais promissoras por ensaios de:

- a) Estudos microscópicos da alteração na morfologia fúngica;
- b) Parede celular: Ensaio com protetor osmótico;

4- Averiguar a ocorrência de apoptose nas células de *P. brasiliensis* tratadas com as substâncias teste;

5- Avaliar a capacidade das substâncias teste em promover fagocitose de *P. brasiliensis* em macrófagos murinos;

Experimentos *in vivo*

1- Avaliação da atividade *in vivo* das substâncias 4c e 4e em modelo experimental (Balb/c) com a doença induzida por *P. brasiliensis* (Pb18). Avaliando os parâmetros:

- a) Recuperação de unidades formadoras de colônias (UFC);
- b) Perfil de resposta imune;
- c) Análise histopatológica.

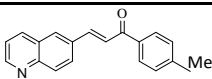
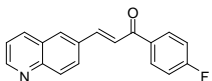
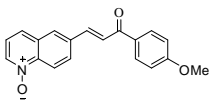
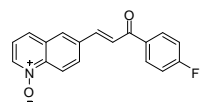
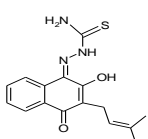
5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Substâncias Experimentais

Para os ensaios *in vitro* foram utilizadas as substâncias 6-quinolinil chalconas **3b** e **3e**, a **3b** contém uma metila (Me) como substituinte, já a **3e** um átomo de flúor (F); e as N-óxido chalconas **4c**, com um substituinte metoxila (OMe) e **4e**, com o substituinte flúor. Estas substâncias foram cedidas pelo Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC. Além destas foi utilizada também a substância semi-sintética tiosemicarbazona do lapachol desenvolvida e cedida pelo Centro de Pesquisa René Rachou, Belo Horizonte, MG. As fórmulas estruturais e moleculares, o peso molecular e o Log P das substâncias utilizadas no presente trabalho estão representadas na tabela 1.

TABELA 1.

Substâncias experimentais.

Substâncias	Fórmula Estrutural	Fórmula Molecular	Peso Molecular	Log P
3b		C ₁₉ H ₁₆ NO	272,33	5,36
3e		C ₁₈ H ₁₃ NOF	277,29	4,93
4c		C ₁₈ H ₁₃ NO ₂ OMe	305,33	3,18
4e		C ₁₈ H ₁₃ NO ₂ F	293,29	3,59
Tiosemicarbazona do lapachol (TSC)		C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₂ S ₁	315	-

5.1.2. Micro-organismos

No presente trabalho foram utilizados 14 isolados do gênero *Paracoccidioides* (Tabela 2) representando as 3 espécies filogenéticas (S1, PS2 e PS3) e o grupo “Pb01-like”, integrantes da coleção do Laboratório de Interação Micro-organismo-Hospedeiro, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

TABELA 2.

Isolados de *Paracoccidioides* sp., espécie filogenética e local onde foram encontrados os isolados do presente estudo.

Isolados	Equivalente em Morais et al. 2000.	Espécie filogenética	Estado/País
Pb18	Pb7	S1	São Paulo / Brasil
Pb B339	Pb1	S1	Brasil
Pb470	Pb14	S1	São Paulo / Brasil
PbMG5	Pb11	S1	Paraná / Brasil
Pb9673	Pb8	S1	São Paulo / Brasil
Pb1017	Pb4	PS2	São Paulo / Brasil
Pb1925	Pb2	PS2	Venezuela
Pb608	Pb3	PS2	São Paulo / Brasil
Pinguim ³		S1	Uruguai
PbAP		S1	São Paulo / Brasil
EPM83 ²		PS3	Colômbia
Pb01 ¹		Pb01-like	Goiás / Brasil
Pb1578 ¹		Pb01-like	Goiás / Brasil
ED01 ¹		Pb01-like	Goiás / Brasil

¹Isolados de *Paracoccidioides* sp. representantes da nova espécie filogenética Pb-01-like, designado como *P. lutzii* (Teixeira et al. 2009).

²Theodoro et al., 2008.

³Garcia et al., 1993.

A coleção de *Paracoccidioides* spp. nas formas de levedura e micélio foram mantidas em tubos com meio YPD (extrato de levedura 1%, peptona 2% , dextrose 2% e Agar 2%), a 37°C para as formas de levedura e a 25°C para as formas de micélio, com repiques quinzenais. Para a utilização nos ensaios biológicos todos os isolados foram previamente adaptados ao meio quimicamente definido MMcM (McVeigh & Morton) e os repiques foram realizados após 5-7 dias de crescimento e o teste de microdiluição foi realizado em MMcM caldo de acordo com o trabalho de Restrepo & Jiménez (1980) e Cruz et al. (2013).

5.2. Preparo do inóculo

As células leveduriformes de *Paracoccidioides* foram coletadas assepticamente com alça bacteriológica e suspensas em 5 ml de salina estéril a 0,9%. A suspensão foi homogeneizada em vortex por cerca de 10 segundos. A suspensão contendo agregados maiores foi colocada em repouso para decantação, em seguida, apenas o sobrenadante foi coletado. A transmitância foi medida com comprimento de onda de 530 nm e então ajustada para 70% em espectrofotômetro, o que equivale a $1-5 \times 10^6$ células/ml (Hahn & Handam, 2000; Cruz et al., 2013). As suspensões resultantes foram diluídas em meio MMcM caldo (1:10) para obtenção do inóculo final com $1-5 \times 10^5$ leveduras/ml (Nakai et al. 2003).

5.2.1. Teste da concentração inibitória mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) foi obtida pelo teste de microdiluição em caldo realizado em conformidade com as orientações do documento CLSI M27-A3 (CLSI, 2008) com modificações sugeridas por Johann et al. (2010). Diluições seriadas das substâncias experimentais, do itraconazol (Pharlab, Brasil) e do sulfametoxazol-trimetoprima (Bactrim[®], Belfar, Brasil) foram realizadas em MMcM líquido, e o volume de 1ml foi mantido constante em cada tubo. A faixa intervalar de concentração utilizada para as substâncias foi de 250-0,48 µg/ml, para o itraconazol foi de 0,5 - 0,0009 µg/ml e para o sulfametoxazol-trimetoprima (SMZ-TMP) foi 600-1,17 µg/ml. Posteriormente 100 µl de cada diluição foram distribuídos em microplacas de 96 poços (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA).

O controle de crescimento e esterilidade constituiu-se apenas de meio MMcM caldo, e como controle de toxicidade do solvente foi utilizado o meio MMcM acrescido de dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração correspondente em cada experimento. O itraconazol foi incluído como controle positivo do antifúngico, e as soluções estoque foram preparadas em dimetilsulfóxido. O controle negativo foi composto por 200 µl de meio de cultura. Após a preparação das placas todos os poços das diluições e controles, com exceção do controle negativo, receberam 100 µl do inóculo fúngico. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e repetidos pelo menos duas vezes (Cruz et al., 2013).

A leitura dos resultados foi realizada após 15 dias e obtida pela redução do MTT (3-(4,5-dimethylthazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Amresco, EUA), um sal tetrazólico de cor amarela utilizado para a mensuração da sobrevivência e proliferação celular (Mosmann, 1983). A leitura foi realizada em leitor de microplacas VERSAmax (Molecular Devices) pelo programa Softmax® Pro 5 (Molecular devices), com absorvância de 570 nm. A absorvância foi comparada com a absorvância do controle de micro-organismo, sendo a porcentagem de inibição calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = 100 \times \frac{(\text{Abs. Contr. sem droga} - \text{Abs. amostra})}{(\text{Abs. Contr. sem droga})}$$

5.2.2. Teste da concentração fungicida mínima

A concentração fungicida mínima (CFM) *in vitro* de cada substância foi determinada por meio do estriamento de 10 µl de cada poço que apresentou 100 % de inibição no teste CIM em placas de petri contendo o meio ágar MMcM. Estas placas foram incubadas a 37°C por 15 dias. A menor concentração a qual não houve crescimento de colônias foi considerada a CFM (Regasini et al., 2009).

5.2.3. Curva de sobrevivência

Após a determinação da CIM foram preparadas placas contendo diluições das substâncias experimentais, em concentração igual ao valor de CIM e duas vezes a concentração da CIM, um controle negativo, apenas com meio de cultura, e um controle positivo com meio MMcM e o inóculo fúngico. Após a preparação das placas todos os poços das diluições e controles, com exceção do controle negativo, receberam 100 µl do inóculo fúngico (isolado Pb18) preparado conforme o item. 5.2. Estas placas foram incubadas a 37°C e durante o período de 15 dias foram realizadas cinco leituras em diferentes intervalos de tempo, começando com o momento da inoculação (tempo zero) e seguindo com leituras em 24, 120, 240 e 360 horas. A leitura foi realizada em leitor de microplacas VERSAmax (Molecular Devices) pelo programa Softmax® Pro 5 (Molecular devices), com absorvância de 490 nm. Os valores de absorvância dos poços com as diluições foram comparados com o controle positivo, e os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis, comparado com o crescimento do controle ao longo de 15 dias (360 horas) (Santos et al., 2012).

5.2.4. Ensaio de interação entre drogas

As substâncias experimentais foram diluídas 8 vezes, as concentrações utilizadas foram escolhidas de acordo com os resultados encontrados no ensaio de CIM. Também foram feitas diluições da anfotericina B (Sigma, USA) (2-0,015 µg/ml). Posteriormente, 50 µl, de cada diluição da substância a ser testada, foram adicionados nas placas de 96 poços em orientação vertical e 50 µl das diluições de anfotericina B foram adicionadas em posição horizontal. Desta forma cada placa apresentou várias combinações de concentrações da substância a ser testada e da anfotericina B.

O inóculo foi realizado conforme o teste de CIM, onde 100 µl da suspensão de *P. brasiliensis* (isolado 18) foi adicionada em cada poço. As placas foram incubadas em câmara úmida a 37°C por um período de 15 dias.

A concentração inibitória fracional (CIF) foi calculada pela combinação da CIM da substância com anfotericina B dividida pela CIM da substância sozinha e da CIM da anfotericina sozinha. O índice de CIF (CIFI) foi calculado pela soma das CIFs da anfotericina B e da substância experimental. O efeito de sinergismo foi considerado quando o valor de CIFI fosse $\leq 0,5$, e a ausência de interação ou efeito aditivo quando o índice fosse de 0,5 até 4,0 e o antagonismo quando o índice fosse $>4,0$. Este experimento também foi executado utilizando o itraconazol (0,125- 0,0009 µg/ml) e o sulfametoxazol-trimetoprima (150- 1,17 µg/ml) (Cuenca-Estrella, 2004; Soares et al., 2008).

5.3. Estudos de Efeitos fenotípicos

5.3.1. Estudos microscópicos de alteração na morfologia fúngica

Os estudos microscópicos de alteração da morfologia fúngica foram realizados utilizando microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. Ambas as microscopias foram realizadas no CEMEL (Centro de microscopia eletrônica) no ICB, UFMG.

Microscopia eletrônica de Varredura

Para análise por microscopia eletrônica de varredura, as leveduras do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* foram tratadas com as drogas experimentais no meio MMcM caldo em concentração sub-inibitória por 15 dias a 37°C. Após este período, as células foram fixadas durante 6 horas em solução de glutaraldeído 2,5% em PBS 1X (pH 7,3) à

temperatura ambiente. Posteriormente, estas células foram separadas por centrifugação (8000 rpm por 5 minutos), e o precipitado foi lavado 2 vezes em PBS 1X estéril.

As amostras foram encaminhadas ao centro de Microscopia eletrônica da UFMG (CEMEL), onde foram pós-fixadas por 1 hora em tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 0,8%, e depois aplicadas a polilisina revestindo a lamínula. Então, estas amostras foram desidratadas em etanol e depois em aparelho de ponto crítico de CO₂. As amostras foram posteriormente secas em secador de ponto crítico, e revestidas com liga de ouro-paládio e visualizadas ao microscópio eletrônico (microscópio DSM 950, Zeiss/West Germany) (Santos et al., 2007).

Microscopia eletrônica de transmissão

Alíquotas de suspensões de células em meio MMcM líquido com e sem as substâncias experimentais foram centrifugadas e o sobrenadante foi removido. As células obtidas foram fixadas em glutaraldeído, 2% (v/v), paraformaldeído, 2% (p/v), e tampão cacodilato de sódio 0,5M, pH 7,4, por 12 h em temperatura ambiente. O fixador foi removido e o material lavado, 4 vezes, em tampão cacodilato de sódio. O pós-fixador foi removido em 1% de OsO₄ e o material foi desidratado em uma série de concentrações de acetona, classificada de 30% a 100% (v/v) e incluídos em resina Spurr. Secções semi-finas foram coradas com azul de toluidina. Secções ultrafinas foram coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss-EM10) (Santos et al., 2007).

5.3.2. Ensaio de Parede Celular: Teste com Sorbitol

A CIM foi determinada para o isolado Pb 18 de *P. brasiliensis* através do procedimento padrão de microdiluição em caldo descrito no item 5.2.1. Para este ensaio foram preparadas placas em duplicata: uma contendo as diluições das substâncias experimentais, e a outra contendo as diluições das substâncias em meio acrescido de sorbitol (Himedia, Índia) a 0,8 M. Os valores de CIM foram avaliados após 15 dias do crescimento fúngico. O ensaio foi realizado duas vezes em duplicata (Frost et al., 1995).

5.3.3. Ensaio de apoptose

Obtenção de esferoplastos de P. brasiliensis

Leveduras do isolado Pb18 foram tratadas com as drogas experimentais em concentração sub-inibitória por 5 dias a 37°C em MMcM. Após este período este material foi centrifugado a 8000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. As células foram lavadas com PBS 1X, centrifugadas e o sobrenadante foi novamente descartado. Em seguida, as células foram aliqüotadas em eppendorfs na quantidade de 1×10^6 células em cada um e foram adicionadas 120 unidades da enzima liticase (Sigma, USA), dissolvida em PBS 1X e o volume foi completado para 1ml com sorbitol 1M. Estes eppendorfs foram incubados a 30°C por 2 horas.

Ensaio com marcadores de morte celular: Iodeto de propídeo e DAPI

O núcleo das células apoptóticas apresenta cromatina muito condensada que pode ser corada pelo DAPI, substância capaz de penetrar as membranas de células apoptóticas e corar a cromatina (Madeo, 1997), já o iodeto de propídeo se liga ao DNA, mas não é capaz de atravessar membranas íntegras, sendo assim, a coloração positiva resulta de uma célula com membrana drasticamente danificada o que caracteriza processos de apoptose tardia ou de necrose (Silva, 2001).

Os esferoplastos obtidos foram lavados com 500 µl de PBS 1X, centrifugados a 10.000 rpm, por 1 minuto e o sobrenadante foi descartado. Este procedimento foi repetido 2 vezes. Posteriormente, foram adicionados 100 µl de solução de iodeto de propídeo (PI) (1 mg/ml) e 900 µl de PBS 1X, em seguida, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente, seguiu-se com a centrifugação a 14.000 rpm por 1,5 min. e o sobrenadante foi descartado. O material foi, então, lavado com 500 µl de PBS 1X, centrifugado a 10.000 rpm por 1 min., o sobrenadante foi descartado, e o pellet foi ressuscitado em 100 µl de PBS 1X e 10 µl foram colocados em lâmina para a realização da leitura em microscópio confocal (Leica SP1) (Phillips et al., 2003).

Para a coloração com DAPI (4,6-diamido-2-phenylindole; Invitrogen, EUA) foram seguidos os mesmos passos iniciais de lavagem dos esferoplastos em PBS 1X. Em seguida, os esferoplastos foram incubados com formaldeído (Synth, Brasil) por 30 minutos à temperatura ambiente. Após este período, o conteúdo foi centrifugado a 14.000 rpm por 1,5 min e seguiu-se com 2 lavagens em PBS. Logo, as amostras foram incubadas com 100 µl de DAPI e 900 µl de PBS por 15 minutos. O material foi lavado

2 vezes com 500 µl de PBS 1X, centrifugado a 10.000 rpm por 1 min., o sobrenadante descartado, e o pellet foi ressuspensionado em 100 µl de PBS 1X e 10 µl foram retirados para leitura em lâmina ao microscópio confocal (Phillips et al., 2003).

Ensaio *in vivo*

5.4. Fungo e preparação do Inóculo

As células leveduriformes virulentas do isolado Pb18 com 5-7 dias de crescimento em meio YPD líquido foram lavadas 3 vezes com tampão fosfato (PBS 1X estéril) sob centrifugação a 8000 rpm por 5 minutos (Centrífuga JOUAN BR4i, EEC). Após a lavagem, foi adicionado 5ml de PBS e as partículas maiores foram sedimentadas pela ação da gravidade. A porção superior desta suspensão contendo células isoladas ou com poucos brotamentos foram coletadas. A viabilidade das células foi determinada pelo corante Verde Janus (Sigma, USA) e somente foi utilizado inóculo fúngico com pelo menos 80% de viabilidade. A contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer e a concentração foi ajustada para 1×10^6 células em 30 µl da suspensão fúngica antes da inoculação.

5.4.1. Grupos de animais

Para os experimentos *in vivo* foram utilizados camundongos machos BALB/c, com aproximadamente 6-8 semanas e 25 gramas, fornecidos pelo Centro de Pesquisas René Rachou de Belo Horizonte. Os testes de experimentação animal estão em conformidade com o Comitê de Ética em Experimentação animal (CETEA/UFMG), protocolo nº 100/2010 (ANEXO). Foram utilizados 5 grupos de animais para cada condição experimental a ser avaliada (tabela 3).

Inicialmente foi realizado teste com as substâncias 4c e 4e em animais BALB/c machos, a fim de avaliar alterações histopatológicas no baço, pulmão e fígado decorrentes de efeitos tóxicos destas substâncias. Para isso, animais saudáveis receberam um volume de 200 µl, via intraperitoneal, das substâncias diluídas em PBS, na dose de 5 e 10 mg/kg/dia por 15 dias

TABELA 3.

Representação dos grupos de camundongos e condições experimentais.

Grupos	Siglas
Apenas Infectado	Cp
Não infectado tratado com PBS	Cn
Infectado e tratado com Itraconazol	IT
Infectado e tratado com substâncias experimentais	Droga

*CP – controle positivo; CN – controle negativo; IT - grupo de animais infectados e tratados com Itraconazol; Droga - grupo de animais infectados e tratados com as substâncias a serem testadas.

5.4.2. Infecção

Os animais foram anestesiados pela via intraperitoneal (IP) com uma solução de xilazina, cetamina e PBS estéril. Após a anestesia os animais foram submetidos à infecção pela via intratraqueal (IT). Para tal, uma incisão transversal de aproximadamente 1 cm na pele da região do pescoço foi realizada para exposição da traquéia e, com auxílio de uma seringa de 1 ml, foram injetados 30 µl do inoculo fúngico (1×10^6 leveduras/animal). Os animais do controle negativo receberam apenas 30 µl de solução PBS estéril pela mesma via. Depois de realizado os procedimentos, os grupos experimentais foram mantidos em gaiolas separadas e os animais receberam água e ração à vontade por 15 dias para o estabelecimento da infecção. Após este período o tratamento dos animais prosseguiu por mais 15 dias (Maluf et al., 2008).

5.4.3. Tratamento

Para o tratamento dos animais, as drogas experimentais 4c e 4e e o itraconazol foram dissolvidas em DMSO (2,5 %) e diluídas em PBS estéril. O volume de 200 µl foram administradas pela via intraperitoneal na dose de 5mg/Kg/dia durante um período de 15 dias. O itraconazol foi veiculado em PBS estéril e administrado pela via IT na dose de 5mg/kg/dia.

5.4.4. Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC)

Após o período de tratamento, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o pulmão, baço e fígado foram removidos e pesados. Após a pesagem,

fragmentos desses órgãos foram triturados e homogeneizados em 1ml de PBS estéril. Alíquotas de 100 µl dessa suspensão foram semeadas, em duplicata, com auxílio de bastões de vidro em L, em placas de Petri, contendo o meio BHI (Brain heart infusion Agar; Difco, France) suplementado com soro fetal bovino 4%, fator de crescimento 5% (filtrado da cultura do isolado B339) e sulfato de amicacina 1% (Nova Farma, Brasil). Em seguida, as placas foram vedadas e incubadas em estufa (BOD Q-315D, QUIMIS), sob câmara úmida, a 37°C. As colônias obtidas foram contadas após 20-30 dias de crescimento. O resultado foi expresso pelo número de UFC por grama de órgão (Maluf et al., 2008).

5.4.5. Dosagem de citocinas

As citocinas avaliadas foram: IL-10, IL-12 e IFN- γ . A dosagem foi realizada quantitativamente pelo método de ELISA utilizando amostras de pulmão extraído dos camundongos e macerados em solução contendo inibidor de proteases (Roche), após centrifugação.

Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 50 µl de anticorpo de captura específico para cada interleucina avaliada, e incubadas overnight a 4°C. Decorrido este período, as placas foram lavadas com PBS- Tween-20 0,05% (PBS-T) e bloqueadas com 100 µl de PBS-BSA 10% por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas novamente com PBS-T, e adicionado 100 µl das amostras padrões (citocinas recombinantes de camundongo) e as amostras experimentais incubadas por duas horas a temperatura ambiente. Após lavagem com PBS-T foram adicionados 50 µl de anticorpos biotinizados, bem como conjugados enzimáticos (avidina-peroxidase) e as placas foram incubadas novamente por 1 hora a temperatura ambiente. Seguindo-se da lavagem com PBS-T foram adicionados 50 µl de solução de substrato tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio (TMB Substrate Reagent B Set, BD-PharMingen, EUA), por 30 minutos a temperatura ambiente protegido da luz. A reação foi interrompida com o acréscimo de 25 µl de H₂SO₄ 2M. As placas foram lidas no comprimento de onda de 450 nm em leitor de ELISA (Thermoplate, EUA). As concentrações obtidas para cada citocina avaliada foram calculadas com base em uma curva-padrão preparada juntamente com as amostras experimentais.

5.4.6. Histopatologia

Amostras de pulmão, baço e fígado obtidas após o sacrifício dos camundongos controle e infectados foram fixadas em solução de formol tamponado 10% com PBS (v/v) por 24 horas. Em seguida, as amostras foram desidratadas em uma série de soluções de álcool, diafanizadas em xilol, para posterior inclusão em parafina e preparação das lâminas coradas com hematoxilina – eosina. As lâminas foram examinadas ao microscópio óptico para avaliar alterações histopatológicas. Para observação de células típicas de *P. brasiliensis* nos órgãos analisados foi utilizado o kit de coloração Gomori-Grocott (Easypath, Brasil) (Maluf et al., 2008).

