



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

BENEDITO RODRIGUES DA SILVA NETO

Perfil transcricional e proteômico de *Paracoccidioides* em resposta à itraconazol e anfotericina B e identificação de compostos com potencial antifúngico

TESE DE DOUTORADO

**Goiânia
2013**



Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TEDE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás–UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☐ Dissertação ☒ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor(a):	Benedito Rodrigues da Silva Neto				
CPF:	00974362166	E-mail:	bio.neto@gmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? ☒ Sim ☐ Não					
Vínculo Empregatício do autor	Aluno de Pós graduação.				
Agência de fomento:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico			Sigla:	CNPq
País:	Brasil	UF:	GO	CNPJ:	
Título:	Perfil transcricional e proteômico de <i>Paracoccidioides</i> em resposta à itraconazol e identificação de compostos com potencial antifúngico				
Palavras-chave:	<i>Paracoccidioides</i> , antifúngico, inibidores, docking molecular, malato sintase, adesão.				
Título em outra língua:	Proteomic and transcriptional profile of <i>Paracoccidioides</i> in response to itraconazole and identification of compounds with antifungal potential				
Palavras-chave em outra língua:	<i>Paracoccidioides</i> , antifungal inhibitors, molecular docking, malate synthase, adhesion.				
Área de concentração:	Microbiologia				
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	02/05/2013				
Programa de Pós-Graduação:	Medicina Tropical e Saúde Pública				
Orientador(a):	Dra. Maristela Pereira				
CPF:	609197796-20	E-mail:	maristelaufg@gmail.com		
Co-orientador(a):					
CPF:		E-mail:			

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ ☐ total ☒ parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

☐ Capítulos. Especifique: _____

☒ Outras restrições: Apenas abstract dos capítulos até a publicação em revista internacional do material inédito.

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Data: ____ / ____ / ____

Assinatura do(a) autor(a)

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

BENEDITO RODRIGUES DA SILVA NETO

Perfil transcricional e proteômico de *Paracoccidioides* em resposta à itraconazol e anfotericina B e identificação de compostos com potencial antifúngico

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de **Doutor em Medicina Tropical e Saúde Pública**.

Orientador: Dr^a. Maristela Pereira

**Goiânia
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG

S586p Silva Neto, Benedito Rodrigues da.
Perfil transcricional e proteômico de *Paracoccidioides* em resposta à itraconazol e identificação de compostos com potencial antifúngico [manuscrito] / Benedito Rodrigues da Silva Neto. - 2013.

165 f. : figs., tabs.

Orientador: Profa. Dra. Maristela Pereira.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás,
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2013.
Bibliografia.

1. *Paracoccidioides*. 2. *Paracoccidioides* - Antifúngico.
3. *Paracoccidioides* – Malato sintase. I. Título.

CDU: 615.282

“Um ramo de flores, um
acorde de música preferida,
um verso do poema que entenece,
pois a alma de um cientista abriga a beleza,
a música, a poesia, levam seu pensamento, de súbito,
a se voltar para o seu trabalho e o fazem recordar um parâmetro faltante,
uma correção não executada, um controle esquecido, um sem-número de
pequenas coisas que, por sua complexidade, marcam o elaborado edifício do método
experimental”

Henrique Leonel Lenzi.

Ao Autor e consumidor da minha fé,
que primeiro me aceitou e me redimiu
se tornando razão da minha esperança,
como âncora da alma, firme e segura,
a quem honro e sirvo com minha vida
e entoo o meu louvor.

Àqueles que ainda hoje depositam sua esperança em mim,
Meus pais, Osmário Rodrigues da Silva e
Aluzair Francisco Dourado, e minha irmã
Laura Maria Gomes Dourado
Dedico.

Dedico ainda à Maristela,
Como poder agradecer a confiança
durante todos estes anos?
Orientadora e ao mesmo tempo exemplo de dedicação,
fidelidade e responsabilidade.

AGRADECIMENTOS

À Deus, Tua promessa que me sustenta, e me faz acreditar em , uma e um motivo que me faz levantar a cada novo dia.

À Profa. Maristela Pereira, que, me orientando e conduzindo pelo caminho do conhecimento.

À Profa. Célia Maria de Almeida Soares, sua capacidade e competência me levaram a chegar ao fim deste trabalho vislumbrando novos horizontes. Grato por todo auxílio e compreensão.

À Profa. Zezé, por todo conhecimento transmitido de forma tão graciosa naqueles dias inesquecíveis em Araraquara – SP, muito obrigado por fazer parte deste momento!

À todos da micologia da UNESP de Araraquara, em especial à Julhiany, como é bom estar perto de pessoas como você (até a próxima festa junina!).

Aos professores do Instituto de Ciências Biológicas, e Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG, e ao professor Luciano do CENARGEN – EMBRAPA DF, que contribuíram tão grandemente para o meu aprendizado.

Àos professores do Laboratório de Biologia Molecular Sílvia Maria, Clayton Borges, Juliana Parente e Alexandre Bailão.

Àqueles que estiveram comigo no princípio desta longa e muitas vezes agradável jornada: Kesser, Aline e Patrícia Zambuzzi, Patrícia Kott, Sarah (prima), Rogério, Flavinha Luiz Augusto, Christielly, Lidiane, Moniquinha, Mônica Santiago, Nadya, Nayche, Kelly, Daciene, Lorena, Wesley, Simone Weber, Rodrigo (mesmo distante compartilhando os bons resultados!), Amanda, Sabrina, Symone Vitoriano, Camila, Karinne, Dayane e Nathalie.

À todos que conviveram de maneira tão agradável no laboratório: Leandro Rodrigues (grande amigo e companheiro), Mariana, Luciana Casaletti, Felipe, Lívia, Mirelle, Elisa, Cristina, Ana Flávia, Patricia Lima, Luis Paulo, Renatinha, Leandro, Hanna, Gabriel, Edilânia, Sheyla (como foi bem te conhecer), Juliana Decurcio, Mariell, Laura, Laurine e

À Karine e ao Zezinho, pela atenção e cordialidade prestadas durante todas as dúvidas e questões relacionadas à Pós-Graduação;

Ao auxílio financeiro dos seguintes órgãos: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG).

Aos amigos da Padrão, que bom que nossos caminhos um dia se cruzaram, nos permitindo compartilhar objetivos, planos e boas rizadas!

Às professoras Cecília e Lucília do Instituto de Química pela colaboração e amizade.

Ào professor Roosevelt e Guilherme tão prestativos nas análises de *docking molecular*.

Ào Marcelo Ramada pelo grande auxílio na análise dos espectros.

À Igreja Fonte da Vida que é meu amparo e lugar seguro.

Amo “a” como ama o amor. Não “a” conheço nenhuma outra razão para amar senão amar. Que queres que te diga, além de que te amo, se o que quero dizer-te “logo” é que te amo? (parafraseando Fernando Pessoa).

À minha família, razão pela qual cheguei até aqui e motivo que me faz acreditar em cada objetivo, cada plano, cada sonho....e é o que me dá força para alcançá-los.

Sim, é hora de voar, bem alto!

SUMÁRIO

Sumário.....	ix
Tabelas, figuras e anexos	xi
Símbolos Siglas e Abreviaturas.....	xii
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xv
Capítulo I – Revisão da Literatura	
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Considerações Gerais	
1.1.1 Aspectos Gerais do fungo <i>Paracoccidioides</i>	16
1.1.2 A doença Paracoccidioidomicose.....	19
1.1.2.1 Epidemiologia.....	20
1.1.2.2 Patogênese	21
1.1.2.3 Diagnóstico.....	21
1.1.3 Mecanismos de ação conhecidos dos antifúngicos.....	22
1.1.4 Transcritoma e Proteoma do fungo <i>Paracoccidioides</i>	24
1.1.5 A Genômica na elucidação de mecanismos de ação de antifúngicos	30
1.2 Caracterização de Alvos para Agentes Antifúngicos	
1.2.1 Ciclo do Glioxalato.....	32
1.2.2 Malato Sintase.....	35
1.2.3 Isocitrato Liase.....	37
1.3 Componentes de Matriz Extracelular.....	38
1.3.1 Moléculas envolvidas no processo de adesão de fungos.....	40
1.4 Considerações sobre os alcalóides.....	43
1.5 Docking molecular.....	43
2. JUSTIFICATIVA..	45
3. OBJETIVOS	47
Capítulo II	
Artigo 1: Transcriptional and proteomic profile of <i>Paracoccidioides</i> in response to itraconazole.....	49
Capítulo III	
Artigo 2: β - carboline alkaloids from <i>Galianthe ramosa</i> (Rubiaceae) inhibiting Malato Synthase from the <i>Paracoccidioides</i> spp.....	82
Capítulo IV	
Artigo 3: Virtual screening and natural products ininhibiting malate synthase of <i>Paracoccidioides</i> spp.....	100

Capítulo V

4. DISCUSSÃO.....	132
5. CONCLUSÕES.....	140
6. BIBLIOGRAFIA.....	141
7. ANEXOS – Publicações.....	150

FIGURAS, TABELAS E ANEXOS

Figura 1.....	17
Figura 2.....	33
Figura 3.....	154
Tabela 1	155
Anexo 1 – Publicação.....	150
Anexo 2 – Publicação.....	151
Anexo 3 – Coorientação.....	152
Anexo 4 – Análises Proteômicas	153
Anexo 5 – Patente	156

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

cAMP: adenosina 3',5'- monofosfato cíclico

CIM: concentração inibitória mínima

CDII: cisteína dioxigenase

CDB: convenção sobre diversidade biológica

cDNA: DNA complementar

CIT1: citrato sintetase

CYP51: citocromo P-450 14- α -esterol demetilase

CYP61: C22 esterol desaturase

DNA: ácido desoxirribonucléico

EBP: estradiol binding protein (protein de ligação ao estradiol)

ELISA: enzyme linked immuno sorbent assay (ensaio de ligação imuno absorvente)

ERG1: esqualeno epoxidase

ERG5: C22 esterol desaturase

ERG6: esterol C-metil transferase

ERG7: (2,3)-oxido esqualeno ciclase

ERG9: esqualeno sintase

ERG11: citocromo P-450 14- α -esterol demetilase

ERG25: C-4metil esterol oxidase

EST: expressed sequence tag (etiquetas de sequências expressas)

5-FC: 5-flucitosina

gp43: glicoproteína de 43kDa

4-HPPB: 4-hidroxil-fenil piruvato dioxigenase

HSP: heat shock protein (proteína de choque térmico)

ITS: internally transcribed spacer (espaçador interno transcrito)

kDa: kiloDalton

MLSs: malato sintases

mRNA: ácido ribonucléico mensageiro

MLS: malato sintase

ICL: isocitrato liase

MMcM – meio McVeigh/Morton

MS – espectrometria de massas

MALDI – ionização à laser assistida por matriz

MIPS – centro de informação de sequências protéicas de Munique

µg - micrograma

mg – miligrama

µL - microlitro

mL - mililitro

µM – micromolar

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido

NTBC: 2-(2-nitro-4-trifluorometilbenzoyl)-ciclohexano-1,3-dionel

Pb01, *Pb03* e *Pb18*: isolados 01, 03 e 18 de *Paracoccidioides*

PbMLS: proteína malato sintase de *Paracoccidioides*

PbICL: proteína isocitrato liase de *Paracoccidioides*

PCM: paracoccidioidomicose

PCR: reação em cadeia da polimerase

CHAPS – 3-(colamidopropil)dimetilamônio-1-propanosulfonato

CoA – coenzima A

DTT – ditioneitol

SDS-PAGE – gel de poliacrilamida em condições desnaturantes

rpm – rotações por minuto

RT-PCR – reação em cadeia da polimerase precedida por transcrição reversa

TCA – ciclo do ácido tricarboxílico

RESUMO

O fungo patógeno termodimórfico *Paracoccidioides* é o agente da paracoccidioidomicose. Esta doença é caracterizada por uma inflamação granulomatosa onde as formas clínicas vão da infecção localizada benigna a uma disseminada. As drogas triazólicas são antifúngicos de amplo espectro e são usadas atualmente para tratar infecções causadas por vários fungos patogênicos e fungos. O mecanismo de ação dos azólicos foi elucidado em alguns fungos, embora pouco se sabe em *Paracoccidioides*. Aqui, em primeiro lugar pretendemos investigar o mecanismo de ação do itraconazol em *Paracoccidioides* usando análise de diferença representacional de *Paracoccidioides* células de levedura crescidas na ausência e na presença de itraconazol por 1 e 2 horas. Entre os genes *Paracoccidioides* up-regulados pelo itraconazol foram os envolvidos, principalmente no transporte celular, metabolismo/energia, transcrição, defesa e virulência. ERG11, ERG6, ERG3, ERG5 e ERG25 foram regulados quando avaliados de forma temporal. Experimentos de infecção em camundongos corroborou resultados in vitro. O ciclo do glioxilato e suas enzimas chave isocitrato liase (ICL) e malato sintetase (MLS) desempenham um papel fundamental na patogenicidade e virulência de vários fungos, assim como patogênese em humanos. Neste trabalho, descrevemos um estudo realizado para desenvolver ligantes racionais como candidatos pra inibir o receptor PbMLS. Apresentamos um passo importante na busca de ligantes para este receptor baseando-se em homologia de estruturas, dinâmica molecular e acoplamento molecular envolvendo varredura virtual (*virtual screening*) por meio do programa AutoDock Vina. Identificamos a partir de banco de compostos naturais (data bank ZINC) potenciais ligantes candidatos a inibir a atividade de PbMLS quando comparados ao ligante original. Este processo nos conduziu aos alcalóides indólicos monoterpênicos do gênero *Palicourea* (Rubiaceae) que compreende cerca de 230 espécies entre arbustos e pequenas árvores distribuídas, principalmente, nas regiões tropicais. A partir da ancoragem molecular quinze compostos foram testados quanto à sua eficácia na inibição da atividade de PbMLS. A atividade específica de PbMLS foi afetado pelos compostos. Quatro alcalóides indólico mostraram capacidade de reduzir a atividade da enzima. Desde que PbMLS é uma proteína associada à superfície que se comporta como uma adesina ancorada também foi investigado se os compostos inibem a adesão da proteína às matrizes extracelulares. O processo de eletroforese em gel bidimensional foi utilizado para investigar as proteínas diferencialmente expressas durante o tratamento com itraconazol e anfotericina B. Gel de três réplicas biológicas independentes foram digitalizadas e as imagens foram analisadas usando o software 6.0 Platinum 2D ImageMaster (GE Healthcare). Intensidades dos *spots* foram normalizados e foram estimadas as análises estatísticas por ANOVA one-way. Os *spots* de interesse foram excisadas do gel digerida com tripsina e os péptidos foram analisados por MS e / ou MS / MS e sequenciados. Os resultados obtidos aqui devem ajudar na compreensão do mecanismo de ação de drogas em *Paracoccidioides*, e delinear estudos de identificação de compostos com atividade antifúngica.

Palavras-chave: *Paracoccidioides*, antifúngico, inibidores, *docking* molecular, malato sintase, adesão.

ABSTRACT

The thermally dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides* is the agent of paracoccidioidomycosis. This disease is characterized by a granulomatous inflammation with clinical forms ranging from a benign localized infection to a disseminated one. The triazole drugs are broad-spectrum antifungal agents and are currently used to treat infections caused by various pathogenic yeast and molds. The mechanism of action of azoles has been elucidated in some fungi, although little is known in *Paracoccidioides*. Here we aim to investigate the mechanism of action of itraconazole on *Paracoccidioides* by using Representational Difference Analysis from *Paracoccidioides* yeast cells grown in the absence and presence of itraconazole for 1 and 2 h. Among the *Paracoccidioides* genes up-regulated by itraconazole were those mainly involved in cellular transport, metabolism/energy, transcription, cell rescue, defense and virulence. *ERG11*, *ERG6*, *ERG3*, *ERG5* and *ERG25* were up-regulated when evaluated in a timely manner. *In vivo* infection experiment in mice corroborated *in vitro* results. The glyoxylate cycle and its key enzymes isocitrate lyase and malate synthase (MLS) play a crucial role in the pathogenicity and virulence of various fungi such as the human pathogens. Here, we describe a study conducted to develop rational ligands as candidates to inhibit receptor *PbMLS*. The important step in the search for ligands for this receptor based on structural homology, molecular docking and molecular dynamics involving scanning virtual (virtual screening) through the program AutoDock Vina. Identified from the database of natural compounds (ZINC data bank) potential candidate ligands to inhibit the activity of *PbMLS* when compared to the original binder. This process led us to monoterpene indole alkaloids of the genus *Palicourea* (Rubiaceae) comprises about 230 species from shrubs and small trees distributed mainly in tropical regions. From the molecular docking fifteen compounds were tested as to its effectiveness in inhibiting the activity of *PbMLS*. The specific activity of *PbMLS* was affected by the compounds. Four indol alkaloids showed ability to reduce the enzyme activity. Since *PbMLS* is a linked surface protein that behaves as an anchorless adhesin, and *PbICL* is here described as adhesin, we also investigated if those compounds inhibit the adhesion of the protein to extracellular. Two-dimensional gel electrophoresis we used to investigate the proteins expressed differentially during treatment with itraconazole and amphotericin B. Gels of three independent biological replicates were digitalized and the images were analyzed using the ImageMaster 2D Platinum 6.0 software (GE Healthcare). Spot intensities were normalized and the statistics analyses were estimated by one-way ANOVA. The spots of interest were excised, in-gel digested with trypsin, and the peptides were then analyzed by MS and/or MS/MS and and sequenced. The results obtained here should assist in understanding the mode of action of drugs in *Paracoccidioides*, and outline studies identifying compounds with antifungal activity.

Keywords: *Paracoccidioides*, antifungal inhibitors, molecular docking, malate synthase, adhesion.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

1.1.1 Aspectos Gerais do Fungo *Paracoccidioides*

No ano de 1908 Adolpho Lutz, pai da medicina tropical no Brasil, descrevia pela primeira vez a paracoccidioidomicose (PCM), quando ao analisar exames histológicos de um de seus pacientes, observou a ausência de esférulas com esporos no seu interior o que diferenciava este fungo de outros espécimes característicos de coccidioidomicose. Alguns anos depois, Splendore descreveu novos casos em pacientes da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e estudou minuciosamente a morfologia do fungo, denominando-o *Zymonema brasiliensis*, no entanto em 1930, Floriano Paulo de Almeida instituiu a denominação *Paracoccidioides brasiliensis* uma vez que até o momento era classificado como espécie única (Pontes *et al.*, 2000). Atualmente se aceita a existência de pelo menos quatro espécies filogenéticas: S1 (espécie 1 com 38 isolados), PS2 (espécie filogenética 2, com 6 isolados), PS3 (espécie filogenética 3, com 21 isolados) e Pb01-like (incluindo o isolado Pb01 e isolados filogeneticamente similares), logo mais adiante relataremos estes estudos genômicos estruturais assim como a distribuição de cada uma das quatro espécies filogenéticas. A paracoccidioidomicose é, também, denominada doença de Lutz, blastomicose sulamericana, blastomicose brasileira, moléstia de Lutz Splendore-Almeida e micose de Lutz.

Paracoccidioides, filogeneticamente considerado um fungo ascomiceto, é capaz de adaptar-se para sobreviver no hospedeiro causando a doença PCM, a mais prevalente micose sistêmica na América Latina (Restrepo e Tobon, 2005). O fato de ser um fungo termodimórfico torna-o capaz de crescer na forma leveduriforme nos tecidos do hospedeiro ou quando cultivado à 36°C, e na forma miceliana em condições saprófitas ou quando cultivado à temperatura ambiente (18-23°C) (Bagagli *et al.*, 2006; Restrepo 1985). O aspecto miceliano quando examinado ao microscópio de luz, apresenta hifas finas e septadas com raros clamidósporos terminais ou intercalares e com vários núcleos (Franco *et al.*, 1989). As células leveduriformes apresentam morfologia oval ou alongada, contendo múltiplos núcleos (2 a 5 por células). Sua parede celular é birrefringente com blastoconídios simples ou múltiplos gerados por germinação, onde observamos o aspecto de “roda de leme” uma característica primordial em sua identificação (Lacaz *et al.*, 1991) (Figura 1). O aspecto morfológico do fungo também foi descrito nos tecidos do

hospedeiro, onde foi possível observar que durante a infecção ativa, as lesões contêm um elevado número de leveduras, sendo que destas, 24 – 33 % apresentam múltiplos brotamentos (Restrepo, 2000).

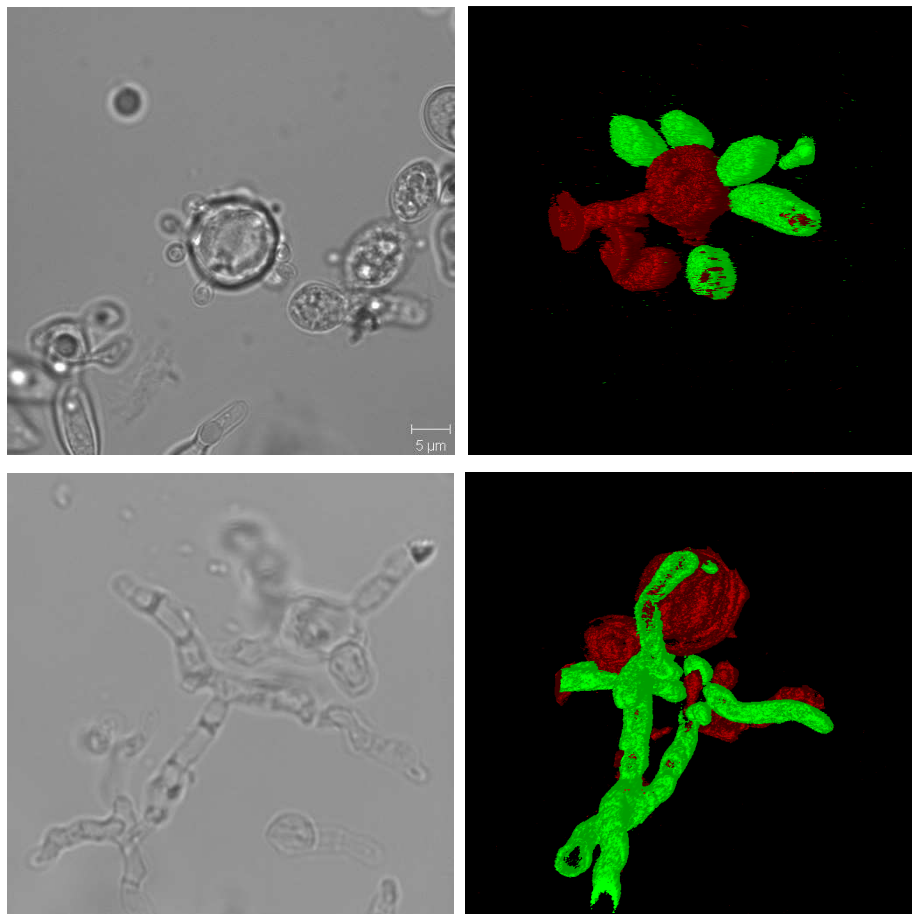


Figura 1 – Microscopia confocal demonstrando a morfologia de *Paracoccidioides* isolado Pb01. As figuras A e B demonstram o aspecto leveduriforme obtidos pelo canal DIC e por conformação respectivamente enquanto C e D revelam a forma miceliana do fungo *Paracoccidioides* (Fonte: Henrique Leonel Lenzi & Benedito R. da Silva Neto).

Determinadas características climáticas ou tipos específicos de solos provavelmente auxiliam na adaptação do fungo ao habitat natural (Rappleye e Goldman, 2006). As diferentes condições de solos alteram a capacidade de crescimento da forma miceliana e a produção de conídios por *Paracoccidioides* (Terçarioli *et al.*, 2007). O nicho ecológico alternativo de *Paracoccidioides* são animais com temperatura corporal de 36°C a 37°C, onde a transição para a forma leveduriforme promove o estabelecimento da doença. Desta forma o fungo tem sido descrito em isolado de tatus (*Dasypus novem cinctus* no Brasil e *Cabassous centralis* na Colômbia) em áreas endêmicas e esses animais são reconhecidos como reservatórios naturais do fungo (Corredor *et al.*, 2005; Bagagli *et al.*,

2008). O patógeno também tem sido relatado em cachorros (Farias *et al.*, 2011), pingüins (Garcia *et al.*, 1993) e morcegos frugívoros (Grose e Tamsitt, 1965). Testes sorológicos e intradérmicos também sugeriram a presença do fungo em animais domésticos e primatas (Corte *et al.*, 2007). Richini-Pereira e colaboradores (2008) demonstraram, por técnicas moleculares, a presença de *Paracoccidioides* em animais selvagens mortos em estradas e rodovias. Por meio de Nested-PCR (reação em cadeia da polimerase) com oligonucleotídeos ITS específicos para *Paracoccidioides*, detectou-se o fungo em tatu (*Dasypus sp.*), preá (*Cavia aperea*), porco espinho (*Sphigurrus spinosus*), guaxinim (*Procyon cancrivorus*) e furão (*Galictis vittata*). A detecção do fungo *Paracoccidioides* em diferentes órgãos de diferentes espécies mostra que o fungo pode ter diferentes perfis de disseminação.

A ausência de forma sexuada tem dificultado a classificação taxonômica de *Paracoccidioides* (San-Blas *et al.*, 2002). Deste modo a classificação aceita tem sido baseada através de comparações filogenéticas entre fungos dermatófitos e fungos dimórficos, baseada na subunidade rRNA 28S ribossomal, Leclerc e colaboradores (1994) classificaram *Paracoccidioides* na ordem Onygenales, família Onygenaceae (filo Ascomycota), juntamente com *Blastomyces dermatitidis* e *Histoplasma capsulatum* (Peterson e Singler 1998). Atualmente o fungo aqui estudado pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, subdivisão Euascomycotina, classe Plectomyceto, subclasse Euascomycetidae, ordem Onygenales, família Onygenaceae, subfamília Onygenaceae Anamórficos, gênero *Paracoccidioides*, espécie *Paracoccidioides brasiliensis* (San-Blas *et al.* 2002).

Conforme relatamos acima, fungo *Paracoccidioides* até então era considerado uma espécie única de seu gênero até se propor a existência de quatro espécies filogenéticas: PS3 um grupo geograficamente restrito a Colômbia; PS2 encontrado predominantemente no Brasil, nos Estados de São Paulo e Minas Gerais e também na Venezuela; S1 está distribuída no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela (Matute *et al.*, 2006). Posteriormente, Carrero e colaboradores (2008) mostraram por meio de análises das regiões codificantes e não codificantes de vários genes, bem como a região ITS, que com exceção dos genes FKS1 e Catalase A, o isolado Pb01 ficou distante de todos os outros isolados de *Paracoccidioides* utilizados nesse estudo, se agrupando com a linhagem IFM 54648, um isolado atípico, obtido de um paciente do estado do Paraná, região sul do Brasil, sugerindo a possibilidade de mais do que três espécies filogenéticas de *Paracoccidioides*, onde o isolado Pb01 seria uma nova espécie dentro do gênero (Carrero

et al., 2008, Theodoro *et al.*, 2008). A fim de confirmar a existência da quarta espécie filogenética do fungo *Paracoccidioides*, Teixeira e colaboradores (2009), utilizando o método de reconhecimento filogenético (GCPSR) e os isolados de *Paracoccidioides*, pertencentes aos grupos S1, PS2 e PS3 identificaram que o isolado *Pb01* apresentou grande divergência morfológica quando comparado aos isolados pertencentes à esses grupos. O sequenciamento dos genomas estruturais dos isolados *Pb01*, *Pb03* e *Pb18*, permitiu identificar a presença de cinco cromossomos em cada isolado. As análises permitiram verificar que o isolado *Pb01* apresenta 9132 genes e 32,94 Mb, apresentando um maior número de genes quando comparado aos isolados *Pb03* e *Pb18*. O isolado *Pb03* apresentou um genoma de 29,06 Mb com 7.875 genes e *Pb18* um genoma de 29,95 Mb, contendo 8.741 genes (Desjardins *et al.*, 2011).

1.1.2 A Doença Paracoccidioidomicose

O termo paracoccidioidomicose (PCM) foi instituído em 1971 na reunião de micologistas das Américas em Medellin e persiste, até hoje, como nomenclatura oficial (Valle e Costa, 2001). A PCM é uma micose infecciosa, granulomatosa, crônica e sistêmica. A principal rota de infecção ocorre pela inalação de conídios produzidos pela forma miceliana do fungo, que ao atingirem os pulmões podem transformar-se em células leveduriformes.

A PCM apresenta duas formas clínicas principais: forma aguda ou subaguda (juvenil) e forma crônica (adulta). A forma aguda representa 3 a 5% dos casos descritos, sendo a maioria dos pacientes constituídos por crianças, adolescentes ou adultos jovens. É a forma clínica menos frequente e o período de incubação é de semanas até meses (Barrozo *et al.*, 2009). A doença caracteriza-se por um desenvolvimento rápido e por marcante envolvimento de órgãos como baço, fígado, gânglios linfáticos e medula óssea. Apesar de não haver manifestações clínicas ou radiológicas de comprometimento pulmonar, pode-se isolar o fungo do lavado brônquico, evidenciando a participação do pulmão como porta de entrada, mesmo na ausência de alteração radiológica (Restrepo *et al.*, 1983). Não existem relatos de transmissão inter-humana (Brummer *et al.*, 1993).

Após a penetração no hospedeiro, o fungo se converte para a forma patogênica de levedura, sendo este processo considerado como um passo fundamental para o estabelecimento bem sucedido da infecção (Franco, 1987) e fase inicial da interação parasito-hospedeiro (Camargo e Franco, 2000). A doença é caracterizada pelo polimorfismo das lesões (De Almeida, 2005), formação de grânulos epiteliais com áreas

de necrose central, um halo de linfomononuclear e fibrose (Camargo e Franco, 2000). A PCM pode se apresentar em duas formas principais: i) aguda/subaguda e ii) crônica. Na forma aguda/subaguda também chamada de forma juvenil, a maioria dos pacientes são crianças, adolescentes ou adultos jovens com idade inferior a 25 anos (Mendes, 1994), apresentando uma variação sistêmica de leve a moderada (Marques, 2003), além de decréscimo na resposta imune celular, resposta inflamatória granulomatosa e disseminação fúngica (Arango e Yarzabal, 1982; Franco *et al.*, 1987). A forma crônica é a forma encontrada em adultos e é a mais frequente (90%), acometendo principalmente homens com mais de 30 anos de idade. O período de latência pode variar desde alguns meses ou até décadas. Ao contrário da forma aguda, o quadro clínico apresenta um desenvolvimento lento com comprometimento pulmonar evidente (Brummer *et al.*, 1993). Em aproximadamente 25% dos casos, o pulmão é o único órgão afetado (forma unifocal), mas é uma doença que tem tendência à disseminação, sendo pouco frequentes os quadros pulmonares isolados (Restrepo *et al.*, 1983) uma vez que *P. brasiliensis* é notavelmente um patógeno versátil, capaz de infectar numerosos nichos no hospedeiro, como a pele, as mucosas oral, nasal e gastrointestinal, baço, ossos, próstata, fígado, pâncreas e sistema nervoso central (Silva e Saraiva, 2008; Lopes *et al.*, 2009; Fortes *et al.*, 2009; Goldani *et al.*, 2011).

1.1.2.1 Epidemiologia

A infecção ocorre na América Latina, desde o México até a Argentina, excetuando-se países como Chile, Guiana, Guiana Francesa, Suriname, Nicarágua, Belize e várias ilhas da América Central que não possuem registros de casos autóctones da doença (Martinez, 2004). No Brasil, a maior incidência ocorre nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais. Nas últimas décadas houve muitas alterações da frequência e na distribuição geográfica da doença chegando a atingir até a região Norte do país, sobretudo a Amazônia. É possível que atividades relacionadas à agropecuária e a melhoria dos testes diagnósticos expliquem estas alterações (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). Os casos relatados fora da área endêmica são de pacientes que visitaram ou residiram por algum tempo em um país latino-americano (Bicalho *et al.*, 2001; Paniago *et al.*, 2003). O conhecimento sobre a epidemiologia da infecção baseia-se em inquéritos com a reação intradérmica de leitura tardia, que é considerada uma estratégia simples, adequada e de baixo custo para avaliar a prevalência regional do patógeno. Embora existam relatos mostrando a dificuldade de comparar os resultados desse exame, face à

heterogeneidade dos antígenos, há dados que demonstram que esses testes são positivos nas formas subclínicas e crônicas e negativos nas formas agudas e subagudas (tipo juvenil). Apesar da possibilidade de reação cruzada com outros fungos, particularmente o *Histoplasma capsulatum*, a resposta imunológica específica ao *Paracoccidioides* é identificável (Mangiaterra *et al.*, 1996).

1.1.2.2 Patogênese

A maioria dos casos de PCM ocorre em indivíduos do sexo masculino, fumantes e etilistas crônicos, cujas condições de higiene, nutricionais e socioeconômicas são precárias. Esses indivíduos costumam ser trabalhadores rurais que, por sua atividade, permanecem com mais frequência diretamente em contato com a terra e vegetais (Araújo *et al.*, 2002). A incidência da doença até a puberdade é a mesma em ambos os sexos, porém na fase adulta, mais de 80% dos pacientes são do sexo masculino (Martinez, 1997). Acredita-se que esse fato seja explicado pela ação protetora que os hormônios estrógenos conferem ao sexo feminino (Sano *et al.*, 1999), e pela ausência ou menor contato das mulheres com as fontes de infecção (Marques *et al.*, 1983). A implantação traumática do fungo na mucosa oral, era erroneamente associada a fragmentos de vegetais comumente usados para limpeza dentária no meio rural, fosse a via de entrada desse agente infeccioso em razão de muitos pacientes apresentarem ulcerações na boca. Contudo, em experimentos com animais de laboratório, não foi comprovada essa teoria. As lesões em mucosa oral são geralmente precedidas ou acompanhadas por lesões pulmonares (Bisinelli *et al.*, 2002; Martinez *et al.*, 2004). A infância ou a adolescência é o período em que infecção geralmente ocorre, e sua evolução depende da virulência do fungo, da quantidade de conídios inalados (esporos) e da integridade do hospedeiro. Após longo período de latência do fungo em um nódulo fibrótico no pulmão, um desequilíbrio na relação entre hospedeiro e parasita pode ocorrer, e o paciente, então, evolui para os sinais e sintomas da doença. Sendo assim, apesar de o contato inicial do homem com o fungo e a infecção ocorrerem, muitas vezes, na infância, as manifestações clínicas da PCM, em geral, são vistas em pacientes adultos (Bisinelli *et al.*, 2002).

1.1.2.3 Diagnóstico

Embora esfregaço e cultura possam ser utilizados, há o inconveniente de o *Paracoccidioides* crescer lentamente. A biópsia é recomendada para o diagnóstico definitivo mostrando um granuloma supurativo com células gigantes e blastóporos,

estruturas como cistos, com aproximadamente 30 μ m de diâmetro, geralmente seguidos por esporos filhos (Bicalho *et al.*, 2001). Os testes sorológicos revelam a existência do micro-organismo antes mesmo dos exames cultural e histopatológico, e são de amplo uso na confirmação da doença (Blotta *et al.*, 1999). A glicoproteína de peso molecular 43 Kda (GP43) é um antígeno exocelular secretado durante a fase de infecção pelo *Paracoccidioides*. GP43 é o principal antígeno diagnosticado na PCM, em todas as formas clínicas, sendo reconhecidos nos mais variados testes sorológicos (Marques *et al.*, 2003). A detecção de anticorpos da classe IgM e IgA e a determinação sequencial desses anticorpos para a GP43 pode ser uma ferramenta útil para o sorodiagnóstico e avaliação da eficácia do tratamento (Mendes-Giannini *et al.*, 1990). Doenças com características clínicas semelhantes devem ser consideradas no diagnóstico diferencial da PCM tais como as manifestações estomatológicas de carcinoma espinocelular, histoplasmose, coccidioidomicose, sífilis, tuberculose, granulomatose de Wegener, leishmaniose e sarcoidose (Giovani *et al.*, 2000; Bicalho *et al.*, 2001; Sposto *et al.*, 1993)

1.1.3 Mecanismos de ação conhecidos dos antifúngicos

Os antifúngicos disponíveis pertencem às classes das sulfonamidas, azóis, polienos, fluorocitosina e equinocandinas. Os mais utilizados no tratamento da PCM são as sulfonamidas, polienos e azóis (Travassos *et al.*, 2008).

Sulfonamidas foi a primeira classe de fármacos disponíveis para o tratamento de pacientes com PCM, sendo utilizada sozinha, ou na combinação trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMT). É usada em pacientes com restrição à anfotericina B e aos imidazóis, e em pacientes que apresentam cardiopatia ou hepatopatia e com restrição de idade (Dillon *et al.*, 1986). Embora a resposta clínica inicial seja satisfatória, é necessário um longo período de tratamento, usualmente mais que dois anos, evidenciando a toxicidade do medicamento, o custo do tratamento, e as elevadas taxas de incompatibilidade com a terapia. As sulfonamidas atuam inibindo a síntese de ácido fólico competindo com o ácido p-aminobenzóico na reação catalisada pela dihidropteroato sintase, que envolve a condensação de ácido p-aminobenzóico e 6-hidroximetil-dihidropterina pirofosfato para produzir dihidropteroato. A inibição dessa reação leva à depleção de folato intracelular, o qual é essencial para o crescimento do organismo patogênico (Hong *et al.*, 1995).

Os polienos (anfotericina B e nistatina) são fungicidas que atuam aumentando a permeabilidade da membrana plasmática por se ligarem a esteróis de membrana,

principalmente ao ergosterol, esterol presente na membrana de fungos, comprometendo a integridade da membrana, e levando à morte celular (Beauvais e Latgé, 2001; Lyman e Walsh, 1992; Gallis *et al.*, 1990). Embora a anfotericina B seja o antifúngico mais utilizado no tratamento de micoses sistêmicas, seu uso clínico tem sido limitado devido ao alto nível de nefrotoxicidade (Wu *et al.*, 2004). A anfotericina B é geralmente utilizada em casos disseminados de PCM nos quais outras terapias não foram efetivas, ou em casos de intolerância a sulfonamidas ou sulfonas (Lortholary *et al.*, 1999).

Os azóis (fluconazol, itraconazol, cetoconazol, saperconazol e voriconazol) interagem com a enzima citocromo P-450 14- α -esterol demetilase (ERG11), a qual é essencial para a síntese do ergosterol, se ligando ao grupo heme no sítio ativo da enzima (Sanglard, 2002; Kelly *et al.*, 1993). Essa inibição causa a depleção de ergosterol e acúmulo de esteróis alterados na membrana (Geogopapadakou e Walsh, 1996). Embora a ERG11 também esteja envolvida na síntese de colesterol em mamíferos, os azóis apresentam uma afinidade significativamente maior pela enzima de fungos (Wu *et al.*, 2004). O N-substituído triazol itraconazol é um agente antifúngico de amplo-espectro disponível para uso oral nas formas de cápsula e solução para o tratamento e/ou profilaxia de aspergilose, blastomicose, infecções por *Candida* nas formas disseminada e superficial, cryptococose, esporotricose, dermatofitoses, histoplasmose, algumas formas de coccidioidomicose e PCM (Harousseau *et al.*, 2000; Odds, 1996).

O imidazol (cetoconazol) e os triazóis (fluconazol, saperconazol e itraconazol) têm sido utilizados para o tratamento da PCM (Fagunde-Pereyra *et al.*, 2006). Os azóis são altamente ativos contra determinados fungos em culturas *in vitro* e têm se mostrado efetivos para propósitos clínicos, apresentando menores efeitos adversos quando comparados à anfotericina B (Hahn e Hamdan, 2000). O itraconazol foi sugerido recentemente pela Sociedade Brasileira de Medicina Tropical como a melhor alternativa para terapia de primeira linha no tratamento da PCM (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

A 5-flucitosina (5-FC) é o único antimetabólito atualmente utilizado como um agente antifúngico (Krcmery, 2005). A 5-FC é captada pela célula do fungo através da citosina permease sendo convertida em 5-fluorouracil (5-FU) pela citosina deaminase e posteriormente em ácido 5-fluorouridílico, que é fosforilado e incorporado ao RNA interferindo na síntese protéica. O 5-FU também é convertido em monofosfato de 5-fluorodeoxiuridina, um potente inibidor da timidilato sintase, enzima envolvida na síntese de DNA e em processos de divisão nuclear (Carillo-Muñoz *et al.*, 2006).

A severidade da doença, o local da lesão e a contra-indicação para o uso de determinada medicação, baseado no histórico prévio de falha ou reação de hipersensibilidade, são os parâmetros considerados na escolha do antifúngico a ser utilizado na terapia (Yasuda, 2005). O tratamento da PCM é lento, iniciando com uma dosagem agressiva de agentes antifúngicos, se prolongando por meses ou anos, causando a frequente desistência do paciente (Mendes *et al.*, 1994; Hahn *et al.*, 2003).

O fato dos antifúngicos sintéticos não propiciarem uma cura efetiva (Karen *et al.*, 2004), o surgimento de isolados resistentes às classes de antifúngicos disponíveis (Hahn *et al.*, 2003), mesmo utilizando-se terapia combinada (Yasuda, 2005), e a alta toxicidade comprovada têm complicado o tratamento de pacientes, principalmente os imunocomprometidos (Corti *et al.*, 2003). Mesmo o antimetabólito 5-FC e o novo antifúngico da classe das equinocandinas têm sido utilizados com moderação, devido ao alto índice de isolados resistentes e ao limitado espectro de atuação (Krcmery, 2005; Messer *et al.*, 2004). Desta forma, torna-se relevante a necessidade de pesquisa e desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

1.1.4 Transcritoma e Proteoma do Fungo *Paracoccidioides*

A fim de estudar a expressão diferencial de genes de um organismo em um determinado processo ou tratamento, diversas técnicas têm sido utilizadas. Essas técnicas permitem detectar as mudanças na expressão de RNAm sem qualquer conhecimento prévio de informações da sequência dos genes específicos em questão. Um dos métodos utilizados para clonar genes diferencialmente expressos é a técnica do RDA (Hubank e Schatz, 1994). A técnica de RDA é um processo de subtração acoplado à amplificação, originalmente desenvolvido para uso com DNA genômico como um método capaz de identificar as diferenças entre dois genomas complexos (Hubank e Schatz, 1994). A fim de permitir análise de populações de RNAm diferencialmente expressos, Lisitsyn 1995 modificou o processo. Baseado em rounds sucessivos de hibridização subtrativa, seguido por PCR (reação em cadeia da polimerase), esta técnica possui a vantagem de elimina fragmentos presentes em ambas as populações de RNAm, deixando apenas os genes expressos diferencialmente.

O RDA se baseia na geração, por digestão com enzima de restrição e amplificação por PCR, de versões simplificadas dos transcriptomas sob investigação conhecidas como “representações”. Se um fragmento de restrição amplificável (o alvo) existe numa representação (*tester*) e está ausente em outra (*driver* – controle), um enriquecimento

cinético do alvo pode ser alcançado por hibridização subtrativa do *tester* na presença de um excesso de *driver*. Sequências com homólogos no *driver* não são amplificadas, enquanto o alvo hibridiza apenas com ele mesmo e retém a habilidade de ser amplificável por PCR. Interações sucessivas da subtração e o processo de PCR produzem fragmentos de cDNA visíveis num gel de agarose correspondendo ao alvo enriquecido (Hubank e Schatz, 1994).

Na técnica de RDA as populações de cDNA podem ser fracionadas por um número de enzimas de restrição com sequências curtas de reconhecimento para produzir conjuntos de cDNAs. Este aspecto do RDA melhora grandemente as chances de se clonar com sucesso espécies diferencialmente expressas. Além disso, pelo fato de que cada cDNA é restringido no seu comprimento para produzir fragmentos, o procedimento de RDA oferece múltiplas chances de se recuperar um gene de interesse. No entanto, assim como acontece em outras técnicas de obtenção de genes expressos diferencialmente, a técnica de RDA pode apresentar algumas desvantagens, como o aparecimento de falso-positivos, porém trata-se de um procedimento relativamente barato e rápido (Pastorian *et al.*, 2000).

A técnica de RDA tem sido utilizada visando o conhecimento de genes expressos em diversas condições. Bailão e colaboradores (2006) utilizaram a técnica de RDA a fim de identificar genes diferencialmente expressos de duas populações de cDNA, uma obtida a partir de células leveduriformes de *Paracoccidioides* provenientes de camundongos infectados e outra proveniente de células leveduriformes do fungo incubadas com sangue humano. As análises identificaram genes relacionados à aquisição de ferro, síntese de melanina e defesa celular.

Os genes envolvidos no processo infeccioso de *Trichophyton rubrum* foram analisados por Baeza e colaboradores (2007), utilizando a técnica do RDA a partir de duas populações de cDNA, uma proveniente de RNA extraído do fungo exposto à queratina e outra obtida de RNA extraído do fungo cultivado em meio mínimo. Genes relacionados à transdução de sinal, proteína de membrana, resposta a estresse oxidativo e alguns prováveis fatores de virulência se apresentaram super-expressos. A fim de identificar genes diferencialmente expressos entre as células leveduriformes de dois isolados diferentes de *Paracoccidioides*, isolados *Pb01*, que se apresenta com morfologia características de células leveduriformes, e o isolado *Pb4940*, que se apresenta tipicamente na forma miceliana, sem a presença de conversão para a fase leveduriforme ao se alterar a temperatura de cultivo, Borges e colaboradores (2010), utilizaram a técnica

de RDA. A técnica foi utilizada a fim de compreender os eventos moleculares que ocorrem no fungo durante a resposta ao aumento de temperatura e estabelecimento da fase leveduriforme do isolado *Pb01*. Nesse trabalho, o isolado *Pb01* foi utilizado como *tester* e o isolado *Pb4940* como *driver*. Um total de 258 clones se mostram super-expressos para o isolado *Pb01*, comparado ao isolado *Pb4940*, que correspondem a proteínas de membrana/parede celular, HSP30, C6 fator de transcrição (CTF1b) e fator de transcrição GATA (NSDD).

Faganello e colaboradores (2009) utilizaram a técnica de RDA a fim de isolar sequências que representam diferenças no DNA genômico de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. Nesse estudo foram sequenciados, cerca de 200 clones, que permitiram a identificação de 19 sequências diferentes em relação ao genoma de *C. neoformans*. Dentre as sequências identificadas, genes envolvidos com o polimorfismo em espécies de *Cryptococcus* foram observados, como o gene codificante para IDE e quitina sintase.

O mapeamento dos genes expressos por *Paracoccidioides* em diferentes condições tem sido objetivo de vários projetos transcritomas deste fungo. O Projeto Genoma Funcional e Diferencial foi desenvolvido visando uma melhor compreensão do metabolismo de *Paracoccidioides*, isolado *Pb01*, na fase de micélio e levedura. Nos transcritomas relativos às fases leveduriforme e miceliana foram sequenciados um total de 6.022 ESTs. Dentre os transcritos encontrados foram observados genes relacionados à virulência e potenciais alvos para drogas, como quitina deacetilase, isocitrato liase e α -1,3-glicana sintase, uma vez que eles não possuem homologia em humanos. As análises do transcritoma também revelaram alguns prováveis componentes das vias de sinalização, como Ca^{2+} /calmodulina-calcineurina, MAPKs e AMPc/proteína quinase, (Felipe *et al.*, 2005a; Felipe *et al.*, 2003).

Um total de 4.692 genes expressos na fase leveduriforme de *Paracoccidioides*, isolado *Pb18*, após infecção em camundongo foram identificados por Goldman e colaboradores (2003). Foram encontrados vários genes homólogos a *C. albicans* considerados fatores de virulência e envolvidos na patogenicidade.

Estudos realizados com *Aspergillus fumigatus* (Brownlee *et al.*, 2004) e *C. albicans* (Lock *et al.* 1998), os quais possuem o gene 4-HPPB, mostraram que NTBC exerce um efeito inibitório no crescimento desses fungos assim como observado por Nunes e colaboradores (2005) para *Paracoccidioides* na fase leveduriforme .

