

Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular

**Efeitos do Farnesol, uma Molécula de *Quorum-Sensing* de *Candida albicans*, em diferentes isolados de *Paracoccidioides brasiliensis***

Calliandra Maria de Souza Silva

Orientadora: Ildinete Silva Pereira

Brasília - DF  
Maio – 2009

Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular

**Efeitos do Farnesol, uma Molécula de *Quorum-Sensing* de *Candida albicans*, em diferentes isolados de *Paracoccidioides brasiliensis***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, para obtenção de título de Mestre em Biologia Molecular.

Aluna: Calliandra Maria de Souza Silva  
Orientadora: Ildinete Silva Pereira

Brasília - DF  
Maio – 2009

## I. Dedicatória



Dedico este trabalho a todas as pessoas que marcaram minha jornada, em especial minha família.

## II. Agradecimentos

Bem, ...por onde começar? Até chegar a este momento histórico, a jornada não foi fácil: re-adaptação ao país de origem, costumes, formas de pensamento e idioma (confesso que ainda estou me apropriando). Porém, nesta jornada, neste vôo, encontrei pessoas que me apoiaram, ajudaram e guiaram no caminho que escolhi construir.

Um lugar de honra pertence à minha família, os meus, que desde minha terna infância sempre estiveram ao meu lado, mesmo quando eu aprontava feio, acreditando e me fazendo acreditar que não havia limites para minha imaginação. Mãe, Pai e Chu: muito obrigado! Os amos muito. Minhas queridíssimas avós, Severina e Elpídia. Valeram todos os conselhos e suas filosofias.

Em seguida vêm Fátima Guerra e Ivan Sérgio. Durante o mestrado, mais do que me darem abrigo e orientações, deram-me um lugar em sua família, à qual senti pertencer, onde me senti em um lar, em minha própria casa. Muito obrigada! Eles são a minha família, meus pais e meus tios de Brasília.

Chega então Ildinete, minha orientadora, quem, sem saber nada de mim nem de minha história, decidiu confiar em mim, e aceitou-me como sua orientanda. Foi graças às suas orientações, compreensão e incompreensões (principalmente por causa da língua, a bela e complicada língua portuguesa..., e por todas as questões e dificuldades de comunicação), paciência e humanismo, que pude chegar aonde cheguei com este trabalho. Obrigada por ser um Norte na minha jornada.

Também quero agradecer a minha “co-orientadora” Lorena. Sem sua experiência e guia, tanto nos cuidados do Pb quanto nos procedimentos de um laboratório de biologia molecular, teria dado voltas desnecessárias e não teria me apropriado do “caminho das pedras”. Sinceramente, ela foi uma verdadeira deusa na arte de entender mais ou menos o que eu queria dizer, a partir do que fez incríveis correções do meu “Portuñol”.

Agradeço imensamente a Isabel, por ajudar na estatística do meu trabalho e pela paciência em responder todas as minhas perguntas, que foram muitas. Adicionalmente,

quero agradecer pela semana que me deixou ficar em sua casa, para mudar de ambiente de trabalho, onde se transformou temporariamente em meu dicionário ambulante e em minha cozinheira particular. Realmente valeu.

Agora as coisas se complicam. Tenho muitos agradecimentos, todos importantes e sem ordem específica. Quero agradecer novamente a Lorena e a Bel, pela amizade, e a Tiago, Marciano e o pessoal do Lab3 pelo ambiente agradável de trabalho e amizade. A Simoneide, por sua orientação na sala de cultura, amizade e infinita paciência. Theissa, muito obrigada; se não a tivesse conhecido e trocado tantas palavras com você, nos meus primeiros meses, sem orientadora, acho que não teria conseguido adaptar-me tão bem na UnB e no Departamento. Agradeço também a Adriane, Velba, Dani e Letícia, por todas as loucuras e diversões; vocês estabilizaram minha lucidez. Por último, mas não menos importante, agradeço a Lídia por prover-me de livros absorventes, empolgantes, nos meus momentos de desespero. Finalmente, àqueles que esqueci de citar, muito obrigada!

Gente, obrigada por fazer meu caminho interessante!

"Caminante no hay camino,  
se hace camino al andar..."  
**Antonio Machado**

### III. Resumo

O fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM) – a micose sistêmica mais comum na América Latina. O tratamento é prolongado e traz severos efeitos secundários. Além disso, a resistência a medicamentos usados tem sido demonstrada em *P. brasiliensis*. O farnesol, conhecido componente de óleos essenciais, exerce um papel crítico no *quorum-sensing* e na virulência de *Candida albicans*. Dados da literatura relataram um efeito antimicrobiano do farnesol para diversos microrganismos. O efeito fungicida deste composto, bem como seu papel no retardo da transição dimórfica do isolado Pb18, pertencente à espécie críptica S1 de *P. brasiliensis*, foi descrito recentemente por nosso grupo de pesquisa. Neste trabalho estendemos esta análise para representantes de outras espécies crípticas, o isolado Pb01 do grupo “Pb01-like” e o isolado Pb3 do grupo PS2. Em concordância com nossos estudos prévios, confirmamos o efeito fungicida para estes dois outros isolados de *P. brasiliensis*. A concentração inibitória mínima (MIC<sub>90</sub>) de farnesol, que inibe 90% do crescimento de *P. brasiliensis*, tanto para o isolado Pb01 quanto para o isolado Pb3 é de 20µM, enquanto a concentração letal mínima (MLC<sub>90</sub>) de farnesol para o isolado Pb01 é de 30µM e para o isolado Pb3 é de 40µM. Neste trabalho, analisando o efeito do farnesol na transição dimórfica dos isolados Pb01 e Pb3, observamos que este também retarda a transição de levedura para micélio destes dois isolados. Diante da expectativa de uso deste sequiterpeno como um adjuvante terapêutico, analisamos o seu efeito em associação com alguns antifúngicos empregados no tratamento da PCM. Nossos dados indicam uma ausência de efeito sinérgico entre o farnesol e os antifúngicos da família dos azóis (fluconazol e cetoconazol), além de um possível efeito protetor para o fungo quando associado a uma dada faixa de concentração (0,0312 a 0,125µg/mL) de anfotericina B. Estes resultados sugerem, fortemente, que o farnesol não deve ser utilizado como um adjuvante terapêutico no tratamento da PCM sistêmica. Uma vez que dados da literatura descreveram a indução de apoptose em *Aspergillus nidulans* pelo farnesol, analisamos a expressão de alguns genes de *P. brasiliensis* relacionados a este processo. Nenhuma alteração significativa no padrão de expressão dos genes analisados foi observada. No entanto, ainda não podemos descartar a possível ativação deste processo de morte celular em *P. brasiliensis* em resposta ao tratamento com farnesol.

## IV. Abstract

The dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* is the etiological agent of paracoccidioidomycosis (PCM) – the most prevalent systemic mycosis in Latin America. Its treatment is usually long and frequently results in several side effects. Besides, some isolates of *P. brasiliensis* have developed resistance to many of the antimicrobial agents used. Farnesol, a known component of essential oils, is a quorum-sensing molecule and a virulence factor of *Candida albicans*. It was demonstrated that farnesol exerts an antimicrobial activity in a number of microorganisms. The fungicide effect of this compound, as well as its role in the delay of the dimorphic transition in the isolate Pb18, belonging to the S1 cryptic species of *P. brasiliensis*, has been recently describe by our research group. In this work, we expanded our analyzes to other cryptic species of *P. brasiliensis* found in Brazil, namely the isolates Pb01 from “Pb01-like” group and Pb3 from the PS2 cryptic species. In accordance to our previous results, we confirmed the fungicide effect of farnesol in the other two isolates of *P. brasiliensis*. The minimum inhibitory concentration (MIC<sub>90</sub>) of farnesol, the concentration that inhibits 90% of growth, was 20µM for both isolates, while the minimum lethal concentration (MLC<sub>90</sub>) of farnesol were 30µM and 40µM for the isolates Pb01 and Pb3, respectively. Additionally, in this study it was also analyzed the effect of farnesol on the dimorphic transition of the isolates Pb01 and Pb3, which results also reveal that farnesol promotes a delay in the transition from yeast to mycelium of these isolates. Based on its fungicide activity, the use of farnesol has been proposed as a possible adjuvant in the treatment of bacterial and fungal diseases. In this sense, we analysed its effect in association with some fungicides commonly used in the treatment of PCM. Nonetheless, we found an absence of synergism between farnesol and the azole family of fungicides (fluconazole and ketoconazole). Curiously, a protective effect to the fungus was observed when farnesol was associated to amphotericin B in concentrations of 0,0312 to 0,125µg/mL. These results suggest that farnesol should not be used as therapeutic adjuvant in the treatment of PCM. The effect of farnesol as an apoptosis inducer in *Aspergillus nidulans* was described. In this context, we analysed the expression of some *P. brasiliensis*’ genes related to the process of programmed cell death. Although no significant alteration was observed in the gene expression pattern, the possible role of farnesol in inducing apoptosis in *P. brasiliensis* cannot be ruled out.

## Sumario

Lista de siglas e abreviaturas .....	x
Lista de Figuras .....	xii
Lista de Figuras no Anexo.....	xiii
Lista de Tabelas .....	xiii
Lista de Quadros.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O fungo <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .....	1
1.1.1 <i>Ocorrência na população e histórico dos seus isolados</i> .....	1
1.1.2 <i>Imunobiologia da Paracoccidioidomicose</i> .....	4
1.2 Tratamento da Paracoccidioidomicose.....	9
1.2.1 <i>Farnesol – uma molécula de quorum-sensing de Candida albicans e seu potencial papel como um agente antimicrobiano</i> .....	11
2 Justificativa.....	17
3 Objetivos.....	19
3.1 Objetivo Geral .....	19
3.2 Objetivos Específicos .....	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1 Manutenção e Propagação das Células.....	20
4.1.1 <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .....	20
4.1.2 <i>Preparo das soluções de farnesol</i> .....	20
4.2 Avaliação do efeito do farnesol sobre diferentes isolados de <i>P. brasiliensis</i> .	20
4.2.1 <i>Avaliação do efeito do diluente do farnesol sobre diferentes isolados de P. brasiliensis</i> .....	20
4.2.2 <i>Avaliação do efeito do farnesol sobre o crescimento de distintos isolados de P. brasiliensis</i> .....	21
4.2.3 <i>Padronização do método colorimétrico MTT para a medida da taxa de crescimento/viabilidade de culturas de P. brasiliensis em placas de 96 poços</i> .....	21
4.2.4 <i>Avaliação do efeito do farnesol sobre a viabilidade de distintos isolados de P. brasiliensis</i> .....	22
4.2.5 <i>Avaliação do efeito do farnesol sobre o dimorfismo de distintos isolados de P. brasiliensis</i> .....	23
4.3 Avaliação dos efeitos do farnesol sobre a ação de diferentes antifúngicos e na expressão de genes relacionados à apoptose para o isolado Pb18 de <i>P. brasiliensis</i> .	23
4.3.1 <i>Avaliação do efeito do farnesol sobre a ação de diferentes antifúngicos para P. brasiliensis</i> .....	23
4.3.2 <i>Avaliação do efeito do farnesol nos níveis de expressão de genes relacionados ao processo de morte celular pela via de apoptose</i> .....	24
4.4 Análise estatística dos resultados .....	30
4.4.1 <i>Avaliação do efeito do diluente de farnesol sobre diferentes isolados de P. brasiliensis</i> .....	30
4.4.2 <i>Avaliação do efeito do farnesol sobre o crescimento de distintos isolados de P. brasiliensis</i> .....	30
4.4.3 <i>Padronização do método colorimétrico MTT para a medida da taxa de crescimento/viabilidade de culturas de P. brasiliensis em placas de 96 poços</i> .....	30
4.4.4 <i>Avaliação do efeito do farnesol sobre a viabilidade de distintos isolados de P. brasiliensis</i> .....	30

4.4.5	<i>Avaliação do efeito do farnesol sobre a ação de diferentes antifúngicos para P. brasiliensis</i> .....	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	32
5.1	Efeito do farnesol sobre diferentes isolados de P. brasiliensis.....	32
5.1.1	<i>Efeito do diluente do farnesol sobre diferentes isolados de P. brasiliensis</i> 32	
5.1.2	<i>Padronização do método colorimétrico MTT para a medida da taxa de crescimento/viabilidade de cultivos de P. brasiliensis em placas de 96 poços</i> .....	34
5.1.3	<i>Efeito do farnesol sobre o crescimento e viabilidade de distintos isolados de P. brasiliensis</i> .....	36
5.1.4	<i>Efeito do farnesol sobre o dimorfismo dos isolados Pb01 e Pb3 isolados de P. brasiliensis</i> .....	40
5.2	Avaliação dos efeitos do farnesol sobre a ação de diferentes antifúngicos e na expressão de genes relacionadas à apoptose para o isolado Pb18 de P. brasiliensis.	45
5.2.1	<i>Efeito do farnesol sobre a ação de diferentes antifúngicos para o isolado Pb18 de P. brasiliensis</i> .....	45
5.2.2	<i>Efeito do farnesol nos níveis de expressão de genes relacionados ao processo de apoptose</i> .....	49
6	CONCLUSÃO.....	53
7	PERSPECTIVAS .....	54
8	Anexos.....	55
8.1	Anexo I: Estudo do efeito do farnesol na infecção ex-vivo de distintas linhagens celulares em cultura por Paracoccidioides brasiliensis .....	55
8.1.1	<i>Objetivo Geral</i> .....	55
8.1.2	<i>Objetivos Específicos</i> .....	55
8.1.3	<i>Materiais e Métodos</i> .....	55
8.1.4	<i>Resultados e Discussão</i> .....	61
8.2	Anexo II: Participação em Congressos.....	66
8.2.1	Pôsteres:.....	66
8.2.2	Pôsteres como co-autora:.....	66
8.3	Anexo III: Participação em artigo .....	67
9	REFERÊNCIAS .....	68

## Lista de siglas e abreviaturas

°C	Graus Celsius
arp3 e arp9	Proteínas 3 e 9 relacionadas à autofagia
ap	Proteína de autofagia.
cDNA	Sequência de DNA complementar
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Desoxirribonuclease
dNTP	Desoxirribonucleotídeo
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FOH	Farnesol - (E,E)-3,7,11-trimeil-2,6,10-dodecatrieno-1-ol
g	Gramas
h	Hora
HEPES	N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-ácido etanosulfônico
M	Molar
mc	metacaspase
MCP	Morte celular programada
mg	Miligrama
MIC	Concentração mínima inibitória
min	Minuto
mL	Mililitro
MLC	Concentração mínima letal
mM	Milimolar
mn	Nuclease mitocondrial
MØ	Macrófago
mRNA	RNA mensageiro
MTT	Brometo 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium
OD	Densidade óptica ou absorbância

PBS	Tampão de fosfato
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PCM	Paracoccidioidomicose
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
QS	Quorum-sensing
QSM	Molécula de QS
RNA	Ácido ribonucléico
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
rr	Rodoxina reductase
RT-PCR	Amplificação por PCR de um produto de transcrição reversa (cDNA)
SEM	Erro padrão da média
SFB	Soro fetal Bovino
T <sub>m</sub>	Temperatura de fusão
U	Unidade enzimática
V	Volume
vps	Proteína associada à proteína classificatória vacuolar
v/v	volume/volume
YPD	Yeast Peptone Dextrose (meio YPD)
μg	micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
%	Por cento

## Lista de Figuras

Figura 1. Resumo dos rumos da interação parasito-hospedeiro em PCM humana (Benard, 2008).....	5
Figura 2. Resumo da regulação de citocinas associada às três principais formas de PCM, baseadas nas respostas imune à glicoproteína 43kDa (gp43), componente antigênico imunodominante da forma leveduriforme de <i>P. brasiliensis</i> (Benard, 2008)..	7
Figura 3. Resumo da indução da reposta Th1 ou Th2 pelo sistema imune adaptativo..	9
Figura 4. Sinalização e metabolismo do farnesol.....	14
Figura 5. Análise do crescimento dos isolados Pb18, Pb01 e Pb3 de <i>P. brasiliensis</i> após o tratamento com diferentes concentrações de metanol.....	33
Figura 6. Comparação entre os resultados do ensaio MTT e da contagem de leveduras na câmara de Neubauer para os isolados Pb01 (A) e Pb3 (B) de <i>P. brasiliensis</i> .....	35
Figura 7. Análise do crescimento dos isolados Pb01 e Pb3 de <i>P. brasiliensis</i> após tratamento com diferentes concentrações de farnesol.....	37
Figura 8. Análise da viabilidade dos isolados Pb01 e Pb3 de <i>P. brasiliensis</i> após tratamento com diferentes concentrações de farnesol.....	38
Figura 9. Efeito do farnesol no dimorfismo do isolado Pb01 de <i>P. brasiliensis</i> . Leveduras do isolado Pb01 foram incubadas por 24h e 48h à 25°C em diferentes concentrações de farnesol.....	41
Figura 10. Efeito do farnesol no dimorfismo do isolado Pb3 de <i>P. brasiliensis</i> . Leveduras do isolado Pb3 foram incubadas por 24h e 48h à 25°C em diferentes concentrações de farnesol.....	43
Figura 11. Avaliação do efeito do farnesol sobre o MIC dos antifúngicos. As concentrações mínimas inibitórias (MIC) dos antifúngicos.....	48
Figura 12. Perfil eletroforético do RNA total extraído do isolado Pb18 de <i>P. brasiliensis</i> à 6h do tratamento com farnesol após tratamento com DNase I livre de RNase.....	50
Figura 13. Níveis de expressão de genes relacionados à apoptose e à autofagia após 6h de tratamento com farnesol. Para o cálculo foi utilizado o método do $2^{-\Delta\Delta CT}$ .....	51

## Lista de Figuras no Anexo

Figura_ I. Análise do efeito de 2% e 5% de SFB sobre a viabilidade do isolado Pb18 de <i>P. brasiliensis</i> tratado com diferentes concentrações de farnesol. ....	61
Figura_ II. Análise da viabilidade das células das linhagens MH-S e J774A.1 de macrófagos e a linhagem A549 de pneumócitos após de tratamento diferentes concentrações de farnesol.....	63
Figura_ III. Análise da viabilidade das células da linhagem primaria de macrófagos peritoneais após tratamento com diferentes concentrações de farnesol. ....	64
Figura_ IV. Análise da morfologia das células da linhagem primaria de macrófagos peritoneais após tratamento com diferentes concentrações de farnesol. ....	65

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Dados gerais dos oligonucleotídeos sintetizados.....	25
Tabela 2: Dados gerais do controle interno. ....	25
Tabela 3: Valores obtidos pelo método $\Delta\Delta CT$ para avaliação dos níveis de expressão de genes relacionados à apoptose e à autofagia após 6h de tratamento com farnesol. ....	51

## Lista de Quadros

Quadro I. Termos Relacionados. ....	4
Quadro II. Resposta Th1/Th2. ....	9
Quadro III. Morte celular programada (MCP) em fungos.....	16

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a incidência de patologias causadas por fungos vem aumentando consideravelmente com o aumento no número de pacientes imunodeprimidos, tornando-se conseqüentemente maior o interesse por tratamentos alternativos (Romani, 2004; Chakrabarti, 2005; Carrillo-Munoz *et al.*, 2006; Kauffman, 2006; Klein e Tebbets, 2007). A veemência nessa procura por novos tratamentos provem do fato de os tratamentos tradicionais requererem longos períodos de tempo, podendo acarretar efeitos colaterais severos, além do desenvolvimento de resistência do microrganismo (Arenas, 2003; Gupta e Tomas, 2003; Carrillo-Munoz *et al.*, 2006; Kauffman, 2006).

Entre os fungos de importância médica, os dimórficos destacam-se por serem responsáveis pela maioria das infecções sistêmicas em humanos e outros mamíferos. Este grupo de fungos é constituído por seis gêneros de ascomicetos filogeneticamente relacionados – *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Penicillium marneffeii* e *Sporothrix schenckii* – sendo o *P. brasiliensis* o mais prevalente na América Latina (Arenas, 2003; Rappleye e Goldman, 2006; Klein e Tebbets, 2007).

### 1.1 O fungo *Paracoccidioides brasiliensis*

#### 1.1.1 Ocorrência na população e histórico dos seus isolados

O fungo dimórfico *P. brasiliensis* é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), a micose sistêmica mais comum na América Latina (Franco, 1987; Brummer, Castaneda e Restrepo, 1993; Mcewen *et al.*, 1995; Restrepo, Mcewen e Castaneda, 2001). Estima-se que cerca de 10 milhões de pessoas possam estar infectadas e que aproximadamente 2% destas desenvolvem a doença (Restrepo, Mcewen e Castaneda, 2001). No Brasil, entre 1980 e 1995, a PCM foi a oitava causa de morte mais predominante dentre as doenças crônicas em 1166 municípios (Coutinho *et al.*, 2002). Entretanto, presume-se que a incidência dos indivíduos que desenvolvem a

PCM poderá elevar-se com o aumento do desmatamento e do número de indivíduos imunodeficientes (Arenas, 2003).

O fungo *P. brasiliensis* é um fungo termodimórfico que se encontra como micélio à temperatura ambiente (25°C) e como levedura à 37°C (San-Blas e Cova, 1975; San-Blas, 1985; 1993). A sua forma leveduriforme tem sido isolada facilmente de pacientes, tatus e cães infectados (Costa, Diniz e Netto, 1995; Costa *et al.*, 1995; Ono *et al.*, 2001; Restrepo, Mcewen e Castaneda, 2001; Bagagli *et al.*, 2006; Bagagli *et al.*, 2008). Este fungo também tem sido isolado, esporadicamente, de solo e materiais relacionados, tais como rações de cachorros e fezes de pingüins e morcegos (Franco *et al.*, 2000; Tercarioli *et al.*, 2007). Apesar de não se conhecer muitos aspectos ecológicos deste fungo, existem várias evidências que apontam o solo como o principal habitat saprofítico, como descrito para outras espécies termodimórficas relacionadas: *B. dermatitidis*, *C. immitis*, e *H. capsulatum* (Zeidberg *et al.*, 1952; Kirkland e Fierer, 1996; Baumgardner e Paretzky, 1999; Tercarioli *et al.*, 2007). No entanto, a dificuldade de isolamento de *P. brasiliensis* na sua forma miceliana combinado com achados sobre a interação parasito-hospedeiro, tais como: a tendência a períodos prolongados de latência da infecção, a cronicidade e a recidiva em pacientes tratados (que refletem uma grande capacidade adaptativa do microrganismo), sugerem a existência de ciclo de vida associado ao hospedeiro (Bagagli *et al.*, 2006). No entanto, a demonstração da necessidade adaptativa de um ciclo associado ao hospedeiro ainda encontra-se em aberto, uma vez que após a morte do hospedeiro infectado, o fungo pode voltar para o ambiente. Desta forma, a infecção poderia ser considerada como um evento acidental (Franco *et al.*, 2000; Restrepo, Mcewen e Castaneda, 2001; Bagagli *et al.*, 2008). Entretanto, podemos especular que o processo de infecção possa contribuir para um maior sucesso adaptativo do fungo, uma vez que este pode se propagar e colonizar novos ambientes.