5.4.7. Análise estatística

Os dados foram analisados usando o programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA). O teste de comparação múltipla Newman-Keuls foi empregado para comparação entre os grupos experimentais. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5.5. Ensaio de fagocitose

Citotoxicidade em macrófagos murinos

Macrófagos peritoneais foram obtidos de três camundongos BALB/c fêmeas de 6 semanas. Para isso, foram injetados 2 ml de tioglicolato de sódio (3%) por via intraperitoneal. Após 72 horas os camundongos foram submetidos à eutanásia e mergulhados em álcool 70°GL para desinfecção. A membrana peritoneal foi exposta e foram injetados 5 ml de meio de cultura RPMI 1640 sem soro (Sigma) na cavidade peritoneal a fim de coletar os macrófagos. Esse volume foi aspirado com o auxílio de uma seringa, transferido para um tubo de 15 ml e, posteriormente, centrifugado (10 min, 1200 rpm, 4 °C). O sedimento de células foi suspenso em RPMI com 10% de soro fetal bovino e a densidade celular determinada por contagem em câmara de Neubauer. Os macrófagos de cada camundongo foram semeados (1×10^5 células/poço) em duas placas de 96 poços e incubados por 12 horas a 37 °C em estufa com 5% de CO₂.

Após 12 horas de incubação, o meio de cultura foi removido e foram acrescentados 100 µL de meio de cultura RPMI + 10% soro fetal bovino contendo as substâncias em teste nas concentrações 1000, 200, 40, 8, 4 e 1,6 µg/ml . Em cada poço identificado como “branco” foram acrescentados 100 µL de meio de cultura RPMI + 10% de soro fetal bovino contendo uma concentração das substâncias testadas. Após o

tratamento, as células foram incubadas por 24 horas a 37 °C em estufa com 5% de CO₂. O meio de cultura foi removido e foram acrescentados 100 µL de meio de cultura RPMI + 10% soro fetal bovino contendo MTT (0,5 mg/mL). Após 4 horas de incubação o sobrenadante foi removido e os cristais de formazan foram dissolvidos com uma solução de isopropanol/ HCl 0,04 M. A absorvância das amostras a 570 nm e 670 nm foi determinada no leitor de microplacas SpectraMax M5 (Molecular Devices) (Bonacorsi et al., 2004; Ferrari et al., 1990).

Para a determinação da morte celular foram feitos os seguintes cálculos:

1. $Abs_{570} - Abs_{670} = Abs$
2. $Abs - Abs_{branco} = Abs_{amostra}$
3. Média da $Abs_{controle\ células}$ (Abs_{CC})
4. $Viabilidade_{amostra} = 100 \times (Abs_{amostra}/Abs_{CC})$
5. $Morte\ celular = 100 - Viabilidade_{amostra}$

Cultura de macrófagos peritoneais para o ensaio de fagocitose

O lavadoperitoneal obtido, segundo a metodologia descrita para o ensaio de citotoxicidade, foi centrifugado a 1200 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 9 ml de água e 1 ml de PBS 10X ao mesmo tempo, ambos estéreis, para a lise das hemácias, e 10 ml de meio RPMI-1640 sem MOPS e acrescido de HEPES (Sigma, USA) (6g/L). O material foi novamente centrifugado sob as mesmas condições e o sobrenadante foi descartado. Logo, foi adicionado 1 ml de RPMI suplementado com HEPES (6g/L) e 10% de soro fetal bovino inativado.

Para a verificação da fagocitose foram preparadas placas de 24 poços contendo uma lamínula circular e a quantidade de 3×10^5 macrófagos em cada poço em um volume final de 2 ml de RPMI com soro fetal bovino. Nas placas para a verificação da atividade fungicida dos macrófagos as placas não continham lamínulas, mas seguiram os outros passos da preparação. Estas placas foram incubadas overnight em estufa com 5% CO₂ a 37°C (Ferrari et al., 1990).

Inóculo

O inóculo foi preparado utilizando o mesmo protocolo do ensaio *in vivo* (item 6) e a quantidade de leveduras foi calculada a fim de se obter 6×10^4 leveduras em cada poço, seguindo a proporção de 5 leveduras para cada macrófago. O inóculo foi ajustado em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino.

Atividade fagocítica e fungicida de macrófagos murinos

As placas preparadas foram lavadas e adicionou-se 1ml das diluições das substâncias experimentais, na concentração igual ao CIM e na concentração sub-inibitória, em meio RPMI com soro fetal bovino. Em seguida as placas foram incubadas por 30 minutos em estufa com 5% CO₂ a 37°C. Posteriormente foi adicionado 1 ml do inóculo fúngico e as placas foram novamente incubadas por 2 horas em estufa com 5% CO₂ a 37°C.

Após o período de incubação das placas de fagocitose o meio foi retirado e cada poço foi lavado com 1 ml de PBS 1 X, e depois descartado. Logo em seguida, foram adicionados 300 µl de metanol e as lamínulas foram retiradas e colocadas sob lâminas e, posteriormente coradas com o Kit panótico (Renylab, Brasil). Durante a análise das lâminas foram observados e contabilizados a cada 100 macrófagos o número de macrófagos fagocíticos e o número de leveduras em seu interior. O índice fagocítico (IF_%) foi determinado segundo a fórmula a seguir:

$$IF_{(\%)} = \% \text{ células fagocíticas} \times N^{\circ} \text{ de partículas fagocitadas}$$

As placas para a verificação da atividade fungicida foram lavadas com 1 ml de PBS 1X e depois foram lavadas 4 vezes com 250 µL de água estéril para lise dos macrófagos e saída das leveduras fagocitadas. Logo em seguida, 100 µL da suspensão de cada poço foram plaqueados em placas de Petri contendo o meio BHI suplementado com 4% de soro fetal bovino, 5% de fator de crescimento (filtrado da cultura do isolado B339) e 1% sulfato de amicacina. As placas foram incubadas a 37°C por 15 dias, para a contagem das UFC recuperadas (Sargi et al., 2012).

Concentração de óxido nítrico

A concentração de óxido nítrico no sobrenadante da cultura de macrófagos foi medido usando o ensaio colorimétrico baseado na reação de Griess. Para isto, foi retirada uma alíquota de 100 µl do sobrenadante e incubado com 100 µl do reagente de Griess (sulfanilamida 1% em H₃PO₄ 5%, cloreto de naftilenodiamina 0,1%) em microplaca de 96 poços à temperatura ambiente.

A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas VERSAmax (Molecular Devices) pelo programa Softmax® Pro 5 (Molecular devices) sob o comprimento de onda de 550 nm. A concentração de óxido nítrico foi determinada por comparação dos resultados com uma curva padrão gerada por NaNO₂ diluído em água. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em µM (Sargi et al., 2012).

6.1. Concentração inibitória e fungicida mínima

A atividade antifúngica das substâncias experimentais foi determinada por meio da concentração inibitória e fungicida mínima. Todos os isolados testados (14) do gênero *Paracoccidioides*, representantes das três espécies filogenéticas S1, PS2 e PS3 e do grupo “Pb01-like”, foram susceptíveis às cinco substâncias testadas no presente trabalho (Tabela 4).

As concentrações inibitórias mínimas frente às substâncias derivadas de chalconas variaram entre 1,9 a 31,3 µg/ml. Dentre estas substâncias a CIM média entre os 14 isolados foi de 11,6 µg/ml para a substância **3b**; 11,5 µg/ml para a **4c**; 7,3 µg/ml para a **3e** e 12,7 µg/ml para a **4e**. Dentre as substâncias testadas a substância **3e** foi estatisticamente a que apresentou o menor valor de CIM, enquanto que as substâncias **3b**, **4c** e **4e** tiveram atividades semelhantes contra os isolados de *Paracoccidioides* sp. testados.

A tiosemicarbazona do lapachol também demonstrou atividade inibitória *in vitro* apresentando CIM que variou entre 3,9 a 31,3 µg/ml para a maioria dos isolados de *Paracoccidioides* testados, apenas o isolado 608 apresentou um valor de CIM mais elevado, de 62,5 µg/ml. O valor da CIM média desta substância foi 26,5 µg/ml para os isolados de *Paracoccidioides*. Quando os isolados de *Paracoccidioides* foram testados quanto à suscetibilidade ao itraconazol e a combinação de sulfametoxazol-trimetoprima (SMZ-TMP) a CIM obtida foi de 0,0036 a 0,125 µg/ml e 2,3 a 150 µg/ml, respectivamente. O valor da CIM média da SMZ-TMP foi de 52,2 µg/ml e para o itraconazol foi 0,02 µg/ml, dessa forma, comparando com os resultados das substâncias experimentais observa-se que todas apresentaram atividade intermediária entre o itraconazol e a SMZ-TMP (Figura 5). Além disto, não foi observada diferença significativa entre a suscetibilidade das espécies filogenéticas de *Paracoccidioides* observadas nos ensaios de CIM com as substâncias experimentais e com as drogas controle, itraconazol e SMZ-TMP, segundo a análise pelo teste de comparação múltipla Newman-Keuls com $p < 0.05$.

A concentração fungicida mínima também foi verificada sendo que a atividade fungicida coincidiu com o valor da CIM em cerca de 30% dos resultados obtidos, o restante coincidiu com aproximadamente o dobro da CIM.

TABELA 4. Atividade antifúngica da tiosemicarbazona do lapachol e das substâncias experimentais 3b, 4c, 3e, 4e, e drogas controle (itraconazol e sulfametoxazol-trimetoprima) contra 14 isolados do gênero *Paracoccidioides*.

Isolados	TSC-lap		Itraconazol			SMZ-TMP				
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CFM			
	µg/ml	µM	µg/ml	µM	µg/ml	µM	µg/ml			
S1	Pb18	31,25	99,20	31,25	0,004	0,005	0,015	4,70	15,4/2,7	4,70
	B339	4,60	14,40	7,80	0,004	0,005	0,007	4,70	15,4/2,7	4,70
	Mg5	3,90	12,40	3,90	0,004	0,005	0,015	4,70	15,4/2,7	4,70
	470	3,90	12,40	15,60	0,009	0,013	0,015	14,10	46,3/8,1	37,50
	9673	31,25	99,20	62,50	0,007	0,010	0,031	2,30	7,5/1,3	9,37
	Ap	31,25	99,20	62,50	0,007	0,010	0,007	75,00	246,4/43	75,00
	Pinguim	31,25	99,20	31,25	0,005	0,008	0,015	4,70	15,4/2,7	9,37
PS2	1017	31,25	99,20	31,25	0,125	0,177	0,250	150,00	493,6/86,1	300,00
	608	62,50	198,40	62,50	0,062	0,088	0,062	150,00	493,6/86,1	300,00
	1925	15,62	49,50	31,25	0,004	0,005	0,004	11,70	38,6/6,7	37,50
PS3	EPM83	31,25	99,20	31,25	0,007	0,010	0,015	150,00	493,6/86	150,00
Pb01-like	Pb01	31,25	99,20	62,50	0,031	0,044	0,062	150,00	493,6/86,1	150,00
	ED01	31,25	99,20	31,25	0,031	0,044	0,062	4,70	15,4/2,7	9,37
	1578	31,25	99,20	62,50	0,015	0,021	0,031	4,70	15,4/2,7	9,37

Legenda: TSC-lap=tiosemicarbazona do lapachol; CIM= concentração inibitória mínima; DP=desvio padrão; CFM= concentração fungicida mínima; SMZ-TMP= sulfametoxazol-trimetoprima; Espécies filogenéticas de *Paracoccidioides* sp. = S1, PS2, PS3 e Pb01-like.

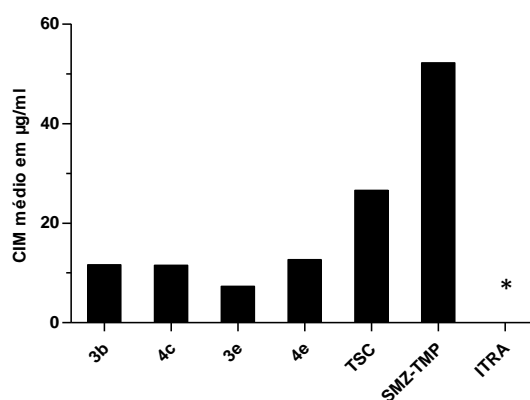


FIGURA 5. Média da Concentração inibitória mínima das substâncias 3b, 4c, 3e, 4e e tiosemicarbazona do lapachol (TSC), sulfametoxazol-trimetoprima (SMZ-TMP) e itraconazol (ITRA) em µg/ml em meio McVeigh&Morton contra 14 isolados de *Paracoccidioides* sp.. *Média do itraconazol foi 0,02 µg/ml, barra não visível no gráfico.

Continuação da Tabela 4.

Isolados	3b		4c		3e		4e						
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM					
	µg/ml	µM	µg/ml	µM	µg/ml	µg/ml	µM	µg/ml	µM	µg/ml			
S1	Pb18	10,40	38,20	15,60	5,90	21,10	7,80	7,80	25,50	7,80	31,25	106,50	31,25
	B339	5,90	21,50	7,80	2,60	9,40	7,80	2,90	9,60	3,90	1,95	6,60	3,90
	Mg5	7,80	28,60	7,80	3,90	14,10	3,90	3,90	12,80	3,90	3,90	13,30	3,90
	470	3,90	14,30	15,60	31,25	112,70	31,25	7,80	25,50	31,25	7,80	26,60	31,25
	9673	4,60	16,70	7,80	13,00	46,90	15,60	3,90	12,80	3,90	15,60	53,20	15,60
	Ap	7,80	28,60	15,60	15,60	56,30	15,60	7,80	25,50	31,25	15,60	53,20	15,60
	Pinguim	3,90	14,30	7,80	7,20	25,80	31,25	3,30	10,60	3,90	5,90	19,90	15,60
PS2	1017	23,40	86,00	62,50	11,70	42,20	31,25	2,60	8,50	3,90	7,80	26,60	7,80
	608	31,30	114,80	62,50	7,80	28,10	31,25	5,90	19,20	7,80	7,80	26,60	7,80
	1925	2,40	8,90	3,90	5,20	18,80	31,25	1,90	6,40	3,90	2,90	10,00	3,90
PS3	EPM83	2,60	9,50	3,90	7,80	28,10	7,80	4,60	14,90	3,90	5,20	17,70	7,80
Pb01-like	Pb01	31,25	114,80	31,25	23,40	84,50	31,25	31,25	102,40	31,25	31,25	106,50	31,25
	ED01	11,70	43,00	31,25	10,40	37,50	15,60	7,80	25,50	15,60	9,10	31,25	15,60
	1578	15,60	57,30	31,25	15,60	56,30	31,25	10,40	34,10	31,25	31,25	106,50	31,25

O teste de sobrevivência foi realizado utilizando o isolado Pb18 de *P. brasiliensis* sob tratamento com as cinco substâncias experimentais na concentração igual ao CIM e duas vezes mais concentrada que o valor da CIM. Este resultado foi expresso na forma de porcentagem de células viáveis quantificadas ao longo de 15 dias (360 horas) de tratamento, mesmo que não houvesse 100% de inibição. Verificou-se que as substâncias experimentais **3b**, **4c**, **3e** e **4e** foram capazes de reduzir em cerca de 70% o número de células viáveis nas primeiras cem horas de incubação, não havendo diferença significativa entre as duas concentrações avaliadas. A tiosemicarbazona do lapachol na concentração duas vezes a CIM foi capaz de reduzir 70% das células viáveis já nas primeiras 20 horas de incubação, enquanto que na concentração igual à CIM esse nível de redução somente foi alcançado após 100 horas de incubação (Figura 6).

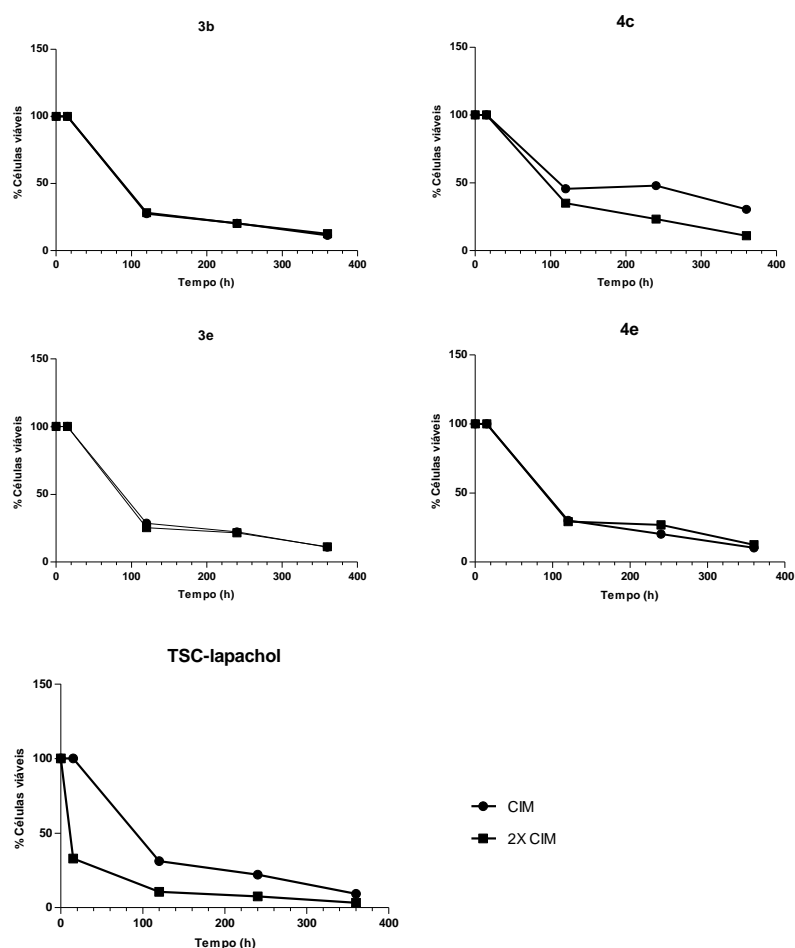


FIGURA 6. Curva de sobrevivência do isolado Pb18 de *Paracoccidioides brasiliensis* sob tratamento com as substâncias **3b**, **4c**, **3e**, **4e** e a tiosemicarbazona do lapachol, expressa pela porcentagem de células viáveis em função do tempo. Legenda: TSC-lapachol=tiosemicarbazona do lapachol; CIM= concentração inibitória mínima.

6.2. Interação entre drogas

Nos testes de interação entre as substâncias experimentais e a anfotericina B, itraconazol e a SMZ-TMP, realizado com o isolado Pb18 de *P. brasiliensis*, foi verificada interação sinérgica apenas entre a substância **4c** e o itraconazol, com índice de CIFI igual a 0,5 (Tabela 5). As demais substâncias apresentaram CIFI de 1,031 a 2,062, sendo reconhecidos como indiferentes ou apresentando apenas um efeito aditivo com as drogas testadas.

TABELA 5
Índices de concentração inibitória fracional (CIFI).

	3b	4c	3e	4c	TSC
Anfotericina	2,062	1,031	2,031	1,031	2,031
Itraconazol	1,062	0,5*	1,1	1,031	1,031
SMZ-TMP	1,062	2,031	1,062	1,031	1,031

Legenda: ≤ 0.5 Sinergismo*; >0.5 e <4 indiferente ou aditivo; > 4 Antagonismo; TSC= tiosemicarbazona do lapachol; SMZ-TMP=sulfametoxazol-trimetoprima. Valores de CIFI referentes apenas para o isolado Pb18 de *P. brasiliensis*.

6.3. Mecanismos de ação

Estudos microscópicos de alteração na morfologia fúngica

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As fotos de microscopia eletrônica de varredura do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* tratado com as substâncias experimentais em concentração sub-inibitória revelaram alterações ultra-estruturais nas células desse micro-organismo, as quais podem ser sugestivas do tipo de mecanismo de ação exercido por estas substâncias. Nestas fotos foram observadas alterações tais como murchamento e depressões na superfície da célula, descamamento da parede celular, células estouradas com extravasamento do conteúdo celular e morfologia celular diferenciada das células sem tratamento.

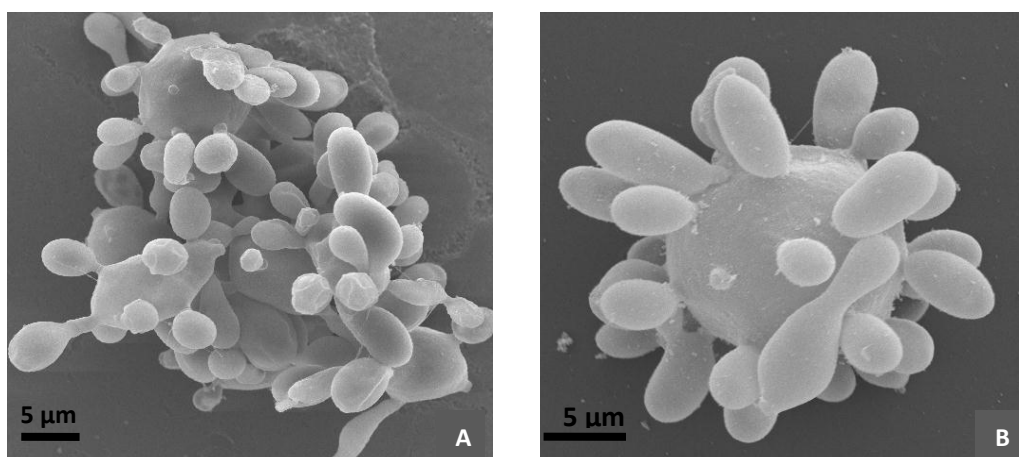


FIGURA 7. Leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado Pb18, em meio McVeigh&Morton com 15 dias de crescimento. Foto por microscopia eletrônica de varredura, 3000 X e 5000 X, respectivamente.