As técnicas de Hibridização Subtrativa por Supressão (SSH) e de microarranjo foram utilizadas por Marques e colaboradores (2004) para identificar genes que são preferencialmente expressos na fase leveduriforme de *Paracoccidioides*, isolado Pb18, quando comparado com a fase miceliana. Os genes CDII (cisteína dioxigenase), α -1,3-glucana sintase, CIT1 (citrato sintetase) e ERG25 apresentaram elevados níveis de expressão na fase leveduriforme de *Paracoccidioides*. Os genes codificantes para a tiredoxina peroxidase e glutamina-S-transferase, apresentaram uma expressão preferencial na fase leveduriforme de *Paracoccidioides*. Os produtos desses genes poderiam atuar como antioxidantes reduzindo os níveis de espécies reativas com oxigênio durante o crescimento da levedura.

Bastos e colaboradores (2007) avaliaram o perfil transcricional de *Paracoccidioides* durante a diferenciação morfológica de micélio para levedura, onde mostraram transcritos relacionados com a síntese de proteínas de membrana e de parede celular estão induzidos durante a diferenciação transitória de micélio para levedura após 22 horas, sugerindo que *Paracoccidioides* favorece o remodelamento de membrana e parede celular durante esse processo. Foram observados ainda, transcritos relacionados a prováveis fatores de virulência e ao sistema de transdução de sinal.

A análise do transcritoma de *Paracoccidioides* durante o processo infeccioso foi também realizada a fim de identificar as alterações na expressão gênica do fungo durante esse processo (Costa *et al.*, 2007). Um total de 4.934 ESTs de células leveduriformes de *Paracoccidioides*, isolado Pb01, provenientes de fígado de camundongo infectado foi sequenciado e anotado. Genes envolvidos no metabolismo anaeróbico da glicose, e alguns responsáveis pelo metabolismo de lipídios foram encontrados nesta condição.

Dentro deste aspecto observamos no trabalho de Gargano e colaboradores (1995) genes relacionados à via de biossíntese do Ergosterol como transcritos de ERG6 (esterol C-metil transferase) e ERG9 (esqualeno sintase). Além disso, precursores para biossíntese do ergosterol, também se mostraram aumentados durante o processo infeccioso, além transcritos relativos à enzima OLEI (Delta-9 ácido graxo desaturase), responsável pela fluidez da membrana em células animais e em microrganismos (Gargano *et al.* 1995).

Com o objetivo de identificar as respostas adaptativas de *Paracoccidioides* durante a infecção, Bailão e colaboradores (2006) utilizaram a técnica de RDA (Análise Diferencial Representacional), para analisar células leveduriformes de *Paracoccidioides*, provenientes de modelo animal e células leveduriformes do fungo incubado em sangue

humano. A gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH), uma adesina que se liga aos componentes da matriz extracelular e é capaz de mediar a aderência e internalização de *Paracoccidioides* em cultura de células *in vitro*, se apresentou induzida.

Em análises do perfil transcricional em células leveduriformes de *Paracoccidioides* após incubação com plasma humano foi possível detectar a super expressão de genes relacionados à síntese de proteínas, resposta celular à mudança de osmolaridade do meio, remodelamento celular e defesa. Os transcritos codificantes para enzimas da β -oxidação também se mostraram induzidos sugerindo que o fungo, nessa condição, desvie o seu metabolismo para a degradação de lipídios (Bailão *et al.* 2007).

Outro aspecto interessante estudado é a resposta transcricional de *Paracoccidioides* à internalização por macrófagos murinos analisado por Tavares e colaboradores (2007) que identificaram genes super-regulados, relacionados à biossíntese de aminoácidos e proteínas de choque térmico, sugerindo que estes genes são relevantes durante o processo de fagocitose por macrófago. Genes relacionados ao ciclo do glicoxilato também se apresentaram super-regulados, sugerindo que *Paracoccidioides* utilize essa via metabólica para obtenção de carbono durante a internalização por macrófagos (Derengowski *et al.*, 2008).

Borges e colaboradores utilizando a técnica do RDA entre os isolados *Pb01* e *Pb4940*, este último não sendo capaz de transitar para levedura, descobriu que durante essa fase de levedura alguns genes induzidos eram relacionados com resposta a estresse, virulência e desenvolvimento. Todos esses genes apoiam a concepção de que a fase de levedura pode potencialmente responder ao ataque das condições do hospedeiro. Genes chave nesse processo incluem proteínas de superfície, proteínas relacionadas a estresse, bem como proteínas envolvidas na morfogênese e controle transcricional (Borges *et al.* 2011a).

Deste modo podemos concluir que muitos trabalhos ao longo dos últimos anos têm descrito o perfil de expressão gênica de *Paracoccidioides* sob determinadas condições, com a finalidade de compreender a sua biologia. Em adição, outros métodos têm sido utilizados para análises da expressão de RNAm, como SAGE (análise serial da expressão gênica) (Velculescu *et al.*, 1995) e a tecnologia de microarranjos de DNA (Schena *et al.*, 1995 e Shalon *et al.*, 1996). Entretanto, a análise de RNAm não reflete diretamente o conteúdo de proteínas na célula (Graves e Haystead, 2002) e, além disso, alguns estudos têm mostrado a pequena relação entre os níveis de RNAm e de proteína (Gygi, 1999;

Ideker, 2001). Ainda, a função das proteínas pode ser modificada a nível pós-traducional e esta informação não é acessível nas análises transcricionais (Gygi *et al.*, 1999).

O perfil de expressão das proteínas altera-se em situações distintas em um mesmo organismo, constituindo-se um fluxo dinâmico respondendo a estímulos internos e externos. As proteínas envolvidas nos processos biológicos são detectadas devido a alterações quantitativas – pouco ou muito reguladas, aparecimento ou desaparecimento, e modificações pós-traducionais (Westermeyer *et al.*, 2002). A análise proteômica ganhou considerável atenção desde que foi revelado que o genoma humano consiste de poucos genes (cerca de 35.000) (Venter, 2001). Atualmente, o termo proteômica tem sido definido como a análise em grande escala de proteínas expressas por uma determinada célula, tecido ou organismo numa condição específica (Wilkins *et al.*, 1995).

Gradativamente os estudos proteômicos de fungos patogênicos dimórficos têm aumentado, acompanhando o desenvolvimento dos bancos de dados (Orsborn *et al.*, 2006; Teutschbein *et al.*, 2010; Xi *et al.*, 2007). A análise proteômica das proteínas citoplasmáticas de *Paracoccidioides* sob restrição do íon ferro foi avaliado por Parente *et al.* (2011). Enzimas da via glicolítica foram induzidas enquanto que várias enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico, ciclo do metilcitrato e glioxalato, e proteínas da cadeia transportadora de elétrons mostraram-se reprimidas.

Rezende *et al.* (2011) utilizaram a técnica de eletroforese bidimensional (2-DE) acoplada à identificação por espectrometria de massas MALDI-QTOF MS e MS/MS como ferramentas proteômicas para investigar o perfil de proteínas de *Paracoccidioides* durante a morfogênese de micélio para células leveduriformes 22 h após a transição.

Weber *et al.* (2012) avaliaram proteínas diferencialmente secretadas por micélio e levedura. Neste estudo, 160 proteínas foram identificadas, sendo 30 secretadas preferencialmente na fase miceliana e 24 na fase leveduriforme. As análises *in silico* mostraram que 65% das proteínas identificadas foram preditas serem secretadas por vias não convencionais. Adicionalmente, foi investigada a influência da inibição da secreção protéica em leveduras durante a fagocitose por macrófagos. Foi mostrado também neste trabalho que a adição de Brefeldina A ao meio de cultura diminuiu significativamente a quantidade de proteínas secretadas e de leveduras internalizadas por macrófagos, indicando que a secreção de proteínas por *Paracoccidioides* pode facilitar os estágios iniciais da invasão/colonização do fungo no hospedeiro.

Vallejo e colaboradores (2012) também utilizaram ferramentas proteômicas (LC-MS/MS) no intuito de caracterizar proteoma extracelular da fase leveduriforme de *Paracoccidioides Pb18*; foram identificadas 120 proteínas, sendo 75 extracelulares.

Grossklaus *et al.* (2013) avaliaram a resposta de *Paracoccidioides* ao stress oxidativo utilizando como estratégia a espectrometria de massas e submissão da massa monoisotópica dos peptídeos ao banco de dados do NCBI. As categorias com maiores frequências de proteínas/isoformas encontradas foram resgate, virulência celular e defesa, metabolismo e energia. O perfil metabólico foi caracterizado, verificando-se ativação da via das pentoses fosfato. Ensaio confirmatórios de atividade enzimática e citometria de fluxo confirmaram os dados obtidos, sugerindo que *Paracoccidioides* possui um amplo repertório antioxidante composto por diferentes proteínas que atuam de maneira complementar.

1.1.5 A Genômica na elucidação de mecanismos de ação de antifúngicos

Os agentes antifúngicos atuam através de uma variedade de mecanismos, alguns dos quais são pouco entendidos. Novas abordagens para caracterizar o mecanismo de ação de agentes antifúngicos são úteis no processo de desenvolvimento de antifúngicos. Um dos caminhos pelos quais as células se ajustam a mudanças ambientais é através da alteração do padrão de expressão de genes. Assim, a medida de mudanças na expressão de genes em exposição a antifúngicos pode ajudar a determinar como os antifúngicos e candidatos a antifúngicos trabalham em células e organismos. Nesse sentido, alterações no perfil de expressão de genes de fungos têm sido estudadas (Liu *et al.*, 2005; Agarwal *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2007).

Utilizando esse enfoque, estudos do perfil genômico foram realizados para avaliar o efeito da anfotericina B, 5-FC, e vários azoles em *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* (Bammert e Foster, 2000; De Backer *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002; 2002a). Esses estudos forneceram uma excelente visão geral dos genes com alteração no perfil de expressão em resposta ao tratamento com esses antifúngicos. Entretanto, esses estudos utilizaram concentrações inadequadas para uma comparação apropriada entre as drogas.

Visando fazer uma análise comparativa entre as drogas utilizadas num mesmo estudo, os genes de *S. cerevisiae* foram investigados em resposta aos representantes das classes dos polienos, pirimidinas, azoles, e equinocandinas. Nesse estudo foi demonstrado que diferenças nas condições ambientais, tais como meio de crescimento, concentração de antifúngico, e período de exposição ao antifúngico pode contribuir para

alterações na expressão dos genes. Foram identificadas alterações classe-específica e mecanismo-independente. Genes responsivos a cetoconazol, caspofungina, e 5-FC indicaram efeitos droga-específico. A exposição do cetoconazol afetou genes primariamente envolvidos na biossíntese e captação do ergosterol; exposição à caspofungina afetou genes envolvidos na integridade da parede celular; e 5-FC afetou genes envolvidos na síntese de proteína e DNA, reparo a dano no DNA, e controle do ciclo celular. Ao contrário, alterações induzidas por anfotericina B na expressão de genes foram relacionadas ao estresse celular, reconstrução de membrana celular, transporte, captação de fosfato, e integridade da parede celular. Embora tenham sido identificados genes com maior especificidade para um antifúngico em particular (genes antifúngico-específicos), também foram encontrados genes sem especificidade para as classes de antifúngicos. Os resultados obtidos forneceram novas informações sobre o mecanismo de ação dessas classes de agentes antifúngicos e demonstraram o potencial de utilização do perfil de expressão de genes no desenvolvimento de drogas antifúngicas (Agarwal *et al.*, 2003).

Estudos similares foram desenvolvidos para *C. albicans* utilizando as mesmas classes de antifúngicos e condições similares de crescimento. Foram encontradas similaridades, mas também diferenças, entre *S. cerevisiae* e *C. albicans*, na resposta a esses agentes antifúngicos. Os experimentos do perfil de expressão gênica revelaram respostas antifúngico-específica consistentes com seu mecanismo de ação, respostas indicativas de outras vias que devem ser afetadas por esses agentes, e respostas que refletem mecanismos conhecidos e potenciais de resistência a esses agentes antifúngicos (Liu *et al.*, 2005).

Análise do transcrito de *Aspergillus fumigatus*, um fungo filamentoso, exposto a voriconazol revelou que a expressão do RNAm de vários genes é dependente da via de sinalização por proteína quinase-AMP cíclico conservada evolutivamente, auxiliando no entendimento de como o fungo se torna resistente ao voriconazol (Ferreira *et al.*, 2006). Estudos utilizando microarranjos com o objetivo de avaliar o perfil transcricional de *Trichophyton rubrum* em resposta a cetoconazol e anfotericina B revelaram resultados consistentes com os mecanismos de ação conhecidos. Entretanto, houveram também achados específicos em *T. rubrum* que diferiram dos resultados obtidos em trabalhos anteriores para outros fungos (Yu *et al.*, 2007).

S. cerevisiae é um excelente organismo modelo para estudar ação de antifúngicos devido ao seu genoma ter sido totalmente sequenciado e bem caracterizado, e também ao

desenvolvimento de microarranjos, possibilitando monitorar globalmente alterações na expressão de genes em resposta a uma variedade de condições experimentais. Em adição, existe a disponibilidade de estoque de mutantes com genes deletados, facilitando a validação de novas hipóteses geradas pelos experimentos de microarranjos (Viscoli *et al.*, 1999). Entretanto, os trabalhos acima demonstraram a importância da realização desses estudos em outros fungos de relevância.

1.2 Caracterização de Alvos para Agentes Antifúngicos

1.2.1 Ciclo do Glioxalato

Para muitos organismos a fonte de carbono preferencial é a glicose. Esta pode ser convertida em um açúcar contendo cinco carbonos, tais como ribose e desoxirribose, através da via pentose fosfato ou ser catabolizada para piruvato e posteriormente acetil-CoA através da glicólise. O acetil-CoA entra para o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) (Figura 2), onde é convertido através de oito passos enzimáticos, em intermediários que alimentam numerosas vias, incluindo as vias de biossíntese de aminoácidos, ácidos graxos e glicose (Lorenz e Fink, 2002).

O TCA resulta na geração de moléculas produtoras de energia, e também atua como reservatório de precursores metabólicos essenciais, para a síntese de aminoácidos, ácidos graxos e açúcares. Este ciclo pode ser regulado, e as enzimas envolvidas podem ser aumentadas ou diminuídas de acordo com a necessidade da célula (Hamel e Appanna, 2001).

Nos animais, um dos primeiros eventos da infecção fúngica é o englobamento do micro-organismo pelos macrófagos. O interior dos macrófagos apresenta glicose limitante, por isso o fungo induz a produção de enzimas que lhe permitam a utilização de outras fontes de carbono presentes nos macrófagos, incluindo os lipídios (Selitrennikoff e Nakata, 2003). Assim, na busca de novas fontes de carbono, fungos e muitos outros micro-organismos procariotos e eucariotos utilizam etanol, acetato e ácidos graxos. Para utilização destes compostos formados por dois carbonos é requerido um ciclo ausente em mamíferos, o Ciclo do Glioxalato (CG) (Figura 2) (Nakata e Selitrennikoff, 2002).

O CG é uma via alternativa para o TCA que permite a oxidação de acetato para formação de ácidos dicarboxílicos (succinato, malato e oxalacetato) (Flavell e Wooward, 1970), ou seja, a função do CG é sintetizar compostos contendo 4 carbonos a partir de compostos contendo 2 carbonos, tais como acetato e etanol (Kornberg, 1966). Neste

processo participam enzimas comuns ao TCA e também as específicas do CG, a Isocitrato Liase (ICL) e a Malato Sintase (MLS). A enzima ICL catalisa a reação de clivagem do isocitrato a succinato e glioxalato. Em seguida, a enzima MLS condensa o glioxalato com acetil-CoA formando o malato (Kornberg, 1966), o qual é convertido em oxaloacetato, seguindo-se as etapas enzimaticamente idênticas às do TCA resultando na regeneração do isocitrato (Lorenz e Fink, 2002).

Em plantas, o CG é processado para a conversão de acetil-CoA produzido pela β -oxidação de ácidos graxos em oxaloacetato, e subsequentemente em açúcar (Smith, 2002). Nas células eucarióticas o ciclo localiza-se em peroxissomos especializados, denominados de glioxissomos; em procariotos o CG ocorre no compartimento citosólico (Trelease *et al.*, 1974).

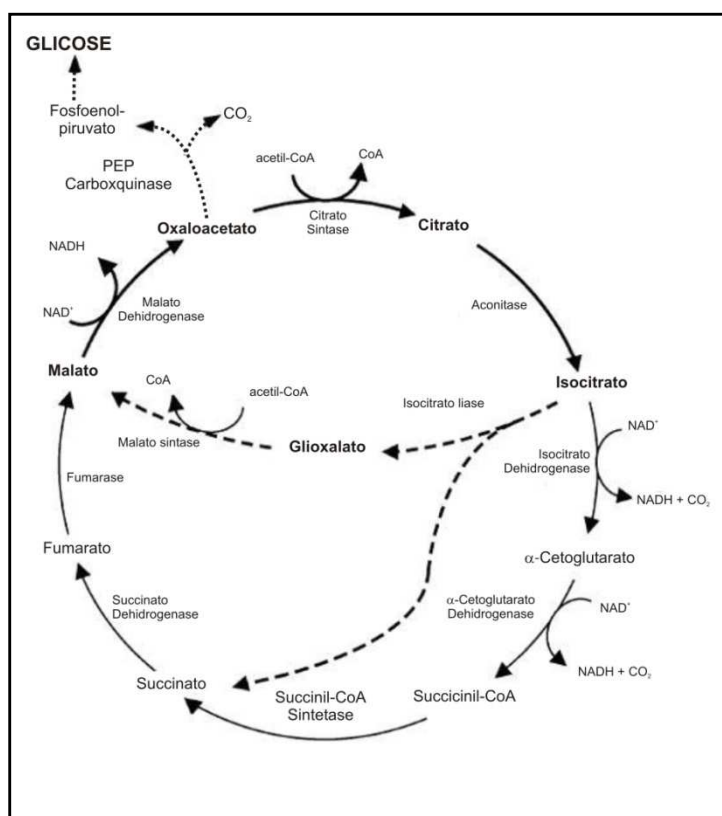


Figura 2 – Esquema representativo do ciclo do ácido tricarboxílico, ciclo do glioxalato e gliconeogênese. Estão evidenciados os passos enzimáticos básicos no ciclo do ácido tricarboxílico (linhas finas), o qual é comum para todos os organismos; passos no ciclo do glioxalato (linhas tracejadas), que é comum para microorganismos e plantas, e os passos compartilhados pelos dois ciclos (linhas grossas) e a reação inicial de gliconeogênese (linhas sombreadas). Fonte: Lorenz e Fink (2002). Life and Death in a Macrophage: Role of the Glyoxylate Cycle in Virulence. Eukaryotic Cell. 657-662.

O CG possui um papel importante na gliconeogênese (Kornberg e Beevers, 1957), visto que o primeiro passo comprometido nessa via é a conversão de oxaloacetato à fosfoenolpiruvato através da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEP

carboxinase). Essa enzima e a frutose-1,6-bifosfatase são as mais importantes na gliconeogênese por atuarem como regulatórias na produção de glicose. Em *S. cerevisiae*, sob fagocitose, frutose-1,6-bifosfatase (FBP1) é altamente induzida (Lorenz e Fink, 2001), validando a idéia de que o primeiro objetivo na indução do CG é a produção de glicose. Macrófagos são deficientes em glicose, e sua produção é a principal função do CG (Lorenz e Fink, 2001). Dado que a fagocitose de *C. albicans* promove indução de enzimas do CG, sugere-se que a aquisição e o uso dos nutrientes sejam prioritários em células leveduriformes sob fagocitose. Em adição, o macrófago é pobre em compostos carbônicos complexos e rico em ácidos graxos e seus produtos de degradação, primeiramente acetil-CoA, que somente é assimilado através do CG, sendo a única rota de síntese de glicose neste ambiente (Cozzzone, 1998).

O CG e as enzimas ICL e MLS são importantes para a virulência de muitos patógenos, como *Mycobacterium tuberculosis* (Mickinney *et al.*, 2000), *C. albicans* (Lorenz e Fink, 2002) e *C. neoformans* (Rude *et al.*, 2002). A indução de genes do CG foi observada por RT-PCR em *Paracoccidioides*, mostrando que os níveis de transcrição de genes da *icl* e *mls* neste fungo aumentaram após a fagocitose por macrófagos murinos (Derengowski *et al.*, 2008). Igualmente, em *C. albicans* e *S. cerevisiae* após fagocitose por macrófagos, as principais enzimas do CG mostraram-se supra reguladas (Lorenz e Fink, 2002). Desta forma, esses micro-organismos são capazes de obter glicose e consequentemente sobreviver no interior de macrófagos. Entretanto, o mesmo não é observado em resposta a meios condicionados, estresse oxidativo, ou contato com macrófagos inativados por aquecimento (Lorenz e Fink, 2001) embora seja amplamente aceito que o ciclo do glioxalato opera em bactérias, fungos, alguns protistas e plantas, a alegação de que esse ciclo é funcionalmente ativo em animais superiores permanece controverso (Kondrashov *et al.*, 2006).

Diante do exposto acima podemos concluir que o CG é uma via metabólica importante, uma vez que há evidências da sua importância em muitos sistemas hospedeiro-patógenos e o conhecimento sobre o papel desta via em patogênese é fundamental, já que proporciona o desenvolvimento de inibidores específicos das enzimas ICL e MLS que poderiam ser usados para combater doenças fúngicas e bacterianas (Dunn *et al.*, 2009).

1.2.2 Malato Sintase

O CG nos fungos é normalmente processado nos peroxissomos. A enzima MLS está localizada nos peroxissomos em todos os organismos eucariotos estudados até o momento, porém estudos recentes mostraram que a MLS de *Paracoccidioides* (PbMLS) também é localizada na parede celular (Neto *et al.*, 2009).

A enzima MLS catalisa a reação de condensação que produz malato a partir de acetil-CoA e glioxalato. Essa reação é altamente específica para esses substratos e requer Mg^{2+} como o cofator (Nogales *et al.*, 2004) com base nas características das sequências de aminoácidos, as MLSs podem se dividir ainda, em duas principais famílias, isoformas A (MSA) e G (MSG). MSA, com massa molecular em torno de 65 kDa, ocorre em bactérias, como por exemplo, *E. coli* (Kornberg, 1966) e fungos, como *S. cerevisiae* (Lorenz e Fink, 2001); MSG possui massa molecular em torno de 80 kDa, ocorrendo somente em bactérias (Nakazawa *et al.*, 2005).

Em *E. coli*, encontramos descrito duas classes de MLSs, sendo codificadas por genes diferentes. *aceB* codifica a forma A, a qual é predominante em células crescidas em meio contendo acetato, e *glcB* codifica a forma G, uma proteína monomérica a qual é induzida pelo glicolato (Molina *et al.*, 1994). Em *E. coli*, o operon *aceBAK* contendo os genes *ICL* (*aceA*) e *MLS* (*aceB*) é reprimido por glicose e induzido por acetato ou ácidos graxos (Clark e Cronan, 1996). *Deinococcus radiodurans* possui duas MLSs, as quais estão localizadas em cromossomos diferentes (Wang *et al.*, 2003).

A estrutura tridimensional de MSG de *E. coli* foi elucidada através de Ressonância Magnética Nuclear (NMR) (Tugarinov *et al.*, 2002). MSG se apresenta como uma proteína globular multimérica; sua estrutura é baseada no enovelamento $\beta 8/\alpha 8$ (TIM barril). O domínio C-terminal da enzima (resíduos 589-722) consiste de cinco hélices, as quais se encaixam no final do barril dentro do loop C-terminal das folhas β . Essa ligação é conectada ao barril por um loop-hélice-turn-hélice-loop (Howard *et al.*, 2000).

É descrito que sítio ativo de MLSG de *E. coli* está localizado em uma cavidade na interface entre a região C-terminal e os loops no final da região C-terminal das folhas β do TIM barril (Howard *et al.*, 2000). Essa posição do sítio ativo está coerente com as posições descritas em outras enzimas que contêm o TIM barril. Este sítio ativo está localizado dentro dos *loops* no final do barril (Branden and Tooze, 1991). Em *E. coli*, os resíduos conservados do sítio ativo, Glu427 e Asp455, os quais se ligam ao íon magnésio, Arg338 que uni o hidrogênio ao oxigênio aldeídico do glioxalato, e a base catalítica

proposta, Asp631, são conservados entre as sequências de MLSs conhecidas. Os domínios críticos para a atividade de MLS parecem ser o domínio do barril e a ligação C-terminal que cobre o sítio ativo, e que também contribui para a base catalítica proposta (Asp631) o domínio C-terminal é composto por 589 resíduos; o loop formado pelos resíduos 577-588 parece ser flexível, permitindo o movimento do domínio para o restante da enzima. Tal movimento permite a abertura do sítio ativo para entrada do substrato e liberação do produto (Howard *et al.*, 2000).

Em *Fomitopsis palustris*, um fungo basidiomiceto, a MLS apresenta-se na forma de um octâmero, com massa molecular de 520 kDa, distribuídas em oito subunidades de 65 kDa. Esta enzima apresentou afinidade para ambos os substratos, glioxalato (K_m de 45 μ M) e acetil-CoA (K_m de 2,2 μ M) (Munir *et al.*, 2002).

A sequência codificante para a enzima malato sintase de *Paracoccidioides* (PbMLS), foi clonada e caracterizada por Zambuzzi-Carvalho *et al.* (2009). O cDNA apresenta 1882 pares de bases, incluindo uma ORF de 1617 pares de bases. A sequência deduzida da proteína é constituída por 539 resíduos de aminoácidos com uma massa molecular predita de 60 kDa, pI de 8.45. A proteína apresenta assinatura característica da família das MLSs, resíduos catalíticos essenciais para a atividade enzimática, e sinal PTS1 de localização peroxissomal/glioxissomal (Zambuzzi-Carvalho *et al.*, 2009).

Pbmls tem motivos que poderiam indicar sua regulação por fontes de carbono e nitrogênio. Além disso, todas as enzimas envolvidas no metabolismo de purinas para formar glioxalato foram encontradas em transcritomas de *Paracoccidioides* (Costa *et al.*, 2007, Bastos *et al.*, 2007). Os dados sugerem que *PbMLS* condensa acetil-CoA a partir de compostos contendo dois carbonos na forma de acetato e etanol (Andrade *et al.*, 2005). Na presença de fontes de nitrogênio, o glioxalato produzido do metabolismo de prolina e purina é condensado com acetil-CoA produzindo malato por ação de *PbMLS*. A regulação de *Pbmls* por fontes de carbono e de nitrogênio é reforçada pela presença de motivos reguladores encontrados na região de promotora do gene (Zambuzzi-Carvalho *et al.*, 2009).

Neto *et al.* (2009) demonstraram que *PbMLS* está associada à parede de *Paracoccidioides*, onde é capaz de se ligar a componentes da matriz extracelular, como fibronectina e colágeno tipo I e IV. Além disso, foi demonstrado que a MLS é capaz de mediar a aderência e internalização de *Paracoccidioides* às células cultivadas *in vitro*, o que sugere o seu papel potencial no estabelecimento da infecção.

1.2.3 Isocitrato Liase

A isocitrato desidrogenase (IDH) e a isocitrato liase são enzimas que utilizam o mesmo substrato, o isocitrato. Em *E. coli* crescida em acetato, o fluxo de carbono se divide entre o ciclo do glioxalato e o ciclo do ácido tricarboxílico. Essa divisão é regulada pela inativação da IDH através de fosforilação reversível. Esse processo proporciona ao ciclo do glioxalato a utilização do isocitrato em diferentes condições, como variações de fontes de carbono (Cozzone, 1998).

As isocitrato liases apresentam comportamento diferenciados durante o processo de infecção. Em *C. albicans* e *M. tuberculosis*, a isocitrato liase é induzida após o microrganismo ser fagocitado por macrófagos. Durante testes in vivo com *Cryptococcus neoformans* e *S. cerevisiae* a ausência de isocitrato liase não afetou a adaptação e virulência desses microrganismos, sugerindo assim que a isocitrato liase e o ciclo do glioxalato são importantes para a virulência desses microrganismos, mas nem sempre são essenciais nesse processo (Lorenz e Fink, 2002).

As isocitrato liases da maioria dos microrganismos são induzidas na presença de etanol e têm sua expressão inibida na presença de glicose. Em *A. fumigatus*, a presença ICL e conídios, sugerem que lipídios podem servir como fonte de carbono durante a germinação. A presença de ICL em organelas foi observada no fungo apenas durante o crescimento em condições que requerem o ciclo do glioxalato, como por exemplo, a presença de acetato (Ebel *et al.*, 2006).

A fosforilação da isocitrato liase também tem sido associada a mecanismos regulatórios. Em *E. coli*, a fosforilação da enzima resultou na ativação da mesma, e após ser desfosforilada a enzima tornou-se inativa (Robertson *et al.*, 1988). De forma contrária, em *S. cerevisiae* a isocitrato liase fosforilada na presença de glicose apresentou um decréscimo na atividade enzimática tendendo à inativação (Lopez-Boado *et al.*, 1988).

A enzima isocitrato liase de *Paracoccidioides* (*PbICL*) apresenta uma ORF de 1614 pares de base, foi realizada também a expressão heteróloga da *PbICL*, determinando uma massa molecular de 60 kDa, sendo que, a *PbICL* predita apresenta homologia com ICLs de outros fungos. Análises da atividade de *PbICL* confirmam a indução da enzima na presença de acetato de potássio, ácido glicólico, etanol e reprimida na presença de glicose, principalmente após 24h de crescimento do fungo nestas condições. A presença de proteínas com diferentes valores de pIs nas análises de

Western blot sugerem regulação pós-traducional da proteína *PbICL* em nível de fosforilação (Cruz *et al.*, 2011).

As isocitrato liases têm sido descritas em bactérias, arqueobactérias, fungos, plantas (Nakazawa *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2003; Maharjan *et al.*, 2004; Ebel *et al.*, 2006; Ying *et al.*, 2005) e também em animais invertebrados e vertebrados (Morgunov *et al.*, 2005; Popov *et al.*, 1998; Van Eyk *et al.*, 1993). Essas enzimas apresentam um hexapeptídeo conservado, K(KR) CGH (LMQR), descrito como motivo característico das isocitrato liases (Wang *et al.*, 2003). As isocitrato liases geralmente são compostas por quatro subunidades idênticas tanto em procariotos como em eucariotos. As isocitrato liases possuem massas moleculares consideravelmente diferentes nesses organismos; bactérias possuem isocitrato liases com subunidades de aproximadamente 47 kDa e eucariotos possuem subunidades com massas moleculares variando entre 60 e 64 kDa (Nakazawa *et al.*, 2005).

Munoz-Elias e McKinney (2005), através de análises de bioinformática, mostram a presença de três grupos de proteínas isocitrato liases que se diferem em relação ao tamanho e organização do domínio. O grupo I, representado pelas eubactérias, compreende as isocitrato liases pequenas; o grupo II, composto por fungos e plantas, as isocitrato liases médias; o grupo III, identificado somente em *Mycobacterium*, é formado por isocitrato liases grandes. O grupo II apresenta uma região central ausente no grupo I, e o grupo III possui uma sequência C-terminal ausente nos grupos I e II.

1.3 Componentes de Matriz Extracelular

A matriz extracelular (MEC) é uma rede complexa de macromoléculas que proporciona um arcabouço físico para a estabilização da estrutura tecidual e modula o comportamento celular. Essa matriz é composta por uma grande variedade de proteínas e de polissacarídeos que são secretados localmente e formam uma rede organizada, em estreita associação com a superfície celular que os produz. A matriz extracelular do tecido conectivo é rica em polímeros fibrosos, especialmente colágeno, suportando a maioria dos estresses mecânicos sofridos pelo tecido.

No tecido epitelial, as células estão ligadas fortemente formando diferentes camadas, uma delas é a matriz extracelular a qual consiste basicamente de uma cobertura fina chamada lâmina basal, responsável por dar suporte ao tecido. A matriz extracelular possui um importante papel nas interações entre as células, fornecendo condições às mesmas para aderirem e proliferarem, modulando diretamente a forma e funções

celulares. As principais classes de macromoléculas presentes na matriz extracelular são as cadeias de polissacarídeos da classe das glicosaminoglicanas, encontradas normalmente ligadas às proteínas formando proteoglicanas, e as proteínas fibrosas, as quais desempenham funções estruturais como o colágeno e as proteínas adesivas, incluindo nessa classe, fibronectina e laminina (Verstrepen e Klis, 2006).

Fibronectina é uma glicoproteína de 440 kDa, presente na forma solúvel no plasma sanguíneo, bem como em outros fluídos corporais, ativando a coagulação, e na forma fibrilar, como componente essencial da matriz extracelular de diversos tecidos (Mohri 1996). Essa glicoproteína atua como adesina contribuindo para a organização da matriz extracelular no processo que envolve a ligação de receptores específicos da superfície celular com domínios presentes na molécula de fibronectina (Butler *et al.*, 2008).

Laminina é uma glicoproteína encontrada na matriz extracelular, possui massa molecular em torno de 900 kDa, apresenta diferentes isoformas, é um dos principais constituintes da membrana basal, e está presente em quase todos órgãos, principalmente nos pulmões (Lebleu *et al.*, 2007). A laminina associa-se a receptores da superfície celular interligando a membrana basal à camada de células adjacentes (Schéele *et al.*, 2007).

Células que são capazes de migrar da corrente sanguínea para os tecidos, como os macrófagos, leucócitos e células tumorais metastáticas, também podem exibir esses receptores (Wright *et al.*, 2008). A interação da laminina com outras macromoléculas da matriz é importante para definição da forma, movimento celular, sendo também crucial em vários processos biológicos que requerem adesão celular, tais como, diapedese, coesão celular dentro do tecido, metástase de células cancerosas e infecções (Beck *et al.*, 1990; Colognato e Yurchenco, 2000).

Colágeno é a proteína mais abundante em mamíferos sendo o principal constituinte da matriz extracelular e representando um importante alvo para a adesão de muitas espécies de microrganismos (Vakonakisa e Campbell, 2007). Existem atualmente mais de vinte tipos de colágeno caracterizados, sendo os mais importantes nos processos de adesão de patógenos o colágeno tipo IV, que é encontrado principalmente na lâmina basal, um dos componentes da membrana basal dos epitélios e o colágeno tipo I que é o mais abundante na constituição da matriz intersticial de vários tecidos, sempre formando fibras e feixes resistentes (Gil *et al.*, 1996). Como constituintes das matrizes extracelulares, os colágenos já foram descritos como alvos para adesão de células tumorais (Kazarian *et al.*, 2003) e de proteínas de microrganismos como *Leptospira*

(Atzingen *et al.*, 2008), *Bartonella henselae* (Dabo *et al.*, 2006), *Paracoccidioides* (Barbosa *et al.*, 2006), aumentando sua capacidade de invasão.

1.3.1 Moléculas envolvidas no processo de adesão de fungos

Os fungos dimórficos utilizam uma variedade de moléculas de superfície para se ligar à matriz extracelular da célula hospedeira e estabelecer a infecção (Lengeler *et al.*, 2000). As moléculas de adesão celular são glicoproteínas expressas na superfície celular, onde mantém o contato entre duas células ou entre células e a matriz extracelular. Um grande número de moléculas que se comportam como adesinas em fungos patogênicos têm sido estudadas, uma vez que o processo de adesão de microrganismos às proteínas da matriz extracelular é bastante importante para o estabelecimento do processo infectivo nos tecidos do hospedeiro (Patti *et al.*, 1994).

C. albicans possui uma família gênica denominada ALS (Agglutinin-Like Sequence), composta por oito genes, os quais codificam para proteínas capazes de influenciar na aderência do fungo (Sheppard *et al.*, 2004; Filler 2006). A deleção dos genes ALS1 e ALS3 ocasionaram na redução da capacidade de aderência dos mutantes às células endoteliais da veia umbilical humana e células de epitélio bucal, em relação ao tipo selvagem (Zhao *et al.*, 2004). No genoma de *C. glabrata* foram encontrados vinte e três membros da adesina epitelial (EPA), que são responsáveis pela aderência do fungo às células do hospedeiro (Kaur *et al.*, 2005). A função de adesina foi confirmada para três membros da família EPA (EPA1, EPA6, EPA7); essas proteínas continham ligantes que se aderiram ao resíduo terminal galactose contribuindo para a aderência de células epiteliais e endoteliais *in vitro* (Zupancic *et al.*, 2008).

Penicillium marneffei é o agente etiológico de uma micose conhecida como peniciliose, a qual apresenta manifestações clínicas como febre, anemia, perda de peso, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. A habilidade de *P. marneffei* em iniciar a infecção está relacionada com a capacidade de adesão de seus esporos às moléculas da MEC e ao tecido epitelial pulmonar. Ensaios de adesão, demonstraram a participação de uma proteína de 20 kDa, caracterizada como um ligante de laminina e fibronectina, potencialmente relevante no processo de adesão de *P. marneffei* ao tecido hospedeiro (Srinouprasert *et al.*, 2006).

A capacidade do *Histoplasma capsulatum* interagir com a laminina é um importante mecanismo para estabelecer a histoplasmose. Estudos onde o fungo foi colocado em contato com laminina imobilizada demonstraram que *H. capsulatum*

interage com a proteína de maneira rápida e específica. A presença do anticorpo anti-laminina inibiu significativamente a adesão do fungo. Essa adesão é mediada possivelmente por uma glicoproteína de 50 kDa identificada na parede celular de *H. capsulatum*. O anticorpo anti-proteína de 50 kDa e o peptídeo IKVAV presente na molécula de laminina foram capazes de inibir a adesão do fungo à laminina (McMahon *et al.*, 1995).

O fungo *Sporothrix schenckii*, o qual comumente acomete indivíduos imunocomprometidos é o causador da esporotricose, uma micose subcutânea, que pode se disseminar por vários tecidos e órgãos. Estudos de interação entre *S. schenckii* e proteínas da MEC mostraram que o fungo foi capaz de se aderir à laminina, colágeno e fibronectina, e que essa interação foi mediada por moléculas de 90 e 135 kDa localizadas na superfície do fungo.

A colonização eficiente dos tecidos por fungos patogênicos é um evento complexo, que envolve geralmente adesinas codificadas pelo patógeno. *Paracoccidioides* tem a capacidade de atravessar rapidamente as células endoteliais e provavelmente alcançar tecidos mais profundos do hospedeiro (Silva *et al.*, 2005). Os componentes da MEC envolvidos na interação de *Paracoccidioides* com o hospedeiro têm sido recentemente caracterizados (Mendes-Giannini *et al.*, 2006).

Uma glicoproteína de 43 kDa (gp43) tem sido descrita como uma importante adesina determinante da patogenicidade de *Paracoccidioides* (Carvalho *et al.*, 2005; Cislupino *et al.*, 1996), e com a capacidade de interagir com fibronectina (Mendes-Giannini *et al.*, 2006) e com laminina (Vicentini *et al.*, 1994). Foi demonstrado que a interação da gp43 com a laminina foi inibida *in vivo* e *in vitro* por anticorpos anti-gp43 (Vicentini *et al.*, 1994; Gesztes *et al.*, 1996). A laminina é uma das principais moléculas que promovem a adesão de *Paracoccidioides*, facilitando a sua patogenicidade (Mendes-Giannini *et al.*, 2008).

Andreotti *et al.* (2005) descreveram moléculas de *Paracoccidioides* provavelmente envolvidas no processo de adesão do fungo. Esses autores isolaram uma adesina de *Paracoccidioides* de 30 kDa com a capacidade de se ligar à laminina. O tratamento de células epiteliais em cultura com as adesinas de laminina de *Paracoccidioides* de 30 kDa, inibem a adesão desse fungo às células epiteliais. Em outro estudo, outras duas proteínas de superfície celular de *Paracoccidioides* com massas moleculares de 19 e 32 kDa apresentaram interação com diferentes proteínas da matriz extracelular, tais como laminina, fibrinogênio e fibronectina (González *et al.*, 2005).

Estudos experimentais de PCM utilizando camundongos BALB/c, com o tratamento prévio de conídios (forma infectante) do fungo com laminina, fibronectina e fibrinogênio promoveram um menor dano tissular nos pulmões, baço e fígados analisados por exame histopatológico no período pós-infecção, comparado aos órgãos de animais não tratados. Assim, os componentes da matriz extracelular bloqueariam moléculas na superfície dos conídios de *Paracoccidioides* que estariam atuando como fatores de adesão, diminuindo o potencial do patógeno de aderir e disseminar no foco inicial de infecção (González *et al.*, 2008).

No ciclo biológico de *Paracoccidioides*, as leveduras são expostas ao hospedeiro, portanto suas proteínas de superfície são fortes candidatas a antígenos e moléculas de adesão. Barbosa *et al.* (2006) verificaram que a expressão da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) recombinante de *Paracoccidioides* em leveduras é importante para a adesão do fungo às células do hospedeiro. A GAPDH se localiza no citoplasma, na camada mais externa da parede celular e interage com proteínas da matriz extracelular, tais como laminina, fibronectina, desencadeando uma resposta na célula hospedeira no estágio inicial da infecção. Dfg5p, uma proteína relacionada com a formação e manutenção da parede celular de fungos, estando presente na fase leveduriforme de *Paracoccidioides*. Dfg5p apresenta motivo RGD em sua sequência predita. Essa proteína liga-se à laminina, fibronectina e ao colágeno tipo I e IV evidenciando um importante papel da Dfg5p na interação do *Paracoccidioides* com as células do hospedeiro (Castro *et al.*, 2008).

Outra possível adesina de *Paracoccidioides* é a triose fosfato isomerase (TPI), uma enzima da via glicolítica, que está localizada no citoplasma, e também na parede celular da fase leveduriforme do fungo. Assim, a TPI pode estar envolvida na interação do *Paracoccidioides* com componentes da matriz extracelular como laminina e fibronectina. Essa interação pode ser crucial na aderência e invasão do fungo a tecidos do hospedeiro (Pereira *et al.*, 2007).

Neto *et al.* (2009) mostraram, recentemente, que a MLS de *Paracoccidioides* (PbMLS) se encontra associada à superfície celular do fungo, onde foi capaz de se ligar a componentes da matriz extracelular. A propriedade de adesina de PbMLS foi demonstrado através de *Far-Western*, ELISA e ensaios de ligação, que mostraram que a proteína recombinante reconheceu as proteínas presentes na matriz extracelular, fibronectina e colágeno tipo I e IV, assim como células epiteliais pulmonares. Esse

evento indica que *PbMLS* pode ter um papel de interação do fungo com componentes do hospedeiro.

1.4 Considerações sobre os Alcalóides

Os alcalóides podem ser encontrados predominantemente em angiospermas, principalmente nas famílias Apocynaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae, Rubiaceae, Solanaceae e Berberidaceae. São compostos nitrogenados que podem ser definidos como uma substância orgânica cíclica contendo um nitrogênio em um estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos, englobando a maioria dos compostos considerados como alcalóides (Pelletier, 1983 apud Bhat *et al.*, 2007).

O gênero *Palicourea* (Rubiaceae) compreende cerca de 230 espécies entre arbustos e pequenas árvores distribuídas, principalmente, nas regiões tropicais. Apesar de incluir plantas tóxicas para bovinos, tem sido usado na medicina tradicional para tratamento de infecções fúngicas, tosse, dores de estômago (El-Seed, 1999) e como agente antitumor (Hartwell, 1972). A família Rubiaceae produz alcalóides pertencentes a mais de dez classes diferentes, onde se destacam: os isoquinolínicos, com 44 substâncias elucidadas; os quinolínicos com 70 alcalóides; e os indólicos, com 391 compostos isolados (Cordell *et al.*, 2001).

Quimicamente esse gênero caracteriza-se por biossintetizar alcalóides indólicos contendo uma unidade secologanínica, classe de substâncias extremamente importante do ponto de vista biológico (Dusman *et al.*, 2004). Adicionalmente, tem se observado na literatura, o relato da presença de alcalóides pirrolindólicos (Nakano e Martín, 1976), terpenóides, cumarinas e compostos fenólicos (El-Seed, 1999).

Os alcalóides apresentam uma ampla bioatividade, tais como: efeitos antiespasmódicos, antitumorais, antialérgicos, estimulantes do Sistema Nervoso Central, analgésicos, controle da pressão sanguínea, entre outros (Gudi *et al.*, 1990). Muitos alcalóides apresentam efeitos farmacológicos em mamíferos e outros organismos e, com isso, constituem importantes agentes terapêuticos e/ou medicinais. Alguns exemplos mais comuns são cafeína, cocaína, nicotina, estricnina e morfina (Gudi *et al.*, 1990; Morikawa *et al.*, 2004).

1.5 Docking Molecular

Experimentos de modelagem molecular como *docking* e dinâmica molecular podem também confirmar a hipótese de interação entre duas proteínas, e, além disso,

identificar aminoácidos envolvidos na interação protéica e fornecer um conhecimento energético e estrutural detalhado destas interações (Grosdidier *et al.*, 2009). É importante destacar que a compreensão do modo como as proteínas se ligam entre si e formam complexos só é possível através de experimentos de alta resolução, usando estruturas tridimensionais, uma vez que estes fornecem detalhes atômicos necessários para entender como os componentes individuais do complexo são montados e coordenados para funcionar como uma unidade molecular.

O *docking* computacional visa prever a estrutura de um complexo formado por duas proteínas que interagem a partir das estruturas dos componentes individuais e fornecer uma avaliação da afinidade de ligação (Mosca *et al.*, 2009). Essencialmente, o objetivo do *docking* molecular é dar uma previsão da estrutura do complexo ligante-receptor usando métodos computacionais. O *docking* pode ser obtido através de dois passos inter-relacionados: primeiro, por amostragem das conformações do ligante no sítio ativo da proteína, em seguida, classificando estas conformações através de uma função de pontuação. Idealmente, os algoritmos de amostragem devem ser capazes de reproduzir o modo experimental de ligação e a função de pontuação deve ser a de maior classificação entre todas as conformações geradas (Meng *et al.*, 2011). Já a dinâmica molecular é uma ferramenta importante para a compreensão da base física da estrutura e função de macromoléculas biológicas. A visão de proteínas sendo estruturas relativamente rígidas foi substituída por um modelo dinâmico em que os movimentos internos e resultantes de alterações conformacionais desempenham um papel essencial nas interações protéicas e consequentemente nas funções das proteínas (Karplus e McCammon, 2002).

Deste modo, todos os métodos de detecção de PPIs citados são complementares, devendo ser aplicados em combinação para produzir mapas de interação proteína-proteína confiáveis e de alta qualidade. Como ainda não existem ferramentas moleculares para abordagens genéticas clássicas e reversas para estudo de função gênica em *Paracoccidioides*, tem-se utilizado o estudo de PPI para inferência de funções (Borges *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2007).

2. JUSTIFICATIVA

Os poucos agentes antifúngicos disponíveis apresentam limitações em relação à eficácia e toxicidade. A necessidade por estratégias alternativas no tratamento de infecções fúngicas tem aumentado com o surgimento de novos patógenos fúngicos e o desenvolvimento de resistência a antifúngicos. Desta forma, novas abordagens para identificar alvos para drogas antifúngicas únicos são necessárias. Em adição, um maior entendimento do mecanismo de ação de agentes antifúngicos disponíveis auxiliaria nesse esforço.

Utilizando-se ferramentas de bioinformática, em uma etapa pós-genômica, foi possível identificar genes/proteínas específicos do fungo *Paracoccidioides* e ausentes em humanos. Dessa forma, espera-se que inibidores da atividade enzimática ou do processo de adesão destes sejam mais efetivos, mais seguros e apresentem menos efeitos colaterais para o homem, quando comparados aos fármacos já existentes, visto a relevância dessas moléculas, principalmente em fungos.

Muitos alcaloides apresentam efeitos farmacológicos em mamíferos e outros organismos e, com isso, constituem importantes agentes terapêuticos e/ou medicinais. A relevância da presença de alcalóides indólicos monoterpênicos e a ampla gama de atividades biológicas atribuídas às diversas espécies do gênero *Palicourea* a (Rubiaceae) motivaram-nos a investigá-los fitoquimicamente uma vez que ocorre em ambientes de Cerrado, visando o isolamento e a identificação estrutural dos principais metabólitos secundários presentes na planta como que inibidores da atividade enzimática ou do processo de adesão das enzimas do ciclo do Glioxalato.

Sabemos também que um dos caminhos pelos quais as células se ajustam a mudanças ambientais é através da alteração do padrão de expressão de genes. Assim, a medida de mudanças no padrão de expressão de genes sob exposição a drogas pode ajudar a determinar como as drogas e candidatos a drogas trabalham em células e organismos.

Nesse sentido, as enzimas chave do ciclo do glioxalato adquirem notada relevância, uma vez que representam um importante papel na virulência do fungo dentro do hospedeiro. Além de que torna-se de extrema importância o estudo e avaliação das alterações no perfil de expressão de genes e proteínas de *Paracoccidioides*, uma vez que

estudos comparativos têm demonstrado a importância da realização desses estudos em fungos de relevância.