Conhecimentos sobre a biologia evolutiva são importantes para a área da micologia médica porque promovem uma base mais adequada para a determinação do tratamento (Bagagli *et al.*, 2006; Bagagli *et al.*, 2008). O fungo *P. brasiliensis* foi considerado, por muito tempo, uma entidade biológica única, devido as suas características microscópicas tanto em condições de cultivo quanto parasitária, o que facilitava o diagnóstico médico (Bagagli *et al.*, 2008). Entretanto, a observação de que

os isolados distintos apresentam diferenças na virulência (Singer-Vermes *et al.*, 1994; Molinari-Madlum, Felipe e Soares, 1999; Kurokawa *et al.*, 2005; Macoris *et al.*, 2006), sugerem que uma caracterização mais apropriada poderia auxiliar na escolha de um tratamento mais eficaz.

Matute *et al.* (2006; Matute, Sepulveda *et al.*, 2006) determinaram três espécies crípticas de *P. brasiliensis*, das quais duas são espécies filogenéticas (PS2 e PS3) e a terceira, uma espécie parafilética (S1) (Quadro I). No mesmo estudo, S1 e PS2 foram consideradas espécies com recombinação sexual, embora sejam reprodutivamente isoladas entre si (são simpátricas). Por outro lado, o grupo PS3 demonstrou-se uma espécie clonal (Matute, Mcewen *et al.*, 2006; Matute, Sepulveda *et al.*, 2006). A espécie PS2 é composta por isolados brasileiros e venezuelanos, enquanto a PS3 é restrita a isolados colombianos, e, por último, a S1 tem um habitat mais amplo que percorre as áreas endêmicas (Matute, Mcewen *et al.*, 2006; Matute, Sepulveda *et al.*, 2006). Apesar das diferenças, todas as três espécies crípticas são capazes de causar doenças tanto em humanos como em tatus (Carvalho *et al.*, 2005). Em estudos com novos isolados de *P. brasiliensis*, Carreo *et al.* (2008) verificaram que os isolados Pb01 e IFM 54648 foram os únicos a não encaixarem em nenhum dos três grupos supracitados e encontram-se filogeneticamente distantes deles. Em estudos mais recentes, foram analisados 88 isolados dos quais 16 apresentavam características genotípicas que se assemelham ao isolado Pb01, o que permitiu separar os isolados semelhantes ao Pb01 (“Pb01-like”) em um grupo filogenético distinto dos três supracitados; e o evento de especiação deste grupo é considerado simpátrico dado que compartilha algumas regiões geográficas como as outras três espécies sem fluxo gênico entre eles (Teixeira *et al.*, 2009 em revisão). A diferença entre o grupo “Pb01-like” é tamanha com as três espécies descritas por Matute, McEwen *et al.* (2006), que Teixeira *et al.* (2009 em revisão) sugere uma descrição formal de uma nova espécie a ser denominada *Paracoccidioides lutzii*, em homenagem ao médico micologista Adolpho Lutz, primeiro pesquisador a descrever o fungo patogênico humano *P. brasiliensis* no ano de 1908 (Teixeira *et al.*, 2009 em revisão).

**Quadro I. Termos Relacionados.**

Grupo Filogenético – formado pelo menor grupo taxonômico com uma linhagem comum que compartilha uma característica fenotípica única e diagnosticável (<http://www.blackwellpublishing.com/ridley/>).

Grupo Parafilético – formado por um grupo taxonômico que inclui alguns mas não todos os descendentes do ancestral comum. Seus membros incluem aqueles que mudaram pouco do estado ancestral, sendo aqueles que mudaram muito excluídos (<http://www.blackwellpublishing.com/ridley/>).

Especiação Simpátrica – são populações de espécies relativamente próximas que ocupam a mesma área geográfica, ou áreas sobrepostas, sem entrecruzarem. A espécie diferencia-se sem nenhuma separação da região geográfica da espécie ancestral (<http://www.blackwellpublishing.com/ridley/>).

### 1.1.2 Imunobiologia da *Paracoccidioidomycose*

Embora o ciclo biológico de *P. brasiliensis* não tenha sido completamente desvendado, acredita-se que a infecção ocorra pela inalação de conídios ou fragmentos de micélio da fase saprofítica do fungo, os quais atingem primeiramente o aparelho respiratório do hospedeiro (Brummer, Castaneda e Restrepo, 1993; Restrepo, Mcewen e Castaneda, 2001; Arenas, 2003). No pulmão, ocorre a transição dos conídios e/ou fragmentos de hifa para a forma de levedura; no entanto nem os mecanismos envolvidos em sua disseminação nem o modo pelo qual o fungo atinge os compartimentos intravasculares de vários órgãos estão esclarecidos (Franco, 1987; Mendes-Giannini *et al.*, 2008). Após a inalação, a manifestação clínica e os rumos da infecção irão variar de paciente a paciente, dependendo da resposta imunológica do hospedeiro e da virulência do fungo (Figura 1). Nos indivíduos resistentes, a infecção pode tornar-se latente ou ainda ser erradicada sem causar danos ao hospedeiro (Franco, 1987; San-Blas, Nino-Vega e Iturriaga, 2002). Em áreas endêmicas, têm sido reportados muitos casos de infecção subclínica, o que indica que existe elevada resistência natural a esta infecção (Brummer, Castaneda e Restrepo, 1993). Nos indivíduos susceptíveis, a infecção torna-se aguda ou crônica e as leveduras terminam por disseminar-se pelo resto do organismo (Brummer, Castaneda e Restrepo, 1993). Em ambos os casos, as etapas de adesão, invasão, colonização e disseminação de *P. brasiliensis* são consideradas cruciais no

desenvolvimento das diferentes formas da PCM, dependendo de vários fatores, tais como o isolado do fungo e a condição do hospedeiro (Calich *et al.*, 1985; Franco, 1987; Singer-Vermes *et al.*, 1994; Calich, Vaz e Burger, 1998; San-Blas, Nino-Vega e Iturriaga, 2002; Kurokawa *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007; Calich *et al.*, 2008; Mendes-Giannini *et al.*, 2008). Portanto, é importante compreender as interações hospedeiro-fungo visando o descobrimento e desenvolvimento de novas terapias antifúngicas (Mendes-Giannini *et al.*, 2008).



**Figura 1. Resumo dos rumos da interação parasito-hospedeiro em PCM humana (Benard, 2008).**

Recapitulando, o primeiro local de contato entre o fungo *P. brasiliensis* e o hospedeiro é o epitélio respiratório, onde estão os macrófagos alveolares, que provavelmente são as primeiras células do sistema imune a interagirem com o parasito, e as células epiteliais alveolares, as quais contribuem para a sinalização e ativação da resposta imune (Mendes-Giannini *et al.*, 2004; Romani, 2004; Filler e Sheppard, 2006; Calich *et al.*, 2008; Mendes-Giannini *et al.*, 2008). O sistema imune inato<sup>1</sup> consiste de um braço humoral (proteínas do complemento, lisozimas, lactoferrina, defensinas, entre outros) e um braço celular (macrófagos, leucócitos polimorfonucleares, células “natural killer”, entre outros). No caso das vias aéreas, o sistema imune celular consiste principalmente de macrófagos alveolares (Lambrecht, 2006). Se estes mecanismos

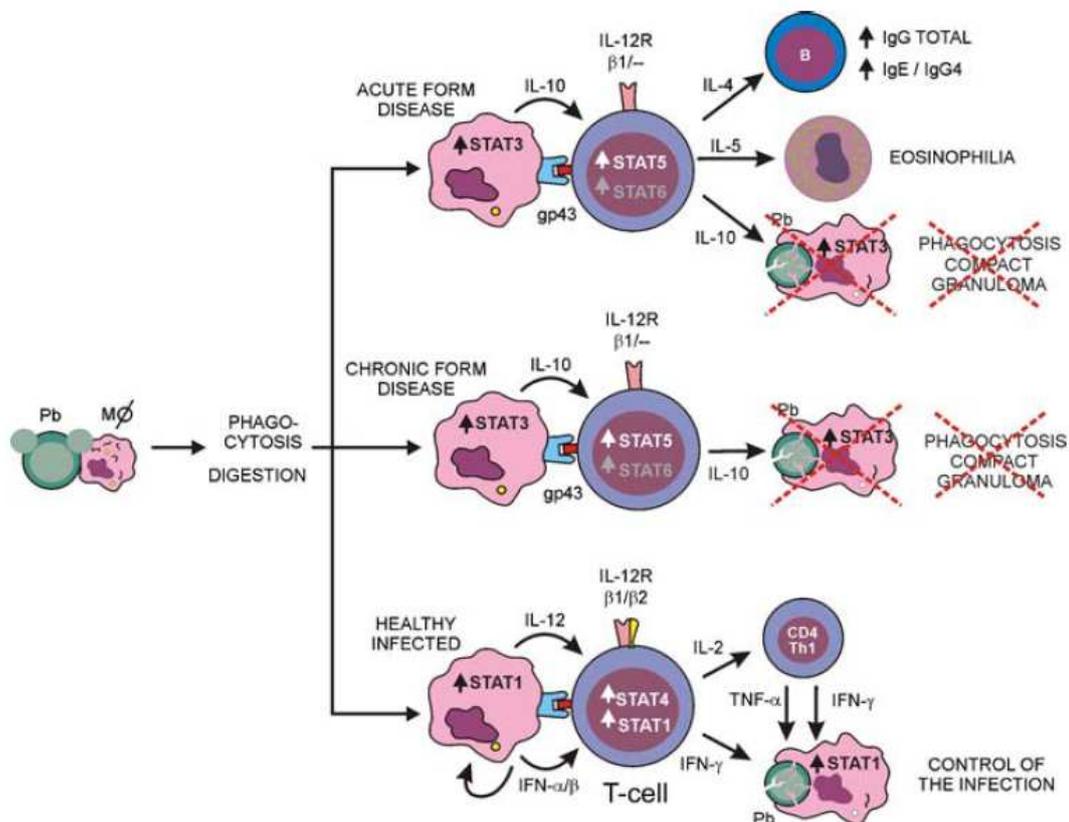
<sup>1</sup> O sistema imune inato não é específico a um patógeno particular e sim ao grupo que representam (vírus, bactérias, fungos, etc.) através de receptores de reconhecimento padrão (PRR) que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) (Adany *et al.*, 1994; Rioja *et al.*, 2000).

inatos falharem, é ativado o sistema imune adaptativo pelas células epiteliais e dendríticas alveolares (Lambrecht, Prins e Hoogsteden, 2001).

Em um experimento realizado por MacLean *et al.* (1996), foram estimados que os macrófagos alveolares eram capazes de lidar com até  $10^9$  bactérias injetadas intratraquealmente antes do microrganismo ser reconhecido pelas células dendríticas, as quais ativam o sistema imune adaptativo. Fundamentalmente, a ativação da imunidade celular é vital para o controle efetivo e proteção contra a PCM tanto em humanos como em modelos murinos (Singer-Vermes *et al.*, 1994), como também contra outros fungos (revisado em Romani, 2004). Nesses mesmos modelos, a resposta imune inata demonstra ter papel fundamental no controle da disseminação do fungo nas fases iniciais da infecção e na determinação do destino da infecção (Calich, Vaz e Burger, 1998; Calich *et al.*, 2008).

Os macrófagos alveolares, como mencionado anteriormente, são provavelmente a primeira célula do sistema imune a interagir com *P. brasiliensis* e exerce um papel crucial para sua restrição inicial pelo hospedeiro (Romani, 2004; Calich *et al.*, 2008), sendo a importância do sistema mononuclear fagocítico evidenciada pelo trabalho de Kashino *et al.* (1995), no qual foi mostrado que o bloqueio deste sistema aumentava a severidade da enfermidade tanto em animais resistentes quanto em suscetíveis. Brummer *et al.* (1989) demonstrou que macrófagos alveolares não ativados são capazes de fagocitar as leveduras, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, mas também podem conferir um ambiente propício para a multiplicação de *P. brasiliensis*. Por outro lado, quando os macrófagos são ativados apresentam ação fungicida por desintegrarem as estruturas citoplasmáticas e romperem a membrana plasmática; permanecendo íntegra somente a parede celular das leveduras (Brummer *et al.*, 1989; Brummer *et al.*, 1990). Essa relação também se evidencia quando os macrófagos alveolares são analisados após uma infecção pulmonar em camundongos, no qual peróxido de hidrogênio encontra-se ausente nos suscetíveis e é produzido através do curso da infecção nos resistentes (Cano *et al.*, 1995). Embora comprovado que a ativação de macrófagos peritoneais de camundongos por INF- $\gamma$  aumente a atividade fungicida independente de explosão oxidativa (Brummer, Hanson e Stevens, 1988), o papel do óxido nítrico demonstrou-se fundamental para a habilidade fungicida destas células, que por mecanismo de restrição de ferro inibem a transformação do conídio ingerido à levedura (Cano *et al.*, 1992; Cano

*et al.*, 1994; Gonzalez *et al.*, 2000). Além de seu papel no combate a microrganismos aéreos (revisado em Romani, 2004), os macrófagos alveolares desempenham um papel no direcionamento da resposta imune adaptativa, que no caso de *P. brasiliensis* se encontra resumido na figura 2.



**Figura 2. Resumo da regulação de citocinas associada às três principais formas de PCM, baseadas nas respostas imunes à glicoproteína 43kDa (gp43), componente antigênico imunodominante da forma leveduriforme de *P. brasiliensis* (Benard, 2008).** Pb, *P. brasiliensis*; MØ, macrófago; IL, interleucina; IL-12R, receptor da IL-12; β1 e β2, subunidades do IL-12R; IFN, interferon; TNF, fator de necrose tumoral; STAT, tradutores de sinal e ativadores da transcrição.

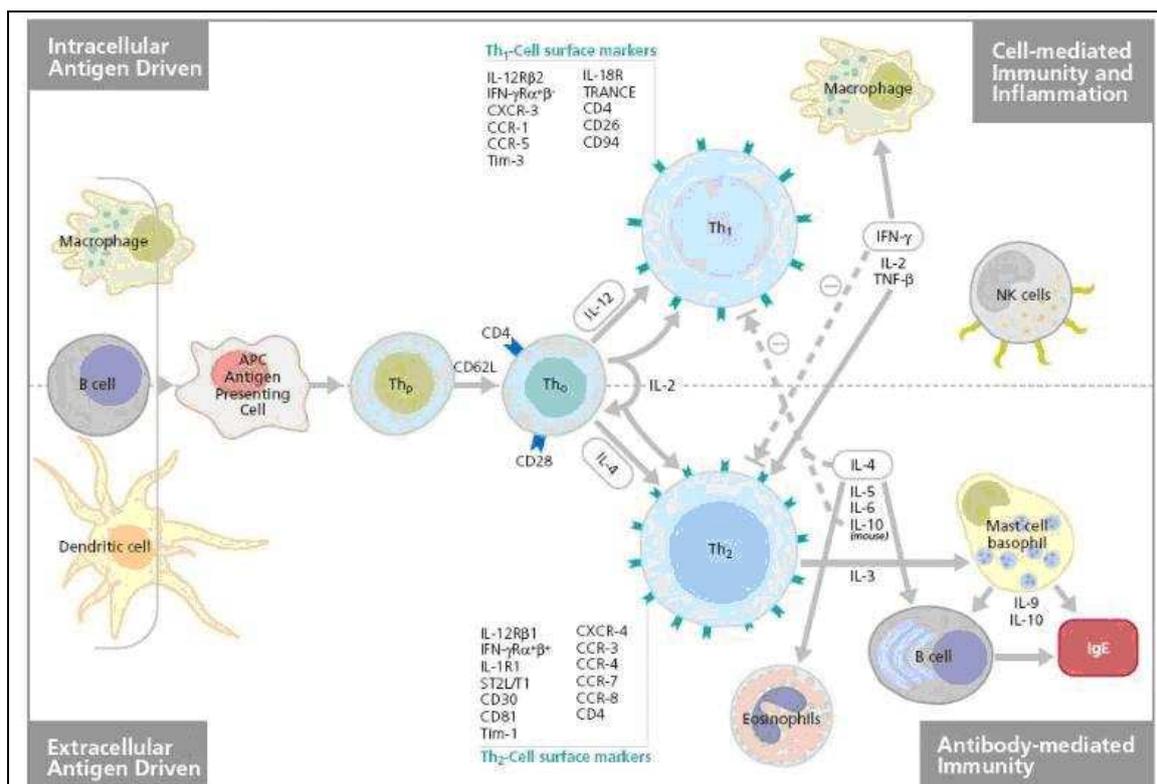
Como anteriormente mencionado, outras células que parecem possuir um papel crucial na defesa do organismo à infecção por patógenos aéreos são as células dendríticas (revisado em Lambrecht, Prins e Hoogsteden, 2001). Essas células são as mais efetivas apresentadoras de antígenos, importantes na integração entre o sistema imune inato e adaptativo (Lambrecht, Prins e Hoogsteden, 2001; Wan e Dupasquier, 2005). Seu papel na PCM tem sido alvo de muitas investigações nos últimos anos, uma vez que sua interação com *P. brasiliensis* determinará o tipo de resposta imune adaptativa que será montada, determinando assim se o indivíduo desenvolverá ou não a doença (Almeida e Lopes, 2001; Ferreira, Lopes e Almeida, 2004; Ferreira e Almeida,

2006; Ferreira *et al.*, 2007). Nesse contexto, a resistência do hospedeiro à PCM está associada a uma resposta a favor da ativação de células fagocíticas durante toda infecção, e, apesar de não existir uma resposta polarizada dos padrões Th1/Th2 (Quadro II), a secreção de IL12 e IFN $\gamma$  demonstra-se protetora (Calich, Vaz e Burger, 1998; Spadari, Lopes e Rogério, 2004; Spadari *et al.*, 2007; Calich *et al.*, 2008). Por outro lado, a susceptibilidade está associada a uma desativação prematura da imunidade mediada por células T, e ativação das células B, além do aumento de IL-10 ou TGFP (Calich, Vaz e Burger, 1998; Calich *et al.*, 2008).

#### **Quadro II. Resposta Th1/Th2.**

As citocinas são mensageiras hormonais responsáveis pela maioria dos efeitos biológicos do sistema imune, e, embora sejam inúmeras, podem ser funcionalmente divididas em: pro-inflamatórias e antiinflamatórias (Lucey, Clerici e Shearer, 1996; Murphy *et al.*, 1998; Infante-Duarte e Kamradt, 1999; Antachopoulos e Roilides, 2005). A maior fonte de citocinas são os linfócitos T que estão subdivididos em duas principais categorias distinguidas pela presença das moléculas CD4 ou CD8 na sua superfície celular (Lucey, Clerici e Shearer, 1996; Murphy *et al.*, 1998; Infante-Duarte e Kamradt, 1999; Antachopoulos e Roilides, 2005). Dentro destas subunidades, as células T CD4 ou *helpers* são as mais prolíficas produtoras de citocinas, e podem ser influenciadas a partir do seu estado basal Th0 a diferenciar-se para produzir, de uma maneira muito simplificada, citocinas do tipo Th1 ou Th2 (Lucey, Clerici e Shearer, 1996; Murphy *et al.*, 1998; Infante-Duarte e Kamradt, 1999; Antachopoulos e Roilides, 2005).

As citocinas típicas do padrão de resposta Th1, como por exemplo o interferon gama (INF- $\gamma$ ), são responsáveis por induzir uma resposta imune pro-inflamatória mediada por células e que pode resultar na eliminação dos microrganismos intracelulares (Lucey, Clerici e Shearer, 1996; Murphy *et al.*, 1998; Infante-Duarte e Kamradt, 1999; Antachopoulos e Roilides, 2005). Por outro lado, as citocinas do tipo Th2, que incluem interleucinas 4, 5 e 10, entre outras, são responsáveis por uma resposta imune mediada por anticorpos importantes na defesa contra microrganismos extracelulares (Lucey, Clerici e Shearer, 1996; Murphy *et al.*, 1998; Infante-Duarte e Kamradt, 1999; Antachopoulos e Roilides, 2005). Um resumo das citocinas associadas com as respostas Th1/Th2 pode ser observadas na figura 3.



**Figura 3. Resumo da indução da resposta Th1 ou Th2 pelo sistema imune adaptativo.** As células dendríticas, macrófagos e/ou células B apresentam o antígeno às células T CD4 ou *helpers* em seu estado basal que, dependendo do antígeno apresentado, começam a diferenciar-se para produzir citocinas do tipo Th1 ou Th2. Isto inicia uma cascata de eventos que modula o sistema imune adaptativo a montar a melhor resposta contra o intruso em questão.

(<http://www.biocompare.com/Articles/TechnicalArticle/1348/Th1-And-Th2-Balance,-Regulation,-And-Involvement-In-Disease-from-BD-Biosciences.html>)

## 1.2 Tratamento da Paracoccidioidomicose

Os antifúngicos comercializados para o tratamento desta e de outras micoses sistêmicas afastam-se do ideal - que seria de apresentar um amplo espectro de atividade fungicida sem causar danos ao hospedeiro - dado que o uso das drogas atuais é limitado devido a questões de segurança, resistência e efetividade dos fármacos (Arenas, 2003; Carrillo-Munoz *et al.*, 2006). Além disso, existem poucos antifúngicos em comparação ao número de antibióticos anti-bacterianos e, nos últimos anos, tem aumentado o número de fungos resistentes às drogas (Cowen, 2008).

Os alvos clássicos dos antifúngicos são: os esteróis fúngicos (ou por interação com os esteróis de membrana ou pela interferência na sua biossíntese); o metabolismo dos ácidos nucleicos; e a parede celular (por exemplo, a inibição da enzima beta-glucana sintetase) (Arenas, 2003; Carrillo-Munoz *et al.*, 2006). Os antifúngicos contra o

primeiro alvo são utilizados preferencialmente na clínica, e estão divididos funcionalmente em duas classes principais (Arenas, 2003; Carrillo-Munoz *et al.*, 2006):

- Macrólidos (ou macrolídeos) poliênicos: fixam-se ao ergosterol da membrana celular do fungo, e formam poros que alteram a integridade da mesma. Destes, a anfotericina B é considerada o padrão de ouro para o tratamento de micoses severas, apesar de seus efeitos secundários salientes.
- Azóis: bloqueiam a 14  $\alpha$ -demetilase do sistema enzimático do citocromo P-450 microsomal, e, conseqüentemente, inibem a síntese de lipídeos (em especial o ergosterol) de membrana que geram o acúmulo de 14  $\alpha$ -metilesteróis. Estes compostos podem desorganizar os agrupamentos das cadeias acilas dos fosfolipídios e assim interferir com os sistemas enzimáticos da membrana. Podem ser subdivididos em:
  - Imidazólicos, tais como o cetoconazol.
  - Triazólicos, tais como o fluconazol e o itraconazol, que agem de maneira mais seletiva, portanto acarretam menos problemas endocrinológicos ao paciente.