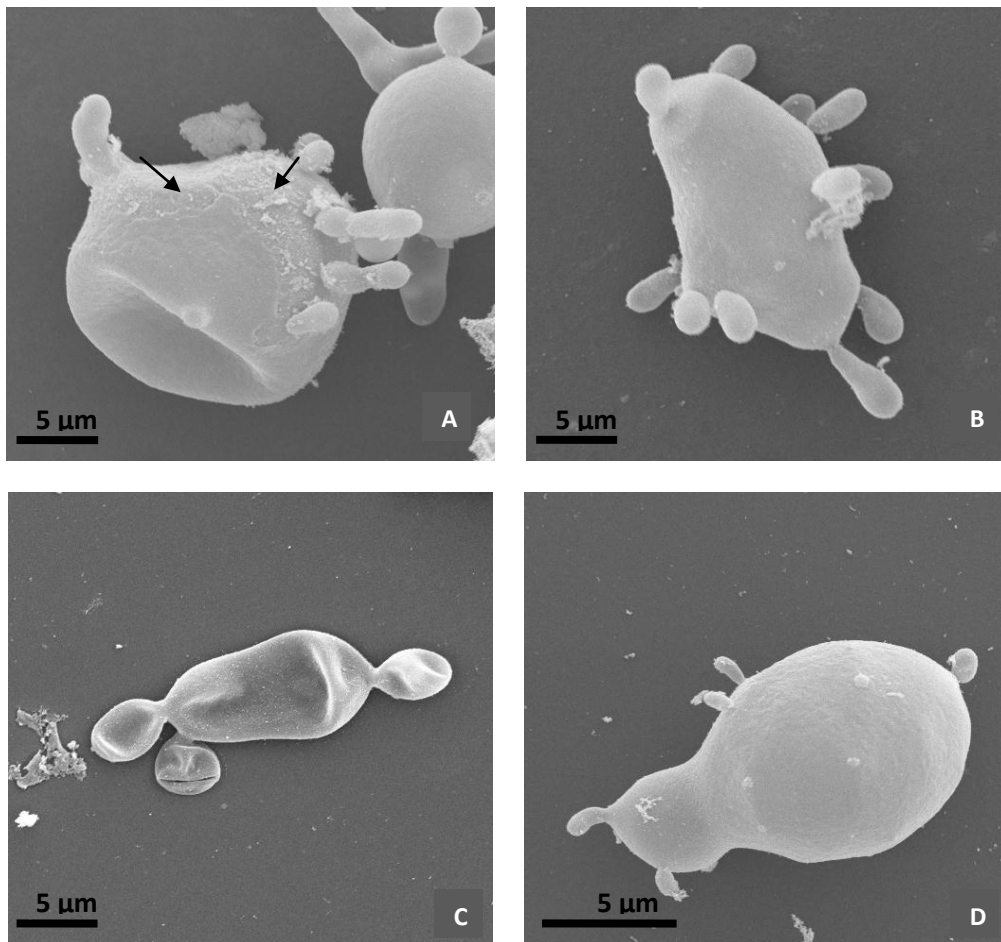


FIGURA 8. Leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado Pb18, tratadas com a substância **3b** em concentração sub-inibitória (3,9 μg/ml) em meio McVeigh&Morton com 15 dias de crescimento. A) célula murcha e com início de descamação no envoltório celular (seta); C) Célula murcha; B e D) Célula com morfologia diferenciada. Foto por microscopia eletrônica de varredura, A, B e C aumento de 3000 X e D 5000 X.

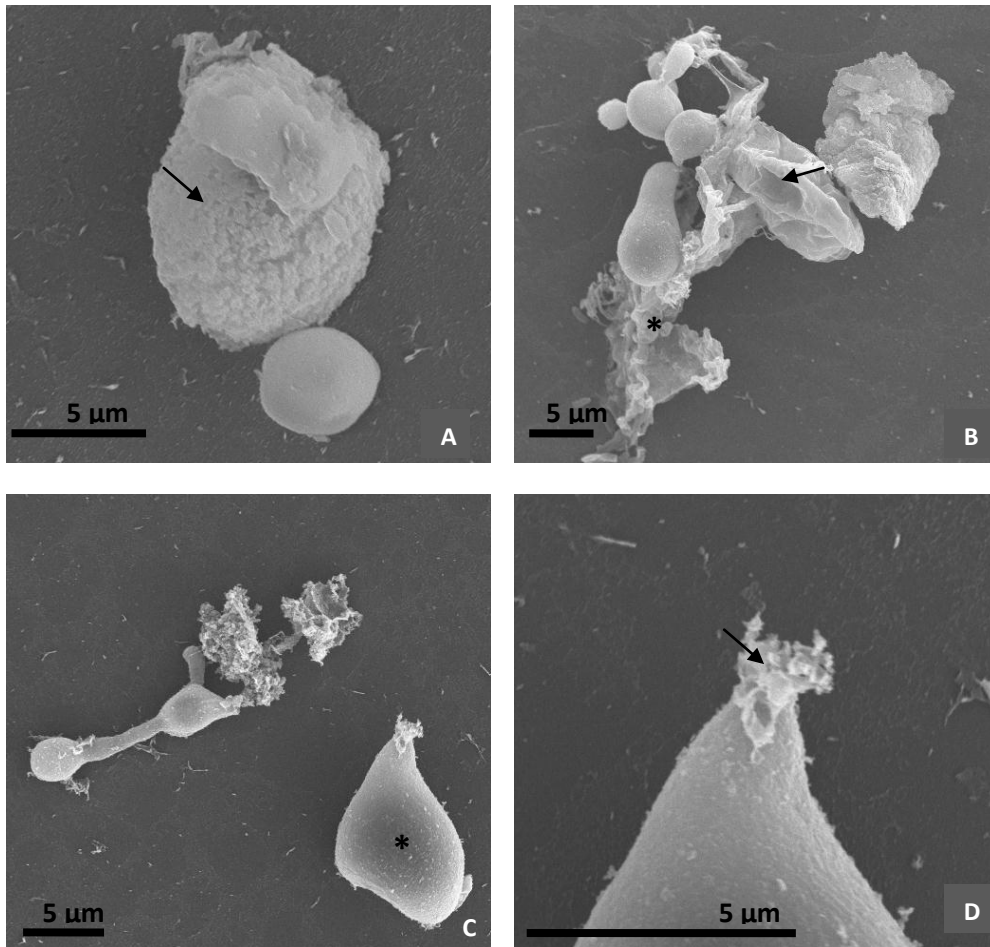


FIGURA 9. Leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado Pb18, tratadas com a substância **4c** em concentração sub-inibitória (1,95 µg/ml) em meio McVeigh&Morton com 15 dias de crescimento. A) célula com descamação no envoltório celular (seta), 5000 X; B) Célula estourada (seta) com extravasamento do conteúdo celular (*), 3000 X; C e D) célula com morfologia diferenciada (*) e extravasamento do conteúdo celular (seta), 3000 X e 10.000X, respectivamente. Microscopia eletrônica de varredura.

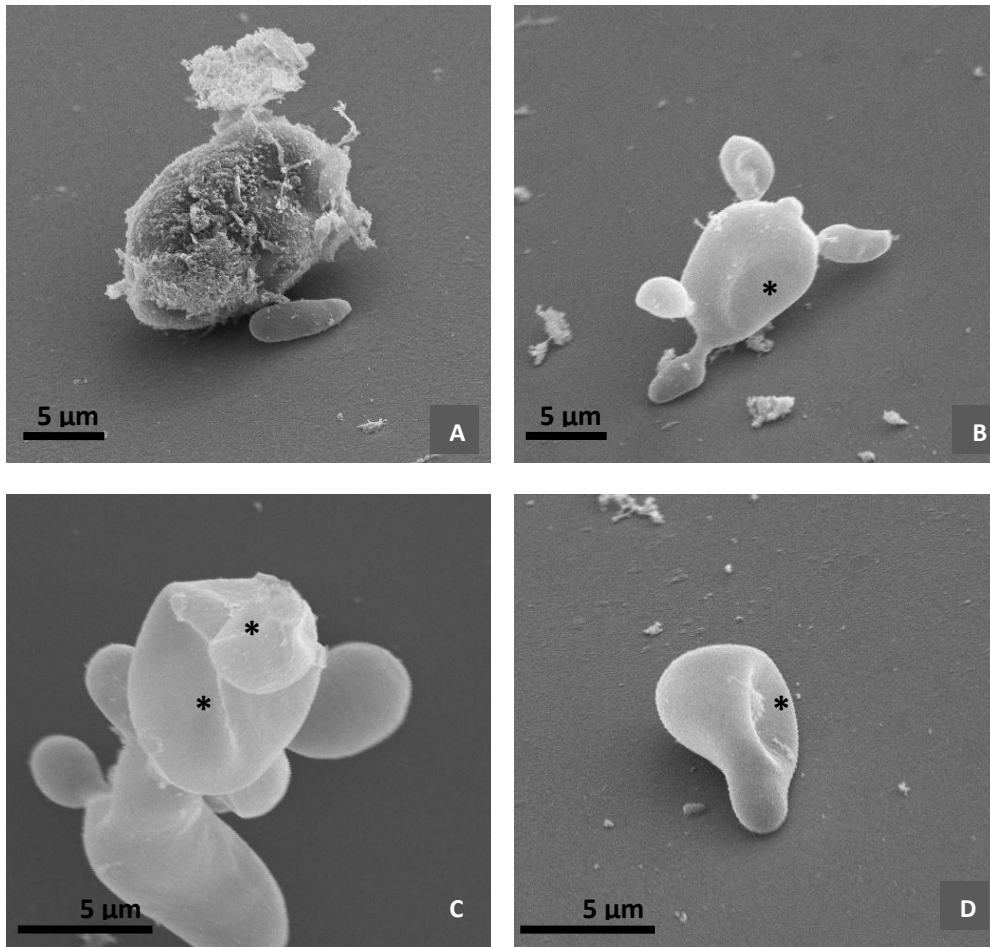


FIGURA 10. Leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado Pb18, tratadas com a substância **3e** em concentração sub-inibitória (3,9 µg/ml) em meio McVeigh&Morton com 15 dias de crescimento. A) célula com comprometimento do envoltório celular e extravasamento do conteúdo celular, 3000 X; B) Célula estourada (seta) com extravasamento do conteúdo celular (*), 3000 X; B, C e D) células murchas (*), 5000 X e 5000X. Microscopia eletrônica de varredura.

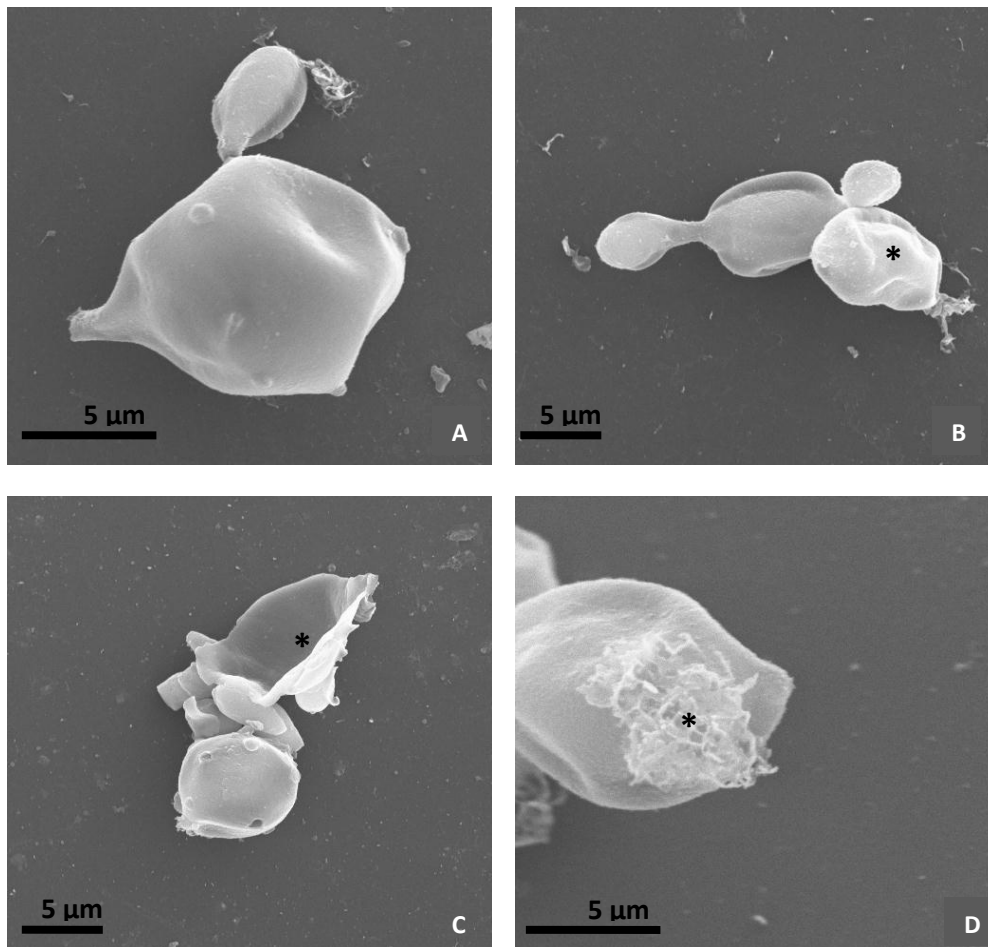


FIGURA 11. Leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado Pb18, tratadas com a substância **4e** em concentração sub-inibitória (3,9 $\mu\text{g/ml}$) em meio McVeigh&Morton com 15 dias de crescimento. A e B) células murchas, 5000 X e 3000 X, respectivamente; C) Célula estourada (*), 3000 X; D) célula murcha e com extravasamento de conteúdo celular (*), 5000 X. Microscopia eletrônica de varredura.

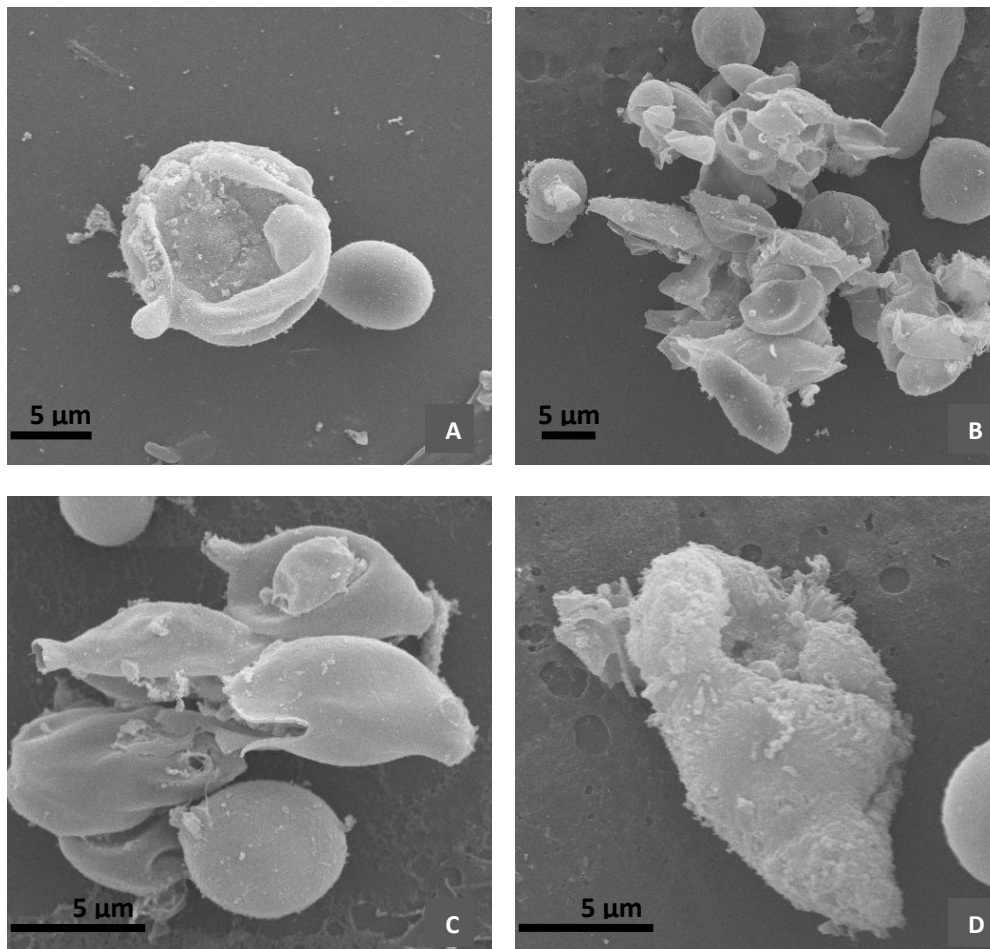


FIGURA 12. Leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado Pb18, tratadas com a tiosemicarbazona do lapachol em concentração sub-inibitória (7,8 µg/ml) em meio McVeigh&Morton com 15 dias de crescimento. A, B e C) células murchas e rompidas, 3000 X, 3000X e 5000 X, respectivamente; D) célula murcha e com envoltório celular comprometido, 5000 X. Microscopia eletrônica de varredura.

O isolado Pb18 cultivado em meio McVeigh&Morton apresentou crescimento abundante com desenvolvimento de célula-mãe com formato oval e multi-brotamentos característicos do gênero *Paracoccidioides* (Figura 7a). Foi observado que sob as condições de tratamentos testados as leveduras de *P. brasiliensis*, isolado Pb18, quando tratadas com a substância **3b** apresentaram murchamento das células, como observado nas figuras 2a e 2c, além de alterações na morfologia celular (Figuras 8b e 2d). Quando o isolado Pb18 foi tratado com **4c** houve o descamamento do envoltório celular (Figura 9a) e algumas células apresentaram extravasamento do conteúdo citoplasmático (Figuras 9b, c, d). Já as leveduras quando expostas a ação da substância **3e**

apresentaram, sobretudo, murchamento e depressões na superfície celular (Figuras 10b, c, d), o que sugere que a célula esteja em processo de apoptose, contudo, algumas células sofreram alterações no envelope externo e extravasamento do conteúdo celular. Sob tratamento com a substância **4e** as células também sofreram murchamento (Figuras 11a, b, d) e rompimento da célula (Figuras 11c). As leveduras de *P. brasiliensis* (Pb 18) sob ação da tiosemicarbazona do lapachol em sua grande maioria estavam murchas e rompidas, sugerindo morte celular por necrose (Figuras 12a, b,c).

Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Utilizando microscopia eletrônica de transmissão foi possível observar alterações na morfologia e na estrutura interna celular do isolado Pb18 sob tratamento com as substâncias em teste. Nestas fotos foram observadas desorganização citoplasmática, vacuolização celular e digestão de organelas, destruição da membrana celular, ausência de núcleo indicando comprometimento do metabolismo celular, além de alterações na membrana características de apoptose.

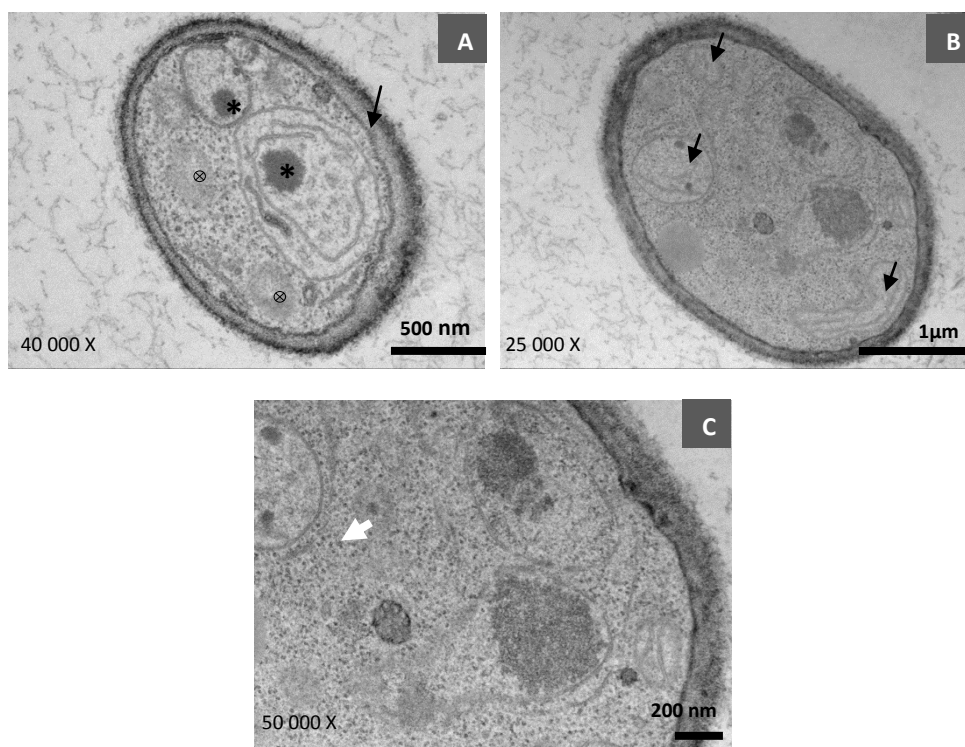


FIGURA 13. Leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado Pb18, cultivadas em meio McVeigh&Morton com 15 dias de crescimento na ausência de tratamento (grupo controle). A) célula binucleada (*) com vacúolos (⊗), membrana citoplasmática (seta) e externamente a membrana a parede celular; B) mitocôndrias (seta); C) citoplasma com granuloso (seta branca). Microscopia eletrônica de transmissão.

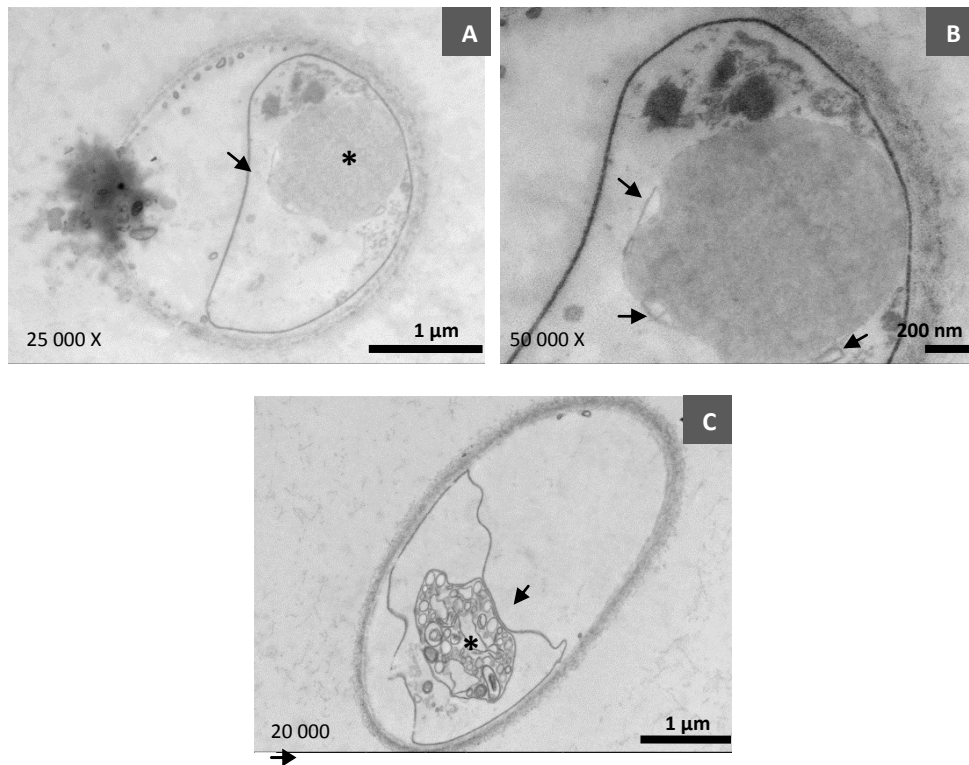


FIGURA 14. Leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado Pb18, tratadas com a substância **3b** na concentração de 3,9 µg/ml cultivadas em meio McVeigh&Morton com 15 dias de crescimento. A) membrana plasmática retraída (seta) com núcleo condensado (*); B) formação de vesículas na membrana nuclear (seta); C) citoplasma e membrana retraída (seta) com vacúolo digestivo (*). Microscopia eletrônica de transmissão.