A alta prevalência de infecções por *Paracoccidioides*, e o conhecimento dos genes obtidos através dos genomas estruturais e funcionais já realizados, elegem *Paracoccidioides* como um bom modelo para estudos. Assim, por intermédio deste trabalho forneceremos informações sobre os mecanismos moleculares do metabolismo, patogênese, atividade de enzimas específicas, adesão, resistência a drogas e genes/proteínas alvos para o desenvolvimento de antifúngicos. Os resultados obtidos nesse projeto deverão suportar trabalhos futuros com os genes de interesse.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo é investigar as alterações no perfil de expressão gênica e/ou protéica de *Paracoccidioides* após exposição a determinados antifúngicos, assim como buscar inibidores da atividade enzimática e/ou do processo de adesão de enzimas chave do ciclo do glioxalato.

Visando estudar o mecanismo de ação de *Paracoccidioides* em resposta ao fármaco itraconazol, propomos os seguintes objetivos específicos:

- ✓ Utilizar a metodologia de RDA e células leveduriformes de *Paracoccidioides* crescidas na presença e na ausência de itraconazol;
- ✓ Sequenciar as ESTs de *Paracoccidioides* obtidas pela técnica de RDA;
- ✓ Identificar os genes induzidos e reprimidos em *Paracoccidioides* na presença de itraconazol;
- ✓ Validar os genes induzidos e reprimidos em *Paracoccidioides* na presença de itraconazol.

Visando detectar e avaliar diferenças qualitativas e quantitativas nas proteínas de *Paracoccidioides* na condição controle e tratado com os fármacos itraconazol/anfotericina B, propomos os seguintes objetivos específicos:

- ✓ Padronização de mapas eletroforéticos bidimensionais de proteínas totais hidrossolúveis na forma leveduriforme de *Paracoccidioides* em contato com os diferentes fármacos;
- ✓ Realização de análises computacionais dos mapas bidimensionais de proteínas capturadas em sistema de fotodocumentação e processá-las, detectando o número de spots de proteínas, a massa molecular e ponto isoelétrico nas diferentes condições;
- ✓ Realização de análises estatísticas para obter os spots das proteínas de *Paracoccidioides* que são diferencialmente expressas nas condições controle e tratado;
- ✓ Retirada dos spots protéicos de interesse dos géis bidimensionais e realizar digestão com tripsina para, posteriormente, obter os espectros de massas
- ✓ Sequenciamento *De novo* dos espectros de MS e MS/MS obtidos com o programa PepSeq;

Visando avaliar a atividade inibitória de compostos alcalóides sobre a atividade enzimática e adesão da enzima malato sintase de *Paracoccidioides*, propomos os seguintes objetivos específicos:

- ✓ *Screening* Virtual para busca de compostos com afinidade de interação com o sítio ativo da enzima;
- ✓ Padronizar a atividade enzimática de *PbMLS* em microplacas e avaliar da inibição da atividade por compostos alcalóides;
- ✓ Realizar testes para Concentração Inibitória Mínima e citotoxicidade com compostos alcalóides;
- ✓ Avaliação da inibição de *PbMLS* por compostos alcalóides através de *immunoblotting*, ELISA e microscopia de fluorescência;

MANUSCRITO I

Transcriptional and proteomic profile of *Paracoccidioides* in response to itraconazole

Benedito Rodrigues da Silva Neto¹, Patrícia Fernanda Zambuzzi Carvalho¹, Wellington Santos Martins², Célia Maria de Almeida Soares¹, Maristela Pereira^{1*}

¹Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil; ²Instituto de Informática, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.

*Corresponding author: Maristela Pereira. Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, ICBII, Campus II, Universidade Federal de Goiás, C.P. 131, 74001-970, Goiânia, GO, Brazil. Phone/fax: +55 62 35211110. E-mail address: maristelaufg@gmail.com

Abstract

Itraconazole is currently used to treat paracoccidioidomycosis. The mechanism of action of azoles has been elucidated in some fungi, although little is known regarding its mechanism of action in *Paracoccidioides spp.* The present work focused on identification of regulated transcripts using representational difference analysis of *Paracoccidioides spp* yeast cells treated with itraconazole for 1 and 2 h. EST sequences were clustered using the CAP3 program, annotated using the Blast2GO program and classified into different functional categories in agreement with their possible functions using the FunCat2 scheme. The database sequence matches with BLAST e-values $\leq 10^{-5}$ were considered significant. *Paracoccidioides Pb01* genes up-regulated by itraconazole included genes involved in cellular transport, metabolism/energy, transcription, cell rescue, defense and virulence. *ERG11*, *ERG6*, *ERG3*, *ERG5* and *ERG25* were up-regulated at multiple time points. In vivo infection experiments in mice corroborated the in vitro results. Ergosterol levels and distribution were evaluated in *Paracoccidioides Pb18* yeast cells, and the results demonstrate that both factors were changed in the fungus treated with itraconazole. To our knowledge, this is the first transcriptional analysis of *Paracoccidioides spp* exposed to a triazole drug. The results obtained here should assist in understanding the mode of action of itraconazole in *Paracoccidioides spp*.

1. Introduction

Paracoccidioides spp, a complex of several phylogenetic species, is the agent of paracoccidioidomycosis (PCM). *Paracoccidioides spp* is a thermodimorphic fungus, which grows in the soil as saprobic mycelium, resulting in the formation of propagules, which initiate infection in humans when inhaled into the respiratory tract. Subsequently, in the lung, the mycelia propagules develop into yeast cells [1]. PCM is endemic in Latin

America [2], with 80% of cases reported in Brazil, where it is the eighth-leading cause of mortality among infectious and parasitic diseases, establishing it as a serious public health problem [3,4].

Itraconazole is suggested to be the best alternative for first-line therapy of PCM and should be administered over a long period [5]. Itraconazole is a triazole antifungal drug, which are multi-ringed synthetic compounds containing three nitrogen atoms in the azole ring. Mechanistically, the triazole drugs inhibit the synthesis of ergosterol, an essential component of fungal cell membranes, and cause abnormalities in the membrane permeability and consequently cell death [6]. Itraconazole and related azole derivatives act by blocking the ergosterol biosynthesis pathway through the inhibition of the fungal cytochrome P450 enzyme lanosterol demethylase (Erg11) [7].

The global response to azoles, including itraconazole, of fungi such as *Saccharomyces cerevisiae* [8], *Trichophyton rubrum* [9], *Aspergillus fumigatus* [10] and *Candida albicans* [11,12] has been studied using transcriptional and proteomic approaches. In general, the findings revealed both specific and nonspecific antifungal-induced changes in gene and protein regulation. There was an increase in expression of the genes involved in lipid, fatty acid and sterol metabolism, as well as genes involved in drug adaptation, including cell stress response, drug efflux and small molecule transport.

Despite of the importance of *Paracoccidioides spp*, nothing is known about the mechanism of itraconazole inhibition in this pathogen. Here, cDNA libraries were constructed to obtain expressed sequence tags (ESTs) of *Paracoccidioides spp*. The representational difference analysis (RDA) technique was used to identify changes in the transcriptional profile of *Paracoccidioides spp* in response to itraconazole, with the aim of identifying the adaptative response of the fungus to the compound. Transcript levels

were also measured during the infection process. In addition, the transcript levels of *ERG* genes, ergosterol levels and ergosterol localization were evaluated.

2. Materials and Methods

2.1. Culture and cell viability

Paracoccidioides Pb01 and *Pb18* have been studied at our laboratory previously [13,14]. *Pb01* and *Pb18* yeast phase was maintained in vitro by subculturing at 36 °C in Fava Netto's semisolid medium [15] every seven days. Fava Netto's semisolid medium components were as follows: 1% (w/v) peptone, 0.5% (w/v) yeast extract, 0.3% (w/v) proteose peptone, 0.5% (w/v) beef extract, 0.5% (w/v) NaCl, 4% (w/v) glucose and 1.2% (w/v) agar, pH 7.2. The determination of IC₅₀ was performed according to Santos et al.[16] and in accordance with the macro dilution method described in the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)M27-A2(2005), with modifications. To determine the IC₅₀, yeast cells in the exponential growth phase were maintained in the chemically defined solid medium McVeigh Morton (MMcM), [17] for seven days at 36 °C and inoculated in liquid MMcM. A stock solution (1 mg/ml) containing sterile itraconazole (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was prepared in dimethylsulfoxide (DMSO, Merck).The final concentration of the solvent in the medium never exceeded 2% (v/v) and had no effect on the cell growth. From this stock solution, the drug was serially diluted in sterile MMcM (pH 7.0), producing a final concentration of 1.25 – 320 µg/ml (5 – 1260 mM). The drug concentration range was selected based on previous studies [18]. The controls without antifungal and DMSO were included. The concentrations of inoculums were determined by spectrophotometer using a yeast cell suspension in sterile 0.85% NaCl with 10% transmittance at 520 nm. The mixture was stirred to disperse aggregated cells. Yeast cells were collected from the liquid MMcM and counted in a

Neubauer chamber. An initial inoculum containing 5×10^6 cells/ml was collected, and 0.1 ml aliquots were added to 2.4 ml of MMcM containing the drug dilutions. The fungus was grown at 36°C under agitation at 150 rpm for five days. The IC₅₀ was determined using measurements of the turbidity of the medium [19]. The experiments were processed in triplicate.

For viability experiments, yeast cells were grown in the presence or absence of 4 µg/ml (IC₅₀) of itraconazole and were kept in liquid MMcM [17] for 1, 2, 3, 4 and 5 h at 36 °C before the viability of the cells was determined by Trypan Blue method [20]. In brief, cells from all incubation times were incubated with a dye solution (0.1% Trypan Blue Stain) for 5 min at room temperature, and viability was assessed by counting viable and unviable cells in a Neubauer chamber.

2.2. RDA: RNA extraction and synthesis of cDNAs

Paracoccidioides Pb01 yeast cells were cultured in MMcM broth medium in the presence or absence of 4 µg/ml of itraconazole for 1 h and 2 h, corresponding to a viability of 95% and 85%, respectively. For RNA isolation, cells were harvested by centrifugation, washed in cold water and the RNA from driver and tester cultures were extracted with Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA quality was assessed using the A_{260nm}/A_{280nm} ratio. The RNA was treated with DNase I RNase-free (Invitrogen) to remove chromosomal DNA. The concentration and purity of RNA were determined by spectrophotometer, and RNA integrity was visualized after electrophoresis on 1.2% agarose gel. The RNAs were used to construct subtracted libraries and qRT-PCR experiments.

The cDNA fragments used for processing the RDA were generated according to the protocol previously described by Hubank and Schatz [21] and modified by Pastorian

et al. [22]. Briefly, first-strand cDNA synthesis was performed with 1 µg total RNA, obtained from driver and tester cultures, using SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen). The first-strand cDNA obtained (3 µL) was used as template to synthesize the second-strand of cDNA. The cDNA was prepared using the SMART PCR cDNA synthesis kit (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA).

2.3. RDA: Subtractive hybridization

The cDNAs were digested with the restriction enzyme *Sau3AI* (Amersham Pharmacia Biotech, Amersham Place, UK). Two successive rounds of subtraction employing different adapters (J-Bam and N-Bam, Table 1) were performed to enrich the differentially expressed sequences. Four cDNA-subtracted libraries were constructed. The cDNA libraries containing up-regulated genes were constructed from driver cDNA obtained from *Paracoccidioides Pb01* yeast cells grown for 1 h and 2 h in MMcM medium and from tester cDNA, which was synthesized from RNA extracted from *Paracoccidioides Pb01* yeast cells grown for 1 h and 2 h in MMcM medium plus itraconazole. The cDNA libraries containing down-regulated genes were constructed from driver cDNA, obtained from *Paracoccidioides Pb01* yeast cells, grown for 1 h and 2 h in MMcM medium plus itraconazole and tester cDNA, which was synthesized from RNA extracted from *Paracoccidioides Pb01* yeast cells grown for 1 h and 2 h in MMcM medium. The resulting products were purified using a GFX kit (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). The tester-digested cDNA, from 1 h- and 2 h-samples, was linked to adapters (a 24-mer annealed to a 12-mer) and amplified by PCR.

For the generation of the differentially up- and down-regulated products, the tester and driver cDNAs of both conditions were mixed separately; the hybridization occurred at 67 °C for 18 h and the amplification occurred by PCR using the

oligonucleotide matching the 24-mer adaptor [23]. The successive rounds of subtraction and amplification were performed using hybridization tester-driver ratios of 1:10 and 1:100. Adapters (Table 1) were changed between cross-hybridization, and the different products were purified using the GFX kit. After the second subtractive reaction, the cDNA was purified and cloned directly into the pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA). *Escherichia coli* XL1 Blue competent cells were transformed with the ligation products. The plasmid DNAs were prepared from selected clones of subtracted libraries and sequenced with the ET Dye Terminator kit Dyanamic (GE Healthcare) in a MegaBACE 1000 DNA sequencer (GE Healthcare) using primers corresponding to the pGEM-T Easy vector.

2.4. Processing and annotation of ESTs

The sequences of at least 75 nucleotides, with a PHRED score ≥ 20 were considered for the assembly and formation of clusters. The assembly of these ESTs was performed using CAP3 [24] and clustered to generate contigs and singlets, which were analyzed. All these tools were integrated in a specific pipeline (<http://www.lbm.icb.ufg.br/pipelineUFG/>). The annotation of genes was performed using the program Blast2GO (<http://www.blast2go.org/>), which provides a comparison between clusters of sequences obtained from public databases. The BLAST program from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), processed with the non-redundant sequences (nr) GenBank and the nucleotide database generated from *Paracoccidioides spp* structural genome (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html), was used for the annotation. The database sequence matches were considered

significant at e-values $\leq 10^{-5}$. The program INTERPROSCAN (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) [25] was used to obtain information about the domains present in clusters and the classification of families. The metabolic pathways were analyzed using maps obtained from the KEGG database (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (<http://www.genome.ad.jp/kegg>) [26] with annotated EC numbers, and this information was used to help elucidate the function of ESTs. The Munich Information Center for Protein Sequences (MIPS) (<http://mips.gsf.de/>) was used to designate the functional categories. Additionally, sequences were grouped into functional categories using the PEDANT 3 database (<http://pedant.helmholtz-muenchen.de/index.jsp>).

2.5. Analysis of RNA transcripts by qRT-PCR

An aliquot of RNA from treated and untreated samples was used to perform reverse transcription qRT-PCR. Total RNAs from *Paracoccidioides Pb01* yeast cells cultured in the presence or absence of itraconazole were obtained as previously described, in independent experiments from those used in the RDA assays. After treatment with DNase, cDNAs were synthesized from total RNA using Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen) and oligo (dT)₁₅ primer according to the supplier's instructions. Gene-specific primers were designed for the selected genes and for the control gene, α -tubulin, using Primer Express software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (Table 1). qRT-PCRs were performed in triplicate in a StepOnePlus™ real time PCR system (Applied Biosystems). The PCR thermal cycling program consisted of 40 cycles of 95 °C for 15 s; 60 °C for 1 min. The SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems) was supplemented with 1 pmol of each gene-specific oligonucleotide and 40 ng of template cDNA in a final volume of 20 μ L. A curve melting analysis was

performed to confirm the amplification of a single PCR product. The data were normalized to the α -tubulin transcript amplified in each set of qRT-PCR experiments. A no-template control was included. Samples of each cDNA were pooled and serially diluted 1:5 to generate a relative standard curve. Relative expression levels of genes were calculated using the standard curve method for relative quantification [27]. Statistical comparisons were performed using Student's t-test and samples with p-values < 0.05 were considered statistically significant. The specific sense and antisense primers are listed in Table 1. Itraconazole-regulated transcripts were selected for qRT-PCR validation assays.

2.6. Preparation of protein extracts and validation of data obtained by specific activity of Glutathione S-Transferase (GST)

GST activity was measured with GST assay kit (Sigma-Aldrich). Briefly, the GST Assay Kit employs 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) to produce 1-glutathionyl-2,4-dinitrobenzene (GS-DNB) by conjugation of the thiol group of glutathione (GSH). The reaction product GS-DNB absorbs at 340 nm, and the rate of increase in the absorption is directly proportional to the GST activity of the sample.

Protein extracts from *Paracoccidioides Pb18* yeast cells were prepared by inoculating 50 ml of Fava Netto's liquid medium with 10^6 cells/ml. Cultures were incubated overnight at 36 °C with gentle shaking for 16 h. Cells were centrifuged at 5,000 x *g* for 5 min and transferred into MMcM media containing itraconazole for 1 h. Control cells were incubated in MMcM without drug. The cells were centrifuged at 10,000 x *g* for 15 min at 4°C, frozen in liquid nitrogen and disrupted by maceration [28]. Extraction buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.8; 2 mM CaCl₂) containing a mixture of protease inhibitors (serine, cysteine and calpain inhibitors) (GE Healthcare) was added to

the yeast cells. After the addition of glass beads (0.45 mm), the cells were lysed in a bead-beater, followed by centrifugation at 10,000 x *g* for 15 min at 4°C. The supernatant was collected, and the protein concentrations were determined using Bradford reagent (Sigma-Aldrich). The samples were stored in aliquots at -80 °C.

The increase in absorbance is directly proportional to the GST activity. The GST-specific activity is defined as mmol of GS-DNB per mg of total protein per min (mmol/mg/min). The enzymatic activity results represent the mean of three independent determinations, and statistical comparisons were performed using Student's *t* test. The samples with *p*-values ≤ 0.05 were considered statistically significant.

2.7. Sterol quantification method

The quantification of total intracellular ergosterol was performed as previously described [29], with slight modifications. Cell extracts from *Paracoccidioides Pb18* yeast cells were prepared as already described above. Five ml of 25% alcoholic potassium hydroxide solution (25 g KOH and 35 ml sterile distilled water added to 100 ml 100% ethanol) was added to each tube, and the samples were mixed on a vortex for 2 min. The cell suspensions were incubated in an 85 °C water bath for 3 h and allowed to cool to room temperature. Sterols were extracted by addition of 2 ml of sterile distilled water and 5 ml *n*-heptane (Sigma-Aldrich), followed by vigorous mixing in a vortex mixer for 5 min. The samples were kept at room temperature for 1 to 2 h to allow the phases to separate or were stored at 4 °C overnight. One ml of the heptane layer (containing ergosterol) was transferred to a 1.5 ml quartz cuvette and analyzed spectrophotometrically by scanning at wavelengths between 200 and 300 nm. If necessary, the samples were diluted five fold with 100% ethanol and reanalyzed. The ergosterol content as a percentage of the wet cell weight was calculated by the following

equations: value 1 = $[(A_{281.5}/290) \times F]/\text{wet cell weight}$, value 2 = $[(A_{230}/518) \times F]/\text{wet cell weight}$, and percent ergosterol = value 1 - value 2. F is the factor for dilution in ethanol, and 290 and 518 are fixed values determined for crystalline ergosterol and 24(28) dihydroergosterol, respectively.

2.8. Fluorescence microscopy

Filipin stained samples were prepared using a previously described protocol for fixing and staining filamentous fungi [30]. *Paracoccidioides Pb18* yeast cells were prepared by inoculating 50 ml of Fava Netto's liquid medium with 10^8 cells/ml. Cultures were incubated overnight at 36 °C under gentle shaking for 16 h. Cells were centrifuged at 5,000 x g for 5 min and transferred in MMcM media containing itraconazole. Control cells were incubated in MMcM without drug. The fungus was then removed and fixed for 30 min in 3.7% formaldehyde and rinsed with ddH₂O. A 5 mg/ml stock solution of filipin (Sigma-Aldrich) dissolved in DMSO was diluted to 25 µg/ml and used to stain the fixed samples for 10 min. Samples were then rinsed with ddH₂O, mounted on a microscope slide and sealed with nail varnish.

2.9. BALB/c mice infection with *Paracoccidioides Pb18*

The animals were bred at the Universidade Federal de Goiás animal facility under specific-pathogen-free conditions. All animal experiments were performed in accordance with the international rules for animal experimentation. The animal protocol was approved by the Universidade Federal de Goiás committee of the ethical treatment of animals (Number: 008/11 CEUA-UFG).

Female BALB/c mice, 8-12 weeks old, were inoculated with 1×10^7 of *Paracoccidioides Pb18* yeast cells. In brief, yeast cell suspension in the 7th day of in vitro

growth were washed in PBS 1X and inoculated intraperitoneally in mice. The mice were divided into three groups of five animals to be sacrificed 21 days post-challenge. Each group was subdivided by treatment options as follows: five uninfected mice (negative controls), five yeast cell-infected mice (positive controls) and five yeast cell-infected mice treated with itraconazole starting at the third week post-infection. The animals were sacrificed in the sixth week after infection. The spleens were removed and homogenized in 5 ml of sterile PBS 1X. The homogenized sample was plated in brain heart infusion agar supplemented with 4% (v/v) fetal calf serum and 2% (w/v) glucose. The plates were incubated at 36 °C and colony-forming units (CFUs) were determined after 20 days.

Gene expression analyses of *Paracoccidioides Pb18* from infected mice were performed by isolating yeast cells from spleens as previously described with minor modifications [31]. The spleens of infected mice were homogenized in 1X PBS using a tissue grinder. The homogenate was then filtered using nylon mesh to remove large pieces of animal tissue. The sample was frozen in liquid nitrogen and then centrifuged at 500 x *g* for 5 min to remove any remaining animal tissue. Next, the sample was centrifuged at 7,000 x *g* for 15 min to isolate fungal cells. Total RNA was extracted from recovered cells using TRIZOL reagent (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. RNA was used to perform qRT-PCR as described above.

3.0 Mass spectrometry analysis

Spots of interest were manually excised and digested as previously described [50]. Briefly, the gel pieces were resuspended in 100 ml acetonitrile (ACN) and dried in a speed vacuum. The gel pieces were then reduced with 10 mM DTT and alkylated with 55 mM iodoacetamide. The supernatant was then removed, and the gels were washed with 100 mL ammonium bicarbonate by vortexing for 10 min. The supernatant was removed,

and the gel pieces were dehydrated in 100 ml of a solution containing 25 mM ammonium bicarbonate/50% (v/v) ACN, vortexed for 5 min, and centrifuged. This step was then repeated once. Next, the gel pieces were dried in a speed vacuum and 12.5 ng/ml trypsin (sequencing grade modified trypsin, Promega, Madison, WI, USA) solution was added followed by a rehydration step performed on ice at 4°C for 10 min. The supernatant was removed, 25 ml of 25 mM ammonium bicarbonate was added and the supernatant was then incubated at 37°C for 16 h. Following digestion, the supernatant was placed in a clean tube. Next, 50 mL 50% (v/v) ACN and 5% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) were then added to the gel pieces. The samples were vortexed for 30 min, sonicated for 5 min, and the solution was then combined with the aqueous extraction above. The samples were dried in a speed vacuum, the peptides were solubilized in 10 ml ultrapure water, and the samples were subsequently purified in ZipTipH Pipette Tips (ZipTipsH C18 Pipette Tips, Millipore, Bedford, MA, USA). Two microliters of each peptide sample were deposited onto a matrix-assisted laser desorption ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry (MALDI-Q-TOF MS) target plate and dried at room temperature. Next, the peptide mixture was covered with 2 ml of matrix solution (10 mg/ml α -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix in 50% (v/v) ACN and 5% (v/v) trifluoroacetic acid). The mass spectra were recorded in the positive reflectron mode on a MALDI-Q-TOF mass spectrometer (SYNAPT, Waters Corporation, Manchester, UK). The search against the NCBI non-redundant database using the MS/MS data was performed using Mascot software v. 2.4 ([http:// www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) (Matrix Science, Boston, USA). The Mascot MS/MS ion search parameters were as follows: tryptic peptides with one missed cleavage allowed; fungi taxonomic restrictions; fixed modifications: carbamidomethylation of Cys residues; variable modifications: oxidation of methionine; and na MS/MS tolerance of 0.6 Da. The identified proteins were described in functional

categories according to the MIPS Functional Catalogue Database

(<http://fsd.riceblast.snu.ac.kr>). For the identification of the MS spectra using the NCBI database, we included the analysis of post-translational modifications (PTMs) for multiple identified proteins/isoforms. We included variable modifications in the search as follows: the acetylation of lysine and the phosphorylation of serine/tyrosine/tryptophan. All proteins/isoforms that presented matches with predicted modified peptides were selected for manual spectral analysis.

3. Results

3.1. Construction of cDNA libraries

A viability curve of *Paracoccidioides* Pb01 yeast cells was created at different time intervals using a sub-inhibitory concentration of 4 µg/ml of itraconazole to determine the time point to be used for the RDA experiments. Total RNAs were collected at 1 h and 2 h, corresponding to 95% and 85% viability (data not shown), to obtain cDNAs to be used in the construction of libraries. The differential expression products generated were cloned into pGEM-T Easy and sequenced.

A total of 861 ESTs were successfully sequenced. From these, 224 up- and 208 down-regulated ESTs were obtained from yeast cells after incubation with itraconazole for 1 h, containing 55 singlets and 26 contigs for up-regulated transcripts and three singlets and 20 contigs for down-regulated ones. In addition, 230 up- and 199 down-regulated ESTs were obtained from yeast cells after incubation with itraconazole for 2 h, containing three singlets and 10 contigs for up-regulated and seven singlets and 12 contigs for down-regulated. The ESTs obtained were submitted to the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database under accession numbers: LIBEST_028165 *Paracoccidioides* Pb01 itraconazole 1h up Library, LIBEST_028164 *Paracoccidioides*

Pb01 itraconazole 1h down Library, LIBEST_028167 *Paracoccidioides* Pb01

itraconazole 2h up Library and LIBEST_028166 *Paracoccidioides* Pb01 itraconazole 2h down Library.

The ESTs were processed using the Blast2GO program, which allowed us to annotate and identify the different functional groups. The functional classification was based on the homology of each EST, considering e-values $\leq 10^{-5}$ significant, using BLASTx against the GenBank non-redundant database and the MIPS functional annotation scheme (Table 2). The analyses indicated the presence of transcripts from different functional categories: metabolism/energy, transcription, cell rescue, defense and virulence, protein synthesis and biogenesis, protein fate, cellular transport, biogenesis of cellular components and cellular communication.

3.2. Global gene expression monitoring in *Paracoccidioides* Pb01 upon itraconazole treatment

A total of 86 genes were differentially expressed upon exposure to itraconazole, of which 55 were up-regulated and 31 were down-regulated. ESTs obtained from 1 h treatment with itraconazole were clustered into functional classes which were defined as metabolism/energy (26.12%); transcription (17.09%); cell rescue, defense and virulence (10.32%); protein synthesis and biogenesis (2.90%); protein fate (2.90%); cellular transport (23.87%); biogenesis of cellular components (1.61%); cellular communication (1.29%); and unclassified proteins (13.87%). ESTs from 2-h samples were clustered into functional classes which were defined as: metabolism/energy (11.61%); transcription (19.5%); cell rescue, defense and virulence (20.74%); protein synthesis and biogenesis (0.82%); protein fate (0.41%); cellular transport (41.90%); and unclassified protein (4.97%) (Fig. 1).

From these functional categories, several genes were found from different metabolic pathways, including production of precursors of acetyl groups, such as acyl-CoA dehydrogenase (*ADH*), isovaleryl-CoA dehydrogenase (*IVD*), pyruvate kinase (*PK*) and cysteine desulfurase (*CYSD*). In addition, genetic precursors to the components of membrane and cell walls were found, such as phospholipids and carbohydrates, as well as genes related to detoxification. These components are diacylglycerol *o*-acyltransferase (*DGAT*), chitin synthase regulator 2 (*CHSr*), hemolysin-iii channel protein (*HLYiii*), tetracycline resistance protein (*TETA*), voltage-gated Ca^{2+} alpha subunit (*CAV*) and the MFS transporter.

3.3. Expression profiles of genes in *Paracoccidioides* Pb01 yeast cells

Confirmation of the expression levels of the ESTs found in the redundancy analysis was performed by qRT-PCR analysis, including *Paracoccidioides* Pb01 glutathione S-transferase (*GST*), (*CHSr*), betaine aldehyde dehydrogenase (*BADH*), *CYSD*, ribulose-phosphate 3-epimerase (*RP3E*), carnitine/acyl-carnitine carrier transcription factor (*CTFIB*), acyl*ADH*, heat shock protein (*HSP30*), *GPR1/FUN34/YAAH* family protein, *PK*, *DGAT*, *IVD*, ubiquitin-protein ligase (*UBI*), family integral membrane protein (*IMP*), *HSP10*, *HSP70* and ATP synthase f0 subunit 9 (*ATPS9*). These genes were chosen because of their high frequency or as representatives of different functional categories. Differential expression profiles of genes corroborated RDA data (Fig. 2A).

3.4. Analysis of *ERG* transcripts by qRT-PCR

Because *ERG* transcripts and proteins levels were changed in the presence of azoles in fungi such as *T. rubrum* [9], *S. cerevisiae* [8], *A. fumigatus* [32] and *C.*

albicans [11, 12], we investigated whether ergosterol synthesis-related transcripts such as lanosterol 14 α -demethylase (*ERG11*), C5,6-desaturase (*ERG3*), delta-24-sterol C-methyltransferase (*ERG6*), C-22 sterol desaturase (*ERG5*) and C-4 methyl sterol oxidase (*ERG25*) were changed in *Paracoccidioides* Pb01 after 1 h, 2 h and 6 h of exposure to itraconazole using specific oligonucleotides in qRT-PCR. The results showed that all transcripts were increased at all time points (Fig. 2B).

3.5. *Paracoccidioides* Pb18 transcripts identified in mice treated with itraconazole

We investigated whether the regulated transcripts identified by RDA experiments using Pb01 also occurred in another cryptic species, Pb18, in vivo. Balb/c mice infected with *Paracoccidioides* Pb18 were treated with itraconazole, and spleens were removed. The treatment with itraconazole reduced the fungal burden 42% in the spleens. RNAs extracted from recovered fungus were analyzed in qRT-PCR experiments using *MFS*, *GST* and *CHS**r* genes. In agreement with the RDA data, all the evaluated genes were up-regulated in spleen fungal samples after treatment with itraconazole (Fig. 2C).

3.6. *GST*-specific activity correlates with transcriptional data

Because *GST* transcripts were up-regulated in our study and are described in the literature as important for the detoxification of many different xenobiotics [33], we evaluated the *GST*-specific activity in protein extracts of fungus grown in the presence of itraconazole. *GST*-specific activity in the presence of itraconazole (0.26 $\mu\text{mol/mg/min}$) was 6.5 times higher than in the absence of itraconazole (0.04 $\mu\text{mol/mg/min}$) (Fig. 2D).

3.7. Analysis of the ergosterol level

Because transcript levels of ergosterol pathway components were changed in the presence of itraconazole, we evaluated if itraconazole could disturb the total intracellular level of ergosterol. The method for quantification of ergosterol used here takes advantage of the unique four-peak spectral absorption pattern produced by extracted sterols between 240 and 300 nm. Comparing the scans obtained from control (1.2 g of ergosterol/g yeast cells) and the corresponding itraconazole-exposed cultures (0.62 g of ergosterol/g yeast cells), a decrease of 48,6% was identified in the ergosterol content of *Paracoccidioides Pb18* yeast cells grown in the presence of itraconazole.

3.8. Effect of itraconazole on ergosterol localization in *Paracoccidioides Pb18* yeast cells

Because itraconazole induces changes in transcript levels in the ergosterol pathway and disturbs the total intracellular ergosterol content [34], the localization of ergosterol molecules was assessed in *Paracoccidioides Pb18* yeast cells. Ergosterol was detected by its ability to bind to the dye filipin. This characteristic has been used to detect ergosterol in dimorphic fungi [35], yeasts, filamentous fungi [36, 37] and mammalian cells [38].

The distribution of ergosterol on the surface of *Paracoccidioides Pb18* yeast cells treated with itraconazole was strikingly different from that observed in the control untreated cells. Control cells showed a homogeneous fluorescence distribution. In contrast, the cells treated with itraconazole displayed dark regions without filipin fluorescence (Fig. 4).

3.9. A model for the *Paracoccidioides* spp adaptation to the itraconazole

The most prominent adaptations undergone by *Paracoccidioides* spp during exposure to itraconazole are summarized in Fig. 4. See the Discussion for details.

3.9. Proteomic analysis of yeast cells submitted to itraconazole treatment

The changes in protein profiles upon exposure of yeast cells to itraconazole were analyzed using 2-DE gel electrophoresis. The control of protein loading was performed by using the Bradford reagent. Using the gel image software a total of 463 spots from early and late conditions were successfully matched between control and itraconazole treatment being 135 differentially expressed (65 Proteins induced and 73 repressed as shown in Fig. 5.) among them Succinyl-CoA ligase subunit beta, Cytochrome P450 55A1, CobW domain-containing protein, Propionyl-CoA carboxylase, L-threonine 3 dehydrogenase, Heat shock protein 60 and Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B (Table 3).

4. Discussion

Among the *Paracoccidioides* Pb01 genes up-regulated by itraconazole were those involved in cellular transport, metabolism/energy, transcription, cell rescue, defense and virulence. Similar groups were also observed in other fungi in response to azoles [34, 9, 8, 12, 11].

Although *ERG* genes were not identified in the RDA experiments, qRT-PCR results showed that *ERG11*, *ERG3*, *ERG6*, *ERG5* and *ERG25* genes were temporally regulated, particularly after longer contact with the drug (6 h). Acetyl is a precursor to the production of ergosterol [8]. Acetyl CoA seems to be intensively produced due to up-regulation of transcripts from different metabolic pathways, including lipid degradation by hormone-sensitive lipase (*LIPE*) and acyl-CoA dehydrogenase (*ACAD*) and amino acid metabolism by *IVD*. Acetyl CoA is also produced from citrate, which is made from isocitrate by the action of aconitase (*ACO*). In addition, the induction of *BADH* and

CYSD could lead to production of thiamine, a cofactor to pyruvate dehydrogenase (PDH), which produces acetyl CoA from pyruvate, whose production would be increased by the action of pyruvate kinase (Fig. 5).

Ergosterol is produced by the action of erg enzymes [39]. Here, the action of itraconazole on ergosterol biosynthesis and its distribution on *Paracoccidioides* Pb18 yeast cells surface was documented. Ergosterol is an essential component of fungal plasma membranes; it affects membrane permeability and the activities of membrane-bound enzymes. This sterol is a major component of secretory vesicles and has an important role in mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation [40, 41]. It can thus be expected that changes in ergosterol levels and in sterol structure could influence the activities of several metabolic pathways. The mechanism responsible for the global up-regulation of *ERG* genes in response to azoles remains unclear. One theory postulates that depletion of ergosterol or another sterol formed late in the pathway increases global *ERG* expression; another argues that accumulation of an early substrate or toxic sterol by-product induces *ERG* expression [34].

Here on our results of proteome can highlight the overexpression of the enzyme Cytochrome P450 55A1, the azoles exert their activity by specifically binding to the heme group in the active site of the cytochrome P450 enzyme 14-lanosterol demethylase (ERG11). The inhibition of Erg11p results in insufficient amounts of ergosterol within the fungal membrane and the accumulation of the toxic sterol 14 α -methylergosta-8,24-(28)-dien-3 β ,6 α -diol, which also inhibits fungal growth.

The correlation between cell wall integrity and perturbation of the ergosterol pathway in *T. rubrun* suggests that changes in the cell wall may compensate for stress in the plasma membrane [9]. The phospholipid level in the cell membrane seems to be affected in *Paracoccidioides* Pb01, as indicated by up-regulation of *DGAT*) and

phosphatidyl synthase (*PHS*), which produce phospholipids. *DGAT* has been found in several transcriptomes to date, indicating it may be important for the fungi response to azoles [41, 34].

CHS and their regulatory genes are important for the growth and virulence of human fungal pathogens, including *C. albicans* [43, 44]. It has been observed that high ergosterol levels can inhibit chitin synthases, whereas *C. albicans* mutants with low ergosterol content showed increased levels of chitin synthesis [45]. *CHS**r* was up-regulated in *Paracoccidioides Pb01* in the presence of itraconazole.

Glutathione S-transferases (*GSTs*), which are important for the detoxification of many xenobiotic compounds, are a family of multifunctional enzymes that play a role in cellular detoxification and excretion of a wide variety of xenobiotic substances [33]. It has been reported that *GSTs* correlate with fungi defense in response to damage caused by oxidative stress, xenobiotics and antifungal compounds [46]. *GST* was up-regulated in *Paracoccidioides* in the presence of itraconazole.

In *Paracoccidioides Pb01*, genes encoding several classes of transporters were up-regulated upon exposure to itraconazole. *MFS* transporter and *TETA*, for example, have been implicated in azole resistance [47]. Drug resistance is often associated with the overexpression of genes encoding efflux pumps, which is presumed to prevent intracellular accumulation of itraconazole in fungus [48, 9]. The up-regulation of *Paracoccidioides Pb01 MFS*, *GST* and *CHS**r* transcripts also occur in vivo, as demonstrated here by qRT-PCR using RNAs extracted from spleens of mice.

It should be noted that a number of genes involved in small molecule transport, especially in ion transport, were differentially expressed in *Paracoccidioides Pb01* in response to itraconazole. Up-regulated genes included *CAV*, *IMP* and *HLYiii*. Down-regulated genes included carnitine/ acyl carnitine carrier (*CAR*) and integral membrane

MPV17/PMP22. The inhibition of ergosterol, which is an essential component of fungal biological membranes, including the plasma membrane, can lead to destabilization of the membrane, leakage of cellular components and influx of extracellular ingredients. Therefore, the regulation of transporter genes is necessary to maintain ionic homeostasis within the fungal cell when membranes are damaged by itraconazole [49, 9].

This is the first study to analyze the changes in the *Paracoccidioides spp* gene expression profile following triazole exposure. Among the genes affected, we identified genes unique to *Paracoccidioides Pb01*, as well as genes in common with other fungi. In vitro results were validated by in vivo experiments. The results obtained here should assist in understanding the mode of action of itraconazole in *Paracoccidioides spp*.

Acknowledgements

This work performed at Universidade Federal de Goiás was supported by Ministério da Ciência e Tecnologia/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MCTI/CNPq), Fundo Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FNDCT), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) and INCT_IF (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica). Additionally, B.R.S.N. was supported by a fellowship from CNPq and P.F.Z.C. by CAPES.

References

- [1] M. Franco, Host–parasite relationship in paracoccidioidomycosis, J. Clin. Microbiol. 25 (1987) 5–18.
- [2] A. Restrepo, J.G. McEwen, E. Castañeda, The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? Med. Mycol. 39 (2001) 233–41.
- [3] G. San-Blas, G. Niño-Vega, T. Iturriaga, *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: Molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics, Med. Mycol. 40 (2002) 225–242.
- [4] Z. Coutinho, D. Silva, M. Lazera, R.M. Oliveira, P.C. Sabroza, B. Wanke, Paracoccidioidomycosis mortality in Brasil 1980-1995. Cad. Saúde Pública. 18 (2002) 1441-1454.

- [5] M.A. Shikanai-Yasuda, F.Q. Telles, R.P. Mendes, A.L. Colonbo, M.L. Moretti, Guidelines in paracoccidioidomycosis, Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 39 (2006) 297-310.
- [6] D. S. Burgess, R.W. Hastings, "A comparison of dynamic characteristics of fluconazole, itraconazole, and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans* using time-kill methodology," Diagnost. Microbiol. and Infect. Dis. 38 (2000) 87-93.
- [7] D.C. Lamb, S. Maspahy, D. E. Kelly, N. J. Manning, A. Geber, J. E. Bennett, S. L. Kelly, Purification, reconstitution, and inhibition of cytochrome P-450 sterol, D22-desaturase from the pathogenic fungus *Candida glabrata*. Antimicrob. Agents Chemother. 43 (1999) 1725-1728.
- [8] G.F. Bammert, J.M. Foster, Genome-wide expression patterns in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of drug treatments and genetic alterations affecting biosynthesis of ergosterol, Antimicrob. Agent. Chemother. 44 (2000) 1255-1265.
- [9] Y. Diao, R. Zhao, X. Deng, W. Leng, J. Peng, Q. JIN, Transcriptional profiles of *Trichophyton rubrum* in response to itraconazole, Med. Mycol. 47 (2009) 237-247.
- [10] S.P. Georgiadou, D.P. Kontoyiannis, The impact of azole resistance on aspergillosis guidelines, Ann. N Y Acad. Sci. 1272 (2012) 15-22.
- [11] T.T. Liu, R.E.B. Lee, K.S. Barker, R.E. Lee, L. Wei, R. Homayouni, P.D. Rogers, Genome-wide expression profiling of the response to azole, polyene, echinocandin, and pyrimidine antifungal agents in *Candida albicans*, Antimicrob. Agent. Chemother. 49 (2005) 2226-2236.
- [12] C.F. Hoehamer, E.D. Cummings, G.M. Hilliard, P.D. Rogers, Changes in the proteome of *Candida albicans* in response to azole, polyene, and echinocandin antifungal agents, Antimicrob. Agents Chemother. 54 (2010) 1655-64.
- [13] A.H. Da Silva Cruz, M. Brock, P.F. Zambuzzi-Carvalho, L.K. Santos-Silva, R.F. Troian, A.M. Goes, C.M.A. Soares, M. Pereira, Phosphorylation is the major mechanism regulating isocitrate lyase activity in *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. FEBS J. 278(2011) 2318-2332.
- [14] K.M. De Oliveira, B.R. S. Neto, J.A. Parente, R.A. Da Silva, G.O. Quintino, A.R. Voltan, M.J. Mendes-Giannini, C.M. C.M.A. Soares, M. Pereira, Intermolecular interactions of the malate synthase of *Paracoccidioides spp*, BMC Microbiol. 13(2013)107.
- [15] C. Fava Netto, V.S. Vegas, J.J. Sciannamea, D.B. Guarnieri, Antígeno polissacarídeo do *Paracoccidioides brasiliensis*. Estudo do tempo de cultura do *P.brasiliensis* necessário ao preparo do antígeno, Rev. Inst. Med. Trop. 11 (1969) 177-181.
- [16] G.D. Santos, P.H. Ferri, S.C. Santos, S.N. Bao, C.M.A. Soares, M. Pereira, (2007). Oenothien B inhibits the expression of *PbFKS1* transcript and induces morphological changes in *Paracoccidioides brasiliensis*, Med. Mycol. 45 (2007) 609-618.
- [17] A. Restrepo, B.E. Jimenez, Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium, J. Clin. Microbiol. 12 (1980) 279-281.
- [18] R.C. Hahn, Y.T. Morato Conceição, N.L. Santos, J.F. Ferreira, J.S. Hamdan, Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and in vitro resistance to ketoconazole and trimethoprim sulphamethoxazole, Mycoses 46(2003) 342-347.
- [19] R.C. Hahn, J.S. Hamdan, In vitro susceptibilities of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form to antifungal drugs, Mycoses 43(2000) 403-407.
- [20] R. Freshney, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. New York, Alan R. Liss, (1987) Inc.
- [21] M. Hubank, A.G. Schatz, Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA, Nucleic Acids Res. 22 (1994) 5640.
- [22] K. Pastorian, L. Havell 3rd, C.V. Byus, Optimization of cDNA Representational Difference Analysis for the identification of differentially expressed mRNAs, Anal Biochem. 283 (2000) 89-98.
- [23] V. Dutra, L. Nakazato, I.S. Broetto, M.H. Vainstein, A. Schrank, Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the *Boophilus microplus cuticle*, Res. Microbiol. 155 (2004) 245-251.
- [24] X. Huang, A. Madan, CAP3: a DNA sequence assembly program, Genom. Res. 9 (1999) 868-877.
- [25] R. Apweiler, A. Bairoch, C.H. Wu, Protein sequence databases, Curr. Opin. Chem. Biol. 8 (2004) 76-80.
- [26] M. Kanehisa, S. Goto, KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes, Nucleic Acids Res. 28 (2000) 27-30.
- [27] L. Bookout, C.L. Cummins, D.J. Mangelsdorf, J.M. Pesola, M.F. Kramer, High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR, In: F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl (Eds), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, (2006) pp.15.8.1.

- [28] C.A. Fonseca, R.S. Jesuino, M.S. Felipe, D.A. Cunha, W.A. Brito, C.M.A. Soares, Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*, *Microb. Infect.* 3 (2001) 535-42.
- [29] B.A. Arthington-Skaggs, H. Jradi, T. Desai, C. J. Morrison, Quantitation of ergosterol content: novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida albicans*, *J. Clin. Microbiol.* 37 (1999) 3332-3337.
- [30] M. Momany, Using microscopy to explore the duplication cycle. In: Talbot, N. (Ed.), *The Molecular and Cellular Biology of Filamentous Fungi: A Practical Approach*. Oxford University Press, (2001) Oxford.
- [31] D. Andes, A. Lepak, A. Pitula, K. Marchillo, J. Clark, A simple approach for estimating gene expression in *Candida albicans* directly from a systemic infection site, *J. Infect. Dis.* 192 (2005) 893-900.
- [32] S.P. Georgiadou, D.P. Kontoyiannis, The impact of azole resistance on aspergillosis guidelines, *Ann. N Y Acad. Sci.* 1272 (2012) 15-22.
- [33] J.D. Hayes, J.U. Flanagan, I.R. Jowsey, Glutathione transferases, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45 (2005) 51-88.
- [34] M.D. De Backer, T. Ilyina, X.J. Ma, S. Vandoninck, W.H. Luyten, H. Vanden Bossche, Genomic profiling of the response of *Candida albicans* to itraconazole treatment using a DNA microarray, *Antimicrob. Agents and Chemot.* 45 (2001) 1660-70.
- [35] A.B. Munkacsy, P.G. Pentchev, S.L. Sturley, Spreading the wealth: Niemann-Pick type C proteins bind and transport cholesterol, *Cell Metab.* 10 (2009) 3-4.
- [36] A. Breakspear, M. Pasquali, K. Broz, Y. Dong, H.C. Kistler, Npc1 is involved in sterol trafficking in the filamentous fungus *Fusarium graminearum*, *Fungal Genet. and Biol.* 48 (2011) 725-730.
- [37] M.R. Van Leeuwen, W. Smant, W. de Boer, J. Dijksterhuis, 2008. Filipin is a reliable in situ marker of ergosterol in the plasma membrane of germinating conidia (spores) of *Penicillium discolor* and stains intensively at the site of germ tube formation, *J. of Microbiol. Method.* 74 (2008) 64-73.
- [38] C.T. Beh, J. Rine, A role for yeast oxysterol-binding protein homologs in endocytosis and in the maintenance of intracellular sterol-lipid distribution, *J. Cell Sci.* 117 (2004) 2983-2996.
- [39] R. A. Akins, An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*, *Med. Mycol.* 43 (2005) 285-318.
- [40] H. Vanden Bossche, P. Marichal, J. Gorrens, D. Bellens, H. Moereels, P.A.J. Janssen, Mutation in cytochrome P450-dependent 14 α -methylase results in decreased affinity for azole antifungals, *Biochem. Society Transact.* 18 (1990) 56-59.
- [41] G. Daum, N.D. Lees, M. Bard, R. Dickson, Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast.* 14 (1998) 1471-1510.
- [42] Q. Liu, R.M.P. Siloto, R. Lehner, S. J. Stone, R. J. Weselake, Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase: Molecular biology, biochemistry and biotechnology, *Progr. in Lipid Resear.* 51 (2012) 350-377.
- [43] C.A. Munro, K. Winter, A. Buchan, K. Henry, J. M. Becker, A. J. Brown, C. E. Bulawa, N. A. Gow, Chs1 of *Candida albicans* is an essential chitin synthase required for synthesis of the septum and for cell integrity, *Mol. Microbiol.* 39 (2001) 1414-1426.
- [44] I.R. Banks, C.A. Specht, M.J. Donlin, K.J. Gerik, S.M. Levitz, J.K. Lodge, A Chitin Synthase and Its Regulator Protein Are Critical for Chitosan Production and Growth of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*, *Eukaryot. Cell.* 4 (2005) 1902-1912.
- [45] H. Vanden Bossche, Biochemical targets for antifungal azole derivatives hypothesis on the mode of action, *Curr. Top. Med. Mycol.* 1 (1985) 313-351.
- [46] W. Wang, N. Ballatori, Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions, *Pharmacol. Rev.* 50 (1998) 335-356.
- [47] M.A. Ghannoum, L.B. Rice, Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance, *Clin. Microbiol. Rev.* 12 (1999) 501-517.
- [48] A. Lupetti, R. Danesi, M. Campa, M. Del Tacca, S. Kelly, Molecular basis of resistance to azole antifungals, *Trend. Mol. Med.* 8 (2002) 76-81.
- [49] T. Edlind, L. Smith, K. Henry, S. Katiyar, J. Nickels, Antifungal activity in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated by calcium signaling, *Mol. Microbiol.* 46 (2002) 257-268.
- [50] T.C. Rezende, C.L. Borges, A.D. Magalhães, M.V. de Sousa, C.A. Ricart CA, et al. A quantitative view of the morphological phases of *Paracoccidioides brasiliensis* using proteomics. *J Proteomics* (2011) 75: 572-587.