A fim de selecionar o fármaco e a duração do tratamento apropriados, no caso da PCM, é importante determinar, primeiramente, sua gravidade, o local da lesão e as contra-indicações (baseadas no histórico do paciente) (Shikanai-Yasuda, 2005). No momento, o tratamento recomendado consiste em duas etapas: i) a inicial ou fase indutora (antes de aliviar os sintomas clínicos e a normalização dos marcadores da fase ativa da doença); ii) e a fase de manutenção (prolongada até a interrupção do tratamento) (Shikanai-Yasuda, 2005). Não se recomenda suspender a fase de manutenção do tratamento até a estabilização das alterações radiológicas do tórax, ausência de sintomas durante dois anos e estudo sorológico negativo (Arenas, 2003). Este tratamento de duas fases foi proposto dado à necessidade de administrar, na fase inicial, medicamentos mais ativos e, portanto, mais tóxicos principalmente naqueles casos mais severos (Shikanai-Yasuda, 2005). Estes fármacos são mais difíceis de serem usados em termos da rota de sua administração e posologia, por isso dificultam a adesão do paciente ao tratamento. Uma vez a enfermidade esteja controlada, muda-se para drogas que são mais fáceis de serem administradas. Cabe destacar que a ausência de tratamento pode ser fatal quando o indivíduo desenvolve a doença.

O medicamento mais utilizado em fases iniciais é o itraconazol, embora o fluconazol também seja bastante eficaz (Brummer, Castaneda e Restrepo, 1993; Arenas, 2003). Já o cetoconazol, apesar de ser efetivo, tem muitos efeitos colaterais. A terapia clássica que utiliza derivados de sulfonamidas (sulfas de eliminação lenta) ainda é eficaz, enquanto a anfotericina B é reservada para casos mais graves (Brummer, Castaneda e Restrepo, 1993; Arenas, 2003). Em todos os casos, o tratamento é prolongado, podendo durar anos para evitar recidivas. Outro aspecto importante é o desenvolvimento de resistência de *P. brasiliensis*, em particular contra os medicamentos cetoconazol e trimetoprim (Hahn *et al.*, 2003). Ademais, Silva Costa *et al.* (2005) mostraram possíveis *locus* de transportadores de drogas no transcriptoma de *P. brasiliensis*, enquanto da Silva *et al.* (2006) demonstraram também que melanina produzida reduz a suscetibilidade do fungo à anfotericina B, aos azóis (cetoconazol, fluconazol, itraconazol) e à sulfametoazol.

### 1.2.1 *Farnesol – uma molécula de quorum-sensing de Candida albicans e seu potencial papel como um agente antimicrobiano*

O conceito de *quorum-sensing* (QS) é relativamente novo. Este tem sua origem nos anos 60, com o grande interesse de microbiologistas e bioquímicos sobre as bactérias bioluminescentes (Hastings e Greenberg, 1999) e no reconhecimento da ação de compostos presentes nos sobrenadantes de culturas microbianas de auto-induzir o fenômeno de competência em bactérias Gram positivas (Felkner e Wyss, 1964; Tomasz e Hotchkiss, 1964). Mas foi somente em 1970, que Nealson *et al.* (1970) organizaram as informações precedentes sobre as bactérias bioluminescentes e determinaram em seus experimentos a associação entre a produção de bioluminescência e a densidade celular das bactérias. No entanto, apenas em 1994, na primeira revisão feita sobre o assunto, é que o termo *quorum-sensing* foi cunhado (Fuqua, Winans e Greenberg, 1994).

Em termos gerais, QS é um processo de comunicação celular entre microrganismos mediado pela densidade populacional. O mecanismo principal de regulação de QS é pela produção de autoindutores que são liberados no meio externo, onde se acumulam, e a medição concomitante de sua concentração por meio de sua interação com seu receptor, o qual pode ser tanto intracelular como estar na superfície

celular (revisado em Neelson, Platt e Hastings, 1970; Redfield, 2002; Hense *et al.*, 2007). Quando sua concentração atinge um certo limiar, este promove a ativação ou a repressão de vários genes levando as células a exibirem novos fenótipos. Estes fenótipos aperfeiçoariam a expressão de determinadas funções que seriam mais eficientes e, portanto, de maior benefício se realizadas por uma população maior de células (revisado em Edwards e Ericsson, 1999; Redfield, 2002; Hense *et al.*, 2007).

Em bactérias, este fenômeno de auto-indução tem sido vastamente estudado, e foi verificado que está relacionado a diversos processos celulares; tais como a produção de antibióticos, esporulação, competência, expressão de genes de virulência, transferência de DNA, formação de biofilmes, bioluminescência, entre outros (revisado em Miller e Bassler, 2001).

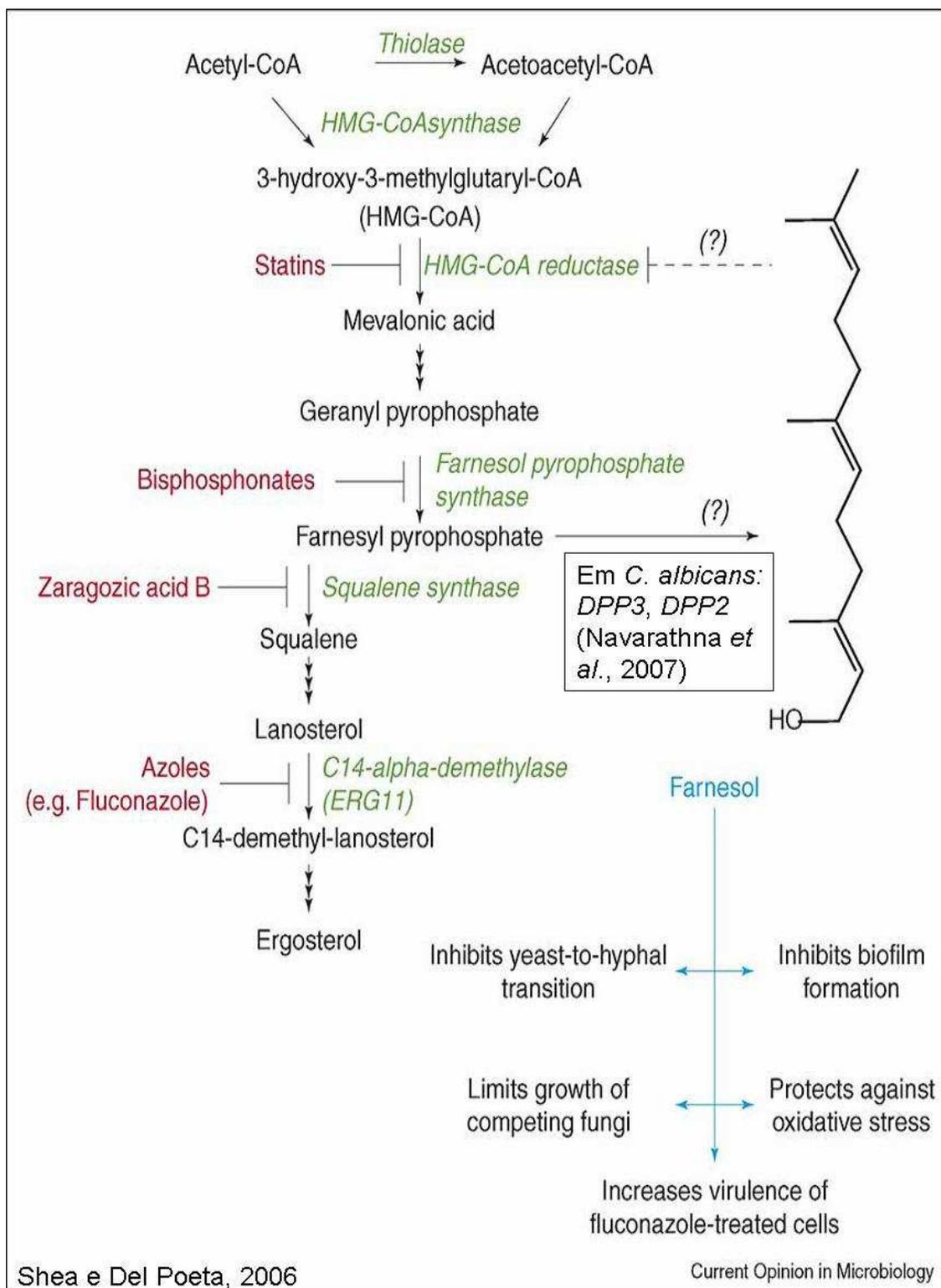
Em eucariotos, até o presente momento, o mecanismo de QS foi relatado em fungos, sendo que a maioria dos casos descritos está relacionada com a transição morfológica desses organismos. Mesmo assim, o fenômeno de QS em fungos tem sido alvo de várias revisões (Chen e Fink, 2006; Hogan, 2006; Nickerson, Atkin e Hornby, 2006; Sprague e Winans, 2006). O primeiro estudo relatando a possibilidade de existir o fenômeno de QS em eucariotos foi realizado em *H. capsulatum*, verificando-se a regulação da transição de micélio para levedura nesse fungo (Kugler *et al.*, 2000). Em *Ceratocystis ulmi*, observações similares foram relatadas (Hornby *et al.*, 2004). Já no patógeno oportunista *Candida albicans*, foram purificadas e caracterizadas, até o presente momento, duas moléculas de QS (QSM, do inglês *Quorum-Sensing Molecules*), o farnesol (Hornby *et al.*, 2001) e o tirosol (Chen *et al.*, 2004). Ambas as moléculas afetam a morfologia, o crescimento e a formação de biofilme em *C. albicans* - sendo o farnesol a mais estudada de ambas (Hornby *et al.*, 2001; Ramage *et al.*, 2002). Desde então, muitos outros relatos da existência do fenômeno de QS foram descritos (Chen e Fink, 2006; Hogan, 2006).

A molécula de farnesol<sup>2</sup> (Figura 4), um álcool sesquiterpeno que consiste de três unidades de isopreno, está presente também em muitos óleos essenciais e foi amplamente estudada em sua interação com as células de mamíferos devido a sua

---

<sup>2</sup> (E,E)-3,7,11-trimeil-2,6,10-dodecatrieno-1-ol

propriedade de induzir preferencialmente apoptose ou a parada do ciclo celular em células cancerígenas (Melnykovich, Haug e Goldner, 1992; Haug *et al.*, 1994; Voziyan, Haug e Melnykovich, 1995; Miquel *et al.*, 1998; Joo *et al.*, 2007; Wiseman, Werner e Crowell, 2007), sem afetar as células normais (Adany *et al.*, 1994; Rioja *et al.*, 2000). Seu mecanismo de ação ainda está em estudo, mas acredita-se que envolva a inibição da incorporação de colina na síntese de fosfatidilcolina, provavelmente através da inibição da ação do aglomerado (“pool”) de diacilglicerol (DAG) gerado pela transdução de sinal via fosfolipase D reduzindo que normalmente ativaria um alvo antiapoptótico/proliferativo (Melnykovich, Haug e Goldner, 1992; Haug *et al.*, 1994; Voziyan, Haug e Melnykovich, 1995; Miquel *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 2005). Adicionalmente, lhe esta associado um papel funcional no aumento da degradação de 3-hidroxi-2-metilglutaril(HMG-CoA) redutactase, que encontra-se ancorada ao reticulo endoplasmático por oito domínios transmembrana e participa das primeira etapas da síntese de esteróis, e na ativação do receptor X farnesoide (FXR), um membro órfão da superfamília de receptores nuclear de hormônios (revisado em Edwards e Ericsson, 1999).



**Figura 4. Sinalização e metabolismo do farnesol.** A via de HMG-CoA reductase gera unidades de isoprenos que formam pirofosfato de farnesil e pirofosfato de geranyl (usado na isoprenilação de proteínas) e também esteróis tais como ergosterol (revisado em Shea e Del Poeta, 2006). Em *Saccharomyces cerevisiae* dois genes, *DPP1* (Toke, Bennett, Dillon et al., 1998) e *LPP1* (Toke, Bennett, Oshiro et al., 1998), que codificam para isopreno fosfato fosfatases que convertem farnesil pirofosfato em farnesol foram identificados. Enquanto em *C. albicans*, os genes homologos correspondentes são *DPP3* e *DPP2*, respectivamente (Navarathna, Hornby et al., 2007).

No fungo dimórfico *C. albicans*, a molécula de farnesol confere – ademais do seu papel como QSM - maior resistência ao estresse oxidativo incluindo peróxido de hidrogênio e geradores de superóxidos, e possivelmente desempenha um papel na persistência desse microrganismo quando no ambiente intracelular de fagócitos (Westwater, Balish e Schofield, 2005). Embora seu papel na patogenicidade do fungo não seja bem compreendido, existem evidências que este aumenta a virulência de *C. albicans* quando administrado exogenamente em modelo de infecção murino, aparentemente sem que cause nenhum tipo de dano em camundongos, e esta mesma virulência diminui quando sua produção endógena é reduzida (Navarathna, Hornby *et al.*, 2007). Além disso, o farnesol interfere na progressão normal da expressão de citocinas no mesmo modelo de infecção, inibindo INF- $\gamma$ , citocina crítica na resposta Th1, e aumentando IL-5, citocina relacionada à resposta Th2 (Navarathna, Nickerson *et al.*, 2007).

Outro aspecto importante desta molécula é o seu efeito antagônico contra outros microrganismos de interesse humano. Foi demonstrado que esta molécula inibe o crescimento de *Staphylococcus aureus* (Jabra-Rizk, Meiller *et al.*, 2006), e *Saccharomyces cerevisiae* (Machida *et al.*, 1998; Machida *et al.*, 1999). Adicionalmente, o farnesol induz apoptose (Quadro III) através de mecanismo que induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), e requer a mitocôndria funcional e a presença do complexo da proteína G heteromérica para inibir o crescimento e o desenvolvimento de *Aspergillus nidulans* (Semighini *et al.*, 2006). Observou-se também nesse contexto uma diminuição na abundância de RNAs mensageiros (mRNAs) de uma série de genes relacionados no processamento e modificação de RNA, transcrição, tradução, biogênese e estrutura ribossomal, metabolismo e transporte de aminoácido (Savoldi *et al.*, 2008). Ao mesmo tempo, observou-se um aumento na expressão de mRNAs relacionados a genes de proteínas mitocondriais das quais, nesse estudo, a aifA (fator indutor de apoptose similar à oxidoreductase mitocondrial<sup>3</sup>) foi caracterizada em detalhe (Savoldi *et al.*, 2008). O aumento na produção de ERO dependente de F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase mitocondrial foi igualmente observado em *S. cerevisiae* (Machida *et al.*, 1998; Machida e Tanaka, 1999), sugerindo

---

<sup>3</sup> Apoptose-Inducing Factor (AIF)-like mitochondrial oxidoreductase

que um dos efeitos antagônicos do farnesol seja induzir dano oxidativo em outras espécies de fungos. Por outro lado, foi observado que o farnesol inibe a formação de biofilmes em outras espécies de *Candida* (Jabra-Rizk, Shirtliff *et al.*, 2006) e inibe a produção de uma QSM (quinolona) de *Pseudomonas* (PQS), e, conseqüentemente, inibe o fator de virulência piocianina de *P. aeruginosa* por ela controlado (Cugini *et al.*, 2007). Ainda, o farnesol induz o aumento da suscetibilidade de microrganismos ao tratamento com antibióticos, podendo ser usado também como um adjuvante terapêutico (Jabra-Rizk, Shirtliff *et al.*, 2006).

### **Quadro III. Morte celular programada (MCP) em fungos.**

MCP é um programa de morte celular altamente conservado de grande importância para o desenvolvimento e para a homeostase de organismos multicelulares. Na última década foi observada evidência desses processos em leveduras e fungos filamentosos (Madeo, Frohlich e Frohlich, 1997; Hamann, Brust e Osiewacz, 2008; Ramsdale, 2008). Em fungos, foi demonstrada sua participação em diferentes processos biológicos que incluem interações com outros sistemas, tais como em interações antagônicas e em relações hospedeiro-parasita, no desenvolvimento e na reprodução fúngica, bem como no envelhecimento (Hamann, Brust e Osiewacz, 2008). Dentre estas, o que mais nos interessa nesse trabalho é seu envolvimento em interações antagônicas. As duas principais categorias de MCP são (Hamann, Brust e Osiewacz, 2008):

- Apoptose (MCP tipo I) que, em geral, é distinguido por um número de mudanças morfológicas que ocorrem durante a morte celular, tais como: fragmentação e condensação de DNA, exposição de fosfatidilserina na superfície celular, e produção de EROs. Cabe destacar que tanto a via de sinalização dependente e independente de mitocôndria é eficiente para ativá-la.
- Autofagia (MCP tipo II) representa o mecanismo de “autodigestão” de células e organelas danificadas como resultado da atividade lisossomal. É importante lembrar que esse mecanismo é parte de um dos principais sistemas de degradação e reciclagem dentro das células.

## 2 Justificativa

Considerando o longo tempo de duração e efeitos colaterais do tratamento e as diversas facetas da PCM (Brummer, Castaneda e Restrepo, 1993; Arenas, 2003), além do aumento da resistência aos medicamentos por isolados de *P. brasiliensis* (Hahn *et al.*, 2003), é cada vez mais necessário investigar novas drogas e tratamentos alternativos. Por isto, com a descoberta de seu papel antagônico para outros microrganismos (Brummer, Castaneda e Restrepo, 1993; Machida *et al.*, 1998; Machida *et al.*, 1999; Arenas, 2003; Jabra-Rizk, Meiller *et al.*, 2006; Jabra-Rizk, Shirliff *et al.*, 2006; Semighini *et al.*, 2006; Semighini, Murray e Harris, 2008) em conjunto com sua baixa toxicidade células normais (Adany *et al.*, 1994; Rioja *et al.*, 2000; Navarathna, Hornby *et al.*, 2007), o farnesol vem sendo considerado seu uso como um potencial agente antimicrobiano.

Derengowski *et al.* (2009), aluna de doutorado de nosso grupo de pesquisa, avaliou o papel fungicida deste sesquiterpeno *in vitro* no crescimento, na viabilidade e na morfogênese no isolado Pb18 do fungo dimórfico *P. brasiliensis*. A concentração mínima inibitória (MIC) e a concentração mínima letal (MLC) para o isolado foram estimadas em 25  $\mu\text{M}$  e 30  $\mu\text{M}$  de farnesol respectivamente, no qual se observou, por microscopia eletrônica de transmissão, um efeito global de degradação de organelas citoplasmáticas sem afetar a parede celular (Derengowski, De-Souza-Silva, Braz, Mello-De-Sousa *et al.*, 2009). Enquanto em concentrações que não comprometem a viabilidade celular (5 à 15  $\mu\text{M}$ ), o farnesol demonstrou afetar a morfogênese ao retardar tanto a transição de levedura para micélio quanto a de micélio para levedura, além de inibir a formação e o alongamento dos tubos germinativos (Derengowski, De-Souza-Silva, Braz, Mello-De-Sousa *et al.*, 2009). Adicionalmente, quando *P. brasiliensis* foi cultivado em meio acrescido de 40% do sobrenadante de uma cultura densa de *C. albicans*, verificou-se uma inibição na formação de tubos germinativos, indicando a existência de um fator secretado por *C. albicans* que retardar a transição dimórfica em *P. brasiliensis* (dados não publicados). Esses dados demonstram o papel fungicida promissor do farnesol para *P. brasiliensis*.

Os experimentos supracitados foram realizados apenas para o isolado Pb18 de *P. brasiliensis*, pertencente a espécie críptica S1, considerada, como mencionado anteriormente na secção 2.1.1, uma espécie parafilética com reprodução sexual e simpátrica com relação a espécie crítica PS3 (Matute, Mcewen *et al.*, 2006). No entanto, existe grande diferenças entre os vários isolados e para validar o farnesol como possível antifúngico contra *P. brasiliensis*, tornar-se necessário investigar seu papel em outros isolado.

Nesse trabalho, escolhemos o isolado Pb3 representante da outra espécie críptica encontrada no território brasileiro, a PS2, e o isolado Pb01 do grupo “Pb01-like” considera uma nova espécie por Teixeira et al. (2009em revisão). Ademais, avaliamos o efeito do farnesol sobre os MICs dos antifúngicos utilizados no tratamento de PCM e a expressão de genes relacionados MCP visando verificar o possível mecanismo de ação do farnesol no isolado Pb18 do fungo dimórfico *P. brasiliensis*.

### 3 Objetivos

#### 3.1 *Objetivo Geral*

- Avaliar o efeito do farnesol em diferentes isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* e analisar sua potencial interação com outros antifúngicos.

#### 3.2 *Objetivos Específicos*

##### 1. Farnesol e outros isolados de *P. brasiliensis*:

- Determinar a concentração mínima inibitória (MIC) e a concentração mínima letal (MLC) do farnesol para os isolados Pb01 e Pb3 de *P. brasiliensis*.
- Determinar o efeito do farnesol no dimorfismo destes isolados

##### 2. Efeito e Interações do farnesol com o isolado Pb18 de *P. brasiliensis*:

- Avaliar o efeito do farnesol no MIC dos antifúngicos: fluconazol, cetoconazol e anfotericina B.
- Avaliar o efeito do farnesol na expressão de genes relacionados ao processo de apoptose e autofagia.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 *Manutenção e Propagação das Células*

#### 4.1.1 *Paracoccidioides brasiliensis*

Os isolados Pb18, Pb01 e Pb03 de *P. brasiliensis*, na forma de levedura, foram mantidos por passagens semanais em meio sólido Fava-Neto (protease peptona 0,3%, peptona 1%, extrato de carne 0,5%, dextrose 4%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,5% e ágar 1,6 %; pH 7,2) a 36,5°C, e foram usados em experimentos após 6-7 dias de crescimento.

Estes isolados foram suspensos no meio específico de cada experimento (ver a seguir), agitados vigorosamente em vortex, visando diminuir o tamanho dos grumos, e posteriormente decantados para a sedimentação de grumos restantes. O número de células viáveis foi determinado por contagem em câmara de Neubauer, sendo a viabilidade do fungo analisada por meio do corante vital verde Janus (Goihman-Yahr *et al.*, 1980). Em nossos experimentos empregamos fungos com uma viabilidade mínima de 90%.

#### 4.1.2 *Preparo das soluções de farnesol*

A partir de uma solução estoque de uma mistura de estereoisômeros de farnesol (Fluka/Sigma - Sigma-Aldrich; Cat.# 46191; Lote # 32706330), foram feitas diluições em metanol levando-se sempre em consideração que o mesmo volume (4µL) das diferentes diluições seria adicionado ao ensaio para obtenção da concentração final desejada. Além disto, o mesmo volume do diluente puro (metanol) foi utilizado em todos os sistemas controle.