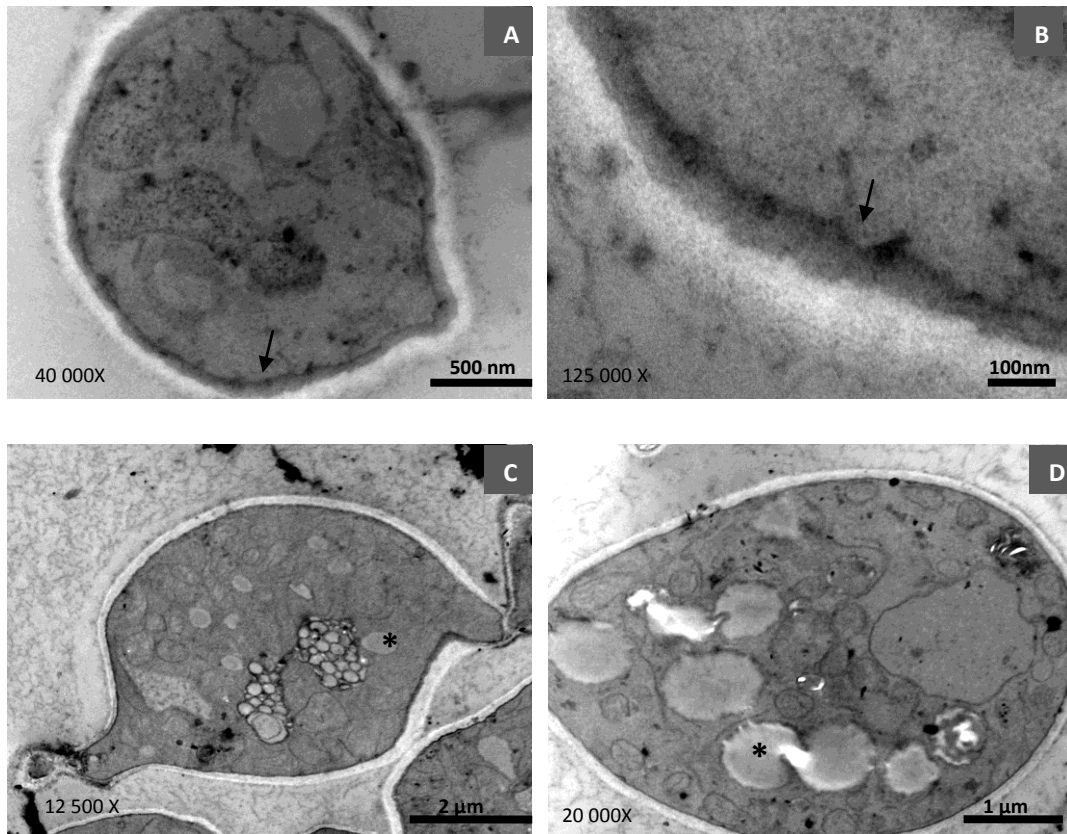


FIGURA 15. Leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado Pb18, tratadas com a substância **4c** em concentração sub-inibitória (1,95 $\mu\text{g/ml}$) em meio McVeigh&Morton com 15 dias de crescimento. A) célula com retração da membrana plasmática (seta); B) membrana plasmática ampliada (seta); C e D) célula com muitos vacúolos (*) e citoplasma desorganizado. Microscopia eletrônica de transmissão.

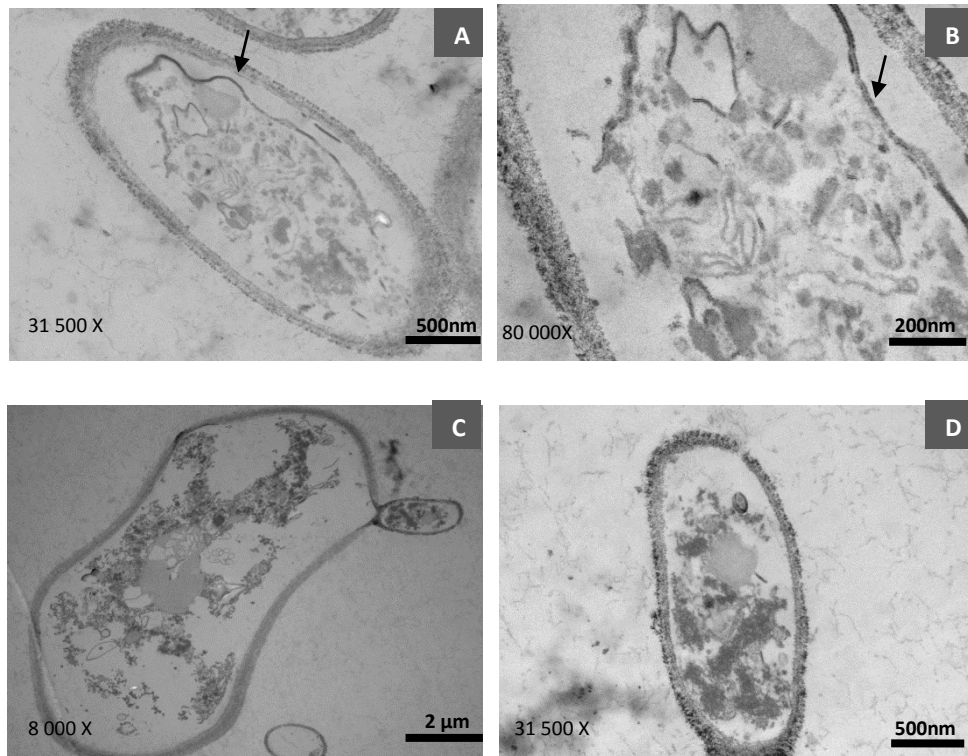


FIGURA 16. Leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado Pb18, tratadas com a substância **3e** em concentração sub-inibitória (3,9 µg/ml) em meio McVeigh&Morton com 15 dias de crescimento. A) célula com membrana plasmática degradada (seta) e desorganização citoplasmática; B) fragmentos da membrana celular (seta); C) célula-mãe e célula-filha com ausência de membrana plasmática e desorganização citoplasmática; D) ampliação da célula-filha. Microscopia eletrônica de transmissão.

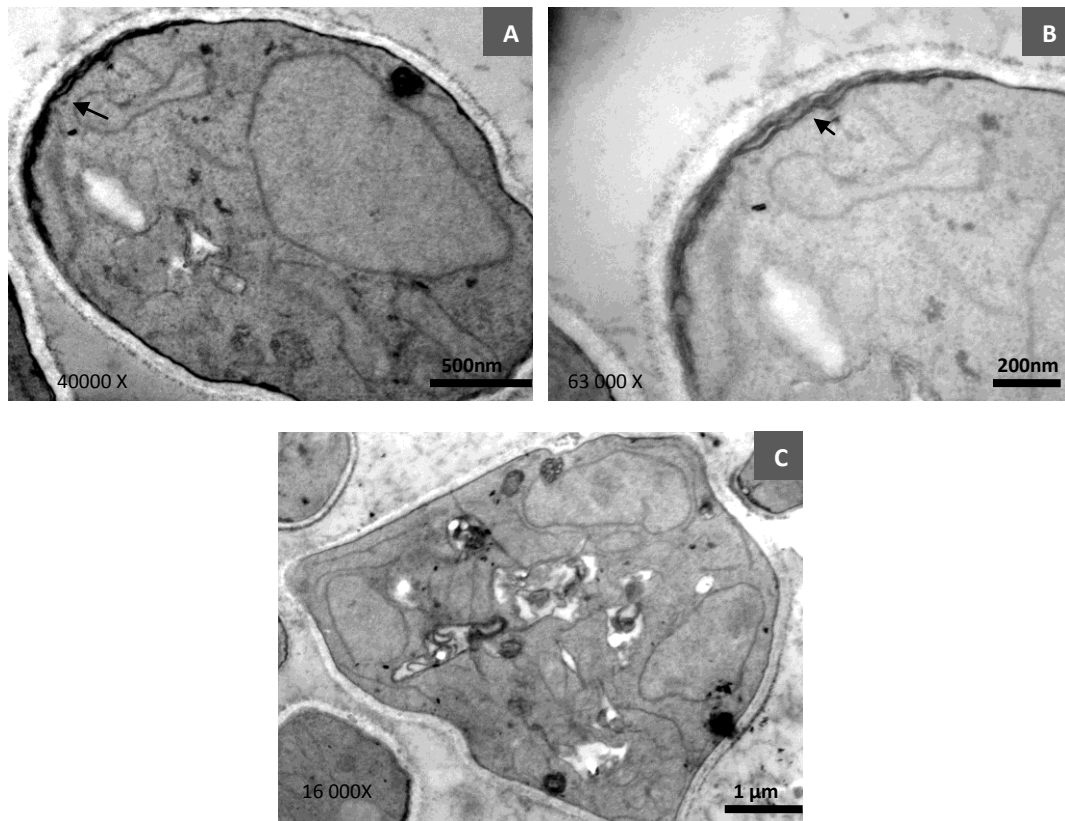


FIGURA 17. Leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado Pb18, tratadas com a substância **4e** em concentração sub-inibitória (3,9 $\mu\text{g/ml}$) em meio McVeigh&Morton com 15 dias de crescimento. A e B) células com alteração em parte da membrana celular (seta) e desorganização citoplasmática; C) Célula com morfologia alterada e citoplasma desorganizado. Microscopia eletrônica de transmissão.

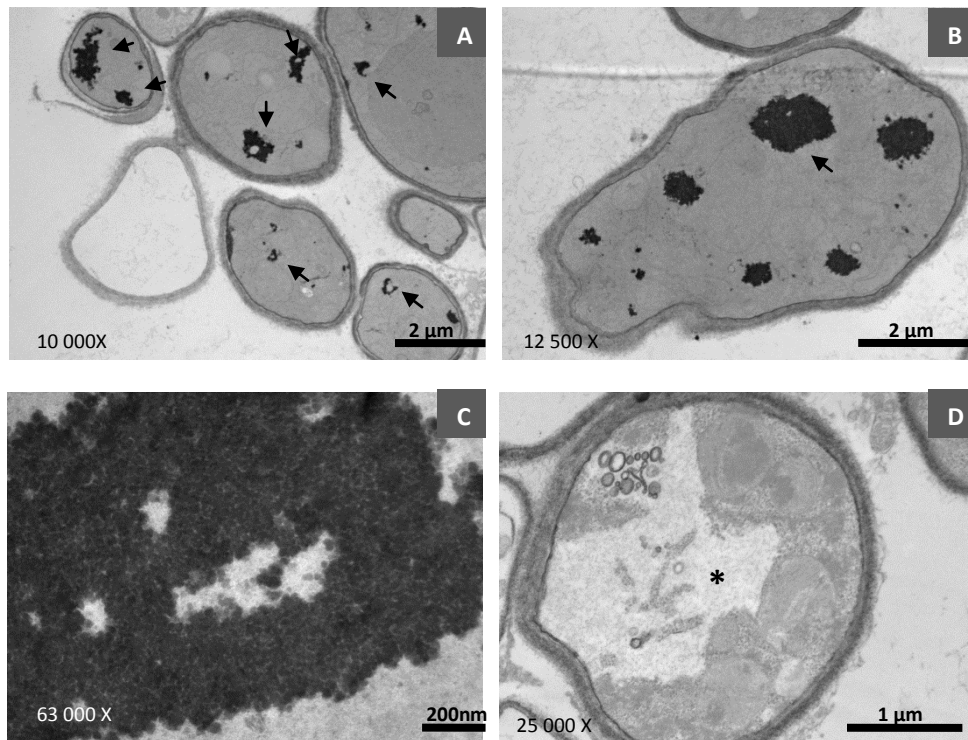


FIGURA 18. Leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado Pb18, tratadas com a tiosemicarbazona do lapachol em concentração sub-inibitória (7,8 µg/ml) em meio McVeigh&Morton com 15 dias de crescimento. A e B) células com acúmulo de resíduos granulosos (seta); C) grânulos ampliados; D) célula com citoplasma desorganizado. Microscopia eletrônica de transmissão.

As leveduras Pb18 de *P. brasiliensis* quando tratadas com a substância **3b** apresentaram alterações drásticas na membrana citoplasmática, com retração dessa estrutura (Figura 14a) deixando a membrana com um formato de meia-lua, característico do processo de morte por apoptose. O núcleo em muitas células apresentava-se condensado e com formação de vesículas junto à membrana nuclear (Figura 14b). O tratamento do fungo com a substância **4c** provocou uma leve retração da membrana plasmática (Figura 15 a, b) e formação de vários vacúolos, além de uma desorganização citoplasmática (Figura 15c,d). A substância **3e** provocou a destruição da membrana plasmática (Figura 16a,b) e desorganização citoplasmática. Alterações mais pontuais na membrana plasmática também foram observadas no tratamento com a substância **4e** (Figura 17a,b), além de alteração na morfologia celular e desorganização citoplasmática (Figura 17c).

O tratamento com a tiosemicarbazona do lapachol levou ao acúmulo de grânulos no citoplasma (Figura 18a,b), e desorganização citoplasmática (Figura 18d). Após o cultivo do isolado Pb18 em presença desta substância as células apresentavam coloração mais escura que a cultura na sua ausência desta, sendo possível que esta alteração na coloração da célula esteja relacionada ao acúmulo destes resíduos granulosos, os quais podem ser da própria substância que se acumula no citoplasma celular sem ser metabolizado pela célula de *P. brasiliensis*.

Ensaio com alvo na parede celular fúngica

Ensaio do Sorbitol

O teste com o sorbitol, protetor osmótico, foi realizado com o objetivo de se observar se as substâncias em teste possuem ação sobre a parede celular fúngica. No entanto, não foi observada alteração no valor da CIM na presença do sorbitol, o que indica que as substâncias não agem diretamente sob a parede celular fúngica do isolado Pb18 (Tabela 6).

TABELA 6.

Resultado da concentração inibitória mínima na presença e ausência de sorbitol a 0,8 M das substâncias **3b**, **4c**, **3e**, **4e** e da tiosemicarbazona do lapachol (TSC) contra o isolado Pb18 de *Paracoccidioides brasiliensis*.

Concentração inibitória mínima (CIM) µg/ml		
	MMcM	MMcM+Sorbitol
3b	7,8	7,8
4c	7,8	7,8
3e	7,8	7,8
4e	7,8	7,8
TSC	15,6	15,6

Legenda; MMcM – meio McVeigh&Morton.

Ensaio com marcadores de morte celular: Iodeto de propídeo e DAPI

Este teste foi realizado com o isolado Pb18 de *P. brasiliensis* após 5 dias de crescimento sob tratamento com as substâncias **3b**, **4c**, **3e**, **4e** e a tiosemicarbazona do lapachol em concentração sub-inibitória. As amostras dessas células tratadas foram divididas para incubação, separadamente, com os marcadores de morte celular iodeto de propídeo (IP) e 4,6'-diamino-2-fenilindol (DAPI). Na amostra controle, com apenas as leveduras em cultivo, observamos que 74,16% das células se coraram com DAPI e 15,7% apresentaram IP positivo (Tabela 7).

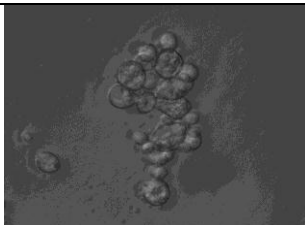
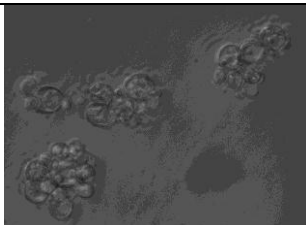
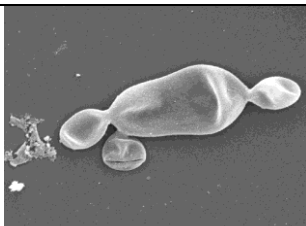
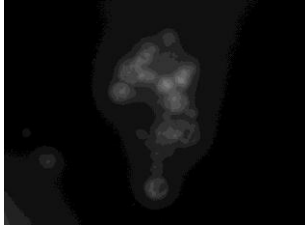
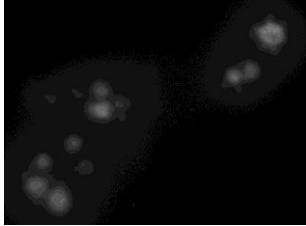

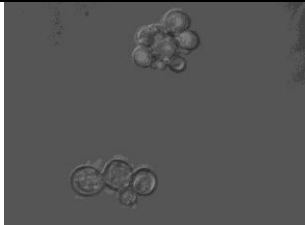
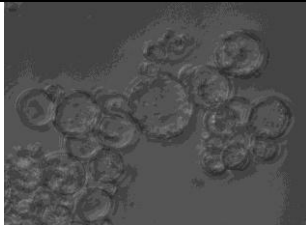
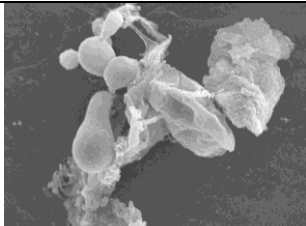
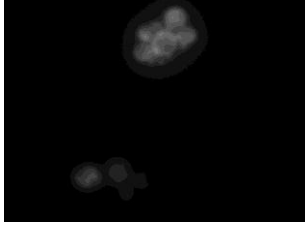
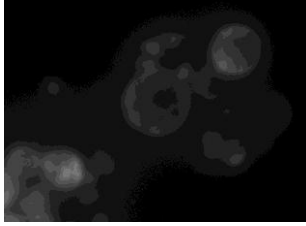

Na amostra de células tratadas com a substância **3b** 50% apresentaram condensação da cromatina indicadas pela coloração positiva com o DAPI, sugerindo a possibilidade de estas estarem em processo de apoptose. Contudo, segundo teste com o IP, 30% apresentou danos na membrana sugerindo morte celular por necrose. Quando comparados com as características ultraestruturais observadas após 15 dias de tratamento, as células estavam murchas e com o citoplasma retraído contendo apenas vacúolos digestivos, contudo o rompimento do envelope celular não foi observado, o que reforça o indício de um processo apoptótico nessas células.

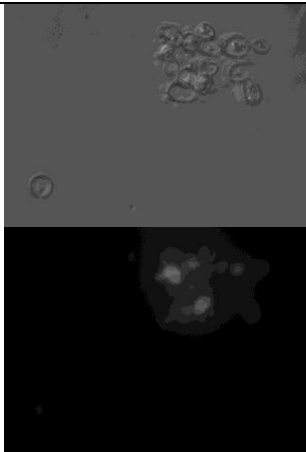
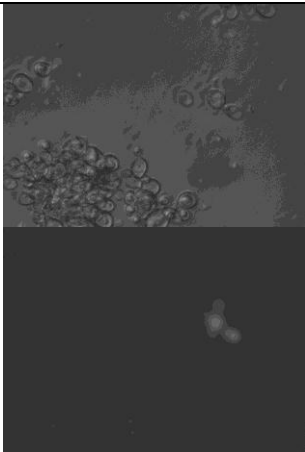
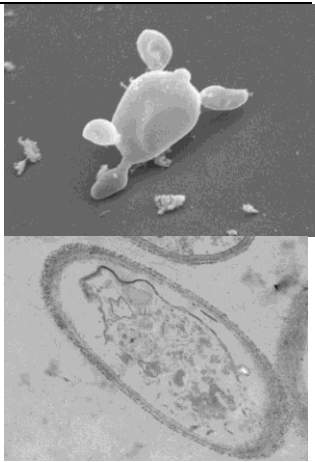
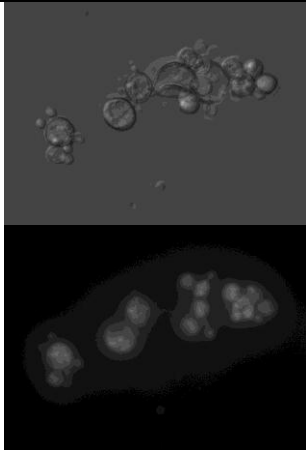
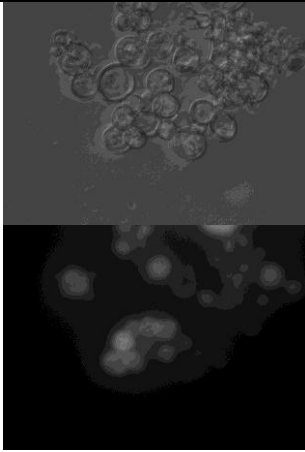
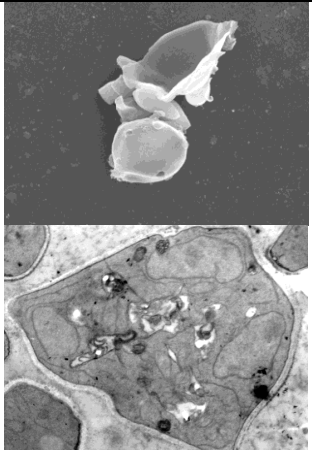
No tratamento com a substância **4c** foi observado que 70% das células apresentaram DAPI positivo e 40% apresentaram IP positivo e por microscopia eletrônica observamos que algumas células estavam rompidas indicando a ocorrência de necrose. Já no tratamento com **3e** cerca de 30% das células apresentaram cromatina condensada, enquanto apenas 6% não apresentaram membrana íntegra e foram coradas com IP. A microscopia mostrou células murchas e com alterações citoplasmáticas e membrana degradada, contudo a parede celular estava íntegra não havendo extravasamento de conteúdo celular, o que reforça a possibilidade de indução de apoptose.

