UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

Inibição da Isocitrato Liase de *Paracoccidioides brasiliensis* Pelo Produto Natural Argentilactona

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Candidata: *Renata Silva do Prado*
Orientadora: *Profa. Dra. Maristela Pereira*

Goiânia-GO
Novembro/2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

Inibição da Isocitrato Liase de *Paracoccidioides brasiliensis* Pelo Produto Natural Argentilactona

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia.

Candidata: *Renata Silva do Prado*
Orientadora: *Profa. Dra. Maristela Pereira*

Goiânia-GO
Novembro/2009

sistema de bibliotecas ufg

UFG

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, por meio 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: **[x] Dissertação** **[ ] Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	RENATA SILVA DO PRADO				
E-mail:	renata.ufg@hotmail.com				
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	[x]Sim	[ ] Não			
Vínculo empregatício do autor		MESTRANDO			
Agência de fomento:		CAPES		Sigla:	
País:	Brasil	UF: GO	CNPJ:		
Título:	INIBIÇAO DA ISOCITRATO LIASE DE *Paracoccidioides brasiliensis* PELO PRODUTO NATURAL ARGENTILACTONA				
Palavras-chave:	ISOCITRATO LIASE, *Paracoccidioides brasiliensis*, INIBIÇÃO, *Hyptis ovalifolia*.				
Título em outra língua:	INHIBITION OF *Paracoccidioides brasiliensis* ISOCITRATE LYASE BY THE NATURAL PRODUCT ARGENTILACTONE				
Palavras-chave em outra língua:	ISOCITRATE LYASE, *Paracoccidioides brasiliensis*, INHIBITORY ACTIVITY, *Hyptis ovalifolia*.				
Área de concentração:	BIOLOGIA MOLECULAR E BIOQUÍMICA				
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	20/11/2010				
Programa de Pós-Graduação:	PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃP EM BIOLOGIA-UFG				
Orientador (a):	MARISTELA PEREIRA				
E-mail:	mani@icb.ufg.br				
Co-orientador (a):					
E-mail:					

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?[1] [x] total [ ] parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

[ ] Capítulos. Especifique: _____

[ ] Outras restrições: _____

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

Renata Silva do Prado

Assinatura do (a) autor (a)

Data: 11/02 /2010

[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.

“Dissertação desenvolvida no Laboratório de Biologia Molecular, Genoma e Proteoma do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás.”

Apoio Finaceiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo a Pesquisa (FUNAPE), International Foundation for Science (FINS).

BANCA EXAMINADORA

TITULARES

Profa. Dra. Maristela Pereira – Orientadora
Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

Profa. Dra. Cecília Maria de Oliveira
Laboratório de Produtos Naturais.
Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás.

Prof. Dr. Cirano José Ulhoa
Laboratório de Enzimologia, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

SUPLENTES

Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares
Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

Prof. Dra. Sílvia Maria Salem Izacc
Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

“Agora sei que o SENHOR dá a vitória
ao rei que ele escolheu.
Do seu santo céu, ele lhe responde
e, com o seu grande poder, ele o torna vitorioso.
Alguns confiam nos seus carros de guerra,
e outros, nos seu cavalos,
mas nós confiamos no poder do SENHOR, nosso Deus.
Eles tropeçarão e cairão,
mas nós nos levantaremos e ficaremos firmes.”
Sl. 20.6-8

“Pouca coisa é necessária para transformar
inteiramente uma vida:
amor no coração e sorriso nos lábios.”
Martin Luther King

À Deus, eterno pai, senhor e salvador de nossas vidas.

À minha amada mãe, Juliete Teresinha Silva,
verdadeiro exemplo de coragem, dignidade e amor,
a quem devo minha vida,
minha formação e todas as minhas conquistas.
À minha querida irmã, Alessandra Silva Prado Fonseca,
pelo seu apoio incondicional, por seu zelo e preocupação,
por sempre fazer meu coração sorrir.
Ao meu querido noivo, Thiago Vilar Silva,
abrigo em todas as intempéries,
por me ensinar sobre caráter,
pelo companheirismo, cuidado e apoio.

À vocês meu eterno amor e gratidão.

À professora Dra. Maristela Pereira, pela oportunidade concedida e pela confiança em mim depositada. Sua orientação, suas cobranças e seus sorrisos foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Cecília Maria Alves de Oliveira, por sua disposição e alegria, sempre contagiantes, e pela parceria, fundamental para o desenvolvimento de nosso trabalho.

Ao professor Dr. Cirano José Ulhoa, pelo bom humor e competência, essenciais para a composição deste trabalho.

Às professoras Dra. Célia Maria Almeida Soares e Dra. Sílvia Maria Salem Izacc, por serem prestativas sempre que se foi necessário.

Ao professor Dr. Samuel Mariano G. da Silva, responsável por meus primeiros passos na jornada acadêmica, que muito fez pelo meu crescimento enquanto profissional e pessoa.

Aos meus amigos e companheiros de trabalho Patrícia Zambuzzi, Patrícia Kott (e de boteco), Rogério Troian (e de boteco), Benedito Neto e Amanda Gregorim (e de fofoca), responsáveis por incontáveis discussões acerca de artigos e protocolos, e tantos outros incontáveis momentos de alegria e descontração, cruciais para o desenrolar dessa jornada.

Às meninas Symone Vitoriano e Karine Oliveira pela ajuda, pelo companheirismo e pelo sorriso sempre oferecidos.

À Raquel Vaz e Martha Alencar, por estarem sempre ali presentes, e demonstrarem alegria perante meu crescimento.

Aos queridos Leandro Nascimento e Dayane Cristyne, por sua lealdade, sua amizade, seu sorriso e sua companhia.

À Clayton Borges, Alexandre Bailão, Wesley Brito e Luiz Augusto, que muito me ensinaram, e da maneira mais alegre com que se pode ensinar a alguém.

Ainda a todos os companheiros do laboratório de biologia molecular: Regilda, Aline, Rodrigo, João Guilherme, Simone, Daciene, Priscila, Patrícia Lima, Nathalie, Sabrina, Elisa Flávia, Mirelle, Mariana, Cristina, Hellen, Juliana, Fafá, Kelly, Ronney, Rodrigo, Sarah, Keila, Marco Túlio, Hérika e Ademar. Os abraços, sorrisos e a força foram fundamentais.

Aos companheiros do laboratório de enzimologia, pela prestatividade e, principalmente, pela amizade oferecida: Saulo José, Marcelo Ramada e Andrei Stecca.

Ao amigo Eduardo Fernandes por estar disposto a me ouvir, seja durante as conversas descontraídas, seja durante os cálculos de diluição.

À sempre prestativa Gleize, cuja competência e carinho facilitaram essa jornada.

Ainda aos queridos amigos, grandes conquistas dessa caminhada, Aline França, Deyze Alencar, Lucas Breseghelo (nossa..aqueles gráficos!!), Flávio, Thiago, Kárita, Marcela, Ana Flávia e toda a turminha do mestrado.

Às amigas e companheiras de "lar doce lar", Marina Zanin, Lorena Cintra e Fabi Barbosa por todos os devaneios, pela companhia, pelas risadas, por me ensinarem um pouco mais sobre a realidade.

Aos amigos Bruno Barreto, Guilherme Oliveira, Lorena Tchatchatchá e Luiz, pela alegria que adicionaram ao meu cotidiano.

À todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia pela oportunidade do aprendizado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal de Goiás, por possibilitar essa etapa.

À todos vocês, meu queridos, e aos demais que me auxiliaram, de uma maneira ou de outra, durante o desenvolvimento deste trabalho, **MUITÍSSIMO OBRIGADA!!!!!**

SUMÁRIO

RESUMO..... 17

ABSTRACT..... 18

I. INTRODUÇÃO..... 19

I.1. O fungo *Paracoccidioides brasiliensis*..... 18

I.1.1. Aspectos gerais..... 18

I.1.2. Dimorfismo de *P. brasiliensis*..... 21

I.1.3. Trasncriptomas de *P. brasiliensis*..... 23

I.2. Ciclo do Glioxalato..... 27

I.3. Paracoccidioidomicose..... 30

I.4. Antifúngicos utilizados no tratamento da PCM..... 32

I.5. Plantas utilizadas com fins terapêuticos..... 34

I.6. O gênero *Hyptis*..... 35

II. JUSTIFICATIVA..... 37

III. OBJETIVOS..... 39

IV. MANUSCRITO..... 40

Title and general information..... 41

Abstract and keywords..... 42

Introduction..... 43

Results and Discussion..... 45

Conclusion..... 48

Experimental..... 48

Acknowledgements..... 53

References..... 53

Figure legends..... 58

Figure and tables..... 59

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 62

VI. CONCLUSÃO..... 65

VII. PERSPECTIVAS..... 66

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo do ciclo do ácido tricarboxílico, ciclo do glioxalato e gliconeogênese. 29

Figure 1: Molecular structures of argentilactone and analogues 59

Figure 2: Effect of argentilactone and analogues on P. brasiliensis yeast cells growth. 60

Figure 3: Effect of argentilactone and analogues on P. brasiliensis differentiation process from mycelium to yeast. 61

ÍNDICE DE TABELAS

Table 1: Inhibitory effect of argentilactone and analogues on the activity of isocitrate lyase (ICL) from P. brasiliensis. 62

Table 2: Kinetic parameters for isocitrate lyase (ICL) on the presence of argentilactone and reduced argentilactone. 63

LISTA DE ABREVIATURAS

µM: micromolar

5-FC: 5-fluorocitosina

cDNA: DNA complementar

DNA: ácido desoxiribonucléico

DTT: dithiothreitol

EBP: proteína de ligação do estradiol

EST: fragmentos de expressão gênica

HSP: proteína de choque térmico

ICL: isocitrato liase

IPTG: isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo

ITS: espaço transcricional interno

K_m: constante de Michaelis e Menten

M: molar

MLS: malato sintase

mM: milimolar

MMcM: Mc Veigh and Morton (meio mínimo de cultura)

Pb: *Paracoccidioides brasiliensis*

PCM: paracoccidioidomicose

PBS: solução de tampão fosfato

RDA: análise de diferença representacional

RNA: ácido ribonucléico

PABA: ácido para-aminobenzóico

PCR: reação em cadeia da polimerase

pH: potencial hidrogeniônico

RT-PCR: PCR acoplada à transcrição reversa

TCA: ciclo do ácido tricarboxílico

U: mol de glioxalato fenildrazona formado por minuto

$V_{máx}$: velocidade máxima da reação

RESUMO

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), micose humana sistêmica de maior prevalência na América Latina. Devido à toxicidade dos antifúngicos existentes, e ao aparecimento de isolados resistentes, estudos em busca de novas terapias tem adquirido relevância. Plantas com propriedades terapêuticas representam uma fonte em potencial para descoberta de novos antifúngicos. Neste trabalho, foi investigada a influência de argentilactona, extraída do óleo essencial de *Hyptis ovalifolia,* e seus análogos obtidos sinteticamente sobre células leveduriformes de *P. brasiliensis*, durante o processo de diferenciação de micélio para levedura e sobre a enzima isocitrato liase recombinate (*Pb*ICLr) e nativa. Os testes de sensibilidade em placas, que avaliaram a atividade de argentilactona sobre células leveduriformes de *P. brasiliensis*, mostraram que tanto argentilactona como argentilactona reduzida interferiram no crescimento do fungo, afetando as células de modo dose-dependente. Os experimentos de avaliação de concentração inibitória mínima (CIM), que avaliaram a influência dos compostos durante a transição de micélio para levedura em *P. brasiliensis* mostraram que argentilactona e argentilactona reduzida interferem nesse processo, também de modo dose-dependente. A atividade específica da isocitrato liase do fungo, tanto recombinante como nativa, mensurada por testes de atividade enzimática, também foi afetada pelos compostos. O tipo de inibição promovida pela argentilactona e argentilactona reduzida foi definido como inibição do tipo mista, através de testes de cinética enzimática. Diferentes fontes de carbono (acetato e glicose) influenciaram diretamente o processo de inibição. Os análogos epoxi argentilactona e diol argentilactona não inibiram o crescimento de células leveduriformes e o processo de diferenciação de *P. brasiliensis.* Em adição, também não inibiram a atividade da enzima isocitrato liase recombinante e nativa.

Palavras-chave: Isocitrato liase, *Paracoccidioides brasiliensis*, inibição, *Hyptis ovalifolia.*

ABSTRACT

The fungus *Paracoccidioides brasiliensis* is the causative agent of paracoccidioidomicosys (PCM), the most prevalent human systemic mycosis in Latin America. The toxicity of drugs and the appearance of resistant strains have imposition the search for new therapeutic approaches. Plants with reputed antimicrobial uses represent a rich source for the screening of potential antifungal compounds. In this work, we investigated the inhibitory action of argentilactone, extracted from the essential oil of *Hyptis ovalifolia*, and its analogues on *P. brasiliensis* yeast cells, during the differentiation from mycelium to yeast, on native and recombinant *Pb*ICL. Sensitivity tests on plates, which assessed the activity of argentilactone on yeast cells of *P. brasiliensis* showed both argentilactone as reduced argentilactone interfered in fungus growth, affecting the cells in a dose-dependent way. The experiments evaluating the minimum inhibitory concentration (MIC), which evaluated the influence of the compounds during the transition from mycelium to yeast in *P. brasiliensis* showed that argentilactone and reduced argentilactone interferes in this process, also in a dose-dependent way. A specific activity of isocitrate lyase of the fungus, both recombinant as native, as measured by tests of enzyme activity was also affected by the compounds. The type of inhibition promoted by argentilactone and reduced argentilactone was defined as inhibition of mixed type through tests of enzyme kinetics. Different carbon sources (acetate and glucose) have directly influence on the processs of inhibition. The analogues epoxy argentilactone and diol argentilactone not inhibit the growth and differentiation of *P. brasiliensis*. In addition, it not inhibited the enzyme isocitrate lyase native or recombinant.

Keywords: Isocitrate lyase, *Paracoccidioides brasiliensis*, Inhibitory activity, *Hyptis ovalifolia.*

I – INTRODUÇÃO

I.1 – O fungo *Paracoccidioides brasiliensis*

I.1.1 – Aspectos Gerais

Paracoccidioides brasiliensis é um fungo dimórfico, patogênico, agente etiológico da micose humana sistêmica paracoccidioidomicose (PCM) (LUTZ, 1908). O fungo encontra-se no ambiente sob a forma denominada micélio, a qual também é a forma infectiva, ou quando cultivados *in vitro* em temperaturas inferiores a 28°C (BAGAGLI *et al.*,2006). Quando no tecido do hospedeiro ou cultivado *in vitro* a 36°C, este fungo se apresenta sobre a forma leveduriforme, caracterizada por apresentar brotamentos múltiplos (QUEIROZ-TELLES, 1994).

A forma miceliana de *P. brasiliensis*, apresenta crescimento lento, e macroscopicamente, produz colônias pequenas, duras, planas, irregulares, de coloração bege, cobertas por micélio aéreo e curto que frequentemente aderem-se ao ágar (BRUMMER *et al.,* 1993). Quando examinadas ao microscópio óptico, observam-se hifas finas e septadas, com clamidoconidios terminais ou intercalares (FRANCO *et al.*, 1987). Ao microscópio eletrônico, as hifas apresentam um envoltório celular constituído de três camadas: uma interna, a membrana plasmática; uma camada mais espessa, a parede celular, e uma externa de aspecto finamente granular, a membrana basal (MINGUETTI *et al.,* 1985). As hifas são multinucleadas, com cromatinas finas dispersas no nucleoplasma. No citoplasma podem ser vistos ribossomos, mitocôndrias esféricas ou alongadas, retículo endoplasmático e vacúolos (SAMSONOFF *et al.*, 1991).

As colônias leveduriformes apresentam-se macroscopicamente com coloração creme, de aspecto cerebriforme, não aderidas ao meio e com crescimento evidente após sete dias de incubação a 37°C (CARBONELL & RODRIGUES, 1965). As células leveduriformes apresentam morfologia oval ou alongada, em diferentes tamanhos (4 a

30 μm), contendo múltiplos núcleos (2 a 5 por células), nucléolo e cromatina evidentes (LACAZ, 1994). Sua parede celular é espessa (LACAZ *et al*., 1991), a membrana plasmática é composta por três camadas e apresenta múltiplas invaginações que constituem vesículas e estruturas tubulares; também apresenta escasso retículo endoplasmático, vários vacúolos, gotas de lipídios proeminentes, ribossomos e mitocôndrias (BRUMMER *et al.,* 1993). Células com blastoconídios simples ou múltiplos gerados por germinação, conferem ao fungo a característica primordial em sua identificação, o aspecto de "roda de leme" (FURTADO *et al.,* 1967; ANGULO–ORTEGA & POLLAK, 1971; LACAZ *et al.,* 1991).