### 4.2 *Avaliação do efeito do farnesol sobre diferentes isolados de P. brasiliensis*

#### 4.2.1 *Avaliação do efeito do diluente do farnesol sobre diferentes isolados de P. brasiliensis*

Visando comprovar que os efeitos sobre diferentes isolados de *P. brasiliensis* aqui observados deveram-se ao farnesol e não ao seu diluente metanol, primeiro se

analisou o efeito de distintas concentrações do metanol sobre o crescimento do fungo. As concentrações finais analisadas foram 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7% e 8% de metanol sobre um inóculo de  $2 \times 10^5$  cel/mL dos isolados Pb18, Pb01 e Pb03 de *P. brasiliensis* em meio YPD (1% extrato de levedura, 2% peptona, e 2% glicose; pH 7,2). Os experimentos foram realizados em placa de cultura de células de 96 poços, incubadas a 36°C sob agitação (150rpm). A avaliação do crescimento de *P. brasiliensis* foi realizada por densitometria em um leitor de ELISA (Elx800 do grupo SG CQC) à 630nm, no tempo zero e no oitavo dia de cultivo. Os controles usados foram: controle de crescimento (cultura sem metanol) e o branco (apenas o meio de cultura). Todas as condições experimentais foram realizadas em triplicata.

#### 4.2.2 Avaliação do efeito do farnesol sobre o crescimento de distintos isolados de *P. brasiliensis*

Para verificar o efeito do farnesol no crescimento dos isolados Pb01 e Pb3,  $2 \times 10^5$  cél/mL da forma leveduriforme de cada isolado foram incubadas, em placas de 96 poços (volume final de 200µL), em meio YPD com farnesol acrescentado para se obter as seguintes concentrações finais: 2,5µM, 5µM, 7,5µM, 10µM, 12,5µM, 15µM, 17,5µM, 20µM, 22,5µM, 25µM, 27,5µM, 30µM, 35µM, 40µM, 50µM, 75µM, 100µM, 150µM e 300µM. As culturas foram incubadas a 36°C, sob agitação (150rpm), por oito dias. A avaliação do crescimento de *P. brasiliensis* foi realizada por densitometria em um leitor de ELISA (Elx800 do grupo SG CQC) à 630nm, no tempo zero e no oitavo dia de crescimento. Os controles usados foram: controle de crescimento (cultura sem farnesol), controle do diluente (cultura com 2% metanol) e o branco (apenas o meio de cultura). A concentração mínima inibitória (CMI) foi definida como sendo aquela que promove 90% de inibição do crescimento quando comparado com o controle (cultura sem farnesol).

#### 4.2.3 Padronização do método colorimétrico MTT para a medida da taxa de crescimento/viabilidade de culturas de *P. brasiliensis* em placas de 96 poços

A viabilidade de *P. brasiliensis* foi determinada utilizando-se o reagente MTT (brometo 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium; Invitrogen; cat.# M6494; Lote# 423865) que avalia a atividade mitocondrial celular, dado que este sal é metabolizado em nível da cadeia respiratória, principalmente pelas enzimas

desidrogenases, produzindo um produto de coloração roxo conhecido como formazan (Mosmann, 1983; Vistica *et al.*, 1991; Hussain, Nouri e Oliver, 1993; Stentelaire *et al.*, 2001). Esta conversão só ocorre em células viáveis, em outras palavras em células com suas mitocôndrias metabolicamente ativas, e é proporcional ao número de células vivas (Mosmann, 1983; Hussain, Nouri e Oliver, 1993; Freimoser *et al.*, 1999; Stentelaire *et al.*, 2001). Para confecção da curva de calibração, foram contadas células de um inóculo denso de cada um dos isolados Pb01 e Pb3 de *P. brasiliensis* e, a partir destes, foram feitas diluições seriadas (fator de diluição de dois) nas quais 200µL de cada diluição foram adicionados em triplicada em uma placa de 96 poços. Em seguida, uma solução contendo 5mg/mL de MTT em 0,15M de PBS (tampão de fosfato: NaCl 137mM, KCl 2,7mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2mM; pH 7,4) foi adicionada aos inóculos, de forma tal que a concentração final em cada poço fosse de 0,5mg/mL. Ao final de quatro horas de incubação à 36°C no escuro, 90µL do meio YPD-MTT livre de células (depositadas no fundo de cada poço) foram cuidadosamente retirados de cada poço. Após a adição de 100µL de DMSO (dimetil sulfóxido), para solubilizar o sal de formazan formado (Carmichael *et al.*, 1987; Comley e Turner, 1990), procedeu-se a leitura da absorbância a 490nm empregando um leitor de ELISA (Elx800 do grupo SG CQC). O controle usado foi o branco, consistindo do meio de cultura puro (sem células).

#### 4.2.4 Avaliação do efeito do farnesol sobre a viabilidade de distintos isolados de *P. brasiliensis*

Visando avaliar o efeito do farnesol sobre a viabilidade dos isolados Pb01 e Pb3, 2 x 10<sup>5</sup> cel/mL do fungo foram incubadas em meio YPD com diferentes concentrações de farnesol para as seguintes concentrações finais: 2,5µM, 5µM, 7,5µM, 10µM, 12,5µM, 15µM, 17,5µM, 20µM, 22,5µM, 25µM, 27,5µM, 30µM, 35µM, 40µM, 50µM, 75µM, 100µM, 150µM, e 300µM. A viabilidade de *P. brasiliensis* foi determinada utilizando-se o reagente MTT, conforme metodologia supracitada no item 3.3.3, após oito dias de incubação à 36°C (150rpm). Os controles usados foram: controle de crescimento (cultura sem farnesol), controle do diluente (cultura com 2% metanol) e o branco (apenas o meio de cultura). A concentração mínima letal (MLC) foi definida como a concentração mínima necessária para causar 90% de morte celular, quando comparada com o controle (cultura sem farnesol).

#### 4.2.5 *Avaliação do efeito do farnesol sobre o dimorfismo de distintos isolados de P. brasiliensis*

Para avaliar o efeito de concentrações não letais do farnesol no dimorfismo dos isolados Pb01 e Pb3 de *P. brasiliensis*,  $2 \times 10^5$  cél/mL de cada isolado foram inoculadas em meio YPD contendo diferentes concentrações de farnesol, em placas de 24 poços (volume final de 1mL). As concentrações finais de farnesol analisadas para o isolado Pb01 foram 5 $\mu$ M, 7,5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 15 $\mu$ M, 20 $\mu$ M e 25 $\mu$ M, e para o isolado Pb3, 10 $\mu$ M, 15 $\mu$ M, 20 $\mu$ M, 25 $\mu$ M e 50 $\mu$ M. Em ambos os casos, o controle foi suplementado com 0,4% de metanol (a concentração máxima do diluente do farnesol nos ensaios). As placas foram incubadas à 25°C por 48h. A morfologia celular foi avaliada ao microscópio óptico após os tempos de 24 e 48h, onde foram calculados a porcentagem de células em transição e o tamanho médio dos tubos germinativos.

#### 4.3 *Avaliação dos efeitos do farnesol sobre a ação de diferentes antifúngicos e na expressão de genes relacionados à apoptose para o isolado Pb18 de P. brasiliensis*

Nesse tópico, tratamos de aprofundar o conhecimento referente ao efeito do farnesol sobre o isolado Pb18 de *P. brasiliensis*, conforme nossos trabalhos prévios (Derengowski, De-Souza-Silva, Braz, Mello-De-Sousa *et al.*, 2009). Para isso, avaliamos os possíveis efeitos do farnesol na ação de diferentes antifúngicos para *P. brasiliensis* e na expressão de genes relacionados à apoptose no isolado Pb18 do mesmo fungo.

##### 4.3.1 *Avaliação do efeito do farnesol sobre a ação de diferentes antifúngicos para P. brasiliensis*

###### 4.3.1.1 Concentração inibitória mínima (MIC) dos antifúngicos

O protocolo M-27 A (Galgiani *et al.*, 1997) de microdiluição em placa com algumas modificações (concentração final de *P. brasiliensis* de  $10^5$  cél/mL em cada poço; leitura após seis dias de crescimento) foi empregado para determinar os MICs dos antifúngicos fluconazol (Forma & Formula – Farmácia e Laboratório de Manipulação,

Ribeirão Preto – São Paulo), cetoconazol (Forma & Formula – Farmácia e Laboratório de Manipulação, Ribeirão Preto – São Paulo) e anfotericina B (Cristália) para o isolado Pb18 de *P. brasiliensis*.

As concentrações testadas foram:

- Fluconazol – 4 a 0,0078µg/mL
- Cetoconazol – 4 a 0,00015µg/mL
- Anfotericina B – 8 a 0,0156µg/mL

#### 4.3.1.2 Efeito do MIC<sub>50%</sub> de farnesol no MIC dos diferentes antifúngicos para *P. brasiliensis*

Para determinar o MIC dos antifúngicos supracitados na presença do MIC<sub>50%</sub> de farnesol em o isolado Pb18 de *P. brasiliensis* (12,5µM) (Derengowski, De-Souza-Silva, Braz, Mello-De-Sousa *et al.*, 2009), foi utilizado o mesmo protocolo anterior, com a diferença de que na suspensão de *P. brasiliensis* foi adicionado farnesol para a concentração final de 12,5µM.

#### 4.3.2 *Avaliação do efeito do farnesol nos níveis de expressão de genes relacionados ao processo de morte celular pela via de apoptose*

##### 4.3.2.1 Desenho dos oligonucleotídeos para genes da via de apoptose

Foram desenhados oligonucleotídeos específicos para alguns genes de *P. brasiliensis* definidos como ortólogos a genes de outros fungos, os quais são associados aos processos de apoptose e/ou autofagia. Entre estes estão os genes arp3 e arp9 (autophagy-related protein<sup>4</sup> 3 e 9, respectivamente), ap (autophagy protein<sup>5</sup>), mc (metacaspase), vps (vacuolar protein-sorting-associated protein<sup>6</sup>), mn (mitochondrial nuclease<sup>7</sup>), e rr (rhodocoxin reductase<sup>8</sup>).

Os oligonucleotídeos foram desenhados baseando-se nas seqüências obtidas no banco de dados do Projeto Transcriptoma (Felipe *et al.*, 2005) <[http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides\\_brasiliensis/MultiHome.html](http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html)> e no Projeto Genoma de *P. brasiliensis* <<https://www.biomol.unb.br/cgi->

<sup>4</sup> Proteínas 3 e 9 relacionadas à autofagia.

<sup>5</sup> Proteína de autofagia.

<sup>6</sup> Proteína associada à proteína classificatória vacuolar.

<sup>7</sup> Nuclease mitocondrial.

<sup>8</sup> Rodoxina reductase.

bin/Pb/home/home.pl?projeto>. Para tanto, utilizou-se o *software*, Primer 3 <<http://frodo.wi.mit.edu/>>. A seguir, os oligonucleotídeos selecionados foram analisados utilizando-se o programa Oligo Analyzer da Integrated DNA Technologies (IDT), também disponível *online* <<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>>. Finalmente, os oligonucleotídeos foram sintetizados pela companhia IDT (Integrated DNA Technologies), e suas características estão descritas na tabela 1.

**Tabela 1: Dados gerais dos oligonucleotídeos sintetizados.**

Iniciador	Seqüência de nucleotídeos (5'→3')	Tm	Tamanho do produto esperado a partir do cDNA (pares de base)
5' ARP3 f	AGCACATGGAGGGAACGTCT	62.04	101
3' ARP3 r	AGATAGTCGCCTGCGAGGAC	61.85	
5' ARP9 f	CATCCAATCCCCAAGCGTAT	61.97	80
3' ARP9 r	TTCGGGTCAACAAATGCAAG	61.97	
5' AP f	TGTCCAACCTGGCGAGAAGAA	61.92	100
3' AP r	TCTGCTAGGCGGGTATAGGC	61.59	
5' MC f	CCTCCCCAACAGAACCCATA	62.02	80
3' MC r	GAAGCCGCATATCCACCATT	62.11	
5' VPS f	AGAGTGCGATGGGTGAGGAT	62.02	87
3' VPS r	CCTGCTCAGGAGGCTCATCT	62.02	
5' MN f	GTGCTTTTGTCTGCCCCAAT	62.33	93
3' MN r	ACCCACTAGCCCTCTCCACA	62.03	
5' RR f	ACGAAGTCACCTCCGTCGAT	62.04	89
3' RR r	CGTTGCGAGGATGAGTTTTG	61.73	

O controle interno empregado nos experimentos de Real Time foi o gene L34, que codifica para uma proteína da subunidade maior do ribossomo, e cuja expressão é constitutiva e não diferencial entre as fases leveduriforme e miceliana de *P. brasiliensis*, conforme verificado no banco de dados do Projeto Transcriptoma. Os oligonucleotídeos desenhados para o gene L34 estão listados na tabela abaixo:

**Tabela 2: Dados gerais do controle interno.**

Iniciador	Seqüência de nucleotídeos (5'→3')	Tm	Tamanho do produto esperado a partir do cDNA (pares de base)
5' L34 f	CCGTACAACACACGGTCAAA	60.46	91
3' L34 r	GTGCGGTTCCCTTCTCTTG	59.85	

#### 4.3.2.2 Cultivo de *P. brasiliensis* em presença de diferentes concentrações de farnesol para obtenção de RNA total

O isolado Pb18 de *P. Brasiliensis*, um inóculo correspondendo a uma alçada de células, foi cultivado por 10 dias a 36,5°C sob agitação (150rpm) em 250mL de meio YPD. Após o período de incubação, as células foram baixadas à 4000rpm/5min/temperatura ambiente/rotor 224/centrífuga IEC e redistribuídas de forma uniforme em erlenmeyers contendo 100mL YPD com diferentes concentrações de farnesol (0µM, 25µM e 50µM) em triplicata. As culturas foram incubadas a 36,5°C (150rpm) por seis horas.

#### 4.3.2.3 Extração de RNA total de *P. brasiliensis*

As células do isolado Pb18 cultivadas em diferentes concentrações de farnesol (0µM, 25µM e 50µM) nas condições especificadas no item 4.2.2. foram coletadas por centrifugação (4000rpm/5min/temperatura ambiente/rotor 224/centrífuga IEC) e o sobrenadante foi descartado. Cerca de 0,2g de células (peso úmido) foram empregados para extração de RNA total. A extração do RNA total foi realizada pela adição de 1mL do reagente Trizol (Invitrogen; cat.# 15596; Lote# 50867501) à massa de células, de acordo com as recomendações do fabricante. A mistura trizol-células foi transferida a microtubos do tipo eppendorf contendo micro-pérolas de vidro (Sigma). A lise das células foi realizada por contínua agitação em “vortex” à temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente, cada amostra foi centrifugada por 10000rpm/1 min à temperatura ambiente para baixar as pérolas de vidro e os restos celulares, com o sobrenadante sendo transferido a um novo tubo eppendorf (este procedimento foi repetido mais uma vez). Ao lisado celular adiciona-se 200µL de clorofórmio, seguido de agitação vigorosa. Após centrifugação (12000rpm/15 min), a fase aquosa foi transferida a um novo tubo eppendorf, onde foram adicionados 500µL de isopropanol e deixado incubar à temperatura ambiente por 10 min. Após a incubação, a amostra foi centrifugada à 12000rpm/10 min e o sobrenadante desta descartado. O pellet foi lavado duas vezes com 1mL de etanol 75% (12000rpm/5 min), e após descarte do sobrenadante foi deixado secar à temperatura ambiente. Em seguida, o sedimento foi ressuspensionado em 50µL de água Milli Q RNase free.

#### 4.3.2.4 Tratamento do RNA total com DNase I livre de RNases

Após quantificação por espectrofotometria (Genequant – Amersham Pharmacia Biotech) e a verificação da integridade do RNA total extraído por eletroforese em gel de agarose 0,8% em condições livre de RNase (Sambrook e Russel, 2001), cerca de 7 $\mu$ g do RNA total obtido foi submetido ao tratamento com DNase I livre de RNase (Promega; cat. #M6101; Lote # 251465), a fim de se eliminar qualquer traço residual de contaminação por DNA genômico. As condições de tratamento com DNase I, para um volume final de 70 $\mu$ L de reação, foram: tampão da DNase I 1X; 7U da enzima DNase I livre de RNase. O tratamento foi realizado à 37°C por 30 minutos, parando-se a reação pela adição de 7 $\mu$ L do tampão de inativação da enzima e aquecendo-a a 65°C por 10 minutos. Após precipitação padrão com etanol e acetato de sódio (Sambrook e Russel, 2001), o RNA total tratado com DNase I, livre de RNase, foi novamente quantificado e analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% em condições livres de RNase (Sambrook e Russel, 2001). Uma última verificação, para determinação de uma possível contaminação residual com DNA genômico foi feita pela metodologia de PCR (do inglês *Polimerase Chain Reaction*), conforme descrito a seguir. Foi submetido 1 $\mu$ L do RNA total obtido após o final do tratamento com DNase I (o que equivale a aproximadamente a 0,25-0,61  $\mu$ g RNA total) à reação de amplificação em um volume final de 25 $\mu$ L contendo: tampão *Taq* DNA polimerase 1X; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM dNTPs; 0,4  $\mu$ M do iniciador RAS-1 Forward; 0,4  $\mu$ M do iniciador RAS-1 Reverso; 2U da enzima *Taq* DNA polimerase (Cenbiot-RS/Brasil). O par de oligonucleotídeos utilizados amplifica o gene que codifica a proteína G monomérica Ras1. Seu emprego teve como único objetivo avaliar uma possível contaminação por DNA genômico, uma vez que as condições de amplificação utilizando-se tais iniciadores já estavam bem estabelecidas em nosso grupo. Como controle positivo da reação foi empregado 5 $\mu$ g de DNA genômico de *P. brasiliensis*. Os parâmetros de ampliação foram os mesmos adotados por Derengowski *et al.* (2009) em sua dissertação de mestrado:

- (1) Desnaturação inicial: 94°C/ 2 min
- (2) Desnaturação: 94°C/ 1 min
- (3) Anelamento: 60°C/ 1 min
- (4) Extensão: 72°C/ 1 min
- (5) Repetição das etapas de 2 a 4 (30x)
- (6) Extensão final: 72°C/ 10 min

Os produtos de amplificação foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

#### 4.3.2.5 Síntese de cDNA

Após tratamento com DNase I, a primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir de 2µg de RNA total de cada amostra. A essa quantidade de RNA total foi adicionado 0,5µg do iniciador OligodT<sub>18</sub> e a mistura foi incubada a 70°C por 10 min, seguido de resfriamento imediato por incubação no gelo por cerca de um minuto. À amostra foi adicionado o MIX, para um volume final de 25µL, contendo os seguintes reagentes em suas concentrações finais: tampão da transcriptase reversa 1X; DTT 8mM; 0,4mM dNTPs; 20U RNase Out (Invitrogen). Em seguida, a reação de polimerização foi realizada por incubação a 42°C por 2 min, sendo adicionado ao sistema 200U da enzima transcriptase reversa (SuperScript III, Invitrogen) e incubando-se a 42°C por mais uma hora. A seguir, a enzima foi inativada por aquecimento a 70°C por 20 min.

#### 4.3.2.6 PCR quantitativo em tempo real

Uma alíquota correspondente a 1/5<sup>9</sup> (5µL) da reação de síntese de cDNA foi submetida à reação de amplificação em tempo real, cujo volume final era de 10µL, contendo: 5µL de SyBr Green Máster Mix (Applied Biosystems); 0,2µM de cada oligonucleotídeo (forward e reverso) especificado no item 3.3.2.1 (Tabela 1). Conforme mencionado anteriormente, foram utilizados como controle interno os oligonucleotídeos que amplificam o gene que codifica a proteína ribossomal L34 (Tabela 2). As condições de ciclagem foram as programadas para o reativo SyBr Green:

##### Ciclagem:

- (1) 50°C/ 2 min
- (2) 95°C/ 5 min
- (3) 95°C/ 3 seg
- (4) 60°C/ 30 seg
- (5) Repetir (3) e (4) quarenta vezes.

##### Curva de Dissociação:

- (1) 95°C/ 15 min
- (2) 60°C/ 1 h
- (3) 95°C/ 15 min

Todas as amplificações foram feitas no equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

---

<sup>9</sup> Diluição padrão empregada em nossas condições de PCR em tempo real.

#### 4.3.2.7 Análise da expressão dos genes relacionados à apoptose

Os níveis de expressão dos genes associados à apoptose e autofagia foram analisados pelo método comparativo  $C_T$  cuja quantidade do alvo é normalizada a uma referência endógena e relativa a um calibrador dada pela fórmula aritmética  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ .

#### 4.4 *Análise estatística dos resultados*

As análises estatísticas ANOVA paramétricas e H de Kruskal-Wallis foram feitas com o auxílio do programa de computador “SPSS Statistics 17.0.1”.

##### 4.4.1 *Avaliação do efeito do diluente de farnesol sobre diferentes isolados de P. brasiliensis*

Para estes dados, foram realizados o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, para verificar se as pressuposições da ANOVA (Análise de Variância) foram respeitadas. Satisfeita esta condição, a ANOVA *one-way* com o *post hoc test* de Dunnet bicaudal foram efetuados, porque os tratamentos foram comparados somente com o controle. Valores de p inferiores a 0,05 representavam diferença estatística entre os grupos.

##### 4.4.2 *Avaliação do efeito do farnesol sobre o crescimento de distintos isolados de P. brasiliensis*

Para estes dados, os valores de p do teste de normalidade foram inferiores a 0,05, assim, optou-se por um teste estatístico não-paramétrico. Portanto, o teste escolhido foi o H de Kruskal-Wallis, com o *post hoc test* de Bonferroni (para comparação entre os pares). Valores de  $p < 0,05$  representavam diferença estatística entre os tratamentos com diferentes concentrações de farnesol para cada isolado do fungo.

##### 4.4.3 *Padronização do método colorimétrico MTT para a medida da taxa de crescimento/viabilidade de culturas de P.brasiliensis em placas de 96 poços*

Para a curva de calibração, submetem-se os dados a uma regressão linear.

##### 4.4.4 *Avaliação do efeito do farnesol sobre a viabilidade de distintos isolados de P. brasiliensis*

Os dados foram analisados pelo teste H de Kruskal-Wallis, com o *post hoc test* de Bonferroni. Valores de  $p < 0,05$  representavam diferença estatística entre os tratamentos.

#### 4.4.5 *Avaliação do efeito do farnesol sobre a ação de diferentes antifúngicos para P. brasiliensis*

Devido ao delineamento experimental, o interesse nesta avaliação foi a interação entre duas variáveis (presença/ausência de farnesol no sistema e diferentes concentrações dos antifúngicos) sobre a variável resposta (crescimento celular). Portanto, o teste escolhido foi a ANOVA *two-way* (opção *General Linear Model*), e a avaliação posterior foi medida pela construção dos intervalos de confiança a 95%.