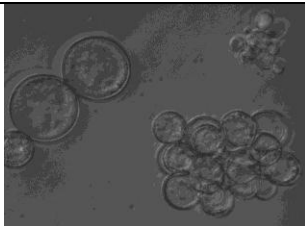
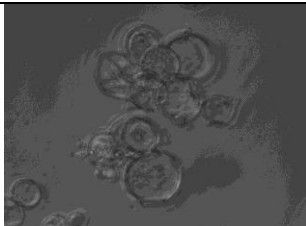
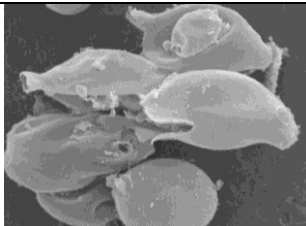
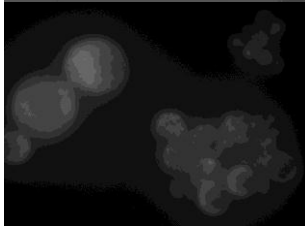
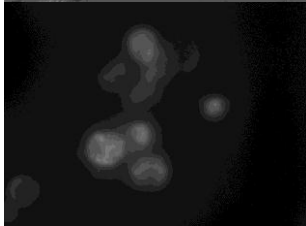
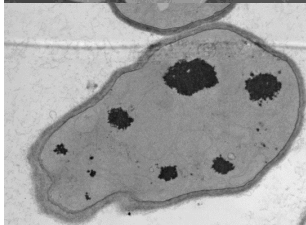
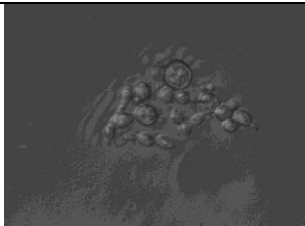
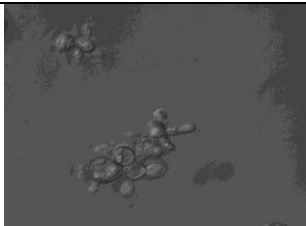
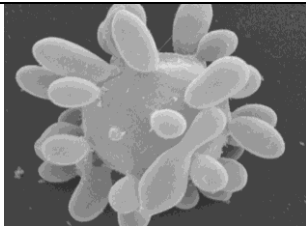
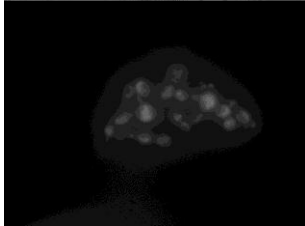


A amostra tratada com **4e** revelou que 95% das células apresentavam cromatina condensada e 33,3% foram IP positivo, além disso, segundo a microscopia eletrônica muitas células estavam murchas e outras estouradas. Nas leveduras tratadas com **TSC** 60% das células foram coradas com DAPI e 50% com IP. Como o resultado do DAPI e IP foram semelhantes e por microscopia observamos muitas células rompidas é possível que esteja ocorrendo morte por necrose, sendo assim o DAPI positivo poderia estar relacionado à facilidade de penetrar na célula pela membrana danificada, podendo se

ligar à cromatina ou ao conteúdo celular solto no meio revelando um falso teste positivo.

TABELA 7. Ensaio com marcadores apoptóticos. Porcentagem de células coradas com DAPI e Iodeto de propídeo (IP) associadas a características ultra-estruturais do isolado Pb18 de *Paracoccidioides brasiliensis* quando submetidos a tratamento com as substâncias **3b**, **4c**, **3e**, **4e** e tiosemicarbazona do lapachol (TSC) em concentração sub-inibitória (por 5 dias para DAPI e IP e 15 dias para microscopia eletrônica).

Substâncias	DAPI	IP	Microscopia eletrônica
3b			
			
	50%	30%	Célula murcha, ausência de organelas, parede celular íntegra, citoplasma retraído
4c			
			
	70%	40,74%	Células com envoltório rompido, desorganização citoplasmática.

Substâncias	DAPI	IP	Microscopia eletrônica
3e			
	28,57%	6%	Célula murcha, desorganização citoplasmática e degradação da membrana celular.
4e			
	95%	33,3%	Célula murcha e estourada, desorganização citoplasmática e morfologia alterada.

Substâncias	DAPI	IP	Microscopia eletrônica
TSC			
			
	60%	50%	Células murchas e rompidas, morfologia alterada e acúmulo de grânulos eletrondensos.
Controle			
			
	74,16%	15,7%	Célula-mãe com múltiplos brotamentos, estruturas celulares íntegras.

6.4. Ensaio de fagocitose

Primeiramente foi realizado um ensaio para observar se as substâncias provocariam efeitos tóxicos sob macrófagos murinos. Diversas concentrações foram testadas e o aumento da toxicidade foi relacionado ao aumento da concentração das substâncias **3b**, **4c**, **3e**, **4e** e tiosemicarbazona do lapachol (TSC). Nos resultados a maior porcentagem de viabilidade celular está relacionada a uma menor toxicidade das substâncias aos macrófagos murinos. Na 8 observa-se que a substância **4c** e TSC

apresentaram maior porcentagem de macrófagos viáveis nas concentrações próximas a CIM e também igual a 40 µg/ml, enquanto que as substâncias **3b**, **3e** e **4e** não foram tóxicas principalmente em concentração igual ou menor que CIM.

TABELA 8.

Porcentagem de viabilidade de macrófagos murinos tratados com as substâncias **3b**, **4c**, **3e**, **4e** e a tiosemicarbazona do lapachol (TSC).

Substância	Concentração (µg/ml)	Viabilidade celular (%)	DP	Substância	Concentração (µg/ml)	Viabilidade celular (%)	DP
3b	1000	8,48	2,20	4e	1000	1,51	1,06
	200	24,99	2,61		200	3,68	1,63
	40	46,08	3,30		40	65,34	4,67
	8*	63,43	3,79		8*	66,50	4,55
	1,6	82,00	8,95		1,6	79,90	8,00
4c	1000	3,36	2,80	TSC	1000	3,26	1,56
	200	2,90	0,65		200	24,91	13,46
	40	63,74	10,95		40	97,73	4,95
	8	73,61	7,25		15,6*	96,91	10,27
	4*	85,83	7,02		8	96,72	3,80
3e	1000	4,09	0,91	SDS	2,5	1,73	1,22
	200	5,16	0,85		0,5	1,21	1,68
	40	46,77	5,28		0,1	2,48	1,11
	8*	70,03	3,43		0,02	69,35	4,28
	1,6	92,63	8,12		0,004	87,75	8,51

Legenda: SDS -dodecilssulfato de sódio; Subst.= substância.; *valor próximo à concentração inibitória mínima (CIM).

No ensaio de fagocitose com macrófagos murinos foi verificado que as substâncias **3b**, **4c** e **4e** em concentração sub-inibitória foram capazes de alterar significativamente o índice fagocítico aumentando o índice em relação ao controle

(Figura 19). Contudo, observamos que na concentração igual à CIM não houve elevação da taxa de fagocitose pelos macrófagos murinos tratados com **3b** e **4e**. As substâncias **3e** e a tiosemicarbazona do lapachol apresentaram, nas duas concentrações testadas (CIM e sub-CIM), níveis de fagocitose semelhantes ao grupo controle. Observamos também, a redução do índice fagocítico nos tratamentos com **3b** na concentração igual à CIM e **3e** na concentração sub-inibitória.

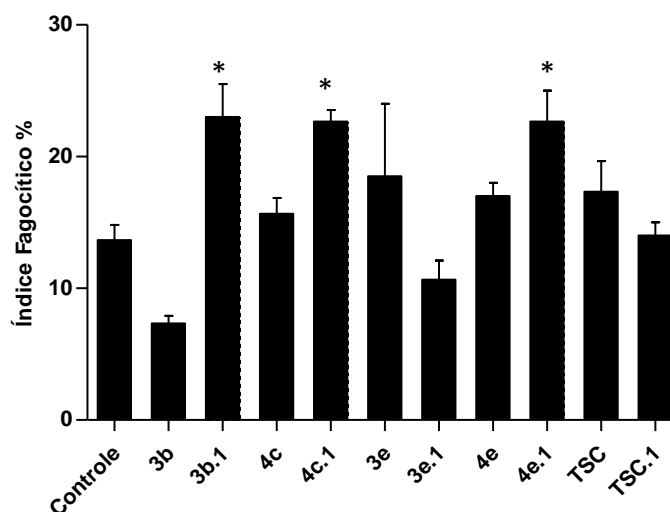


FIGURA 19. Índice fagocítico de macrófagos murinos tratados com as substâncias **3b**, **4c**, **3e**, **4e** e a tiosemicarbazona do lapachol (TSC) nas concentrações igual à CIM e sub-inibitória frente ao isolado Pb18 de *Paracoccidioides brasiliensis*. Teste de comparação múltipla Newman-Keuls, $p < 0.05$. Legenda: **3b**= 7,8 $\mu\text{g/ml}$; **3b.1**= 3,9 $\mu\text{g/ml}$; **4c**= 3,9 $\mu\text{g/ml}$; **4c.1**= 1,95 $\mu\text{g/ml}$; **3e**= 7,8 $\mu\text{g/ml}$; **3e.1**= 3,9 $\mu\text{g/ml}$; **4e**= 7,8 $\mu\text{g/ml}$; **4e.1**= 3,9 $\mu\text{g/ml}$; TSC= 15,6 $\mu\text{g/ml}$; TSC.1= 7,8 $\mu\text{g/ml}$. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

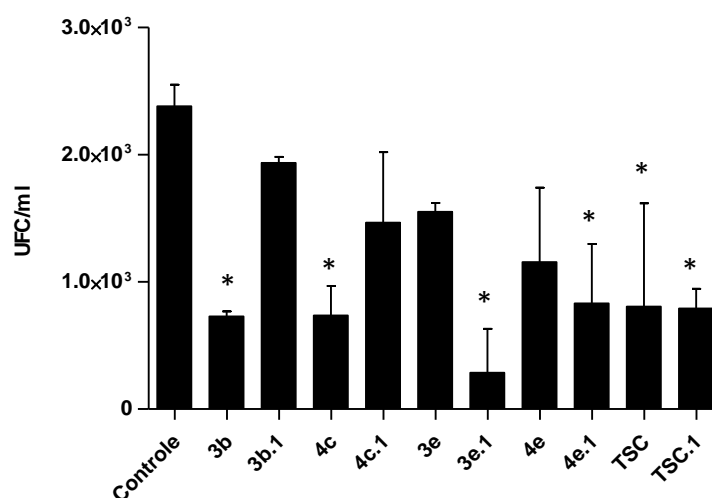


FIGURA 20. Atividade fungicida de macrófagos murinos tratados com as substâncias **3b**, **4c**, **3e**, **4e** e a tiosemicarbazona do lapachol (TSC) nas concentrações igual à CIM e

sub-inibitória frente ao isolado Pb18 de *Paracoccidioides brasiliensis*. Teste de comparação múltipla Newman-Keuls, $p < 0.05$. Legenda: **3b**= 7,8 $\mu\text{g/ml}$; **3b.1**= 3,9 $\mu\text{g/ml}$; **4c**= 3,9 $\mu\text{g/ml}$; **4c.1**= 1,95 $\mu\text{g/ml}$; **3e**= 7,8 $\mu\text{g/ml}$; **3e.1**= 3,9 $\mu\text{g/ml}$; **4e**= 7,8 $\mu\text{g/ml}$; **4e.1**= 3,9 $\mu\text{g/ml}$; TSC= 15,6 $\mu\text{g/ml}$; TSC.1= 7,8 $\mu\text{g/ml}$. * $p < 0,05$.

Pelo teste de comparação múltipla Neuman-keuls com nível de significância menor que 0.05, todas as substâncias induziram aumento da atividade fungicida dos macrófagos em relação ao controle (Figura 20) em pelo menos uma das concentrações testadas. Contudo, comparando a eficiência das concentrações testadas, apenas a substância **3e** obteve melhor atividade fungicida na concentração sub-inibitória que na concentração igual ao CIM.

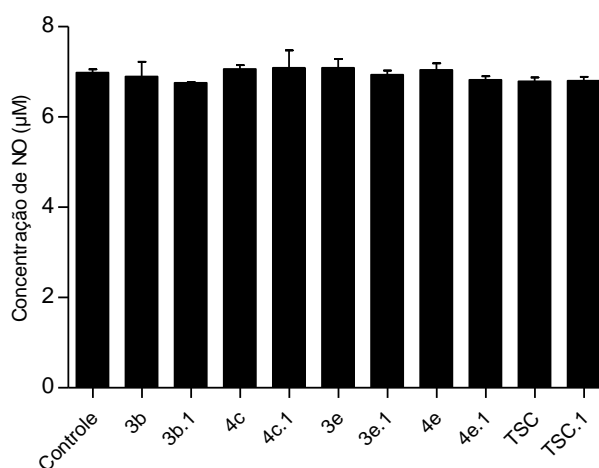


FIGURA 21. Concentração de óxido nítrico (NO) em sobrenadante da cultura de macrófagos murinos tratados com as substâncias **3b**, **4c**, **3e**, **4e** e a tiosemicarbazona do lapachol (TSC) nas concentrações igual à CIM e sub-inibitória frente ao isolado Pb18 de *Paracoccidioides brasiliensis*. Teste de comparação múltipla Newman-Keuls, $p < 0.05$. Legenda: **3b**= 7,8 $\mu\text{g/ml}$; **3b.1**= 3,9 $\mu\text{g/ml}$; **4c**= 3,9 $\mu\text{g/ml}$; **4c.1**= 1,95 $\mu\text{g/ml}$; **3e**= 7,8 $\mu\text{g/ml}$; **3e.1**= 3,9 $\mu\text{g/ml}$; **4e**= 7,8 $\mu\text{g/ml}$; **4e.1**= 3,9 $\mu\text{g/ml}$; TSC= 15,6 $\mu\text{g/ml}$; TSC.1= 7,8 $\mu\text{g/ml}$.

Com o objetivo de se observar se as substâncias testes induziam a produção de óxido nítrico (NO) pelo macrófago, aumentando sua capacidade fungicida, foi feito o ensaio de dosagem NO no sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais previamente tratados com as substâncias experimentais. Contudo, não observamos diferença significativa na produção de óxido nítrico entre o controle e os grupos tratados com as substâncias experimentais, logo, nas condições avaliadas em um período de 2h as substâncias não induziram a produção de NO pelos macrófagos (Figura 21).

6.5. Atividade antifúngica *in vivo*

Para avaliação da atividade antifúngica em modelo animal utilizamos apenas as substâncias **4c** e **4e**, pois estas apresentaram melhor solubilidade em PBS e puderam ser administradas por via intraperitoneal.

No ensaio prévio para análise de toxicidade substâncias **4c** e **4e** na dose de 5mg/kg/dia em camundongos BALB/c machos, a análise histológica não revelou alterações no pulmão, fígado e baço de camundongos não-infectados, quando o tratamento foi administrado por 15 dias com doses diárias de 5 mg/kg/dia (Figura 22). Descartada a possibilidade de alterações histológicas mediante a ação das substâncias experimentais, sob as condições testadas, o ensaio *in vivo* prosseguiu utilizando as mesmas condições.

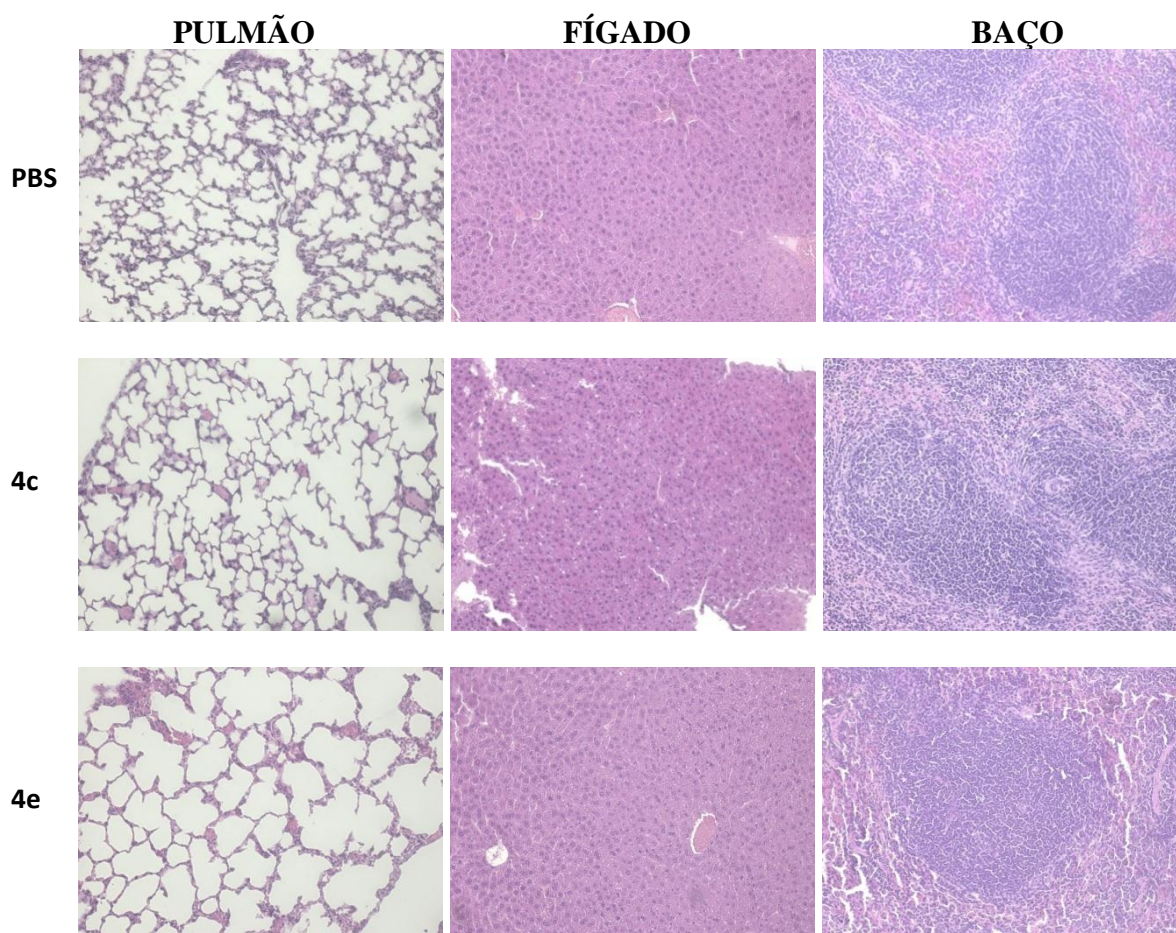


FIGURA 22. Histologia do pulmão, fígado e baço de camundongos BALB/c para avaliação da toxicidade das substâncias **4c** e **4e**. Os grupos de animais receberam volumes diários de 200 µl das substâncias **4c** e **4e** com dose igual a 5mg/kg/dia, via intraperitoneal, por 15 dias. O grupo controle recebeu apenas PBS em condições iguais

de tratamento. Os órgãos analisados não apresentaram alterações histológicas significativas que pudessem ser remetidas a ação das substâncias experimentais. Coloração hematoxilina-eosina, 20X. N=5.

No presente trabalho o desenvolvimento da PCM murina e a eficácia dos tratamentos foram avaliados a partir da extração do pulmão, do fígado e do baço para recuperação de unidades formadoras de colônias (UFC), análise histológica e dosagem de citocinas. Como controle foi utilizado um grupo de animais que não receberam tratamento e um grupo tratado com itraconazol. As substâncias testes e o itraconazol foram testados na concentração de 5mg/kg/dia.

A recuperação de UFC somente foi alcançada a partir do pulmão, dos demais órgãos não foram recuperadas células viáveis de *P. brasiliensis*. Pela contagem de colônias foi observado que os três grupos de animais tratados (itraconazol, **4c** e **4e**) foram capazes de promover melhor redução do número de UFC em comparação com o controle (grupo infectado sem tratamento), apresentando $p < 0,05$ pelo teste de comparação múltipla Newman-Keuls. Apesar de serem observadas diferenças de UFC entre os três tratamentos, esta não foi estatisticamente significativa entre os três tratamentos oferecidos aos animais (Figura 23).

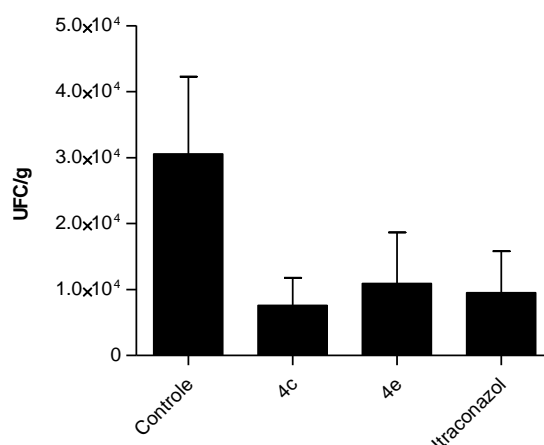


FIGURA 23. Quantidade de UFC/g de pulmão de camundongos BALB/c machos infectados com o isolado Pb18 de *Paracoccidioides brasiliensis*. Os grupos de camundongos foram tratados por 15 dias com volumes diários de 200 µl na dose de 5mg/kg/dia, em condições iguais para os três tratamentos oferecidos. Teste de comparação múltipla Newman-Keuls, $p < 0,05$. N=5.

Para análise histológica do pulmão, fígado e baço foram preparadas lâminas coradas com hematoxilina-eosina (HE) para observação de alterações patológicas e coloração Gomori-Grocott para verificação da presença das leveduras de *P. brasiliensis* nos tecidos. A coloração de Gomori-grocott revelou a presença de leveduras no fígado e pulmão em todos os grupos experimentais (Figura 24). Entretanto, no baço não observamos células típicas de *P. brasiliensis*.

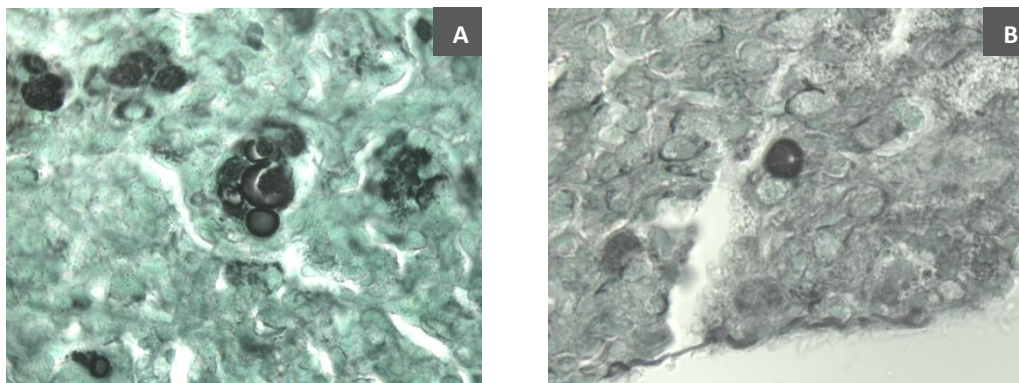


FIGURA 24. Coloração Gomori-grocott. Pulmão e fígado de animais do grupo controle. a) pulmão com acúmulo de infiltrado inflamatório (verde) e presença de leveduras (marrom); b) Fígado com presença de levedura de *P. brasiliensis*; 100X.

A análise histológica do pulmão corado com HE revelou um quadro de pneumonia multifocal com acúmulo de infiltrado inflamatório e início de fibrose pulmonar nos animais infectados que não receberam tratamento, caracterizando um quadro infeccioso causado pela paracoccidiodomicose (Figura 26a). O grupo tratado com a substância **4c** se destacou apresentando maior parte do parênquima preservado e poucas áreas com infiltrado inflamatório (Figura 26g), enquanto que os grupos tratados com a substância **4e** apresentaram excesso de infiltrado e acúmulo de granulomas (Figura 16j). O grupo de animais que recebeu tratamento com o itraconazol apresentou pulmão com acúmulo de infiltrado inflamatório e alguns granulomas (Figura 26d).