Legends:

Figure 1 – Functional classification of genes responding to itraconazole in

***Paracoccidioides*.** cDNAs obtained from RNAs of yeast cells after incubation with itraconazole for 1 h (A) and 2 h (B). The numbers of ESTs are indicated with white bar segments for the up-regulated genes and black bar segments for the down-regulated genes. The annotation of genes was performed by using the Blast2GO program considering significant homology cut-off $\leq 1e^{-5}$. Sequences were grouped in functional categories according to the classification of the MIPS functional catalog. Additionally, sequences were grouped into functional categories using PEDANT 3 database. Each functional class is represented as a segment and expressed as a number of ESTs in each library.

Figure 2 – Relative fold change for genes determined by qRT-PCR. (A) For twenty genes listed in Table 1, **(B)** for the ergosterol pathway genes, **(C)** In vivo gene expression profile of *Paracoccidioides* recovered directly from a systemic mice spleen. Changes in gene expression levels were calculated by relative standard curve method using the control non-treated samples as the calibrator. **(D)** GST activity was measured in protein extract obtained from *Paracoccidioides* Pb18 yeast cells growth in the presence and absence of itraconazole. Each error bar represents the standard error of the mean ($\pm$ SD) from three independent experiments performed in triplicate, and significant-fold changes are denoted by asterisks in the figure ($*p \leq 0.05$). Data were normalized with the transcript encoding the α -tubulin protein. Student's t test was used for statistical comparisons.

Figure 3 - Sterol distribution in *Paracoccidioides*. Yeast cells were fixed, stained with filipin, and followed to observation in microscopy of fluorescence. **(A)** Staining in the control cells was diffuse with homogeneous marking. **(B)** Cells treated with itraconazole displayed no homogeneous fluorescence, predominantly detected either diffusely.

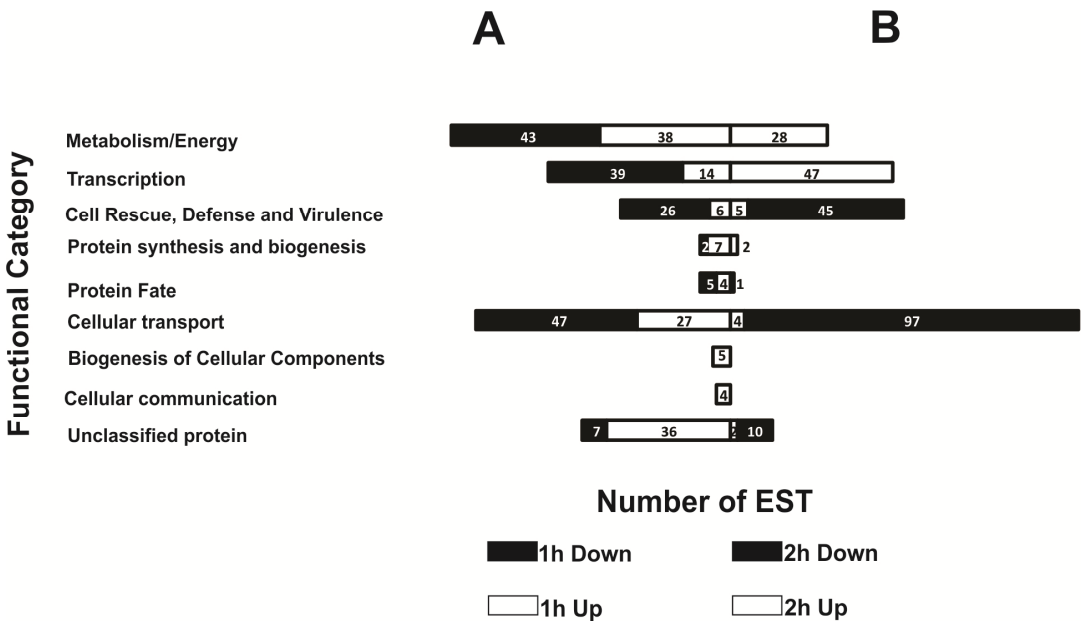
Figure 4 –Hypothetical model for the mode of action of itraconazole against *Paracoccidioides*. The up-regulation of transcripts as hormone-sensitive lipase, acyl-CoA dehydrogenase (*ADH*), isovaleryl-CoA dehydrogenase (*IVD*) and aconitase (*ACO*) from different metabolic pathways would produce acetyl CoA that would be used to ergosterol synthesis by the action of *ERG* enzymes. Acetyl CoA would produce phospholipid to membrane by the action of diacylglycerol *o*-acyltransferase (*DGAT*) and phosphatidil

synthase (*PHS*). The induction of betaine aldehyde dehydrogenase (*BADH*) and cysteine desulfurase (*CYSD*) would lead to production of thiamine, cofactor to pyruvate dehydrogenase (*PDH*), which also would produce acetyl CoA. Glutathione S-transferase (*GST*) would conjugate glutathione to xenobiotic and would lead itraconazole out of the cell by transporters allowing the detoxification.

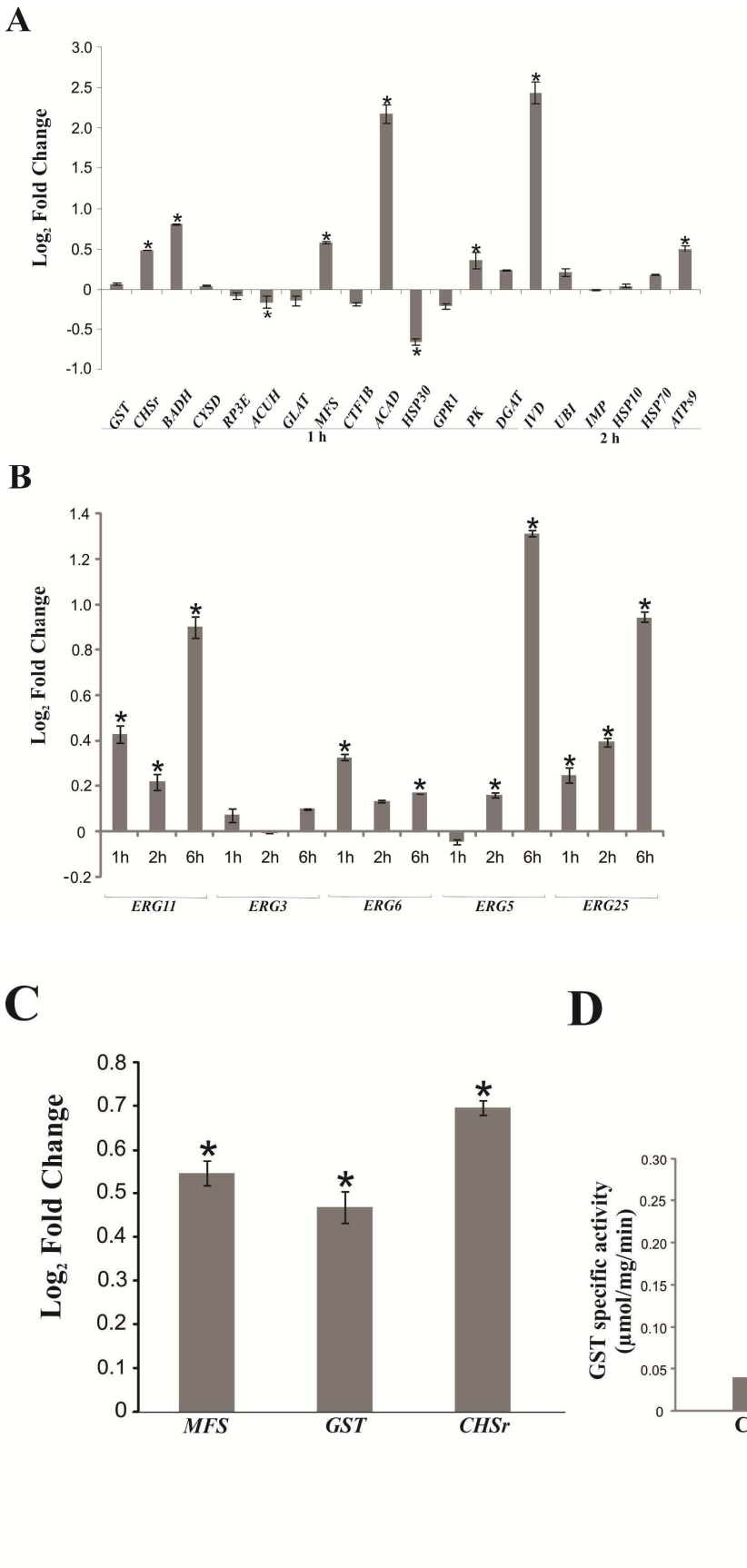
Figure 5 - Profile of proteins *Paracoccidioides* identified by mass spectrometry. 2-DE Image related to control (A) and treated with itraconazole (B). The pH gradient is marked above the gel and molecular weight standard (kDa) are indicated on the left of the gels.

Figures

1.

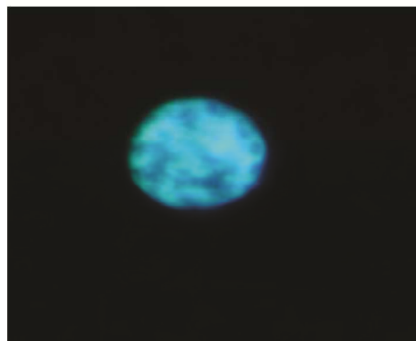


2.

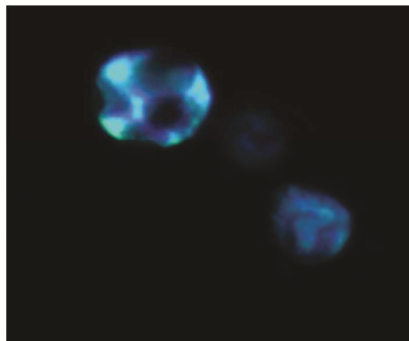


3.

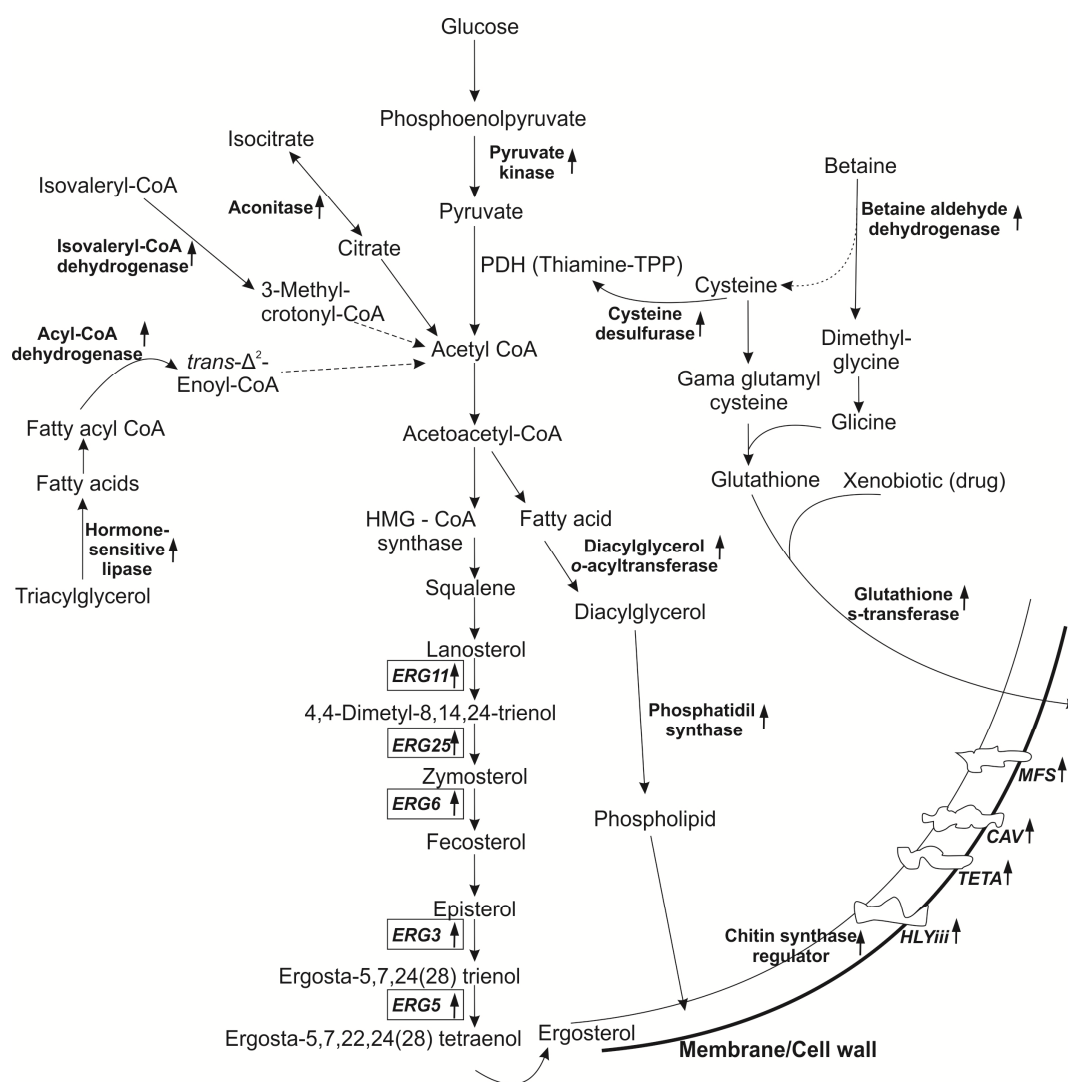
A



B



4.



5.

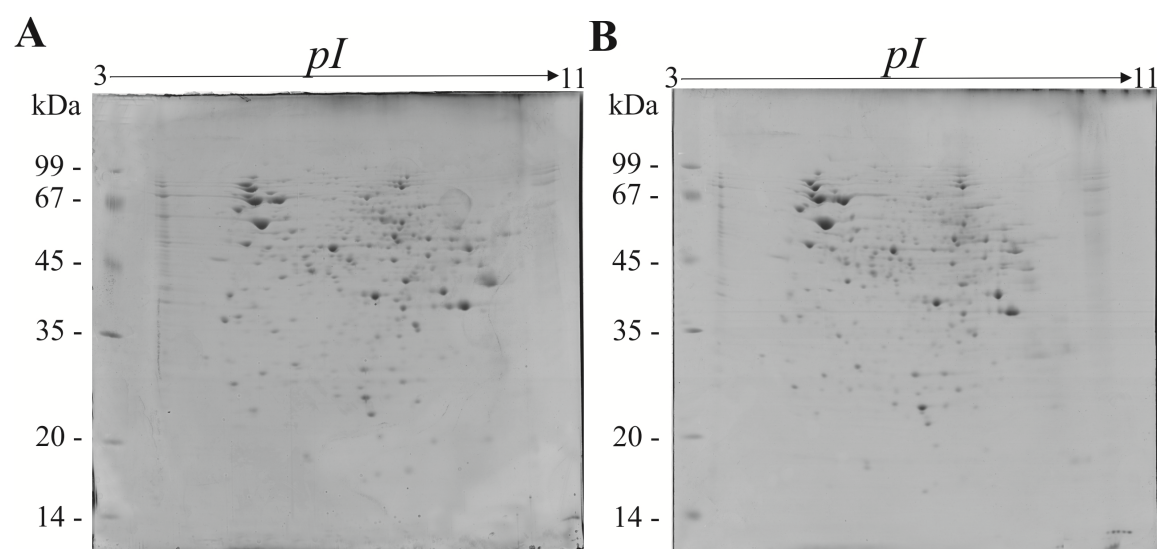


Table 1 – Gene-specific primers used for qRT-PCR assays and RDA.

Sequence Name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Amplicon size (bp)
Glutathione S-transferase (<i>GST</i>)	GAACCGCAAACCCTAACCTT	ACAGCGGCTGAAAAGTCCCA	157
Chitin synthase regulator 2 (<i>CHSr</i>)	AGAGCTGCAGAATTAGGCCTT	TTTCGCCCCGTTTCATCTCCGT	140
Betaine aldehyde dehydrogenase (<i>BADH</i>)	GTTGAAGAGCCATTTGGTCC	CAGATCATTGGACCACACAGA	120
Cysteine desulfurase (<i>CYSD</i>)	CAACAGAAGAGATGGAGTATGA	AGCGAATGACACGTTGACACA	143
Ribulose-phosphate 3-epimerase (<i>RP3E</i>)	CAATGGATCGACCTGATATGG	GACCTCCGTCAACTTCGATG	141
Carnitine/acyl-carnitine carrier (<i>CAR</i>)	GAAGGCATTGCCAGGGGGT	CATTATGAACGGGGACGGTG	139
Glutamine amidotransferase subunit pdxT (<i>GLAT</i>)	TGAGAGACTTTGTCAAGAACCA	TGCGCGGATAAATACACCCAT	143
Mfs transporter (<i>MFS</i>)	CTAATTATGTTCTTTTGGGGTAC	GCATCGCCTATACCAACAAGA	136
C6 transcription factor (<i>CTF1B</i>)	CAAACCACTCGTCAACACAATC	GATTGCCTTGAGTCTGATAGAG	138
Acyl-CoA dehydrogenase (<i>ACAD</i>)	GAGAACGAGACGCCCCGAAG	GTTGTAGTAAGGACTCTTGTAG	108
<i>GPR1/FUN34/YAAH</i> family protein	ACTGGCTGGGATGTGGGAG	TTCTTCTCCGTCATTTCTTGA	141
Pyruvate kinase (<i>PK</i>)	ATGCGATGATAAATATCTCTACG	GACACTTGGCGCGGAGAGA	143
Diacylglycerol o-acyltransferase (<i>DGAT</i>)	TATTAGATATACCAAGTGCCG	TACCCTGGGTTTGTATTCAATG	143
Isovaleryl-CoA dehydrogenase (<i>IVD</i>)	GATGTGGATTACCAACGGGC	TCATGCCAAGCTTGTCGAGTT	152
Ubiquitin-protein ligase (<i>UBI</i>)	GGAGGCATGCAGATCTTCGT	ACGACCGTCTCAAGCTGC	168
Family integral membrane protein (<i>IMP</i>)	CGCCAGCAATCTGATTATCTC	AACCCAGCTGACCTTCATTAC	142
Heat shock protein (<i>HSP10</i>)	TCTTCCTCCCAGAGAGCGC	CAGGGCTGCCTCCATACTG	143
Heat shock protein (<i>HSP30</i>)	GGCCTTGACAGCATTCTGG	CTGGCGATAAAGGGCAGAAG	130
Heat shock protein (<i>HSP70</i>)	GCAGAAGGAGCTTGAAAGTGT	GTCAACCTCCTCGACAGTAG	181
ATP synthase f0 subunit 9 (<i>ATPS9</i>)	AAGCAGCGAAAATAATGGGATC	GCAAATAATCCTGTAGCTTCTG	181
Lanosterol 14 α -demethylase (<i>ERG11</i>)	CTGAGCTGTAGGGAAAAGTAC	TCCTCAGCGCAAACGTCCTT	131

C5,6-desaturase (<i>ERG3</i>)	GGAGAATATGTATACCAGCCC	ATCCAAGTGATGAGATACAGAG	128
Delta-24-sterol C-methyltransferase (<i>ERG6</i>)	GCTACTCTTACCCGACATTAC	AATGGGCAAGGTAATGTTTCATG	142
C-22 sterol desaturase (<i>ERG5</i>)	GGTCCCATGTTCAAAATCCCT	AAATTTGTGGAAAACCGAGACG	123
C-4 methyl sterol oxidase (<i>ERG25</i>)	GGACCATGGCCTACCAAATC	GCGGAGTATTGGTGGTGGAT	129
cDNA*	AGCAGTGGTATCAACGACAGAGTACG		-
	CGGG		
CDS*	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT		-
	(30)N1N		
PCRII*	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT		-
JBam12*	GATCCGTTTCATG		-
JBam24*	ACCGACGTCGACTATCCATGAACG		-
NBam12*	GATCCTCCCTCG		-
NBam24*	AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAG		-
RBam12*	GATCCTCGGTGA		-
RBam24*	AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGAG		-
T7*	GTAATACGACTCACTATAGGGC		-
Oligo (dT) ₁₅ *	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT		-
	(30)N1N		

* Primers used in RDA experiments.

Table 2 – Genes differentially expressed in *Paracoccidioides* in response to treatment with itraconazole.

Functional Category	Gene Product	Best hit/ <i>Paracoccidioides</i> genome locus	e-value	Number of occurrences ^a	
				1h	2h
Metabolism/ Energy	3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase (<i>DAHPS</i>)	PAAG_03237	9.2e-29	+2	
	Cysteine desulfurase (<i>CYSD</i>)	PAAG_05850	2.2e-58	+22	
	Betaine aldehyde dehydrogenase (<i>BADH</i>)	PAAG_05392	2.1e-19	+2	
	NADP-specific glutamate dehydrogenase (<i>GDH</i>)	PAAG_07689	1.6e-26	+1	
	NAD dependent epimerase dehydratase (<i>EDH</i>)	PAAG_05580	1.6e-30	+1	
	Succinyl 3-ketoacid-coenzyme A transferase (<i>SCOT</i>)	PAAG_05093	2.6e-17	+1	
	Isoform cra_b	PAAG_05467	3.2e-15	+1	
	Ribulose-phosphate 3-epimerase (<i>RP3E</i>)	PAAG_01632	6.5e-42	-17	
	Aconitase (<i>ACO</i>)	PAAG_05328	5.8e-18	-2	
	D-amino-acid oxidase (<i>DAAO</i>)	PAAG_02361	2.4e-38	-3	
	Er-associated proteolytic system protein (<i>ERAD</i>)	PAAG_04633	8.6e-40	-4	
	Oxysterol-binding protein (<i>OSBP</i>)	PAAG_06807	3.6e-45		+6
	Isovaleryl-CoA dehydrogenase (<i>IVD</i>) ^b	PAAG_06830	1.0e-23	+4	
	Acyl-CoA dehydrogenase (<i>ADH</i>) ^c	PAAG_05211	1.0e-30	+1	
	Acyl-CoA dehydrogenase (<i>ADH</i>)	PAAG_01222	2.1e-19	-8	
	Hormone-sensitive lipase (<i>LIPE</i>)	PAAG_06218	7.6e-37	+1	
	Pyruvate kinase (<i>PK</i>) ^c	PAAG_06380	3.1e-31	+1	
	Aldehyde dehydrogenase	PAAG_05249	1.0e-44	-4	

Transcription	(<i>ALDH</i>)				
	Glutamine amidotranferase subunit pdxT (<i>GLAT</i>)	PAAG_07505	1.3e-23	-5	
	ATP synthase f0 subunit 9 (<i>ATPS9</i>) ^b	PAAG_12009	3.0e-17		+22
	Short chain dehydrogenase (<i>DHS-14</i>)	PAAG_04787	3.2e-48	+1	
	Transcription factor (<i>STE</i> A)	PAAG_00406	8.4e-50	+3	
	Pirin (<i>PIR</i>)	PAAG_04726	2.5e-52	+7	+47
	RING finger protein (<i>RNF</i>)	PAAG_06129	1.5e-18	+2	
	Apses transcription (<i>APSES</i>)	PAAG_02379	1.6e-30	+1	
	Myosin class ii heavy chain (<i>MHC</i>)	PAAG_02991	4.9e-37	+1	
	mRNA-nucleus export ATPase	PAAG_04548	4.0e-45	-27	
Cell Rescue, Defense and Virulence	C6 transcription factor (<i>CTFIB</i>)	PAAG_01359	4.5e-65	-12	
	Survival factor1 (<i>SVF1</i>)	PAAG_02425	4.7e-36	+1	
	Mannan polymerase ii complex ANP1 subunit (<i>ANP1</i>)	PAAG_03940	9.4e-54	+2	
	Heat shock protein (<i>STI1</i>) ^b	PAAG_06811	2.2e-24	+2	
	Heat shock protein (<i>HSP10</i>)	PAAG_05142	6.5e-32	+1	+2
	Heat shock protein (<i>HSP30</i>) ^c	PAAG_00871	5.4e-52	-26	-33
	Heat shock protein (<i>HSP70</i>) ^c	PAAG_08003	4.4e-40		+3
	Heat shock protein (<i>HSP60</i>) ^b	PAAG_08059	4.3e-55		-12
	ATP-dependent RNA helicase (<i>eIF4A</i>)	PAAG_00689	1.3e-24	+7	
	Serine threonine-protein kinase (<i>SRK1</i>)	PAAG_06726	7.6e-66	-2	
Protein synthesis and biogenesis	40S ribosomal protein S4 (<i>RPS4</i>)	PAAG_03816	7.3e-37		+2
	Ubiquitin-protein ligase (<i>UBI</i>) ^b	PAAG_02632	3.7e-11	+2	
	WD repeat containing protein (<i>WDR</i>)	PAAG_00103	1.0e-25	+1	
	Ubiquitin thioesterase (<i>OTU1</i>)	PAAG_08841	1.0e-32	-5	
Protein Fate (folding, modification, destination)	Ubiquitin fusion degradation protein (<i>UFD</i>)	PAAG_01475	1.0e-62		+1
	Proteasome component (<i>PREP6</i>)	PAAG_07802	6.1e-5	+1	
Cellular transport, transport facilities and transport routes					
	Tetracycline resistance	PAAG_01353	1.0e-56	+13	

	protein, (TETA)				
	Mfs transporter (MFS) ^b	PAAG_02191	7.3e-56	+9	
	Nucleoporin (SONB)	PAAG_02655	1.1e-36	+1	
	Voltage-gated Ca ²⁺ alpha subunit (CAV)	PAAG_01353	9.9e-15	+1	
	Sodium-dependent phosphate transporter (SPIT)	PAAG_03892	1.5e-11	+1	
	Glutathione S-transferase (GST) ^b	PAAG_03931	1.0e-33	+1	
	Rep-helicase	PAAG_02735	4.2e-27	+1	
	Zinc finger membrane protein (DHHC)	PAAG_06616	6.6e-53	-4	
	autophagy regulatory protein	PAAG_04970	2.6e-33	-2	
	GPR1/FUN34/YAAH family protein	PAAG_08587	1.2e-47	-13	-5
	Carnitine/acyl carnitine carrier (CAR) ^b	PAAG_03452	1.7e-30	-18	-89
	General secretion pathway protein.	PAAG_05009	2.7e-60	-10	
	Family integral membrane protein (IMP) ^c	PAAG_03183	4.1e-50		+1
	Hemolysin-iii channel protein (HLYiii)	PAAG_01871	6.0e-34		+3
	Integral membrane MPV17/PMP22	PAAG_02868	6.6e-37		-2
	Vesicular fusion protein (SEC17)	PAAG_06233	2.8e-77		-1
Biogenesis of Cellular Components (cell wall/ membrane)					
	Chitin synthase regulator 2 (CHSr) ^c	PAAG_04860	2.0e-17	+3	
	Diacylglycerol o-acyltransferase (DGAT) ^c	PAAG_07527	1.4e-64	+1	
	Phosphatidyl synthase (PHS)	PAAG_03571	6.5e-34	+1	
Cellular communication/ Signal transduction mechanism					
	FluG Domain-containing protein	PAAG_05486	1.0e-53	+1	
	Leucine -rich repeat Igi member 4 (LGI4)	PAAG_00833	1.0e-25	+1	
	Conserved Lysine protein (LYS)	PAAG_03092	6.2e-43	+2	
Unclassified protein					
	Conserved hypothetical protein	PAAG_02735	1.3e-39	+2	
	Conserved hypothetical protein	PAAG_01353	1.3e-18	+6	
	Conserved hypothetical protein	PAAG_07364	5.8e-30	+4	
	Conserved hypothetical protein	PAAG_00520	3.9e-27	+3	

Conserved hypothetical protein	PAAG_02379	1.5e-19	+2	
Conserved hypothetical protein	PAAG_02210	1.8e-37	+6	
Conserved hypothetical protein	PAAG_02236	1.0e-15	+1	
Conserved hypothetical protein	PAAG_03559	4.8e-47	+1	
Conserved hypothetical protein	PAAG_03596	4.4e-83	+3	
Conserved hypothetical protein	PAAG_08759	1.5e-63	+2	
Conserved hypothetical protein	PAAG_07907	1.0e-42	+2	
Conserved hypothetical protein	PAAG_04000	1.0e-44	-4	
Conserved hypothetical protein	PAAG_06816	1.7e-8		-2
Conserved hypothetical protein	PABG_06807	1.0e-51		-6
Conserved hypothetical protein	PAAG_01871	1.0e-51		-2
Conserved hypothetical protein	PAAG_07034	3.4e-33	+2	
Conserved hypothetical protein	PADG_04444	6.7e-17		+2
Hypothetical protein	PAAG_02259	1.0e-18	-3	
Domain-containing protein (DUF1688)	PAAG_04000	7.5e-17	+2	

^aOccurrences are expressed as the fold change relative to the value for the nontreated, control; +, induction; -, repression.

^bGenes found in other fungi when exposed to itraconazole.

^cGenes found in other fungi when exposed to other azoles.

Genes not marked are specific to *Paracoccidioides*.

Table 03 – *Paracoccidioides* identified proteins with differential expression during exposition to itraconazole.

Gene Bank – NCBI reference/Protein description ^b	MS/MS		Exp/ pI ^e	Exp/ MW ^h
	Score	Matched peptides ^g		
XP_002796422.1/ Integral membrane protein	198	6	9.70	42210.74
XP_002796455.1/ Succinyl-CoA ligase subunit beta	160	8	5.74	48257.22
XP_002795809.1/ Cytochrome P450 55A1	118	3	5.97	44774.42
XP_002794607.1/ CobW domain-containing protein	174	2	4.67	46759.65
XP_002789134.1/ Hypothetical protein PAAG_08963	129	5	9.66	30782.21
XP_002791682.1/ Conserved hypothetical protein	127	6	5.36	85520.02
XP_002790000.1/ Conserved hypothetical protein	141	4	5.80	63356.53
XP_002798063.1/ Propionyl-CoA carboxylase	98	1	8.44	645652.74
XP_002797107.1/ L-threonine 3-dehydrogenase	102	7	5.85	37542.45
AAC14712.1/ Heat shock protein 60	132	4	5.51	62132.91
XP_002796880.1/Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	112	4	7.87	22829.04

^{**}Spots visualized only in exposition itraconazole condition;

^bAccession number/Protein description – accession number of matched protein from GenBank general information identifier;

^eExp/ pI – experimental/ isoelectric point; ^hExp/MW (kDa) – experimental/molecular weigh;

MANUSCRITO II

β -Carboline alkaloids from *Galianthe ramosa* (Rubiaceae) inhibit malate synthase from *Paracoccidioides* spp

Carla S. de Freitas¹, Daniely Silva¹, Lucilia Kato¹, Cecília M. A. de Oliveira¹, Ivânia T. Schuquel², Piero G. Delprete³, Roosevelt A. da Silva⁴, Guilherme de Oliveira Quintino⁴, Benedito R. Silva Neto⁵, Célia M. A. Soares⁵, Maristela Pereira⁵

¹Instituto de Química – Universidade Federal de Goiás, Goiania, GO, Brazil

²Depto. Química, Universidade Estadual de Maringa, Maringa, PR, Brazil

³Herbier de Guyane, IRD, UMR AMAP, Cayenne Cedex, French Guiana, France

⁴Núcleo Colaborativo de BioSistemas, Campus Jataí, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

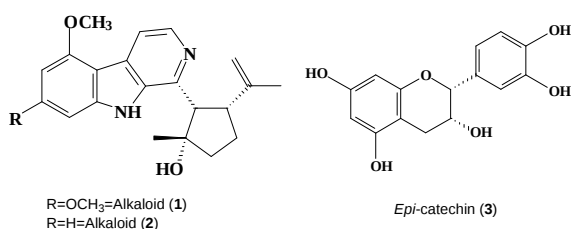
⁵Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Goiás, Goiania, GO, Brazil

Correspondence: Prof. Dr. Lucilia Kato, Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, 74001-970 - Goiânia, GO, Brazil. e-mail:

lucilia@quimica.ufg.br. Phone +55 62 3521 1008 Fax +55 62 3521 1167

Abstract

As part of our continuing chemical and biological analyses of Rubiaceae species from the Cerrado, we isolated new alkaloids **1** and **2**, together with a known epicatechin (**3**), ursolic acid, and oleanolic acid, from *Galianthe ramosa*. Alkaloid **2** inhibited the malate synthase from the pathogenic fungus *Paracoccidioides spp.* This enzyme is considered an important molecular target because it is not found in humans. The results were supported by molecular docking simulations.



Keywords: *Galianthe ramosa*, indole alkaloids, malate synthase, *Paracoccidioides spp*

Introduction:

Paracoccidioides spp are dimorphic fungi that cause paracoccidioidomycosis (PCM), the most prevalent invasive fungal disease in South America [1]. There are distinct forms of PCM [2], and treatment regimens of longer duration are required to treat patients with the more severe forms, resulting in greater toxicity and even therapy relapse [3]. In addition, cases of PCM associated with AIDS have recently been reported [4-5]. Over the latest decade, efforts have been focused on finding specific targets for antifungal drugs that are absent in mammalian cells. The role of the glyoxylate cycle and the associated enzymes isocitrate lyase (ICL) and malate synthase (MLS) in microbial virulence has been reported for several pathogens, including *Mycobacterium tuberculosis* [6], *Candida albicans* [7-8], *Cryptococcus neoformans* [9], *Paracoccidioides spp*, and the phytopathogenic fungus *Magnaporthe grisea* [10]. Expression of the MLS gene in *Paracoccidioides spp* is induced during the infectious process, suggesting that this enzyme has an important role in the establishment of infection [11-14]. Therefore, this enzyme may be an attractive target for new antifungal agents against PCM.

Indole alkaloids are a diverse and complex class of natural products. Because this class has been found to have a wide range of biological activities, including antifungal activity, we included carboline alkaloids isolated from Rubiaceae species in our antifungal screening program to identify natural molecules with the potential to inhibit *Paracoccidioides spp* growth and PbMLS activity.

In this paper, we describe the structural elucidation of two novel indole alkaloids, **1** and **2**, isolated from the aerial part of *Galianthe ramosa* E. L. Cabral. We also present their activity against *Paracoccidioides* and PbMLS and the results of molecular docking investigations.

Results and Discussion:

Structural elucidation

Alkaloid **1** was obtained as a brown solid and was deduced to contain a nitrogen function based on TLC analysis using Dragendorff's reagent. Analysis of the HRMS data indicated that compound **1** has the molecular formula $C_{22}H_{26}N_2O_3$ [(M+H)⁺: m/z 367.2027, calculated m/z 367.2022]. The IR spectrum suggested the presence of an NH and/or OH (3390 cm^{-1}) functionality and an alkene group (1625 cm^{-1}). The ^1H NMR spectrum has resonances at δ 8.33 (1H, d, $J=5.4\text{ Hz}$), 7.89 (1H, d, $J=5.4\text{ Hz}$), 6.28 (1H, d, $J=1.8\text{ Hz}$) and 6.54 (1H, d, $J=1.8\text{ Hz}$) that were correlated with 138.4, 114.5, 91.9 and

87.2, respectively (Table 1), suggestive of a tetrasubstituted phenyl ring and 1,2-pyridine ring. The presence of seven quaternary sp^2 carbons, at 135.4 (C-2), 141.9 (C-3), 128.7 (C-7), 106.3 (C-8), 157.5 (C-9), 162.3 (C-11) and 142.8 (C-13), together with the HMBC correlations between H-6 and C-8 (106.3) and C-2 (135.4) and the H-5/C-7 (128.3), H-10/C8 (106.3) and H-12/C-10 (91.9) correlations helped us to elucidate the presence of an disubstituted moiety β -carboline. In the HSQC spectrum, the resonances at δ 4.01 (3H, s) and 3.86 (3H, s) correlated with resonances at 55.6 and 55.8, respectively, and there were HMBC correlations between both C-9 (δ_c 157.5) and C-11 (δ_c 162.3) and these methoxy groups. These correlations corroborated a presence of a *meta*-substituted β -carboline core at C-9 and C-11. Four methylene hydrogens, δ 2.13-1.83 (m, H-16 and H-17), correlated with δ 41.8 and 28.6, and two methine hydrogens, δ 3.72-3.67 (1H, m, H-18) and δ 3.76 (1H, d, $J=11$ Hz), correlated with δ_c 46.5 and 57.6, respectively. An oxymethine hydrogen was also observed at δ 83.3. The COSY correlations H-16/H-17/H-18 and the HMBC correlations H-14/C-15/C-16 confirm the presence of a cyclopentane unit in compound **1**. Additionally, in the HMBC spectrum, the methyl group at δ 0.98 (3H, s, H-22) correlated with C-15 (δ 83.3), suggesting that the five-membered ring was substituted by hydroxyl and methyl groups.

The indole unit and the cyclopentane ring were found to be connected by C-3 and C-14, as demonstrated by the HMBC correlations between the hydrogens at δ 4.61 (1H, br s, H-20a) and δ 4.67 (1H, brs, H-20b) and the sp^2 carbon at 109.5. Additionally, the methyl hydrogens at δ 1.71 (3H, s, H-21) correlated with δ_c 20.9 (C-21) in the HSQC spectrum and with C-20 (109.5) and 147.4 (C-19) in the HMBC spectrum, indicating the presence of an isopropenyl unit.

The main HMBC correlations, H-14/C-3/C-15/C-18 and H-20/C-18, demonstrated that the three units are connected. Further HMBC correlations are listed in Table 1. All these data were consistent with a new alkaloid, **1**. Our data for compound **1** were in accordance with the literature data for a similar alkaloid isolated from *Galianthe thalictroides* [15]. The relative configuration of the asymmetric center at C-20 was determined based on the coupling constant of H-14 (δ 3.76, d, $J=11.0$), which corresponded to a $^3J_{H14-H18}$ vicinal coupling. The large coupling constant observed is consistent with the *cis* orientation. The NOE difference peaks for H-14/H-16/H-17 and H-18 when the methyl group was irradiated verified that the methyl proton H-14 and H-18 were in the *cis* orientation.

Alkaloid **2** was obtained as a brown solid and was deduced to possess a nitrogen function based on TLC analysis using Dragendorff's reagent. Analysis of HRMS data indicated that compound **2** has the molecular formula $C_{21}H_{25}N_2O_2$ $[(M+H)^+ : m/z\ 337.1965$, calculated $m/z\ 337.1916]$. This ion was 30 amu lighter than that of alkaloid **1**, suggesting that compound **2** has only one methoxy unit.

The IR spectrum suggested that an NH and/or OH (3432 cm^{-1}) functionality and an alkene group (1620 cm^{-1}) are present in **2**.

The NMR spectrum showed resonances at $\delta\ 8.40$ (1H, d, $J = 5.3\text{ Hz}$, H-5), $\delta\ 8.02$ (1H, d, $J = 5.3\text{ Hz}$, H-6), $\delta\ 6.68$ (1H, d, $J = 8.11\text{ Hz}$, H-10), $\delta\ 7.11$ (1H, d, $J = 8.11\text{ Hz}$, H-12), and $\delta\ 7.45$ (1H, t, $J = 8.11\text{ Hz}$, H-11), characteristic of an indolic moiety with meta substitution. The HSQC and HMBC correlations are listed in Table 1. Only one methoxy was identified, at $\delta\ 4.07$ (s, 3H), and it correlated with $\delta_c\ 55.7$. The HMBC correlation of this methoxy group with the resonance at 157.2 and the ^{13}C assignments for the aromatic ring system suggest a 9 substitution on the β -carboline indolic ring. The comparison of the data for **2** with those for alkaloid **1** indicated that alkaloid **2** is 9-methoxy indolic alkaloid derivative. Epicatechin, ursolic acid and a mixture containing ursolic acid and oleanolic acid were also isolated from *G. ramosa*, and the data for these compounds are accordance with the literature [16-17].

Compounds **1** and **2** were tested for activity against *Paracoccidioides spp* and its enzyme PbMLS. Both **1** and **2** inhibited the growth of *Paracoccidioides spp*, with MIC values of 185 μM and 26 μM , respectively. We evaluated the effects of alkaloids **1** and **2** on PbMLS using pyruvic acid as a positive control [18-19]. Alkaloid **1** had no inhibitory activity on PbMLS, but alkaloid **2** inhibited this enzyme with an IC_{50} of 50 μM (Fig. 1), similar to that of the positive control, pyruvic acid.

Homology model

The 3D-homology model of PbMLS was built using a modeling algorithm based on the 3D-structures of *Escherichia coli* and *Bacillus anthracis* malate synthase A, which both have 49% identity to PbMLS (PDB id: 3CUZ; resolution: 1.04 Å). The Ramachandran plot of the homology model was used to assess the Φ and Ψ distributions, and 95.2% of bonds were in the favored region and 3.6% were in allowed regions. The quality factor of this structure was estimated to be 76.209 by ERRAT.

Molecular dynamics

PbMLS was subjected to 20 ns simulation with the program Gromacs to achieve a stable RMSD for the non-hydrogen atoms with respect to the structure homology models. Fig. 2A shows that the conformation of *PbMLS* remained stable at around RMSD = 0.4 nm after approximately 10 ns of simulation. The structure selected for *PbMLS* after the MD simulations had a higher RMSD with respect to the homology model, with an increase of approximately 2.55 Å. Differences in the secondary structures between homology model and the MD model were small. The alpha helix-like pattern was reduced by only 2.5%, and the beta sheet-like pattern was increased by only 0.8%. The conformation of the binding pocket was preserved after the MD simulations. More pronounced deviations were observed in sections involving the residues PRO333-ALA346, THR489-PRO497 and, in particular, VAL468-VAL476.

Molecular docking

The molecular docking of alkaloids to *PbMLS* was performed using AutoDock Vina. Only the best model structures (lowest score) provided by AutoDock Vina were selected. Fig. 2B shows how each compound is accommodated in the binding pocket and the *PbMLS* residues that interact most strongly.

Note that for both alkaloids **1** and **2**, the residue ARG50 is critical for stability through the π -interactions. The heterocycles of alkaloids **1** and **2** are accommodated in the cavity in a more constrained conformation that favors the formation of π -interactions. Strong electrostatic interactions between chemical groups present in both compounds occur with LEU43 and SER251. In the case of LEU43, a hydrogen bond with **2** occurs via the methoxy group of the indole, and for alkaloid **1** this interaction occurs via the NH of the indole core. The residues ARG46, SER251, and GLU219 may also contribute to the stability of alkaloid **1** via electrostatic interactions. In the case of the indole group of alkaloid **2**, the electrostatic interaction with ARG47 favors a stronger bond than that between the indole group of **1** and LEU43. Conversely, the electrostatic interaction between the methoxy group of **1** and ARG46 favors a stronger bond than that between the same group in **2** and LEU43.

The energies obtained by AutoDock Vina for **1** (−7.3) and **2** (−8.1) are very close, with is

a difference of only 0.8. These data indicate that alkaloid **2** tends to be somewhat more stable than **1** (the lower the score, the greater the stability). This small energy difference is certainly not sufficient to explain the differences in the experimental activity results for these compounds. However, when we observe the characteristics of each compound relative to its specificity and ability to accommodate the binding pocket, it is clear that alkaloid **2** has a greater propensity for binding. LigPlot diagrams of the protein/ligand binding modes (Fig. 2B) show that there is a higher proportion of nonpolar contacts for **2** than for **1**. These contacts result in a large increase in the entropy of the medium when this ligand, or its non-polar groups, are well accommodated in the cavity of PbMLS (greater complementarity). This conclusion is supported by the fact that alkaloid **2** has a lower accessible surface area than alkaloid **1**. Its non-polar groups are better protected in the PbMLS cavity (see Fig. 2B). Our hypothesis is that its lower polar content provides sufficient specificity to ensure greater accessibility to the binding pocket, resulting in a lower binding free energy (not estimated here).

In conclusion, two new alkaloids (**1** and **2**) were isolated from *Galianthe ramosa*, and alkaloid **2** was found to have relevant activity against *Paracoccidioides* spp and the enzyme PbMLS. Alkaloid **2** is the first example of a MS inhibitor reported in the literature. Additionally, the results of the molecular docking analysis corroborated the experimental findings.

Material and Methods:

General Experimental Procedures:

IR spectra were obtained with a Perkin Elmer Spectrum 400 FT-IR. ¹H, ¹³C, and 2D spectra were recorded on a Bruker Avance II 500. HRMS spectra were recorded with a Waters Xevo Q-Tof spectrometer.

Plant Material: Fresh material (stems, leaves, flowers, and roots) of *G. ramosa* was collected by Piero Delprete on 19 November 2006 from an area with cerrado vegetation with rocky outcrops at Mun. Cocalzinho, Parque Estadual dos Pireneus (15°48'23"S, 48°49'21"W; at 1100-1200 m altitude). The voucher specimen, Delprete et al. 9955, was identified by Piero Delprete and deposited at the herbarium (UFG) of the Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil.

Plant extract and isolation of individual compounds:

The plant material was dried at room temperature, and the dry material (leaves (87 g), stems (102 g), flowers (22 g) and roots (103 g)) was powdered and extracted with 99% ethanol several times. The ethanol was removed under vacuum to afford crude ethanolic extracts of the leaves (EEL, 24.5 g), flowers (EEF, 9.2 g), stems (EES, 11.9) and roots (EER, 12.6 g). The EEL extract was partitioned successively with hexane (HL, 0.9 g), chloroform (CL, 1.5 g), ethyl acetate (AL, 2.3 g), and methanol (ML 5.0 g). This process was repeated with the EES and EER extracts.

The successive purification of the CL fraction using a chromatography column yielded alkaloid **1** (12 mg), alkaloid **2** (2 mg) and ursolic acid (44 mg). After purification, the AL fraction yielded epicatechin (6 mg), oleanolic acid (20 mg) and ursolic acid (25 mg).

Minimum inhibitory concentration (MIC)

The yeast assay was performed using the microdilution method as described in M27-S3 reference method of the CLSI [20] with modifications and as previously described by de Paula e Silva et al. (2013) [21] to determine the minimum inhibitory concentration (MIC). Alkaloids **1** and **2** from *G. ramosa* were prepared as described above and diluted according to CLSI M27-A3 method. Inocula were prepared in RPMI-1640 (GIBCO™) with L-glutamine and without sodium bicarbonate supplemented with 2% glucose and buffered to pH 7.0 using 0.165 M MOPS, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The *Paracoccidioides* spp suspension was adjusted to a final concentration 0.5×10^3 to 2.5×10^3 cells/mL in RPMI-1640. In 96-well plates, serial dilutions (250 mg/L to 0.48 mg/L) of the analyzed compounds were added to wells containing yeast. The plates were incubated at 35°C and 150 rpm for 48 h. After this period, alamarBlue® (BIOSOURCE) was employed (according the manufacturer's instructions), and the plates were incubated for an additional 24 h, thus requiring 72 h for the MIC final reading. The lowest concentration of antifungal agent that substantially inhibited the growth of the organism was visually determined as the point at which there was no change in the original blue color of the reagent.

PbMLS activity assays

The activity assays as well as the inhibition assays using pyruvic acid and indole alkaloids were performed as described previously by Roucourt *et al.* [22]. Briefly, an endpoint assay that measures the amount of CoA was used. The amount of free thiol groups on CoA was determined using 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) or DTNB

(Sigma Aldrich,) [23]. The absorption at 415 nm was measured in a microplate reader (Model 680 microplate reader, Bio-Rad Laboratories). DTNB was added to a final concentration of 2 mM. The addition of DTNB to the mixture arrests the reaction, most likely due to reaction of the DTNB with the free thiol groups of cysteine residues [24]. The standard reaction mixture contained 2 μ g *PbMLS*, 100 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM glyoxylate (Sigma-Aldrich), and 1 mM acetyl CoA (AppliChem GmbH). Unless stated otherwise, the reactions were incubated for 30 min at pH 7.5. All experiments were conducted in triplicate. The error bars correspond to one standard deviation.