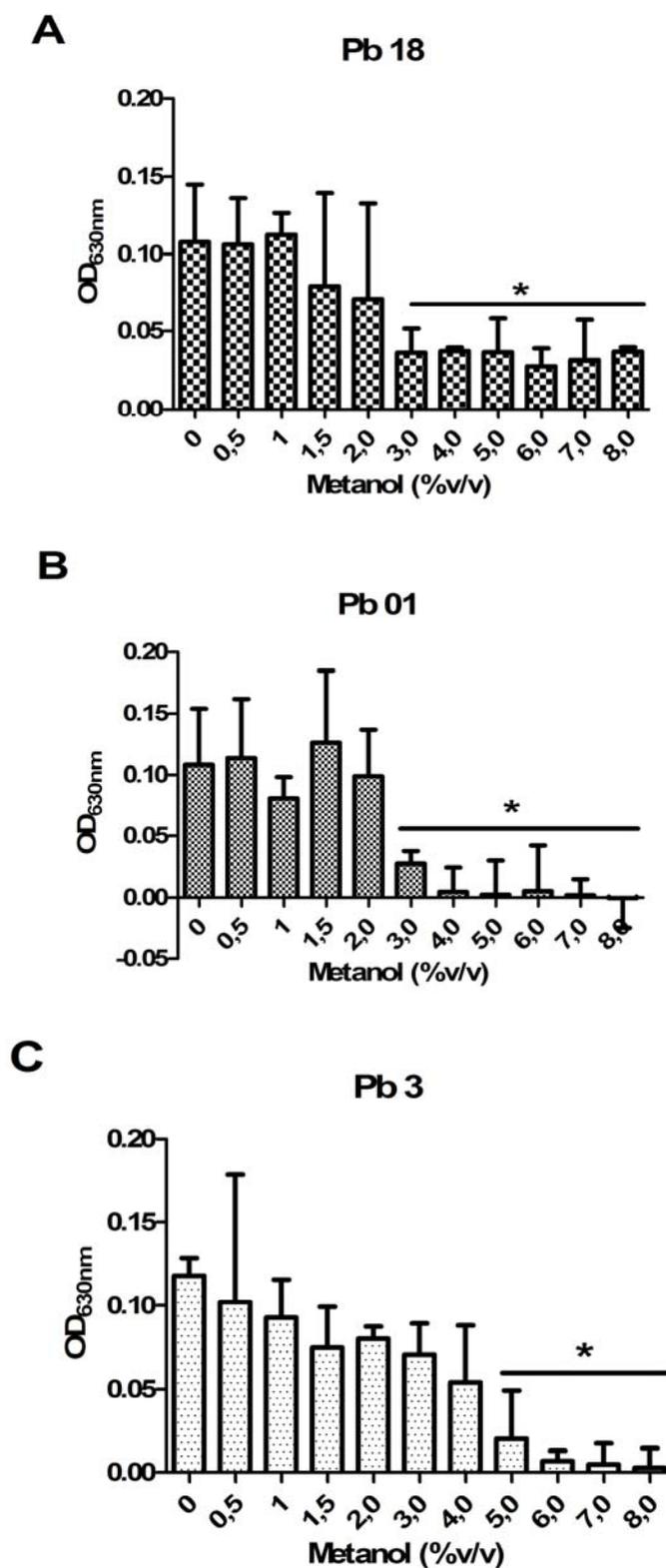
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Efeito do farnesol sobre diferentes isolados de *P. brasiliensis*

#### 5.1.1 Efeito do diluente do farnesol sobre diferentes isolados de *P. brasiliensis*

O diluente do farnesol usado em todos os experimentos foi metanol, uma vez que o reagente em estudo possui característica lipídica, sendo, portanto, hidrofóbico. No entanto, há relatos na literatura de uma potencial atividade antimicrobiana, e até mesmo fungicida, para o metanol (Rajaganapathi, Rajagopal e Edward, 2001; Gulluce *et al.*, 2003; Leeja e Thoppil, 2007; Ozer *et al.*, 2007; Vukovic *et al.*, 2007). Nesse sentido, buscou-se avaliar o efeito de diferentes concentrações de metanol (0,5 a 8,0%) visando determinar a máxima concentração deste composto que não afeta a taxa de crescimento e a viabilidade dos três isolados de *P. brasiliensis* em estudo (Pb01, Pb3 e Pb18).

Como mostrado na figura 5, até a concentração final de 2% de metanol, para os três isolados de *P. brasiliensis* analisados, não foi observada diferença estatística significativa no crescimento em comparação com o controle sem metanol. Vale ressaltar que vários experimentos independentes realizados em triplicatas foram conduzidos para confirmar os resultados apresentados nessa seção (5.1.1) como nas seções 5.1.2, 5.1.3 e 5.2.1 desse trabalho, assim como as seções 8.1.4.1 e 8.1.4.2 dos anexos. Baseado nisso, o volume das diluições do farnesol a ser acrescentado nos próximos experimentos foi de 4µL. Conseqüentemente, a concentração do metanol nos sistemas controle (sem farnesol, apenas contendo o diluente), e, portanto, a concentração máxima de metanol em nossos experimentos, quando empregando as placas de 24 e 96 poços, foi de 0,4% e 2%, respectivamente. Dessa forma, fica estabelecido que os efeitos observados a seguir, tanto no crescimento quanto na viabilidade e no dimorfismo de *P. brasiliensis*, é devido ao farnesol e não ao seu diluente.

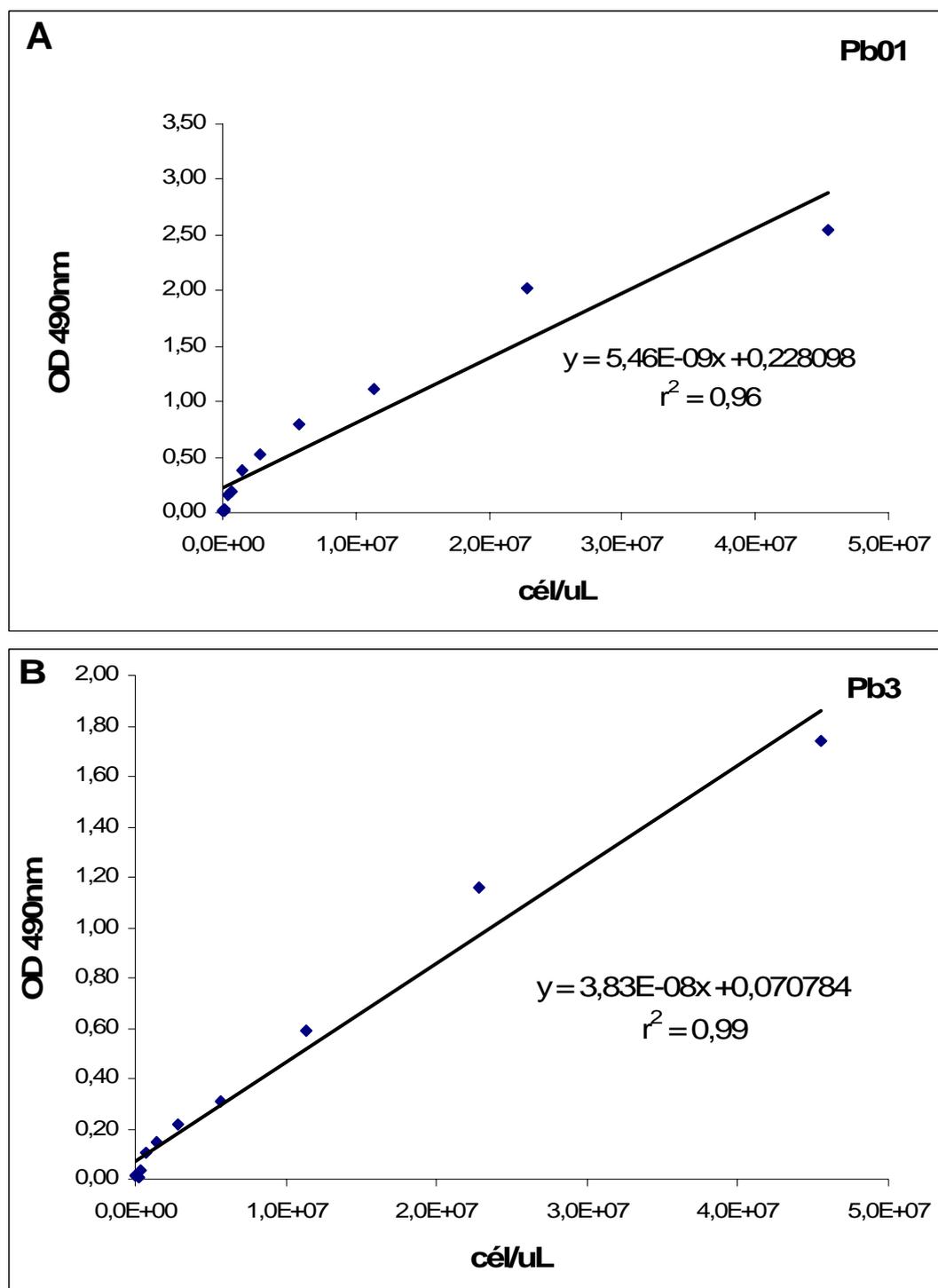


**Figura 5. Análise do crescimento dos isolados Pb18, Pb01 e Pb3 de *P. brasiliensis* após o tratamento com diferentes concentrações de metanol.** A viabilidade das leveduras dos isolados Pb18 (A), Pb01 (B) e Pb3 (C) de *P. brasiliensis* foi medida por densitometria após oito dias de tratamento com diferentes concentrações de farnesol. Os dados mostrados são derivados de um experimento realizado em triplicata (média  $\pm$  SEM). O \* representa diferença estatística em relação ao controle de  $P < 0,05$ .

### 5.1.2 *Padronização do método colorimétrico MTT para a medida da taxa de crescimento/viabilidade de cultivos de P. brasiliensis em placas de 96 poços*

O ensaio colorimétrico utilizando-se o reagente MTT tem sido usado em inúmeros estudos de tratamento de anti-cancerígenos para medir viabilidade, proliferação e citotoxicidade celular (Mosmann, 1983; Green, Reade e Ware, 1984; Jiao *et al.*, 1992; Hussain, Nouri e Oliver, 1993). Dada sua praticidade, esse método tem sido recentemente empregado em outras áreas, tais como *screening* para fatores nutricionais (Zhang *et al.*, 2004), determinação de densidade fúngica (Freimoser *et al.*, 1999; Meletiadis *et al.*, 2000; Stentelairea *et al.*, 2001), *screening* para o tratamento de uma variedade de microrganismos (Comley e Turner, 1990; Gomez-Flores *et al.*, 1995; Higa *et al.*, 1998; Dutta *et al.*, 2005), entre outros. No entanto, a forma normalmente usada nesses ensaios para células não aderentes é muito trabalhosa e consome muito tempo. Portanto, foi validado um método em placa de 96 poços para os isolados Pb01 e Pb3 de *P. brasiliensis* visando o emprego desse método em ensaios de viabilidade celular para esse patógeno.

Como se pode observar na figura 6, há uma correlação linear entre o número de células fúngicas contadas em câmara de Neubauer e o valor de absorbância (OD 490nm) obtida pelo método colorimétrico MTT. Portanto, esses resultados validam a utilização do protocolo aqui descrito em experimentos que tem por objetivo verificar a viabilidade celular do fungo *P. brasiliensis*. Nesse sentido, o reagente MTT foi empregado em ensaios posteriores para avaliar o efeito do farnesol sobre o crescimento e a viabilidade dos isolados Pb01 e Pb3.



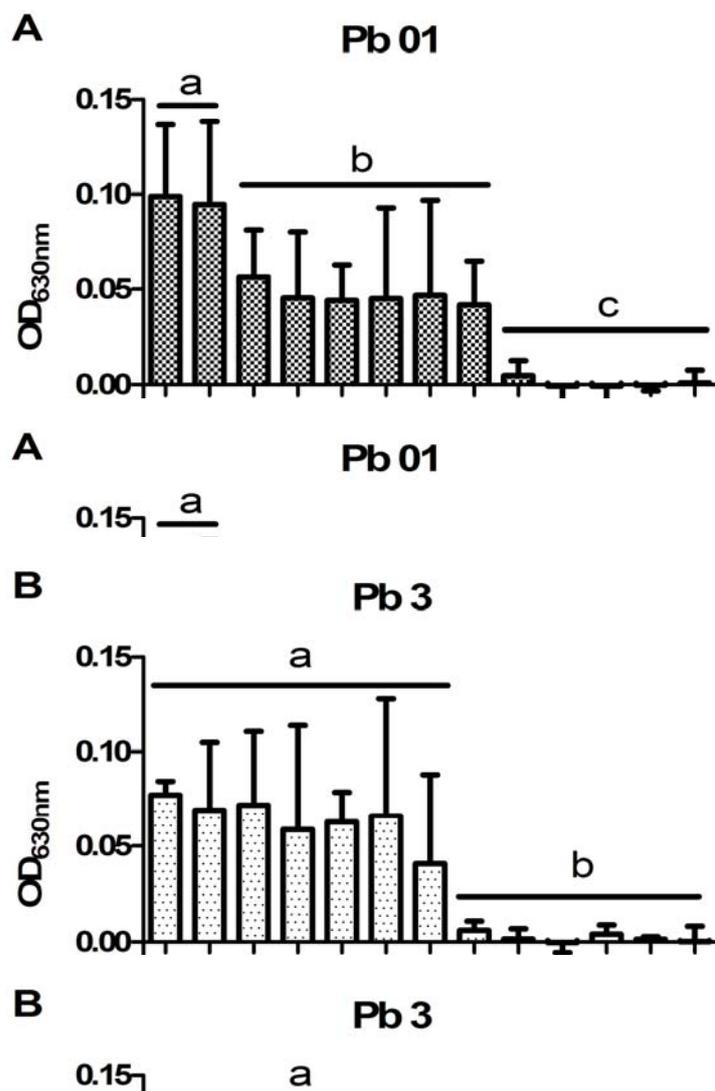
**Figura 6.** Comparação entre os resultados do ensaio MTT e da contagem de leveduras na câmara de Neubauer para os isolados Pb01 (A) e Pb3 (B) de *P. brasiliensis*. Após a determinação do número de células de um inóculo de cada isolado por contagem em câmara de Neubauer, foram realizadas diluições seriadas, as quais foram incubadas com o reagente MTT para determinação dos valores de absorbância (OD 490nm).

### 5.1.3 Efeito do farnesol sobre o crescimento e viabilidade de distintos isolados de *P. brasiliensis*

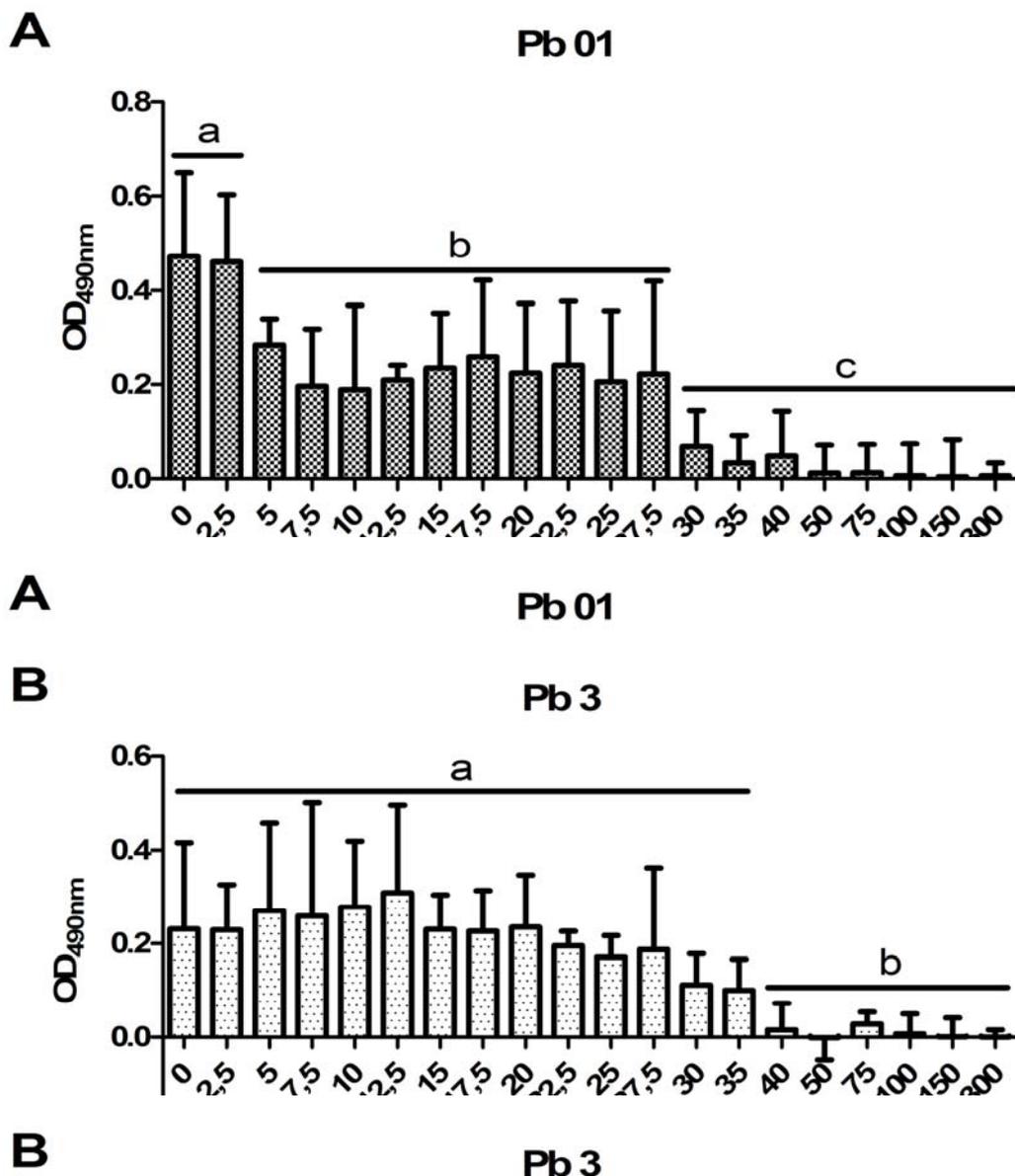
Derengowski *et al.* (2009), como mencionado previamente, mostraram uma inibição de 90% do crescimento e 90% de letalidade do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* quando tratado *in vitro* com 25 $\mu$ M e 30 $\mu$ M de farnesol respectivamente. Contudo, este isolado representa apenas uma das quatro espécies propostas, três por Matute *et al.* (2006) e uma por Teixeira *et al.* (2009 em revisão), e, conseqüentemente, os resultados observados nesses experimentos poderiam não aplicar-se ao *P. brasiliensis* como um todo devido à grande variabilidade existente nas distintas espécies.

Devido ao isolado Pb18 de *P. brasiliensis* pertencer à espécie críptica S1 (Matute, Mcewen *et al.*, 2006), decidimos analisar representantes das outras espécies presentes no Brasil para legitimar o farnesol como possível antifúngico para *P. brasiliensis*. Nesse sentido, escolhemos o isolado Pb3 como representante da espécie críptica PS2, e o isolado Pb01 como representante do grupo “Pb01-like”.

Ao analisar o efeito deste sesquiterpeno sobre o crescimento dos isolados Pb01 e Pb3 foi observado um efeito de inibição similar, já que ambos tiveram seu crescimento reduzido drasticamente quando adicionado 20 $\mu$ M de farnesol (figura 7). Contudo, o isolado Pb01 mostrou-se mais sensível dado que a partir da concentração 5 $\mu$ M já havia apresentado uma redução significativa no crescimento celular (figura 7A). Isto está de acordo com a proposição de Teixeira *et al.* (2009, em revisão), que relata que é tão grande a diferença entre o grupo “Pb01-like” e as demais espécies crípticas descritas por Matute *et al.* (2006) que esta deveria ser descrita formalmente como uma nova espécie. Por outro lado, esta diferença no comportamento do isolado Pb01 pode ser devido ao fato deste não apresentar um crescimento com tantos grumos, como os isolados Pb18 e Pb3, estando desta forma efetivamente mais exposto ao farnesol. Ademais, a concentração mínima inibitória para o farnesol, na qual se observa uma diminuição de 90% no crescimento celular, tanto para o isolado Pb01 quanto para o isolado Pb3, é de 20 $\mu$ M. Conseqüentemente, para podermos estabelecer qualquer correlação dos efeitos do farnesol com os resultados observados pela filogenia molecular, estudos do efeito do farnesol, bem como de outras características deverão ser realizados empregando-se mais isolados representantes de cada grupo filogenético proposto.



**Figura 7. Análise do crescimento dos isolados Pb01 e Pb3 de *P. brasiliensis* após tratamento com diferentes concentrações de farnesol.** O crescimento das leveduras dos isolados Pb01 (A) e Pb3 (B) de *P. brasiliensis* foi medido por densitometria após oito dias de tratamento com diferentes concentrações de farnesol. Os dados mostrados são derivados de um experimento realizado em triplicata (média  $\pm$  SEM). Os grupos a, b e c apresentam diferença estatística entre si.



**Figura 8.** Análise da viabilidade dos isolados Pb01 e Pb3 de *P. brasiliensis* após tratamento com diferentes concentrações de farnesol. A viabilidade das leveduras dos isolados Pb01 (A) e Pb3 (B) de *P. brasiliensis* foi medida por meio do ensaio colorimétrico MTT. Após oito dias de tratamento com diferentes concentrações de farnesol, a placa foi incubada a 36°C com MTT, e sua absorbância (OD) medida após 4h. Os dados mostrados são derivados de um experimento realizado em triplicata (média  $\pm$  SEM). Os grupos a, b e c apresentam diferenças estatísticas entre si.

Visando avaliar se o farnesol possui efeito fungicida ou unicamente fungistático no fungo *P. brasiliensis*, procedeu-se o ensaio de viabilidade celular utilizando-se o reagente MTT, conforme protocolo previamente estabelecido na seção 4.1.2, em resposta a diferentes concentrações de farnesol. Conforme verificado na figura 8, os isolados Pb01 e Pb3 apresentaram uma diminuição na taxa metabólica à medida que a concentração de farnesol foi aumentada, revelando um efeito dose-dependente.

Entretanto, assim como para as curvas de crescimento, as curvas resultantes do efeito do farnesol sobre a viabilidade destes isolados apresentam diferenças. No caso do isolado Pb01, a curva apresenta a forma típica de uma resposta antagônica bifásica (Hayter, 2002). Neste sentido, nas concentrações entre 5 a 27,5µM o farnesol causa inicialmente uma inibição de cerca de 20% na taxa metabólica. Já em concentrações a partir de 30µM verifica-se um efeito mais drástico desse composto (figura 8A). Por outro lado, para o isolado Pb3, o farnesol parece estimular o crescimento / metabolismo - mesmo que não de forma significativa – em concentrações menores (até 12,5µM), mas depois demonstra um efeito inibitório à medida que a concentração aumenta, sendo finalmente letal a partir de 40µM de farnesol (figura 8B). Em ambos os casos, essas curvas atípicas influenciam na hora de calcular a concentração mínima letal de 90% para o farnesol. Assim sendo, o MLC<sub>90</sub> para o isolado Pb01 é de 30µM e para o isolado Pb3 é de 40µM de farnesol.