Quanto às lâminas de fígado coradas com HE, os animais tratados com itraconazol e **4c** não apresentaram alterações morfológicas visíveis (Figura 26e, h). Enquanto o grupo tratado com **4e** apresentou extensas áreas de microesteatose e degeneração hidrópica semelhante aos animais não tratados (Figura 26k, b). A análise do baço não revelou alterações histopatológicas assim como a ausência de leveduras no ensaio de recuperação de UFC (Figura 26c, f, i, l).

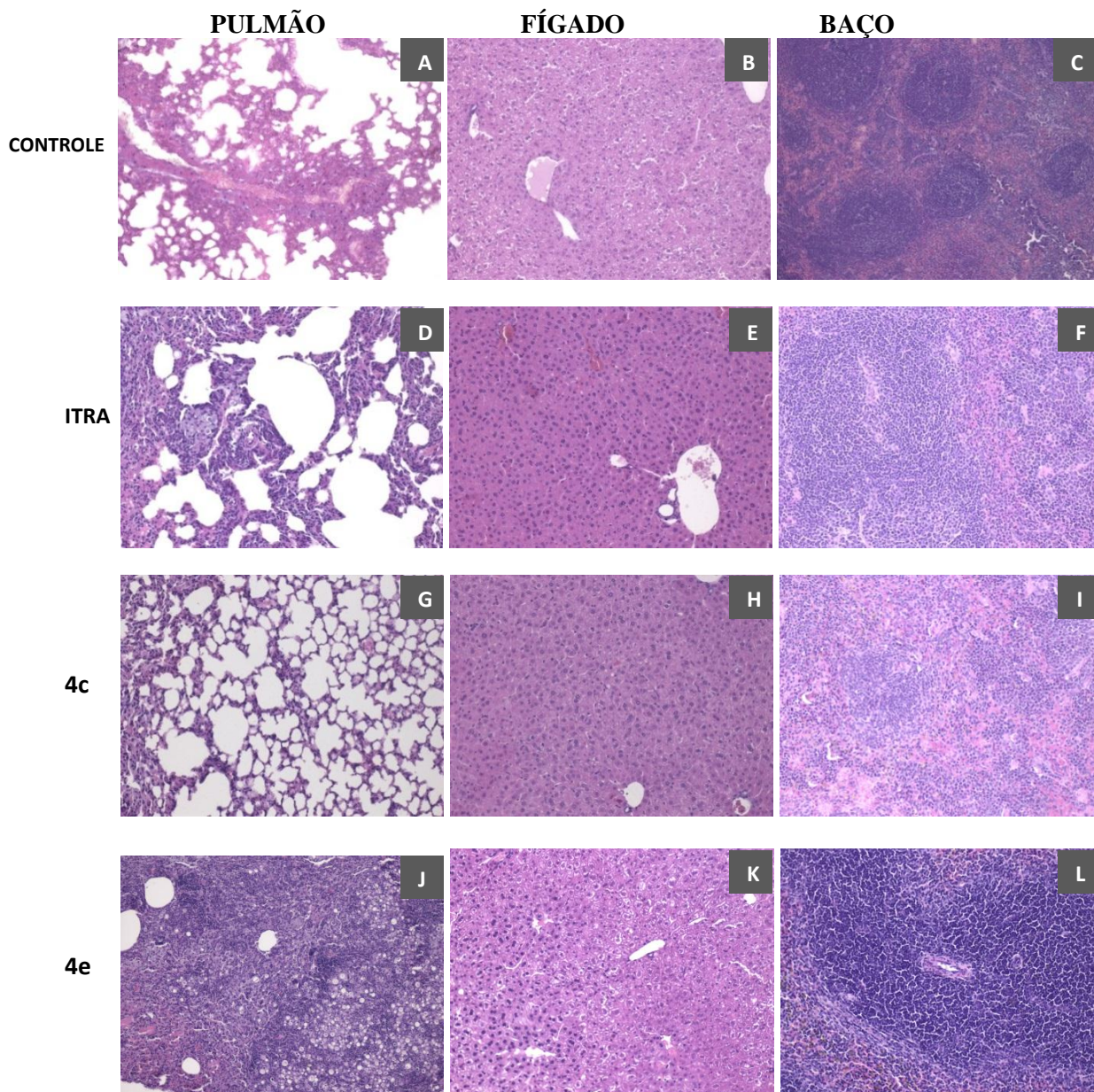


FIGURA 25. Histopatologia do pulmão, fígado e baço de camundongos BALB/c infectados com o isolado Pb18 de *Paracoccidioides brasiliensis*, tratados com as substâncias **4c** e **4e** e com o itraconazol (ITRA). Os grupos de animais receberam tratamento por 15 dias com as substâncias **4c** e **4e** e com itraconazol, na dose de 5mg/kg/dia, via intraperitoneal. A) Pulmão com excesso de infiltrado inflamatório no parênquima e início de fibrose pulmonar; B) fígado com degeneração hidrópica; C) Baço sem alterações visíveis; D) Pulmão com inflamação focal; E) Fígado normal; F) Baço normal; G) Pulmão com parênquima preservado e áreas de inflamação branda; H) Fígado normal; I) Baço normal; J) Pulmão com inflamação intensa e excesso de granulomas; K) Fígado com degeneração hidrópica; L) Baço normal. Coloração hematoxilina-eosina, 20X.

A partir das lâminas coradas com HE foi realizada uma avaliação patológica do pulmão e do fígado desses animais seguindo os parâmetros apresentados na tabela a seguir:

TABELA 9.

Parâmetros da avaliação histopatológica do pulmão e fígado de camundongos BALB/c com paracoccidioidomicose.

Parâmetros de avaliação histopatológica	
Fígado	Pulmão
Hiperemia	Hiperemia
Infiltrado periportal	Infiltrado perivascular
Infiltrado lobular	Infiltrado lobular
Esteatose	Fibrose
Apoptose	Necrose
Necrose	
Degeneração Hidrópica	
Pontuação	
Inexistente	0
Leve	1
Moderado	2
Acentuado	3
Grave	4

A partir da observação das características citadas na tabela 9 nas lâminas de pulmão e fígado, dos grupos experimentais, e do somatório dos valores obtidos foi desenvolvido um escore do processo inflamatório em cada grupo e este pode ser observado na figura 25. Não foi realizada análise do baço, uma vez que ele não apresentou alterações histopatológicas visíveis. Os valores obtidos foram analisados segundo o teste de comparação múltipla Newman-Keuls, sendo que as diferenças foram consideradas significativas quando encontrado $p < 0,05$.

A análise do fígado revelou maior controle do processo inflamatório nos grupos de animais tratados com itraconazol e com a substância **4c**, com valores do escore menores que no grupo controle, apresentando diferenças significativas em relação aos animais não-tratados. Quanto ao pulmão apenas o grupo tratado com **4c** apresentou menor valor atribuído no escore patológico com diferenças significativas no quadro inflamatório em relação aos animais controle. Já o grupo tratado com **4e** apresentou comprometimento do fígado e pulmão semelhante ao observado no grupo controle, não havendo diferença significativa entre os valores do escore.

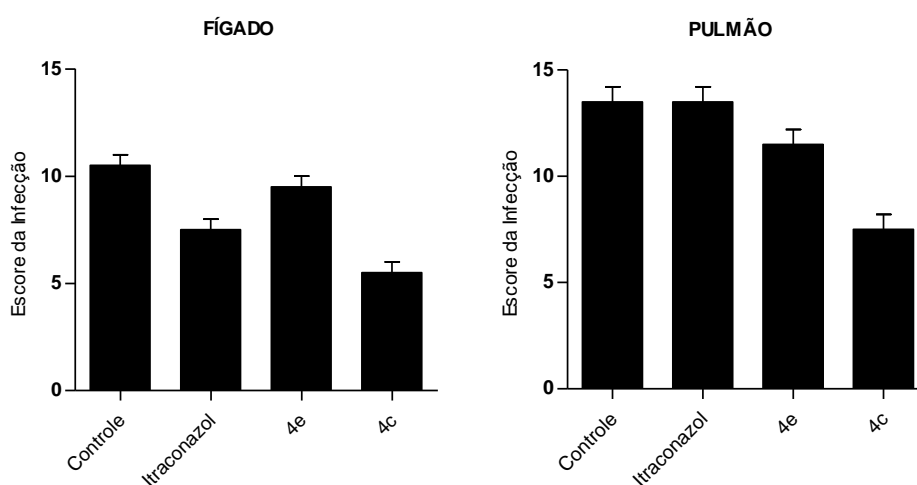


FIGURA 26. Escore do processo inflamatório decorrente da infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) no fígado e pulmão de camundongos BALB/c tratados com as substâncias **4c** e **4e** e com o itraconazol. Teste de comparação múltipla Newman-Keuls, $p < 0,05$. $N = 3$.

A dosagem de citocinas foi realizada apenas no pulmão dos animais integrantes dos grupos experimentais, uma vez que grande parte das alterações histopatológicas e também a recuperação de UFC foram mais evidentes nesse órgão. Não houve diferença estatisticamente significativa na dosagem das citocinas pró-inflamatórias INF- γ e IL-12 entre os tratamentos com as substâncias 4c e 4e e o grupo de animais tratados com itraconazol. Contudo, nos três tratamentos administrados observamos uma elevação significativa da produção de INF- γ e IL-12, semelhante ao grupo de animais não-infectados que receberam apenas PBS por via intraperitoneal (PBS), quando

comparados ao grupo de animais infectados (controle) que não receberam tratamento (Figuras 27 e 28).

Em relação à citocina anti-inflamatória IL-10, apenas o grupo controle com animais infectados apresentaram maior dosagem dessa citocina no pulmão quando comparado aos demais grupos experimentais. Os grupos tratados e o grupo PBS não foram significativamente diferentes entre si (Figura 29).

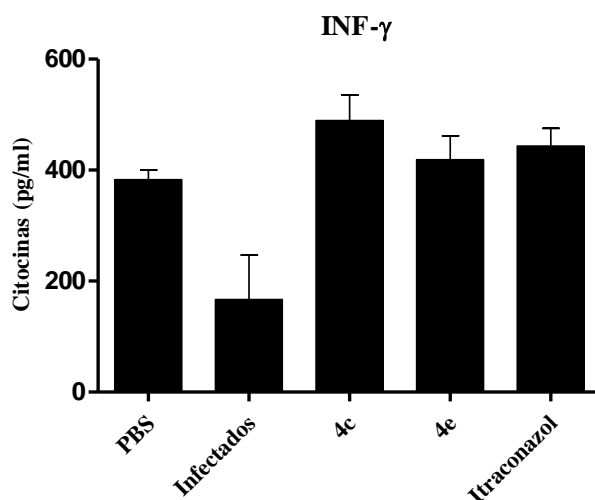


FIGURA 27. Concentração da citocina pró-inflamatória INF- γ no pulmão de camundongos BALB/c tratados com as substâncias **4c** e **4e**, e com itraconazol. Teste de comparação múltipla Neuman-keuls, $p < 0,05$.

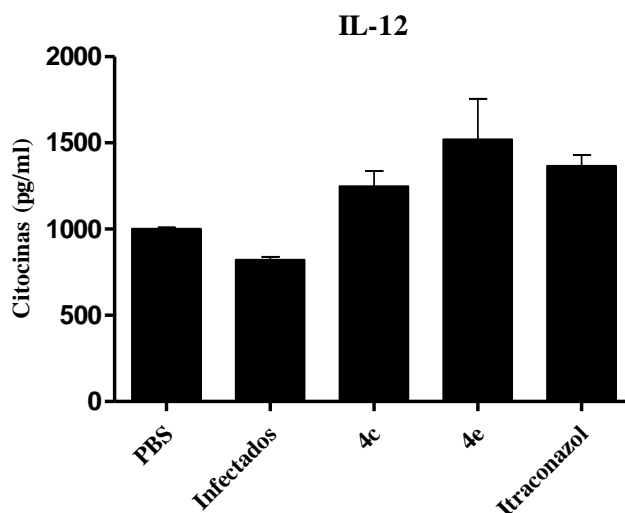


FIGURA 28. Concentração da citocina pró-inflamatória IL-12 no pulmão de camundongos BALB/c tratados com as substâncias **4c** e **4e**, e com itraconazol. Teste de comparação múltipla Neuman-keuls, $p < 0,05$.

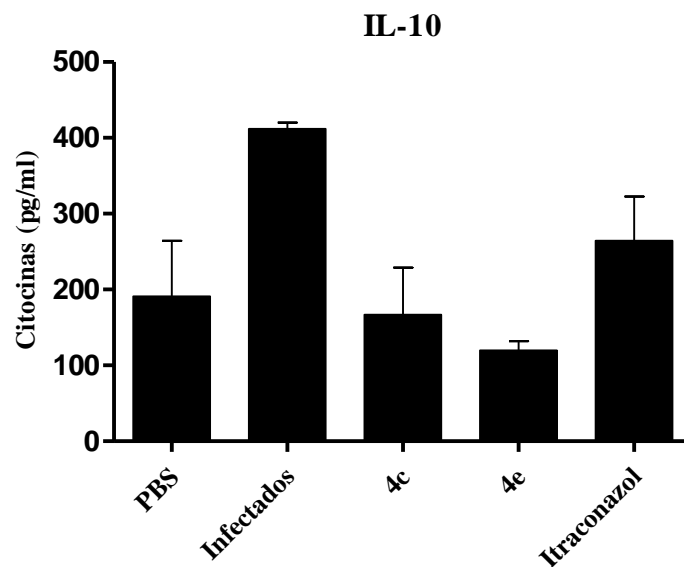


FIGURA 29. Concentração da citocina anti-inflamatória IL-10 no pulmão de camundongos BALB/c tratados com as substâncias **4c** e **4e**, e com itraconazol. Teste de comparação múltipla Neuman-keuls, $p < 0,05$.

O presente trabalho teve como objetivo à busca por novas opções terapêuticas contra a PCM. O estudo das substâncias derivadas de chalconas **3b**, **4c**, **3e** e **4e** e da tiosemicarbazona do lapachol mostrou que estas substâncias são capazes de inibir e matar o fungo em testes *in vitro*. Esta atividade é ampla dentro do gênero *Paracoccidioides*, uma vez que os diferentes isolados representantes das espécies filogenéticas foram igualmente suscetíveis à ação das substâncias. Esses resultados corroboram com estudos que mencionam a atividade biológica de substâncias provenientes de chalconas e também do lapachol (Dhar, 1981; Araujo et al., 2002).

Comparando a atividade antifúngica *in vitro* das substâncias derivadas de chalconas e da tiosemicarbazona do lapachol com as drogas utilizadas como controle, observamos que o itraconazol foi mais ativo que as substâncias experimentais, mas o SMZ-TMP apresentou uma concentração inibitória mais elevada que as substâncias do presente trabalho. Essa atividade é interessante por ser uma atividade intermediária às duas drogas utilizadas no tratamento da PCM, sendo que a mais utilizada pelo SUS (Sistema único de saúde) é a sulfametoxazol-trimetoprima (Shikanai-Yasuda et al., 2006).

A atividade antifúngica das substâncias experimentais também foi verificada na curva de tempo de morte, que mostra a cinética de crescimento e a ação dessas substâncias, as quais principalmente após cem horas de tratamento reduziram a viabilidade celular em cerca de 70%. No trabalho de Takahagi-Nakaira et al. (2009) o teste de tempo de morte de células do isolado Pb18 devido à anfotericina B, na concentração fungicida, mostrou que no período de 100 horas todas as células estavam mortas, entretanto, o resultado foi baseado no número de UFC recuperadas, enquanto que no presente trabalho avaliamos a diferença de absorbância comparada ao controle de crescimento.

No estudo de Tavares et al. (2011) as substâncias derivadas de chalconas **3b**, **4c**, **3e** e **4e** foram descritas juntamente com outras chalconas com radicais diferentes em sua estrutura, sendo que a substância **3b** tem um substituinte metila, **3e** apresenta como substituinte um átomo de flúor, a **4c** tem um substituinte metoxila) e a **4e** é uma n-

óxido chalcona com um flúor como substituinte . Estes autores observaram que a adição de radicais como flúor e metoxila foram capazes de melhorar a atividade antifúngica destas moléculas, contra diferentes isolados de *Paracoccidioides* sp.. Nos ensaios de CIM realizados por estes autores utilizando o meio RPMI a atividade das chalconas também foi melhor que a do SMZ-TMP contra *Paracoccidioides* sp., mas os valores diferem sutilmente dos valores observados no presente trabalho. Em outros trabalhos citados na literatura a CIM também tem sido relatada com valores diferentes de acordo com o meio de cultura utilizado. Sabatelli et al. (2006) relatou valores de CIM para o itraconazol de 0,16 a 0,63 µg/ml em meio RPMI em ensaios *in vitro* com *Paracoccidioides* sp.. Hahn e Handam (2000) apresentaram valores de CIM para o itraconazol, em meio MMcM, de 0,0009 até 0,5 µg/ml utilizando a técnica de macrodiluição descrita por Shadomy (1987), enquanto no presente trabalho observamos um valor médio de CIM de 0,004 a 0,125 µg/ml para cinco isolados. Nós optamos pela utilização do meio de cultura MMcM em todos os experimentos realizados, uma vez que este foi descrito por Restrepo & Jiménez (1980) como um meio quimicamente definido ideal para o crescimento de leveduras do gênero *Paracoccidioides*.

No trabalho de Souza et al. (2012) foi relatado que a atividade do lapachol contra o isolado Pb18 de *P. brasiliensis* foi de 0,13 µmol/mL (31,2 µg/mL) enquanto que com o acréscimo da tiosemicarbazona, originando a tiosemicarbazona do lapachol, a CIM passou para 0,04 µmol/mL (13,8 µg/mL). As tiosemicarbazonas são conhecidas também por sua atividade farmacológica, tais como antitumoral, antibacteriana, antiviral, antiprotozoária, citotóxica (Tenório et al., 2005).

Nos ensaios de interação entre drogas foi verificado que na combinação de **4c** e itraconazol, especificamente, na concentração de 0,97 e 0,0072 µg/ml, respectivamente, apresentou interação sinérgica *in vitro* contra o isolado Pb18 de *Paracoccidioides* sp.. Nas outras concentrações testadas os valores de CIFI obtidos foram reconhecidos como um possível efeito aditivo ou com ação indiferente à combinação (Cuenca-Estrella, 2004). Dessa forma, a interação é dependente da concentração destas substâncias podendo variar de indiferente a sinergismo. Este tipo de interação é importante, pois pode levar ao desenvolvimento de uma nova terapia combinada que utilize menor concentração do itraconazol em menor tempo de tratamento, o que reduziria os efeitos colaterais dos pacientes, uma vez que o itraconazol interage com o citocromo P-450, o que pode acarretar alterações nas enzimas hepáticas e a inibição do sistema enzimático

dos mamíferos, tais como os envolvidos com a síntese dos hormônios esteróides e prostaglandinas, que são dependentes deste citocromo (Pierad et al., 2000; Meinerz et al., 2007).

No ensaio de interação entre drogas no presente trabalho foi utilizado o método baseado na determinação da concentração inibitória mínima (Cuenca-estrella, 2004) e consideramos os valores do índice da concentração inibitória fracional para determinar o tipo de interação existente. Contudo, as definições de ausência de interação e de efeito aditivo ainda são confusas, uma vez que a ausência de interação é definida como nenhuma interação significativa entre os agentes antimicrobianos testados, mas definições, tais como aditivo, sub-aditivo e indiferente ainda são usadas (Grecco et al., 1995).

Neste trabalho realizamos o ensaio utilizando o protetor osmótico sorbitol, que considera o aumento da CIM como indício de atividade na parede celular. O sorbitol atua como protetor osmótico estabilizando a parede celular, com isso, é possível reverter a atividade do antifúngico em meio de cultura contendo sorbitol, uma vez que ele dificulta a ação sobre a parede celular resultando no aumento do valor da CIM (Frost et al., 1995). No presente estudo não houve diferença no valor de CIM na presença e ausência do sorbitol para todas as substâncias testadas. Portanto, provavelmente, o mecanismo de ação das substâncias testadas não se encontra na parede celular do fungo *Paracoccidioides*.

Em conformidade com os resultados expostos em nosso trabalho, Tavares et al. (2011) também não encontraram atividade na parede celular do *Paracoccidioides* sp, utilizando o estudo com protetor osmótico, para as substâncias **3b**, **4c**, **3e** e **4e**, em meio RPMI, assim como para as outras substâncias derivadas de chalconas. Souza et al. (2012) também observou que não havia alteração da CIM da tiosemicarbazona do lapachol na presença do sorbitol.

Com a finalidade de se observar os possíveis alvos de ação das substâncias testadas foram realizados estudos de microscopia eletrônica de varredura e transmissão de leveduras de *P. brasiliensis* (Pb 18) tratadas com as substâncias experimentais. Nestes estudos a substância **3b** provocou alteração na organização das organelas citoplasmáticas com a formação de vacúolos digestivos e retração da membrana plasmática, a qual permaneceu intacta, enquanto na superfície essas alterações eram

refletidas na morfologia celular alterada e depressões na superfície celular. Essas características se assemelham com o observado em células de mamíferos por MET, a qual é considerada confiável para confirmar a apoptose, devido à exposição de características ultraestruturais irrefutáveis de apoptose, tais como a marginalização do núcleo elétron-denso na fase inicial, fragmentação nuclear, membrana celular intacta mesmo durante a fase de desintegração da célula, desorganização das organelas citoplasmáticas, vacúolos claros e formação de bolhas na superfície da célula (White et al., 2004).

As leveduras tratadas com **4c** apresentaram muitos vacúolos de baixa eletrondensidade e desorganização do citoplasma com uma leve retração da membrana celular, alteração da morfologia externa, descamamento do envelope celular e ruptura da célula. Além do rompimento celular Madeo et al. (1999) atribui o aumento do número de vacúolos intracelulares a danos por necrose, observados na levedura *Candida albicans*.

Nós observamos que a ação da substância **3e** induziu a destruição da membrana celular e desorganização citoplasmática somada a murchamento e comprometimento do envelope celular. As substâncias **4e** e tiosemicarbazona do lapachol culminaram no murchamento e rompimento das células com extravasamento do citoplasma, mas a **4e** provocou distúrbios em parte da membrana plasmática, desorganização citoplasmática e alteração na morfologia. Enquanto a tiosemicarbazona do lapachol levou ao acúmulo de grânulos eletrondensos no citoplasma. Estas características se assemelham ao relatado na literatura acerca de células de mamíferos em processo de necrose, as quais apresentam alterações morfológicas de formação de vacúolos citoplasmáticos, desorganização das organelas com retículo endoplasmático distendido, formação de bolhas no citoplasma, ruptura das mitocôndrias, desagregação dos ribossomos, rompimento dos lisossomos e ruptura da membrana celular (Kerr et al., 1972; Majno et al., 1995).