Apesar de ser considerado um fungo imperfeito, por não ter seu mecanismo de reprodução da fase assexuada definido (SAN-BLAS *et al*., 2002), a atual classificação taxonômica de *P. brasiliensis* proposta por Margulis & Scharwatz (1998) apresenta-se da seguinte forma: Reino: *Fungi*, Filo ou Divisão: *Ascomycota*, Subdivisão: *Euascomycotina*, Classe: *Plectomyceto*, Sub-classe: *Euascomycetidae*, Ordem: *Onygenales*, Família: *Onygenaceae*, Sub-família: *Onygenaceae* anamórficos, Gênero: *Paracoccidioides*, Espécie: *brasiliensis*. No entanto, existem três grupos distintos de *P. brasiliensis*, S1, PS2 e PS3, todos identificados através de dados de polimorfismo genéticos. A espécie filogenética S1 distribui-se no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela, enquanto PS2 foi encontrado apenas no Brasil e na Venezuela e PS3 encontra-se restrito à Colômbia. Todas as três espécies foram capazes de induzir a doença em hospedeiros humanos e animais, entretanto, uma menor virulência tem sido observada nas espécies PS2 (MATUTE *et al.*, 2006).

A composição genética de *P. brasiliensis* apresenta-se pouco conhecida com informações sobre o tamanho do genoma e organização dos cromossomos escassa (FELIPE *et al*, 2005). Através da comparação de sequências de regiões codantes, não codantes e sequências espaçadoras internas (ITS - Internal Trancribed Spacer) de 21 isolados de *P. brasiliensis*, pode-se observar que o isolado *Pb*01 apresentou-se

filogeneticamente distinto dos outros isolados analisados, agrupando-se apenas com o isolado IFM 54648, obtido de um paciente do estado do Paraná/Brasil. Esse fato, aliado à idéia de que estes dois isolados encontram-se separados geneticamente dos outros isolados por um longo período de tempo, sugerindo que os mesmos possam constituir uma nova espécie do gênero *Paracoccidioides* (CARRERO *et al.*, 2008).

Não se sabe ao certo o habitat exato de *P. brasiliensis*, mas sugere-se que o fungo viva de forma saprófita na natureza, próximo a ambientes de água fresca, tais como rios ou córregos e de forma temporária no solo (BAGAGLI *et al.*, 2006; TERÇARIOLI *et al.*, 2007). No entanto, devido à presença de poucos isolados deste fungo no solo, acredita-se que este não seja o habitat permanente do patógeno, sugerindo que o fungo resida por tempo variável nestes locais (CONTI-DIAZ, 2007), e que, ainda, determinados tipos de solos devem ser mais favoráveis à produção de conídios, um aspecto importante por aumentar a eficiência de sobrevivência do microorganismo no meio ambiente, bem como a capacidade de infectar humanos (THEODORO *et al.*, 2005).

A infecção natural do fungo em alguns animais silvestres, como tatus (*Dasypus novemcinctus*, *Dasypus septemcinctus* e *Dasypus centralis*), e animais domésticos, como cachorro (*Canis familiaris*), também tem sido observada. Cabe ressaltar que esses organismos devem ser considerados hospedeiros acidentais e não reservatórios naturais do fungo, pois os mesmos podem ser acometidos pela doença (CONTI-DIAZ, 2007). Atualmente, foi obtida a identificação de *P. brasiliensis* através de *Nested-PCR* (reação em cadeia da polimerase) com oligonucleotídeos ITS do fungo, em animais selvagens mortos encontrados em estradas e rodovias. Foi detectada a presença do fungo em tatu (*Dasypus sp.*), porco da índia (*Cavia aperea*), porco espinho (*Sphigurrus spinosus*), guaxinim (*Procyon cancrivorus*) e furão (*Gallictis vittata*). Os dados revelaram que a infecção em animais silvestres de áreas endêmicas é mais alta do que era proposto inicialmente por outros pesquisadores (RICHINI-PEREIRA *et al.*, 2008).

P. brasiliensis alcança o hospedeiro, usualmente através da via respiratória, por inalação de propágulos do micélio, presentes no ambiente. Nos pulmões esses propágulos se convertem a fase leveduriforme, de onde podem disseminar-se para diferentes órgãos e tecidos (SAN BLAS *et al.*, 2002).

I.1.2 – Dimorfismo de *P. brasiliensis*

O dimorfismo térmico é uma característica importante de *P. brasiliensis*, mas não se trata de uma característica exclusiva deste microorganismo. Outros fungos patogênicos humanos como *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* e *Sporothrix schenckii*, também apresentam esta característica. Sabe-se que esta capacidade de alteração morfológica é um importante mecanismo de virulência e patogenicidade destes fungos (KUROKAWAI *et al.*, 1998). O dimorfismo é considerado um mecanismo de defesa importante para a adaptação de fungos as condições adversas do hospedeiro humano, a invasão dos tecidos e ao estabelecimento da doença (SAN-BLAS *et al*; 2002).

O estímulo ambiental determinante na transição entre as formas de micélio e levedura em *P. brasiliensis* é a temperatura, sendo que além deste, fatores nutricionais também podem interferir no processo de diferenciação do patógeno. A adição de soro fetal bovino tanto a meio de cultura complexo quanto a meio quimicamente definido permitiu preservar a expressão fenotípica de leveduras, à 25°C (VILLAR *et al.*, 1988).

A alta incidência da PCM em adultos do sexo masculino sugere que fatores hormonais possam desempenhar papel na patogênese da doença (SANO *et al*., 1999), essa fato pode ser explicado pela influência hormonal sobre o dimorfismo do fungo. Estudos mostraram que o hormônio feminino 17-β-estradiol é capaz de inibir a transição de micélio para levedura de modo dose-dependente, *in vitro* (RESTREPO, 1985), e *in vivo* (SANO *et al.*, 1999). Foi observada, *in vivo*, a participação do hormônio feminino na resistência de fêmeas de rato ao desenvolvimento inicial da PCM (ARISTIZABAL *et*

al., 2002). Através de análises transcricionais (FELIPE *et al.*, 2005) foi identificado um gene preferencialmente expresso na fase leveduriforme de *P. brasiliensis* que potencialmente codifica uma proteína de ligação ao 17-β-estradiol, previamente caracterizada (LOOSE *et al.*, 1983). A EBP (Estradiol binding protein) possui interação seletiva a estrogênios ligando-se ao estradiol no citoplasma (CLEMONS *et al.*,1989; LOOSE *et al.*, 1983). Acredita-se que a interação do hormônio 17-β-estradiol com a EBP citoplasmática iniba a transição de micélio para levedura, explicando a baixa incidência da PCM em mulheres.

O sequenciamento de EST (Expressed sequence tags) proveniente das fases miceliana e leveduriforme do isolado *Pb*01 resultou na detecção de genes diferencialmente expressos (FELIPE *et al.*, 2003; FELIPE *et al.*, 2005). Consequentemente foram identificados trancritos que codificam para proteínas envolvidas no processo de estresse, componentes das vias de sinalização e sequências gênicas especificas de *P. brasiliensis* que não possuem nenhum homólogo no genoma humano, todos preferencialmente expressos na fase leveduriforme do fungo.

Tendo em vista que a eficiência de instalação de *P. brasiliensis* no hospedeiro se da pela transição da forma miceliana (infectante), para a leveduriforme (patogênica), o estudo de genes/proteínas com expressão diferencial durante a transição dimorfica do fungo tem sido alvo de estudos de diferentes grupos (NUNES *et al.*, 2005; BASTOS *et al.*, 2007).

Durante a transição de micélio para levedura em *P. brasiliensis*, foram identificados vários genes diferencialmente expressos, entre eles genes que codificam para enzimas envolvidas no metabolismo de aminoácidos, transdução de sinal, síntese de proteínas, metabolismo da parede celular, estrutura do genoma, resposta ao estresse oxidativo, controle do crescimento e desenvolvimento do fungo (NUNES *et al.*, 2005).

Bastos *et al.* (2007), avaliaram o perfil transcricional de *P. brasiliensis* durante o processo de diferenciação de micélio para levedura. Vários genes potencialmente

relacionados com a síntese de membrana e parede celular mostraram-se super regulados durante este processo de diferenciação, sugerindo que *P. brasiliensis* favorece o remodelamento da membrana e da parede celular nos estágios iniciais da morfogênese. Verificou-se, também, que durante o processo de diferenciação, enzimas que participam do ciclo do glioxalato, como a isocitrato liase, malato desidrogenase, citrato sintase e aconitase se mostraram presentes, sugerindo que a transição morfológica em *P. brasiliensis* é mediada pela ativação de vias metabólicas alternativas que influenciam na adaptação ao ambiente, o que garante a sobrevivência do fungo no hospedeiro.

I.1.3 – Transcriptomas de *P. brasiliensis*

Nos últimos anos, os esforços para construção de bibliotecas de cDNAs obtidos da forma leveduriforme e miceliana de *P. brasiliensis* foram significativos, com o objetivo de estudar perfis de expressão de genes do fungo como resposta adaptativa do mesmo ao dimorfismo e ao hospedeiro. Foram identificados 6.022 genes expressos nas fases de micélio e levedura do isolado *Pb*01 de *P. brasiliensis*, sendo que entre os transcritos identificados, existem aqueles codificantes para chaperonas diferencialmente expressas e genes que não apresentam homologia no genoma humano. Neste grupo, estão os genes que codificam para as enzimas isocitrato liase e α-1,3-glucana sintase, importantes alvos para busca de antifúngicos, já que ambas foram expressas diferencialmente na fase leveduriforme do fungo (FELIPE *et al.*, 2003; FELIPE *et al.*, 2005). Características metabólicas diferenciais das formas miceliana e leveduriforme de *P. brasiliensis* foram descritas, elucidando que o fungo apresenta metabolismo aeróbio em sua fase miceliana e anaeróbio em sua fase leveduriforne. A alta expressão de genes que codificam enzimas que participam da fosforilação oxidativa, como a isocitrato desidrogenase e succinil coenzima-A sintase sugere que o micélio apresente metabolismo aeróbio. Já na fase leveduriforme, genes como álcool desidrogenase I têm

seus níveis de expressão aumentados, sugerindo que o metabolismo, nessa fase, seja predominantemente anaeróbio (FELIPE *et al.*, 2005).

No isolado *Pb*18 de *P. brasiliensis* foram identificados vários genes expressos na fase leveduriforme homólogos a fatores de virulência descritos em *C. albicans*, que possivelmente atuam na sobrevida do fungo no ambiente hostil do hospedeiro. Os resultados sugerem que os mecanismos para patogenicidade e virulência são conservados entre as espécies analisadas. A expressão de alguns genes foi analisada por *RT-PCR* em tempo real. Os resultados identificaram genes com níveis de expressão aumentados na fase miceliana, tais como isocitrato liase, malato desidrogenases e oxidases. Outros genes, tais como ubiquitina e chaperonas de choque térmico (HSP70, HSP82 e HSP104) apresentaram níveis de expressão aumentados na transição dimórfica de micélio para levedura e na fase leveduriforme (GOLDMAN *et al.*, 2003).

Bastos *et al.* (2007) detectaram aumento nos níveis de expressão de genes relacionados ao remodelamento de parede celular, bem como transcritos que codificam para enzimas relacionadas com à síntese e degradação de carboidratos de membrana e metabolismo do enxofre, bem como do ciclo do glioxalato durante o processo de transição de micélio para levedura em *P. brasiliensis*. Genes que codificam para enzimas do ciclo do glioxalato como isocitrato liase, malato desidrogenase, citrato sintase e aconitase sugerem que esta via seja funcional durante a transição dimórfica.

Com o objetivo de elucidar as respostas adaptativas de *P. brasiliensis* à infecção em modelo animal, analises subtrativas de cDNAs utilizando a técnica de RDA (análise de diferença representacional) foram realizadas a partir de cDNAs obtidos de células leveduriformes recuperadas de fígado de camundongos infectados. Observou-se a regulação positiva da transcrição do gene transportador de alta afinidade de ferro/zinco, fato justificado pelas baixas concentrações destes compostos no fígado de camundongos. A super-expressão de transcritos codificantes para proteínas de choque-térmico (HSPs) foi relatada, sugerindo papel de reparo de danos causados por estresse,

além de atuarem em processos como divisão celular, síntese de DNA, transcrição, tradução, enovelamento, transporte protéico e transporte transmembrana. Transcritos que codificam para enzimas das vias de biossíntese de melanina foram induzidos em células leveduriformes de *P. brasiliensis* recuperadas do fígado de camundongos e demonstram a relevância da síntese de melanina no processo infeccioso em camundongos (BAILÃO *et al.*, 2006). Células melaninizadas de *P. brasiliensis* são mais resistentes à fagocitose por macrófagos murinos e à ação dos antifúngicos anfotericina B, cetoconazol, fluconazol, itraconazol e sulfametoxazol (SILVA *et al.*, 2006).

Bailão *et al.*(2006) realizaram análises subtrativas de cDNAs utilizando a técnica de RDA após a incubação de células leveduriformes de *P. brasiliensis* na presença de sangue humano, condição semelhante à que o fungo é submetido durante a disseminação no hospedeiro. Genes codificantes para glutamina sintase e permease de aminoácidos ácidos tiveram sua expressão aumentada, o que pode estar relacionado ao acúmulo de quitina para remodelamento da parede em resposta a mudança de osmolaridade externa. O transcrito codificante para uma serina protease S08 foi regulado positivamente em *P. brasiliensis* durante a incubação em sangue humano, o que provavelmente ocorre com o intuito de promover o acúmulo de aminoácidos no meio extracelular, para captação pelo fungo, como acontece em *A. fumigatus*, demonstrado em estudos realizados por Gifford *et al.* (2002).

Foram realizadas análises de transcritos através da técnica de RDA em células leveduriformes de *P. brasiliensis* após incubação com plasma humano, condição na qual o fungo, *in vivo*, pode ser submetido em conseqüência de resposta inflamatória aguda em sítios de infecção. Como resultado do estudo, foi possível detectar a super-expressão de genes relacionados à síntese de proteínas, resposta celular a mudança de osmolaridade do meio, remodelamento celular e defesa. Os transcritos codificantes de enzimas da β-oxidação foram induzidos durante a incubação de leveduras de *P.*

brasiliensis em plasma humano sugerindo que o fungo, nessa condição, desvie o seu matabolismo para a degradação de lipídios (BAILÃO *et al.*, 2007)

Tavares *et al.* (2007) estudaram a resposta transcricional de *P. brasiliensis* à internalização por macrófagos murinos e identificaram genes supra regulados, principalmente àqueles relacionados à biossíntese de aminoácidos e proteínas de choque térmico, sugerindo que estes genes são relevantes durante o processo de fagocitose por macrófago. Posteriormente, genes relacionados ao ciclo do glioxalato foram avaliados durante a internalização por macrófagos, mostrando que genes necessários para a metabolização de compostos de dois carbonos apresentaram-se supra regulados nessa condição, sugerindo que *P. brasiliensis* utilize o ciclo do glioxalato como uma via metabólica para obtenção de carbono durante a internalização por macrófagos (DERENGOWSKI *et al.*, 2008).

I.2 - Ciclo do Glioxalato

Sabe-se que a grande maioria dos microorganismos é capaz de crescer em fontes de carbono não fermentáveis, tais como acetato, etanol ou ácidos graxos, pois possuem o ciclo do glioxalato (Figura 01) (KUNZE *et al.*, 2002), uma via metabólica anaplerótica que permite a biogênese de carboidratos a partir de compostos de dois carbonos (KORNBERG, 1966).

É importante lembrar que o ciclo do glioxalato possui um papel importante na gliconeogênese (KORNBERG & BEEVERS, 1957), sendo que o primeiro passo comprometido na gliconeogênese é a conversão de oxaloacetato à fosfoenolpiruvato através da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEP carboxinase). Esta, juntamente com a frutose-1,6-bifosfatase, se constituem as mais importantes enzimas na gliconeogênese por atuarem como regulatórias na produção de glicose. Em *Saccharomyces cerevisiae*, sob fagocitose, frutose-1,6-bifosfatase (FBP1) é

induzida (LORENZ & FINK, 2001), ratificando a idéia de que o primeiro objetivo na indução do ciclo do glioxalato é a produção de glicose.