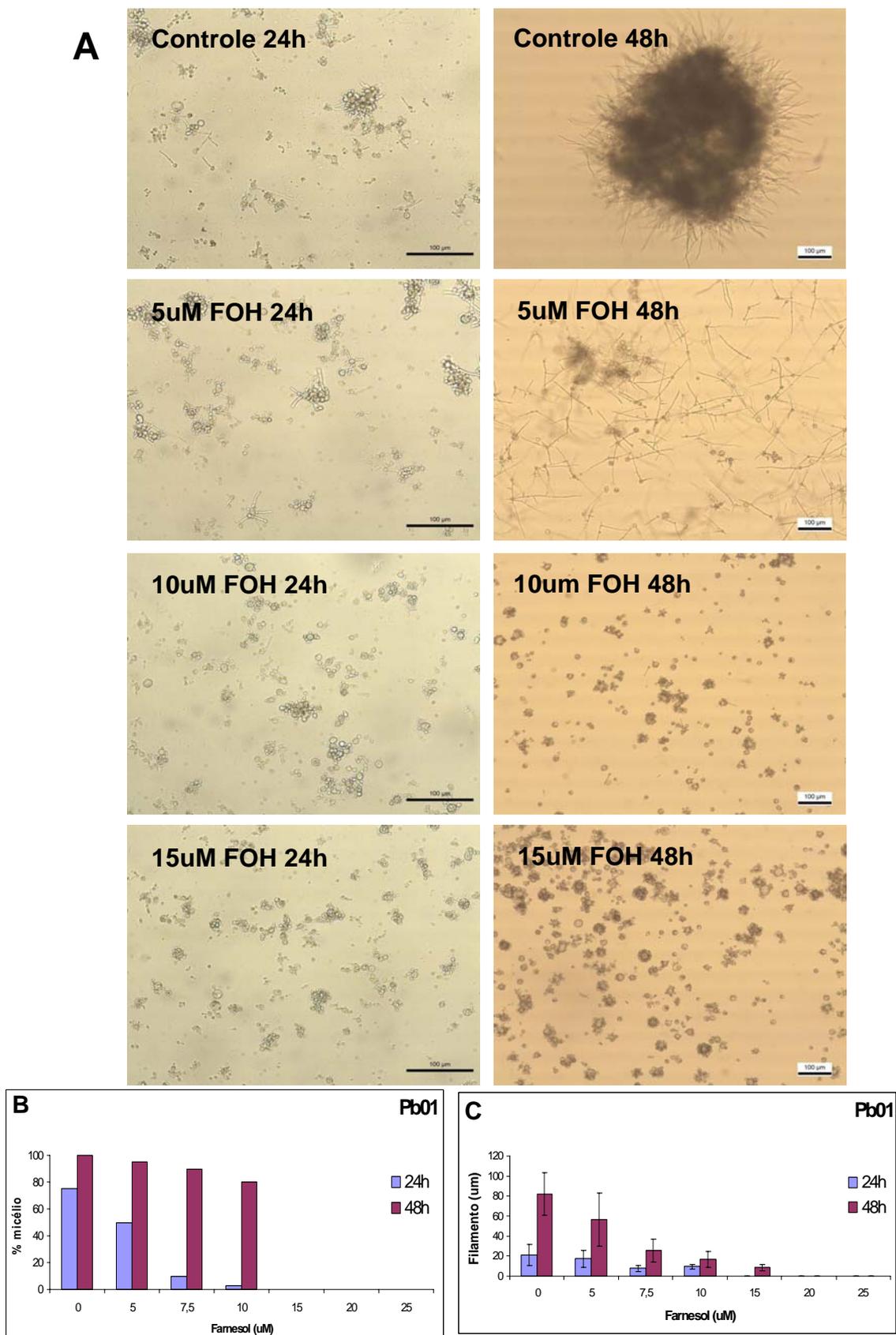
É interessante observar que o isolado Pb01 do grupo “Pb01-like” demonstrou ser mais sensível ao farnesol que isolados Pb18 e Pb3 das espécies crípticas S1 e PS2, respectivamente. Ambas as curvas de crescimento e de viabilidade (figuras 7A e 8A) foram típicas de uma resposta antagônica bifásica (Hayter, 2002), dado que apresentam uma forte inibição inicial começando na concentração de 5µM seguida de um efeito mais drástico a partir da concentração de 20µM para a curva de crescimento e 30µM para a curva de viabilidade. Enquanto, tanto para o isolado Pb3 (figuras 7B e 8B) quanto para o isolado Pb18 (Derengowski, De-Souza-Silva, Braz, Mello-De-Sousa *et al.*, 2009), o farnesol, em concentrações menores ao seu MIC ou MLC, afeta pouco o crescimento/metabolismo das células, mas no seu MIC ou MLC o efeito inibitório é drástico. Com relação ao seu MIC, os isolados Pb01 e Pb3 demonstraram ser ligeiramente mais sensíveis ao farnesol que o isolado Pb18 de *P. brasiliensis*, já que o MIC para os dois primeiros é de 20µM em comparação com 25µM para o Pb18. No entanto, com relação ao efeito fungicida deste sesquiterpeno, tanto o isolado Pb18 quanto o isolado Pb01 mostraram-se mais sensíveis, sendo o MLC de 30µM para ambos comparados aos 40µM necessários para promover 90% de letalidade no isolado Pb3.

Conforme mencionado na introdução, o papel do farnesol como antimicrobiano vem sendo estudado em diferentes organismos (Machida *et al.*, 1999; Jabra-Rizk, Meiller *et al.*, 2006; Jabra-Rizk, Shirtliff *et al.*, 2006; Semighini *et al.*, 2006; Semighini,

Murray e Harris, 2008), sendo que *P. brasiliensis* mostra-se o mais sensível dentre os microrganismos analisados até momento, com um MLC de 30 a 40 $\mu$ M. Como base de comparação, em algumas bactérias estudadas a MLC para o farnesol é de 200 $\mu$ M para *S. aureus* e *S. tendae*, e de 300 $\mu$ M para *S. mutans* (Dionigi, Millie e Johnsen, 1991; Koo *et al.*, 2002; Jabra-Rizk, Meiller *et al.*, 2006). Da mesma forma, o nível de tolerância também é elevado em outros fungos estudados, como em *Candida dubliniensis* cuja MLC é de 500 $\mu$ M de farnesol. Esses trabalhos e nossos resultados, adicionados aos resultados obtidos por Derengowski *et al.* (2009), revelam um potente efeito microbicida do farnesol no fungo dimórfico *P. brasiliensis*.

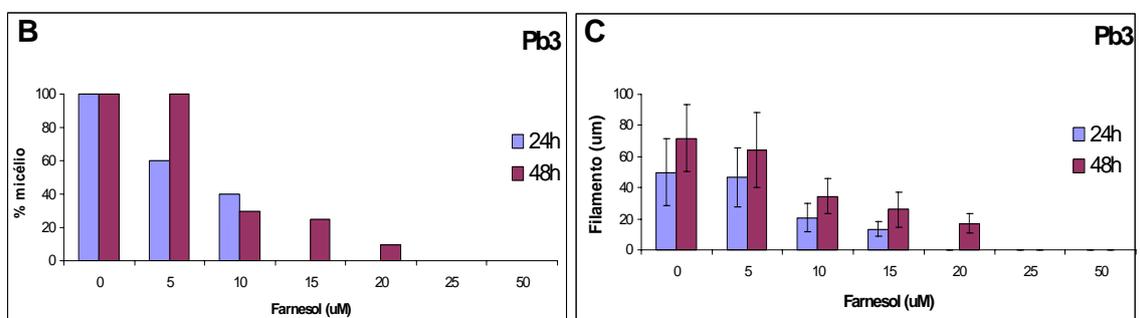
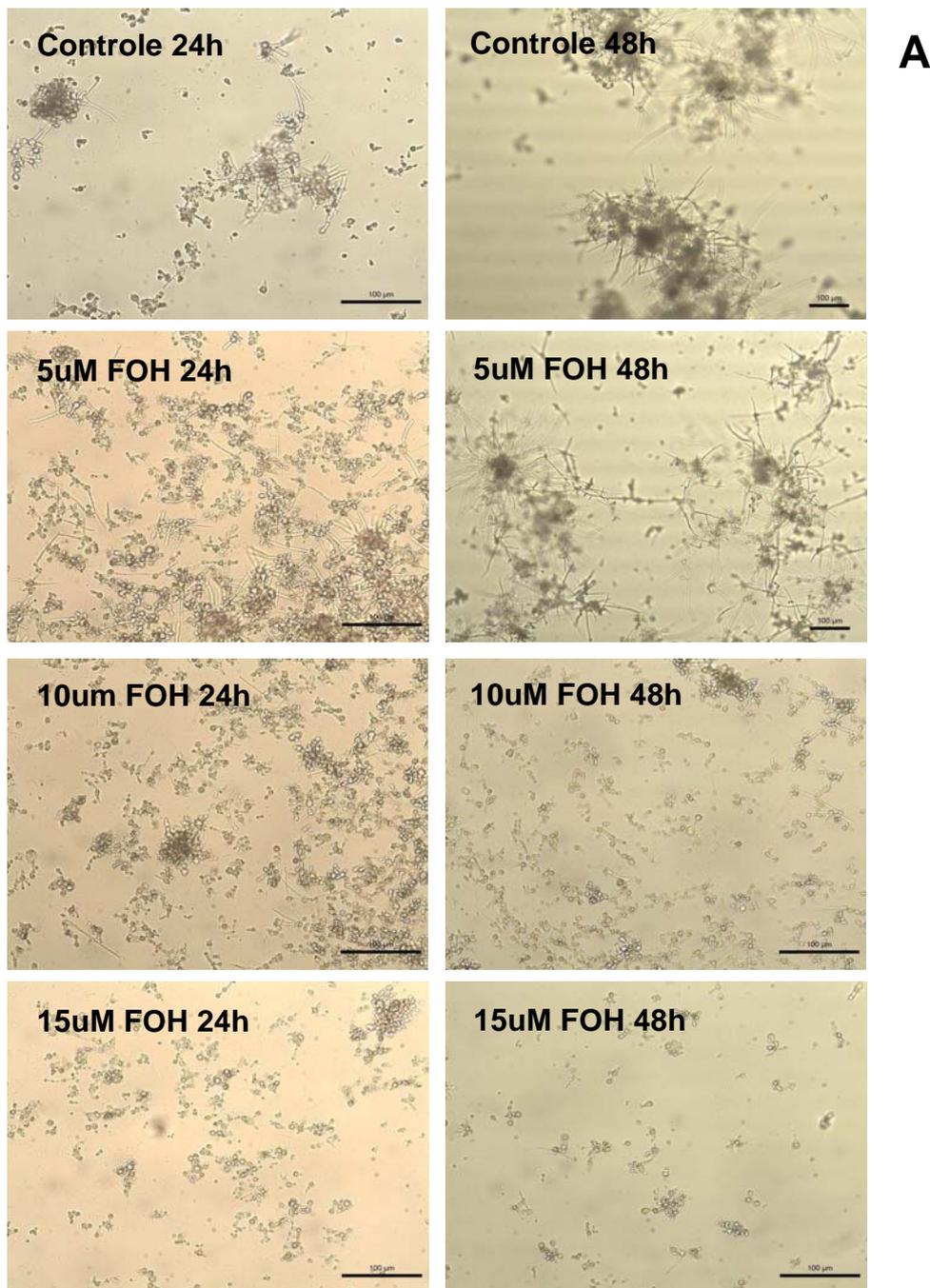
#### 5.1.4 Efeito do farnesol sobre o dimorfismo dos isolados Pb01 e Pb3 isolados de *P. brasiliensis*

O farnesol, como já mencionado, é uma molécula de QS de *C. albicans* e tem por efeito inibir a transição de levedura à micélio nesse fungo (Hornby *et al.*, 2001; Ramage *et al.*, 2002; Mosel *et al.*, 2005). Adicionalmente, essa QSM possui efeito antagônico no crescimento e/ou desenvolvimento de outros microorganismos (Machida *et al.*, 1999; Jabra-Rizk, Meiller *et al.*, 2006; Jabra-Rizk, Shirtliff *et al.*, 2006; Semighini *et al.*, 2006; Cugini *et al.*, 2007; Semighini, Murray e Harris, 2008). Em estudos com os isolados Pb18 (Derengowski, De-Souza-Silva, Braz, Mello-De-Sousa *et al.*, 2009), Pb01 (Figura 7A e 8A) e Pb3 (Figura 7B e 8B) de *P. brasiliensis*, também verificamos um provável efeito antagônico mediado pelo farnesol, já que esse composto apresenta atividade antimicrobiana contra esse patógeno. Ademais, Derengowski *et al.* (2009) revelou em seu estudo que o farnesol, em concentrações não inibitórias, retarda a transição dimórfica do isolado Pb18 da espécie críptica S1 de *P. brasiliensis*. Com a finalidade de determinar o efeito deste sesquiterpeno sobre o processo de transição dimórfica dos isolados Pb01 do grupo “Pb01-like” e Pb3 da espécie críptica PS2, o fungo na forma de levedura foi incubado à temperatura ambiente na presença de farnesol em concentrações finais que não afetam a viabilidade celular, conforme verificado previamente.



**Figura 9. Efeito do farnesol no dimorfismo do isolado Pb01 de *P. brasiliensis*.** Leveduras do isolado Pb01 foram incubadas por 24h e 48h à 25°C em diferentes concentrações de farnesol. A) Verificação da morfologia por microscopia óptica após 24 e 48h de incubação. B) Porcentagem de células com tubos germinativos. C) Tamanho médio dos filamentos.

Ao se observar a morfologia celular após 24h e 48h de incubação de leveduras do isolado Pb01 a 25°C, percebeu-se um atraso na transição de levedura à micélio quando o fungo foi cultivado na presença de 5 a 15µM de farnesol (Figura 9A). Conforme mostrado na figura 9B, na ausência de farnesol, mais de 70% das células iniciaram o processo de transição em 24h, e 100% dessas eram micélio em 48h. Em contrapartida, na presença de concentrações não letais de farnesol, foi observada uma diminuição na porcentagem de células com tubos germinativos de um modo dependente da concentração de farnesol (Figura 9B). No entanto, em 48h esta diferença em número de leveduras com o processo de transição iniciado se via compensada, em consideração com o controle (sem farnesol), nas concentrações entre 5µM e 10µM de farnesol (Figura 9B). Cabe ressaltar que nas concentrações de 15µM e de 20µM o isolado Pb01 se encontra metabolicamente ativo, embora haja uma redução de cerca de 20% na sua taxa metabólica (Figura 8A). Portanto, a falta da transição nestas concentrações provavelmente é devida a um efeito do farnesol na morfogênese, e não unicamente na viabilidade do fungo, uma vez que cultivando-se o *P. brasiliensis* em 15 e 20µM de farnesol ainda verifica-se unidades formadoras de colônias nesses concentrações (dados não mostrados). Outro efeito interessante do farnesol, em concentrações que não afeta o crescimento, é sobre o tamanho do tubo germinativo. Como se pode observar nas figuras 9A e 9C, embora a porcentagem de leveduras com tubos germinativos seja alta em 48h nas concentrações de 5 a 10 µM de farnesol, o tamanho médio dos tubos germinativos mostrou-se significativamente menor quando comparado ao tamanho dos filamentos presentes no controle (sem farnesol). Em 24h, o tamanho dos filamentos em formação, nessas concentrações, não difere significativamente do controle, no entanto em 48h de incubação se pode observar que o tamanho desses é indiretamente proporcional à concentração de farnesol (Figura 9C). Esta diferença somente torna-se equivalente ao observado com o controle (sem farnesol) na concentração de 5µM após 72h de incubação (dados não mostrados).



**Figura 10. Efeito do farnesol no dimorfismo do isolado Pb3 de *P. brasiliensis*.** Leveduras do isolado Pb3 foram incubadas por 24h e 48h à 25°C em diferentes concentrações de farnesol. A) Verificação da morfologia por microscopia óptica após 24 e 48h de incubação. B) Porcentagem de células com tubos germinativos. C) Tamanho médio dos filamentos.

No caso do isolado Pb3, do mesmo modo, observa-se um retardo na transição de levedura à micélio na presença de concentrações subinibitórias de farnesol. Em 24h de incubação verificou-se que no controle (sem farnesol) todas as células apresentavam tubos germinativos, e esta porcentagem diminuía de forma diretamente proporcional ao aumento na concentração de farnesol, sendo que todas as células apresentavam-se na forma de levedura em concentrações igual ou superiores a 20 $\mu$ M (Figura 10B). Em 48h, observou-se um aumento na porcentagem de células com tubos germinativos nas concentrações de 5 $\mu$ M a 20 $\mu$ M de farnesol, sendo a diferença entre o controle e a concentração de 5 $\mu$ M completamente compensada nesse período (Figura 10B). Novamente, é importante destacar que o isolado Pb3 se encontra metabolicamente ativo em concentrações até 25 $\mu$ M de farnesol apesar de permanecer na fase leveduriforme (Figura 8B). Outro dado importante é que o mesmo efeito observado para o isolado Pb01 (Figura 9C) e Pb18 (Derengowski, De-Souza-Silva, Braz, Mello-De-Sousa *et al.*, 2009) sob o tamanho dos tubos germinativos pode ser observado para o isolado Pb3. No entanto, é importante notar que o controle e a concentração de 5 $\mu$ M de farnesol, em relação ao tamanho dos filamentos, não apresentam diferença significativa em nenhum dos tempos observados (Figura 10C). Dentro da mesma concentração de farnesol ( $\mu$ M) há um aumento gradativo na porcentagem de células filamentosas ( $\mu$ m) entre os tempos de 24 e 48h; porém há uma diminuição do tamanho médio dos filamentos com aumento da concentração de farnesol aplicado, independente do tempo observado (Figura 10A e 10C).

Esses resultados para os isolados Pb01 e Pb3 assemelham-se aos resultados obtidos por Derengowski *et al.* (2009) sugerindo fortemente que o farnesol exerce um efeito de retardo no processo de transição dimórfica de *P. brasiliensis*. É interessante notar que o efeito de retardo do início da transição é maior nos isolados Pb18 e Pb3 pertencentes às espécies crípticas, S1 e PS2 respectivamente (Matute, Mcewen *et al.*, 2006), enquanto que seu efeito sobre o alongamento do tubo germinativo é similar nos três isolados. Em outras palavras, o número das leveduras tratadas com farnesol nesses isolados demorou mais tempo para se equivaler ao controle (sem farnesol) em comparação ao isolado Pb01, sem levar em consideração o tamanho do filamento. Como já observado em todas as análises sobre o efeito do farnesol nestes três isolados, ocorre um padrão de similaridade entre os isolados Pb3 e Pb18, sendo que este padrão

não foi visto no isolado Pb01. No entanto, como anteriormente discutido no presente trabalho, até o atual momento não se pode estabelecer uma correlação entre estes dados e os resultados da filogenia molecular. Cabe destacar que o mesmo efeito foi observado no processo inverso (micélio para levedura) no isolado Pb18 (Derengowski, De-Souza-Silva, Braz, Mello-De-Sousa *et al.*, 2009).

## **5.2 Avaliação dos efeitos do farnesol sobre a ação de diferentes antifúngicos e na expressão de genes relacionadas à apoptose para o isolado Pb18 de *P. brasiliensis***

Nesse tópico abordaremos o possível efeito do farnesol sobre a ação de diferentes antifúngicos usados no tratamento da PCM (seção 4.2.1), uma vez que na literatura foi demonstrado que o farnesol aumenta a sensibilidade de alguns microorganismos a antibióticos (Jabra-Rizk, Meiller *et al.*, 2006; Jabra-Rizk, Shirliff *et al.*, 2006), sendo assim considerado como um potencial adjuvante no tratamento dessas infecções.

Adicionalmente, analisamos a expressão de genes de *P. brasiliensis* possivelmente relacionados à apoptose e autofagia em resposta ao farnesol (seção 4.2.2), uma vez que foi demonstrado para o fungo *A. nidulans* (Semighini *et al.*, 2006; Savoldi *et al.*, 2008) e para células neoplásicas (Haug *et al.*, 1994; Miquel *et al.*, 1998; Rioja *et al.*, 2000; Joo *et al.*, 2007) que esse composto induz a via de morte celular programada. Por outro lado, o melhor entendimento da ação de farnesol em *P. brasiliensis* poderá auxiliar na compreensão dos efeitos desse composto nas interações com os antifúngicos analisados, e assim auxiliar futuramente no desenvolvimento de compostos alternativos para o tratamento da PCM. Além disso, esses estudos poderão auxiliar na compreensão dos mecanismos de comunicação interespecíficos, uma vez que o farnesol é uma molécula de QS de *C. albicans* e possui efeito antibiótico em outros microorganismos.

### **5.2.1 Efeito do farnesol sobre a ação de diferentes antifúngicos para o isolado Pb18 de *P. brasiliensis***

É sabido que cada fármaco tem sua própria cinética e dinâmica de ação; no entanto, quando estes são adicionados juntos a um sistema vivo podem interagir entre si. Nessa interação suas ações podem ter efeitos aditivos, potencializados, diminuídos,

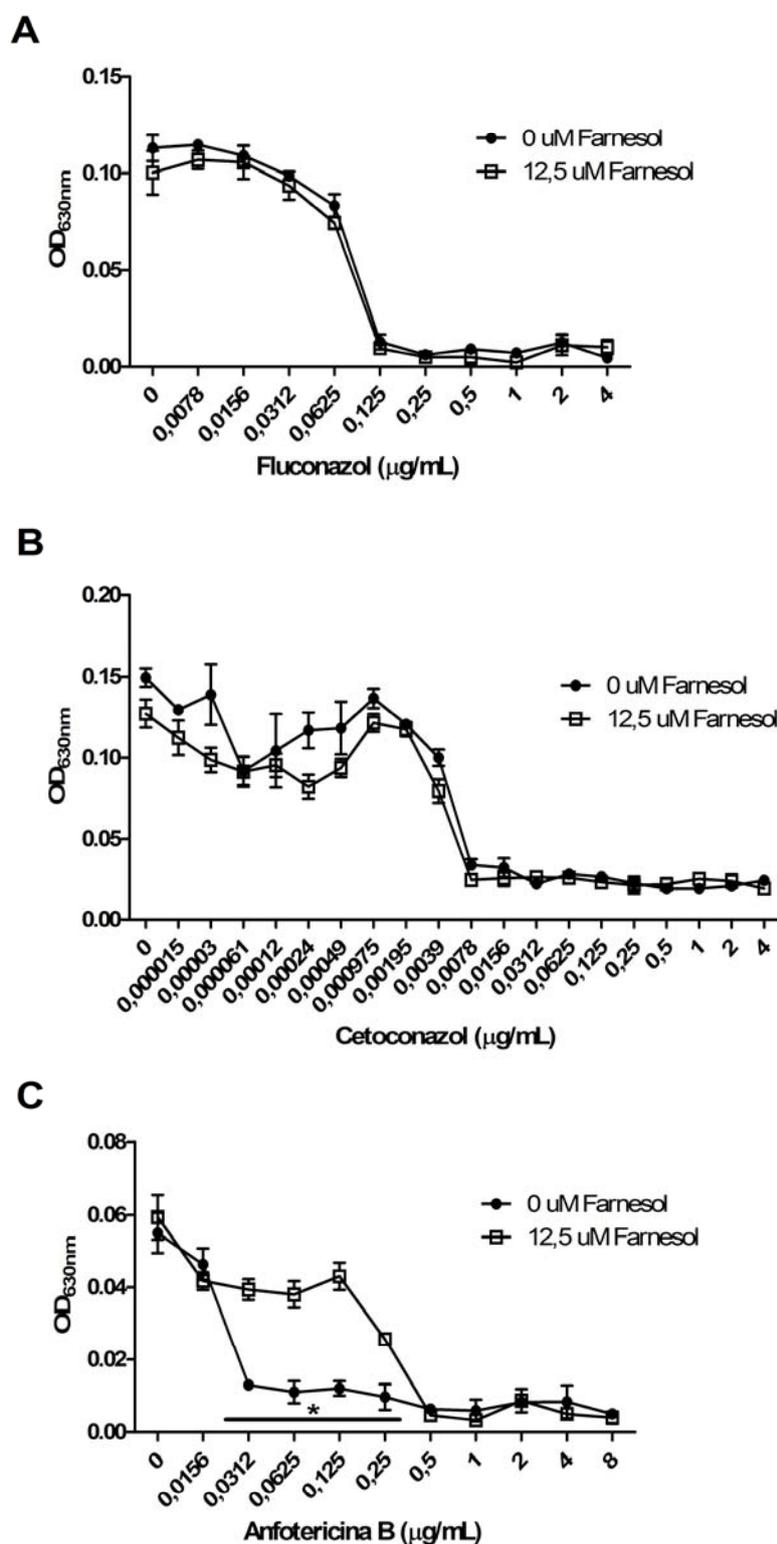
anulados ou não apresentarem influência entre si (Hardman *et al.*, 1996). Nesse contexto, foi mostrado que o farnesol aumenta a suscetibilidade de isolados resistentes tanto de *C. albicans* quanto de *C. dubliensis* ao tratamento com fluconazol (Jabra-Rizk, Shirliff *et al.*, 2006), revelando um efeito sinérgico de atuação desses dois compostos. No caso de *S. aureus*, o farnesol demonstrou ser um excelente potencializador da gentamicina em isolados sensíveis, além de reverter a resistência de isolados não sensíveis (Jabra-Rizk, Meiller *et al.*, 2006). Conseqüentemente, para todos os casos supracitados, o farnesol poderia ser usado como um adjuvante terapêutico.