Essas observações coincidem com o trabalho de Santos et al. (2007), no qual a ação da oenoteína B provocou depressões na superfície celular do *Paracoccidioides*, desorganização citoplasmática, ruptura do envoltório, extravasamento do citoplasma e a formação de grande vacúolos de baixa eletrondensidade. A formação desse tipo de

vacúolo tem sido associada ao fluxo de água a partir do ambiente extracelular que pode elevar a pressão no interior da célula ocasionando ruptura celular (Nakai et al., 2005).

A formação de depressões na superfície celular sem o rompimento do envelope é associada ao processo de morte celular por apoptose (Granot et al., 2003), sendo assim, é possível que a substância **3b** interfira desencadeando a morte da levedura por apoptose. Nesse processo a célula tende a se retrair, enrugar e apresentar menor tamanho (Kerr et al., 1972).

A morte celular por apoptose ocorre naturalmente em organismos multicelulares durante o desenvolvimento, para a eliminação de células danificadas, em resposta a agentes infecciosos, tanto quanto em respostas adaptativas a estresse biótico e abiótico (Sharon, 2009). No entanto um processo alternativo a apoptose é a necrose, considerado um processo tóxico e degradante de morte celular (Majno et al., 1995) e dependendo de fatores tais como a intensidade e duração do estímulo esses dois processos podem ocorrer simultaneamente (Zeiss et al., 2003). Contudo, a necrose é um processo passivo e descontrolado, sendo principalmente mediada pela interferência no suprimento de energia da célula e danos diretos à membrana celular, enquanto a apoptose é controlada e dependente de energia (Elmore et al., 2007).

A partir destas observações realizamos ensaios com os marcadores de morte celular iodeto de propídeo (PI), capaz de penetrar em células que estejam com a membrana significativamente danificada e, então, ele se liga ao DNA, e o DAPI, capaz de penetrar as membranas das células apoptóticas e corar a cromatina condensada (Yang et al., 2006).

No controle observamos que mais de 70% das leveduras se coraram com DAPI, o que tem sido relatado na literatura, uma vez que o método de marcação com o DAPI é considerado subjetivo fornecendo apenas indícios de um provável processo apoptótico, pois não há uma diferenciação entre as células normais que estejam em fase de divisão celular, na prófase na qual os núcleos se encontram condensados e portanto se coram por DAPI, e as células apoptóticas (Yang et al., 2006).

Nas células tratadas com a substância **3b** uma maior porcentagem de leveduras apresentou condensação da cromatina indicadas pela coloração positiva com o DAPI, o que sugere a possibilidade destas estarem em processo de apoptose. Além disso, por

microscopia eletrônica observamos que as células estavam murchas, com o citoplasma retraído contendo apenas vacúolos digestivos e membrana celular íntegra, o que reforça o indício de um processo apoptótico nessas células, mesmo havendo algumas células mortas evidenciadas pelo PI.

No tratamento com a substância **4c** observamos que 40% das leveduras apresentaram IP positivo e por microscopia eletrônica observamos que algumas células estavam rompidas, o que fornece indícios da ocorrência de necrose. No entanto, 70 % das leveduras foram coradas pelo DAPI. É possível que isto se deva ao fato de na microscopia as células foram tratadas por 15 dias, sendo possível que uma fase mais tardia de apoptose culmine no rompimento celular observado (Ludovico et al., 2005), mas em 5 dias a maioria das células ainda apresentava apenas a condensação da cromatina sugerindo um processo apoptótico. Em relação ao tratamento com a substância **4e** o resultado foi semelhante, no qual 95% das células apresentaram cromatina condensada, contudo na microscopia eletrônica muitas células estavam murchas e outras estouradas. Nas leveduras tratadas com **3e** observamos uma baixa porcentagem de células coradas com DAPI (30%) e IP (6%). Ludovico et al. (2005) relatam que nas leveduras, os corpos apoptóticos e fragmentos celulares sofrem ruptura, o que pode causar problemas na caracterização da apoptose em leveduras, pois marcadores de necrose, tais como a desintegração da membrana celular se sobrepõe aos marcadores típicos de apoptose. Além disso, o curso do processo apoptótico exibe diferentes características, as quais têm sido descritas como fases distintas, sendo que numa fase tardia a apoptose culmina na ruptura da célula assim como ocorre no processo de necrose (Elmore et al., 2007). Já no tratamento com a tiosemicarbazona do lapachol (TSC) a porcentagem de células coradas com DAPI e PI foram semelhantes, mas na microscopia eletrônica observamos muitas células rompidas, reforçando que a morte pode ter sido por necrose.

No início da infecção pelo *Paracoccidioides* sp. o contato primário entre o fungo e o hospedeiro se faz por meio das células fagocíticas, que atuam como importante fator de defesa inata do organismo. Acredita-se que a capacidade do hospedeiro de resistência à infecção fúngica é determinada principalmente pela habilidade de restringir a infecção ao seu sítio primário, evitando assim a disseminação fúngica e o comprometimento de outros órgãos o que culmina em uma rápida resolução da doença (Cano et al., 1995).

No presente trabalho nós utilizamos macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem BALB/c para observar se as substâncias experimentais melhoravam a resposta fagocítica. Acredita-se que os macrófagos destes animais apresentam boa capacidade microbicida, capacidade de montar um granuloma epitelióide característico da ativação de células efectoras do tipo Th1 e produzem IFN- γ como citocina efetora, quando em situações de resistência (Brummer et al., 1984). Foi observado que as substâncias **3b**, **4c** e **4e** foram capazes de induzir a fagocitose e tiveram atividade fungicida significativa, contudo, essa atividade fungicida não foi associada ao aumento da produção de óxido nítrico nas condições testadas. Ainda é necessário examinar quais vias podem ter sido ativadas por estas substâncias. É possível que o tempo de incubação de 2 horas tenha sido curto para a quantificação de um aumento significativo na produção de NO pelos macrófagos, pois trabalhos têm demonstrado que a principal atividade microbicida dos macrófagos relaciona-se com a produção de NO e seus metabólitos (Missal et al., 2004). Tavares (2007) relatou que após 6 horas de incubação dos macrófagos murinos infectados com *Paracoccidioides* sp. foi possível observar o acúmulo de transcritos de genes relacionados à atividade pró-inflamatória e de fagocitose.

Outros agentes oxidantes também podem ser produzidos pelas células fagocíticas. A enzima NADPH oxidase que não é ativada em macrófagos em estado normal, quando fagocita determinados microrganismos e certos peptídeos inflamatórios é ativada a produzir O_2^- a partir da redução do oxigênio molecular. E a inatividade da NADPH oxidase tem sido associada a quadros de doença granulomatosa crônica em humanos, que leva a infecções bacterianas e fúngicas recorrentes (Heyworth et al., 1991). Sendo assim, testes para identificação de outras espécies reativas são importantes para o esclarecimento do aumento da atividade fungicida dos macrófagos quando tratados com as substâncias em estudo.

Em outros trabalhos a capacidade da anfotericina B em ativar macrófagos tem sido demonstrada, indicando um possível efeito desta droga diretamente na membrana plasmática do macrófago aumentando a capacidade de produção do ânion superóxido (Wilson et al., 1991). Alguns trabalhos também sugerem que a ação do antifúngico também pode ocorrer diretamente sobre o fungo fagocitado (Ponce et al., 1990). Em macrófagos humanos a anfotericina B foi capaz de ativar a produção de ânion superóxido (Wilson et al., 1991).

O estabelecimento do modelo experimental para o estudo da PCM permite boa correlação com a doença humana, esclarecendo melhor a interação parasita-hospedeiro e a ação de agentes terapêuticos no prognóstico da doença (Singer-Vermes, 1993). Os camundongos da linhagem BALB/c apresentam suscetibilidade intermediária ao *Paracoccidioides* sp. e por isso são amplamente utilizados como modelo experimental no estudo da PCM (Restrepo et al., 1992).

Em nosso trabalho utilizamos BALB/c machos para avaliação da atividade antifúngica *in vivo* das substâncias **4c** e **4e**. Apenas estas substâncias foram escolhidas porque apresentam maior solubilidade em PBS e com isso puderam ser administradas via intraperitoneal. Esta via tem sido utilizada em diversos trabalhos devido a sua fácil execução e boa reprodutibilidade (Maluf et al., 2008). Nós utilizamos três parâmetros para avaliar o desenvolvimento da PCM nesses animais, os quais foram análise histopatológica do tecido e observação de células típicas de *Paracoccidioides* sp., a recuperação de leveduras viáveis em meio de cultura e a análise de citocinas.

Para a infecção o isolado Pb18 de *Paracoccidioides* sp. teve sua virulência restabelecida por meio da passagem em camundongos BALB/c e foi capaz de em todos os testes realizados de estabelecer a infecção em modelo animal. A recuperação da virulência do fungo é importante, pois se sabe que ocorre a atenuação e perda de infectividade dos isolados durante anos de manutenção *in vitro* (Brummer et al., 1990; Singer-Vermes et al., 1989).

Nossos resultados mostraram que a infecção foi estabelecida com sucesso nos animais utilizados ao longo dos 30 dias de experimento, pois leveduras de *Paracoccidioides* sp. foram observadas, por meio da coloração de Gomori-Grocott, no pulmão e fígado desses animais, as quais coincidiram com distúrbios patológicos típicos de uma doença granulomatosa nesses órgãos. Contudo, durante o período analisado não houve disseminação da infecção para o baço, uma vez que não ocorreram alterações patológicas ou a presença de leveduras nesse órgão.

Nos animais tratados com a substância **4c** e **4e** ocorreu redução significativa do número de UFC recuperadas do pulmão em relação ao grupo controle que não recebeu tratamento. Em todos os grupos não foram recuperadas UFC do fígado e baço, porém, no fígado observamos a presença de leveduras em cortes histológicos. Esta atividade em

modelo animal não diferiu significativamente do grupo de animais tratados com o itraconazol, droga utilizada para o tratamento da PCM humana.

A partir da análise histopatológica e construção de um escore do progresso da doença nos camundongos, observamos que a substância **4c** alcançou um melhor controle da doença, contribuindo para a resolução do quadro de pneumonia, também visto nos animais do grupo controle e dos animais tratados com **4e** e itraconazol ao longo de 15 dias. Outros trabalhos na literatura apresentam um tempo de infecção e de tratamento maior, contudo, tem sido observado que após 10 semanas de infecção os animais são capazes de controlar a infecção, não sendo possível recuperar células viáveis em meio de cultura (Maluf et al., 2008).

Nossas observações acerca da substância **4c** se assemelham ao trabalho de Maluf et al. (2008) com o ajoeno comparado ao itraconazol, no qual o ajoeno apresentou melhor controle da infecção que o itraconazol ao longo de 10 semanas de tratamento. Entretanto, eles utilizaram a dose de 20mg/kg/dia em ambos os tratamentos, sendo o itraconazol administrado via intra-gástrica em polietilenoglicol, enquanto que em nosso trabalho observamos atividade semelhante ao itraconazol com apenas 5mg/kg/dia de **4c** e de itraconazol ao longo de 2 semanas.

No trabalho de Fernandes et al. (2011) foi testada a capacidade de imunização das proteínas recombinantes rPb40 e rPb27, das quais foram utilizadas 25µg de cada, em combinação com o fluconazol, na dose de 10 mg/kg/dia, no tratamento de camundongos BALB/c com a PCM. Estes autores não recuperaram UFC nos animais que receberam o tratamento em combinação com a imunização após 120 dias de tratamento, o que foi associado à eficiência da imunização com as proteínas recombinantes. E assim como no presente trabalho a capacidade promissora no tratamento da PCM foi considerada avaliando-se a capacidade de reduzir o número de UFC, melhorar o aspecto histopatológico do pulmão, fígado e baço e, também, de direcionar ou favorecer o desenvolvimento de uma resposta imune eficiente contra o *P. brasiliensis*.

Nós realizamos a avaliação da secreção de citocinas apenas em amostras de pulmão extraídos dos animais pertencentes aos grupos experimentais, uma vez que as principais alterações histopatológicas e a recuperação de UFC foram mais proeminentes neste órgão. A dosagem das citocinas pró-inflamatórias INF-γ e IL-12 e da citocinas

anti-inflamatória IL-10 mostrou um padrão predominante diferente de resposta inflamatória entre os animais que não receberam tratamento e os animais tratados com a substância **4c** e **4e** e itraconazol. Segundo a literatura, é conhecido que uma célula T precursora se diferencia originando linfócitos Th1 e Th2 por citocinas produzidas por células do sistema imune inato logo após a infecção (Romani, 2011). As citocinas secretadas pelos linfócitos Th1 são vitais para uma resposta imune celular efetiva contra fungos causadores de micose sistêmica, devido principalmente à secreção de INF- γ que ativa macrófagos conferindo a eles uma melhor atividade microbicida (Cano, 1998; Lavigne, 1998). A relação entre o padrão de citocinas e a resistência a infecção ocorre de forma similar na PCM humana e na infecção experimental (Bernard, 2001).

No presente trabalho observamos que os animais infectados do grupo controle tiveram maior produção da citocina anti-inflamatória IL-10, comparada ao INF- γ e IL-12, sugerindo que a infecção foi estabelecida nestes animais e na ausência de tratamento estes desenvolveram uma resposta imune mais voltada para o padrão Th2. Entretanto, os animais tratados com **4c**, **4e** e itraconazol apresentaram uma elevação da produção de INF- γ e IL-12, e uma baixa concentração de IL-10, quando comparados aos animais infectados do grupo controle. Esses achados sugerem que os tratamentos oferecidos auxiliaram no direcionamento de uma resposta imune mais eficaz, conferindo a estes animais uma maior resistência à infecção pelo *P. brasiliensis*. Contudo, não observamos, no período de infecção analisado, alguma diferença significativa entre os três tratamentos oferecidos, os quais também tiveram a dosagem de citocinas semelhante aos animais saudáveis do grupo que recebeu apenas PBS. Bernard et al. (2001) avaliaram a secreção de citocinas de pacientes com PCM na forma crônica e aguda e de indivíduos sadios sensibilizados para o fungo, os quais demonstravam uma produção substancial de INF- γ e IL-10, ao passo que pacientes na forma crônica e aguda apresentavam níveis baixos de INF- γ e elevado de IL-10. Em outro trabalho pesquisadores também confirmaram que pacientes com a PCM na forma crônica localizada tinham maior produção de INF- γ em relação às pacientes com doença crônica disseminada (Marques-Mello, 2002).

No trabalho de Marques et al. (2006) os testes com o peptídeo P10 em camundongos revelaram que após 90 dias de tratamento houve uma diminuição da produção de IL-10 e um aumento de INF- γ , em animais que foram imunizados e receberam tratamento com a droga sulfametoxazol-trimetoprima. No entanto, com apenas 30 dias de experimento eles não verificaram diferenças nos níveis de citocinas,

ao passo que em nosso trabalho verificamos alterações nos níveis de INF- γ , IL-12 e IL-10 ao final de trinta dias de experimento.

No trabalho de Thomaz et al. (2007) camundongos BALB/c foram infectados, via intratraqueal, e tratados até o 45º dia com ajoeno na dose de 10mg/kg/dia. Foi relatado que estes animais foram capazes de desenvolver uma resposta do tipo Th1, associada a níveis elevados de INF- γ e IL-12, quando comparados a animais infectados do grupo controle. Além disso, a eficácia do tratamento da PCM murina com o ajoeno foi associada a sua capacidade antifúngica, agindo diretamente sobre o fungo, e ao desenvolvimento de uma proteção pró-inflamatória (Thomaz et al., 2007).

Este trabalho forneceu informações importantes que podem contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da paracoccidiodomicose. Nós verificamos que:

- As substâncias **3b**, **4c**, **3e**, **4e** e a tiosemicarbazona do lapachol apresentaram atividade antifúngica *in vitro* contra diferentes isolados representantes das espécies filogenéticas do gênero *Paracoccidioides*;

- A substância **4c** apresentou interação sinérgica com o itraconazol contra o isolado Pb18 de *P. brasiliensis*;

- Todas as substâncias provocaram alterações morfológicas na célula do isolado Pb18 que em comparação com os marcadores de morte celular DAPI e iodeto de propídeo forneceram indícios de processos de apoptose, provocada pela substância **3b**, e necrose, observada nos tratamentos com **4c**, **3e**, **4e** e **TSC**, contudo testes específicos de apoptose ainda são necessários;

- As substâncias experimentais não provocaram danos diretos sobre a parede celular fúngica;

- As substâncias experimentais não apresentaram toxicidade sobre macrófagos murinos;

- As substâncias **3b**, **4c** e **4e** foram capazes de aumentar o índice fagocítico e a atividade fungicida de macrófagos murinos *in vitro*, contudo, esta atividade não foi associada ao aumento da produção de óxido nítrico;

- As substâncias **4c** e **4e** não apresentaram toxicidade direta sobre o pulmão, fígado e baço de camundongos BALB/c nos ensaios realizados;

- As substâncias **4c** e **4e** apresentaram atividade *in vivo* semelhante ao itraconazol na dose de 5 mg/kg/dia, demonstrada pela capacidade de reduzir o número de UFC recuperadas do pulmão;

- A substância **4c** apresentou características histopatológicas semelhantes ao itraconazol, observadas no pulmão, fígado e baço;

- A substância **4e** apresentou o pulmão e fígado mais comprometido pela infecção semelhante ao grupo controle que não recebeu tratamento;

- As substâncias **4c** e **4e** foram capazes de favorecer o desenvolvimento de uma resposta imune eficaz;

- Os resultados apresentados neste trabalho confirmaram o potencial antifúngico das substâncias **3b**, **4c**, **3e**, **4e** e da tiosemicarbazona do lapachol apresentando-as como possíveis candidatas a terapêutica da PCM.

Foi possível obter dados sobre a atividade *in vitro* e toxicidade em modelo murino sob as condições de concentração testadas. Em especial, a substância **4c**, deverá seguir com testes mais amplos em modelo murino, sendo ainda necessários estudos quantitativos dos processos de absorção, distribuição e biotransformação, a fim de delinear as condições adequadas para sua utilização, referentes à dose e via de administração.

Acreditamos ser importante o estudo *in vivo* das substâncias **3b**, **3e** e da tiosemicarbazona do lapachol, pois são substâncias que podem ser facilmente sintetizadas e apresentaram interessante atividade *in vitro*, mas que em razão do curto tempo deste trabalho não foi possível testá-las em modelo animal. Ainda são necessários estudos para delinear com mais clareza o mecanismo de ação das substâncias testadas neste trabalho, pois podem contribuir para a descoberta de novos alvos para o desenvolvimento de antifúngicos, além do teste contra outros microrganismos patogênicos, a fim de esclarecer a amplitude do espectro de ação destas substâncias.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade, RV; Silva, SP; Torres, FAG; Poças-Fonseca, MJ; Silva-Pereira, I; Maranhão, AQ; Campos, EG; Moraes, LMP; Jesuíno, RSA; Pereira, M; Soares, CMA; Walter, MEMT; Carvalho, MJA; Almeida, NF; Brígido, MM; Felipe, MSS. Overview And Perspectives On The transcriptome Of *Paracoccidioides brasiliensis*. Rev Iberoam Micol, 22: 203-212, 2005.

Almeida OP; Jacks JJR; Scully C. Paracoccidioidomycosis Of The Mouth: An Emerging Deep Mycosis. Crit Rev Oral Biol Med, 14(5):377–83, 2003.

Amaral, AC; Fernandes, L; Galdino, AS; Felipe, MS; Soares, CM; Pereira, M. Therapeutic targets in *Paracoccidioides brasiliensis*: post-transcriptome perspectives. Genet. mol. res.;4(2):430-449, 2005.

Araújo, EL; Alencar, JRB; Neto, RPJ. Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. Rev. Bras. Farmacogn., 12:57–59, 2002.

Bagagli, E. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. Infection, Genetics and Evolution, V. 6: p. 344-351, 2006.

Bagagli, E; Theodoro, RC; Bosco, SMG; McEwen, JG. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. Mycopathologia, 165:197–207, 2008.

Bergold, AM; Georgiadis, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. Visão Acad., v.5 p.159-172, 2004.

Bernard, G; Romano, CC; Cacere, CR; Juvenale, M; Mendes-Gianini, MJ; Duarte, AJ. Imbalance of IL-12, INF-gamma and secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. Cytokine, 13:248-252, 2001.

Bonacorsi1, C; Raddi, MSG; Carlos, IZ. Cytotoxicity of chlorhexidine digluconate to murine macrophages and its effect on hydrogen peroxide and nitric oxide induction. Braz J Med Biol Res, 37(2), 2004.

Borges-Walmsley, MI; Chen, D; Shu, X; Walmsley, AR. The Pathobiology Of *Paracoccidioides brasiliensis*. Trends In Microbiology, V.10 No.2, 2002.

Bossche, HV. Mechanisms of antifungal resistance. Rev Iberoam Micol, 14:44-49, 1997.

Brummer, E. Restrepo, A., Stevens, D. A., Azzi, R., Gomez, A. M., Hoyos, G. L., MC Evens, J. G., Cano, L. E. and Bedout, C. Murine model of Paracoccidioidomycosis. Production of faial acute pulmonary or chronic pulmonary and disseminated disease. Immunological and pathologica! observations. *J. Exp. Pathol.*, 7: 241-255, 1984.

Brummer, E; Restrepo, A; Hanson, LH; Stevens, DA. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*: the influence of *in vitro* passage and storage. *Mycopathologia*, 109:13-8, 1990.

Brummer E; Castañeda E; Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: na update. *Clin Microbiol Rev*, 6: 89-117, 1993.

Cano, LE; Kashiro, SS; Arruda, C; Andre, D; Xidieh, CF; Singer-Vermes, LM; Vaz, CA; Burguer, E; Calich, VL. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect. Immun*, 66:800-806, 1998.

Cano, LE; Singer-Vermes, LM; Vaz, CA; Russo, M; Calich, VL. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune reponse and specificisotype patterns. *Infect. Immun.*, v.63, p. 1777-1783, 1995.

Carrero, LI; Niño-Vega, G; Teixeira, MM; Carvalho, MJA; Soares, CMA; Pereira, M; Jesuino, RSA; Mcewen, JG; Mendoza, L; Taylor, JW; Felipe, MS; San-Blas, G. New *Paracoccidioides brasiliensis* Isolate Reveals Unexpected Genomic Variability In This Human Pathogen. *Fungal Genetics and Biology*, 45: 605–612, 2008.

Catalán, M; Montejo, JC. Antifúngicos sistêmicos. *Farmacodinamia Y Farmacocinética*. Ver Iberoam Micol, 23:39-49, 2006.