Das enzimas envolvidas no ciclo do glioxalato, duas delas, isocitrato liase (ICL) e malato sintase (MLS) são consideradas enzimas-chave (KORNBERG & BEEVERS, 1957). ICL catalisa a clivagem reversível de isocitrato a glioxalato e succinato, e MLS catalisa a reação de condensação que produz malato a partir de acetil-CoA e glioxalato (NOGALES *et al*., 2004) (Figura 1). 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* (LORENZ & FINK, 2001; SOLOMON *et al*., 2004; IDNURM & HOWLETT, 2002). Em *C. albicans* e *S. cerevisiae,* sob fagocitose, a maioria das enzimas do CG são induzidas, permitindo que esses microrganismos sejam capazes de sobreviver dentro de macrófagos, ambiente caracterizado por ser pobre em carboidratos e ricos em lípidios (LORENZ & FINK, 2002).

Em *P. brasiliensis*, os níveis dos transcritos de ICL e MLS são alterados durante a transição de micélio para levedura (Bastos *et al*., 2007; Goldman *et al*., 2003), sugerindo que essas enzimas atuam nesse processo. O gene que codifica para ICL é super expresso na fase leveduriforme quando comparado com a fase de micélio (Felipe *et al*., 2005), sendo também, supra regulado em células de fígado de camundongos retiradas após infecção com *P. brasiliensis*. Os altos níveis de ICL encontrados sugerem a importância dessa enzima para o fungo durante o processo de infecção (Costa *et al*., 2007).

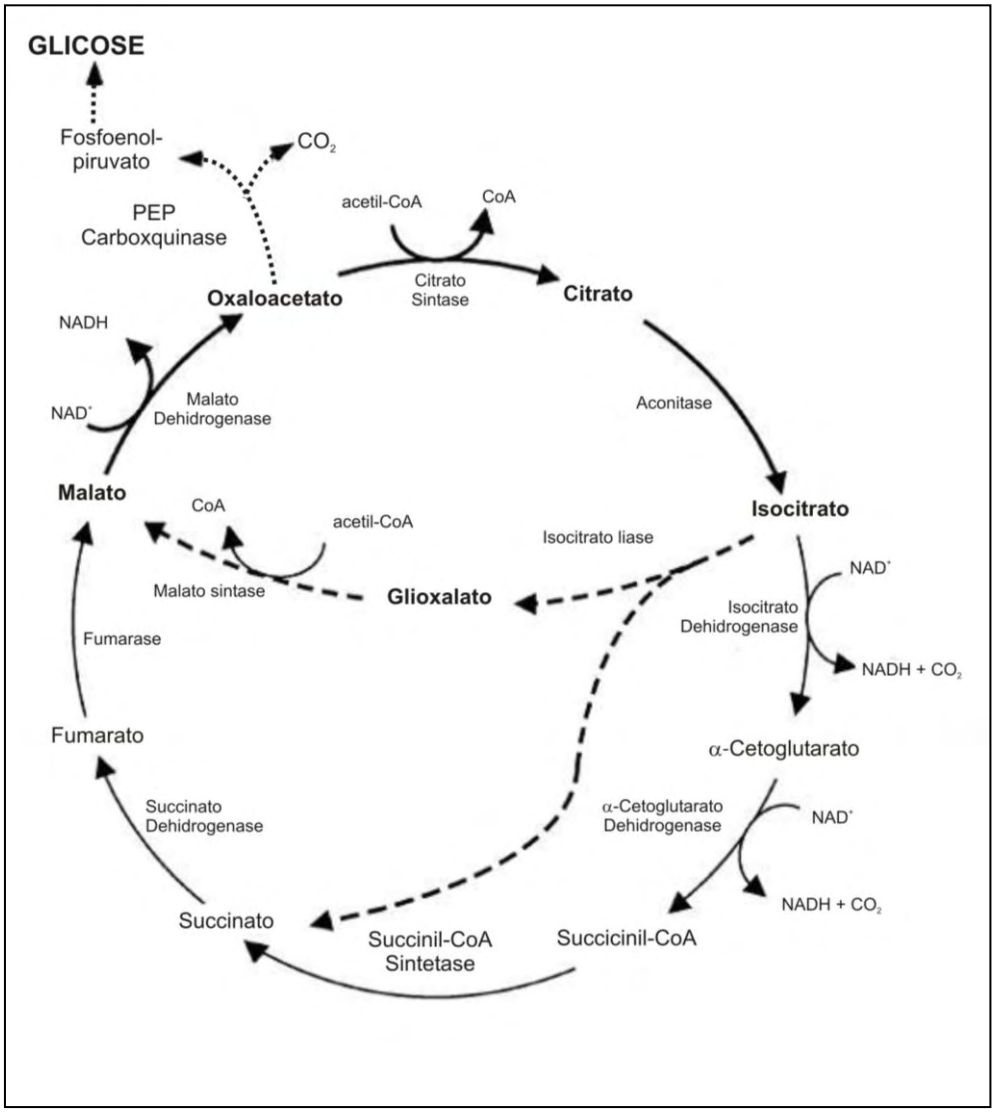


Figura 1 – Esquema representativo do ciclo do ácido tricarboxílico, ciclo do glioxalato e gliconeogênese. Estão evidenciados os passos enzimáticos básicos no ciclo do ácido tricarboxílico (linhas finas), o qual é comum para todos os organismos; passos no ciclo do glioxalato (linhas tracejadas), que é comum para microorganismos e plantas, e os passos compartilhados pelos dois ciclos (linhas grossas) e a reação inicial de gliconeogênese (linhas sombreadas). Fonte: Lorenz & Fink (2002). Life and Death in a Macrophage: Role of the Glyoxylate Cycle in Virulence. Eukaryotic Cell. 657-662.

I.3 – Paracoccidioidomicose (PCM)

A PCM é uma micose humana sistêmica granulomatosa, enfermidade de alta prevalência e morbidade, que determina dois quadros clínicos aparentes, uma forma crônica e outra aguda, inicialmente descrita em São Paulo, no ano de 1908, por Adolpho Lutz (LUTZ, 1908).

O fungo *P. brasiliensis* infecta os hospedeiros humanos usualmente através das vias respiratórias, por inalação de propágulos do micélio, como artroconídios (FRANCO, 1987), que resulta na formação de um foco inflamatório nos pulmões que, geralmente regride com o estabelecimento da imunidade especifica do hospedeiro (BRUMMER, *et al.*, 1993). Essa primeira interação parasito-hospedeiro ocorre, mais precisamente, nos alvéolos pulmonares; a partir daí o fungo pode disseminar-se por vias hematogênica ou linfática, acometendo outros órgãos e sistemas como fígado, baço, ossos e sistema nervoso central (CAMARGO & FRANCO, 2000; SAN-BLAS, 1993; VALERA *et al.*, 2008). O contato inicial do hospedeiro com o fungo aparentemente evolui para uma infecção subclínica ou assintomática. Se há progresso da infecção, ocorre o estabelecimento da doença de uma das duas formas clínicas conhecidas (a forma aguda ou tipo juvenil e a forma crônica ou adulta) (FRANCO *et al.*, 1987).

A forma juvenil representa 3 a 5% dos casos descritos da doença, sendo a maioria dos pacientes constituídos por crianças ou adultos jovens (REIS *et al.*, 1986; BRUMMER *et al.*, 1993), tem evolução mais rápida e é mais severa levando a taxas de mortalidade significativas. Apesar de não haver manifestações clinicas ou radiológicas de comprometimento pulmonar evidente, pode-se isolar o fungo do lavado brônquico, evidenciando a participação do pulmão como porta de entrada do patógeno (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

Ao contrário da forma aguda, a forma crônica apresenta um desenvolvimento lento com comprometimento pulmonar evidente, e representa mais de 90% dos casos, onde a maioria dos pacientes é composta por homens adultos (BRUMMER *et al.*,

1993). Em alguns casos, o pulmão é o único órgão afetado (forma unifocal), o que prejudica o tratamento da doença, uma vez que a pessoa afetada só busca auxílio médico quando apresenta sintomas de comprometimento extrapulmonar (multifocal) (LONDERO 1986; BRUMMER *et al.*, 1993). Cabe ressaltar, que na lesão multifocal, o envolvimento ocular, destruição óssea e comprometimento dos sistemas nervoso e vascular ocorrem com menor frequência (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006). Sabe-se que independentemente do órgão afetado, a PCM é usualmente associada à formação de fibrose, o que, na maioria das vezes, interfere permanentemente na qualidade de vida das pessoas afetadas (TÓBON *et al.*, 2003).

Nas áreas endêmicas estima-se que, por ano, aconteçam de um a três casos de PCM para cada 100.000 habitantes (COUTINHO *et al.*, 2002). A PCM é mais comum em trabalhadores rurais do sexo masculino, entre 30 e 50 anos de idade (SVIDZINSKI *et al.*, 1999; VILLA *et al.*, 2000), sendo que o trabalho diretamente com a terra, em plantações na zona rural, é fator ocupacional predisponente para a aquisição da PCM (FRANCO, 1987). Em 90% dos casos da doença na fase adulta, os acometidos são do sexo masculino, no entanto, da infância à puberdade, a incidência da doença é a mesma em ambos os sexos (MARTINEZ, 1997), fato esse que pode ser explicado pelo efeito protetor dos estrógenos sobre as mulheres (SANO *et al.*, 1999).

Em estudo de revisão realizado por Coutinho *et al.* (2002), no período que vai de 1980 a 1995, um total de 3.181 pessoas morreram de PCM no Brasil, nomeando a PCM como a oitava causa de morte entre as doenças parasitárias no país e a primeira causa de morte entre as micoses humanas sistêmicas.

I.4 – Antifúngicos utilizados no tratamento da PCM

Tradicionalmente, são analisados três parâmetros durante a escolha do melhor medicamento para o tratamento da PCM, e tempo de administração deste: severidade da

doença, local da lesão e contra-indicações baseadas em histórico prévio de falhas ou reação de hipersensibilidade (YASUDA, 2005). No entanto, medidas gerais envolvendo o combate a má nutrição, depressão imunológica e o processo infeccioso são indispensáveis, uma vez que estes fatores, somados, favorecem a instalação da micose (MENDES *et al.*, 2004) .

A PCM é tratada, inicialmente, com dosagens agressivas de antifúngicos, mas como em outras infecções causadas por fungos, seu tratamento é um processo lento, podendo se estender por meses ou anos (HANH *et al.*, 2003; MENDES *et al.*, 1994), apresentando uma série de efeitos adversos e sem garantia de cura efetiva, característica de antifúngicos sintéticos em geral (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, tratamento utilizando polienos passaram a ser empregados, com destaque para a anfotericina B, eficiente no tratamento de infecções viscerais e no tratamento 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 resistência de *P. brasiliensis* às sulfonamidas, azoles e anfotericina B (LACAZ *et al.*, 1959; RESTREPO & TABARES, 1984). A resistência para cetoconazol, trimetropima-sulfametoxazol também foi descrita em isolados de

pacientes que apresentavam falhas ao tratamento com combinação de drogas (YASUDA, 2005).

Atualmente, o único antimetabólito administrado como antifúngico é o 5-fluorocitosina (5-FC), uma pirimidina sintética que interfere no metabolismo das pirimidinas, como na síntese de RNA, DNA e síntese protéica de células fúngicas (KRCMERY, 2005). Existe, também, a nova geração de agentes antifúngicos que compreende a caspofungina, micafungina e anidulafungina. Essa classe de antifúngicos inibe 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).

É fato que vários problemas relacionados aos antifúngicos existentes têm sido evidenciados, principalmente no que diz respeito à toxicidade dos mesmos (RUHNKE *et al.*, 1994; GALLIS *et al.*, 1990). Apesar da existência de potentes antibióticos a agentes antifúngicos, isolados resistentes ou multi-resistentes continuam aparecendo (HANH *et al.*, 2003). Sendo assim, torna-se necessária a busca permanente por novos candidatos antifúngicos.

I.5 – Plantas utilizadas com fins terapêuticos

Atualmente, observa-se um crescimento na utilização de fitoterápicos pela população brasileira. Alguns fatores poderiam explicar o aumento do uso desses medicamentos, como os avanços ocorridos na área científica que permitiram o desenvolvimento de fitoterápicos reconhecidamente seguros e eficazes, como também uma forte tendência de busca, pela população, por terapias menos agressivas destinadas ao atendimento primário à saúde (YUNES *et al.*, 2001).

De acordo com a legislação em vigor no país, entende-se como fitoterápico "aquele medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais.

É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos do seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização e documentações técnico-científicas em publicações ou ensaios clínicos fase 3" (BRASIL, 2004).

Nesse sentido, o desenvolvimento de pesquisas com plantas tem se tornado cada vez mais necessário, não só para análises de características próprias de cada espécie, mas também para identificar possíveis metabólitos com aplicabilidade nas diferentes áreas de interesse (VOLK & FURKERT, 2006). As plantas possuem uma grande variedade de substâncias químicas, e a pesquisa para confirmação de estruturas químicas e de propriedades biológicas pode alcançar sucesso considerável (ADEWUNMI *et al.*, 2001). No entanto, devido à imensa quantidade de espécies a serem exploradas, selecionar espécies vegetais e investigar o seu potencial farmacológico torna-se difícil. Os riscos associados ao uso dessas plantas, como por exemplo, a toxicidade, também devem ser avaliados (AURICCHIO & BACCHI, 2003).

Brasil, Cuba, Índia, Jordânia, México são exemplos de países que possuem flora diversificada e rica; nesses países, as plantas têm sido utilizadas com agentes antifúngicos e antibacterianos (REHDER *et al.*, 2004; AHMAD & BEG, 2001; MAHASNEH *et al.*, 1999; MARTINEZ *et al.*, 1996; NAVARRO *et al.*, 1996). O Brasil é o país de maior diversidade do planeta, foi o primeiro signatário da convenção sobre diversidade biológica (CDB), é considerado pela Conservação Internacional (CI, 1999) (http://www.conservation.org.br) como país megabiodiverso que congrega pelo menos 70% das espécies vegetais e animais existentes. A biota terrestre brasileira tem a flora mais rica do mundo, com 56.000 espécies de plantas (IBAMA, 2003) catalogadas e distribuídas nos seis maiores biomas, entre eles o Cerrado (DIAS, 1996).

I.6 – O gênero *Hyptis*

Sabe-se que o gênero *Hyptis* é composto por ervas, subarbustos, arbustos ou raramente árvores de pequeno porte. Os caules seguem padrão quadrangular, as folhas são opostas, simples ou, em alguns casos, partidas, pecioladas ou sésseis, ou curtamente pedunculadas, contendo substâncias aromáticas (BORDIGNON, 1990).

Este gênero é composto por cerca de 350 espécies exclusivamente neotropicais, distribuídas desde o sul dos Estados Unidos e Caribe até a Argentina, excluindo-se somente o extremo sul. Algumas espécies invasoras são bem estabelecidas na Ásia, África e norte da Austrália. O centro da diversidade do gênero se encontra nos campos Cerrados do Brasil Central, mais especificamente nos Estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás (BORDIGNON, 1990). Seus representantes se constituem uma importante fonte de constituintes bioativos com importantes propriedades, tais como atividades antimicrobianas (OLIVEIRA *et al*., 2004), citotóxicas e inseticidas (PORTER *et al*., 1995).

Uma grande diversidade morfológica de plantas desse gênero é encontrada no Cerrado, sendo que suas espécies são ricas em óleos essenciais e utilizadas popularmente no tratamento de infecções gastrintestinais, cólicas, dores, infecções cutâneas e reumatismo (FÁTIMA *et al*., 2004), além de serem considerados potentes agentes antiinflamatórios e antiinfecciosos, especialmente contra infecções causadas por bactérias (BISPO *et al*., 2001). Apesar disso, apenas 25 espécies de *Hyptis* foram estudadas do ponto de vista da etnofarmacologia, da farmacologia e da composição química (NOVELO *et al*., 1993).

Estudos realizados sobre os componentes de espécies do gênero *Hyptis* revelaram a presença de diterpenóides (FRAGOSO-SERRANO *et al.*, 1999; OHSAKI *et al.*, 2005), flavonóides (PEREDA-MIRANDA *et al.*, 1990), ligninas (NOVELO *et al.*, 1993; KUHNT, *et al.*, 1994) e derivados pirona (PEREDA-MIRANDA *et al.*, 1990; BOALINO *et al.*, 2003).