Os medicamentos mais utilizados no tratamento da PCM são da família dos azóis, tais como, itraconazol, fluconazol e cetoconazol, além das sulfonamidas e anfotericina B, esses dois últimos reservados para o tratamento de casos mais graves (Brummer, Castaneda e Restrepo, 1993; Arenas, 2003). Como já mencionado antes, em todos os casos, o tratamento é prolongado e, portanto, gera muitos efeitos colaterais, como especialmente verificado para a anfotericina B (Brummer, Castaneda e Restrepo, 1993; Arenas, 2003). Ademais, recentes casos de pacientes infectados com isolados resistentes ao cetoconazol foram reportados (Hahn *et al.*, 2003). Nesse contexto, decidimos avaliar o possível papel do farnesol como adjuvante terapêutico por meio da análise de seu efeito sobre o MIC dos antifúngicos fluconazol, cetoconazol e anfotericina B.

Conforme observado na figura 11, para o isolado Pb18 de *P. brasiliensis* nenhum sinergismo foi observado entre farnesol e os antifúngicos da família dos azóis (Figura 11A e 11B). No entanto, na faixa de concentração de 0,0312 a 0,125µg/mL de anfotericina B foi observado um efeito antagonista do farnesol resultando em uma maior taxa de crescimento quando da presença de 12,5 µM desse composto (Figura 11C). Em outras palavras, uma concentração subinibitória de farnesol parece proteger o isolado Pb18 dos efeitos nocivos da anfotericina B entre as concentrações 0,0312 a 0,125µg/mL. Este efeito protetor do farnesol foi observado, também, na interação do farnesol com o fluconazol nos primeiros dias desaparecendo com o passar do tempo (dados não mostrados).

Com base nestes resultados, embora, o efeito fungicida do farnesol sobre o fungo dimórfico *P. brasiliensis* seja o menor dentre o observado para os diferentes

organismos estudados até o momento (Machida *et al.*, 1999; Jabra-Rizk, Meiller *et al.*, 2006; Jabra-Rizk, Shirliff *et al.*, 2006; Semighini *et al.*, 2006; Semighini, Murray e Harris, 2008) – 30 $\mu$ M para os isolados Pb18 (S1) (Derengowski, De-Souza-Silva, Braz, Mello-De-Sousa *et al.*, 2009) e Pb01 (grupo “Pb01-like”), e 40 $\mu$ M para o isolado Pb3 (PS2), conforme mostrado nas figuras 8A e 8B – e que em concentrações subinibitórias retarda a transição de levedura para micélio (Figuras 9 e 10), este sesquiterpeno provavelmente não poderá ser utilizado como adjuvante terapêutico no tratamento da PCM sistêmica. O farnesol quando associado com anfotericina B ou fluconazol, em certas concentrações (figura 11), parece favorecer o crescimento do fungo podendo, conseqüentemente agravar o quadro do paciente. Adicionalmente, é importante mencionar que embora na literatura seja relatado que o farnesol apresente baixa toxicidade em células normais (Adany *et al.*, 1994; Rioja *et al.*, 2000; Navarathna, Hornby *et al.*, 2007), observamos que nas concentrações letais para *P. brasiliensis* este composto também afeta as células de mamíferos (ver anexo I).



**Figura 11. Avaliação do efeito do farnesol sobre o MIC dos antifúngicos.** As concentrações mínimas inibitórias (MIC) dos antifúngicos: A) fluconazol, B) cetoconazol e C) anfotericina B para o isolado Pb18 de *P. brasiliensis* foram determinadas por meio do protocolo M-27 A (Galgiani *et al.*, 1997) de microdiluição em placa com algumas modificações (inóculo final de *P. brasiliensis* de  $10^5$  cél/mL em cada poço; leitura só após seis dias de crescimento). Os dados mostrados são derivados de um experimento realizado em triplicata (média  $\pm$  SEM). O \* representa diferença estatística entre os conjuntos ( $P < 0,05$ ).

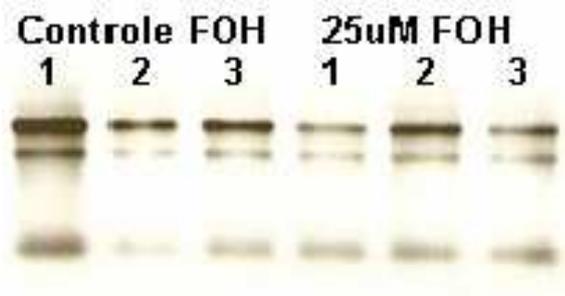
### 5.2.2 Efeito do farnesol nos níveis de expressão de genes relacionados ao processo de apoptose

O farnesol é um conhecido agente indutor de apoptose em células neoplásicas (Adany *et al.*, 1994; Haug *et al.*, 1994; Voziyan, Haug e Melnykovich, 1995; Rioja *et al.*, 2000; Joo *et al.*, 2007). Também identificado como uma QSM de *C. albicans*, provavelmente confere uma vantagem seletiva a esse fungo devido às suas interações antagonicas com outros microorganismos (Machida *et al.*, 1999; Jabra-Rizk, Meiller *et al.*, 2006; Jabra-Rizk, Shirliff *et al.*, 2006; Cugini *et al.*, 2007). No caso da atividade antagonista do farnesol sobre *A. nidulans*, a morte celular exhibe características apoptóticas que incluem condensação nuclear, fragmentação do DNA, externalização do fosfolípido de membrana fosfatidilserina e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (Semighini *et al.*, 2006). Ademais, foi demonstrado recentemente que, no mesmo organismo, este sesquiterpeno induz o acúmulo do RNA mensageiro do fator indutor de apoptose similar à oxidoreductase mitocondrial<sup>10</sup> (Savoldi *et al.*, 2008). Nesse contexto, para verificar se o efeito do farnesol sobre *P. brasiliensis* é devido à ativação da morte celular programada (MCP), foi analisada a expressão de genes ortólogos às principais categorias de MCP: apoptose e autofagia (Tabela 1).

O perfil eletroforético do RNA total recuperado do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* após seis horas de tratamento com farnesol nas concentrações de 0µM (controle) e 25µM, seguido de tratamento com DNase I livre de RNase, para eliminar possível contaminação residual com DNA genômico, é mostrado na figura 12.

---

<sup>10</sup> Apoptose-Inducing Factor (AIF)-like mitochondrial oxidoreductase



**Figura 12. Perfil eletroforético do RNA total extraído do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* à 6h do tratamento com farnesol após tratamento com DNase I livre de RNase.** Aproximadamente 1µg de RNA total de cada triplicata foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo, em condições livre de RNase.

O resultado revela a validade do RNA total extraído, visualizado pela integridade dos RNAs ribossomais. Após a confirmação da ausência de DNA genômico por PCR (dados não mostrados), uma alíquota do cDNA total sintetizado a partir do RNA total mostrado acima, foi empregada para análise por PCR em tempo real do padrão de expressão de alguns genes de *P. brasiliensis* ortólogos a genes de outros fungos associados a ambas as categorias de MCP. Os genes ortólogos à autofagia analisados foram: arp3 e arp9 (autophagy-related protein<sup>11</sup> 3 e 9, respectivamente), e ap (autophagy protein<sup>12</sup>). Os genes relacionados ao processo de apoptose foram: mc (metacaspase), vps (vacuolar protein-sorting-associated protein<sup>13</sup>), mn (mitochondrial nuclease<sup>14</sup>), e rr (rhodocoxin reductase<sup>15</sup>). Esse último apresenta alta similaridade com o gene que codifica para a oxidoreductase mitocondrial de *A. nidulans*, para o qual foi mostrado acúmulo de transcrito na presença de farnesol (Savoldi *et al.*, 2008). O controle interno empregado, como já mencionado anteriormente, foi o gene constitutivo e não diferencial entre as fases leveduriforme e miceliana de *P. brasiliensis* L34, que codifica uma proteína da subunidade maior do ribossomo. Além do gene L34, utilizamos outro controle interno, a  $\alpha$ -tubulina. Os resultados utilizando-se ambos os genes como normalizadores mostraram-se similares, sendo que o gene L34 apresentou um comportamento ligeiramente mais constitutivo. Dessa forma, optamos por incluir somente os resultados obtidos utilizando-se o gene L34 como controle interno (Tabela 3 e Figura 13).

<sup>11</sup> Proteínas 3 e 9 relacionadas à autofagia.

<sup>12</sup> Proteína de autofagia.

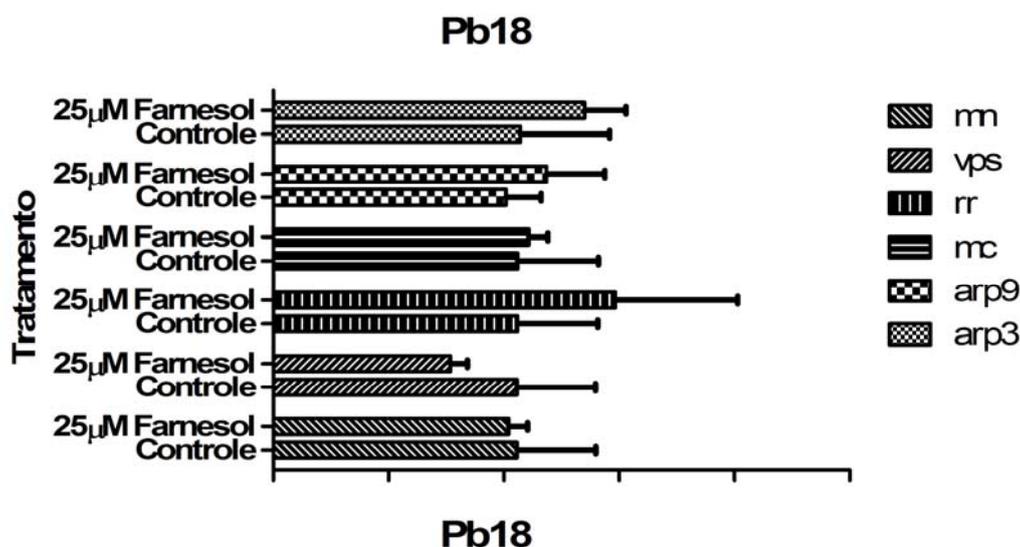
<sup>13</sup> Proteína associada à proteína classificatória vacuolar.

<sup>14</sup> Nuclease mitocondrial.

<sup>15</sup> Rodoxina reductase.

**Tabela 3: Valores obtidos pelo método  $\Delta\Delta C_T$  para avaliação dos níveis de expressão de genes relacionados à apoptose e à autofagia após 6h de tratamento com farnesol.**

Gene	Amostra	Media do $C_T$ do Gene de Interesse	Media do $C_T$ do Calibrador (L34)	$\Delta C_T$	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$ Fold Difference
<i>arp3</i>	Controle	23,258±0,501	19,046±0,216	4,212±0,546	0,000±0,546	1,072±0,387
	25 $\mu$ M FOH	23,804±0,165	19,171±0,098	4,633±0,192	0,421±0,192	1,351±0,179
<i>arp9</i>	Controle	23,893±0,013	19,046±0,216	4,847±0,216	0,000±0,216	1,011±0,151
	25 $\mu$ M FOH	24,231±0,295	19,171±0,098	5,060±0,311	0,213±0,311	1,186±0,252
<i>mc</i>	Controle	22,489±0,446	19,046±0,216	3,443±0,496	0,000±0,496	1,060±0,350
	25 $\mu$ M FOH	22,759±0,044	19,171±0,098	3,588±0,107	0,145±0,107	1,109±0,082
<i>rr</i>	Controle	24,689±0,444	19,046±0,216	5,643±0,494	0,000±0,494	1,059±0,349
	25 $\mu$ M FOH	25,362±0,228	19,171±0,098	6,191±0,248	0,548±0,248	1,484±0,53
<i>vps</i>	Controle	21,539±0,432	19,046±0,216	2,493±0,483	0,000±0,483	1,057±0,341
	25 $\mu$ M FOH	21,279±0,095	19,171±0,098	2,108±0,136	0,385±0,136	0,769±0,073
<i>mn</i>	Controle	20,991±0,434	19,046±0,216	1,945±0,485	0,000±0,485	1,057±0,342
	25 $\mu$ M FOH	21,142±0,063	19,171±0,098	1,971±0,117	0,026±0,117	1,021±0,082



**Figura 13. Níveis de expressão de genes relacionados à apoptose e à autofagia após 6h de tratamento com farnesol. Para o cálculo foi utilizado o método do  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ .**

O acúmulo dos transcritos relativos aos genes de *P. brasiliensis* provavelmente envolvidos no processo de apoptose e autofagia, após 6h de tratamento com farnesol, não apresentou diferença quando comparado ao nível de expressão do controle (sem farnesol) (Figura 13). Também foi analisado o perfil de expressão destes mesmos genes após tratamento com farnesol por um período de 15h, aqui mostramos somente o tempo de 6h. Igualmente, os resultados obtidos revelam a ausência de modulação dos níveis de expressão nestas condições (dados não mostrados). No entanto, ainda não é possível descartar completamente a possibilidade que uma destas categorias de MCP seja a via

de ação do farnesol dado que o efeito global deste sesquiterpeno leva à degeneração das organelas citoplasmática *in vitro* (Derengowski, De-Souza-Silva, Braz, Mello-De-Sousa *et al.*, 2009).

Embora o efeito fungicida do farnesol em *P. brasiliensis* tenha sido claramente mostrado, ainda não se pode concluir sobre o mecanismo pelo qual este composto atua sobre o fungo. Os resultados obtidos na análise dos níveis de expressão de genes envolvidos no processo de apoptose e autofagia não apresentaram diferença significativa entre as células tratadas e o controle (Tabela 3 e Figura 13). Entretanto, esses resultados não são conclusivos e, dessa forma, não pode ser descartada a possibilidade de que uma das categorias de MCP seja a via de ação do farnesol. Isto por que nos experimentos realizados por Derengowski *et al.* (2009) observou-se um efeito global de degeneração de organelas citoplasmática *in vitro* sem destruição da parede celular. Nesse sentido, pretende-se verificar a existência ou não de outros tipos de evidências de que o farnesol possa ser agente indutor de apoptose em *P. brasiliensis* por outras metodologias, tais como condensação e fragmentação do DNA (ensaio TUNEL), exposição de fosfatidilserina na superfície celular (ensaio Annexin V) e a produção de espécies reativas de oxigênio (medição através de 2',7'-diclorodihidrofloreína) (Madeo, Frohlich e Frohlich, 1997; Madeo *et al.*, 1999; Madeo *et al.*, 2004; Hamann, Brust e Osiewacz, 2008) além de repetir os experimentos de análise de expressão gênica alternando a forma de aeração, uma vez que o farnesol é extremamente volátil, e/ou empregar também outros tempo dos cultivos, visando a obtenção de resultados conclusivos.

## 6 CONCLUSÃO

### 1. Farnesol e outros isolados de *P. brasiliensis*:

- A MIC<sub>90</sub> do farnesol tanto para o isolado Pb01 quanto para o isolado Pb3 é de 20µM.
- A MLC<sub>90</sub> para o isolado Pb01 é de 30µM e para o isolado Pb3 é de 40µM de farnesol.
  - ⇒ *P. brasiliensis* mostra-se o mais sensível dentre os microrganismos analisados até momento.
- Com base nos resultados obtidos com os isolados Pb01 e Pb03 conjuntamente com os resultados obtidos para o isolado Pb18 (Derengowski, De-Souza-Silva, Braz, Mello-De-Sousa *et al.*, 2009), sugere-se fortemente que o farnesol exerce um efeito de retardo no processo de transição de levedura para micélio no fungo *P. brasiliensis*.

### 2. Efeito e Interações do farnesol com o isolado Pb18 de *P. brasiliensis*:

- Não foi observado nenhum sinergismo entre farnesol e os antifúngicos da família dos azóis (fluconazol e cetoconazol).
- Na faixa de concentração de 0,0312 a 0,125µg/mL de anfotericina B, o farnesol protegeu o isolado Pb18 do efeito deletério deste antifúngico.
  - ⇒ Com base nestes resultados, apesar do efeito fungicida do farnesol sobre *P. brasiliensis*, concentrações subinibitórias de farnesol não poderiam ser utilizadas como um possível adjuvante terapêutico no tratamento da PCM sistêmica.
- O mecanismo pelo qual este composto atua sobre o fungo não é conhecido. Os resultados obtidos na análise dos níveis de expressão de genes envolvidos no processo de apoptose e autofagia não apresentaram diferença significativa entre as células tratadas e o controle. No entanto, há a possibilidade de que uma das categorias de MCP seja a via de ação do farnesol, como já mencionado anteriormente.

## 7 PERSPECTIVAS

### 1. Farnesol e outros isolados de *P. brasiliensis*:

- Verificar o efeito do farnesol na transição de micélio para levedura para os isolados Pb01 e Pb3 de *P. brasiliensis*.
- Avaliar o efeito do farnesol sobre os isolados Pb18, Pb01 e Pb3 após diferentes tempos da indução da transição dimórfica.

### 2. Efeito e Interações do farnesol com o isolado Pb18 de *P. brasiliensis*:

- Verificar a existência ou não de outros tipos de evidências de que farnesol possa ser agente indutor de apoptose no isolado Pb18 de *P. brasiliensis*, tais como condensação e fragmentação do DNA (ensaio TUNEL), exposição de fosfatidilserina na superfície celular (ensaio Annexin V) e a produção de espécies reativas de oxigênio (medição através de 2',7'-diclorodihidrofloreceína).
- Reavaliar o efeito do farnesol na expressão de genes relacionados ao processo de morte celular programada melhor ajustando as condições de cultivo (para evitar a possibilidade de evaporação do farnesol).

## 8 Anexos

### 8.1 Anexo I: Estudo do efeito do farnesol na infecção ex-vivo de distintas linhagens celulares em cultura por *Paracoccidioides brasiliensis*

Nessa seção encontram-se os estudos e resultados preliminares, de forma simplificada, da proposta original para o meu trabalho de mestrado. Apesar de que não ter sido possível seguir esta linha, os resultados aqui apresentados poderiam contribuir para trabalhos futuros relacionados a este tema. Vale ressaltar que nossa proposta inicial era baseada em dados da literatura que mostravam a não toxicidade do farnesol quando administrado exogenamente em camundongos.

#### 8.1.1 Objetivo Geral

- Avaliar o efeito do farnesol na infecção de macrófagos e pneumocitos em cultura por *Paracoccidioides brasiliensis*.

#### 8.1.2 Objetivos Específicos

- Farnesol e as Linhagens de Células em Cultura:
  - Avaliar o efeito SFB no MIC do FOH para o isolado Pb18 de *P. brasiliensis*.
  - Avaliar o efeito do farnesol nas linhagens J774 e MH-S de macrófagos em cultura, e na linhagem primária de macrófagos peritoneais.

#### 8.1.3 Materiais e Métodos

##### 8.1.3.1 Manutenção e Propagação das Células

##### 8.1.3.1.1 *Paracoccidioides brasiliensis*

Os isolados Pb18, Pb01 e Pb03 de *P. brasiliensis*, na forma de levedura, foram mantidos por passagens semanais em meio sólido Fava-Neto (protease peptona 0,3%, peptona 1%, extrato de carne 0,5%, dextrose 4%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,5% e ágar 1,6 %; pH 7,2) a 36,5°C, e foram usados em experimentos após 6-7 dias de crescimento.

Estes isolados foram suspensos no meio específico de cada experimento (apresentados seguir), agitados vigorosamente em vortex, visando diminuir o tamanho dos grumos, e posteriormente decantados – para a sedimentação de grumos restantes. O número de células viáveis foi determinado por contagem em câmara de Neubauer, sendo a viabilidade do fungo analisada por meio do corante vital verde Janus (2009, in press).

Para os experimentos de infecção de macrófagos, o fungo *P. brasiliensis* na sua forma leveduriforme foi suspenso em meio RPMI contendo 20% de soro fresco de camundongo, incubando a suspensão de células a 37°C por 30 minutos a modo de opsonizar o fungo e facilitar sua adesão/internalização pelo macrófago.

#### 8.1.3.1.2 *Linhagens celulares*

A linhagem celular de macrófagos utilizada neste estudo foi a J774A.1 (ATCC TIB-67) de macrófago/monócito originada de ascitis de uma adulta fêmea da cepa BALB/cN de camundongos em 1968. Posteriormente, também empregaremos a linhagem MH-S (ATCC TIB-67) de macrófago alveolar originada da transformação de macrófagos alveolares de camundongos BALB/c com SV40. Ademais, foi utilizada a linhagem A549 (ATCC CCL-185) de pneumócitos originado de um carcinoma de pulmão humano em 1972. As células foram cultivadas em frascos de cultura de 150cm<sup>2</sup> contendo meio de cultura RPMI 1640 (Sigma Chemical, USA) suplementado com HEPES (20mM), bicarbonato de sódio (1,5g/L), gentamicina (25µg/mL)(GIBCO-BRL) e 2%<sup>16</sup> ou 10%<sup>17</sup> de soro fetal bovino (SFB - GIBCO-BRL). Os frascos contendo as células em cultura foram mantidos a 36,5°C numa atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Uma vez atingida 80-90% de confluência, as células J774 foram soltas do frasco utilizando “scrapper” e para as células MH-S e as A549 foi utilizada uma solução de tripsina 0,125% - EDTA 0,02% por dois minutos<sup>18</sup>. Uma vez que as células foram descoladas do frasco, o número de células viáveis foi contado em câmara de Neubauer, empregando o corante vital azul de tripan, e as células foram passadas para um novo frasco (propagação) ou placa (experimentos). Para os experimentos nesse trabalho as células foram cultivadas em placas de 24 poços (3 x 10<sup>5</sup> cél/poço).