Receptor preparation

The 3D structure of *PbMLS* was initially predicted by homology modeling using the ModWeb server [25]. The quality of the predicted structure was assessed using the NIH-MBI laboratory servers (<http://nihserver.mbi.ucla.edu>) with ERRAT [26]. The Ramachandran plot of *PbMLS* was prepared on the RAMPAGE web server [27], and Verify 3D was used to evaluate the environments of the amino acids [28].

The molecular dynamics (MD) simulations for this structure were performed with GROMACS [29–31] to reproduce the structural stability of this receptor in its native environment [32]. The Particle Mesh Ewald method [33] was used with periodic boundary conditions in all directions. The entire system was composed of 5406 atoms of *PbMLS*, 03 Cl⁻ counterions and 22500 solvent atoms. To release conflicting contacts, the simulation was then subjected to minimization using the steepest descent energy and was considered complete only when the tolerance of 1000 kJ/mol was no longer exceeded. After minimization, the system was subjected to a 100 ps simulation in the NVT and NPT ensembles. For both ensembles, the temperature was set to 300 K, and the position of the protein was restricted. In the NVT ensemble, temperature coupling was performed with the V-rescale Berendsen thermostat (thermostat relaxation constant = 0.1 ps), and the velocities were determined from the Maxwell distribution. In the NPT ensemble, pressure coupling was performed with the Parrinello-Rahman barostat under the following conditions: pressure, 1 atm; time-step, 2 fs; and isothermal compressibility of water, 4.5×10⁻⁵ bar⁻¹. Only after these steps was the system subjected to MD simulations. The simulation was performed for 20 ns (nanoseconds) at a constant temperature of 300 K and a pressure of 1 atm with a time-step of 2 fs (femtoseconds) and without any restriction of the protein's conformation. Data concerning the trajectory of

these times were collected every 5 ps. The equilibration of the trajectory was assessed by monitoring the equilibration of quantities such as the root-mean-square deviation (RMSD) of non-hydrogen atoms with respect to the initial structure.

The average structure of the trajectory was also determined using the g_rms algorithm [34]. The first 10 ns of the trajectory were not used to determine the average structures. Water molecules and ions were removed (including ordered water molecules) from the selected structure used in molecular docking simulations.

Ligand preparations

The 3D structures of **1** and **2** were generated using the GlycoBioChem PRODRG2 Server [30]. Following conversion into PDB format, charges and non-polar hydrogen atoms were added using the prepare_receptor4.py script from MGLTools [35], and pdbqt files (format for AutoDock) containing the individual compounds and the receptor were created. The conformations in those files were used as the initial conformations in the molecular docking simulations.

Molecular docking

The conformations of the compounds on the surface of *PbMLS* were limited to only a region surrounding the binding pocket of the protein, which was defined using the DogSiteScorer - Active Site Prediction and Analysis Server [36, 37].

AutoDock Vina [38, 39] was used for the molecular docking simulations with the *PbMLS* model and the compounds. Simulations were performed with no pre-conceived bias toward particular interactions, and the best model structure of the complex was considered the one with the greatest stability and accessibility (highest hits).

The scores for the conformations generated by AutoDock Vina (global energy) take into account the weak attractive and repulsive van der Waals forces (hydrophobic interactions), hydrogen bonds, and torsional penalties [40].

Acknowledgments:

This work, performed at Universidade Federal de Goiás, was supported by MCTI/CNPq (Ministério da Ciência e Tecnologia/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FNDCT (Fundo Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FAPEG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos), and INCT_IF (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica). Additionally, CSF, DS and BRSN were supported by fellowships from CAPES, and GOQ and PD were supported by CNPq.

Conflicts of interests

The authors declare no conflicts of interests.

References

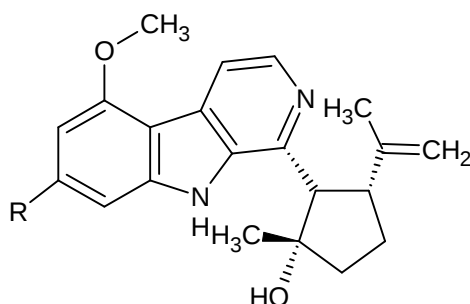
- [1] Restrepo A, Mc Eween JG, Castaneda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med. Mycol* 2001; 39: 233-241.
- [2] Bernard G, Kavakama J, Mendes-Giannini MJM, Kono A, Duarte AJ, Shikanai-Yasuda MA. Contribution to the natural history of paracoccidioidomycosis: identification of primary pulmonary infection in the severe acute form of the disease – a case report. *Clinical Infection Disease* 2005; 40:1-4.
- [3] Shikanai-Yasuda MA, Queiroz-Telles F, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. Consenso em Paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39(3): 297-310.
- [4] Nunura RJ, Salazar MD, Vásquez LT, Endo GS, Rodríguez FA, Zerpa LR. Paracoccidioidomycosis and multidrug-resistant tuberculosis (TBC-MDR) in patient coinfecting with HIV and hepatitis C. *Rev Chilena Infectol* 2010; 27(6): 551-5.
- [5] Bellissimo-Rodrigues F, Vitali LH, Martinez R. Serological diagnosis of paracoccidioidomycosis in HIV-coinfecting patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105(7): 904-7.
- [6] McKinney JD, Höner zu Bentrup K, Muñoz-Elías EJ, Miczak A, Chen B, Chan WT, Swenson D, Sacchettini JC, Jacobs WRJr, Russell DG. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* 2000; 406(6797): 735-8.
- [7] Lorenz MC, Fink GR. Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence. *Eukaryotic Cell* 2002; 1: 657-662.

- [8] Lorenz MC, Bender JA, Fink GR. Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryotic Cell* 2004; 3: 1076-1087.
- [9] Rude TH, Toffaletti DL, Cox GM, Perfect JR. Relationship of the glyoxylate pathway to the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 2002; 70: 5684-5694.
- [10] Thines ER, Webber RW, Talbot NJ. MAP kinase and protein kinase A-dependent mobilization of triacylglycerol and glycogen during appressorium turgor generation by *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* 2000; 12: 1703-1708.
- [11] Bastos KP, Bailão AM, Borges CL, Faria FP, Felipe MS, Silva MG, Martins WS, Fiuza RB, Pereira M, Soares CMA. The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. *BMC Microbiology* 2007; 7: 29.
- [12] Costa M, Borges CL, Bailão AM, Meirelles GV, Mendonça YA, Dantas SF, de Faria FP, Felipe MS, Molinari-Madlum EEWI, Mendes-Giannini MJ, Fiuza RB, Martins WS, Pereira M, Soares CMA. Transcriptome profiling of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast-phase cells recovered from infected mice brings new insights into fungal response upon host interaction. *Microbiology* 2007; 153: 4194-4207.
- [13] Derengowski LS, Tavares AH, Silva S, Procópio LS, Felipe MS, Silva-Pereira I. Upregulation of glyoxylate cycle genes upon *Paracoccidioides brasiliensis* internalization by murine macrophages and in vitro nutritional stress condition. *Med Mycol* 2008; 46: 125-134.
- [14] Goldman GH, dos Reis Marques E, Duarte Ribeiro DC, de Souza Bernardes LA, Quiapin AC, Vitorelli PM, Savoldi M, Semighini CP, de Oliveira RC, Nunes LR, Travassos LR, Puccia R, Batista WL, Ferreira LE, Moreira JC, Bogossian AP, Tekaiia F, Nobrega MP, Nobrega FG, Goldman MH. EST analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence/pathogenicity genes. *Eukaryot Cell* 2003; 2(1):34-48.
- [15] Figueiredo PO, Garcez FR, Matos MFC, Perdomo RT, Queiroz LMM, Pott A, Garcez AJS, Garcez WS. A new cytotoxic b-carboline alkaloid from *Galianthe thalictroides*. *Planta Med* 2011, 77:1852-1854.
- [16] El-Razek AMH. NMR assignments of four catechi epimers. *Asian J Chem* 2007, 19: 4867-4872.
- [17] Kim D, Han K, Chung I. Triterpenoids from the flower of *Campis grandiflora* K. Schum. as human acyl-CoA: cholesterol acyltransferase inhibitors. *Arch Pharm Res* 2005 28: 550-556
- [18] Anstrom DM, Kallio K, Remington SJ. Structure of the *Escherichia coli* malate synthase G pyruvate: acetylcoenzyme A abortive ternary complex at 1.95 Å resolution. *Protein Sci* 2003; 12:1822-1832.
- [19] Munir E, Takefumi H, Mikio S. Purification and characterization of malate synthase from the glucosegrown woodrotting basidiomycete *Fomitopsis palustris*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002; 66:576-581.
- [20] Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI), Document M38-A2. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi, Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI), Wayne, Pa, USA, 2nd edition, 2008.
- [21] de Paula e Silva AC, Oliveira HC, Silva JF, Sangalli-Leite F, Scorzoni L, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJ. Microplate alamarBlue assay for *Paracoccidioides* susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 2013; 51:1250-2.

- [22] Roucourt B, Minnebo N, Augustijns P, Hertveldt K, Volckaert G, Lavigne R. Biochemical characterization of malate synthase G of *P. aeruginosa*. BMC Biochemistry 2009; 10:1471-2091.
- [23] Ornston LN, Ornston MK: Regulation of glyoxylate metabolism in *Escherichia coli* K-12. J Bacteriol 1969; 98:1098-1108.
- [24] Beeckmans S, Khan AS, Kanarek L, Van Driessche E. Ligand binding on to maize (*Zea mays*) malate synthase: a structural study. Biochem J 1994; 303:413-421.
- [25] N. Eswar, B. John, N. Mirkovic, A. Fiser, V.A. Ilyin, U. Pieper, A.C. Stuart, M.A. Marti-Renom, M.S. Madhusudhan, B. Yerkovich, et al (2003). Tools for comparative protein structure modeling and analysis. *Nucleic Acids Res.* **31**:3375–3380.
- [26] Colovos C, Yeates TO. Verification of protein structures: Patterns of nonbonded atomic interactions. Protein Science 1993; 2: 1511–1519 Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/pro.5560020916>
- [27] Lovell SC, Davis IW, Arendall WB, De Bakker PIW, Word JM, Prisant MG, Richardson JS, Richardson DC. Structure validation by Ca geometry: ϕ, ψ and C β deviation. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics 2003; 50: 437–450 Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/prot.10286>
- [28] Luthy R, Bowie JU, Eisenberg D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. Nature 1992; 356: 83–85 Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/356083a0>
- [29] Van Gunsteren WF, Billeter SR, Eising AA, Hünenberger PH, Kröger P, Mark AE, Scott WRP, Tironi IG. Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide. Zürich, Groningen: Biomos b. v., 1996
- [30] Berendsen HJC, Van der Spoel D, Van Drunen R. Gromacs: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. Comput Phys Commun 1995; 91: 43–56
- [31] E. Lindahl BH, Van der Spoel D. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. J Mol Model 2001; 7: 306–317
- [32] Kim ND, Chun H, Park SJ, Yang JW, Kim JW, Ahn SK. Discovery of novel HCV polymerase inhibitors using pharmacophore-based virtual screening. Bioorganic & medicinal chemistry letters 2011; 21: 3329–3334 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21531135>
- [33] Darden T, York D, Pedersen L. Particle mesh Ewald: an N.log(N) method for Ewald sums in large systems. J Chem Phys 1993; 98: 10089–10092
- [34] Maiorov VN, Crippen GM. Size-independent comparison of protein three-dimensional structures. Proteins 1995; 22: 273–283 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7479700>
- [35] Schüttelkopf AW, Van Aalten DMF. PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography 2004; 60: 1355–1363 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15272157>
- [36] Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. Journal of Computational Chemistry 2009; 30: 2785–2791 Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.21256>
- [37] Volkamer A, Kuhn D, Grombacher T, Rippmann F, Rarey M. Combining Global and Local Measures for Structure-Based Druggability Predictions. Journal of Chemical Information and Modeling 2012; 52: 360–372 Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/ci200454v>

- [38] Volkamer A, Griewel A, Grombacher T, Rarey M. Analyzing the Topology of Active Sites: On the Prediction of Pockets and Subpockets. *Journal of Chemical Information and Modeling* 2010; 50: 2041–2052 Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/ci100241y>
- [39] Manuscript A. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J Comput Chem* 2011; 31: 455–461
- [40] Chang MW, Ayeni C, Breuer S, Torbett BE. Virtual screening for HIV protease inhibitors: a comparison of AutoDock 4 and Vina. *PloS one* 2010; 5: e11955 Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2915912&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Structural Formulas



Alkaloid 1 = R = OCH₃; Alkaloid 2 R = H

Legends

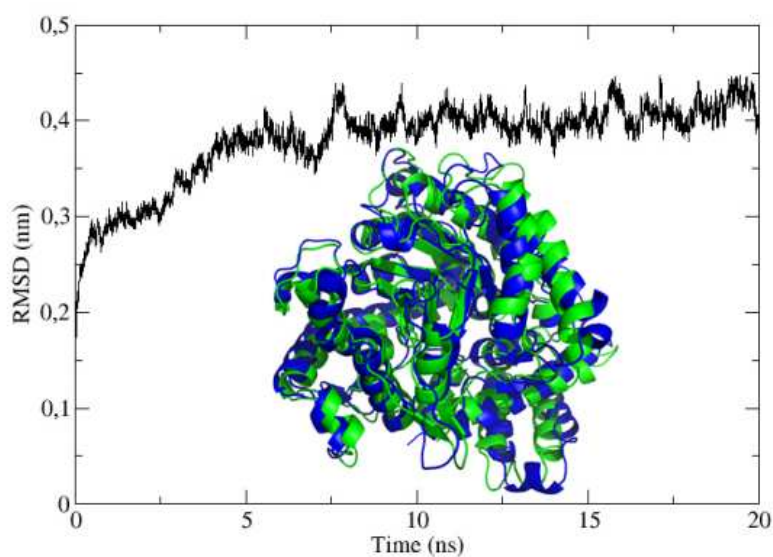
Figure 1. Dynamic profile for the RMSD as obtained in MD simulations of PbICL during 20 ns. In Figure inserted superimposition of homology-model (blue) and DM-structure (green) of PbMLS.

Figure 2. Molecular surface representation of the PbMLS and Ligplots of the protein/ligand in binding pocket of GR1 (gree) and GR2 (orange) compounds. Pink circles indicate residues involved in hydrogen-bond polar or charged interactions; green circles indicates residues involved in van der Waals interactions. Pi-interactions are represented by orange lines. The structures of the compounds shown refers to the lowest score obtained from the docking simulations with AutoDock Vina.

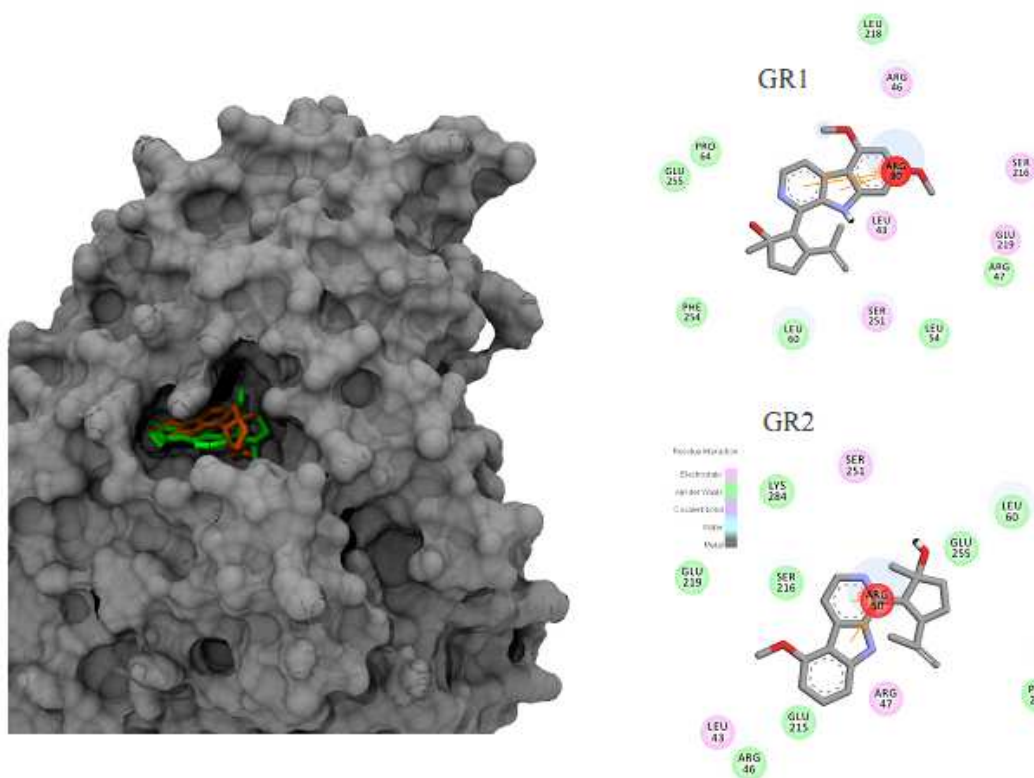
Figure 3. The influence of compounds alkaloids 1 and 2 on the malate synthase activity. The relative activity of malate synthase is shown in function of the pyruvic acid and compounds indole alkaloids concentration (in uM). The reaction without malate synthase (indicated by yellow) and with malate synthase (indicated by red) serves as reference.

Figures

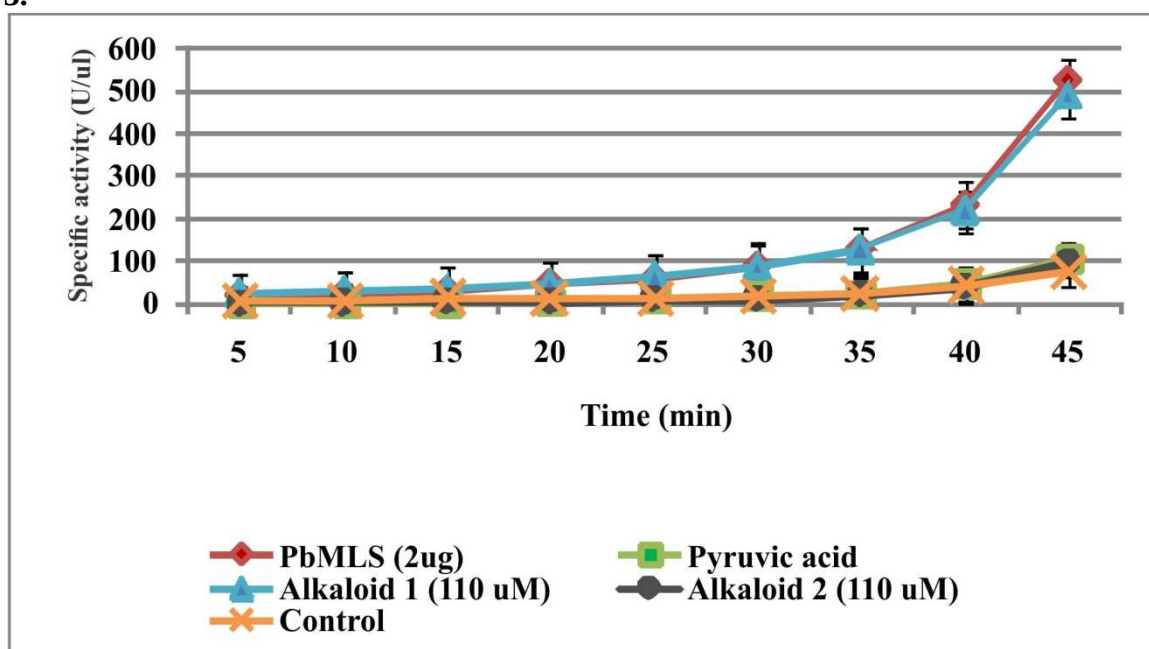
1.



2.



3.



Supplementary Material **Table 1: NMR data of** (500.13 MHz, CDCl₃) of alkaloid 1.

N	¹³ C/HSQC *	δ ¹ H (n°H; mult, J Hz)	COS Y	HMBC
1		9.57 (1H; sl)	—	—
2	135.4	—	—	—
3	141.9	—	—	—
4		—	—	—
5	138.3	8.33 (1H; d; 5.4)	H-6	114.5 (C ₆); 128.3 (C ₇); 141.9 (C ₃)
6	114.5	7.89 (1H; d; 5.4)	H-5	106.3 (C ₈); 135.4 (C ₂); 138.3 (C ₅)
7	128.3	—	—	—
8	106.3	—	—	—
9	157.5	—	—	—
10	91.9	6.28 (1H; d; 1.8)	H-12	87.2 (C ₁₂); 106.3 (C ₈); 157.5 (C ₉); 162.3 (C ₁₁)
11	162.3	—	—	—
12	87.2	6.54 (1H; d; 1.8)	H-10	91.9 (C ₁₀); 106.3 (C ₈); 162.3 (C ₁₁); 142.8 (C ₁₃)
13	142.8	—	—	—
14	57.6	3.76 (1H; d; 11)	—	83.3 (C ₁₅); 25.5 (C ₂₂); 46.5 (C ₁₈); 135.4 (C ₂); 141.9 (C ₃); 147.3 (C ₁₉)
15	83.3	—	—	—
16	41.8	2.13 – 2.04 (2H; m) 2.01 – 1.94 (1H; m)	H-17	—
17	28.6	2.13 – 2.04 (2H; m)	H-18	—

		1.90 – 1.83 (1H; m)	H-16	
18	46.5	3.72 – 3.67 (1H; m)	H-17	57.6 (C ₁₄)
19	147.3	–	–	–
20	109.5	4.61 (1H; sl)	–	20.9 (C ₂₁); 46.5 (C ₁₈)
		4.67 (1H; sl)	–	20.9 (C ₂₁); 46.5 (C ₁₈)
21	20.9	1.71 (3H; s)	–	46.5 (C ₁₈); 147.3 (C ₁₉); 109.5 (C ₂₀)
22	25.5	0.98 (3H; s)	–	41.8 (C ₁₆); 57.6 (C ₁₄); 83.3 (C ₁₅)
9 - OCH ₃	55.6	4.01 (3H; s)	–	157.5 (C ₉)
11 - OCH ₃	55.8	3.86 (3H; s)	–	162.3 (C ₁₁)

*Os carbonos não hidrogenados foram assinalados através de análises do espectro de HMBC.

Experimental Data for compound i

Yellow solid;

I.R. ν^{KBr} (cm⁻¹) – 3419 cm⁻¹ e 1624 cm⁻¹

HRMS (ESI): m/z 367,2027 [M+H]⁺; calculated for [C₂₂H₂₇N₂O₃]⁺ 367,2021;

(PF) 129-131 °C

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +23.33$ (c=0.46, CH₂Cl₂)

Table 2: NMR data ¹H (500.13 MHz, CDCl₃) of alkaloid 2;

N	¹³ C/HSQC	$\delta^1\text{H}$ (n°H; mult, J Hz)	COSY	HMBC
1	–	9.39 (1H; s)	–	–
2	135.3	–	–	–
3	142.7	–	–	–
4	–	–	–	–
5	138.5	8.40 (1H; d; 5.3)	H-6	115.4 (C ₆); 127.8 (C ₇); 142.7 (C ₃)
6	115.4	8.02 (1H; d; 5.3)	H-5	112.1 (C ₈); 135.3 (C ₂)
7	127.8	–	–	–
8	112.1	–	–	–
9	157.2	–	–	–
10	100.4	6.68 (1H; d; 8.1)	H-11	104.4 (C ₁₂); 112.1 (C ₈); 157.2 (C ₉)
11	129.3	7.45 (1H; t; 8.1)	H-10 H-12	157.2 (C ₉); 141.8 (C ₁₃)
12	104.4	7.11 (1H; d; 8.1)	H-11	112.1 (C ₈)
13	141.8	–	–	–
14	57.5	3.78 (1H; d; 11.8)	–	83.4 (C ₁₅); 46.5 (C ₁₈)
15	83.4	–	–	–
16	41.9	2.01 – 1.94 (1H; m) 2.13 – 2.04 (1H; m)	H-17	83.4 (C ₁₅); 28.6 (C ₁₇)
17	28.6	1.95 – 1.87 (1H; m) 2.13 – 2.04 (1H; m)	H-16	83.4 (C ₁₅);

18	46.5	3.75 – 3.71 (1H; m)	–	57.5 (C ₁₄)
19	147.3	–	–	–
20	109.8	4.68 (1H; sl)	–	21.5 (C ₂₁); 46.5 (C ₁₈)
	109.8	4.63 (1H; sl)	–	21.5 (C ₂₁); 46.5 (C ₁₈)
21	21.5	1.74 (3H; s)	–	46.5 (C ₁₈); 147.3 (C ₁₉); 109.8 (C ₂₀)
22	25.9	0.98 (3H; s)	–	41.9 (C ₁₆); 57.5 (C ₁₄); 83.4 (C ₁₅)
9 – OCH ₃	55.7	4.07 (3H; s)	–	157.2 (C ₉)

*the signal of carbonos were assigned by HMBC spectra analyses.

Experimental Data for compound ii

Yellow solid;

I.R. ν^{KBr} (cm⁻¹) – 3432 cm⁻¹ e 1620 cm⁻¹

HRMS (ESI): m/z 337.1965 [M+H]⁺; calculated for [C₂₂H₂₇N₂O₃]⁺ 337.1916;

(PF) 155-158 °C

[α]_D²⁰ = +13.85 (c=0.24, CH₂Cl₂).

Epicatechin (iii)

colorless crystals;

I.R. ν^{KBr} (cm⁻¹)

[α]_D²⁰ = – 38.1 (c=0.61, MeOH)

¹H NMR (500.13 MHz, CD₃OD,) δ 6.97 (1H, d, J=2.0, H-2'), 6.80 (1H, dd, J=2.0, 8.0, H-6'), 6.76 (1H, d, J=8.0, H-5'), 5.94 (1H, d, J=2.3, H-6), 5.92 (1H, d, J=2.3, H-8), 4.82 (sl, H-2), 4.17 (1H, ddd, J=1.5, 3.0, 4.6, H-3), 2.86 (1H, dd, J=16.8, 4.6, H-4 α), 2.73 (1H, dd, J=16.8, 3.0, H-4 β).

¹³C NMR (125,7 MHz, CD₃OD) δ 158.9 (C-5 and C-7), 157.3 (C-9), 145.9 (C-3'), 145.7 (C-4'), 132.2 (C-1'), 119.3 (C-6'), 115.4 (C-2'), 115.3 (C-5'), 100.1 (C-10), 96.4 (C-6), 95.9 (C-8), 79.9 (C-2), 67.5 (C-3), 29.3 (C-4).

Ursolic acid (iv)

white solid;

I.R. ν^{KBr} (cm⁻¹)

¹H NMR (500.13 MHz, CD₃OD/CDCl₃) δ 5.21 (1H, t, J=3.5, H-12), 3.15 (1H, dd, J=5.0, 11.0, H-3), 2.17 (1H, d, J=11.0, H-18), 1.91 (2H, d, J=3.5, H-11), 1.58 (2H, dd, J=3.7, 11.0, H-2), 1.35 (1H, dd, J=2.0, 11.0, H-19), 1.08 (3H, s, H-27), 0.96 (3H, s, H-23), 0.94 (3H, d, J=6.2, H-30), 0.92 (3H, s, H-25), 0.85 (3H, d, J=6.5, H-29), 0.81 (3H, s, H-26), 0.75 (3H, s, H-24), 0.72 (1H, d, J=11.0, H-5).

¹³C NMR (125,7 MHz, CD₃OD/CDCl₃) δ 182.0 (C-28), 139.7 (C-13), 127.0 (C-12), 80.0 (C-3), 56.8 (C-5), 54.4 (C-18), 49.2 (C-17), 49.1 (C-9), 43.4 (C-14), 40.9 (C-8), 40.5 (C-4), 40.4 (C-19), 40.2 (C-20), 40.1 (C-1), 38.3 (C-10), 38.2 (C-22), 34.5 (C-7), 32.0 (C-21), 29.4 (C-15), 29.2 (C-23), 28.1 (C-2), 25.6 (C-16), 24.7 (C-27), 24.6 (C-11), 22.1 (C-30), 19.7 (C-6), 18.1 (C-29 and 26), 16.8 (C-24), 16.5 (C-25).

MANUSCRITO III

Virtual screening and natural products inhibiting malate synthase of *Paracoccidioides* spp

Benedito Rodrigues da Silva Neto¹; Cecília Maria Alves de Oliveira²; Lucília Kato²; Roosevelt Alves da Silva³; Guilherme Oliveira Quintino³; Maria José Soares Mendes Giannini⁴; Julhiany de Fátima da Silva⁴; Célia Maria de Almeida Soares¹ and Maristela Pereira^{1#}

¹Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil; ²Laboratório de Produtos Naturais, Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil; ³Núcleo Colaborativo de BioSistemas, Campus Jataí, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil; ⁴Laboratório de Micologia Clínica, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Melo, Araraquara, SP, Brazil.

*Corresponding author

Maristela Pereira
Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Campus II, Universidade Federal de Goiás, C.P. 131, 74001-970 Goiânia, GO, Brazil.
E-mail address: mani@icb.ufg.br
Tel./fax: +55 62 35211110.

Abstract

The thermally dimorphic pathogenic fungus *Paracoccidioides* is the agent of paracoccidioidomycosis. This disease is characterized by a granulomatous inflammation with clinical forms ranging from a benign localized infection to a disseminated one, affecting several parts of the body. The glyoxylate cycle and its key enzymes isocitrate lyase and malate synthase (MLS) play a crucial role in the pathogenicity and virulence of various fungi such as the human pathogens. The enzyme MLS catalyzes the production of malate from glyoxylate and acetyl-CoA. It is thought that inhibitors of the MLS will be powerful antifungals without side effects in the patients, once this enzyme is absent in humans. Here, virtual screening was performed aiming to obtain compounds inhibitors to *Paracoccidioides* spp MLS (*PbMLS*). By using AutoDock Vina a total of 89,415 compounds were screened considering the criteria affinity and efficiency. The amino acids involved on ligation with *PbMLS* were identified. Since those compounds were structurally similar to alkaloids compounds already isolated from natural products by our group, we performed molecular docking between *PbMLS* and those alkaloids aiming to investigate if these compounds could bind efficiently to *PbMLS*. The alkaloids and reduced alkaloids were classified according to the affinity to *PbMLS*. From 14 compounds tested, 4 of them inhibited *PbMLS*, and two of them inhibited the fungus growth. In addition, those compounds inhibited the adhesion of the fungus and *PbMLS* to extracellular matrix components Fibronectin, Collagen I and IV.

Keywords: *Paracoccidioides* spp, malate synthase, natural products, alkaloids, virtual screening, adhesion.

Introduction

Several plant and human pathogenic fungi and bacteria utilize the glyoxylate cycle during host infection (Dunn *et al.*, 2009). This pathway has not been observed in mammals; therefore, it has been determined as a potential target for discovery of new drugs. Novel active molecules should shorten the duration of therapy, prevent resistance development and eliminate latent disease (Krátký and Vinšová, 2012; Krieger *et al.*, 2012; Myler and Stacy, 2009). The unique enzymes of this route are isocitrate lyase and malate synthase.

In the human pathogenic fungus *Paracoccidioides spp*, the enzyme malate synthase (*PbMLS*) participates in the glyoxylate pathway, which enables fungus to assimilate two-carbon compounds from the tricarboxylic acid cycle and in the allantoin degradation pathway of the purine metabolism, which allows the fungus to use nitrogen compounds (Zambuzzi-Carvalho *et al.*, 2009). *PbMLS* is localized in peroxisomes, on the cell surface, and is secreted. Also, *PbMLS* plays a role as adhesin, with capacity to mediate adhesion and internalization of the fungus to host cells (Neto *et al.*, 2009). However, no inhibitor to *PbMLS* has been investigated until now.

Here we performed virtual screening aiming to search for compounds binding to *PbMLS*. In the last several years, virtual screening has become an accepted tool in drug discovery. It has been successfully applied in a number of therapeutic programs, in particular, at the lead discovery stage, where high-throughput molecular docking can play an important role (Ghosh & Huang, 2006; Lavecchia & Di Giovanni, 2013). Receptor-based virtual screening docks each molecule of a library into a receptor binding site of known or predicted 3D structure. It has been successfully used to predict high affinity protein ligands (Lee *et al.*, 2009). The molecules of the library are ranked according to their predicted binding affinity for the receptor. Apart from saving time and costs in the

discovery of ligands for a protein target, an additional benefit is the increased specificity of the predicted ligands, because receptor-based virtual screening is directed against a known binding site or even against a particular receptor conformation (Bruning *et al.*, 2010).

Indole alkaloids are a class of compound from natural products. Due their already described antifungal activity, we have included several carboline alkaloids isolated from *Rubiaceae* species in our screening antifungal program aiming to discover compounds with potential to inhibit *Paracoccidioides spp* and *PbMLS*. *Galianthe* Griseb. (*Rubiaceae*, tribe *Spermacoceae*) is a genus comprising 50 endemic species in South America, its main center of diversity is located in central and southern Brazil (Cordell *et al.*, 2001; Gudi *et al.*, 1990).

Here, we report compounds candidates inhibitors *PbMLS* obtained by using virtual screening and natural indole alkaloids inhibiting *Paracoccidioides spp* and *PbMLS*.

Materials and Methods

Experimental chemistry

General Experimental Procedures: IR spectra were obtained with a Perkin Elmer Spectrum 400 FT-IR. ¹H and ¹³C, and 2D spectra were recorded on a BrukerAvance II 500. HRMS were conducted with a spectrometer ToF Water Xevo Q-ToF. Plant Material: biomass (stems, leaves, flowers and roots) of *G. ramosa* was collected on november 2006 and identified by Delprete. The voucher specimen (Delprete 9955) was deposited at Federal University of Goiás Herbarium. The vegetal material was dried at temperature room and the dry material [leaves (87g); stems (102g); flowers (22g) and roots (103 g)]

were powdered and extracted with ethanol 99% for several times. The ethanol were removed under vacuum to afford crude ethanolic extracts from leaves (EEL, 24.5 g), flowers (EEF, 9.2 g), stems (EES, 11.9 g) and roots (EER, 12.6 g). The EEL were extracted successively with hexane (HL, 0.9 g), chloroform (CL, 1.5 g), ethyl acetate (AL, 2.3 g) and methanol (ML, 5 g). This process was repeated with EES and EER).

Receptors preparations

The 3D structures of *PbMLS* has not yet been resolved experimentally, however, in our work yet to be submitted (in preparation) will present a model to its 3D structure following two steps: (1) prediction of a 3D model by using homology modWeb (Eswar *et al.*, 2003); (2) Molecular Dynamic simulations with software GROMACS (Berendsen & Van Drunen, 1995; Lindahl & Spoel, 2001; Gunsteren *et al.*, 1996) to improve relaxation and orientation of their side chains in solution. More information about the protocol used can be checked in this paper we describe in detail the receptor.

Ligands preparations

The structures of natural compounds were obtained from the ZINC database (Irwin & Shoichet, 2005) format pdbqt. A total of 89,415 compounds were selected for testing without any selection criteria and without any modification to the original files. The files of each compound were provided for AutoDock Vina proceed with molecular docking simulations, within the parameters of torsion, bond angle and bond pre-defined by them.

3D structures of alkaloids compounds were generated using the GlycoBioChem PRODRG2SERVER (Schüttelkopf & Van Aalten, 2004). Following conversion to PDB format, charges and non-polar hydrogen atoms were added using the

prepare_receptor4.py script from MGLTools (Morris *et al.*, 2009) and files pdbqt (format for Autodock) containing individual compounds and receptor were created. The conformations of those files were used as initial conformations for proceed with the molecular docking simulations.

Molecular docking

Molecular docking studies require treatment of the interaction between the ligand and receptor through simple functions that may prove the most fundamental aspects of the affinity between them. AutoDock Vina is a new generation of programs that allows to proceed with molecular docking of new inhibitors using quasi-Newton optimization method (Nocedal & Wright, 1999) that uses not only the value of the scoring function, but also its gradient, i.e. the derivatives of the scoring function with respect to its arguments (Trott & Olson, 2010). It allows finding the minimum of the function more quickly within the defined grid (also includes a local search stochastically). Thus, molecular docking tests were limited to a GRID surrounding the main binding pockets of the protein, which were defined using DogSiteScorer - Active Site Prediction and Analysis Server (Grombacher, & Rarey, 2010; Volkamer, 2012). The GRID involving the main binding pockets of the protein was defined using MGLTools (Morris *et al.*, 2009). Only for simulations involving alkaloids, score histogram of 1000 independent simulations was built the 100 ligands lowest score. To increase the efficiency of the sampling by AutoDockVina. Score histogram was built for each ligand.

Ligand Efficiency

Recently (Abad-Zapatero, 2007), there has been proposed a simple function able to select compounds not only by affinity, but for efficiency. Such function depends on the

binding energy ΔG linker between the receiver and the total number n of atoms (excluding hydrogen), i.e.

Such function depends on the binding energy ΔG between ligand and receptor as well as the total number n of atoms (excluding hydrogen), i.e.

$$LE = \Delta G/n,$$

which classifies the efficiency of ligands according to their size. Compounds with fewer atoms and lower affinity are more efficiency. Following this idea, we classify ligands ZINC database in two ways: (1) according to the score that AutoDock Vina provides without any modification and (2) as a function of the ligands with lower LE, since your score is limited to a maximum pre-set. This ensures the classification of small ligands and stability in the cavity. Two scripts were developed to classify ligands as already mentioned.

Recombinant *PbMLS*

Recombinant *PbMLS* (*PbMLSr*) was obtained as described by Neto et al. (2009). Briefly, cDNA encoding to *PbMLS* was inserted in the pET-32a(+) expression vector (Novagen, Inc., Madison, Wis). The resulting plasmid was transferred to *Escherichia coli* BL21 C41 (DE3). His-tagged *PbMLSr* was purified using the Ni-NTA Spin Kit (Qiagen Inc., Germantown, MD) and the tags were subsequently removed by the addition of EKMax™ Enterokinase (GIBCO™, Invitrogen, Carlsbad, CA).

***PbMLS* activity assay in microplate and screening for inhibitors**

The activity assays as described previously by Roucourt *et al.* (2009) with modifications. Briefly, were performed with an endpoint assay which measures the amount of CoA. The amount of free thiol groups of CoA was determined using 5, 5'-

dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) or DTNB (Sigma Aldrich) (Ornston&Ornston, 1969). The absorption at 415 nm was measured in a microplate reader (Microplate reader model 680, Bio-Rad Laboratories). DTNB was added to a final concentration of 2 mM. Addition of DTNB to the mixture arrests the reaction, probably due to reaction of the DTNB with the free thiol groups of cysteine (Beeckmans et al., 1994). The standard reaction mixture contains 2 µg *PbMLS*, 100 mM Tris.HCl, 5 mM MgCl₂, 2mMglyoxylate (Sigma-Aldrich), 1 mM acetyl CoA (AppliChem). Pyruvic acid and fifteen compounds alkaloids were added at a concentration of 40µM as a positive control and to assess the inhibitory potential respectively. Unless stated otherwise, the reactions were incubated for 30 min at pH 7.5. The Specific activities are given as U/µl protein. Compound concentrations were 10 µM, 20 µM, 30 µM and 40 µM to recombinant*PbMLS*. All experiments were conducted in triplicate. The error bars correspond to one standard deviation.

Minimum Inhibitory Concentration

Paracoccidioides Pb18 (ATCC-MYA-826) was cultivated on Fava-Netto's medium (1.0% w/v peptone, 0.5% w/v yeast extract, 0.3% w/v proteose peptone, 0.5% w/v beef extract, 0.5% w/v NaCl, 4% w/v glucose, and 1.4% w/v agar, pH 7.2) (Fava Netto *et al.*, 1969) as yeast cells for 7 days at 36°C.

The test for *Paracoccidioides Pb18* yeast cells growth was carried out in accordance with de Paula e Silva et al. (2013) to determine the minimum inhibitory concentration (MIC). The pure substances extracted from *Galianthe* Griseb. (Rubiaceae, tribe Spermacoceae) were prepared as described. Inoculums were prepared in RPMI-1640 (Gibco™) with L-glutamine, without sodium bicarbonate, supplemented with 2% glucose, and buffered to a pH of 7.0 using 0.165 M MOPS, (Sigma-Aldrich). The *Paracoccidioides Pb18* yeast cells suspension was adjusted to a final concentration

0.5×10^3 to 2.5×10^3 cells/mL in RPMI-1640. In the 96-well plates, substances were added in serial dilutions, starting from a concentration of 250 mg/L to 0.48 mg/L. The plates were incubated at 36°C at 150 rpm for 48 h. After this period, the alamarBlue® (Biosource) was employed according the manufacturer's instructions, and the plates were incubated for an additional 24 h, totalizing 72 h for the MIC final reading. The lowest antifungal agent concentration that substantially inhibited the growth of the organism was visually determined at the point which there was no change in the original blue color of the reagent.

Affinity ligand assays

Far-Western blot assays were carried out as previously described (Neto *et al.*, 2009) *PbMLSr* was submitted to SDS-PAGE and blotted onto nylon membrane. After being blocked for 4 h with 1.5% BSA in 10 mM PBS-milk and then washed three times (for 10 min each time) in 10 mM PBS-T, the membranes were incubated with fibronectin (20 µg/mL), or type I and IV collagen (30 µg/mL), diluted in PBS-T with 2% BSA for 90 min, and then washed three times (for 10 min each time) in PBS-T. The membranes were incubated for 18 h with rabbit anti-fibronectin, anti-type I collagen or anti-type IV collagen antibodies in PBS-T with 2% BSA (diluted 1:100). The blots were washed with PBS-T and incubated with peroxidase-labeled goat anti-rabbit immunoglobulin (diluted 1:1000). The blots were washed with PBS-T and the reactive signals were developed with hydrogen peroxide and diaminobenzidine (Sigma-Aldrich) as the chromogenic reagent. The positive control was obtained by incubating the *PbMLSr* with the polyclonal anti-*PbMLSr* antibody (diluted 1:500), and the reaction was developed as described above.

ELISA analysis

ELISA was carried out as described by Neto *et al.* (2009). Briefly, polypropylene 96-well microtiter ELISA plates were sensitized with 10 µg/mL extracellular matrix (ECM) proteins, overnight at 4°C, and then blocked with 2% BSA, 10% fetal bovine serum and 1% milk. For analysis the percentage inhibition *Paracoccidioides Pb18* adhesion to the ECM by compounds, 100 µM each compound was added, separately, and incubated for 60 min. A total of 10⁶ cells/mL. *Paracoccidioides Pb18* was added and incubated for 16 hours at 37°C. For the analysis the percentage inhibition of *PbMLS* adhesion to the ECM (ratio 1:1; 5 µg each), *PbMLS* and 100 µM each compound, separately, were added on the plate. The percentage inhibition of *PbMLS* and *Paracoccidioides Pb18* adhesion to the ECM by compounds was calculated.

The reaction was developed using buffer citrate pH 4.9 conjugated with *o*-phenylenediamine as chromogenic substrate. Negative controls were performed using *PbMLSr* or ECM only. Positive controls were performed using anti-*PbMLSr*, anti-fibronectin, anti-collagen I or anti-collagen IV antibody. The absorbance was measured at 490 nm and the results were analyzed by using Software Microcal TMOrigin TM software version 5.0 Copyright© (Microcal, 1998).

Adhesion assays and fluorescence microscopy by IN CELL

The cell lines A549 and MRC5 were used for adhesion testing to evaluate the pattern of adherence by *Paracoccidioides Pb18*, as described by Mendes-Giannini *et al.* (2004). The epithelial cells were grown in glass bottles, in a culture medium specific for this cell line, and maintained at 36.5° C. After 3–4 days, the cell line monolayer formed was trypsinized. Briefly, the cell monolayer was washed with 1 mL of 0.2% trypsin solution and 0.02% Versene (ATV), and then 1 mL of ATV was added. In the following

to 2 min, the cells were mixed with variable amounts of their corresponding medium plus 10% fetal calf serum. At this stage, the trypsin was neutralized by the fetal bovine serum present in the culture medium. The total volume of cell suspension obtained was transferred to new bottles to obtain cell concentrations of 10^6 cells/mL. Cells were subcultured 2 days in advance. This procedure included trypsinization with 2 mL of ATV and the addition of 20 mL of culture medium. Five hundred μ L of this mixture were placed on coverslips in each well of a 24-well plate (5×10^4 cells/well). After adjusting the *Paracoccidioides* Pb18 yeast inoculum (1×10^6 – 5×10^6 cells/mL), the infection was initiated. Initially, the old medium was removed from the wells containing the cell line monolayer and 500 μ L of fresh medium were added. Then, 500 μ L of yeast suspension were added to each corresponding plate-well, followed by incubation at 37° C, for 5 h. The supernatant was then removed and the wells were washed three times with PBS. Finally, 500 μ L of 4% formaldehyde were added to each well and incubated overnight at 4°C. Then, the infected plates were washed three times with PBS and the potential fungal infection of pneumocytes was observed by using images processed by the IN Cell Analyzer 2000 System. All nuclei were DAPI stained and actin filaments were revealed with phalloidin-FITC. *Paracoccidioides* Pb18 and PbMLSr were detected with an Alexa 594-conjugated antibody. All experiments were repeated at least three times. Data were evaluated using one-way ANOVA followed by the Tukey test. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

Cell Cytotoxicity Assay

The assay was performed according (Mosmann, 1983). The cytotoxicity of alkaloids compounds was assessed by tetrazolium salt reduction (MTT; 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) method for cell lines A549 and

MRC5. The cells were grown in own culture medium DMEM Ham's F12 medium supplemented with 2mM L-glutamine and 5% fetal bovine serum, and maintained at 36.5°C. A concentration ranging from 2.5 to 5.0×10^4 cells/mL was used for the formation of monolayer cells. The pure substances were kept in contact with the cells for 24 h. After that, the cells treated with 5 mg/mL MTT reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and incubated for 4 h. After the formation of formazan crystals, 100 μ L of isopropanol was added to solubilize the precipitate and allow the reading of the result by changing the color of the medium. The absorbance of formazan was quantified using an ELISA reader (enzyme-linked immunosorbent assay) set at 560 nm. Hydrogen peroxide was used as a positive control.

Results and Discussion

Virtual Screening

The simulations involving the search of conformations of the compounds on the surface of *PbMLS* were limited to only a region surrounding the main binding pockets of the protein, which was defined as the highest volume of cavity according to the classification of DogSiteScorer. A total of 13 pockets were found in *PbMLS* by DogSiteScorer, which have the highest volume of $2415.7 \text{ \AA}^3$. The second in rank only have $335.2 \text{ \AA}^3$.

Using only the classification criteria of AutoDock Vina through its function score, and performing a simulation with each compound (the total of 89415 compounds), two types of classification were performed: affinity - involving the selection of 20 compounds with the lowest scores obtained by AutoDock Vina; and efficiency - involving the

selection of 20 compounds with the lowest values LE and limited to a maximum score of -8.0 Kcal/mol.

In Figure 1 shows all the compounds that were selected according to two criteria of classification. For affinity selection, the score of the lowest value reached was -12 kcal / mol for compound ZINC02121309 (Figure 1A). Already selection for efficiency, compound ZINC00366861 with score -8.2Kcal/mol, reached the lowest LE. Note by Figure 1B and Table 01 that the selection criteria for efficiency, not necessarily result in lower scores for the best. For example, the selected compound in twenty have -9.2Kcal/mol score, while the compound with the highest score (-8.1Kcal/mol) ranks third among the 20 selected compounds.

Figure 2 shows as the top five compounds are accommodated in the binding pocket and as *PbMLS* residues that can interact more strongly with each other. Note that the two best ligands are accommodated in a cavity different from that of other compounds. In this cavity, the compounds 02121309 and 08300073 both are in contact with the polar residues ARG164, ASP445, ASP117, SER118, ASP114, THR92, GLU248, TRP275 and MET328. However, there are a greater number of hydrophobic contacts that appear to be most important for the stability of these compounds than for other interactions, since the coverage of such groups favor an increase in entropy of the medium. In the case of compounds 08918302, 00709385 and 00709383, all of them are in a favorable position to interact with ARG50 through interactions PI. The polar residues GLU215, SER251, GLU255, ARG70, HIS217 and LYS284 contribute to stability through electrostatic interactions.