A espécie *Hyptis ovalifolia*, popularmente conhecida como malva-do-cerrado, é utilizada popularmente no tratamento de reumatismo. Essa espécie é uma erva perene, de 0,80-1,30m de altura, sendo encontrada nos Estados de Goiás, Mato Grosso e Minas Gerais, geralmente em grandes populações nas áreas de ocorrência, podendo ser encontradas em afloramentos rochosos e solos arenosos (BORDIGNON, 1990).

O interesse químico e biológico na espécie *H. ovalifolia*, deveu-se ao grande potencial observado para o gênero. Desta forma, o extrato etanólico, as frações e o óleo essencial das folhas de *H. ovalifolia* foram testados frente à 28 isolados clinicos de *Cryptococcus neoformans* (PAULA *et al*., 2001). O extrato bruto etanólico foi ensaiado frente a 30 isolados clínicos dos seguintes dermatófitos: *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Em todos os ensaios foi observada atividade inibitória das frações testadas.

A argentilactona também foi identificada como molécula bioativa em ensaios bio-guiados utilizando microorganismos patogênicos humanos como *Trypanosoma cruzi* (FÁTIMA *et al.*, 2006), *Plasmodium falciparum* (CARMONA *et al.*, 2006), *Leishmania amazonensis* (WAECHTER *et al.*, 1997) e *Leishmania panamensis* (CARMONA *et al.*, 2006), além de estudos que analisaram a influência sobre células cancerígenas (FÁTIMA *et al.*, 2004). Diante de tais evidências, esta molécula, análoga estrutural da incrustoporina, e encontrada em grande quantidade na espécie *H. ovalifolia*, é um modelo apropriado para gerar futuros derivados candidatos a antifúngicos.

II – JUSTIFICATIVA

Devido à elevada taxa de indivíduos acometidos pela PCM no Brasil, principalmente nos Estados de Goiás, Mato Grosso e São Paulo, vários projetos têm sido desenvolvidos visando à identificação e caracterização estrutural e funcional de genes de *P. brasiliensis.* Em uma etapa pós-genômica, utilizando-se ferramentas de bioinformática, foi possível identificar genes/proteínas específicos do fungo e ausentes em humanos. Dessa forma, espera-se que inibidores para esses genes/proteínas 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.

Nesse sentido, a isocitrato liase, enzima chave do ciclo do glioxalato (via metabólica ausente em vertebrados), adquire notada relevância, uma vez que representa um importante papel na virulência do fungo dentro do hospedeiro, já que é ativada quando células fúngicas são fagocitadas por macrófagos, garantindo assim a sobrevivência do fungo (LORENZ, 2002). No interior dos macrófagos há uma limitação de glicose e sua produção é a principal função do ciclo do glioxalato (SELITRENNIKOFF, 2003). Isocitrato liase quebra compostos de dois carbonos para a obtenção de energia.

Sendo assim, propõe-se a busca de inibidores provenientes de plantas do bioma Cerrado, da região Centro-Oeste, pois este apresenta grande diversidade taxonômica, com muitas espécies endêmicas, as quais são responsáveis pela produção de uma enorme variedade de metabólitos. Muitas plantas do Cerrado têm sido usadas na medicina pela população local para tratamento de doenças tropicais, incluindo Leishmaniose, Malária, Schistosomose e infecções bacterianas e fúngicas, dentre outras. A eficácia e terapêutica desses extratos crus ou de compostos isolados obtidos de plantas têm sido pouco estudadas.

Nesse trabalho, foi avaliada a capacidade inibitória do composto argentilactona, obtido a partir de exemplares do gênero *Hyptis*, bem como de seus análogos, sobre *P. brasiliensis* e a enzima recombinante isocitrato liase (*Pb*ICL), visando a busca de novos compostos com propriedades antifúngicas. A seleção dessa molécula e de seus análogos sintéticos obtidos, foi também pautada nas semelhanças estruturais e físico-quimicas com os inibidores já descritos na literatura para a referida enzima, como os ésteres derivados de ácido itacônico e sesterpenos.

A argentilactona é proposta aqui como um modelo apropriado para gerar futuros derivados candidatos a antifúngicos, pois apresenta uma estrutura lipofílica, pequena e de baixa complexidade estrutural. Os estudos realizados, que avaliaram a atividade inibitória dessa molécula diretamente sobre a proteína recombinante *Pb*ICL e sobre o fungo *P. brasiliensis*, podem permitir o desenho de candidatos a fármacos mais potencializados. Os resultados provenientes do desenvolvimento desse trabalho apresentam potencial de utilização para outros patógenos, visto que a enzima ICL também é encontrada em outras espécies, tais como, *Mycobacterium tuberculosis*, *Trypanosoma cruzzi* e *Plasmodium falciparum.*

III – OBJETIVOS

O estudo de proteínas-específicas presentes em patógenos e ausentes em hospedeiros como possíveis alvos para antifúngicos, tem sido motivo de interesse em diferentes grupos de pesquisa. Em nosso grupo de trabalho, a enzima *Pb*ICL adquire notada relevância.

Visando este enfoque, o presente estudo teve os seguintes objetivos:

i. Estudo da influência de argentilactona e seus análogos diretamente sobre células leveduriformes de *P. brasiliensis*;
ii. Avaliação da atividade inibitória de argentilactona e derivados sobre o processo de diferenciação de micélio para levedura em *P. brasilienis*;
iii. Efeito inibitório de argentilactona e seus análogos sobre a atividade de *Pb*ICL nativa presente no extrato protéico bruto de *P. brasiliensis*;
iv. Análise da influência do produto natural argentilactona e seus análogos obtidos sobre a atividade da enzima recombinante *Pb*ICL;
v. Definição, através de estudos de parâmetros cinéticos, do tipo de inibição promovida pela argentilactona e pelos análogos obtidos sobre a enzima recombinante *Pb*ICL.

IV- MANUSCRITO

Inhibition of *Paracoccidioides brasiliensis* isocitrate lyase by the natural product argentilactone

Renata Silva do Prado[1], Cecília Maria de Oliveira[2], Cirano José Ulhoa[3], Célia Maria de Almeida Soares[1] and Maristela Pereira[1#]

[1]Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, 74001-970, Goiânia, Goiás, Brazil; [2]Laboratório de Produtos Naturais, Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil ; [3]Laboratório de Enzimologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.

Renata Silva do Prado (renata.ufg@hotmail.com)

Cecília Maria de Oliveira (cecilia@quimica.ufg.br)

Cirano José Ulhoa (ulhoa@icb.ufg.br)

Célia Maria de Almeida Soares (Celia@icb.ufg.br)

Maristela Pereira (mani@icb.ufg.br)

[#]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 fungus *Paracoccidioides brasiliensis* is the causative agent of paracoccidioidomicosys (PCM), the most prevalent human systemic mycosis in Latin America. The toxicity of drugs and the appearance of resistant strains have imposition the search for new therapeutic approaches. Plants with reputed antimicrobial uses represent a rich source for the screening of potential antifungal compounds. In this work, we investigated the inhibitory action of argentilactone, extracted from the essential oil of *Hyptis ovalifolia*, and its analogues on *P. brasiliensis* yeast cells, during the differentiation from mycelium to yeast, on native and recombinant *Pb*ICL. Sensitivity tests on plates, which assessed the activity of argentilactone on yeast cells of *P. brasiliensis* showed both argentilactone as reduced argentilactone interfered in fungus growth, affecting the cells in a dose-dependent way. The experiments evaluating the minimum inhibitory concentration (MIC), which evaluated the influence of the compounds during the transition from mycelium to yeast in *P. brasiliensis* showed that argentilactone and reduced argentilactone interferes in this process, also in a dose-dependent way. A specific activity of isocitrate lyase of the fungus, both recombinant as native, as measured by tests of enzyme activity was also affected by the compounds. The type of inhibition promoted by argentilactone and reduced argentilactone was defined as inhibition of mixed type through tests of enzyme kinetics. Different carbon sources (acetate and glucose) have directly influence on the processs of inhibition. The analogues epoxy argentilactone and diol argentilactone not inhibit the growth and differentiation of *P. brasiliensis*. In addition, it not inhibited the enzyme isocitrate lyase native or recombinant.

Introduction

The Brazilian flora, especially the savannah biome, has a high therapeutic potential. Then compounds extracted from essential oil and crude extracts of these plants need to be studied (ALVES *et al.,* 2000; HOLETZ *et al.,* 2002; SOUZA *et al.,* 2002). Products derived from plants have gained relevance in the development of new drugs; of all drugs approved in recent years, 40% are natural products or derivatives and analogues (LEE, 2004; BUTLER, 2004; CLARDY *et al.,* 2004). The argentilactone is a biologically active molecule that has been isolated from *Aristolochia argentina* (Aristolochiaceae) (PRIESTAP *et al.,* 2007), *Chorisia crispflora* (Bombaceae) (MATSUDA *et al.,* 1994), *Annona Haematantha* (Annonaceae) (WAECHTER *et al.,* 1997) and *Hyptis ovalifolia* (Lamiaceae) (OLIVEIRA *et al.,* 2004). This molecule showed antiproliferative activity in cancer cells (FÁTIMA *et al.,* 2004), activity against the protozoan *Plasmodium falciparum*, *Leishmania panamensis* (CARMONA *et al.,* 2003), *Leishmania amazonensis* (WAECHTER *et al.,* 1997) and *Trypanosoma cruzi* (FÁTIMA *et al.,* 2006), and antifungal activity against the dermatophytes *Microsporum canis, Microsporum gypseum, Trycophyton mentagrophytes* and *Trycophyton rubrum* (OLIVEIRA *et al.,* 2004). However, none study was been realized yet to fungi that cause systemic mycosis.

The dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* is the causative agent of paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic granulomatous mycosis (LUTZ, 1908). It is an endemic disease in Latin America, which usually affects rural workers. Approximately 10 million people may be infected with the fungus, while about 2% develop the disease (MCEWEN *et al.,* 1995). In the period between 1980 and 1995 in Brazil, 3,181 people died (COUTINHO *et al.,* 1999), and the increased incidence can be explained by increased deforestation and development of new areas, as well as the number of immunodeficient patients (WANKE *et al.,* 1994; CORTI *et al*., 2003). High drug toxicity (TRAVASSOS *et al*. 2008) and the appearance of resistant or multi-

resistant strains (YASUDA, 2005; HAHN *et al*., 2003), further complicate the long-term treatment of infections which in turn creates the need to search and develop new therapeutic approaches.

In this way, we have investigated genes present in *P. brasiliensis* and absent in human aiming search for inhibitors non toxic to human. Transcripts from diverse *P. brasiliensis* transcriptome projects were analyzed and identified by using bioinformatic tools. Among them is isocitrate lyase (*Pbicl*), which codify to isocitrate lyase (*Pb*ICL) key enzyme that acts in the glyoxylate cycle. It was initially discovered in microorganisms, is present in most prokaryotes, lower eukaryotes, and plants, but not in vertebrates (VANNI *et al.*, 2005). *Pbicl* is up regulated in yeast cells (FELIPE *et al*., 2005), during transition from mycelium to yeast (BASTOS *et al*., 2007; GOLDMAN *et al*., 2003), during infection process (COSTA *et al*., 2007), and during internalization by macrophages (DERENGOWSKI *et al.*, 2008).

It was shown that isocitrate lyase and the entire glyoxylate pathway enzymes are induced under conditions of low glucose, low oxygen tension, in the presence of acetate, ethanol and high temperatures (EBEL *et al*., 2006; RUDE *et al*., 2002; BENTRUP *et al*., 1999; BOWYER *et al*., 1994; DELUCAS *et al*., 1994; FERNANDEZ *et al*., 1993; WAYNE AND LIN, 1982). Furthermore, isocitrate lyase is induced during intracellular growth of several pathogens and it has been assumed that isocitrate lyase and the entire glyoxylate cycle are involved in the virulence and pathogenicity of human pathogenic bacteria like *Mycobacterium tuberculosis* and human pathogenic fungi such as *Candida albicans* (MCKINNEY *et al*., 2000; MUÑOZ-ELÍAS & MCKINNEY, 2005; LORENZ & FINK, 2001). An important role of the glyoxylate cycle has also been shown for the plant pathogenic fungi *Magnaporthe grisea* and *Leptosphaeria maculans* (WANG *et al*., 2003; IDNURM & HOWLETT, 2002).

The aim of this work was to investigate the inhibitory action of argentilactona and its analogues, on *P. brasiliensis* yeast cells, during the differentiation from mycelium to yeast, as well as on native and recombinant *Pb*ICL.

Results and Discussion

In this study, we verified the activity of argentilactone from *H. ovalifolia*, and analogues synthesized from argentilactone (Fig 1), against the human pathogenic dimorphic fungus *P. brasiliensis* and native and recombinant *Pb*ICL. Since pathogenic microorganisms utilize either different carbon sources during pathogenesis (Barelle *et al*., 2006) we evaluated the *P. brasiliensis* yeast cells growth cultured in the presence of glucose or acetate as carbon source (Figure 2). The results showed an inhibition dose dependent of argentilactone under *P. brasiliensis* yeast cells growth when the fungus was cultured in the presence of glucose as carbon source. The inhibition of growth was higher in the presence of acetate (MIC=9 µg/mL) than glucose (MIC=18 µg/mL) (Fig 2A). Similar results were found to reduced argentilactone (Fig 2B). Sub inhibitory concentration of argentilactone and reduced argentilactone was 36 µg/mL, however, a higher effect can be visualized to argentilactone, but the values of MIC found was 18 µg/mL for acetate and 36 µg/mL for glucose. A small effect on fungal growth was observed to epoxy argentilactone and diol argentilactone (Fig 2C and D, respectively). Ours results are according with Oliveira *et al*. (2004) that found a MIC value of 31.2 µg/mL argentilactone upon dermatophytes.

In the soil, *P. brasiliensis* grows as saprobic mycelium, resulting in the formation of propagules, which initiates the infection in humans when inhaled into the respiratory tract. Subsequently, in the lung, the mycelia propagules develop into yeast cells. The ability of *P. brasiliensis* to grow in the mycelia form in the soil and shift to the yeast form in the host is important for infection and disease (FRANCO, 1987; SAN-BLAS *et al.,* 2002). Once introduced into the host, the mycelial propagules have to

convert to yeasts, a condition essential for the fungus to survive and proliferate (HOLETZ *et al.,* 2002; SOUZA *et al.,* 2002). The mycelium to yeast transition can be replicated *in vitro* by growing mycelia in conditions of elevated temperature (BONFIM *et al*., 2006). In this way, we evaluate if argentilactone and analogous interfere in the dimorphic transition of *P. brasiliensis* from mycelium to yeast cultured in the presence of glucose or acetate as carbon source. The results showed an inhibition dose dependent of argentilactone under the dimorphism of *P. brasiliensis* when the fungus was cultured in the presence of glucose or acetate (Fig 3). Ten days after change temperature culture from 23°C to 36°C, the inhibition of dimorphism was higher in the presence of acetate than glucose. Although the effect has been less, similar results were found to reduced-argentilactone. The analogous epoxy argentilactone and diol argentilactone do not interfere on dimorphism process.

The results showed that argentilactone and reduced argentilactone, with less intensity, interfered on *P. brasiliensis* grown and dimorphism. In addition, the effect was higher in the presence of acetate then glucose as carbon source. Most microorganisms capable to utilize acetate or other fatty acids as the sole carbon source employ the glyoxylate cycle for the anaplerosis of oxaloacetate, which is dispensable during growth on glucose. Thereby, the glyoxylate cycle and the tricarboxylic acid (TCA) cycle must operate simultaneously, because some reactions from the glyoxylate cycle are shared with that of the TCA cycle (EBEL *et al*., 2006; VALENCIANO *et al*., 1998; AMOR *et al*., 2000). The key enzymes of the glyoxylate cycle consist of isocitrate lyase and malate synthase, which are assumed to function solely in the glyoxylate cycle (KORNBERG & KREBS, 1957). Only one isocitrate lyase gene has been identified in the genome of *P. brasiliensis* isolate *Pb*01 (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis.2/MultiHome.html). Interestingly, *Pbicl* (FELIPE *et al*., 2005) and *Pbmls* (NUNES *et al*., 2005) transcripts were found to be highly abundant in *P. brasiliensis* yeast cells and up-

regulation occurred during transition from mycelium to yeast (BASTOS *et al*., 2007), as well as, during the infection process (COSTA *et al.,* 2007) and internalization by macrophages (DERENGOWSKI *et al.,* 2008). Therefore, a special importance of the glyoxylate cycle during pathogenesis of *P. brasiliensis* was assumed.