Clemons, KV; Feldman, D; Stevens, DA. Influence os estradiol on protein expression and methionine utilization during morphogenesis of *Paracoccidioides brasiliensis*. J. Gen. microbial., v. 135, p.1607-1617, 1989.

Costa, PF; Fernandes, GF;Santos, PO; Amaral, CC; Camargo, ZP. Characteristics of Environmental *Paracoccidioides brasiliensis* Isolates. Mycopathologia,169:37–46, 2010.

Coutinho, ZF; Silva, D; Lazéra, M; Petri, V; Oliveira, RM; Sabroza, PC; Wanke, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). Cad. Saúde pública, RJ, 18(5):1441-1454, 2002.

Cowen, LE.The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. Nature Reviews Microbiology, v.6, 2008.

Cruz, R.C; Werneck,SMC; Oliveira, CS; Santos, PC; Soares, BM; Santos, DA; Cisalpino, PS. Influence of Different Media, Incubation Times, and Temperatures for Determining the MICs of Seven Antifungal Agents against *Paracoccidioides brasiliensis* by Microdilution. Journal of Clinical Microbiology, Vol.51, n. 2, 2013.

Cuenca-Estrella, M. Combinations of antifungal agents in therapy – what value are they? Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 54, 854-869, 2004.

D'Arpa, P; Liu, LF. Topoisomerase-targeting antitumor drugs. Biochim. Biophys. Acta 989: 163-177, 1989.

Dhar, D.N. The Chemistry of Chalcones and Related Compounds, Wiley-Interscience; New York, 1981.

Di Santo, R. Natural products as antifungal agents against clinically relevant pathogens. Nat. Prod. Rep., 27, 1084–1098, 2010.

Elewski, BE.Mechanisms of action of systemic antifungal agents.Journal of the American Academy of Dermatology, 1993.

Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.*, 35(4): 495–516, 2007.

Felipe, MSS; Torres, FAG; Maranhão, AQ; Silva-Pereira, I; Poças-Fonseca, MJ; Campos, EG; Moraes, LMP; Arraes, FBM; Carvalho, MJA; Andrade, RV; Nicola, AM; Teixeira, MM; Jesuino, RSA; Pereira, M; Soares, CMA; Brígido, MM. Functional genome of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 45: 369–381, 2005.

Ferrari, M; Fornasiero, MC; Isetta, AM. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *Journal of Immunological Methods*, 131:165-172, 1990.

Fernandes, VC; Martins, EMN; Boeloni, JN; Coitinho, JB; Serakides, R; Goes, AM. The combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb40 and Pb27 recombinant proteins enhances chemotherapy effects in experimental paracoccidioidomycosis. *Microbes and Infection* 13:1062-1072, 2011.

Frost, DJ; Brandt, KD; Cugier, D; Goldman, R.A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. *The Journal of Antibiotics*, 1995.

Garcia, NM; Del Negro, GMB; Heins-Vaccari, EM; Melo, NT; Assis, CM; Lacaz, CS. *Paracoccidioides brasiliensis*, nova amostra isolada das fezes e um pinguim (*Pygoscelis adeliae*). *Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 35 (3), 227-235, 1993.

Gow, N; Niño-Vega, G. *Paracoccidioides brasiliensis* – The Man-Hater. *Mycologist*, Volume 16, Part 2., 2002.

Granot, D; Levine, A; Dor-Hefetz, E. Sugar-induced apoptosis in yeast cells. *FEMS Yeast Research* 4:7-13, 2003.

Grecco, WR; Bravo, G; Parsons, JC. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacology Reviews* 47, 331–85, 1995.

Hahn RC; Handam JS. Effects of amphotericin B and three azole derivatives on the lipidic of yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. V. 55, p. 481-504, 2000.

Hahn, RC; Morato, CYT; Santos, NL; Ferreira, JF; Hamdan, JS. Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and in vitro resistance to ketoconazole and trimethoprim sulphamethoxazole. *Mycoses*, 46: 342-347, 2003.

Heyworth, PG; Curnutte, JT; Nauseef. Neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase assembly. Translocation of p47-phox and p67-phox requires interaction between p47-phox and cytochrome b558. *J. Clin. Invest.* 87:352-356, 1991.

Hogan, LH; Klein, BS; Levitz, SM. Virulence Factors Of Medically Important Fungi. *Clinical Microbiology Reviews*, P. 469–488, 1996.

^aJohann S, Cisalpino PS, Watanabe GA, Cota BB, Siqueira EP, Pizzolatti, MG, Zani CL, Resende MA: Antifungal activity of extracts of some plants used in the Brazilian traditional medicine against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Pharmac Biol*, 48: 388-96, 2010.

Johann S, Pizzolatti M G, Donnici C L, Resende M A: Antifungal properties of plants used in Brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. *Braz J Microbiol.*, 38: 632-637, 2007.

^bJohann, S; Sá, NP; Lima, LARS; Cisalpino, PS; Cota, BB; Alves, TMA; Siqueira, EP; Zani, CL. Antifungal activity of schinol and a new biphenyl compound isolated from *Schinus terebinthifolius* against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 9:30, 2010.

Johann, S; Soldi, C; Lyon, JP; Pizzolatti, MG; Resende, MA. Antifungal activity of the amyirin derivatives and in vitro inhibition of *Candida albicans* adhesion to human epithelial cells. *Letters in Applied Microbiology* 45:148–153, 2007.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239–57.

Kipnis, APJ. Contribuição dos modelos murinos no estudo da paracoccidiodomicose. *Revista de patologia tropical*. Vol. 28 (1): 14-25, 1999.

Klepser, M.E.; Wolfe, E.J.; Jones, R.N.; Nightingale, C.H.; Pfaller, M.A. Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B tested against *Candida albicans*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 41 (6), p. 1392-1395, 1997.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. Paracoccidiodomicose. In: Lacaz Cs, Porto E, Martins Jec, Editors. *Micologia Médica*. São Paulo (Brazil): Servier, P. 248–61, 1991.

Lavigne, LM; Schopf, CL; Chung, R; Maylor, JP; Sypek, JP. The role of recombinant murine IL-12 and INF-gamma in the pathogenesis of a murine systemic *Candida albicans* infection. *J. Immunol.* 160:284-292, 1998.

Ledzma, E; Apitz-Castro, R. Ajoene, El principal compuesto activo derivado Del ajo (*Allium sativum*), um nuevo agente antifúngico. *Rev Iberoam Micol*, 23: 75-80, 2006.

Leiter, E., Szappanos, H., Oberparleiter, C., Kaiserer, L., Csernoch, L., Pusztahelyi, T., Emri, T., Pócsi, I., Salvenmoser, W., Marx, F. Antifungal Protein PAF Severely Affects the Integrity of the Plasma Membrane of *Aspergillus nidulans* and Induces an Apoptosis-Like Phenotype. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, p. 2445–2453, V. 49, N° 6, 2005.

Ludovico, P; Sousa, MJ; Silva, MT; Leão, C; Corte-Real, M. *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiology*, 147:2409-2415, 2001.

Luna, B; Drew, RH; Perfect, JR. Agents for treatment of invasive fungal infections. *Otolaryngologic clinics of North America*, volume 33, N° 2, 2000.

Lupi, O; Tyring, SK; McGinnis, MR. Tropical Dermatology: Fungal Tropical Diseases *J Am Acad Dermatol*, 2005.

Mackinnon, JE, Pathogenesis of South American blastomycosis, *Trans. Roy. Soc. Trop. Med.*, 53: 487, 1959.

Madeo, F; Fröhlich, E; Fröhlich, KU. “A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis”, *J. Cell Biol.* 139: 729-734, 1997.

Madeo, F; Fröhlich, E; Ligr, M; Grey, M; Sigrist, SJ; Wolf, DH; Fröhlich, K. Oxygen Stress: A Regulator of Apoptosis in Yeast. *The Journal of Cell Biology*, Volume 145, Number 4, 757-767, 1999.

Madeo, F; Fröhlich, E; Ligr, M; Grey, M; Sigrist, SJ; Wolf, DH; Fröhlich, K. Oxygen Stress: A Regulator of apoptosis in Yeast. *The Journal of Cell Biology*, Volume 145, Number 4, 757-767, 1999.

Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.*, 146:3–15, 1995.

Maluf, MLF; Takahachi, G; Svidzinski, TIE; Xander, P; Apitz-castro, R; Bersani- Amado, CA; Cuman, RKN. Antifungal activity of ajoene on experimental murine paracoccidioidomycosis. *Rev Iberoam Micol*, 25:163-166, 2008.

Mamoni, RL; Blotta, MHSL. Flow-Cytometric Analysis Of Cytokine Production In Human Paracoccidioidomycosis. *Cytokine*. 35:207–216, 2006.

Mamoni, RL; Nouér, AS; Oliveira, SJ; Musatti, CC; Rossi, CL; Camargo, ZP. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. *Med Mycol.*, 40:153-9, 2002.

Mangino, JE; Pappas, PG. Itraconazole for treatment of histoplasmosis and blastomycosis. *International Journal Antimicrobial Agents*, 219-225, 1995.

Marques, AF; Silva, MB; Juliano, MAP; Travassos, LR; Taborda, CP. Peptide Immunization as an Adjuvant to of Chemotherapy in Mice Challenged Intratracheally with Virulent Yeast Cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50(8):2814, 2006.

Marques-Mello, L; Silva-Vergara, ML; Rodrigues Jr, V. Patients with active infection with *Paracoccidioides brasiliensis* present a Th2 immune response characterized by high Interleukin-4 and Interleukin-5 production. *Hum. Immunol.* 63:149-154, 2002.

Martinez, R. Blastomicose Sul-Americana (Paracoccidioidomicose). *Etiologia e Ecologia*. In: Veronesi, R.; Focaccia, R. *Tratado de Infectologia*. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

Matute DR; Mcewen Jg; Puccia R; Montes Ba; San-Blas G; Bagagli E, Et Al. Cryptic Speciation And Recombination In The Fungus *Paracoccidioides brasiliensis* As Revealed By Gene Genealogies. *Mol Biol Evol.*, 23:65–73, 2006.

Mayayo, E; Gómez-Aracil, V; Fernández-Torres, B; Mayayo, R; Domínguez, M. Report Of An Imported Cutaneous Disseminated Case Of Paracoccidioidomycosis. *Rev Iberoam Micol*, 24: 44-46, 2007.

Meinerz, ARM; Cleff, MB; Nascente, PS; Nobre, MO; Shuch, LFD; Antunes, TA; Xavier, MO; Meireles, MCA; Mello, JRB. Efeitos de doses elevadas da terbinafina e itraconazol em ratos Wistar. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 43, n. 1, jan./mar., 2007.

Molina, FP; Majewski, M; Perrela, FA; Oliveira, LD; Junqueira, JC; Jorge, AOC. Própolis, sálvia, calêndula e mamona – atividade antifúngica de extratos naturais sobre cepas de *Candida albicans*. *Cienc Odontol Bras*, 11 (2): 86-93, 2008.

Morais, FV; Barros, TF; Fukada, MK; Cisalpino, PS; Puccia, R. Polymorphism in the gene coding for the immunodominant antigen gp43 from the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol.*,38: 3960-3966, 2000.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Immunology Methods*. V. 65, p. 55-63, 1983.

MS - Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde 2004. *Saúde Brasil 2004 - uma análise da situação de saúde no Brasil*, Brasília (DF), 364 pp.

MS - Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação em Saúde 2005. *Saúde Brasil 2005 - uma análise da situação de saúde no Brasil*, Brasília (DF), 882 pp.

Mukherjee, PK; Sheehan, DJ; Hitchcock, CA; Ghannoum, MA. Combination Treatment of Invasive Fungal Infections. *Cinical Microbiology Reviews*, p. 163–194 Vol. 18, No. 1, 2005.

Musiol, R; Serda, M; Hensel-Bielowka, S; Polanski, J. Quinolone-Based Antifungals. *Current Medicinal Chemistry*, 17: 1960-1973, 2010.

Nakai, T; Uno, Ikeda, F; Tawara, S; Nishimura, K; Miyaji, M. In vitro antifungal activity of micafungin (FK463) against dimorphic fungi: Comparison of yeast- like and mycelial forms. *Ant. Agents and Chemotherapy*. V. 47, p. 1376-1381, 2003.

Nakai, T; Hatano, K; Ikeda, F; Shibuya, K. Electron microscopic findings for micafungin-treated experimental pulmonary aspergillosis in mice. *Med Mycol*, 43: 439-445, 2005.

Odds, FC; Alistair JP. Brown and Neil A.R. Gow .Antifungal agents: mechanisms of action. *TRENDS in Microbiology*, Vol.11 No.6, 2003.

Ostrosky-Zeichner, L; Casadevall, A; Galgiani, JN; Odds, FC; Rex, JH. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. *Nature Reviews*, vol. 9, p. 719-727, 2010.

Passos, XS; Santos, SC; Ferri, PH; Fernandes, OFL; Paula, TF; Garcia, ACF; Silva, MRR. Atividade Antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 35(6):623-627, 2002.

Pagliari, C; Pereira, NV; Kanashiro, L; Stegun, FW; Duarte, Seixas, ML; Sotto, MN. Characterization of cytotoxic immune response in skin and mucosal lesions of paracoccidioidomycosis. *Journal of Cutaneous Pathology*, v. 37, p. 565-570, 2010.

Peraçoli, MTS; Kurokawa, CS; Calvi, AS; Mendes, RP; Pereira, PCM; Marques, AS; Soares. Production Of Pro- And Anti-Inflammatory Cytokines By Monocytes From Patients With Paracoccidioidomycosis. *Microbes And Infection*, 5 413–418, 2003.

Pereira, M; Felipe, MSS; Brígido, MM; Soares, CMA; Azevedo, MO. Molecular cloning and characterization of a glucan synthase gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast*, 16:451-462, 2000.

Phillips, AJ; Sudbery, I; Ramsdale, M. Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans*. *PNAS*, vol. 100, no. 24, 2003.

Pierard, GE; Arrese, JE; Pierard-Franchimont, C. Itraconazole. *Expert Opin. Pharmacother.*, v. 1, n. 2, p. 287-304, 2000.

Poisson, DM; Heitzmann, A; Mille, C; Muckensturm, B; Dromer, F; Dupont, B; Hocqueloux, L. *Paracoccidioides brasiliensis* In A Brain Abscess: First French Cases. *Journal De Mycologie Medicale*, 17, 114—118, 2007.

Ponce, E; Pechére, JC. Activity of amphotericin B and itraconazole against intraphagocytic *Candida albicans*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 9, p. 738-744, 1990.

Prado, M; Silva, MB; Laurenti, R; Travassos, LR; Taborda, CP. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 104(3): 513-521, 2009.

Ramos-e-Silva, M; Saraiva, LES. Paracoccidioidomycosis. Dermatol Clin, 26 257–269, 2008.

Regasini, LO; Cotinguiba, F; Morandim, AA; Kato, MJ; Scorzoni, L; Mendes-Giannini, MJ; Bolzani, VS; Furlan, M. Antimicrobial activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae) against opportunistic yeasts. African Journal of Biotechnology Vol. 8 (12), pp. 2866-2870, 17 June, 2009.

Restrepo, A; Jiménez, BE. Growth Of *Paracoccidioides brasiliensis* Yeast Phase In Chemically Defined Culture Medium. Journal Of Clinical Microbiology, P. 279-281, Vol. 12, No. 2., 1980.

Restrepo, S; Tobon, A; Trujillo, J; Restrepo, A. Development of pulmonary fibrosis in mice during infection with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *J. Med. Vet. Mycol.*, 30: 173, 1992.

Restrepo, A; Mcewen, JG; Castañeda, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med. Mycol.*, v. 39(3), p. 233-241, 2001.

Richini-Pereira, VB; Bosco, SMG; Theodoro, RC; Macoris, SAG; Bagagli, E. Molecular approaches for eco-epidemiological studies of *Paracoccidioides brasiliensis*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 104(4): 636-643, 2009.

Rivitti, EA; Aoki, V. Deep fungal infections in tropical countries. *Clin Dermatol*, 17:171–90, 1999.

Romani, L. Immunity to fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.* 4:1-23, 2011.

Romano, CC; Mendes-Giannini, MJ; Duarte, AJ; Benard, G. IL-12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the in vitro antigen-specific cellular immunosuppression of paracoccidioidomycosis patients. *Cytokine*. 18:149-57, 2002.

Rogers, TH. Antifungal drug resistance: limited data, dramatic impact? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27: 7-11, 2006.

Sabatelli, F; Patel, R; Mann, PA; Mendrick, CA; Norris, CC; Hare, R; Loebenberg, D; Black, TA; McNicholas, PM. In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:2009–2015, 2006.

San-Blas, G; Burger, E. Experimental Medical Mycological Research In Latin America - A 2000-2009 Overview. *Rev Iberoam Micol.*, 28(1):1–25, 2011.

San-Blas, G; Niño-Vega, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. *Mycopathologia*, 165:183-195, 2008.

Sanglard, D. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Current Opinion in Microbiology*, 5:379–385, 2002.

Santos, G; Ferri, D; Pedro H., Santos, SC; Bao, SN; Soares, CMA; Pereira, M. Oenothrin B inhibits the expression of PbfKS1 transcript and induces morphological changes in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Medical Mycology*, 45:7, 609 – 618, 2007.

Santos, JRA; Gouveia, LF; Taylor, ELS; Resende-Stoianoff, MA; Pianetti, GA; César, IC; Santos, DA. Dynamic Interaction between Fluconazole and Amphotericin B against *Cryptococcus gattii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* p. 2553–2558, 2012.

Sargi, SC; Dalalio, MMO; Visentainer, JV; Bezerra, RC; Perini, JAL; Stevanato, FB; Visentainer, JEL. Production of TNF- α , nitric oxide and hydrogen peroxide by

macrophages from mice with paracoccidioidomycosis that were fed a linseed oil-enriched diet. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 107(3): 303-309, 2012.

Shadomy, S; Espinel-Ingroff, A; Cartwright, RY. Estudios de laboratorio con agentes antifúngicos: pruebas de susceptibilidad y bioensayos, p. 1229–1238, 1987.

Selitrennikoff, CP; Nakata, M. New cell wall targets for antifungal drugs. Current Opinion in investigational Drugs, 4(2), 2003.

Sharon, A; Finkelstein, A; Shlezinger, N; Hatam, I. Fungal apoptosis: function, genes and gene function. FEMS Microbiol., Rev 33:833–854, 2009.

Shikanai-Yasuda, MA; Filho, FQT; Mendes, RP; Colombo, AL; Moretti, ML; et al. Consenso em Paracoccidioidomicose. Rev. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 39(3):297-310, 2006.

Silva, TL; Reis, A; Hewitt, C; Roseiro, JC. Citometria de fluxo: funcionalidade celular on-line em bioprocessos. Bol Biotecnol, p.32-40, 2001.

Silva, MB; Marques, AF; Nosanchuk, JD; Casadevall, A; Travassos, LR; Taborda, CP. Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. Microbes and Infection, 197-205, 2006.

Singer-Vermes LM, Burger E, Franco MF, Moscardi-Bacchi M, Mendes-Giannini MJS, Calich VLG. Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. J Med Vet Mycol., 27: 71–72, 1989.

Singer-Vermes, LM; Caldeira, CB; Burger, E; Calich, VLG. Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among the dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. Clin Exp Immunol., 94:75-79, 1993.

Soares, BM; Santos, DA; Kohler, LM; César, GC; Carvalho, IR; Martins, MA; Cisalpino, PS. Cerebral infection caused by *Cryptococcus gattii*: a case report and antifungal susceptibility testing. Rev Iberoam Micol; 25: 242-245, 2008.

Souza, MA; Johann, S; Lima, LARS; Campos, FF; Mendes, IC; Beraldo, H; Fagundes, EMS; Cisalpino, PS; Rosa, CA; Alves, T; Sá, NP; Zani, C. Antimicrobial activity of lapachol and its derivative thiosemicarbazone and semicarbazone. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Impresso), 2012.

Stover, EP; Schar, G; Clemons, KV; Stevens, DA; Feldman, D. Estradiol-binding proteins from mycelial and yeast-form cultures of *Paracoccidioides brasiliensis*. Infect. Immun., v.51, p. 199-203, 1986.

Takahagi-Nakaira, E; Sugizaki, MF; Peraçoli, MTS. Microdilution procedure for antifungal susceptibility testing of *Paracoccidioides brasiliensis* to amphotericin b and itraconazole. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. V.15, n.4, p.718-731, 2009.

Tavares, AHFP. Perfil transcricional do *Paracoccidioides brasiliensis* em resposta á fagocitose por macrófagos murinos. Tese de doutorado, Universidade de Brasília, DF, 2007.

Tavares, LC; Johann, S; Alves, TMA, Guerra ,JC; Fagundes ,SEM; Cisalpino, PS; Bortoluzzi, AJ; Caramori, GF; Piccoli. RM; Braibante, HT; Braibante, ME; Pizzolatti, MG. Quinolinyl and quinolinyl N-oxide chalcones: synthesis, antifungal and cytotoxic activities. Eur J Med Chem.,Sep;46(9):4448-56, 2011.

Teixeira, MM; Theodoro, MC; Carvalho, MJA; Fernandes, L; Paes, HC; Hahn, RC; Mendoza, L; Bagagli, E; San-Blas, G; Felipe, MSS. Phylogenetic Analysis Reveals A High Level Of Speciation In The *Paracoccidioides* Genus. Molecular Phylogenetics And Evolution, 52273–283, 2009.

Tenório, RP; Góes, AJS; Lima, JG; Faria, AR; Alves, AJ; Aquino, TM. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. Quim. Nova, Vol. 28, No. 6, 1030-1037, 2005.

Theodoro, RC; Bagagli, E; Oliveira, C. Phylogenetic analysis of PRP8 intein in *Paracoccidioides brasiliensis* species complex. *Fungal Genetics and Biology*, 45:1284–1291, 2008.

Thomaz, L; Apitz-Castro, R; Marques, AF; Travassos, LR; Taborda, CP. Experimental paracoccidioidomycosis: alternative therapy with ajoene, compound from *Allium sativum*, associated with sulfamethoxazole/trimethoprim. *Medical Mycology* Month,00, 1-6, 2007.

Travassos LR, Taborda CP, Colombo AL: Treatment options for paracoccidioidomycosis and new strategies investigated. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 6: 251-62, 2008.

White, MK; Cinti, C. A morphologic approach to detect apoptosis based on electron microscopy. *Methods Mol Biol*, 285:105–11, 2004.

Wilson, E.; Thorson, L.; Speert, D.P. Enhancement of macrophage superoxide anion production by amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 35, p. 796-800, 1991.

Yang, H; Ren, Q; Zhang, Z. Chromosome or chromatin condensation leads to meiosis or apoptosis in stationary yeast (*Sacharomyces cerevisiae*) cells. *FEMS Yeast Res.*, 6:1254-1263, 2006.

Zeiss, CJ. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol*, v.40, p.481-495, 2003.