Note further that the compounds 00709385 and 00709383 are nearly identical except for a single atom attached to one of heterocycles. In this case, our hypothesis for

the selection of these two compounds is that its structural forms should result in a very good complement to this cavity, a fact that can be checked directly by Figure 2A.

For criterion efficiency rating is noted that the compound 00366861 presents a larger number of polar-contact compared to hydrophobic residue. LYS213 is important for interactions PI and HIS169 and THR519 for the formation of H-bonds (see Figure 2B). ARG164 and GLU248 is critical for stability almost all of compounds shown in Figure 02B, except for the compound 04293378 which ARG50 assumes this role.

Inhibitory effect of alkaloids compounds on *PbMLS* activity

PbMLSr inhibition by alkaloids compounds was investigated. From 14 compounds tested, 4 of them inhibited *PbMLS*. PP6, RB 16.1, fraction containing Reserpine as major compound (LKRWR) and GR2 inhibited *PbMLS* more effectively than the substrate pyruvic acid. The inhibition was higher to LKRWR than to PP6, GR2, and RB16.1, respectively (Table 4).

Inhibitory effect of alkaloids compounds on *Paracoccidioides* spp growth

The interference of the alkaloids compounds in the *Paracoccidioides Pb18* yeast cells growth was investigated. The microdilution microplate assay method Microplate Alamar Blue Assay (MABA) was used to measure the viability of *Paracoccidioides Pb18* yeast cells (de Paula e Silva *et al.*, 2013). The results showed that GR2 and LKRWR inhibited the fungus growth (Table 5).

Inhibition of *PbMLS* adhesion to ECM

Because *PbMLS* is an anchorless adhesin, and binds to fibronectin, type I and IV collagen, we investigated if PP6, RB16.1, GR2 and LKRWR could prevent the adhesion

of *PbMLS* to those ECM by using Far-Western blot. GR2, LKRW R, RB 16.1 and PP6 (lanes 1-4, respectively) inhibited the adhesion of *PbMLSr* to Fibronectin, Collagen I and Collagen IV (Figure 5A, B and C, respectively). Positive reaction was visualized to ECM bound to *PbMLS* immobilized in the membrane (Figure 5 A, B and C, lines 5).

Aiming validate the data obtained above, we investigate if this process could also occur by using ELISA assay (Table 7). So, ECM was immobilized in the plate, and after, the compounds and *PbMLS* were also added. Negative controls were performed using *PbMLSr* or ECM only. Positive control was performed using anti-*PbMLSr*, anti-fibronectin, anti-collagen I, or anti-collagen IV antibody (data not shown). It was observed that PP6, RB16.1, GR2 and LKRW R inhibited the *PbMLS* and *Paracoccidioides Pb18* adhesion to fibronectin, type I and IV collagen. The inhibition was higher to *PbMLS* than to *Paracoccidioides Pb18*.

Considering *PbMLS*, the higher inhibition was observed to GR2, LKRW R and RB16.1 when type I collagen was used. The higher inhibition to PP6 was observed using fibronectin followed for type I collagen. The small inhibition to all compounds was observed to type IV collagen. Considering the fungus, the higher inhibitions were observed to type I and IV collagen.

Fluorescence microscopy by IN CELL

Adherence inhibition patterns of *PbMLS* pneumocytes MRC5 and A549 was evaluated using IN Cell Analyzer 2000 System light microscopy (Figure 7). The more intense the red mark, the greater the adhesion to pneumocytes *MLS*. Immunofluorescence staining of *PbMLS* pneumocytes and adhesion inhibition of *MLS* by alkaloids to MEC was measured (Figure 8 A and B). Adherence inhibition *Paracoccidioides* yeast to A549 and MRC5 cells were also evaluated (Figure 8 C and D). Phalloidin-FITC (green); DAPI

(blue); anti-*Paracoccidioides* polyclonal serum plus Alexa 594-conjugated antibody (red-to-yellow). The fluorescence staining intensity is shown in graphs.

Cell cytotoxicity assay

The cytotoxic effect of the compounds was investigated in A549 and MRC5 cells using MTT assay. The results showed that PP6, RB16.1, GR2 and LKRW R were not cytotoxic to MRC5 and A549 cells (Table 7).

Acknowledgements

This work performed at Universidade Federal de Goiás was supported by Ministério da Ciência e Tecnologia/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MCTI/CNPq), Fundo Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FNDCT), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) and INCT_IF (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica). Additionally, B.R.S.N. was supported by a fellowship from CNPq and P.F.Z.C. by CAPES.

References

- [1] Abad-Zapatero, C. Ligand efficiency indices for effective drug discovery. *Expert opinion on drug discovery*, (2007) 2(4), 469–88. doi:10.1517/17460441.2.4.469
- [2] Berendsen, H. J. C., Van der Spoel, D., & Van Drunen, R. Gromacs: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comput. Phys. Commun.*, (1995) 91, 43–56.
- [3] Bruning, J.B. A.A. Parent, G. Gil, M. Zhao, J. Nowak, M.C. Pace, C.L. Smith, P.V. Afonine, P.D. Adams, J.A. Katzenellenbogen, K.W. Nettles, Coupling of receptor conformation and ligand orientation determine graded activity, *Nature Chemical Biology* 6 (2010) 837e843
- [4] Cordell GA, Quinn-Beattie and ML, Farnsworth NR. The potential of alkaloids in drug discovery. *Phytotherapy Research* (2001); 15(3): 183–205

- [5] de Paula e Silva AC, Oliveira HC, Silva JF, Sangalli-Leite F, Scorzoni L, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJ. Microplate alamarBlue assay for *Paracoccidioides* susceptibility testing. *J Clin Microbiol* (2013); 51:1250-2.
- [6] Dunn MF, Ramírez-Trujillo JA, Hernández-Lucas I. Major roles of isocitrate lyase and malate synthase in bacterial and fungal pathogenesis. *Microbiology*. (2009); 155(Pt 10):3166-75.
- [7] E. Lindahl, B. H., & Van der Spoel, D. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. *J. Mol. Model*, (2001) 7, 306–317.
- [8] C. Fava Netto, V.S. Vegas, J.J. Sciannamea, D.B. Guarnieri, Antígeno polissacarídeo do *Paracoccidioides brasiliensis*. Estudo do tempo de cultura do *P.brasiliensis* necessário ao preparo do antigen, *Rev. Inst. Med. Trop.* 11 (1969) 177-181.
- [9] Ghosh, S., Nie, A., An, J., & Huang, Z. Structure-based virtual screening of chemical libraries for drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*, (2006) 10(3), 194–202.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.04.002>
- [10] Gudi R, Sandhu SS, Athwal RS. Kinetochore identification in micronuclei in mouse bone marrow erythrocytes: an assay for detection of aneuploidy-inducing agents. *Mutation Research* (1990); 234 (5), 263-268.
- [11] Irwin, J. J., & Shoichet, B. K. (2005). ZINC - A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening. *J. Chem. Inf. Model*, 45(1), 177–182.
- [12] Krátký M, Vinšová J. Advances in mycobacterial isocitrate lyase targeting and inhibitors. *Curr Med Chem*. 2012;19(36):6126-37
- [13] Krieger IV, Freundlich JS, Gawandi VB, Roberts JP, Gawandi VB, Sun Q, Owen JL, Fraile MT, Huss SI, Lavandera JL, Ioerger TR, Sacchettini JC. Structure-guided discovery of phenyl-diketo acids as potent inhibitors of *M. tuberculosis* malate synthase. *Chem Biol*. (2012) 19(12):1556-67.
- [14] Lavecchia, A., & Di Giovanni, C. Virtual Screening Strategies in Drug Discovery: A Critical Review. *Current medicinal chemistry*. (2003) 20(23):2839-60.
- [15] Lee, H. S.; Yoon, K. M.; Han, Y. R.; Lee, K. J.; Chung, S. C.; Kim, T. I.; Lee, S. H.; Shin, J.; Oh, K. B. *Bioorg & Med Chem Lett*. (2009), 19, 1051.
- [16] Mendes-Giannini MJ, Hanna SA, da Silva JL, Andreotti PF, Vincenzi LR, Benard G, Lenzi HL, Soares CP: Invasion of epithelial mammalian cells by *Paracoccidioides brasiliensis* leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell. *Microbes Infect* (2004), 6:882-891
- [17] Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, (2009) 30(16), 2785–2791.
- [18] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. (1983) 16;65(1-2):55-63.
- [19] Myler PJ, Stacy R, Stewart L., Staker BL, Van Voorhis WC, Varani G, Buchko GW. The Seattle Structural Genomics Center for Infectious Disease (SSGCID). *Infect Disord Drug Targets*. (2009) 9(5): 493–506.
- [20] Neto BRS, Silva JF, Mendes-Giannini MJS, Lenzi HL, Soares CMA, Pereira M: The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a linked surface

protein that behaves as an anchorless adhesion. *BMC Microbiol* (2009) 9:272–284.

[21] Nocedal, J., & Wright, S. J. (1999). *Numerical Optimization*. (P. Glynn & S. M. Robinson, Eds.) *Analysis* (Vol. 43, pp. 164–75). Springer. doi:10.1002/lsm.21040

[22] Roucourt B, Minnebo N, Augustijns P, Hertveldt K, Volckaert G, Lavigne R. Biochemical characterization of malate synthase G of *P. aeruginosa*. *BMC Biochemistry* 2009; 10:1471-2091.

[23] Schüttelkopf, A. W., & Van Aalten, D. M. F. (2004). PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 60(Pt 8), 1355–1363.

[24] Trott, O., & Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, (2010). 31(2), 455–461.

[25] Van Gunsteren, W. F., Billeter, S. R., Eising, A. A., Hünenberger, P. H., Kröger, P., Mark, A. E., Scott, W. R. P., et al. (1996). *Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide* (pp. IV10–IV101). Zürich, Groningen: Biomos b. v.

[26] Volkamer, A., Griewel, A., Grombacher, T., & Rarey, M. Analyzing the Topology of Active Sites: On the Prediction of Pockets and Subpockets. *Journal of Chemical Information and Modeling*, (2010) 50(11), 2041–2052.

[27] Volkamer, A., Kuhn, D., Grombacher, T., Rippmann, F., & Rarey, M. (2012). Combining Global and Local Measures for Structure-Based Druggability Predictions. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 52(2), 360–372.

[28] Zambuzzi-Carvalho PF, Cruz AHS, Santos-Silva LK, Goes AM, Soares CMA, Pereira M: The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb01 is required in the glyoxylate cycle and in the allantoin degradation pathway. *Med Mycol* 2009, 1:1–11

Legends

Figure 1. Structures of ligands classified by the criterion affinity (A) and (B) efficiency by AutoDock Vina.

Figure 02. Molecular surface representation of the PbMLS and Ligplots of the protein/ligand in binding pocket of the five top-ranked compounds by LE. Pink circles indicate residues involved in hydrogen-bond polar or charged interactions; green circles indicates residues involved in van der Waals interactions; Pi-interactions are represented by orange lines; green arrows indicate hydrogen-bonds interactions with amino acid main chains; blue arrows indicate side chain hydrogen-bond interactions. The structures of the compounds shown refers to the lowest score obtained from the docking simulations with AutoDock Vina.

Figure 3. Structures of the alkaloids (A) and reduced alkaloids (B).

Figure 4. Molecular surface representation of *PbMLS* and Ligplots of the protein/ligand in binding pocket of the four top-ranked compounds by LE. Green circles indicate residues involved in van der Waals interactions; PI-interactions are represented by orange lines. The structures of the compounds shown refer to the lowest score obtained from the docking simulations with AutoDockVina.

Figure 5. Binding *PbMLSr* to extracellular matrix components. *PbMLSr* (0,5µg) was subjected to SDS-PAGE and electroblotted. Negative control was obtained by incubating the *PbMLSr* with peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (data not show). Membranes were reacted with fibronectin and types I and IV collagen (A, B and C, respectively) incubated with alkaloids and subsequently incubated with rabbit IgG anti-laminin, anti-fibronectin, and mouse anti-type I and anti-type IV collagen antibodies, respectively. the positive control was obtained by incubating the recombinant protein with anti-MLS polyclonal antibody (A, B and C lane 5). Use of peroxidase-conjugated anti-rabbit and anti-mouse IgG reveal the reactions.

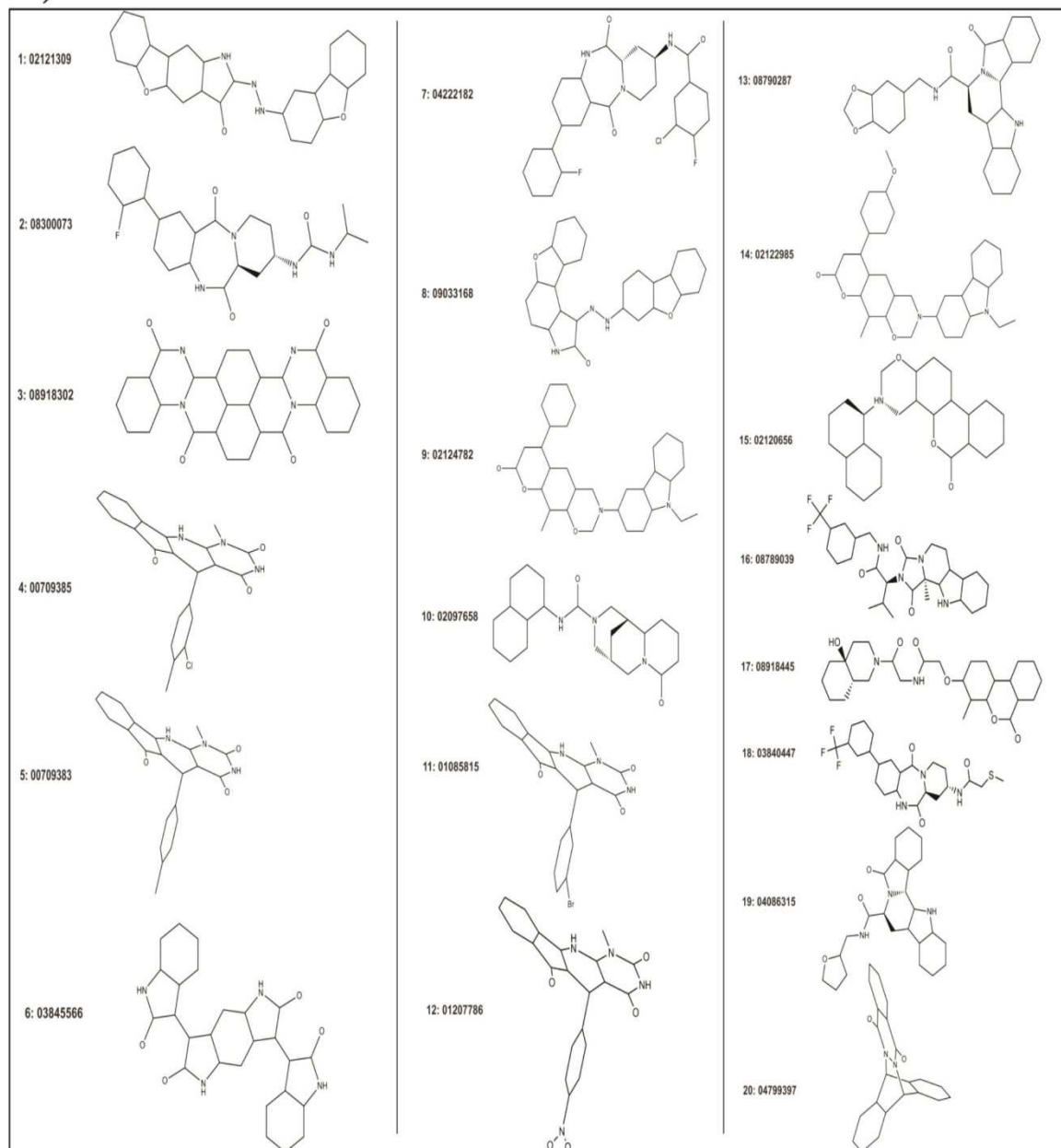
Figure 6. *PbMLS* residues which interact with the ligand binding site in ZINC bank, and position of this ligand on the surface of the cavity *PbMLS*.

Figure 7. *PbMLS* residues which interact with the ligand binding site, and alkaloids position of the surface of the cavity *PbMLS*.

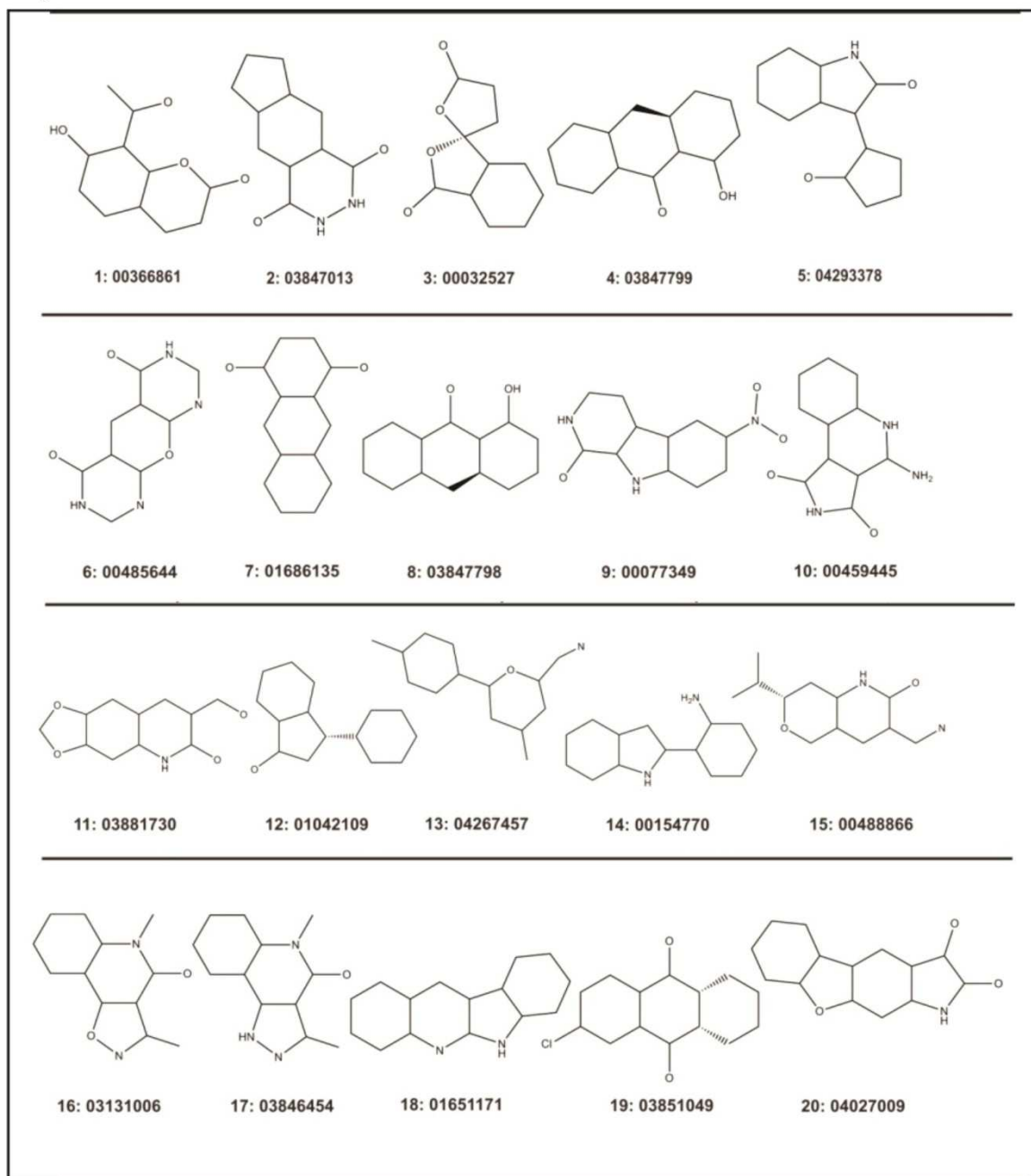
Figure 8 (A) and (B) adherence inhibition patterns of *PbMLS* to cells A549 and MRC5 respectively. Immunofluorescence staining of *PbMLS* pneumocytes. Adhesion inhibition of MLS by alkaloids to MEC. (C) and (D) adherence inhibition patterns of *Paracoccidioides* yeast to pneumocytes. Immunofluorescence staining infection after incubation for 2 h with the *Pb18* strain in A549 and MRC5 cells respectively. Phalloidin-FITC (green); DAPI (blue); anti-*Paracoccidioides* polyclonal serum plus Alexa 594-conjugated antibody (red-to-yellow); the fluorescence staining intensity is shown in graphs. The assays were conducted in an IN Cell Analyzer 2000 using light microscopy.

Figures

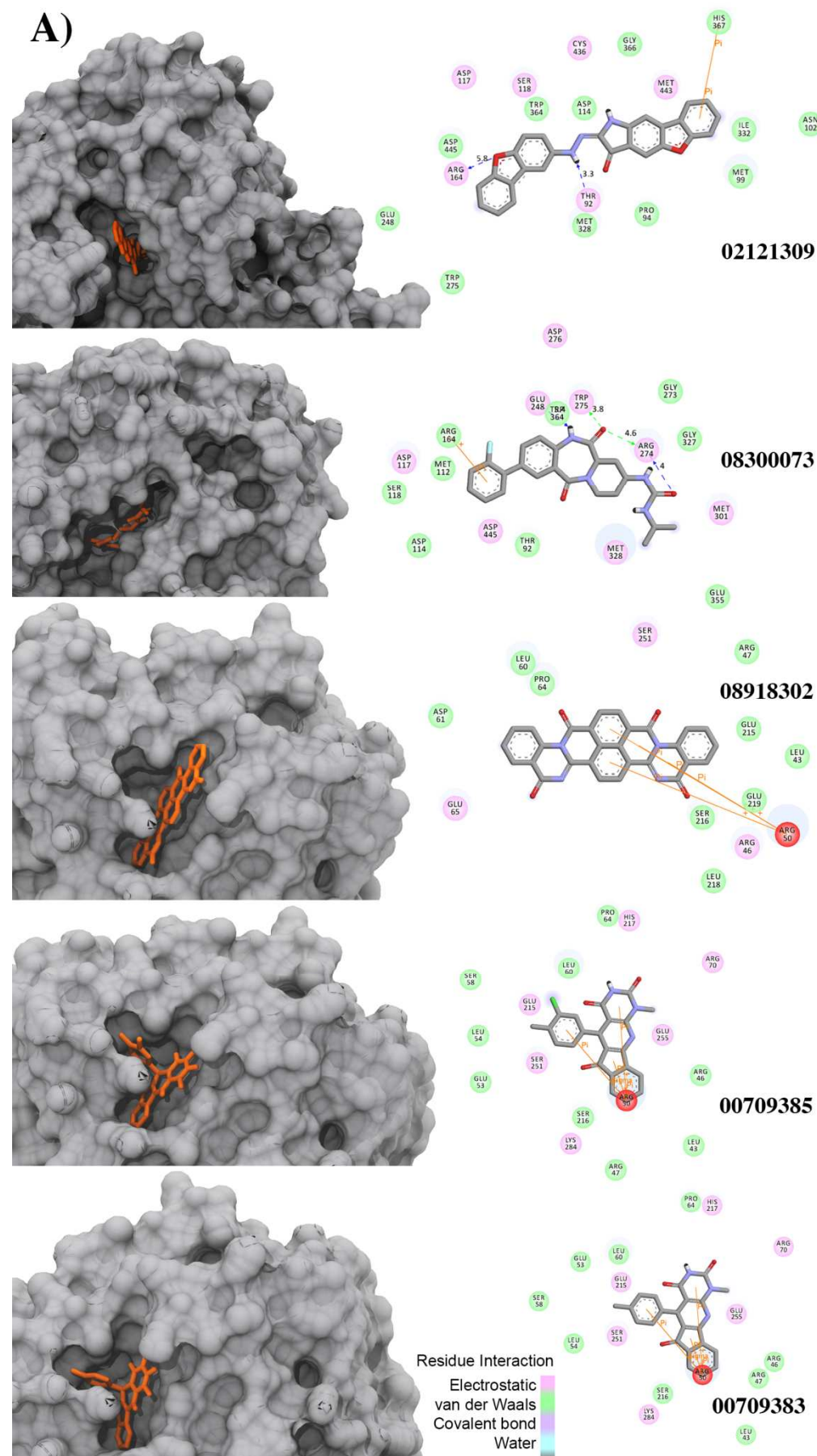
1.
A)

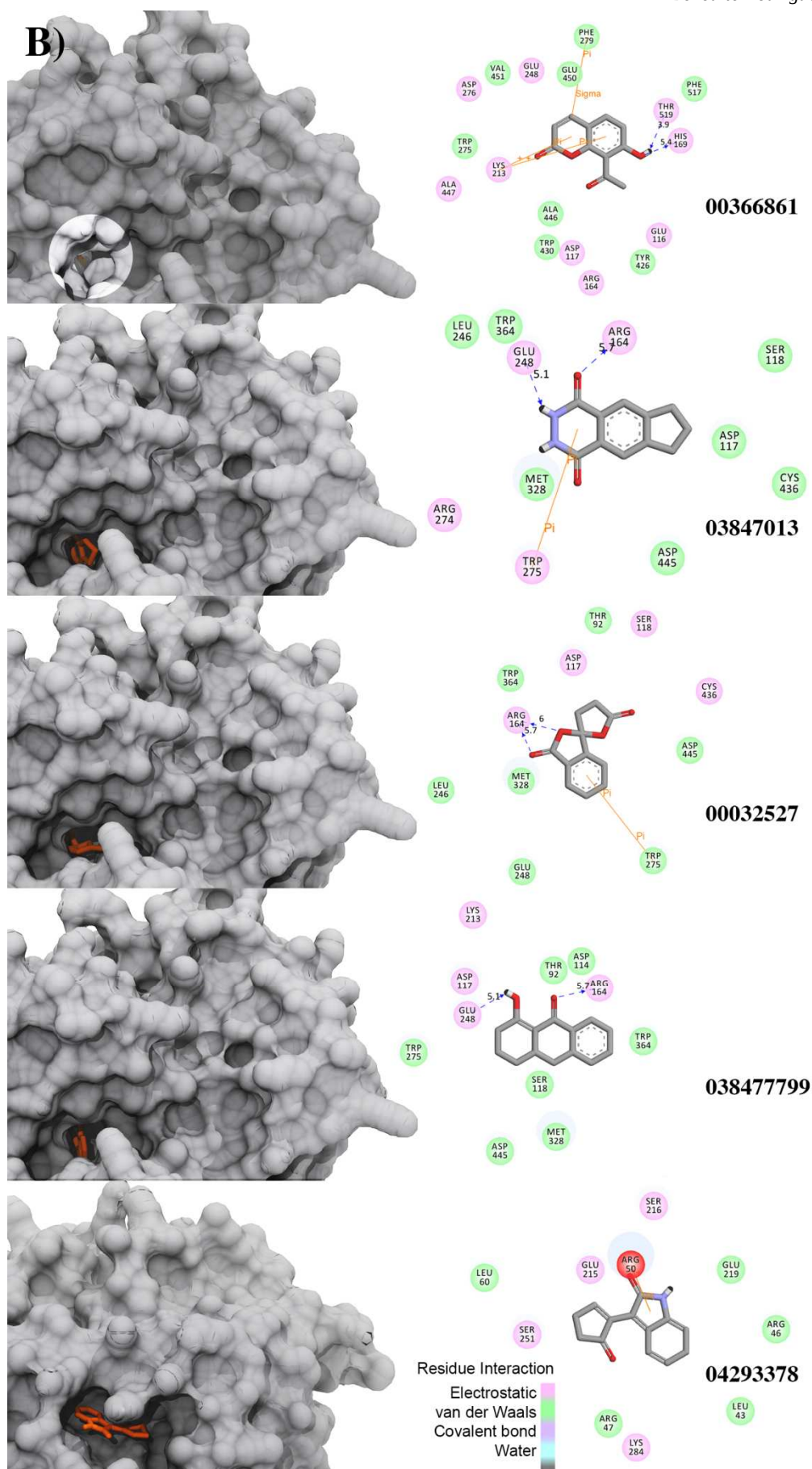


B)

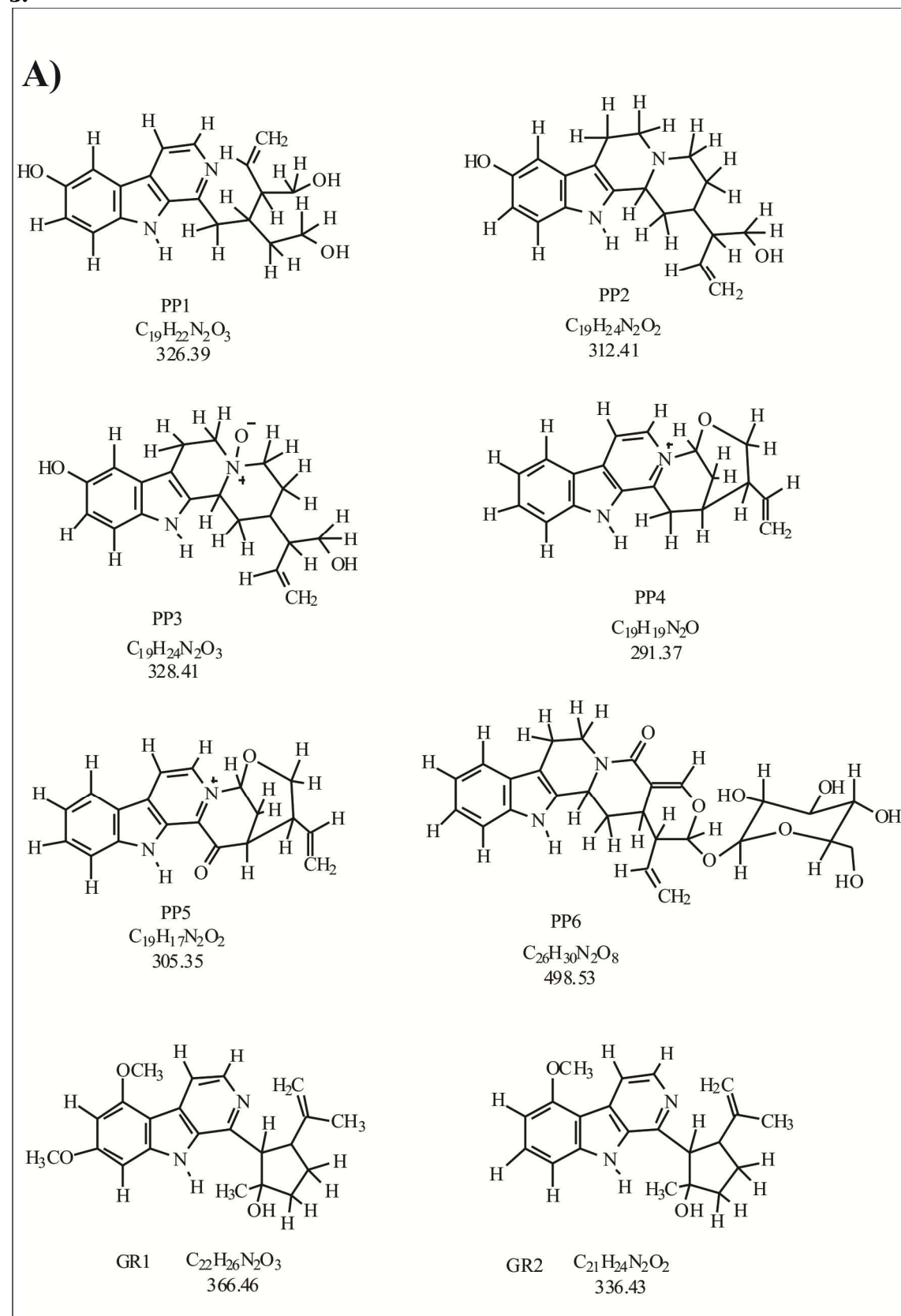


2.

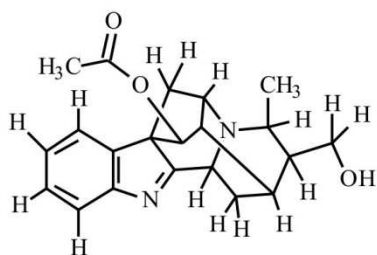




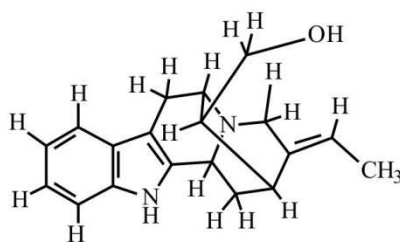
3.



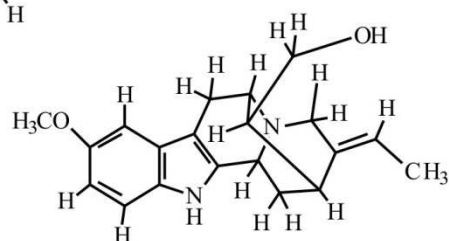
B)



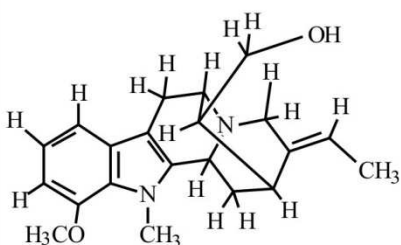
LKRB 16.1
C₂₁H₂₄N₂O₃
352.43



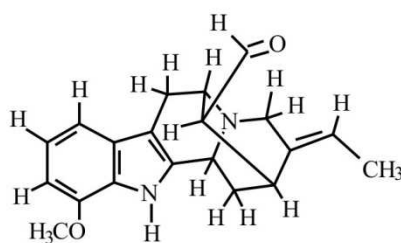
LKRB 16.3
C₁₉H₂₂N₂O
294.39



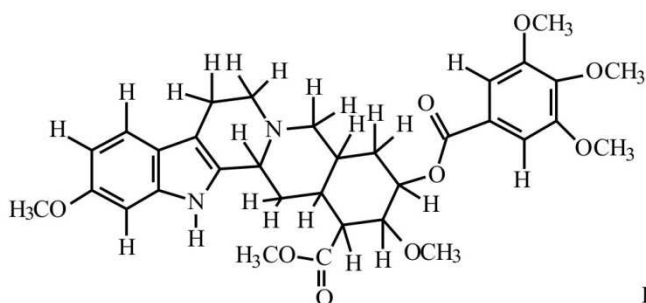
LKRB 30.8
C₂₀H₂₄N₂O₂
324.42



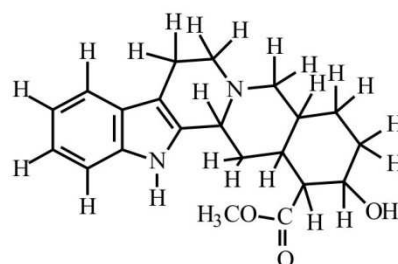
LKRB 41.2
C₂₁H₂₆N₂O₂
338.44



LKRB 44.3
C₂₀H₂₂N₂O₂
322.40

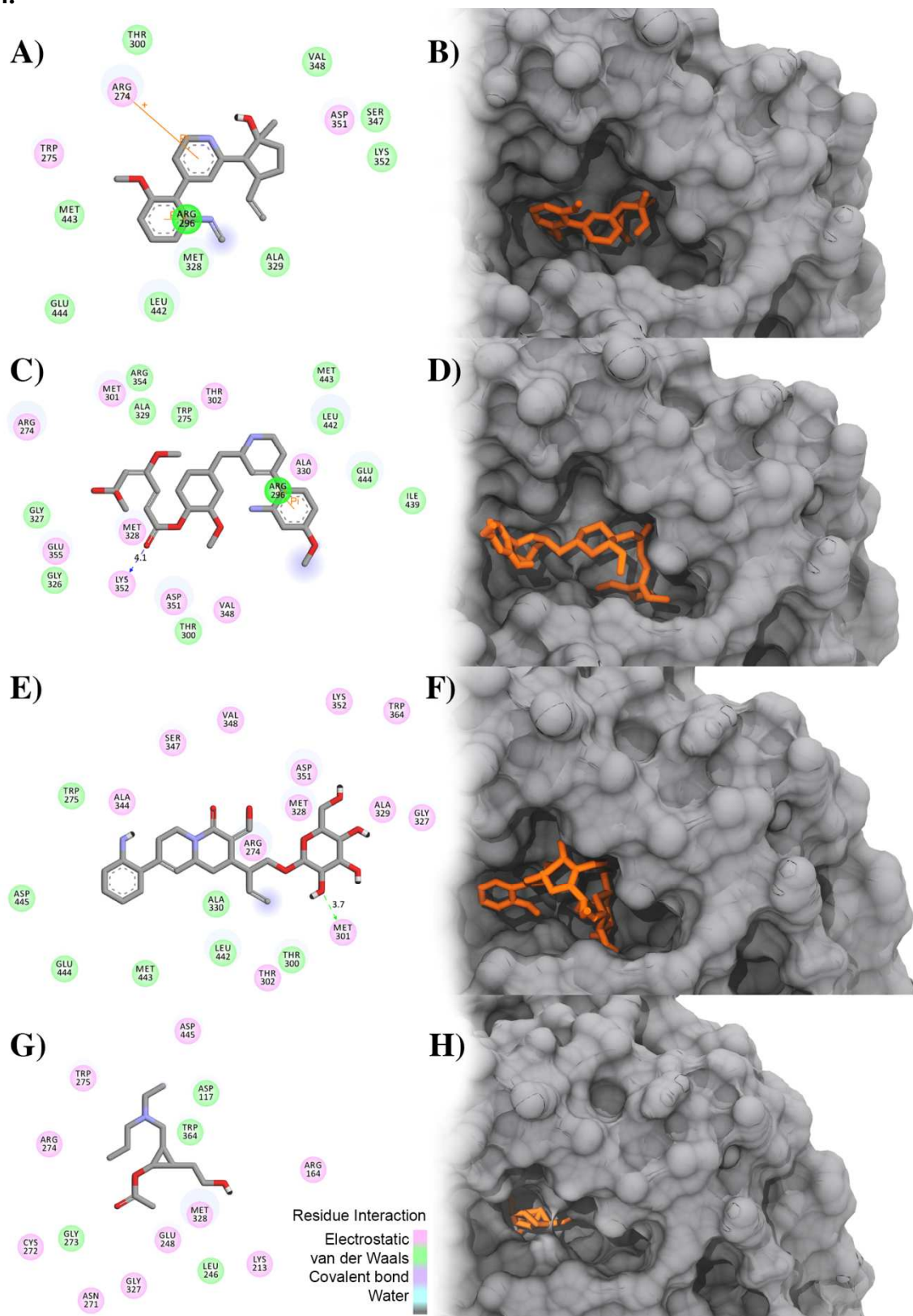


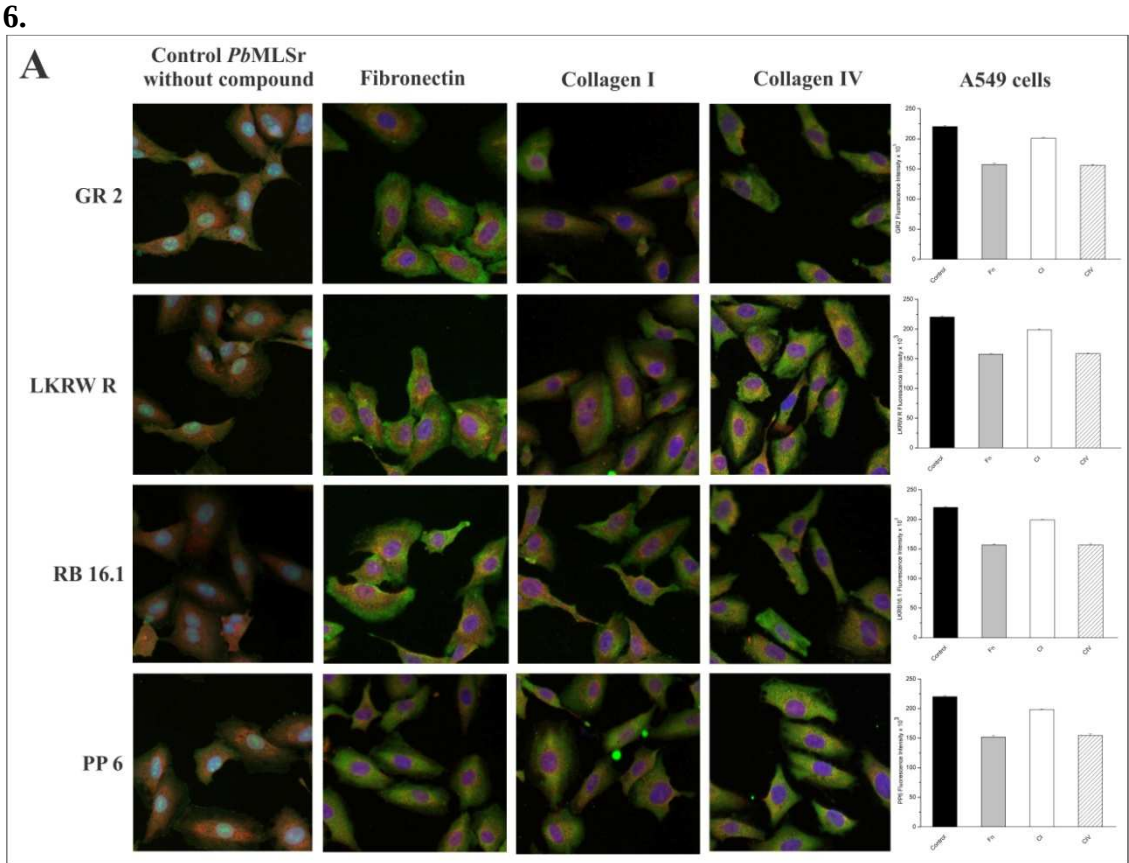
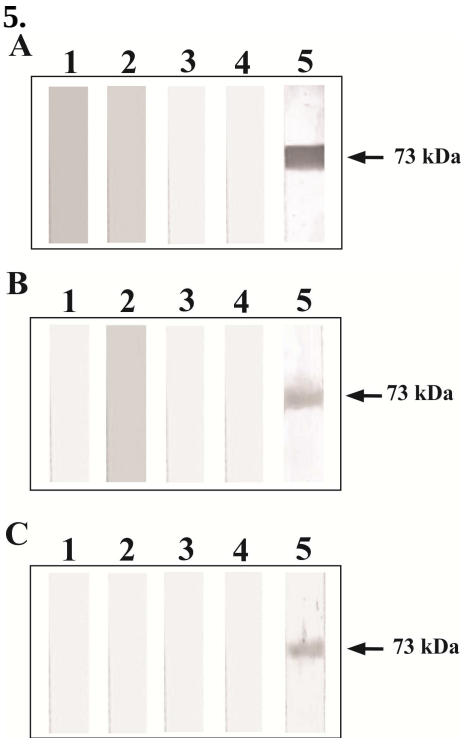
LKRW R
C₃₃H₄₀N₂O₉
608.68

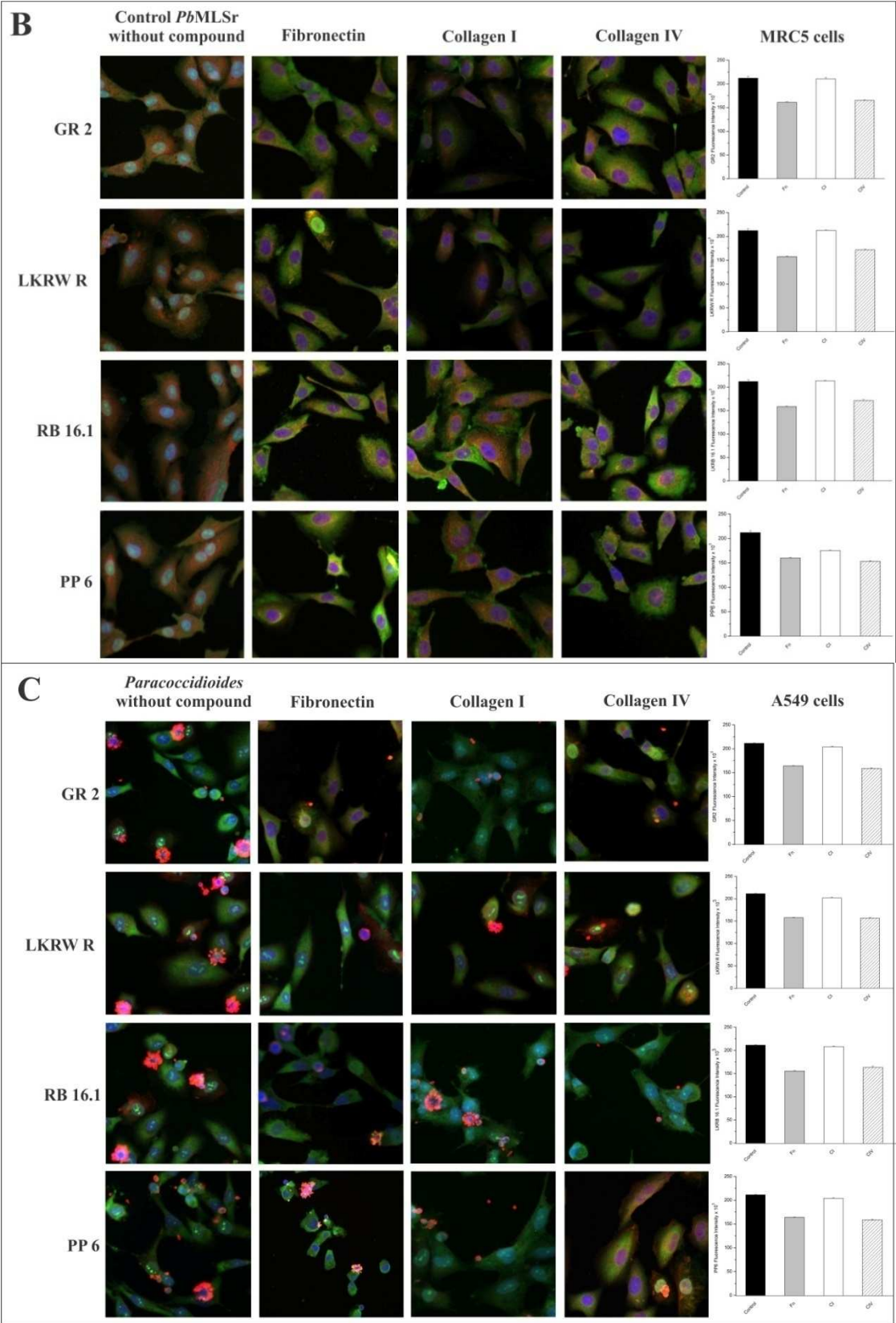


LKRW 24.3
C₂₁H₂₆N₂O₃
354.44

4.







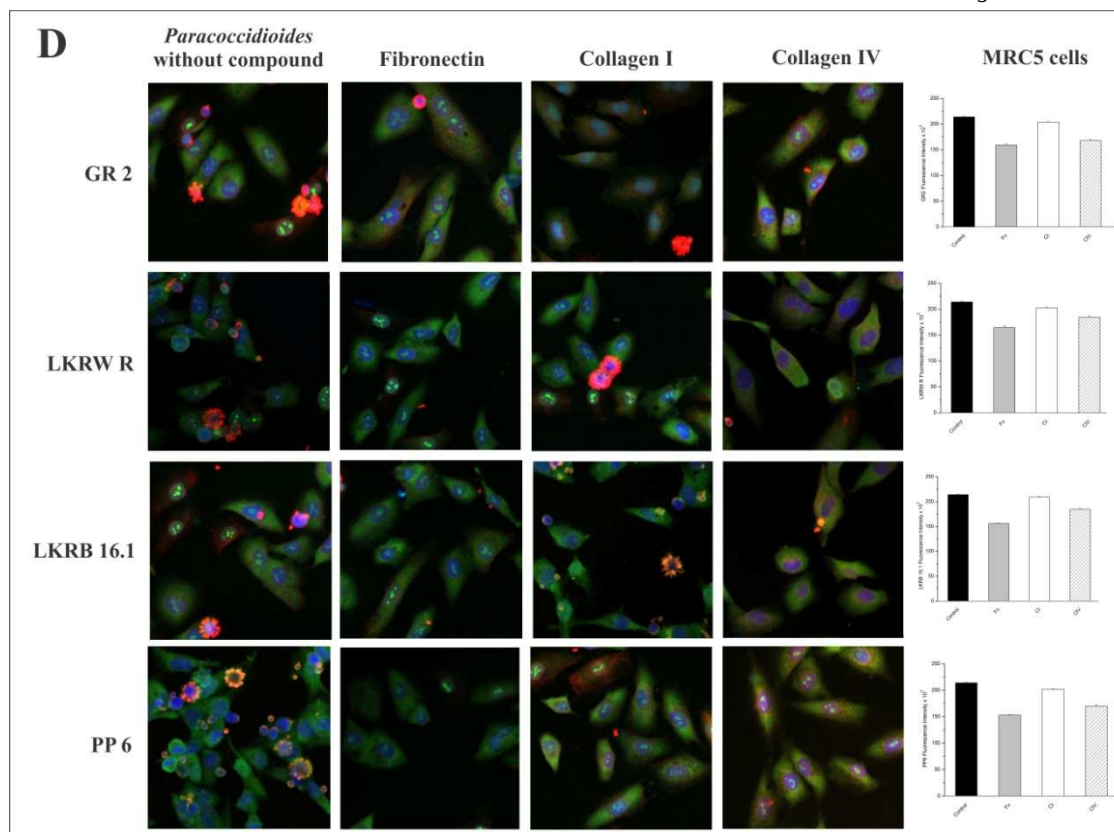


Table 1 - Ligands in ZINC database Malate Synthase, classified by the criterion of affinity and efficiency with their respective affinities (AutoDock Vina).