In this way, we investigated if argentilactone and analogues interfere on native *Pb*ICL activity from crude extract of *P. brasiliensis* yeast cells. According to Cruz *et al.* (*in preparation*) the highest specific activity of this enzyme was obtained after growth in the presence of acetate (0.250 U/mg), at glucose the specific activity was the lowest (0.036 U/mg). As shown on table 1, argentilactone and reduced argentilactone inhibited *Pb*ICL activity. The higher inhibition was observed in the presence of acetate (IC_{50}=50 µM), condition which the enzyme is more active, than glucose (IC_{50}=80 µM). According Cruz *et al.* (*in preparation*) the total *Pb*ICL protein level in glucose grown cells is slightly lower that from acetate grown cells, but the *Pb*ICL specific activity in yeast cells grown on glucose was much lower than expected from the protein abundance due a post-translational regulation of enzymatic activity. The less *Pb*ICL inhibition by argentilactone in the presence of glucose seems to be due to high quantity of *Pb*ICL inactive, which binds to argentilactone. None inhibition could be observed to epoxy argentilactone or diol argentilactone.

The inhibition of argentilactone and analogues was also investigated to recombinant *Pb*ICL (Table 1). Recombinant *Pb*ICL inhibition was higher in the presence of argentilactone (IC_{50}: 28.8 µM) than reduced argentilactone (IC_{50}: 30.2 µM). On the other hand, epoxy argentilactone and diol argentilactone was inactive against *Pb*ICL. Lee *et al.* (2009) showed an inhibitory activity of 5-Hydroxyindole-type alkaloids, a compound from the tropical sponge Hyrtios sp, against isocitrate lyase of *C. albicans* with an IC_{50} value of 89.0 µM. In this way, we can conclude the argentilactone is a potent inhibitor of *Pb*ICL.

The kinetic constants K_m and $V_{máx}$ values were in the presence of argentilactone and reduced argentilactone change (Table 2), when compared to controls, which features a mixed type of inhibition, where it can be inferred that the inhibitor to bind the enzyme in places other than the active site, or to bind to the enzyme-substrate complex.

Conclusion

The compound argentilactone inhibited *Pb*ICL activity, *P. brasiliensis* yeast cells growth, and differentiation from mycelium to yeast indicating to be an excellent candidate model for antifungal. The less inhibition found to reduced-argentilactone and the no inhibition of epoxy argentilactone and diol argentilactone when compared to argentilactone could be probably due to change in polarity of the molecules.

Experimental

Extraction of argentilactone

The essential oil of *Hyptis ovalifolia* was obtained from fresh leaves by hydrodistillation in a Clevenger-type apparatus for five hours. The aqueous phase was extracted with diethyl ether. The organic phase was dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated under N_2 to yield 0.05 % of the essential oil based on the weight of the fresh leaves. The identification of the compounds was based on the comparison of their retention indices and on mass spectra comparison with data of the literature7 as well as by computerized matching of the acquired mass spectra with of the GC/MS data system. Separation of compound **1** was performed by CC using silica gel (Merck) and hexane - ethyl ether (4:1). Compound (**1**): [α]D: -21° (*c* 2.0, CHCl3) (literature value of -21° (EtOH)).8 IR (KBr) vmax/cm-1: 2928, 1723, 1380. EIMS *m/z* (rel. int.): 194 [M]+· (3), 97 (20), 68 (100); ^{1}H NMR (CDCl3, 300 MHz): δ H 6.90 (ddd, *J* 9.8, 5.4 and 3.0 Hz, 1H, H-4), 6.05 (ddd, *J* 9.8, 2.4 and 1.2 Hz, 1H, H-5), 5.66 (dtd, *J* 11.1, 7.5 and 0.9 Hz, 1H, H-2'), 5.56 (ddt, *J* 11.1, 8.4 and 1.5 Hz, 1H, H-1'),

5.22 (ddd, *J* 10.2, 8.4 and 5.5 Hz, 1H, H-2), 2.40 (m, 2H, H-3), 2.10 (m, 2H, H-3'), 1.40-1.30 (m, 6H, H-4', H-5'and H-6'), 0.89 (t, *J* 6.6 Hz, 3H, H-7').^{13}C NMR (CDCl3, 75.4 MHz) δ C 164.3 (C-6), 145.0 (C-4), 135.6 (C-2'), 126.3 (C-1'), 121.6 (C-5), 73.7 (C-2), 31.1 (C-5'), 29.6 (C-3), 28.8 (C-4'), 27.5 (C-3´), 22.2 (C-6'), 13.7 (C-7´).

Epoxidation of Argentilactone

M-cloroperbenzoic acid (85%, 1.0 g) was added to a stirred solution of argentilactone (0.8g, 4.5 mmol) in dry CH_2Cl_2 (10mL) and the mixture was allowed to a stand at room temperature for 2 days. The CH_2Cl_2 solution was washed with 10% aqueous $NaHCO_3$ (3x25mL), dried (Na_2SO_4) and evaporated. Cromatography of the crude product afforded the oil epoxide 2 (500 mg). **Epoxide 2** : ^{13}C NMR δ 162.8 (C-1), 121.4 (C-2), 144.6 (C-3), 27.6 (C-4), 74.6 (C-5), 57.6 (C-6), 56.3 (C-7), 27.3 (C-8), 26.0 (C-9), 31.5 (C-10).

***P. brasiliensis* isolate and culture conditions**

The *P. brasiliensis Pb*01 isolate (ATCC-MYA-826) was previously investigated in our laboratory and was cultivated in Fava-Netto agar 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, 1961) at 36ºC for growth of the yeast-like phase and at 23ºC for mycelium phase.

Transition from mycelium to yeast

The differentiation from mycelium to yeast was performed in Mc Veigh and Morton (MMcM) liquid minimal medium (Restrepo and Jiminez, 1980), containing glucose (0.11 M) or acetate (0.28 M) as carbon source. The cultive temperature was changed from 23°C to 36°C to allow the mycelium to yeast transition. The cells were previously

grown in liquid medium for 18 h before changing the incubation temperature, which was maintained for 10 days.

Sensibility test plate

To the sensibility test plate, 7 days old *P. brasiliensis* yeast cells were grown in liquid MMcM overnight at 37ºC. Samples containing 10^5, 10^4, and 10^3 cells were spotted onto plates in MMcM agar medium supplemented with argentilactone, reduced-argentilactone, epoxy-argentilactone or diol-argentilactone at concentrations of 09 µg/mL, 18 µg/mL, 36 µg/mL or 72 µg/mL. Control plates were performed without any inhibitor. The plates were incubated for 6-7 days at 36ºC before being photographed.

Protein extraction from *P. brasiliensis* yeast cells

P. brasiliensis yeast cells, grown for 24 h in liquid minimal MMcM medium containg glucose or acetate as carbon source, were centrifuged for 5 min at 2,500 × *g*. Proteins were extracted as described previously for *A. fumigatus* (Ebel *et al*., 2006) with some modifications. The cells were washed with sterilized water and frozen in liquid nitrogen. The material was ground to a fine powder; resuspended in 500 µL of 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) supplemented with 1 mM dithiothreitol (DTT) and vigorously mixed with glass beads for 20 min at 4ºC. Cell debris was removed by centrifugation for 15 min at 4ºC and 5,000 × *g*. The supernatant was taken and centrifuged for 15 min at 4ºC and 12,000 × *g*. The cell free extract was used in isocitrate lyase activity assays or stored at -20ºC for further analyses. Quantification of the protein content was performed according to Bradford (Bradford, 1976).

Heterologous expression and purification of *Pb*ICL recombinant protein

The cDNA of the *Pbicl* sequence was amplified by PCR from the cDNA library, which derived from the mycelium to yeast transition (Bastos *et al*., 2007). As oligonucleotides

for the amplification ICL-PS (5` ACGGGATCCATGGATTCTATCG 3`) and ICL-PA (5` GTGCGCTCGAGCTATTTGAATTG 3`) were used, which contained a *Bam*HI or *Xho*I restriction site (underlined), respectively. The PCR conditions were as follows: initial denaturation at 94°C for 3 min followed by 35 cycles at 94°C (1 min 30 s), 58°C (2 min), 72°C (1 min 30 s) and a final extension at 72°C (10 min). The PCR product was restricted with *Bam*HI and *Xho*I, which allowed the in-frame insertion of *Pbicl* cDNA into the *Bam*HI-*Xho*I cloning sites of the pET-32a(+) expression vector (Novagen, Inc., Madison, Wis.), which leads to the control of gene expression by the bacteriophage T7 lac promoter. The vector contains a complete 109 amino acid Trx-tag followed by a His-tag and an enterokinase cleavage site, which allows purification of the recombinant enzyme by Ni-chelate chromatography and subsequent removal of the tags. The resulting plasmid was transferred to *E. coli* BL21 C43 (DE3) cells and expression was induced at an OD_{600} of 0.6 by the addition of 1 mM (final concentration) isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). After induction, the cells were incubated for 2 h at 37°C with shaking at 200 rpm. Cells were harvested by centrifugation at 10,000 × *g* for 5 min at 4°C. The supernatant was discarded and the cells were resuspended in 1 × PBS buffer. *E coli* cells were incubated for 30 min with 100 μg/mL of lysozyme and lysed by extensive sonication (Four times of sonication for 10 min in an Ultrasonic cleaner_odontobrás 1440 DA sonicator, by 1 min of agitation in vortex-mode with glass beads and pauses of 5 min on ice). The sample was centrifuged at 4°C and 8,000 × *g* for 15 min and the supernatant, which contained the soluble protein fraction, was collected. Native His-tagged isocitrate lyase was purified by using the Ni-NTA Spin Kit (Qiagen Inc., Germantown, MD) and the tags were subsequently removed by the addition of EKMax™ Enterokinase (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Determination of enzymatic activity

ICL activity was determined according to Ebel *et al*. (2006). Reactions were performed in 1 mL assay volume containing: 2 mM threo-D,L-isocitrate (effective concentration of threo-D-isocitrate 1 mM), 2 mM $MgCl_{2,}$ 10 mM phenylhydrazine HCl, 2 mM dithiothreitol, and 50 mM Ttris HCl buffer at pH 7.0. The product glyoxylate-phenylhydrazone was followed at 324 nm using an extinction coefficient of 16.8 $mM^{-1}cm^{-1}$. One unit of enzyme activity is defined as the formation of 1 μmol of glyoxylate-phenylhydrazone per minute using threo-D,L-isocitrate as a substrate. The Specific activities are given as U/mg protein.

Measurements of steady-state kinetic parameters

In order to determine the steady-state kinetic parameters recombinant *Pb*ICL, glyoxylate-phenylhydrazone formation were measured at 324 nm in a spectrophotometer. A linear regression module was used to calculate Km^{ICL} and $Vmáx^{ICL}$ transformed the data into a Lineweaver-Burk plot and calculated the *x*- and *y*-*intercept* values in secondary plots.

Acknowledgements

This work at Universidade Federal de Goiás was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), e International Foundation for Science (IFS).

References

Amor, C., Domínguez, A. I., De Lucas, J. R., and Laborda, F. *Arch Microbiol* **2000**, *174*, 59.

Alves, T. M. A; Silva, A. F.; Brandão, M. *et al*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **2000**, *95*, 367.

Barelle, C. J.; Prieste, C. L.; MacCallum, D. M.; Gow, N. A. R.; Odds, F. C.; Brown, A. J. P. *Cell Microbiol.* **2006**, *8(6*), 961.

Bastos K.P.; Bailão A.M.; Borges C.L.; Faria F.P.; Felipe M.S.S.; Silva M.G.; Martins W.S.; Fiúza R.B.; Pereira M.; Soares C.M.A. *BMC Microbiol.* **2007**, *7*, 43.

Bentrup, K. H. Z., Miczak, A., Swenson, D. L., and Russel, D. G. *J Bacteriol.* **1999**, *181*, 7161.

Bowyer, P., De Lucas, J. R., and Turner, G. *Mol Gen Genet*. **1994**,*242*, 489.

Bonfim, S. M.; Cruz, A. H.; Jesuíno, R. S.; Ulhoa, C. J.; Molinari-Madlum E. E.; Soares C. M.; Pereira M. *FEMS Immunol Med Microbiol* **2006**, *46(2)*, 269.

Butler, M. S. *et al. J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 2141.

Carmona, D.; Sáez, J.; Granados, H.;. Pérez, E.; Blair, S.; Angulo, A.; Figadere, B. *Nat. Prod. Res.* **2003**, *17*, 275.

Clardy, J.; Walsh, C. *Nature*. **2004**, *432*, 829.

Corti M; Palmieri O; Negroni R; Soto I; Villafane M. F. *Medicina.* **2003**, *63*, 417.

Costa, M., Borges, C.L., Bailão, A.M., et al. *Microbyology,* **2007**, *153*, 4194.

Coutinho, Z.F., Lazera, M. S., Petri, V., Sabroza, P.C., Kawa, H., Silva, D & Wanke, B. *VII Encontro Internacional sobre Paracoccidioidomicose*. **1999**, 12 .

De Lucas, J. R., Valenciano, S., Laborda, F., and Turner, G. *Arch Microbiol*. **1994**,*162*, 409.

Derengowski, L. S.; Tavares, A. H., Silva, S.; Procópio, L. S.; Felipe, M. S.; Silva-Pereira, I. *Med Mycol.* **2008**, *46*, 125.

Ebel, F.; Schwienbacher, M.; Beyer, J.; Heesemann, J.; Brakhage, A.A.; Brock, M. *Genetics and biology*. **2006**, *43*, 476.

Fátima, A.; Kohn L. K.; Antonio, M. A.; Carvalho, J. E.; Pilli, R. A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* **2004**, *12*, 5437.

Fátima A.; Marquissolo C.; Alburquerque S.; Carraro-Abrahão A. A.; Pilli, R. A. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2006**, *41,* 1210.

Felipe, M.S.S., Andrade, R.V., Arrraes, F.B.M., nicola, A.M., Maranhão, A.Q., Torres, F.A.G., Silva-Pereira, I., Poças-Fonseca, M.J., Campos, E.G., Moraes, L.M.P., Andrade, P.A., Tavares, A.H.F.P., Silva, S.S., Kyaw, C.M., Souza, D.P., Network P, Pereira, M., Jesuíno, R.S.A., Andrade, E.V., Parente, J.A., Oliveira, G.S., Barbosa, M.S., Martins, N.F., Fachin, A.L., Cardoso, R.S., Passos, G.A.S., Almeida, N.F., Walter, E.M.T., soares, C.M.A., Carvalho, M.J.A., Brígido, M.M. *J Biol Chem.* **2005**, 24714.

Fernandez, E., Fernandez, M., Moreno, F., and Rodicio, R. *FEBS J*. **1993**, *333*, 238.

Franco, M. *J Med Vet Mycol.* **1987,** *25*, 5.

Goldman G.H, dos Reis Marques E., Duarte Ribeiro D.C., de Souza Bernardes L.A., Quiapin A.C., Vitorelli P.M., Savoldi M., Semighini C.P., de Oliveira R.C., Nunes L.R., Travassos L.R., Puccia R., Batista W.L., Ferreira L.E., Moreira J.C., Bogossian A.P., Tekaia F., Nobreg M.P., Nobrega F.G., Goldman M.H. *Eukaryot Cell*. **2003n**, *2*, 34.

Hahn R.C ; Morato Conceição Y.T.; Santos N.L.; Ferreira J.F.; Hamdan J. S.(2003) *Mycoses.* **2003**, *46*, 342.

Holetz, F. B.; Pessini, G. L.; Sanches, N. R. *et al*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **2002**, *97*, 1027.

Idnurm, A., and Howlett, B. J. *Eukaryot Cell.* **2002**, *1*, 719.

Kornberg, H. L.; Krebs, H. A. *Nature* **1957**, *179*, 988.

Lee, K. H. *et al. J. Nat. Prod*. **2004**, *67*, 273.

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.

Lorenz, M.C. & Fink, G.R. *Nature* **2001**, *6842*, 83–86.

Lutz, A. *Brasil Med*. **1908**, *22*, 121.

Matsuda, M.; Endo, Y.; Fushiya, S.; Endo, T; Nozoe, S. *Heterocycles.* **1994**, *38*, 1229.

McEwen, J. A.; Garcia, A. M.; Ortiz, B. L.; Botero, S.; Restrepo, A. *Arch Med Res* **1995**, *26*, 305.

Mckinney, J.D., Höner zu Bentrup, K., Muñoz-Elias, E.J. et al. *Nature* **2000**, *17*, 735.

Muñoz-Elias, E., and McKinney, J. D. *Nat Med*, **2005**, *11*, 638.

Nunes, L.R.; Costa de Oliveira, R.; Leite, D.B.; da Silva, V.S.; dos Reis Marques. E.; da Silva Ferreira, M.E.; Ribeiro, D.C.; de Souza Bernardes, L.A.; Goldman, M.H.; Puccia, R.; Travassos, L.R.; Batista, W.L.; Nóbrega, M.P.; Nóbrega, F.G.; Yang, D.Y.; de Braganca; Pereira, C.A.; Goldman, G.H. *Eukaryot Cell*. **2005**, *4*, 2115.

Oliveira, C. M. A.; Silva, M. R. R.; Kato, L.; Silva, C. C.; Ferreira, H. D.; Souza, L. K. H. *J. Braz. Chem. Soc*. **2004**, *5*, 756.

Priestap, H. A.; Bonafede, J. D.; Ruveda, E. A. *Phytochemistry*. **2007**, 1579.

Restrepo, A., and Jiménez, B., 1980. *J Clin Microbiol* 12, 279-281.

Rude, T.H., Toffaletti, D.L., Cox, G.M., Perfect, J.R. *Infect. Immun*. **2002**, *70*, 5684.

San-Blas, G.; Niño-Vega, G.; Iturriaga, T. *Med. Mycol*. **2002**, *40*, 225.

Souza, L. K. H.; Oliveira, C. M. A.; Ferri, P. H. *et al*. *Braz J Microbiol*. **2002**, *33*, 247.

Travassos, L. R., Taborda, C. P., Colombo, A. L. *Expert review of anti-infective therapy*. **2008**, *6*, 251.

Valenciano, S., DE Lucas, J. R., Klei, I.V., Veenhuis, M., Laborda, F. (1998) *Arch Microbiol*. **1998**, *170*, 370.

Vanni, P.; Giachetti, E.; Pinzuati, G.; McFadden, B. A. *Comp. Biochem. Physiol. B* **1990**, *95*, 431.

Waechter, A. I.; Ferreira, M. E; Fournet, A.; Arias, A. R.; Nakayama, H.; Torres, S.; Hocquemiller, R.; Cave, A. *Planta Med.* **1997**, *63*, 433.

Wang, Z. Y, Thornton, C. R., Kershaw, M. J., Debao, L., and Talbot, N. J. *Mol. Microbiol*. **2003**, *47*, 1601.

Wayne, L. G., and Lin, A. Y. *Infect Immun*. **1982**, *37*, 1042.

Wanke B.; Londero A. T. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: Franco M.; Lacaz C. S.; Restrepo A.; del Negro G. (Eds). *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton: CRC press, 1994: 109-117.

Yasuda, M. A. S. *Expert Opinion* **2005**, *6*, 385.

Table 1: Inhibitory effect of argentilactone and analogues on the specific activity of *Pb*ICL.

Figure 1: Structures of argentilactone and analogues.

Figure 2: Effect of argentilactone and analogues on *P. brasiliensis* yeast cells growth. Samples containing 10^5, 10^4, and 10^3 *P. brasiliensis* yeast cells were spotted onto plates in MMcM agar medium containing glucose or acetate, and supplemented with argentilactone and analogues at different concentrations for seven days. **A)** Argentilactone; **B)** Reduced-argentilactone; **C)** Epoxy-argentilactone; **D)** Diol-argentilactone. The growth of yeast cells of *P. brasiliensis* was observed by spectrophotometer (520 nm) in medium containing glucose **(E)** or acetate **(F)**.

Figure 3: Effect of argentilactone and analogues on *P. brasiliensis* differentiation process from mycelium to yeast. Mycelium was incubated for 10 days at 36°C in MMcM agar medium containing glucose or acetate, and supplemented with different concentrations of argentilactone and analogues. Cell morphology was observed on optic microscopy in medium containing glucose **(A)** or acetate **(B)**. *P. brasiliensis* yeast cells were counted on Neubauer chamber in medium containing glucose **(C)** or acetate **(D)**.

Figure 1:

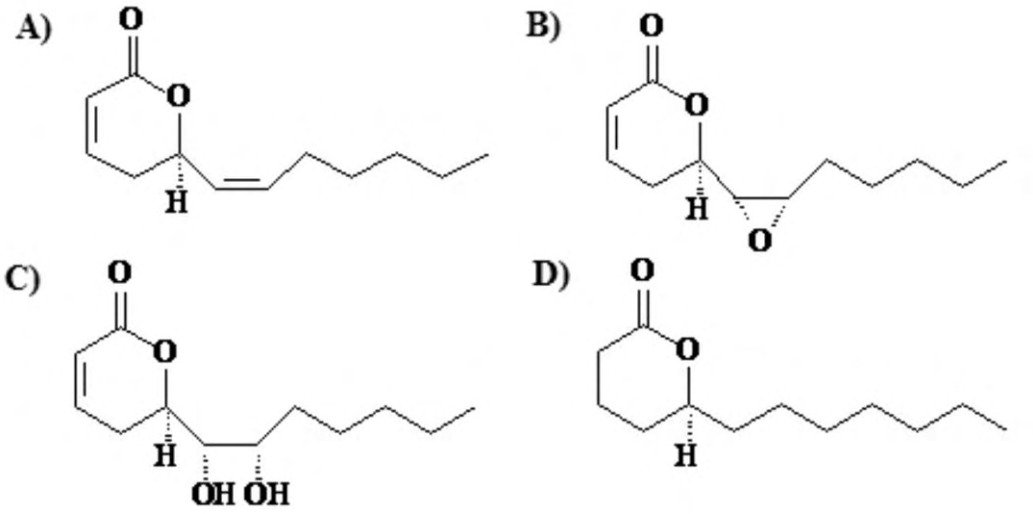


Figure 2:

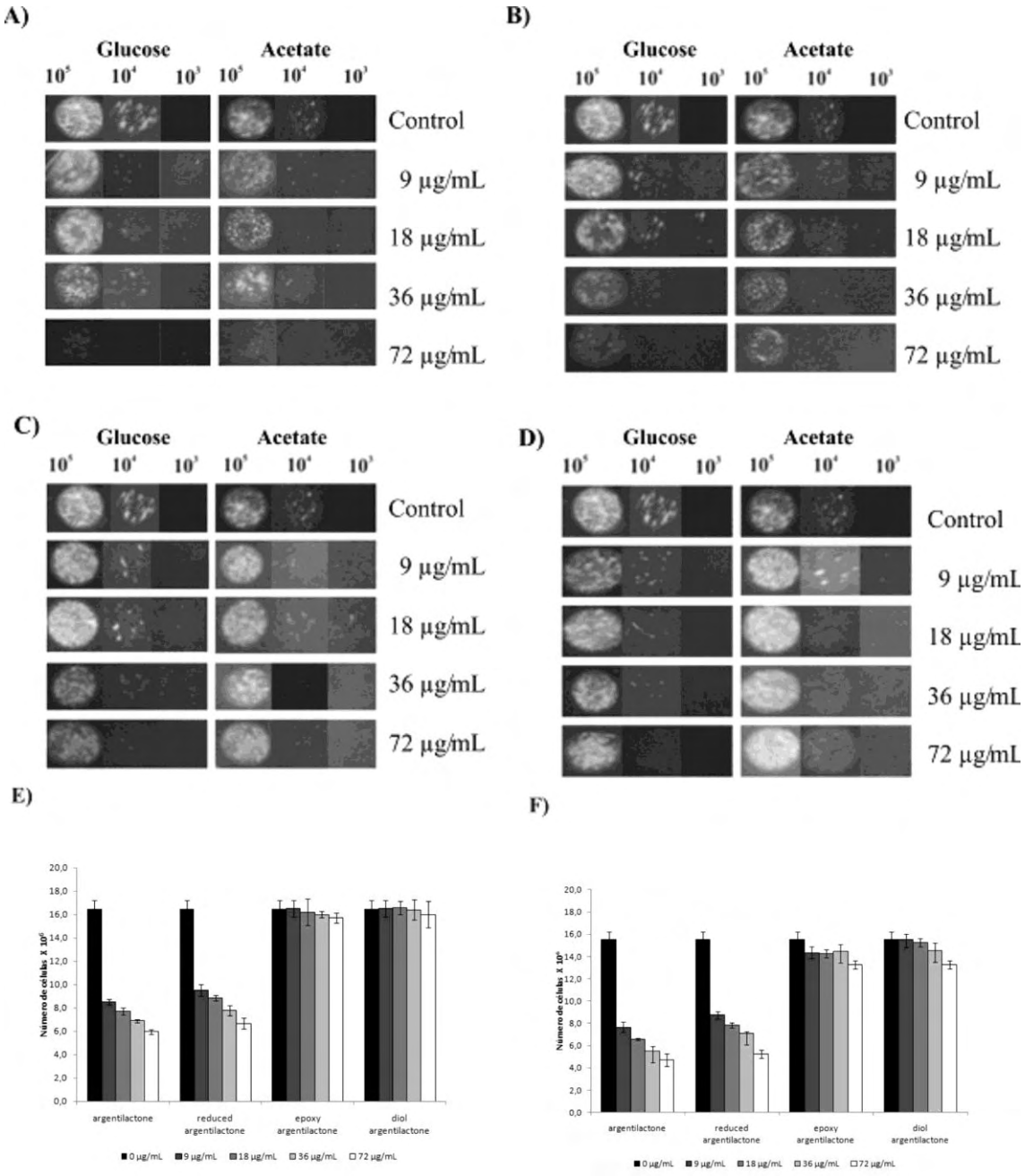
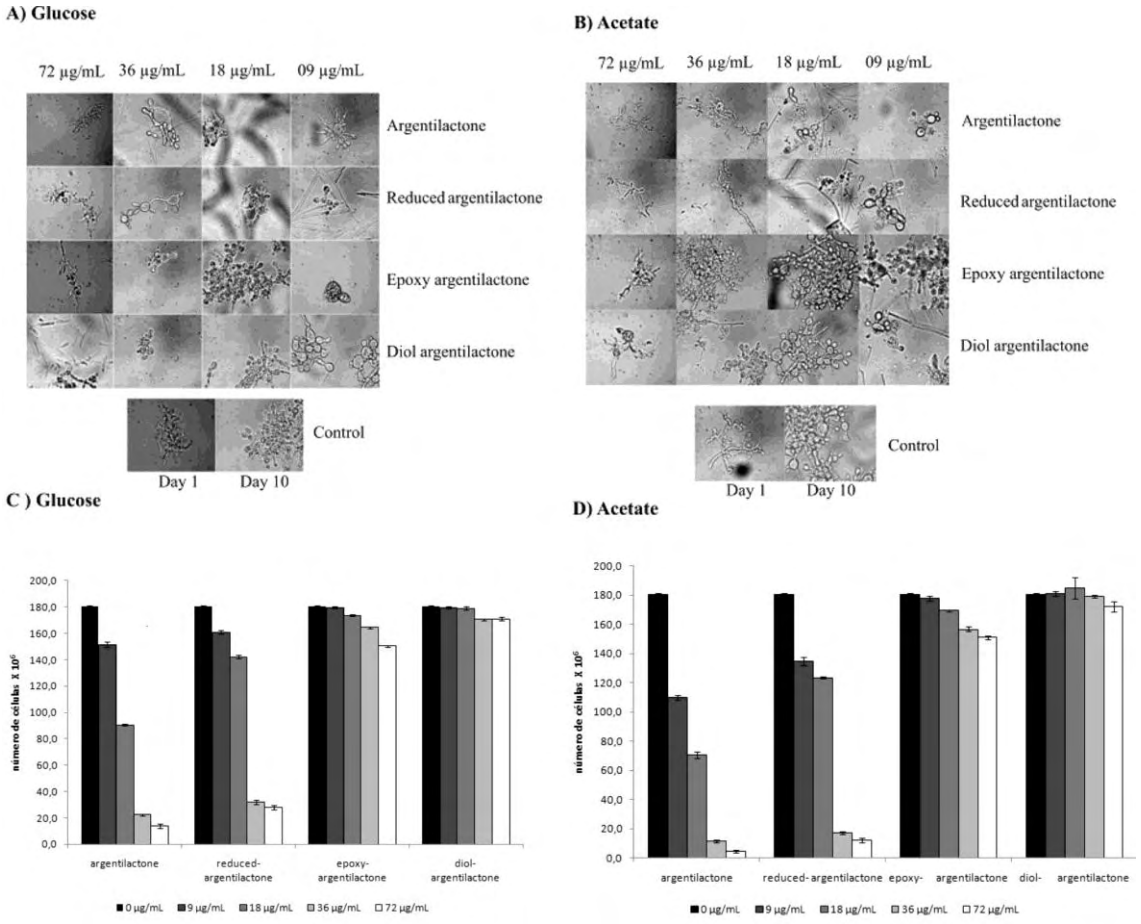

A)
Glucose
Acetate
10⁵ 10⁴ 10³ 10⁵ 10⁴ 10³
Control
9 µg/mL
18 µg/mL
36 µg/mL
72 µg/mL
B)
Glucose
Acetate
10⁵ 10⁴ 10³ 10⁵ 10⁴ 10³
Control
9 µg/mL
18 µg/mL
36 µg/mL
72 µg/mL
C)
Glucose
Acetate
10⁵ 10⁴ 10³ 10⁵ 10⁴ 10³
Control
9 µg/mL
18 µg/mL
36 µg/mL
72 µg/mL
D)
Glucose
Acetate
10⁵ 10⁴ 10³ 10⁵ 10⁴ 10³
Control
9 µg/mL
18 µg/mL
36 µg/mL
72 µg/mL
E)
Número de células X 10⁶
20,0
18,0
16,0
14,0
12,0
10,0
8,0
6,0
4,0
2,0
0,0
argentilactone
reduced argentilactone
epoxy argentilactone
diol argentilactone
0 µg/mL 9 µg/mL 18 µg/mL 36 µg/mL 72 µg/mL
F)
Número de células X 10⁶
20,0
18,0
16,0
14,0
12,0
10,0
8,0
6,0
4,0
2,0
0,0
argentilactone
reduced argentilactone
epoxy argentilactone
diol argentilactone
0 µg/mL 9 µg/mL 18 µg/mL 36 µg/mL 72 µg/mL

Figure 3:


A) Glucose
72 µg/mL
36 µg/mL
18 µg/mL
09 µg/mL
Argentilactone
Reduced argentilactone
Epoxy argentilactone
Diol argentilactone
Control
Day 1
Day 10
B) Acetate
72 µg/mL
36 µg/mL
18 µg/mL
09 µg/mL
Argentilactone
Reduced argentilactone
Epoxy argentilactone
Diol argentilactone
Control
Day 1
Day 10
C) Glucose
número de células X 10⁶
200,0
180,0
160,0
140,0
120,0
100,0
80,0
60,0
40,0
20,0
0,0
argentilactone
reduced-argentilactone
epoxy-argentilactone
diol-argentilactone
0 µg/mL
9 µg/mL
18 µg/mL
36 µg/mL
72 µg/mL
D) Acetate
número de células X 10⁶
200,0
180,0
160,0
140,0
120,0
100,0
80,0
60,0
40,0
20,0
0,0
argentilactone
reduced-argentilactone
epoxy-argentilactone
diol-argentilactone
0 µg/mL
9 µg/mL
18 µg/mL
36 µg/mL
72 µg/mL

Compound	IC_{50} (μM)			Specific activity (U*mg)		
	*Pb*ICL1	*Pb*ICLc#		*Pb*ICL1	*Pb*ICLc#	
		Acetate	Glucose		Acetate	Glucose
Control				2.55±0.2	0.080±0.4	0.010±0.2
Argentilactone	28.8±0.1	50±0.3	80±0.2	0.86±0.1	0.040± 0.1	0.008±0.3
Reduced argentilactone	30.2±0.1	60±0.2	85± 0.1	0.93±0.4	0.067± 0.4	0.009±0.3
Epoxy argentilactone	N.I.¥	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.
Diol argentilactone	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.

*Pb*ICL activity in the crude protein extract
*U=1 mol of glioxylate fenildrazone formed per minute
¥No inhibition found

Table 1: Inhibitory effect of argentilactone and analogues on the activity of isocitrate lyase (ICL) from *P. brasiliensis.*

Compound	K_m (μM)	V_{max} (mol/min)
Control	1.41±0.4	1.56±0.4
Argentilactone	0.11±0.5	0.60±0.1
Reduced argentilactone	0.44±0.4	1.54±0.1

Table 2: Kinetic parameters for *Pb*ICLr on the presence of argentilactone and reduced argentilactone.

V – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, verificou-se a atividade do composto argentilactona, extraído do óleo essencial de *H. ovalifolia* e de seus análogos obtidos por síntese química, sobre o fungo patogênico humano *P. brasiliensis.*

Sabe-se que muitos microorganismos patogênicos humanos utilizam outras fontes de carbono, que não a glicose, durante o processo infectivo (BARELLE *et al.*, 2006), nesse sentido, avaliou-se o crescimento de células leveduriformes de *P. brasiliensis* em glicose e acetato como fontes de carbono (figura 2). Os resultados demonstraram uma inibição do crescimento de modo dose-dependente quando o fungo foi cultivado em glicose. O mesmo aconteceu com as células cultivadas em acetato, no entanto, a inibição do crescimento foi ainda maior em meio contendo acetato quando comparado ao meio contendo glicose. Resultados semelhantes foram encontrados para argentilactona reduzida. Um pequeno efeito sobre o crescimento fúngico foi observado na presença de epoxi-argentilactona e diol-argentilactona. Nossos resultados estão de acordo com Oliveira *et al.* (2004), que em estudo da influência de argentilactona sobre dermatófitos encontrou CIM (concentração inibitória mínima) no valor de 31, 2 µg/mL.

No solo, *P. brasiliensis* se encontra sobre forma saprofítica, o que resulta na formação de propágulos, os quais quando inalados, iniciam a infecção no hospedeiro. Uma vez instalados no pulmão, os propágulos micelianos diferenciam-se, originando células leveduriformes, passo fundamental para o estabelecimento da infecção, permitindo que o fungo sobreviva e prolifere no ambiente hostil do hospedeiro. A transição de micélio para levedura pode ser reproduzida *in vitro* por crescimento micelial em condições de temperatura elevada (BONFIM *et al.*, 2006), dessa forma avaliamos se argentilactona e derivados interferiam na transição de micélio para levedura do fungo dimórfico *P. brasiliensis* cultivado na presença de glicose ou acetato como fonte de carbono. Nossos resultados demonstraram uma inibição do dimorfismo do fungo de modo dose-dependente de argentilactona, tanto na presença de glicose

como de acetato (figura 3). Após dez dias de alteração da temperatura de cultivo de 23°C para 36°C, a inibição foi maior para células cultivadas na presença de acetato como fonte de carbono quando comparado a glicose. Resultado semelhante foi encontrado para argentilactona reduzida, embora o efeito tenha sido menor. Os análogos epóxi-argentilactona e diol-argentilactona não interferiram no dimorfismo do fungo.

A maioria dos microorganismos capazes de utilizar acetato ou ácidos graxos como fonte de carbono utilizam o ciclo do glioxalato para anaplerose do oxaloacetato, que é dispensável durante o crescimento em glicose. Dessa maneira, o ciclo do glioxalato, juntamente com o ciclo do ácido tricarboxílico, devem funcionar simultaneamente, uma vez que são muitas as reações compartilhadas (EBEL *et al.* 2006; VALENCIANO *et al*., 1998; AMOR *et al*., 2000). As enzimas chave do ciclo do glioxalato são isocitrato liase e malato sintase (KORNBERG & KREBS, 1957). Um gene que codifica para ICL foi identificado no genoma de *P. brasiliensis* isolado *Pb*01 (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis.2/MultiHome.html). Curiosamente, transcritos de isocitrato liase (FELIPE *et al.*, 2005) e malato sintase (NUNES *et al*., 2005) foram encontrados de forma abundante em células leveduriformes de *P. brasiliensis* e foram super regulados durante a transição de micélio paralevedura (BASTOS *et al.*, 2007) e durante o processo de infecção (COSTA *et al*., 2007). Assim, o ciclo do glioxalato adquire relevância durante a patogênese de *P. brasiliensis*.

Nesse contexto, nós investigamos se argentilactona e seus análogos interferem sobre a atividade *Pb*ICL nativa presente no extrato protéico bruto de células leveduriformes de *P. brasiliensis*. Segundo Cruz *et al.* (em preparação), a atividade específica desta enzima, obtida após crescimento em acetato, foi maior (0,250 U/mg), do que a atividade específica da mesma enzima obtida após crescimento do fungo em presença de glicose (0,036 U/mg). Nossos resultados demonstraram que argentilactona e argentilactona reduzida inibiram a atividade de *Pb*ICL nativa, e que a maior taxa de

inibição foi observada na presença de acetato (IC_{50}=50 µM), condição que a enzima é mais ativa, quando comparada com glicose (IC_{50}=80 µM) (tabela 1). Segundo Cruz *et al* (em preparação), a quantidade total de *Pb*ICL em células cultivadas em glicose como fonte de carbono é ligeiramente menor do que em células cultivadas em acetato como fonte de carbono, mas a atividade específica das ICLs oriundas de células leveduriformes crescidas em meio com glicose é muito menor do que de células crescidas em meio com acetato. Esse fato se deve a eventos de regulação pós-traducionais que ocorrem em *Pb*ICL. Os menores valores de inibição da *Pb*ICL pela argentilactona quando em presença de glicose podem ser explicados pela elevada quantidade *Pb*ICL inativas, as quais se ligam à molécula inibidora argentilactona. Nenhuma atividade inibitória sobre *Pb*ICL nativa por parte de epóxi-argentilactona e diol-argentilactona foi observada.

A influência de argentilactona e dos análogos obtidos sobre a *Pb*ICL recombinante também foi investigada (tabela 1). A inibição foi maior quando em presença de argentilactona (IC50= 28,8 µM), do que argentilactona reduzida (30,2 µM). Por outro lado, epóxi-argentilactona e diol-argentilactona não apresentaram influência inibitória sobre a *Pb*ICL . Lee *et al* (2009), investigaram a atividade inibitória de 5-hidroxiindole-alcalóide, um composto extraído da esponja tropical *Hyrtios* sp. contra ICL de *C. albicans*, obtendo um valor de IC50 de 89,0 µM. Desta forma, podemos concluir que argentilactona é um potente inibidor da *Pb*ICL.

VI – CONCLUSÃO

i. Argentilactona e o análogo argentilactona reduzida diminuiram o crescimento de *P. brasiliensis*, afetando as células leveduriformes do fungo de modo dose-dependente;

ii. Argentilactona e seu análogo argentilactona reduzida, afetaram, também de modo dose-dependente, o processo de diferenciação de micélio para levedura em *P. brasiliensis*;

iii. Argentilactona e argentilactona reduzida diminuiram a atividade da enzima nativa, bem como da recombinante*Pb*ICL ;

iv. Os análogos epóxi-argentilactona e diol-argentilactona não inibiram o crescimento e diferenciação de *P. brasiliensis*. Em adição, não inibiram a enzima *Pb*ICL nativa ou recombinante;

v. Argentilactona é um excelente candidato a protótipo como antifúngico.

VII. PERSPECTIVAS

i. Estudar o mecanismo de ação da argentilactona em *P. brasiliensis* através da análise de transcriptoma do fungo na presença do composto;

ii. Estudar o efeito da argentilactona em modelo animal com PCM induzida;

iii. Analisar o sinergismo existente entre argentilactona e outros antifúngicos existentes;

iv. Avaliar a toxicidade da argentilactona.

VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adewunmi, C. O.; Agbedahunsi, J. M.; Adebajo, A. C.; Aladesanmi, A. J.; Murphy, N. W. J. (2001). Etho-veterinary: screening of Nigerian medicinal plants for trypanocidal properties. *Journal of Ethopharmacology* **77**: 19-24.

Ahmad, I.; Beg, A. Z. (2001). Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *J. Ethnopharmacol* **74**: 113-123.

Amor, C., Domínguez, A. I., De Lucas, J. R., and Laborda, F. (2000). The catabolite inactivation of *Aspergillus nidulans* isocitrate lyase occurs by specific autophagy of peroxisomes. *Arch Microbiol* **174**: 59-66.

Angulo-Ortega, A.; Pollak, L. (1971). The pathological anatomy of the micoses. Human infections with fungi, actinomycetes and algae. *Springer-Verlag*, Berlin. *In: Paracoccidioidomycosis.* 507-560.

Aristizabal, B. H.; Clemons, K. V.; Cock, A. M.; Restrepo, A. & Stevens, D. A. (2002). Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice: influence of the hormonal status of the host on tissue responses. *Med Mycol* **40(2)**: 169-178.

Auricchio, M. T.; Bacchi, E. M. (2003). *Eugenia uniflora* L. "brazilian cherry" leaves: pharmabotanical, chemical and pharmacological proprieties. *Rev Inst Adolfo Lutz* **62**: 55-61.

Bagagli E.; Bosco S. M.; Theodoro R. C.; Franco M. (2006). Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animals hosts that explain several biological features of the pathogen. *Infect Genet Evol* **6**:344-351.

Bailão, A.M., Schrank, A., Borges, C.L., et al. (2006) Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. *Microbes Infect* **12-13**: 2686–2697.

Bailão, A.M., Schrank, A., Borges, C.L., et al. (2007) The transcriptional profile of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells is influenced by human plasma. *FEMS* **51**: 43-57.

Barelle, C. J.; Prieste, C. L.; MacCallum, D. M.; Gow, N. A. R.; Odds, F. C.; Brown, A. J. P. (2006). Niche-specific regulation of central metabolic pathways in a fungal pathogen. *Cell Microbiol* **8(6)**: 961-971.

Bastos K.P.; Bailão A.M.; Borges C.L.; Faria F.P.; Felipe M.S.S.; Silva M.G.; Martins W.S.; Fiúza R.B.; Pereira M.; Soares C.M.A. (2007) The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. *BMC Microbiol* **7**: 29-43.

Bennet, J. F. (2001). Antimicrobial agents: antifungal agents. In: Goodman & Gilmans the pharmacological basis of therapeuties (10 ed). Harman, J. G.; Limbird, L. F.; Gilman, A. G. (Eds) Macgraw, New York, USA **49**: 1295-1312.

Bentrup, K.H.Z., Miczak, A., Swenson, D.L., Russel, D.G. (1999). Characterization of activity and expression of isocitrate lyase in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis*. **181**:7161-7167.

Boalino, D. M.; Connolly, J. D.; McLean, S.; Reynolds, W. F.; Tinto, W. F. (2003) *Phytochemistry* **64**: 1303–1307.

Bonfim, S. M.; Cruz, A. H.; Jesuíno, R. S.; Ulhoa, C. J.; Molinari-Madlum E. E.; Soares C. M.; Pereira M. (2006). Chitinase from Paracoccidioides brasiliensis: molecular cloning, structural, phylogenetic, expression and activity analysis. *FEMS Immunol Med Microbiol* **46(2)**: 269-283.

Bordignon, S. A. L. (1990). O Gênero *Hyptis* Jacq. (Labiatae) no Rio Grande do Sul. Tese de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul. 123 p.

Brasil 2004. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n° 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. *Diário Oficial*, Brasília, 18 mar.

Brazil Conservation Internacional (1999). Ações prioritárias para a biodiversidade do Cerrado e Pantanal. Brasília: MMA.

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

Carbonell, L. M; Rodríguez, J. (1965). Transformation of mycelial and yeast forms of *Paracoccidioides brasiliensis* in cultures and in experimental inoculations. *J. Bacteriol.* **90**: 504-510.

Carrero L. L.; Nino-Veja G.; Teixeira M. M.; Carvalho M. J.; Soares, C. M.; Pereira M.; Jesuino R. S.; McEwen J. G.; Mendoza L.; Taylor J. W.; Felipe M. S.; San-Blas G.

(2008). New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. *Fungal Genet Biol.* **45**: 605-612.

Camargo, Z. P.; Franco, M. F. (2000). Current knowledge on Pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev Iberoam Micol* **17**: 41-48.

Carmona D.; Sáez J.; Granados H.; Pérez E.; Blair S.; Ângulo A.; Figadere B.(2003) *Nat. Prod. Res.* **17**: 275–280.

Clemons, K. V.; Feldman, D. & Stevens, D. A. (1989). Influence of estradiol on protein expression and methionine utilization during morphogenesis of *Paracoccidioides brasiliensis. J Gen Microbiol* **135(6)**: 1607-1617.

Conti-Diaz, I. A. (2007). On the unknown ecological niche of *Paracoccidioides brasiliensis*: our hypothesisof 1989: present status and perspectives. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **49(2)**: 131-140.

Costa, M., Borges, C.L., Bailão, A.M., et al. (2007) Transcriptome profiling of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast-phase cells recovered from infected mice brings new insights into fungal response upon host interaction. *Microbyology* **153**: 4194-4207.

Coutinho, Z. F.; Silva, D.; Lazera, M.; Petri, V.; oliveira, R. M.; Sabroza, P. C.; Wanke, B. (2002). Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saúde Pública* **18**: 1441-1454.

Del Negro, G. (1985). Peculiaridades na terapêutica das micoses sistêmicas. *Rev Ass Med Bras* **31**: 47-51.

Derengowski, L. S.; Tavares, A. H., Silva, S.; Procópio, L. S.; Felipe, M. S.; 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**: 125-134.

Dias, J. C. (1996). Tropical diseases and the gender approach. *Bull Pan Am Health Organ* **30**: 242-260.

Ebel, F.; Schwienbacher, M.; Beyer, J.; Heesemann, J.; Brakhage, A.A.; Brock, M. (2006). Analysis of the regulation, expression, and localization of the isocitrate lyase from *Aspergillus fumigatus*, a potential target for antifungal drug development. *Fungal Genetics and biology*. **43**:476-489.

Espinel-Ingroff, A. (1998). Comparison of *in vitro* activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743, 872) and LY 303366 against

opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. *J Clin Microbiol* **36*:*** 2950-2956.

Fátima, A.; Kohn L. K.; Antonio, M. A.; Carvalho, J. E.; Pilli, R. A. (2004) Enantioselective syntheses of (R)- and (S)-argentilactone and their cytotoxic activities against cancer cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **12**: 5437–5442.

Felipe, M.S.S.; Andrade R.V.; Petrofeza, S.S.; Maranhão, A.Q.; Torres, F.A.G.; Albuquerque, P.; Arraes, F.B.M.; Arruda, M.; Azevedo, M.O.; Baptista, A.J.; Bataus, L.A.M.; Borges, C.L.; Campos, E.G.; Cruz, M.R.; Daher, B.S.; Dantas, A.; Ferreira, M.A.S.V.; Ghil, G.V.; Jesuino, R.S.A.; Kyaw, C.M.; Leitão, L.; Martins, C.R.; Moraes, L.M.P.; Neves, E.O.; Nicola, A.M.; Alves, E.S.; Parente, J.A.; Pereira, M.; Poças-Fonseca, M.J.; Resende, R.; Ribeiro, B.M.; Saldanha, R.R.; Santos, S.C.; Silva-Pereira, I.; Silva, M.A.S.; Silveira, E.; Simões, I.C.; Soares, R.B.A.; Souza, D.P.; De-Souza, M.T.; Andrade, E.V.; Xavier, M.A.S.; Veiga, H.P.; Venancio, E.J.; Carvalho, M.J.A.; Oliveira, A.G.; Inoue, M.K.; Almeida, N.F.; Walter, M.E.M.T.; Soares, C.M.A.; Brígido, M.M. (2003) Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast*, **20**: 263-271

Felipe, M.S.S., Andrade, R.V., Arrraes, F.B.M., nicola, A.M., Maranhão, A.Q., Torres, F.A.G., Silva-Pereira, I., Poças-Fonseca, M.J., Campos, E.G., Moraes, L.M.P., Andrade, P.A., Tavares, A.H.F.P., Silva, S.S., Kyaw, C.M., Souza, D.P., Network P, Pereira, M., Jesuíno, R.S.A., Andrade, E.V., Parente, J.A., Oliveira, G.S., Barbosa, M.S., Martins, N.F., Fachin, A.L., Cardoso, R.S., Passos, G.A.S., Almeida, N.F., Walter, E.M.T., soares, C.M.A., Carvalho, M.J.A., Brígido, M.M. (2005) Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus Paracoccidioides brasiliensis in mycelium and yeast cells. J Biol Chem. **280**: 24706-24714.

Fernandez, E.; Fernandez, M.; Moreno, F.; Rodicio, R. (1993). Transcriptional regulation of the isocitrate lyase encoding gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS*. **333**:238-242.

Fragoso-Serrano, M.; Gonzalez-Chimeo, E.; Pereda-Miranda, R. J. (1999) *Nat. Prod.* **62**: 45–50.