Rank	compounds ranked by affinity	score ADVina (Kcal/mol)	number of atoms non-hydrogen	compounds ranked by efficiency	score ADVina (Kcal/mol)	number of atoms non-hydrogen
1	02121309	-12.0	32	00366861	-8.2	15
2	08300073	-12.0	31	03847013	-8.2	15
3	08918302	-12.0	36	00032527	-8.1	15
4	00709385	-11.9	29	03847799	-8.4	16
5	00709383	-11.8	28	04293378	-8.4	16
6	03845566	-11.7	34	00485644	-8.3	16
7	04222182	-11.7	35	01686135	-8.3	16
8	09033168	-11.7	32	03847798	-8.3	16
9	02124782	-11.6	37	00077349	-8.8	17
10	02097658	-11.5	27	00459445	-8.2	16
11	01085815	-11.5	28	03881730	-8.2	16

12	01207786	-11.5	30	01042109	-8.2	16
13	08790287	-11.5	34	04267457	-8.2	16
14	02122985	-11.4	39	00154770	-8.2	16
15	02120656	-11.3	29	00488866	-8.2	16
16	08789039	-11.3	37	03131006	-8.2	16
17	08918445	-11.3	35	03846454	-8.2	16
18	03840447	-11.2	33	01651171	-8.7	17
19	04086315	-11.2	30	03851049	-8.7	17
20	04799397	-11.2	36	04027009	-9.2	18

Table 2 - Molecular Docking between Alkaloids and receptor Malate Synthase.

Classification	Compound	*Affinity with greater occurrences (Kcal/mol)	Number of occurrences in the 1000 simulations	Lower affinity value reached in Kcal/mol (number of occurrence)
1°	GR1	-7.1	532	-7.7 (90)
2°	PP6	-8.6	252	-8.7 (220)
3°	PP1	-7.9	348	-8.1 (37)
3°	GR2	-6.9	273	-7,6 (96)
5°	PP3	-7.5	150	-7.8 (1)
6°	PP2	-7.3	121	-7.6 (53)
7°	PP5	-7.4	11	-7.4 (11)
8°	PP4	-7.2	3	-7.3 (2)

*Affinity found in Molecular docking simulations in the binding pocket of Malate Synthase structure. The statistics were generated through a 'filter' only counting the occurrences of a particular score for ligands that are embedded into the binding pocket of the receptor.

Table 3 - Molecular Docking between Alkaloids reduced and Receiver Malate Synthase.

Classification	Compound	Affinity with greater frequency (Kcal/mol)	Number of occurrences of affinity with greater frequency in the 1000 simulations	Occurrences affinity that major affinity greater frequency	Occurrences affinity smaller than the affinity of greater frequency
1°	LKRW 24.3	-8	996	0 (none)	4 (with -7,9 Kcal.mol)
2°	LKRB 16.1	-7,6	717	1 (with -7,7 Kcal/mol)	271 (until -6,5 Kcal/mol)
3°	LKRW R	-7,9	226	592 (until -8,9 Kcal/mol)	181 (until -7,4 Kcal/mol)
3°	LKRB 30.8	-6	111	159 (until -7,0 Kcal/mol)	128 (until -5,5 Kcal/mol)
5°	LKRB 44.3	-5,9	100	198 (until -7,5 Kcal/mol)	100 (until -5,4 Kcal/mol)
6°	LKRB 41.2	-7,5	71	29 (until -7,7 Kcal/mol)	244 (until -5,5 Kcal/mol)
7°	LKRB 16.3	-7,3	54	2 (with -7,4 Kcal/mol)	214 (until -5,4 Kcal/mol)

*Simulations performed on a region covering much of the structure of Malate Synthase. The statistics were generated through a 'filter' only counting the occurrences of ligands that are embedded into the internal cavity of the receiver. As a result, the sum of occurrences do not total 1000. Were discarded because the fittings out of the internal cavity (Figure 1 B and C).

Table 4 - Inhibitory effect of alkaloids compounds in the *PbMLS* specific activity.

Compound	Specific activity (U*/ μ L)
Control	521.7 $\pm$ 0.2
Pyruvic acid	104.5 $\pm$ 0.4
PP6	80.5 $\pm$ 0.1
RB 16.1	102.4 $\pm$ 0.1
GR2	97.5 $\pm$ 0.3
LKRW R	46.2 $\pm$ 0.1
GR1	488.4 $\pm$ 0.4
PP3	501 $\pm$ 0.3
PP2	512 $\pm$ 0.3
PSP11	507.4 $\pm$ 0.3
Wedelin	499.8 $\pm$ 0.5
Hidantoin	520.1 $\pm$ 0.1

RB 30.8 518.3±0.2

Flawo 21.25 511.6±0.3

RW 19.4 519.9±0.3

LW 24.3 515.5±0.1

U* = 1 mol of coenzyme A formed per minute.

Table 5 - MIC of compounds alkaloids on *Paracoccidioides Pb18* yeast cells.

Alkaloids compounds	LKRW R	PP6	GR2	RB 16.1
MIC (μM)	102	501	23	709

Table 6. Percent inhibition of the adherence of *PbMLS* and *Paracoccidioides Pb18* to ECM.

Compound	Fibronectin <i>PbMLS/Pb18</i>	Collagen I <i>PbMLS/Pb18</i>	Collagen IV <i>PbMLS/Pb18</i>
GR2	19.60/30.0	27.59/33.98	21.38/34.63
LKRW R	25.93/5.05	33.03/12.59	21.62/14.36
RB 16.1	18.88/5.27	37.17/31.45	19.47/34.31
PP6	41.10/8.51	31.52/9.18	17.79/12.64

Table 7. Cytotoxic activity of compounds.

Compound	IC ₅₀ values; μM ± SD	
	A549	MRC5
GR2	670 ± 0.9	810 ± 1.2
LKRW R	280 ± 0.6	410 ± 1.0
RB 16.1	140 ± 1.3	760 ± 2.1
PP6	600 ± 1.1	700 ± 0.8

6 DISCUSSÃO

Manuscrito I - **Transcriptional and proteomic profile of *Paracoccidioides* in response to itraconazole**

Diante da exposição a drogas, os fungos têm capacidade de superar a atividade inibitória desses compostos através de mecanismos específicos de resistência, alterando o padrão de expressão gênica nestes organismos (Ahamad *et al.*, 2012).

Estudos têm demonstrado que itraconazol induz a alteração da expressão de genes envolvidos no transporte, metabolismo, membrana, resposta a estímulos e biossíntese do ergosterol em *C. albicans* (De Backer *et al.*, 2001). O itraconazol age contra o citocromo P450 fúngico, o qual está envolvido na 14 α -demetilação da molécula de lanosterol. Esse passo é fundamental para a biossíntese de ergosterol, que mantém a função da membrana plasmática (Sanglard, 2002).

Ergosterol é um componente essencial da membrana plasmática de fungos, afetando a permeabilidade da membrana e a atividade de várias enzimas (Vanden Bossche, 1985). Este esterol tem importante papel na respiração mitocondrial e fosforilação oxidativa (Daum *et al.*, 1998). Dessa forma, é esperado que mudanças nos níveis de ergosterol influenciem a atividade de inúmeras vias metabólicas. A depleção de ergosterol e subsequente acúmulo de metil-esteróis na célula podem resultar em alterações na membrana, na síntese e atividade de várias enzimas e na atividade mitocondrial (De Backer *et al.*, 2001).

No presente estudo foi confirmada a indução temporal (especialmente no tempo de 6 h) de genes da via de biossíntese do ergosterol. Este resultado está de acordo com estudos prévios, os quais revelaram uma indução global dos genes ERG em resposta ao tratamento com itraconazol (De Backer *et al.*, 2001) e outros azóis (Liu *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2007), corroborando o fato de que a via do ergosterol é o principal alvo dos azóis. O mecanismo de indução da expressão global de genes ERG ainda não é bem conhecido. Entretanto, a depleção de ergosterol na membrana pode estar levando a esse aumento da expressão de tais genes.

Para proteger as células de agentes danificadores de macromoléculas como proteínas, lipídios e DNAs, os organismos geram produtos como a glutatona (Takashi *et al.*, 2010). Esta exerce um papel importante na desintoxicação por xenobióticos e regulação da atividade de muitas proteínas pela glutatonação (Kaur *et al.*, 2012), bem como metabolismo de vitaminas e co-fatores. As GSTs são categorizadas como enzimas de desintoxicação com a habilidade de conjugar à glutatona uma ampla gama de xenobióticos potencialmente prejudiciais, constituindo uma superfamília de enzimas multifuncionais que catalisam a conjugação da glutatona a um grupo eletrofílico de produtos metabólicos e compostos xenobióticos (Feng & Singh, 2009). Portanto, tais características condizem com a indução da expressão do gene codificador da glutatona S-transferase, a qual provavelmente está agindo de forma a direcionar o itraconazol para fora da célula. A maioria dos genes de transportadores de membrana está induzida provavelmente devido ao desequilíbrio da homeostase celular.

Genes envolvidos no metabolismo de ácidos graxos e lipídios podem alimentar a via do ergosterol, bem como os genes codificantes de precursores metabólicos e produção de energia podem produzir acetil-CoA, a qual pode levar à produção de ergosterol e fosfolipídios de membrana. Foram encontrados induzidos genes relacionados a tais aspectos: betaína aldeídesidrogenase, cisteína desulfurase, acil-CoA desidrogenase e piruvato quinase.

Chen e colaboradores (2012) apontam que a cisteína desulfurase está envolvida na manutenção da homeostase, no metabolismo de cisteína, aminoácidos, co-fatores e síntese e processamento de tRNA. A cisteína gerada do metabolismo pode ser usada para geração de importantes metabólitos como a CoA e a glutatona (Pandey *et al.*, 2011).

Foi demonstrado que em leveduras, a via da piruvato quinase aumenta a taxa de respiração do organismo, indicando o requerimento da enzima para tal processo (Bluemlein *et al.*, 2012). A piruvato quinase catalisa o último passo da glicólise com concomitante fosforilação do ADP a ATP, levando à geração de energia. Price e colaboradores (2011) mostraram que a deleção do gene da piruvato quinase bloqueou a saída de carbono da glicólise, de forma a demonstrar a importância do metabolismo de glicose para a virulência em *Cryptococcus neoformans*. Neste caso, a produção de ATP foi severamente diminuída. Em leveduras, essa enzima controla diferentes alvos em resposta às mudanças nas condições ambientais (Portela *et al.*, 2002).

A betaína aldeídesidrogenase participa da oxidação de vários aldeídos usando o NADP⁺ como co-fator, reduzindo-o a NADPH. Dessa forma, leva à geração de energia e

participa do processo biossintético da carnitina (Muñoz-Clares, 2010). Tal enzima também catalisa a oxidação NADP-dependente irreversível da betaína aldeído, cujo produto pode funcionar como osmoprotetor para lidar com estresse osmótico (Muñoz-Clares, 2010), o qual pode ser relacionado, neste caso, à vulnerabilidade da membrana desestabilizada pela ação do itraconazol. Portanto, a indução desses genes pode estar levando à produção de ergosterol pelo metabolismo de ácidos graxos ou produção de acetil-CoA. Outro gene também envolvido no metabolismo de ácidos graxos e encontrado induzido foi o da isovaleril CoA desidrogenase. Esta enzima catalisa a degradação de leucina e realiza a desidrogenação dos substratos de acil-CoA influenciando na produção de acetil-CoA (Urano *et al.*, 2010).

Visto que o itraconazol age na célula interferindo na síntese de ergosterol, a integridade da membrana/parede celular é comprometida. A enzima quitina sintase age polimerizando N-acetilglicosamina produzindo quitina, a qual é integrada na membrana plasmática e parede celular (Banks *et al.*, 2005). Esta enzima exerce importante papel no metabolismo de carboidratos, regulação da atividade proteica, resposta ao estresse osmótico e crescimento celular. Takeshita e colaboradores (2005) demonstraram que a quitina sintase possui função crucial na manutenção da integridade da parede celular. Foi demonstrado que altos níveis de ergosterol inibem a quitina sintase, enquanto que mutantes de *Candida albicans* com baixo conteúdo de ergosterol mostraram aumento dos níveis de quitina sintase (Vanden, 1985). No presente estudo, o gene codificante para o regulador da quitina sintase foi encontrado induzido, sugerindo que a síntese de quitina direcionada para a parede celular, esteja suprimindo a deficiência de ergosterol, visando o reestabelecimento da integridade da membrana plasmática.

Os triacilgliceróis são a mais importante forma de armazenamento de energia e biossíntese de ácidos graxos requeridos para a membrana celular de eucariotos. A enzima fundamental na biossíntese desses gliceróis é a diacilglicerol aciltransferase (Sorger & Daum, 2002; Liu *et al.*, 2010). Kalscheuer *et al* (2004) demonstraram que tal enzima é chave para o armazenamento de lipídios e síntese de triacilglicerol em bactérias gram-negativas e *S. cerevisiae*, bem como na biossíntese de esteróis em levedura. A super-expressão do gene da diacilglicerol aciltransferase causa um significativo aumento no acúmulo de lipídios em *S. cerevisiae* (Kamisaka *et al.*, 2010), e os fosfolipídios formados pela ação da enzima podem afetar a biogênese da membrana celular (KAMISAKA *et al.*, 1997).

A resposta celular a condições de estresse, tais como elevação de temperatura, estresse oxidativo ou inanição, é um processo conservado em organismos vivos. Tais tensões podem resultar em desdobramento proteico, agregação não específica, e em última análise, morte celular. Dessa maneira, de forma a neutralizar os prejuízos causados à célula, ocorre a síntese das heat shock proteins (HSPs), também conhecidas por chaperonas, as quais são proteínas especializadas que atuam auxiliando o enovelamento proteico, evitando erros no desdobramento e agregações de proteínas. As chaperonas encaminham a proteína à destruição, caso não seja possível atingir o enovelamento correto (Richter *et al.*, 2010). Existem quatro grandes famílias de HSPs, as HSP100, HSP90, HSP70 e HSP60, as quais são proteínas de alto peso molecular e dependentes de ATP. Em nosso trabalho encontramos e confirmamos mudança de expressão de três genes pertencentes a essa família, tais como HSP10, HSP30 e HSP70. Nagao *et al* (2012) demonstraram em *C. albicans* a importância da proteína MSI3, pertencente à família das HSP70, relacionado à sua resposta celular em presença de fluconazol. Testes de susceptibilidade a drogas indicaram que a repressão da expressão de tal proteína em linhagens mutantes resultou na hipersensibilidade à fluconazol. Os níveis de expressão de HSP70 foram aumentados nas linhagens controle em resposta ao antifúngico, sugerindo que esse processo confere tolerância ao fluconazol (Nagao *et al.*, 2012). Tais dados corroboram com nossos resultados tendo em vista a indução de HSPs, confirmando a condição de estresse de *Paracoccidioides* causada por itraconazol.

Uma das maneiras da célula expulsar agentes externos e desintoxicar-se é a utilização das bombas de efluxo. Tem sido descrito que em *S. cerevisiae* (Niimi *et al.*, 2005) e em *C. albicans* um dos mecanismos moleculares de resistência a azóis é a super expressão de genes de bombas de efluxo de drogas (Mishra *et al.*, 2007; Gaur *et al.*, 2008; Holmes *et al.*, 2012). MFS (Major Facilitator Superfamily) é uma família de transportadores de pequenos solutos em resposta a diferenças no gradiente químico-osmótico da célula (Gaur *et al.*, 2008), e está envolvida na desintoxicação celular, transporte de drogas, açúcares, intermediários da fosforilação glicolítica (Pao *et al.*, 1998). Gaur *et al.* (2008) observaram que a indução do gene MFS leva à resistência específica a drogas. Jacquot e colaboradores (1997) descreveram que o produto do gene é uma permease, mantendo a concentração da droga abaixo do limiar dos níveis tóxicos ou de inibição do crescimento em *S. cerevisiae*.

As alterações nos perfis de proteômicos de *Paracoccidioides* após exposição de ao itraconazol foram analisados utilizando eletroforese em gel 2D. Utilizando o gel image

software de um total de 463 spots a partir das condições tratado e controle foram sobrepostos com sucesso, encontrando assim, 135 diferencialmente expressos onde, 65 proteínas eram induzidas e 73 reprimidas. Destas podemos destacar as proteínas correlacionadas a via de atuação do itraconazol como citocromo P450 55A1, dentre outras tais como succinil-CoA-ligase subunidade beta, proteína contendo domínio CobW, propionil-CoA-carboxilase, L-treonina desidrogenase 3, proteína de choque térmico HSP60 e peptidil-prolil cis-trans isomerase B.

Finalmente, foi investigado se os transcritos diferencialmente expressos no RDA também foram expressos na condição *in vivo* utilizando camundongos Balb/c infectados com *Paracoccidioides* Pb18 tratados com o itraconazol. Foi evidenciado que o tratamento com itraconazol reduziu a carga fúngica em 42% nos animais infectados. Em seguida, utilizando RNAs extraídos do fungo recuperado após o processo de infecção e tratamento, concluímos por qRT-PCR, que os genes MFS, GST e CHS_r foram diferencialmente expressos, corroborando os dados obtidos no RDA.

Manuscrito II - β - carboline alkaloids from *Galianthe ramosa* (Rubiaceae) inhibiting Malato Synthase from the *Paracoccidioides* spp

Os compostos alcalóides 1 e 2 foram testados contra *Paracoccidioides* e para a enzima PbMLS. Os alcalóides 1 e 2 inibiram o crescimento de *Paracoccidioides* com os valores de MIC de 185 μ M e 26 μ M, respectivamente. Os efeitos dos alcalóides 1 e 2 na PbMLS foi avaliado. Alcalóide 1 não teve atividade inibitória sobre PbMLS, mas o alcalóide 2 inibiu a PbMLS com IC₅₀ de 50 μ M.

Aqui elucidamos de formula estrutural dos alcalóides 1 e 2, além disso é o primeiro relatório de que alcalóides sejam identificados como um inibidor da PbMLS. Nos nossos testes de bioatividade contra PbMLS observamos que o alcalóide 2, mostrou resposta dose dependente semelhante ao ácido pirúvico (controle); o alcalóide 1 não inibiu PbMLS.

Em conclusão, temos que dois novos alcalóides (1 e 2) foram isolados de *Galianthe ramosa*, sendo que alcalóide 2 exibe atividade relevante contra *Paracoccidioides* e PbMLS. O alcalóide 2 é o primeiro alcalóide inibidor de PbMLS, e este nos fornece uma evidência adicional para apoiar a importância desta classe como uma fonte rica de novos compostos bioativos e o Cerrado brasileiro como fonte de novos alcalóides bioativos. Os resultados acima foram corroborados por dados obtidos *in silico*.

Manuscrito III - **Virtual screening and natural products inhibiting malate synthase of *Paracoccidioides* spp**

Nos últimos anos, o *screening* virtual tornou-se uma ferramenta aceita na descoberta de medicamentos, sendo aplicada com sucesso em diversos programas terapêuticos. Receptores baseados em *screening* virtual de uma molécula no local de ligação do receptor à estrutura 3D da proteína, conhecida ou previsível, tem sido utilizado com sucesso para prever ligantes de alta afinidade a uma determinada proteína (Lee *et al.*, 2009). Alcalóides são uma classe de compostos obtidas a partir de produtos naturais. Devido a sua atividade antifúngica já descrita, incluímos vários alcalóides carbolínicos isolados de espécies de Rubiaceae em nosso *screening* com o objetivo de identificar compostos com potencial para inibir *Paracoccidioides* e PbMLS. Deste modo, relatamos aqui compostos obtidos por meio de *screening* virtual, bem como a partir de produtos naturais, os quais interferiram em *Paracoccidioides* e PbMLS.

Utilizando os critérios de classificação de AutoDock Vina através de sua função de pontuação, realizamos uma simulação com cada composto (o total de 89.415 compostos), foram realizados dois tipos de classificação: afinidade (envolvendo a seleção de 20 compostos com as pontuações mais baixas obtidas pelo AutoDock Vina) e eficiência (envolvendo a seleção de 20 compostos com os menores valores de LE e limitado a uma pontuação máxima de -8,0 Kcal / mol).

A inibição de PbMLSr por compostos alcalóides foi investigada de tal modo que dos 14 compostos testados, quatro deles inibiram a atividade de PbMLS, são eles: PP6, RB 16,1, fração contendo Reserpina como composto majoritário (LKRW R) e GR2.

A interferência dos compostos alcalóides no crescimento de células leveduriformes de *Paracoccidioides* Pb18 foi investigada. Através do método de ensaio de microdiluição em microplacas (MABA) investigamos e quantificamos a viabilidade das células leveduriforme *Paracoccidioides* Pb18 (de Paula e Silva *et al.*, 2013). Os resultados mostraram que GR2 e LKRW R inibiram o crescimento do fungo de forma significativa, indicando assim que ambos os compostos são promissores no processo de inibição de crescimento fúngico.

Uma vez que PbMLS é uma adesina, e se liga a fibronectina, colágeno tipo I e IV, investigamos se PP6, RB16.1, GR2 e LKRW R poderiam impedir a adesão de PbMLS e de *Paracoccidioides* Pb18 aos MEC utilizando *Far-Western blot*, ELISA e IN Cell

Analyzer 2000 System light microscopy. Os resultados mostraram que PP6, RB16.1, GR2 e LKRW R inibiram *PbMLS* e *Paracoccidioides Pb18* no processo de adesão à fibronectina, colágenos do tipo I e IV. A inibição foi maior para *PbMLS* que a *Paracoccidioides Pb18*. Considerando *PbMLS*, a inibição maior foi observada para GR2, LKRW R e RB16.1 utilizando colágeno tipo I. A maior inibição para PP6 foi observada usando fibronectina seguido por colágeno tipo I. Os compostos PP6, RB16.1, GR2 e LKRW R não foram citotóxicos para as linhagens de células A549 e MRC5 utilizando MTT.

Análises Proteômicas IV – Anfotericina B

Nesta etapa do trabalho, utilizamos a técnica de eletroforese bidimensional (2D) acoplado à identificação por espectrometria de massas MALDI-QTOF MS e MS/MS como ferramentas proteômicas para investigar o perfil de proteínas de *Paracoccidioides* durante o contato com anfotericina B.

Os spots de proteínas obtidos dos géis 2D foram retirados, digeridos com tripsina e os peptídeos foram analisados por PMF e/ou MS/MS, e obtidas por meio de modo de operação refletido e LIFT (manual e automático). As análises de PMF e MS/MS feitas por sequenciamento *De novo* utilizando o programa PepSeq. Todas as proteínas identificadas foram pesquisadas no banco do NCBI nr com restrição para fungos. Vinte e nove proteínas foram identificadas e sequenciadas, na condição tratada com anfotericina B por MS/MS.

Na presença de anfotericina B varias proteínas de *Paracoccidioides* foram induzidas. HSPs está envolvida nos processos de defesa celular e virulência; sabe-se que existem quatro grandes famílias de HSPs, as HSP100, HSP90, HSP70 e HSP60, as quais são proteínas de alta massa molecular e dependentes de ATP, que atuam auxiliando o enovelamento proteico, evitando erros no desdobramento e agregações de proteínas. As chaperonas encaminham a proteína à destruição, caso não seja possível atingir o enovelamento correto (Richter *et al.*, 2010). Nagao e colaboradores (2012) observaram que os níveis de expressão de HSP70 foram aumentados nas linhagens controle em resposta ao antifúngico, sugerindo que esse processo confere tolerância ao fluconazol.

A enzima enolase, a qual cataliza a desidratação reversível da 2-fosfo-D-glicerato a fosfoenolpiruvato na segunda metade da via glicolítica, foi induzida em nossos estudos.

Sabe-se que no fungo *Paracoccidioides* a enolase tem sido encontrada tanto no citosol quanto na superfície celular do fungo e também tem sido relacionada à virulência por atuar como receptor do plasminogênio, aumentando a colonização e invasão (Veloso *et al.*, 2010). Além do plasminogênio, foi demonstrado por Donofrio *et al.* (2009) a capacidade da enolase em se ligar ao fibrinogênio do hospedeiro, o que facilitaria a disseminação do patógeno em tecidos do hospedeiro, estabelecendo o processo de infecção.

Winters *et al.* (2008) detectaram 35 proteínas que tiveram seus níveis diminuídos, dentre elas enolase, malato desidrogenase, sacaropina desidrogenase, HSP70, asparaginil-tRNA sintetase e uma proteína não caracterizada. Esses resultados sugerem uma necessidade do *H. capsulatum* por induzir funções metabólicas específicas para competir com alterações no ambiente do hospedeiro.

Diversos estudos têm descrito que ácidos-graxos são potenciais fontes de carbono para fungos patogênicos durante infecção e a deleção de genes envolvidos na beta-oxidação causa uma acentuada atenuação da virulência (Ramírez & Lorenz, 2007). Encontramos aqui, um aumento na expressão de genes codificantes para proteínas envolvidas na beta-oxidação de lipídeos, tais como enoil-CoA hidratase e 3-cetoacil-CoA tiolase.

As diferentes categorias funcionais evidenciadas no estudo tais como síntese e endereçamento de proteínas, ciclo celular, via glicolítica, ciclo do ácido cítrico, transporte celular, metabolismo de lipídios e síntese e endereçamento de proteínas, reforçam os dados da literatura da ação de amplo espectro deste fármaco.

8. CONCLUSÕES

1 – Este é o primeiro estudo visando analisar as mudanças na expressão gênica em *Paracoccidioides Pb01* diante da exposição ao itraconazol. Entre os genes afetados, foram identificados genes únicos para *Paracoccidioides Pb01*, bem como genes em comum encontrados em outros fungos. Os resultados *in vitro* foram validados por experimentos *in vivo*. ERG11, ERG6, ERG3, ERG5 e ERG25 foram regulados temporalmente. E os níveis de distribuição de ergosterol foram avaliados em *Paracoccidioides Pb18*, e os resultados demonstram a influencia do itraconazol na distribuição deste componente de membrana do fungo. Os resultados obtidos aqui devem ajudar a compreender o modo de ação do itraconazol em *Paracoccidioides spp*.

2 – Simulações de acoplamento molecular permitiram classificar potenciais compostos que se ligam ao sítio catalítico de *PbMLS*. Devido a similaridade estrutural dos compostos com os produtos naturais alcalóides, esses foram obtidos de plantas do Cerrado. Os alcalóides PP6, RB 16,1, fração contendo Reserpina como composto majoritário (LKRW R) e GR2 inibiram a atividade de *PbMLS*, o crescimento de *Paracoccidioides* e a adesão de *PbMLS* e do fungo aos ECM utilizando *Far-Western blot*, ELISA e IN Cell Analyzer 2000 System light microscopy. Os compostos não foram citotóxicos para as células A549 e MRC5.

3 – As análises proteômicas identificaram proteínas diferencialmente expressas para a condição de tratamento com Anfotericina B, estas foram confirmadas por MS/MS. Proteínas envolvidas nos processos de defesa celular e virulência, síntese e endereçamento de proteínas, ciclo celular, via glicolítica, ciclo do ácido cítrico, transporte celular, metabolismo de lipídios e síntese e endereçamento de proteínas, corroborando os dados da literatura da ação de amplo espectro deste fármaco e direcionando os próximos estudos em HPLC-MS de caracterização do perfil protéico de *Paracoccidioides* em contato com estes fármacos.

BIBLIOGRAFIA

Arango M, Yarzabal L 1982. T-cell dysfunction and hyperimmunoglobulinemia E in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*. 79:115-23.

Agarwal, A.K., Rogers, P.D., Baerson, S.R., Jacob, M.R., Barker, K.S., Cleary, J.D., Walker, L.A., Nagle, D.G., Clark, A.M. 2003. Genome-wide expression profiling of the response to polyene, pyrimidine, azole, and echinocandin antifungal agents in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 278:34998-35015.

Araújo MS, Souza SCO 2002. Análise epidemiológica de pacientes acometidos com paracoccidioidomicose em região endêmica do estado de Minas Gerais. *Rev Pos-Grad*. 7:22-6.

Baeza LC, Bailão AM, Borges CL, Pereira M, Soares CMA, Mendes-Gianin MJ 2007. cDNA representational difference analysis used in the identification of genes expressed by *Trichophyton rubrum* during contact with keratin Microbes and infection.

Banks, IR, Specht, CA, Donlin, MJ, Gerik, KJ, LEVITZ, SM, Lodge, JK 2005. A chitin synthase and its regulator protein are critical for chitosan production and growth of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*, v. 4, n. 11, p. 1902-1912.

Bagagli E, Bosco SM, Theodoro RC, Franco M 2006. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. *Infect Genet Evol* 6(5): 344-351.

Bagagli E, Theodoro R C, Bosco S M, McEwen J G, 2008. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. *Mycopathologia* 165(4-5): 197-207.

Barrozo LV, Mendes RP, Marques SA, Benard G, Silva MES and Bagagli E. Climate and acute/subacute paracoccidioidomycosis in a hyper-endemic area in Brazil. *International Journal of Epidemiology* 2009;1-8 doi:10.1093/ije/dyp207.

Bastos KP, Bailão AM, Borges CL, Faria FP, Felipe MS, Silva MG, Martins WS, Fiuza RB, Pereira M, Soares CMA, 2007. The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. *BMC Microbiology* 7: 29

Bailão AM, Schrank A, Borges CL, Dutra V, Molinari-Madlum EEWI, Felipe MSS, Mendes-Giannini MJS, Martins WS, Pereira M, Soares CMA 2006. Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: Representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. *Microbes and Infection*. 8:2686-2697.

Bailão AM, Shrank A, Borges CL, Parente JA, Dutra V, Felipe MSS, Fiúza RB, Pereira M. Soares CMA 2007. The transcriptional profile of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells is influenced by human plasma. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 51: 43-57.

Bammert GF, Foster JM 2000 Genome-wide expression patterns in *Saccharomyces cerevisiae*: Comparison of drug treatments and genetic alterations affecting biosynthesis of ergosterol. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 44:1255-1265.

Bicalho RN, Espírito Santo MF, Aguiar MCF, et al. 2001. Oral paracoccidioidomycosis: A retrospective study of 62 Brazilian patients. *Oral Dis*.;7:56-60.

Bisinelli JC, Ferreira MLS. Doenças infecciosas: paracoccidioidomicose (blastomicose sul-americana). In: Tommasi AF. Diagnóstico em patologia bucal. 3ª ed. São Paulo: Pancast; 2002. p. 202-9.

Bjellqvist B, Sanchez JC, Pasquali C, Ravier F, Paquet N, Frutiger S, Hughes GJ, Hochstrasser D. Micropreparative two-dimensional gel electrophoresis allowing the separation of samples containing milligram amounts of proteins. *Electrophoresis*. 1993 Dec;14(12):1375-8.

Borges CL, Parente JA, Barbosa MS, Santana JM, Bao SN, MV de Sousa, de Almeida Soares CM, Detection of a homotetrameric structure and protein – protein interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* formamidase lead to new functional insights. *FEMS Yeast Res*. 2010; 10(1).

Blotta MHSL, Mamoni RL, Oliveira SJ, et al. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil; a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;61:390-4.

Bluemlein, K.; Glückmann, M.; Grüning, N.M.; Feichtinger, R.; Krüger, A.; Wamelink, M.; Lehrach, H.; Tate, S.; Neureiter, D.; Kofler, B.; Ralser, M. Pyruvate kinase is a dosage-dependent regulator of cellular amino acid homeostasis. *Oncotarget*, v. 3, n. 11, p. 1356- 1369, 2012.

Brownlee, J. M., K. Johnson-Winters, D. H. Harrison, and G. R. Moran. 2004. Structure of the ferrous form of (4-hydroxyphenyl) pyruvate dioxygenase from *Streptomyces avermitilis* in complex with the therapeutic herbicide, NTBC. *Biochemistry* 43:6370–6377.

Brummer E, Castaneda E, Restrepo A 1993. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* 6: 89-117.

Camargo ZP, de Franco MF 2000. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev Iberoam Micol*. 2:41-8.

Carrero L, Niño-Vega G, Teixeira MM, Carvalho MJ, Soares CMA, Pereira M, Jesuino RS, McEwen JG, Mendoza L, Taylor JW, Felipe MSS, San-Blas G 2008. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. *Fungal Genet Biol* 45: 605-12.

Carillo-Muñoz A. J. *et al.* Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Rev Esp Quimioter*, v. 19, n.2, p, 130-9, jun 2006. Cash, P. Proteomics: the protein revolution. *Biologist (London)*. 2002 Apr;49(2):58-62.

Corredor, G. G., Peralta, L. A., Castano, J. H., Zuluaga, J. S., Henao, B., Arango, M., Tabares, A. M., Matute, D. R., McEwen, J. G., Restrepo, A., 2005. The nakedtailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Molecular identification of the isolate. Med Mycol* 43(3): 275-280.

Cordell GA, Quinn-Beattieand ML, Farnsworth NR. The potential of alkaloids in drug discovery. *Phytotherapy Research* 2001; 15(3): 183–205

Corte, A. C., Svoboda, W. K., Navarro, I. T., Freire, R. L., Malanski, L. S., Shiozawa, M. M., Ludwig, G., Aguiar, L. M., Passos, F. C., Maron, A., Camargo, Z. P., Itano, E. N., Ono, M. A., 2007. Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Parana State, Brazil. *Mycopathologia* 164(5): 225-228.

Corti M, Palmieri O, Negroni R, Soto I, Villafane MF 2003. Peripleutis due to *Paracoccidioides brasiliensis* in a patient with AIDS. *Medicina*. 63:417.

Costa M, Borges CL, Bailão AM, Meirelles GV, Mendonça YA, Dantas SF, de Faria FP, Felipe MS, Molinari-Madlum EE, Mendes-Giannini MJ, Fiuza RB, Martins WS, Pereira M, Soares CMA 2007. Transcriptome profiling of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast-phase cells recovered from infected mice brings new insights into fungal response upon host interaction. *Microbiology*. 153:4194-207.

De Almeida SM 2005. Central nervous system paracoccidioidomycosis: an overview. *Braz J Infect Dis*. 9(2):126-33

De Backer, M.D. Ilyina, T., Ma, X.J., Vandoninck, S., Luyten, W.H.M.L., Bossche, H.V. 2001. Genomic profiling of the response of *Candida albicans* to itraconazole treatment using a DNA microarray. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 45:1660-1670.

Derengowski LS, Tavares AH, Silva S, Procópio LS, Felipe MS, Silva-Pereira I 2008.

Upregulation of glyoxylate cycle genes upon *Paracoccidioides brasiliensis* internalization by murine macrophages and in vitro nutritional stress condition. *Med Mycol.* 46(2):125-34.

D6usman, L. T.; Jorge, T. C. M.; Souza, M. C.; Eberlin, M. N.; Meurer, E. C.; Bocca, C. C.; Basso, E. A.; Sarragiotto, M. H. Monoterpene indole alkaloids from *Palicourea crocea*. *Journal of Natural Products*, v. 67, n. 11, p. 1886- 1888, 2004.

El-Seedi, H. R. Coumarins, 1999. Benzoic acids and terpenoids from *Palicourea demissa*. *Rev. Latinoamer. Quím*, v. 27, n. 1, p.13-16.

Felipe MSS, Andrade RV, Petrofeza SS, Maranhão AQ, Torres FAG, Albuquerque P, Arraes FBM, Arruda M, Azevedo MO, Baptista AJ, Bataus LAM, Borges CL, Campos EG, Cruz MR, Daher BS, Dantas A, Ferreira MAS, Ghil GV, Jesuino RSA, Kyaw CM, Leitão L, Martins CR, Moraes LMP, Neves EO, Nicola AM, Alves ES, Parente JA, Pereira M, Poças-Fonseca MJ, Resende R, Ribeiro BM, Saldanha RR, Santos SC, Silva-Pereira I, Silva MAS, Silveira E, Simões IC, Soares, RBA, Souza D P, De-Souza MT, Andrade EV, Xavier MAS, Veiga HP, Venancio EJ, Carvalho MJA, Oliveira AG, Inoue MK, Almeida MF, Walter MEMT, Soares CMAS, Brígido MM 2003. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast.* 20:263-271.

Felipe MS, Andrade RV, Arraes FB, Nicola AM, Maranhão AQ, Torres FA, Silva-Pereira I, Poças-Fonseca MJ, Campos EG, Moraes LM, Andrade PA, Tavares AH, Silva SS, Kyaw CM, Souza DP, Pereira M, Jesuino RS, Andrade EV, Parente JA, Oliveira GS, Barbosa MS, Martins NF, Fachin AL, Cardoso RS, Passos GA, Almeida NF, Walter ME, Soares CM, Carvalho MJ, Brígido MM; 1987. PbGenome Network. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J Biol Chem.* 2005 Jul 1;280(26):24706-14. Epub 2005 Apr 22. Franco M, Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol.* Feb;25(1):5-18.

Feng, X.;Singh, B.R. Molecular identification of glutathione S-transferase gene and cDNAs of two isotypes from northern quahog (*Mercenaria mercenaria*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, v. 154, n. 1, p. 25- 36, 2009.

Ferreira M.ES, Malavazi I, Savoldi M, Brakhage AA, Goldman, MHS, Kim S, Nierman WC and Goldman G 2006. Transcriptome analysis of *Aspergillus fumigatus* exposed to voriconazole. *Curr Genet.* 50:32-34.

Fonseca CA, Jesuino RSA, Felipe MSS, Cunha DA, Brito WA & Soares CMA 2001. Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*, *Microbes Infect*, 3, 535-542.

Fortes RM, Kipnis A, Junqueira-Kipnis A P, 2009. *Paracoccidioides brasiliensis* pancreatic destruction in *Calomys callosus* experimentally infected. *BMC Microbiol* 7: 79-84.

Franco M, Sano A, Kera K, et al 1989. Chlamydospore formation by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 31(3)151-7.

Gallis HA, Drew RH, Pickard WW 1990 Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Reviews of infectious diseases.* 12,308-329.

Garcia NM, Delnegro GM, Heis-Vaccari EM, De Melo NT, de Assis CM, Lacaz CS 1993. *Paracoccidioides brasiliensis* a new sample isolated from feces of a penguin. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 35: 227-35

García AM, Hernández O, Aristizabal BH, Bernardes LAS, Puccia R, Naranjo TW, Goldman GH, Goldman MH, Cano LE, Restrepo A, McEwen JG 2009. Gene expression analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* transition from conidium to yeast cell. *Med Mycol.* 48(1):147-54.

Gargano S, Di Lallo G, Kobayashi GS, Maresca B 1995. A temperature-sensitive strain of *Histoplasma capsulatum* has an altered delta 9-fatty acid desaturase gene. *Lipids* 30:899–906.

- Gaur M, Puri N, Manoharlal R, Rai V, Mukhopadhyay G, Choudhury D, Prasad R 2008. MFS transportome of the human pathogenic yeast *Candida albicans*. *BMC Genomics*, v. 3.
- Georgopapadakou, N.H. 2002 Antifungals targeted to protein modification: focus on protein N-myristoyltransferase. *Expert Opinion Investigation Drugs*. 11:1117-1125.
- Giovani EM, Mantesso A, Loducca SVL, et al. Paracoccidioidomycosis in an HIV-positive patient: a case report with gingival aspects. *Oral Dis*. 2000; 63:27-9
- Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 2000 Apr; 21(6):1037-53.
- Görg A, Weiss W and Dunn MJ 2004. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 4, 3665–3685
- Goldani L Z, 2011. Gastrointestinal paracoccidioidomycosis: an overview. *J Clin Gastroenterol* 45(2): 87-91
- Goldman GH, Dos Reis EM, Ribeiro DCD, De Souza LAB, Quiapin AC, Vitorelli PM, Savoldi M, Semighini CP, De Oliveira RC, Nunes LR, Travassos LR, Puccia R, Batista WL, Ferreira LE, Moreira JC, Bogossian AP, Tekaiia F, Nobrega MP, Nobrega FG, Goldman MH 2003. Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. *Eukaryot Cell*. 2: 34-48.
- Graves PR, Haystead TA 2002. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev*. Mar;66(1):39-63
- Grose E, Tamsitt J R 1965. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus Literatus*) in Colômbia. *Sabouraudia*, Oxfordshire, v.4, p.124-125.
- Gudi R, Sandhu SS, Athwal RS 1990. Kinetochore identification in micronuclei in mouse bone marrow erythrocytes: an assay for detection of aneuploidy-inducing agents. *Mutation Research*; 234 (5), 263-268.
- Gygi SP, Rochon Y, Fianza BR, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol*. 1999 Mar;19(3):1720-30.
- Hahn, R.C., Hamdan, J.S. 2000. In vitro susceptibilities of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form to antifungal drugs. *Mycoses*. 43:403-407.
- Hartwell, J. L. Plants used against cancer. A survey. *Lloydia*, v. 34, n. 1, p.103-160, 1971. Harousseau, J.L., Dekker, A.W., Sta,atoullas-Bastard, A., Fassas, A., Linkesch, W., Gouveia, J., De Bock, R., Rovira, M., Seifert, W.F., Joosen, H., Peeters, M., Beula, De. 2000. Itraconazole oral solution for primary prophylaxis of fungal infection in patients with hematological malignancy and profound neutropenia: a randomized, double-blind, double-placebo, multicenter trial comparing itraconazole and amphotericin B. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 44:1887-1893.
- Holmes, A.R.; Keniya, M.V.; Ivnitski-Steele, I.; Monk, B.C.; Lamping, E.; Sklar, L.A.; Cannon, R.D. The monoamine oxidase A inhibitor clorgyline is a broad-spectrum inhibitor of fungal ABC and MFS transporter efflux pump activities which reverses the azole resistance of *Candida albicans* and *Candida glabrata* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 56, n. 3, p. 1508-1515, 2012.
- Hong YL, Hossler PA, Calhoun DH, Meshick SR 1995. Inhibition of recombinant *Pneumocytis carinii* dihydropteroate synthetase by sulfa drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1756 – 1763.
- Hubank M, Schatz AG 1994. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res*. 22:5640.

Jacquot, C.; Julien, R.; Guilloton, M. The *Saccharomyces cerevisiae* MFS superfamily SGE1 gene confers resistance to cationic dyes. *Yeast*, v. 13, n. 10, p. 891-902, 1997.

Kalscheuer, R.; Luftmann, H.; Steinbüchel, A. 2004. Synthesis of novel lipids in *Saccharomyces cerevisiae* by heterologous expression of an unspecific bacterial acyltransferase. *Appl Environ Microbiol*, v. 70, n. 12, p. 7119-7125.

Kamisaka, Y.; Kimura, K.; Uemura, H.; Shibakami, M. 2010. Activation of diacylglycerol acyltransferase expressed in *Saccharomyces cerevisiae*: overexpression of Dga1 lacking the N-terminal region in the Δ tsnf2 disruptant produces a significant increase in its enzyme activity. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 88, n. 1, p. 105-115.

Kelly S, Arnoldi A, Kelly DE 1993 Molecular genetic analysis of azole antifungal mode of action. *Biochemical Society transactions*. 21, 1034-1038. Kricmery VC Jr 2005. Antifungal chemotherapeutics. *Med Print Pract*. 14: 125-135.

Kaur H, Ganguli D 2012. Bachhawat, A.K. Glutathione degradation by the alternative pathway (DUG pathway) in *Saccharomyces cerevisiae* is initiated by (Dug2p-Dug3p) 2 complex, a novel glutamine amidotransferase (GATase) enzyme acting on glutathione. *J Biol Chem*, v. 287, n. 12, p. 8920-31.

Karas M, Hillenkamp F, 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem*. Oct 15;60(20):2299-301.

Lacaz CS, Martins JEC 1991. Paracoccidioidomycosis. *Micologia Médica*. São Paulo, Sarvier Editora: 248-261,.

Larsen MR, Roepstorff P. 2000. Mass spectrometric of proteins and characterization of their post-translational modifications in proteome analysis. *Fresenius J Anal Chem*, Mar-Apr;366(6-7):677-90.

Leclerc MC, Philipe H, Guého E 1994. Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. *J Med Vet Mycol*. 32:331-341.

Lisitsyn NA 1995 *Trends Genet*. 11:303-307.

Liu, T.T., Lee R.E.B., Barker, K.S., Lee, R.E., Wei, L., Homayouni, R., Rogers, D. 2005. Genome-wide expression profiling of the response to azole, polyene, echinocandin, and pyrimidine antifungal agents in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49:2226-2236.

Lyman, C.A., Walsh, T.J. 1992 Systemically administered antifungal agents. A review of their clinical pharmacology and therapeutic applications. *Drugs* 44:9-35.

Lock EA; Ellis MK; Gaskin P; Robinson M; Auton TR; Provan WM; Smith LL; Prisbylla MP; Mutter LC, Lee DL 1998. From toxicological problem to therapeutic use: the discovery of the mode of action of 2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione (NTBC), its toxicology and development as a drug. *J. Inher. Metab. Dis*. 21: 498-506.

Lopes, D. L., Araújo, S. A., Santos, J. P., Lyon, A. C., Dantas, D. V., Reis, B. S., Góes, A. M., Pedrosa, E. R., 2009. Prostatic paracoccidioidomycosis: differential diagnosis of prostate cancer. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(1): 33-36.

Lutz A 1908. Uma micose pseudo-coccidíica localizada na boca e observada no Brasil: Contribuição ao conhecimento das hifoblastomicoses americanas. *Brasil Méd*. 22: 121-124.

Mangiaterra M, Alonso J, Galvan M, et al. Histoplasmin and paracoccidioidin skin reactivity in infantile population of northern Argentina. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1996;38:349-53.

Marques SA, Franco MF, Mendes RP, Silva NC, Baccili C, Curcelli ED, Feracin AC, Oliveira CS, Tagliarini JV, Dillon NL, [Epidemiologic aspects of paracoccidioidomycosis in the endemic area of Botucatu (São Paulo - Brazil)]. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 1983 Mar-Apr;25(2):87-92.

Marques AS 2003. Paracoccidioidomicose: atualização epidemiológica, clínica e terapêutica. Na *Brás Dermatol.* 73(2):135-50.

Marques ER, Ferreira ME, Drummond RD, Felix JM, Menossi M, Savoldi M, Travassos LR, Puccia R, Batista WL, Carvalho KC, Goldman MH, Goldman GH. Identification of genes preferentially expressed in the pathogenic yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis* using suppression subtraction hybridization and macroarray differential analysis. *Mol Genet Genomics*, 2004 Jul;271(6):667-77. Epub 2004 May 8.

Martinez R. Paracoccidioidomicose. In: Sidrim JJC, Rocha MFG. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.p. 204-21.

Matute DR, Mcewen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, Rauscher JT, Restrepo A, Moraes F, Niño-Vega G, Taylor JW 2006. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol* 23: 65-73

Mendes RP 1994. The gamut of clinical manifestations. In Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del-Negro G eds. *Paracoccidioidomycosis*, 1st edn. Boca Raton: CRC Press. Pp 233-258.

Mendes-Giannini MJS, Bueno JP, Yasuda MAS, et al. Antibody response to the 43 kDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as a marker for the evaluation of patients under treatment. *Am J Trop Med Hyg.*1990;43:200-5

Morikawa T, Sun B, Matsuda H, Wu LJ, Harima S, Yoshikawa M. Bioactive Constituents from chinese natural medicines. xiv. new glycosides of β -carboline-type alkaloid, neolignan, and phenylpropanoid from *Stellaria Dichotoma* L. Var. *Lanceolata* and their antiallergic activities. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 2004; 52: 1194-1199.

Nakano T, Martín A 1976. Studies on the alkaloids of *Palicourea fendleri*. *Planta Medica*, v. 30, p. 186-188.

Negróni P 1966. El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente en el suelo Argentino. *Prensa Med Argent.* 53:2381–2382.

Nemecek JC, Wüthrich M, Klein BS. Global control of dimorphism and virulence in fungi. *Science*, 2006, Apr 28; v,312, p 583-588.

Nunes LR, Costa de Oliveira R, Leite DB, da Silva VS, dos Reis Marques E, da Silva Ferreira ME, Ribeiro DC, de Souza Bernardes LA, Goldman MH, Puccia R, Travassos LR, Batista WL, Nóbrega MP, Nobrega FG, Yang DY, de Bragança Pereira CA, Goldman GH. 2005. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukaryot Cell*, Dec;4(12):2115-28.

Muñoz-Clares, R.A.;Díaz-Sánchez, A.G.; González-Segura, L.; Montiel, C. Kinetic and structural features of betaine aldehyde dehydrogenases: mechanistic and regulatory implications. *Arch Biochem Biophys*, v. 493, n. 1, p. 71-81, 2010.

Nagao, J.; Cho, T.; Uno, J.; Ueno, K.; Imayoshi, R.; Nakayama, H.; Chibana, H.; Kaminishi, H. *Candida albicans* Msi3p, a homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* Sse1p of the Hsp70 family, is involved in cell growth and fluconazole tolerance. *FEMS Yeast Research*. v. 12, n. 6, p. 728-737, 2012.

Niimi, M.; Wada, S.; Tanabe, K.; Kaneko, A.; Takano, Y.; Umeyama, T.; Hanaoka, N.; Uehara, Y.; Lamping, E.; Niimi, K.; Tsao, S.; Holmes, A.R.; Monk, B.C.; Cannon, R.D. Functional analysis of fungal drug efflux transporters by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Jpn J Infect Dis*, v. 58, n. 1, p. 1-7, 2005.

Odds, F.C. 1996. Antifungal therapy, p.35-48. In C. C. Kibbler, D. W. R. Mackenzie, and F. C. Odds (ed.), *Principles and practice of clinical mycology*. John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom.

O'Farrell PH. High two dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, 1975 May 25;250(10):4007-21.

- Pao, S.S.; Paulsen, I.T.; Saier, M.H. Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev*, v. 62, n. 1, p. 1-34, 1998.
- Paniago AMM, Aguiar JIA, Aguiar ES, et al. Paracoccidioidomycose: estudo clínico e epidemiológico de 422 casos observados no Estado de Mato Grosso do Sul. *Ver Soc Bras Med Trop*. 2003;36:455-9.
- Pandey, A.; Yoon, H.; Lyver, E.R.; Dancis, A.; Pain, D. Isd11p protein activates the mitochondrial cysteine desulfurase Nfs1p protein. *J Biol Chem*, v. 286, n. 44, p. 38242-38252, 2011.
- Pastorian K, Havell III L, Byus CV 2000. Optimization of cDNA Representational Difference Analysis for the identification of differentially expressed mRNAs. *Anal Biochem*. 283:89-98
- Pelletier SW. Alkaloids, chemical and biological, perspectives. Nove Iorque: John Wiley And Sons, 1983
- In: Bhat, S V, Nagasampagi, BA, Sivakumar M. Chemistry of Natural Products. 4ª Ed. Nova Delhi: Narosa Publishing House 2007; P. 237.
- Peterson SW, Singler L 1998. Molecular genetic variation in *Emmonsia crescens* and *Emmonsia parva*, ethiologic agents of adiaspiromycosis, and their phylogenetic relationship to *Blastomyces dermatitidis* (*Ajellomyces dermatitidis*) and other systemic fungal pathogens. *J Clin Microbiol* 36: 2918-2925.
- Pitarch A, Sánchez M, Nombela C, Gil C. 2003. Analysis of the *Cândida albicans* proteome. I. Strategies and applications. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. Apr 5;787(1):101-28.
- Pontes FSC, Pontes HAR, Moreira CR, et al. Paracoccidioidomycose: aspectos gerais e relato de caso. *Rev Bras Cirurg Implant*. 2000;7:74-7.
- Portela, P.; Howell, S.; Moreno, S.; Rossi, S. In vivo and in vitro phosphorylation of two isoforms of yeast pyruvate kinase by protein kinase A. *J Biol Chem*, v. 277, n. 34, p. 30477- 30487, 2002.
- Rappleye, C. A., Goldman, W. E., 2006. Defining virulence genes in the dimorphic fungi. *Annu Rev Microbiol* 60: 281-303.
- Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA 1984. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect. Immun*. 46: 346-53.
- Restrepo A 2000. Morphological aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* in lymph nodes: implications for the prolonged latency of paracoccidioidomycosis? *Med Mycol*, Aug;38(4):317-22.
- Restrepo A, Tobón A. (2005). *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dollin R (Eds), Principles and Practice of Infectious Diseases, p. 3062-3068.
- Restrepo, A., 1985. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia* 23(5): 323-334.
- Ricci G, Mota FT, Wakamatsu A, Serafim RC, Borra RC, Franco M 2004. Canine paracoccidioidomycosis. *Med Mycol* 42: 379-383.
- Richini-Pereira VB, Bosco SDE M, Griesse J, Theodoro RC, Macoris SA, Da Silva RJ, Barrozo L, Tavares PM, Zancopé-Oliveira RM, Bagagli E. 2008. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. *Med Mycol*. 46: 35-40.
- Richter, K.; Haslbeck, M.; Buchner, J. The heat shock response: life on the verge of death. *Molecular Cell*. v. 40, p. 253-266, 2010.
- San-Blas, G and Niño-Veja, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. In Fungal Pathogenesis: Principles and Clinical Applications, Cihlar, RL and Calderone, R,A, (eds), New York, N,Y,: Marcel Dekker Inc, 2001, pp, 205-226.

San-Blas G, Niño-Vega G, Iturriaga T 2002. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: Molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol*. 40:225 – 242.

San-Blas G, Niño-Vega G, Morphogenesis in other agents of systemic mycoses. In: San-Blas G, Calderone RA (eds), *Pathogenic Fungi: Structural Biology and Taxonomy*, Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, 2004 pp, 167–220.

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

Sano A, Nishimura K, Miyaji M. The Research Encouragement Award, Effects of sex hormones on sexual difference of experimental paracoccidioidomycosis. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*, 1999; 40(1):1-8.

Sanglard, D. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Current Opinion Microbiology*, v. 5, n. 4, p. 379-385, 2002.

Sorger, D.;Daum, G. Synthesis of triacylglycerols by the acyl-coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase Dga1p in lipid particles of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, v. 184, n. 2, p. 519-524, 2002.

Shankar, J., Restrepo, A., Clemons, K. V., Stevens, D. A., 2011. Hormones and the resistance of women to paracoccidioidomycosis. *Clin Microbiol Rev* 24(2): 296-313

Shalon D, Smith SJ, Brown PO. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res*. 1996 Jul;6(7):639-45.

Shikanai-Yasuda MA, Queiroz-Telles F, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML 2006. Consenso em Paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 39(3):297-310.

Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNAmicroarray. *Science*. 1995 Oct 20;270(5235):467-70.

Sposto MR, Scully C, Almeida OP, et al. Oral paracoccidioidomycosis: a study of 36 south american patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1993;75:461-5.

Tavares AH, Silva SS, Dantas A, Campos EG, Andrade RV, Maranhão AQ, Brígido MM, Passos-Silva DG, Fachin AL, Teixeira SM, Passos GA, Soares CM, Bocca AL, Carvalho MJ, Silva-Pereira I, Felipe MS 2007. Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages. *Microbes Infect*. 5:583-90.

Takahashi, M.;Yamashita, K.;Shiawa, A.;Ichiishi, A.;Fukumori, F.;Fujimura, M. An AP-1-like transcription factor, NAP-1, regulates expression of the glutathione S-transferase and NADH: flavinoxidoreductase genes in *Neurospora crassa*. *Biosci Biotechnol Biochem*, v. 74, n. 4, p. 746-752, 2010.

Takeshita, N.; Ohta, A.; Horuuchi, H. CsmA, a class V chitin synthase with a myosin motor-like domain, is localized through direct interaction with the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell*, v. 16, n. 4, p. 1961-1970, 2005.

Teixeira MM, Theodoro RC, Carvalho MJA, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, Mendonza L, Bagagli E, San-Blas G, Felipe MSS 2009. Phylogenetics analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol* 52: 273-283.

Terçarioli, G. R., Bagagli, E., Reis, G. M., Theodoro, R. C., Bosco, S. M., Macoris, S. A., Richini-Pereira, V. B., 2007. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. *BMC Microbiol* 22: 7:92.

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

Travassos LR, Taborda CP, Colombo AL 2008. Treatment options for paracoccidioidomycosis and new strategies investigated. Expert review of anti-infective therapy. 6:251-262.

Urano, K.;Daimon, T.; Banno, Y.; Mita, K.; Terada, T.;Shimizu, K.;Katsuma, S.;Shimada, T. Molecular defect of isovaleryl-CoA dehydrogenase in the skunk mutant of silkworm, *Bombyx mori*.FEBS J, v. 277, n. 21, p. 4452-4463, 2010.

Westermeier R, Loyland S and Asbury R. Proteomics Technology. Journal of Clinical Ligand Assay. Volume 25, number 3, fall 2002.

Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. Biotechnol Genet Eng Rev, 1996;13:19-50.

Wu XW, Lee CC, Muzny DM, Caskey CT 1989. Urate oxidase: primary structure and evolutionary implications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:9412–9416.

Yu, L., Zhang, W., Wang, L., Yang, J, Liu, T., Peng, J., Leng, W., Chen, L., Li, R., Jin, Q. 2007. Transcriptional profiles of the response to ketoconazole and amphotericin B in *Trichophyton rubrum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51:144-153.

Valle ACF, Costa RLB. Paracoccidioidomicose. In: Batista RS, Igreja RP, Gomes AD, Huggins DW. Medicina Tropical: abordagem atual das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 2001.p. 943-58.

Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. Science. 1995 Oct 20;270(5235):484-7.

Venter JC, Adams, MD, Myers, EW, et al: The human genome. Science 2001; 291:1304–1351

Villar LA, Salazar ME, Restrepo A. Morphological study of a variant of *Paracoccidioides brasiliensis* that exists in the yeast form at room temperature. J Med Vet Mycol, 1988;26 (5):269-76.

Viscoli, C., Girmenia, C., Marinus, A., Collet, L., Martino, P., Vandercam, B., Doyen, C., Lebeau, B., Spence, D., Kremery, V., De Pauw, B. and Meunier, F. 1999 Candidemia in cancer patients: a prospective, multicenter surveillance study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Clinical. Infectious. Diseases*. 28:1071-1079.

Zhang, L., Zhang, Y., Zhou, Y., An, S., Zhou, Y., Cheng, J. 2002a Response of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* to amphotericin B and nystatin measured by microarrays. *Journal Antimicrobial. Chemotherapy*. 49:905-915.

Zhang, L., Zhang, Y., Zhou, Y., Zhao, Y., Zhou, Y., Cheng, J. 2002b Expression profiling of the response of *Saccharomyces cerevisiae* to 5-fluorocytosine using a DNA microarray. *International journal of antimicrobial agents*. 20:444-450.

ANEXOS

Anexo 1 – Artigo publicado na revista *BMC Microbiology* período do Doutorado

BMC Microbiology



Research article

Open Access

The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a linked surface protein that behaves as an anchorless adhesin

Benedito Rodrigues da Silva Neto¹, Julhiany de Fátima da Silva², Maria José Soares Mendes-Giannini², Henrique Leonel Lenzi³, Célia Maria de Almeida Soares¹ and Maristela Pereira^{*1}

Address: ¹Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, C.P. 131, 74001-970, Goiânia, GO, Brazil, ²Laboratório de Micologia Clínica, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, SP, Brazil and ³Laboratório de Patologia, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Email: Benedito Rodrigues da Silva Neto - bio.neto@gmail.com; Julhiany de Fátima da Silva - julhiany.silva@gmail.com; Maria José Soares Mendes-Giannini - gianninimj@gmail.com; Henrique Leonel Lenzi - henrique.lenzi@gmail.com; Célia Maria de Almeida Soares - celia@icb.ufg.br; Maristela Pereira* - mani@icb.ufg.br

* Corresponding author

Published: 24 December 2009

Received: 31 July 2009

BMC Microbiology 2009, **9**:272 doi:10.1186/1471-2180-9-272

Accepted: 24 December 2009

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/9/272>

© 2009 da Silva Neto et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: The pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* is the agent of paracoccidioidomycosis (PCM). This is a pulmonary mycosis acquired by inhalation of fungal airborne propagules that can disseminate to several organs and tissues leading to a severe form of the disease. Adhesion and invasion to host cells are essential steps involved in the internalization and dissemination of pathogens. Inside the host, *P. brasiliensis* may use the glyoxylate cycle for intracellular survival.

Results: Here, we provide evidence that the malate synthase of *P. brasiliensis* (PbMLS) is located on the fungal cell surface, and is secreted. PbMLS was overexpressed in *Escherichia coli*, and polyclonal antibody was obtained against this protein. By using Confocal Laser Scanning Microscopy, PbMLS was detected in the cytoplasm and in the cell wall of the mother, but mainly of budding cells of the *P. brasiliensis* yeast phase. PbMLSr and its respective polyclonal antibody produced against this protein inhibited the interaction of *P. brasiliensis* with *in vitro* cultured epithelial cells A549.

Conclusion: These observations indicated that cell wall-associated PbMLS could be mediating the binding of fungal cells to the host, thus contributing to the adhesion of fungus to host tissues and to the dissemination of infection, behaving as an anchorless adhesin.

Background

Paracoccidioidomycosis (PCM), the most important systemic mycosis in Latin America, is a chronic granulomatous disease that affects about 10 million people.

Paracoccidioides brasiliensis, a thermally dimorphic fungus pathogen, is the pulmonary infective agent [1,2]. This initial interaction appears to govern the subsequent mechanisms of innate and acquire immunity, which result in localized infection or overt disease [3].

Anexo 2 – Artigo publicado na revista *BMC Microbiology*

de Oliveira et al. *BMC Microbiology* 2013, **13**:107
<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/13/107>



RESEARCH ARTICLE

Open Access

Intermolecular interactions of the malate synthase of *Paracoccidioides* spp

Karine Martins de Oliveira¹, Benedito Rodrigues da Silva Neto¹, Juliana Alves Parente¹, Roosevelt Alves da Silva², Guilherme Oliveira Quintino², Aline Raquel Voltan³, Maria José Soares Mendes-Giannini³, Célia Maria de Almeida Soares¹ and Maristela Pereira^{1*}

Abstract

Background: The fungus *Paracoccidioides* spp is the agent of paracoccidioidomycosis (PCM), a pulmonary mycosis acquired by the inhalation of fungal propagules. *Paracoccidioides* malate synthase (PbMLS) is important in the infectious process of *Paracoccidioides* spp because the transcript is up-regulated during the transition from mycelium to yeast and in yeast cells during phagocytosis by murine macrophages. In addition, PbMLS acts as an adhesin in *Paracoccidioides* spp. The evidence for the multifunctionality of PbMLS indicates that it could interact with other proteins from the fungus and host. The objective of this study was to identify and analyze proteins that possibly bind to PbMLS (PbMLS-interacting proteins) because protein interactions are intrinsic to cell processes, and it might be possible to infer the function of a protein through the identification of its ligands.

Results: The search for interactions was performed using an *in vivo* assay with a two-hybrid library constructed in *S. cerevisiae*; the transcripts were sequenced and identified. In addition, an *in vitro* assay using pull-down GST methodology with different protein extracts (yeast, mycelium, yeast-secreted proteins and macrophage) was performed, and the resulting interactions were identified by mass spectrometry (MS). Some of the protein interactions were confirmed by Far-Western blotting using specific antibodies, and the interaction of PbMLS with macrophages was validated by indirect immunofluorescence and confocal microscopy. *In silico* analysis using molecular modeling, dynamics and docking identified the amino acids that were involved in the interactions between PbMLS and PbMLS-interacting proteins. Finally, the interactions were visualized graphically using Osprey software.

Conclusion: These observations indicate that PbMLS interacts with proteins that are in different functional categories, such as cellular transport, protein biosynthesis, modification and degradation of proteins and signal transduction. These data suggest that PbMLS could play different roles in the fungal cell.

Keywords: *Paracoccidioides* spp, Malate synthase, Protein-protein interactions

Background

In vivo, the *Paracoccidioides* spp transition from mycelium to yeast cells is governed by an increase in temperature that occurs upon contact of the mycelia or conidia with the host. The fungus, a complex of several phylogenetic species, causes paracoccidioidomycosis (PCM), a human systemic mycosis. The infection begins with the inhalation of fungal propagules, which reach the epithelium of the alveoli, where the mycelium differentiates to the yeast pathogenic

form [1]. Although most clinical forms of the disease are asymptomatic, severe and progressive infections involving pulmonary and extra-pulmonary tissues occur [2]. A high percentage (80%) of cases of the disease is reported in Brazil, where PCM is the leading cause of death among the systemic mycoses. PCM is the eighth-leading cause of mortality among infectious and parasitic diseases, which establishes it as a serious public health problem [3-5].

Paracoccidioides malate synthase (PbMLS) appears to be important to the infectious process of *Paracoccidioides* spp because the transcript is up-regulated during the transition from mycelium to yeast, during the infectious phase [6], and in yeast cells during phagocytosis by murine

* Correspondence: maristelaufg@gmail.com

¹Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



Anexo 3 – Coorientação de monografia realizada no período do doutorado

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NAYCHE SANTIAGO PACHECO DE SANTANA

CONFIRMAÇÃO DA ALTERAÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA DE *Paracoccidioides* ISOLADO Pb01- like EM EXPOSIÇÃO À ITRACONAZOL

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Biomedicina do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Área de concentração: Biologia Molecular

Orientadora: Prof^a Dr^a Maristela Pereira

Coorientador: Msc. Benedito Rodrigues da Silva Neto

Goiânia

2013

Anexo 4 – Análises Proteômicas

Apresentaremos agora os resultados proteômicos obtidos até o presente momento nas condições tratado e controle diante do antifúngico anfotericina B.

Os extratos protéicos nas condições estudadas foram obtidos seguindo um procedimento já estabelecido (Fonseca *et al.*, 2001). O tempo determinado para incubação com o antifúngico foi determinado por PCR em tempo real, 6 horas para itraconazol e 4 horas para anfotericina B, utilizando-se genes já descritos expressos nas mesmas condições em outros fungos (De Backe *et al.*, 2001; Diao *et al.*, 2009).

As condições para eletroforese bidimensional (2-DE) das proteínas do fungo *Paracoccidioides* foram padronizados para a faixa de pH de 3-11 não linear. Os géis foram realizados com amostras preparadas em diferentes condições como o uso do reagente Clean-up (GE Healthcare) para eliminar interferentes que pudessem prejudicar a focalização isoelétrica das proteínas. Através da coloração com *Comassie blue* foi possível a resolução e detecção de cerca de 944 *spots* de proteínas com massas moleculares de 11 a 127 kDa e pI de 3,3 a 11 para a condição determinada. O perfil protéico tratado com anfotericina B apresentou uma média de 481 *spots*. Os perfis protéicos foram reprodutíveis considerando-se as replicatas técnicas e as amostras biológicas. Para se avaliar os níveis de expressão das proteínas do fungo *Paracoccidioides*, a intensidade de coloração dos *spots* nas condições específicas foi comparada através do software Image Master Platinum 6.0 (GE Healthcare). Inicialmente, foi realizado o pareamento entre as triplicatas das amostras de controle; em seguida o mesmo procedimento foi realizado para o tratamento com cada antifúngico. Logo após, pareou-se o gel mais representativo (*master*) da forma controle com o *master* da forma tratada com o antifúngico itraconazol anfotericina B. Foi gerada então, uma lista dos *spots* contendo dados como volume, volume normalizado (% de cada *spot*) e valores experimentais de massas moleculares da segunda dimensão e pI da primeira dimensão de todos os *spots*. Para comparar as diferenças na expressão das proteínas entre as condições analisadas, os *spots* que parearam entre as três condições foram analisados estatisticamente pelo teste de ANOVA ($p < 0,05$). As análises revelaram que 78 *spots* de proteínas foram diferencialmente expressos no tratamento com anfotericina B. A Figura 3 (A e B) apresenta um gel bidimensional (*master*) da condição realizada.

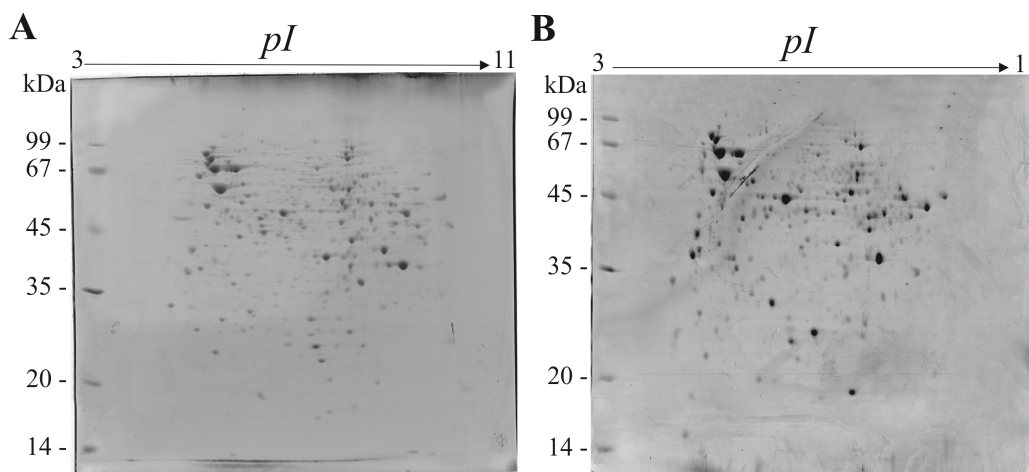


Figura 3 – Perfil de proteínas de *Paracoccidioides* identificadas por espectrometria de massa. Imagem 2-DE referente à controle (A) e tratado com anfotericina B (B). O gradiente de pH está marcado acima do gel e a massas moleculares do padrão (kDa) estão indicadas à esquerda dos géis.

Os *spots* de proteínas obtidos dos géis 2-D foram retirados, digeridos com tripsina e os peptídeos foram analisados por PMF e/ou MS/MS. A Tabela 1 mostra a relação de todas as proteínas identificadas até o momento, obtidas por meio de modo de operação refletido e LIFT (manual e automático) e as análises de PMF e MS/MS feitas por sequenciamento *De novo* utilizando o programa PepSeq. Nas tabelas também encontramos o como o *pI* e a massa molecular teóricos e experimentais de cada *spot*, o número de peptídeos encontrados, a porcentagem de cobertura de sequência em relação à sequência total e os peptídeos confirmados por MS/MS. Todas as proteínas identificadas foram pesquisadas no banco do NCBI^{nr} com restrição para Fungos. Cada peptídeo apresentado na Tabela obteve um *score* acima do valor aceitável, indicando identidade confiável ($p < 0,05$). Foram identificadas e sequenciadas, na condição tratada com anfotericina B, 29 proteínas por MS/MS, dentre elas HSPs envolvidas nos processos de defesa celular e virulência, síntese e endereçamento de proteínas, ciclo celular, via glicolítica, ciclo do ácido cítrico, transporte celular, metabolismo de lipídios e síntese e endereçamento de proteínas, corroborando os dados da literatura da ação de amplo espectro deste fármaco.

Tabela 01: *Paracoccidioides* identified proteins with differential expression during exposition to amphotericin B.

Gene Bank – NCBI reference/Protein description ^b	MS/MS		Exp/ pI ^g	Exp/ MW ^h
	Score	Matched peptides ^g		
XP_002794019.1/Nucleoside diphosphate	112	6	8.32	678032
XP_002790476.1/Heat shock protein SSB1	143	4	9.75	234743
XP_002796904.1/Proteasome component	135	3	6.51	367498
XP_002796993.1/Proteasome component C1	201	5	5.38	37845.82
XP_002795393.1/ Phosphoglycerate kinase	160	9	5.97	43404
XP_002797404.1/Hsp70-like protein	174	7	5.77	68784.13
XP_002796914.1/ DNA damage checkpoint	189	3	4.74	32333.87
XP_002796107.1/ Fructose-bisphosphate	129	6	6.89	40325
XP_002793322.1/ Osmotic growth protein	150	7	6.90	67912.01
XP_002789587.1/ Serine	187	4	6.39	422384
XP_002796872.1/ Bifunctional purine biosynthesis protein ADE17	105	8	5.47	422855
XP_002795188.1/ 3-ketoacyl-CoA thiolase	176	4	8.65	43441.12
XP_002792358.1/ Endoplasmic reticulum and nuclear membrane protein Npl4	144	8	6.64	99190.98
XP_002793533.1/ Spermidine synthase	188	7	6.23	32640.32
XP_002791570.1/ Enoyl-CoA hydratase	79	5	8.62	72146
XP_002797514.1/ Malate dehydrogenase	144	3	7.99	34635.01
XP_002795760.1/ Ran-specific GTPase-	193	6	6.81	25932
XP_002789992.1/ Heat shock protein	110	3	5.51	48432
XP_002789119.1/ Tropomyosin-1	165	9	6.45	613594
XP_002788998.1/ ATP	128	6	8.87	26277
XP_002795658.1/ Thioredoxin	146	5	4.80	234389
EEH47729.1/ Hexokinase	134	7	4.89	47471.76
XP_002789006.1/ TCTP family protein	198	6	4.75	20183.65
XP_002797866.1/ General alpha-glucoside	206	1	5.58	70340.27
XP_002794041.1/ Fatty acid transporter	162	9	5.47	71527.38
XP_002796912.1/ Enolase	138	3	6.27	63468
XP_002791305.1/ Conserved hypothetical	172	2	6.36	32909.65
XP_002795966.1/Hypothetical protein	153	2	4.82	13997.74

**Spots visualized only in exposition amphotericin B condition;

^bAccession number/Protein description – accession number of matched protein from GenBank general information identifier;

^gExpt/ pI – experimental/isoelectric point;

^hExpt/MW (kDa) – experimental/molecular weigh;

Anexo 5 – Patente para utilização de compostos alcalóides como inibidores da MLS no tratamento de micoses

“UTILIZAÇÃO DE COMPOSTOS ALCALÓIDES COMO INIBIDORES DA MALATO SINTASE NO TRATAMENTO DE MICOSSES”, descreve a aplicação de alcalóides como candidatos a protótipo de fármaco que possa atuar diretamente sobre a enzima malato sintase (MLS), uma das enzimas chave do ciclo do glioxalato, presente em patógenos causadores de enfermidades em vertebrados, os quais por sua vez, não possuem a referida enzima. O modelo foi proposto baseado em estudos *in vivo* com células leveduriformes de *Paracoccidioides* e *in vitro* com a enzima MLS recombinante (PbMLSr), visando propor um novo candidato a antifúngico para o tratamento alternativo da paracoccidioidomicose (PCM), bem como outras infecções fúngicas.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção relata a indicação de compostos alcalóides a protótipo de fármaco, visando o desenho racional de antifúngicos para atuar diretamente sobre enzima MLS, uma das enzimas chave do ciclo do glioxalato, via fundamental para a sobrevivência de microorganismos patogênicos no interior de hospedeiros. Para tal, foram realizados testes de atividade enzimática de PbMLSr, bem como a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) sobre células leveduriformes de *Paracoccidioides*.

BACKGROUND DA INVENÇÃO E ESTADO DA TÉCNICA

O fungo *Paracoccidioides* é o causador da PCM, uma micose humana sistêmica granulomatosa, enfermidade de alta prevalência e morbidade, inicialmente descrita por Adolpho Lutz (LUTZ, 1908). O fungo infecta o hospedeiro humano usualmente através das vias respiratórias, por inalação de conídios da fase de micélio a 23°C, diferenciando-se para a fase de levedura a 36°C, resultando na formação de um foco inflamatório nos pulmões do hospedeiro (BRUMMER, *et al.*, 1993; RESTREPO *et al.*, 1985), de onde pode disseminar-se por vias hematogênica ou linfática, acometendo outros órgãos e sistemas como fígado, baço, ossos e sistema nervoso central (VALERA *et al.*, 2008; CAMARGO & FRANCO, 2000; SAN-BLAS, 1993). O contato inicial do hospedeiro

com o fungo aparentemente evolui para uma infecção subclínica ou assintomática. Quando há progresso da infecção ocorre o estabelecimento da doença em uma das duas formas clínicas conhecidas, a forma aguda ou tipo juvenil e a forma crônica ou adulta (FRANCO *et al.*, 1987).

Independentemente do órgão afetado, a PCM é usualmente associada à formação de fibrose que, na maioria das vezes, interfere permanentemente na qualidade de vida das pessoas afetadas (TÓBON *et al.*, 2003). Em estudo de revisão realizado por Prado *et al.* (2009), entre 1996 a 2006, um total de 3.583 pessoas morreram acometidas por micoses sistêmicas, sendo a PCM responsável por 53,9% destas mortes, posicionando-se como a nona causa de morte entre as doenças parasitárias no país e a primeira causa de morte entre as micoses humanas sistêmicas.

A PCM é tratada com dosagens agressivas de antifúngicos, mas como em outras infecções fúngicas, o tratamento é um processo lento, podendo se estender por meses ou anos (HANH *et al.*, 2003; MENDES *et al.*, 1994). Em consequência disso, o tratamento tem como característica efeitos colaterais adversos e a incerteza da cura efetiva (KAREN *et al.*, 2004). As medicações disponíveis atualmente podem ser administradas via oral, intravenosa e intramuscular (MENDES *et al.*, 1994). A sulfonamida foi a primeira droga empregada no tratamento da PCM na década de 40 (DEL NEGRO, 1985), agindo de maneira competitiva com o ácido para-aminobenzóico (PABA), impedindo a utilização deste para a síntese do ácido fólico (PETRI, 2001). Posteriormente, foram utilizados os polienos, com destaque para a anfotericina B, a qual foi eficiente no tratamento de infecções viscerais e de infecções fúngicas invasivas em pacientes imunocomprometidos (ODDS *et al.*, 2003). A anfotericina B atua ligando-se ao ergosterol presente na membrana do fungo prejudicando as funções de membrana do mesmo (BENNET, 2001). Os azoles, também muito utilizados, atuam inibindo a ação da enzima esterol 14- α -dimetilase fazendo com que ocorra uma diminuição da biossíntese do ergosterol situado na membrana plasmática do fungo (ESPINEL-INGROF, 2001; HAHN & HANDAM, 2000; SHEEHAN, 1999).

Estudos *in vivo* mostraram a resistência de *Paracoccidioides* às sulfonamidas, azoles e anfotericina B (LACAZ *et al.*, 1959; RESTREPO & TABARES, 1984). A resistência a cetoconazol e trimetropim-sulfametoxazol também foi descrita em isolados de pacientes que apresentavam falhas ao tratamento com combinação de drogas (YASUDA, 2005).

O único antimetabólito administrado como antifúngico é o 5-fluorocitosina (5-FC), uma pirimidina sintética que interfere tanto no metabolismo das pirimidinas como na síntese de RNA, DNA e proteína de células fúngicas (KRCMERY, 2005). A nova geração de agentes antifúngicos da classe das equinocandinas, que compreende a caspofungina, micafungina e anidulafungina, inibem a síntese do polímero de 1,3- β -glucana de fungos, resultando na produção de uma parede celular osmoticamente instável e estruturalmente comprometida (KLEPSER, 2003). Entretanto, apresentam um limitado espectro de atividade para *Paracoccidioides* (NAKAI *et al.*, 2003).

Vários problemas relacionados aos antifúngicos existentes têm sido evidenciados, principalmente em relação à toxicidade dos mesmos (AGARWAL & SINGH, 2006; KLEINBERG, 2006; LEMKE *et al.*, 2005; FUKUI *et al.*, 2003; ZEICHNER *et al.*, 2003; RUHNKE *et al.*, 1994; GALLIS *et al.*, 1990). Apesar da existência de potentes agentes antifúngicos, isolados resistentes ou multi-resistentes continuam surgindo (HANH *et al.*, 2003; KOHLI *et al.*, 2002; ONYEWU *et al.*, 2003).

Assim, torna-se necessária a busca permanente por novos candidatos a antifúngicos utilizando-se vias específicas presentes no patógeno e ausentes no hospedeiro, com o intuito de obter compostos menos tóxicos ao paciente. Nesse sentido, o ciclo do glioxalato adquire relevância. Sabe-se que devido à existência desta via, que permite a biogênese de carboidratos a partir de compostos de dois carbonos (KORNBERG, 1966), a grande maioria dos microorganismos é capaz de crescer em fontes de carbono não fermentáveis tais como acetato, etanol ou ácidos graxos (KUNZE *et al.*, 2002). Das enzimas envolvidas no ciclo do glioxalato, duas delas, isocitrato liase (ICL) e MLS são consideradas enzimas-chave (KORNBERG & BEEVERS, 1957). Essas enzimas são supra-reguladas sob condições de baixa concentração de glicose e de tensão de oxigênio, na presença de acetato, etanol e alta temperatura, bem como durante crescimento intracelular (COSTA *et al.*, 2007; EBEL *et al.*, 2006; RUDE *et al.*, 2002; MCKINNEY *et al.*, 2000; BENTRUP *et al.*, 1999; FERNANDES *et al.*, 1993).

Vários estudos sugerem que ICL e MLS sejam fatores de virulência de microorganismos patogênicos como *Mycobacterium tuberculosis* (EBEL *et al.*, 2006), *Candida albicans*, *Magnaporthe grisea* e *Leptosphaera maculans* (SOLOMON *et al.*, 2004; IDNURM & HOWLETT, 2002; LORENZ & FINK, 2001). Em *C. albicans* e *S. cerevisiae*, sob fagocitose, a maioria das enzimas do ciclo do glioxalato são induzidas permitindo que esses microorganismos sejam capazes de sobreviver dentro de

macrófagos, ambiente caracterizado por ser pobre em carboidratos e rico em lipídios (LORENZ & FINK, 2002).

Em *Paracoccidioides*, os níveis dos transcritos de *PbICL* e *PbMLS* são alterados durante a transição de micélio para levedura (BASTOS *et al.*, 2007; GOLDMAN *et al.*, 2003), sugerindo que essas enzimas atuem nesse processo. O gene que codifica para *ICL* é super expresso na fase leveduriforme quando comparado com a fase miceliana (FELIPE *et al.*, 2005), bem como em células do fígado de camundongos retiradas após infecção com *Paracoccidioides*. Os altos níveis de *PbICL* encontrados sugerem a importância dessa enzima para o fungo durante o processo de infecção (COSTA *et al.*, 2007). *PbMLS* está localizada no citoplasma, na superfície celular, principalmente em células com brotamento, é secretada, e está envolvida na interação de *Paracoccidioides* com células epiteliais A549 (NETO *et al.*, 2009). *PbMLS* é regulada por fontes de carbono e nitrogênio, atuando no ciclo do glioxalato e na via de degradação da alantoina (ZAMBUZZI-CARVALHO *et al.*, 2009).

OLIVEIRA e colaboradores (2013) identificaram e analisaram as possíveis interações de proteínas-MLS de *Paracoccidioides* (*PbMLS*). A busca de interações foi realizada por ensaio *in vivo* utilizando uma biblioteca de duplo-híbrido construída em *Saccharomyces cerevisiae*, cujos transcritos foram sequenciados e identificados. Além disso, foi realizado ensaio *in vitro* usando metodologia de *pull-down* GST com diferentes extratos protéicos (levedura, micélio, proteínas secretadas e de macrófagos) e as interações resultantes foram identificadas por espectrometria de massas. Algumas interações protéicas foram confirmadas por *Far-Western blot* utilizando anticorpos específicos e a interação de *PbMLS* com macrófagos foi validada por imunofluorescência indireta e microscopia confocal. Análises *in silico* utilizando modelagem molecular, dinâmica e *docking* identificaram os aminoácidos envolvidos nas interações proteínas-*PbMLS*. Por fim, os autores representaram as interações graficamente usando o software Osprey. Os resultados deste trabalho indicaram que *PbMLS* interage com proteínas de diferentes categorias funcionais, tais como transporte celular, síntese protéica, modificação e degradação de proteínas e transdução de sinal.

Dessa forma, estudos na busca de inibidores para essas enzimas se fazem necessários visando o combate à PCM e outras infecções causadas por microorganismos ou parasitas.

Os produtos naturais representam a maior fonte de fármacos e de modelos para alvos sintéticos da história da humanidade. No tratamento quimioterápico, 74% das

drogas são produtos naturais ou derivados (TAN *et al.*, 2006). Sabe-se que o gênero *Hyptis* é uma fonte de constituintes bioativos com importantes propriedades biológicas, tais como atividades antimicrobianas, citotóxicas e inseticidas (OLIVEIRA *et al.*, 2004; PORTER *et al.*, 1995). Plantas desse gênero são utilizadas popularmente no tratamento de infecções gastrointestinais, cólicas, dores, infecções cutâneas e reumatismo (FÁTIMA *et al.*, 2004), além de serem considerados potentes agentes anti-inflamatórios e anti-infecciosos, especialmente contra infecções causadas por bactérias (BISPO *et al.*, 2001).

Os alcalóides podem ser encontrados predominantemente em angiospermas, principalmente nas famílias Apocynaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae, Rubiaceae, Solanaceae e Berberidaceae. São compostos nitrogenados que podem ser definidos como uma substância orgânica cíclica contendo um nitrogênio em um estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos, englobando a maioria dos compostos considerados como alcalóides (Pelletier, 1983 apud Bhat *et al.*, 2007).

O gênero *Palicourea* (Rubiaceae) compreende cerca de 230 espécies entre arbustos e pequenas árvores distribuídas, principalmente, nas regiões tropicais. Apesar de incluir plantas tóxicas para bovinos, tem sido usado na medicina tradicional para tratamento de infecções fúngicas, tosse, dores de estômago (El-Seed, 1999) e como agente antitumor (Hartwell, 1972). A família Rubiaceae produz alcalóides pertencentes a mais de dez classes diferentes, onde se destacam: os isoquinolínicos, com 44 substâncias elucidadas; os quinolínicos com 70 alcalóides; e os indólicos, com 391 compostos isolados (Cordell *et al.*, 2001).

Quimicamente esse gênero caracteriza-se por biossintetizar alcalóides indólicos contendo uma unidade secologanínica, classe de substâncias extremamente importante do ponto de vista biológico (Dusman *et al.*, 2004). Adicionalmente, tem se observado na literatura, o relato da presença de alcalóides pirrolindólicos (Nakano e Martín, 1976), terpenóides, cumarinas e compostos fenólicos (El-Seed, 1999).

Os alcalóides apresentam uma ampla bioatividade, tais como: efeitos antiespasmódicos, antitumorais, antialérgicos, estimulantes do Sistema Nervoso Central, analgésicos, controle da pressão sanguínea, entre outros (Gudi *et al.*, 1990). Muitos alcalóides apresentam efeitos farmacológicos em mamíferos e outros organismos e, com isso, constituem importantes agentes terapêuticos e/ou medicinais. Alguns exemplos mais comuns são cafeína, cocaína, nicotina, estricnina e morfina (Gudi *et al.*, 1990; Morikawa *et al.*, 2004).

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

Alcalóides são uma classe de compostos obtidos a partir de produtos naturais. Devido sua atividade antifúngica já descrita, testamos vários alcalóides carbolínicos isolados de espécies de *Rubiaceae* com o objetivo de encontrar compostos com potencial para inibir *Paracoccidioides spp* e *PbMLS*. Aqui, nós descrevemos compostos candidatos a inibidores de *PbMLS* obtidos por meio de triagem virtual usando AutoDockVina, onde um total de 89.415 compostos foram rastreados considerando o critério de afinidade e eficiência. Os aminoácidos envolvidos na ligação com *PbMLS* foram identificados. Dos 14 compostos testados quanto a inibição da atividade enzimática, quatro deles, PP6, RB 16.1, fração contendo Reserpina como composto marjoritário (LKRW R) e GR2 inibiram *PbMLS*. Além disso, os compostos inibiram a adesão do fungo e *PbMLS* aos componentes da matriz extracelular fibronectina, colagénio I e IV.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Procedimentos Experimentais Gerais: os espectros IV foram obtidos com um Perkin Elmer 400 Espectro de FT-IR. ¹H e ¹³C e espectros 2D foram registrados num BrukerAvance II 500. HRMS foram realizadas com um espectrômetro de ToF Água Xevo Q-ToF. A biomassa (galhos, folhas, flores e raízes) de *G. ramosa* foi coletada em novembro de 2006 e identificado por Delprete. O espécime (Delprete 9955) foi depositado na Universidade Federal de Goiás Herbarium.

EXEMPLO 1

Avaliação da capacidade inibitória dos compostos alcalóides sobre células leveduriformes de *Paracoccidioides*

As substâncias puras foram preparadas como descrito. Os inoculos foram preparadas em meio RPMI-1640 (Gibco™) com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio, suplementado com 2% de glicose e tamponado a um pH de 7,0 usando 0,165 M, MOPS (Sigma-Aldrich). A suspensão de células de leveduriformes de *Paracoccidioides*

Pb18 foi ajustada para uma concentração final de 0.5×10^3 a 2.5×10^3 células/mL em meio RPMI-1640. Nas placas de 96 poços, as substâncias foram adicionadas em diluições seriadas, partindo de uma concentração de 250 mg/L a 0,48 mg/L. As placas foram incubadas a 36 ° C a 150 rpm durante 48 h. Após este período, o AlamarBlue ® (Biosource) foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante. O crescimento de *Paracoccidioides* foi avaliado através da leitura da densidade óptica do meio de cultura.

EXEMPLO 2

Avaliação da capacidade inibitória dos compostos alcalóides sobre a proteína recombinante *PbMLSr*

Os ensaios de atividade, foram realizados como descrito por Roucourt *et al.* (2009) com modificações. Resumidamente, foi realizado um ensaio que mede a quantidade de CoA. A quantidade de grupos tiol livres de CoA foi determinada utilizando-se 5, 5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico) ou DTNB (Sigma Aldrich). A absorção a 415 nm foi medida num leitor de microplacas (leitor de microplacas modelo 680, Bio-Rad Laboratories). DTNB foi adicionado a uma concentração final de 2 mM. A reação contém 2 µg *PbMLS*, 100 mM TrisHCl, 5 mM de MgCl₂, 2mM glyoxylate (Sigma-Aldrich), 1 mM de acetil-CoA (APPLICHEM). Ácido pirúvico (controle positivo) e quatorze compostos alcalóides foram adicionados a uma concentração de 40µM, para avaliar o potencial de inibição, respectivamente. As reações foram incubadas durante 30 minutos a pH 7,5. As atividades específicas são dadas como U/mL de proteína.

EXEMPLO 3

Avaliação da capacidade inibitória dos compostos alcalóides sobre a capacidade de adesão da enzima MLS à componentes de matriz extracelular.

Uma vez que *PbMLS* é uma adesina, e se liga a fibronectina, colágeno tipo I e IV, investigamos se PP6, RB16.1, GR2 e LKRW R poderiam impedir a adesão de *PbMLS* aos componentes de matriz extracelular utilizamos *Far-Western blot*, conforme descrito por Neto *et al.*, (2009). *PbMLSr* foi submetido a SDS-PAGE e transferidas para uma

membrana de nylon. Após bloqueados durante 4 h, com 1,5% de BSA em 10 mM de PBS-leite e, em seguida, lavou-se três vezes (durante 10 min de cada vez) em 10 mM de PBS-T, as membranas foram incubadas com fibronectina (20 ug / ml), ou do tipo I e IV collagen (30 ug / ml), diluído em PBS-T, com BSA a 2% durante 90 minutos, e depois lavou-se três vezes (durante 10 min de cada vez) em PBS-T.

Para também validar estes dados utilizamos a metodologia de ELISA conforme descrito por Neto *et al.* (2009). Assim, os componentes de matriz extracelular foram imobilizados na placa, e depois, os compostos e *PbMLS* foram também adicionados. Os controles negativos foram realizados utilizando somente *PbMLSr* ou ECM. Observou-se que PP6, RB16.1, GR2 e LKRW R inibiram as *PbMLS* e *Paracoccidioides Pb18* no processo de adesão à fibronectina, colagénio tipo I e IV. A inibição foi maior para *PbMLS* que a *Paracoccidioides Pb18*.

EXEMPLO 4

Determinação da influência dos compostos alcalóides na inibição da adesão de *MLS* e *Paracoccidioides Pb18* à células A549 e MRC5

A inibição da aderência de *PbMLS* às linhagens de células MRC5 e A549 foi avaliada utilizando IN Cell Analyzer 2000 System light microscopy, como descrito por Mendes-Giannini *et al.* (2004). Resumidamente, a monocamada de células foi lavada com 1 mL de solução de tripsina a 0,2% e 0,02% de Versene (ATV), e em seguida 1 mL de ATV foi adicionado. O volume total da suspensão celular obtida foi transferida para frascos novos para obter as concentrações de células de 10^6 células / mL. Depois de ajustar o volume de células leveduriformes de *Paracoccidioides Pb18* (1×10^6 - 5×10^6 células / mL), a infecção foi iniciada. Todos os núcleos foram marcados com DAPI e filamentos de actina foram revelados com phalloidin-FITC. *Paracoccidioides Pb18 PbMLSr* e foram detectados com um conjugado Alexa 594. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados foram avaliados utilizando ANOVA.

EXEMPLO 5

Avaliação da citotoxicidade de compostos alcalóides nas linhagens celulares A549 e MRC5.

O ensaio foi realizado de acordo com (Mosmann, 1983). A citotoxicidade de compostos alcalóides foi avaliada através da redução do sal bytetrazolium (MTT, 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) para as linhagens de células A549 e MRC5. As células foram cultivadas em meio F12 próprio meio de cultura de DMEM de Ham suplementado com 2 mM de L-glutamina e 5% de soro fetal bovino, e mantidas a 36,5 ° C. Uma concentração que varia de 2,5 a $5,0 \times 10^4$ células/mL foi usada para a formação da monocamada de células. As substâncias puras foram mantidas em contacto com as células durante 24 h. Depois disso, as células tratadas com 5 mg / ml de MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e incubou-se durante 4h. Após a formação dos cristais de formazano, com 100 mL de isopropanol foi adicionado para solubilizar o precipitado e permitir que a leitura do resultado, alterando a cor do meio. A absorbância de formazano foi quantificada utilizando um leitor de ELISA (enzyme-linked immunosorbentassay) em 560 nm.

REIVINDICAÇÕES

1. “UTILIZAÇÃO DOS COMPOSTOS ALCALÓIDES (PP6, RB 16.1, LKRWR e GR2) COMO INIBIDORES DA MALATO SINTASE NO TRATAMENTO DE MICOSES”, **caracterizada por** ser candidato a protótipo de fármaco com base em sua capacidade inibitória sobre MLS recombinante, enzima chave para o estabelecimento de processos infecciosos, presente em microorganismos patogênicos, ausente em seres humanos.
2. “UTILIZAÇÃO DOS COMPOSTOS ALCALÓIDES (PP6, RB 16.1, LKRWR e GR2) COMO INIBIDORES DA MALATO SINTASE NO TRATAMENTO DE MICOSES”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** atuar em via própria de microorganismos patogênicos, podendo reduzir, deste modo, os efeitos colaterais causados por antifúngicos existentes.
3. “UTILIZAÇÃO DOS COMPOSTOS ALCALÓIDES (PP6, RB 16.1, LKRWR e GR2) COMO INIBIDORES DA MALATO SINTASE NO TRATAMENTO DE MICOSES”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** apresentar resultados positivos na inibição do crescimento de *Paracoccidioides*, podendo ser estendida para a inibição do crescimento de outros fungos patogênicos.
4. “UTILIZAÇÃO DOS COMPOSTOS ALCALÓIDES (PP6, RB 16.1, LKRWR e

GR2) COMO INIBIDORES DA MALATO SINTASE NO TRATAMENTO DE MICOSES”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** apresentar estrutura molecular simples, lipofílica e de baixa complexidade estrutural, o que facilita a manipulação da mesma na busca por antifúngico ideal.