Franco, M. (1987) Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet. Mycol*. 25, 5–18.

Furtado J. S; Brito, T.; Freymuller, E. (1967). The structure and reproduction of *Paracoccidioides brasiliensis* in human tissue. *J Med Vet Mycol* **5:** 226-229.

Gallis, H. A.; Drew, R. H.; Pickard, W. W. (1990). Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Rev Infect Dis* **12**: 308-329.

Gifford, A. H.; Klippenstein J. R.; Moore, M. M. (2002). Serum stimulates growth of and proteinase secretion by *Aspergillus fumigatus. Infec Immun* **70**: 19-26.

Goldman G.H, dos Reis Marques E., Duarte Ribeiro D.C., de Souza Bernardes L.A., Quiapin A.C., Vitorelli P.M., Savoldi M., Semighini C.P., de Oliveira R.C., Nunes L.R., Travassos L.R., Puccia R., Batista W.L., Ferreira L.E., Moreira J.C., Bogossian A.P., Tekaia F., Nobreg M.P., Nobrega F.G., Goldman M.H. (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.

Hahn, R. C.; Handam, J. S. (2000). Effects of amphotericin B and three azole derivatives on the lipds of yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis. Antimicrobial and agents and Chemoterapy* 1997-2000.

Hahn R.C ; Morato Conceição Y.T.; Santos N.L.; Ferreira J.F.; Hamdan J. S.(2003) Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and in vitro resistance to ketoconazole and trimethoprim sulphamethoxazole. *Mycoses* **46**: 342-347.

Idnurm, A.; Howlett, B.J. (2002). Isocitrate lyase is essencial for phatogenicity of the fungus *Leptosphaeria maculans* to canola (*Brassica napus*). *Eukarryotic cell*. **1**:719-724.

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis IBAMA conclui mapeamento das ecorregiões brasileiras, Brasília, Brasil. 2003.

Karen, W.; Martin & Ernest, E. (2004). Herbal medicines for treatment of fungal infections: a systematic review of controlled clinical trials.

Klepser, M. E.; Klepser, D. G.; Ernst, E. J.; Brooks, J.; Diekema, D. J.; Mozzafari, E.; Hendrickson, J.; Doern, G. V. (2003). Health care resource utilization associated with treatment of penicillin-susceptible and –nonsuceptible isolates of *Streptococcus pneumoniae. Pharmacoterapy* **23**: 349-359.

Kornberg, H. L.; Krebs, H. A. (1957). Synthesis of cell constituents from C_2 –units by a modified tricarboxylic acid cycle. *Nature* **179**: 988-991.

Kornberg, H.L. & BEEVERS, H. (1957) A mechanism of convertion of fat to carbohydrate in castor beans. *Nature*. 180, 988.

Kornberg, H.L. (1966) The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. *Biochem*. **99**, 1.

Krcmery, V. C. Jr. (2005). Antifungal chemoterapeutics. *Med Print Pract* **14**: 125-135.

Kuhnt, M.; Rimpler, H.; Heinrich, M. (1994) *Phytochemistr*y **36**: 485–489.

Kunze, M., Kragler, F., Binder, M., Hartig, A., Gurvitz, A. (2002) Targeting of malate synthase 1 to the peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae* cells depends on growth on oleic acid medium. *Eur. J. Biochem* **269**: 915-922.

Lacaz, C. S.; Ulson, C. M.; Sampaio, S. A. (1959). Ação *in vitro* da anfotericina B sobre *Paracoccidioides brasiliensis. Rev Paul Med* **54**: 357-360.

Lacaz, C. S.; Porto E.; Martins J. E. C. (1991). Paracoccidioidomycosis. 248-261 *In: Micologia Médica*, 8th ed. *Sarvier Ed*, São Paulo, Brasil.

Lacaz, C. S. (1994). *Paracoccidioides brasiliensis*: morphology, evolutionary cycle; maintenance during saprophytic life; biology, virulence, taxonomy. *in*: M. Franco; C. S. Lacaz; A. Restrepo-Moreno; G. Del Negro (eds). *Paracoccidioidomycosis*, *CRC press*, boca ratón, **2**:13-25.

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. (2009). 5-hydroxyindole-type alkaloids, as *Candida albicans* isocitrate lyase inhibitors, from the tropical sponge *Hyrtios* sp. *Bioorg & Med Chem Lett* **19**: 1051-1053.

Londero, A. T. (1986). Paracoccidioidomicose. Patogenia, formas clínicas, manifestacoes pulmonares e diagnostico. *J Pneumol* **12**: 41-57.

Loose, D. S.; Stover, E. P.; Restrepo, A.; Stevens, D. A. & Feldaman, D. (1983). Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **80(24)**: 7659-7663.

Lorenz, M.C. & Fink, G.R. (2001) The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature* **412**:(6842):83–86.

Lorenz, M. C.; Fink, G.R. (2002). Life and Death in a Macrophage: Role of the Glyoxylate Cycle in Virulence. *Eukaryotic cell* **5** :657-662.

Lutz, A. (1908). Uma micose pseudo-coccídica localizada na boca e observada no Brasil: contribuição ao conhecimento das hipho-blastomicoses americanas. *Brasil Med*., **22**:121-124 .

Mahasneh, A. M. A.; Adel, M. A.; El-Oglah, A. A. B. (1999). Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Jordan. *Journal of Ethnopharmacology* **64**: 271-276.

Margulis, L.; Schwartz, K.V. (1998). Five kingdoms, an illustrated guide to the phyla of life on Earth. *WH Feeman & Co.*

Martinez, M. J.; Betancourt, J.; Alonso-Gonzáles, N.; Jauregui, A. (1996). Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* **52**: 171-174.

Martinez, R. (1997). Blastomicose-sul-americana (Paracoccidioidomicose) – etioepidemologia e ecologia. Tratado de infectologia. R. Veronesi and R. Focaccia. *Ateneu*: 1082.

Matute D. R.; McEwen J. G.; Puccia R.; Montes B. A.; San-Blas G.; Bagagli E.; Rauscher J. T.; Restrepo A.; Morais F.; Nino-Veja G.; Taylor J. W. (2006). Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paraoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol* **23**:65-73

Mckinney, J.D., Höner zu Bentrup, K., Muñoz-Elias, E.J. et al. (2000) Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages micerequires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyzase. *Nature* **17**: 735-738.

Mendes, R. P.; Negroni, R.; Arechavala, A. (1994) Treatment and controlo f cura. Paracoccidioidomycosis. **29**: 373.

Mendes-Giannini, M.J., Hanna, S.A., da Silva, J.L., Andreotti, P.F., Vincenzi, L.R., Benard, G., Lenzi, H.L. & Soares, C.P. (2004) Invasion of epithelial mammalian cells by *Paracoccidioides brasiliensis* leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell. *Microbes Infect*. 6: 882–891.

Minguetti, G.; Queiroz-Telles, F.; Hofmeister, R. M.; Freitas, O. T.; Lameira, R. F. (1985). Scanning electron microscopic studies of *Paracoccidioides brasiliensis* in the yeast phase. *Sabouraudia.* **23**: 443-446.

Navarro, V.; Villareal, M. L.; Rojas, G.; Lozoya, X. (1996). Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infections diseases. *Journal of Ethnopharmacology* **53**: 143-147.

Nogales, J.; Guijo, M. I.; Quesada, A.; Merchan, F. (2004). Functional analyses and regulation of the malate synthase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* **219**: 325-331.

Novelo, M; Cruz, J. G.; Hernández, L.; Pereda-Miranda, R.; Chai, H. Y.; Mar, W.; Pezzuto, J. M. J. (1993) *Nat. Prod*. **56**, 1728.

Nunes, L.R.; Costa de Oliveira, R.; Leite, D.B.; da Silva, V.S.; dos Reis Marques. E.; da Silva Ferreira, M.E.; Ribeiro, D.C.; de Souza Bernardes, L.A.; Goldman, M.H.; Puccia, R.; Travassos, L.R.; Batista, W.L.; Nóbrega, M.P.; Nóbrega, F.G.; Yang, D.Y.; de Braganca; Pereira, C.A.; Goldman, G.H. (2005) Transcriptome analysis of Paracoccidioides brasiliensis cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukaryot Cell* **4**: 2115-2128.

Odds, F. C.; Brown, A. J. P.; Gow, N. A. R. (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol* **11**: 272-279.

Ohsaki, A.; Kishimoto, Y.; Isobe, T.; Fukuyama, Y. (2005) *Chem. Pharm. Bull*. **53**: 1577–1579.

Oliveira, C. M. A.; Silva, M. R. R.; Kato, L.; Silva, C. C.; Ferreira, H. D.; Souza, L. K. H.(2004). Chemical Composition and Antifungal Activity of the Essential Oil of *Hyptis ovaliofolia* Benth. (Lamiaceae). *J. Braz. Chem. Soc*. **5**: 756-759.

Paula T.F.; Garcia A.C.F.; Oliveira C.M.A.; Martinez R.C.; Silva M.R.R. (2001). Propriedades antifúngicas de *Hyptis ovalifolia*sobre *Cryptococcus neoformans*. Resumo dos Anais do XIII Encontro Científico dos Acadêmicos de Medicina, p. 21.

Pereda-Miranda, R.; Delgado, G. J. (1990) *Nat. Prod*. **53**: 182–185.

Pereda-Miranda, R.; Hernandez, L.; Villavicencio, M. J.; Novelo, M.; Ibarra, P.; Chai, H.; Pezzuto, J. M. J. (1993). *Nat. Prod*. **56**: 583–593.

Petri, W. A. (2001). Antimicrobial agents: sulfonamides, trimethoprim, sulfamethoxazole, quinolones and agents in urinary tract agents, In: Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. Hardman, J. C.; Limbird, L. E.; Gilman, A. G. **36**: 1122-1131.

Porter, R. B. R.; Reese, P. B.; Williams, D. J.(1995). *Phytochemistry*. 40, 735.

Queiroz-Telles F. (1994). *Paracoccidioides brasiliensis* ultrastructural Wndings. In: Franco M.; Lacaz C. S.; Restrepo-Moreno A.; Del Negro G. (Eds.), *Paracoccidioidomycosis*. CRC press, London, p. 27-44.

Rehder, V. L. G.; Machado, A. L. M.; delarmelina, C.; Sartoratto, A.; Duarte, M. C. T.; Figueira, G. M. (2004). Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de duas espécies de Origanum. *Ver Bras Plant Med* **6**: 67-71.

Reis, V. L. L.; Rolla, V. C.; Rangel, C. A.; Sampaio, M. B. N. O.; Tavares, W.; Praxedes H.; Rocha W. B. (1986). Paracoccidioidomicose disseminada aguda com extenso derrame pleural. *Arq Bras Med* **60**: 275-280.

Restrepo, A.; Tabares, C. B. (1984). *In vitro* susceptibility of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form to antifungal agents. *Rev Inst Med Trop* **26**: 322-328.

Restrepo, A. (1985). The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *J. Med. Vet. Mycol.* **23**:323-334

Rude, T.H., Toffaletti, D.L., Cox, G.M., Perfect, J.R. (2002) Relatioship of the glyoxylate pathway to the pathogenesis of *Cryptococcus neoforms Infect. Immun* **70**: 5684 – 5694.

Ruhnke, M.; Eigler, A.; Tennagem, I. *et al.* Emergence of fluoconazole-resistant strains of *Candida albicans* in patients with recurrent oropharyngeal candidosis and human immunodeficiency virus infection. *J Clin Microbiol* **32**: 2092-2098

Richini-Pereira, V. B.; Bosco, S. D.; Griese, J.; Theodoro, R. C.; Macoris, S. A.; Da Silva, R. J.; Barrozo, L.; Tavares, P. M.; Zancope-Oliveira, R. M. and Bagagli, E. (2007). Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. *Med Mycol* **46**: 35-40.

Samsonoff, W. A.; Salazar, M. E.; Mckee, M. L.; Restrepo, A.; Cano, L. E.; Edwards, M. R. (1991). Scanning electron microscopy of the conidia produced by the mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis. Mycopathol*. **114**:9-5

San-Blas, G. (1993). Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis. J med Vet Mycol* **31(2)**: 99-113.

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.

Sano, A,; Nishimura, K. & Miyaji, M. (1999). The research encouragement award: effects of sex hormones on sexual difference of experimental paracoccidioidomycosis. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* **40(1)**: 1-8.

Shikanai-Yasuda, M. A.; Telles Filho F. de Q.; Mendes, R. P.; Colombo, A. l.; Moretti, M. L. (2006). Guidelines in paracoccidioidomycosis. *Ver Soc Bras Med Trop* **39(3)**: 297-310.

Selitrennikoff, C. P.; Nakata, M. (2003). *Curr. Opin. Investig. Drugs* **4**: 200

Sheehan, D. J.; Hitchcock, C. A.; Sibley, C. M. (1999). Current and emerging azole antifungal agents. *Clin Microbiol Rev* **12**: 40-79.

Silva, M. B.; Marques, A. F.; Nosanchuck, J. D.; Casadevall, A.; Travassos, L. R. & Taborda, C. P. (2006). Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. *Microbs Infect* **8(1)**: 197-205.

Solomon, P.S., Lee, R.C, Greer Wilson, T. J and Oliver, R.P. (2004) Pathogenicity of *Stagonospora nodorum* requires malate synthase. *Molecular Microbiology*. **53**:1065–1073.

Svidzinski, T. I.; Miranda Neto, M. H.; Santana, R. G.; Fischman, O.; Colombo, A.L. (1999) *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from patients with acute and chronic disease exhibit morphological differences after animal passage. *Rev Inst Med Trop* **41**:279-83.

Tavares, A. H.; Silva, S. S.; Dantas, A.; Campos, E. G.; Andrade, R. V.; Maranhao, A. Q.; Brigido, M. M.; Passos-Silva, D. G.; Fachin, A. L.; Teixeira, S. M.; Passos, G. A.; Soares, C. M. A.; Bocca, A. L.; Carvalho, M. J.; Silva-Pereira, I.; Felipe, M. S. S. (2007). Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages. *Microbs Infect* **9:** 583-590.

Theodoro, R. C.; Candeias J. M.; Araujo, J. P.; Junior, B. S. de; Macoris, S. A.; Padula, L. O.; Franco, M. & Bagagli, E. (2005). Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. *Med Mycol* **43(8)**: 725-729.

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* **7**: 92.

Tóbon A. M.; Agudelo C. A.; Osorio, M. L.; Alvarez, D. L.; Arango, M; Cano, L. E.; Restrepo A. (2003). Residual pulmonary abnormalities in adult patients with chronic paracoccidioidomycosis: prolonged follow-up after itraconazole therapy. *Clin Infect Dis* **37(7)**: 898-904.

Valenciano, S., DE Lucas, J. R., Klei, I.V., Veenhuis, M., Laborda, F. (1998) Characterization of Aspergillus nidulans peroxisomes by immunoelectron mcroscopy. *Arch Microbiol*. **170**: 370-376.

Valera E. T.; Mori, B. M.; Engel E. E.; Costa I. S.; Brandao, D. F.; Nogueira-Barbosa, M. H.; Queiroz, R. G.; Silveira, V. D. A.; Scrideli, C. A.; Tone, L. G. (2008). Fungal infection by *Paracoccidioides brasiliensis* mimicking bone tumor. *Pediatr Blood Cancer* **50**: 1284-1286.

Villa, L. A.; Tobon, A.; Restrepo, A.; Calle, D.; Rosero, D. S. & Gomez, B. L. (2000). Central nervous system paracoccidioidomycosis. Report of a case successfully treated with itraconazol. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **42(4)**: 231-234.

Villar, L. A.; Salazar, M. E. & Restrepo, A. (1988). Morphological study of a variant of *Paracoccidioides brasiliensis* that exists in the yeast form at room temperature. *J Med Vet Mycol* **26(5)**: 269-276.

Volk, R. B.; Furkert, F. H. (2006). Antialgal, antibacterial and antifungal activity of two metabolites produced and excreted by cyanobacteria during growth. *Microbiological Research* **161**: 180-186.

Waechter, A. I.; Ferreira, M. E.; Fournet, A.; Arias, A. R.; Nakayama, H.; Torres, S.; Hocquemiller, R.; Cave, A. (1997) *Planta Med*. 63: 433–435.

Yasuda, M. A. S. (2005). Pharmacological management of paracoccidioidomycosis. *Expert Opinion* **6**: 385-397.

Yunes R. A., Pedrosa R. C., Cechinel Filho V. (2001). Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Quím Nova* **24**: 147-152.