---

<sup>16</sup> Para os experimentos.

<sup>17</sup> Para manter as células.

<sup>18</sup> Nesse caso, uma vez soltas, neutralizar a solução de tripsina-EDTA com o meio de cultura supracitado.

### 8.1.3.1.3 *Cultivo primário de macrófagos peritoneais BALB/c*

Camundongos BALB/c foram injetados intraperitonealmente com 2mL de tioglicolato 3% estéril, após 72 horas, os animais foram sacrificados e suas células recuperadas por lavagem peritoneal com 10mL de PBS gelado (estéril). O lavado foi centrifugado à 2500rpm/5 min e o sobrenadante desprezado. As células foram resuspendidas em meio RPMI incompleto gelado (1mL/camundongo). As células foram dispensadas em placas de 24 poços (3 x 10<sup>5</sup> cél/poço) e incubadas a 37°C por uma hora. Após a lavagem para remover as células não aderentes, as células foram incubadas com meio RPMI com 10% SFB por 12 horas antes de seu uso.

### 8.1.3.2 Preparo das soluções de Farnesol.

A partir de uma solução estoque de uma mistura de estereoisômeros de farnesol (Fluka/Sigma - Sigma-Aldrich; Cat.# 46191; Lote # 32706330), foram feitas diluições em metanol levando-se sempre em consideração que o mesmo volume (4μL) das diferentes diluições seria adicionado ao ensaio para obtenção da concentração final desejada. Além disto, o mesmo volume do diluente puro (metanol) foi utilizado em todos os sistemas controle.

### 8.1.3.3 Avaliação do efeito do SFB sobre a concentração mínima inibitória (MIC) do farnesol para *P. brasiliensis*

Recentemente, Derengowski *et al.* (2009) demonstraram que 25μM de farnesol é letal ao fungo *P. brasiliensis* quando tratado *in vitro*. Para verificar o efeito do SFB sobre a ação do farnesol, analisou-se a diferença entre a presença e a ausência de 2% ou 5% SFB nas concentrações de 15μM, 25μM, 35μM, 50μM, 70μM, 90μM e 150μM de farnesol sobre 10<sup>5</sup>cel/mL de *P. brasiliensis*. A avaliação do crescimento de *P. brasiliensis* foi realizada por densitometria utilizando um leitor de ELISA (Elx800 do grupo SG CQC) à 630nm, no tempo zero e no oitavo dia de crescimento. Entre as leituras, a placa foi mantida numa incubadora a 36,5°C com uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Os controles usados foram: controle de crescimento (células e o meio), controle do diluente (2% metanol), e o branco dos reativos.

#### 8.1.3.4 Avaliação do efeito do farnesol sobre as linhagens celulares em estudo (citotoxicidade e viabilidade)

##### **8.1.3.4.1 Preparo das células para análise**

As células (foram cultivadas em placas de 24 ou 96 poços por uma noite para sua adesão antes do tratamento. Foram analisados três aspectos do efeito do farnesol sobre as linhagens celulares: **a)** viabilidade e citotoxicidade celular por meio da coloração com MTT; **b)** análise das morfologias das linhagens por meio de coloração. Para os experimentos foram empregados os seguintes sistemas controle: 1) controle do experimento (apenas as células); e 2) controle dos possíveis efeitos do diluente do farnesol<sup>19</sup>. A condição experimental referiu-se à avaliação do efeito de diferentes concentrações de farnesol (25µM, 50µM, 75µM, 90µM, e 150µM sobre as distintas células em cultura). Todas as condições analisadas foram realizadas em triplicata.

##### **8.1.3.4.2 Análise da viabilidade celular por meio da coloração com MTT.**

Para constatar o efeito do farnesol sobre a viabilidade as linhagens celulares J774A.1 ( $3 \times 10^4$  cél/poço), MH-S ( $5 \times 10^4$  cél/poço) e A549 ( $3 \times 10^3$  cél/poço), as células foram incubadas em meio RPMI 2%SFB com diferentes concentrações de farnesol (5µM, 10µM, 15µM, 20µM, 25µM, 30µM, 35µM, 40µM e 50µM) por 24 e 48 horas em placas de 96 poços. Enquanto as células do cultivo primário de macrófagos peritoneais ( $3 \times 10^5$  cél/poço), em meio RPMI 2%SFB, foram incubadas por 6 e 10 horas com distintas concentrações de farnesol (5µM, 7,5µM, 10µM, 12,5µM, 15µM, 17,5µM, 20µM, 22,5µM, 25µM, 27,5µM, 30µM, 35µM, 50µM e 100µM) em placas de 24 poços.

A viabilidade das diferentes células foi determinada pelo método MTT (brometo 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium; Sigma) que avalia a atividade mitocondrial (2009, in press). Após a incubação com farnesol, o meio foi

---

<sup>19</sup> Células na presença de 2% metanol 100% no caso das placas de 96 poços e 0,4% metanol 100% nas de 24 poços.

retirado e 100µL meio RPMI 2%SFB com 0,5mg/mL MTT - feita a partir da solução estoque de 5mg/mL MTT em 0,15M de PBS (tampão de fosfato) – e 100µL de RPMI 2%SFB foi adicionado a cada poço. Ao final de duas horas de incubação a 36,5°C no escuro, o sobrenadante foi cuidadosamente removido de cada poço, as células lavadas com meio RPMI incompleto e foram adicionados 200µL de DMSO (sulfoxido de dimetil)/5 min para solubilizar o sal de formazan formado. A leitura foi realizada num leitor de ELISA (Elx800 do grupo SG CQC) à 490nm. Os controles usados foram: controle de crescimento (células e o meio), controle do diluente (2% de metanol para a placa de 96 poços e 0,4% metanol para placa de 24 poços), e o branco dos reativos.

#### **8.1.3.4.3 *Análise das morfologias das linhagens por meio das colorações***

Após 24h e 48h de tratamento, as células foram lavadas três vezes com PBS e em seguida coradas com Giemsa ou Violeta de Cresil. Para a coloração de Giemsa foi utilizada uma solução de Giemsa 4% em metanol por cinco minutos e lavadas com PBS. Para a coloração com Violeta de Cresil, as células foram primeiramente fixadas com paraformaldeído 2% por dez minutos, lavadas com PBS e coradas com uma solução de violeta de cresil 0,2% em etanol 20% por cinco minutos. Após a coloração, as células foram analisadas e fotografadas no microscópio de luz Zeiss-Axiophot (ocular 10X; objetiva 40X/100X).

#### **8.1.3.5 Análise estatística dos resultados**

As análises estatísticas ANOVA foram feitas com o auxílio do programa de computador “SPSS Statistics 17.0.1”.

##### **8.1.3.5.1 *Avaliação do efeito do SFB sobre a concentração mínima inibitória (MIC) do farnesol para P. brasiliensis***

Devido ao delineamento experimental, o interesse nesta avaliação foi a interação entre duas variáveis (presença 2 ou 5%/ausência de SFB no sistema e diferentes concentrações de farnesol) sobre a variável resposta (crescimento celular). Portanto, o teste escolhido foi a ANOVA *two-way* (opção *General Linear Model*), e a avaliação posterior foi medida pela construção dos intervalos de confiança a 95%.

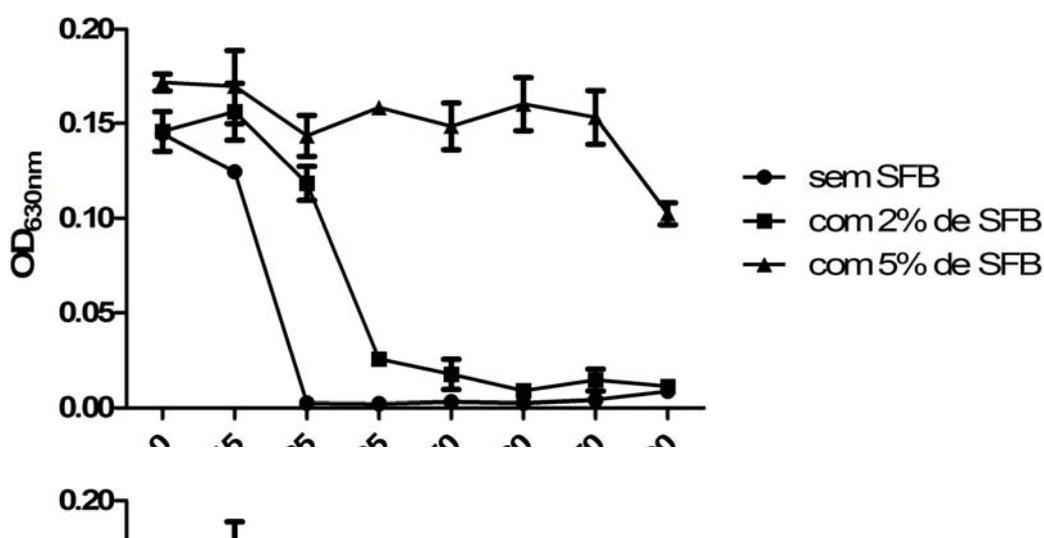
#### ***8.1.3.5.2 Avaliação do efeito do farnesol sobre as linhagens celulares em estudo (citotoxicidade e viabilidade)***

Para estes dados, foram realizados o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, para verificar se as pressuposições da ANOVA (Análise de Variância) foram respeitadas. Satisfeita esta condição, a ANOVA *one-way* com o *post hoc test* de Dunnet bicaudal foram efetuados, porque os tratamentos foram comparados somente com o controle. Valores de p inferiores a 0,05 representavam diferença estatística entre os grupos.

### 8.1.4 Resultados e Discussão

#### 8.1.4.1 Efeito do SFB sobre o MIC do farnesol para *P. brasiliensis*

O estudo da influência do farnesol na infecção de *P. brasiliensis* será realizado com macrófagos em cultura e nesse sistema, além do meio de cultura, o SFB é utilizado para manter as células viáveis já que este contém vários fatores necessários às células. No entanto, o soro apresenta vários componentes, muitos dos quais têm a capacidade de interagir com compostos lipofílicos (Mosmann, 1983; Vistica *et al.*, 1991; Hussain, Nouri e Oliver, 1993; Stentelaire *et al.*, 2001). O farnesol sendo um álcool sesquiterpeno poderia ter seu efeito sobre *P. brasiliensis* reduzido quando na presença de SFB. A fim de se comprovar o possível efeito do soro sobre a atividade fungicida do farnesol, foram analisadas diferentes concentrações deste reagente, na presença (2% ou 5%) e na ausência de SFB, bem como o efeito deste sobre o valor do MIC.



**Figura\_ I.** Análise do efeito de 2% e 5% de SFB sobre a viabilidade do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* tratado com diferentes concentrações de farnesol. O efeito do soro sobre a concentração fungicida do farnesol para o isolado Pb18 do fungo *P. brasiliensis* foi medido por densitometria após oito dias de tratamento com diferentes concentrações de farnesol em meio RPMI complementado com HEPES. Os dados mostrados são derivados de um experimento realizado em triplicata (média  $\pm$  SEM).

O trabalho de Derengowski *et al.* (2009) demonstrou, *in vitro* e na ausência de soro, que concentrações iguais ou superiores a 25 $\mu$ M de farnesol eram letais ao fungo *P. brasiliensis*. Este fato foi novamente corroborado neste experimento (Figura I, sem

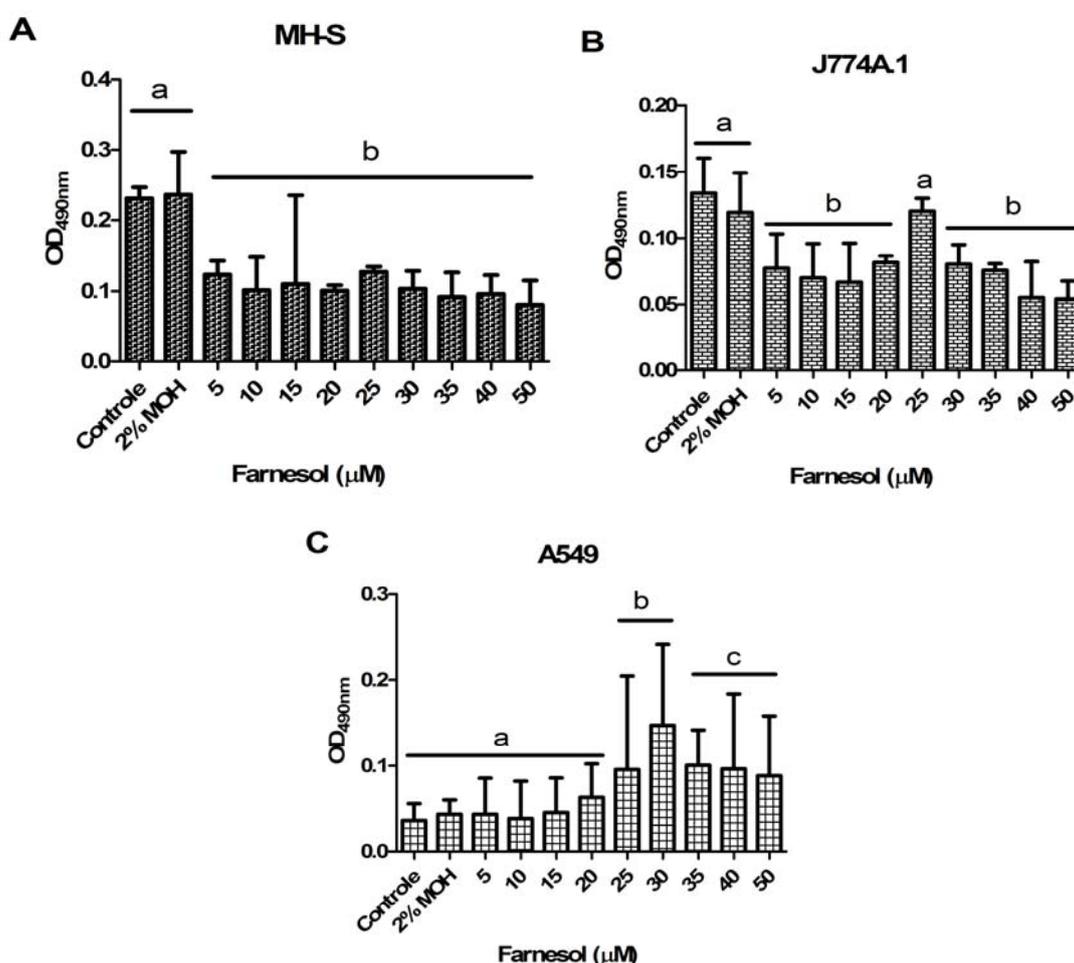
5%SFB). Por outro lado, na presença de soro, a concentração que demonstrou ser letal ao fungo foi muito superior. De fato, o soro protege *P. brasiliensis* contra os efeitos letais do farnesol em concentrações inferiores a 35µM em concentrações de 2% SFB e inferiores a 90µM em concentrações de 5% SFB (Figura I, com 2% e 5%SFB). Por conseguinte, este fato será considerado para os experimentos de infecção de macrófagos, onde se usará 2% de SFB em vez do usual 10%.

#### 8.1.4.2 Avaliação do efeito do farnesol sobre as linhagens celulares em estudo (citotoxicidade e viabilidade)

Conforme mencionado anteriormente, o estudo do efeito do farnesol na infecção de *P. brasiliensis* será realizado com linhagens de macrófagos, MH-S S (ATCC TIB-67) de macrófago alveolar e J774A.1 (ATCC TIB-67) de macrófago/monócito, e/ou de pneumócitos, A549 (ATCC CCL-185) de pneumócitos, em cultura para isso é necessário testar o efeito deste sesquiterpeno sobre estas linhagens com 2%SFB. Dado que na literatura há relatos que este composto induz a apoptose ou a parada do ciclo celular, preferencialmente, em células cancerígenas (2009), sem afetar as células normais (Melnykovich, Haug e Goldner, 1992; Haug *et al.*, 1994; Voziyan, Haug e Melnykovich, 1995; Miquel *et al.*, 1998; Joo *et al.*, 2007; Wiseman, Werner e Crowell, 2007). Além disso, há relatos especificamente demonstrando apoptose na linhagem A549 em concentrações acima das que serão utilizadas aqui (Adany *et al.*, 1994; Rioja *et al.*, 2000). Nesse sentido, buscou-se avaliar o efeito de diferentes concentrações de farnesol visando determinar a máxima concentração deste composto que não afeta a viabilidade, metabolismo e morfologia de cada linhagem, para logo determinar em que faixa avaliar o efeito farnesol na infecção.

As análises de viabilidade com azul de tripan e de morte celular por coloração com alaranjado de acridina/brometo de etídeo descartaram a linhagem J774A.1 para prosseguimento nas próximas etapas dos experimentos (efeito do farnesol na infecção de macrófagos) e nos levaram a selecionar a linhagem MH-S (dados no mostrados), mesmo que em ambos os casos não se observaram padrões típicos de apoptose/necrose o que interpretamos como sendo devido à própria fisiologia dos macrófagos. Com base nisto, experimentos de infecção onde farnesol foi adicionado concomitantemente a adição de *P. brasiliensis* e, também, em diferentes tempos de infecção foram realizados

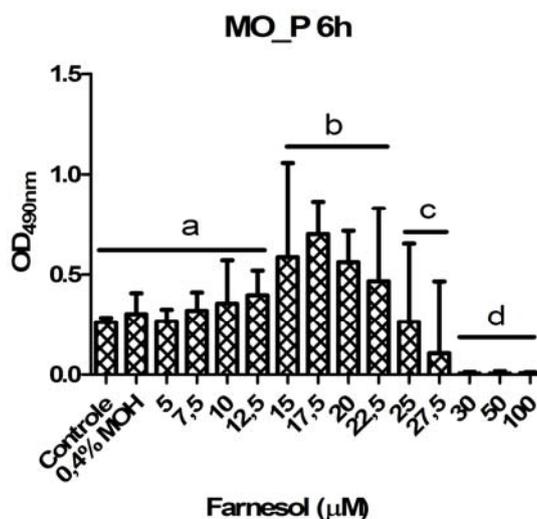
(dados não mostrados). Os resultados obtidos, não foram conclusivos dado que as diferenças com relação aos controles (células na ausência do fungo e na presença da concentração máxima de farnesol, e células infectadas com *P. brasiliensis* e na ausência de farnesol), onde nas células tratadas com farnesol a não observação de mudanças na coloração do meio de cultura, um indicativo de intenso metabolismo celular (dados não mostrados), demonstra que as células não estavam crescendo ativamente, provavelmente por alguma influência do farnesol. Por isso, decidimos reavaliar a viabilidade e citotoxicidade do farnesol nas células por outro método.



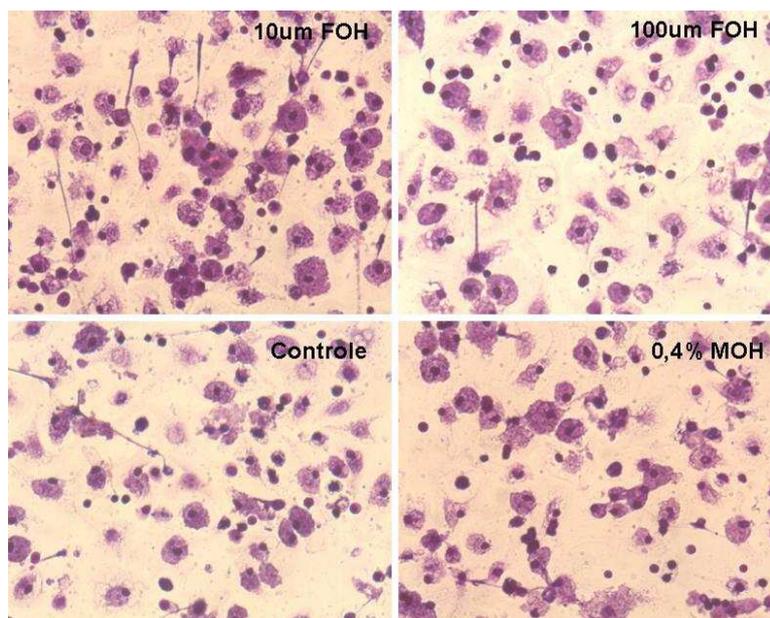
**Figura II.** Análise da viabilidade das células das linhagens MH-S e J774A.1 de macrófagos e a linhagem A549 de pneumócitos após de tratamento diferentes concentrações de farnesol. A viabilidade das diferentes linhagens foi medida pela coloração por MTT após 24h de tratamento com diferentes concentrações de farnesol em meio de cultura com 2% SFB. A) MH-S B) J774A.1 C) A549. Os dados mostrados são derivados de um experimento realizado em triplicata (média  $\pm$  SEM). Os grupos a, b e c apresentam diferenças estatísticas entre si.

Não será possível utilizar os sistemas com as linhagens MH-S, J774A.1 e A549 para analisar o efeito do farnesol sobre a infecção das mesmas dado que as concentrações que este composto não afeta as linhagens são as mesmas que não afetam o isolado Pb18 de *P. brasiliensis* de forma letal (figura I e figura II). Apesar de ter-se feito uma tentativa com as linhagens MH-S e A549, ficou difícil determinar se o resultado observado foi devido ao efeito do farnesol sobre o isolado Pb18 de *P. brasiliensis* ou sobre a linhagem (dados não mostrados). Será necessário determinar a influencia de SFB com o farnesol sobre a transição dimórfica do fungo e utilizar possivelmente estas concentrações para a análise de infecção.

Devido aos problemas com a utilização de linhagens comerciais, decidimos avaliar o efeito do farnesol sobre macrófagos peritoneais retirados de camundongos BALB/c, dado que sesquiterpeno deveria apresentar baixa toxicidade em células normais (Miquel *et al.*, 1998; Joo *et al.*, 2007).



**Figura\_ III. Análise da viabilidade das células da linhagem primaria de macrófagos peritoneais após tratamento com diferentes concentrações de farnesol.** A viabilidade dos macrófagos peritoneais foi medida pela coloração por MTT após 6h de tratamento com diferentes concentrações de farnesol em meio de cultura com 2% SFB. Os dados mostrados são derivados de um experimento realizado em triplicata (média ± SEM). Os grupos a, b, c e d apresentam diferenças estatísticas entre si.



**Figura\_ IV. Análise da morfologia das células da linhagem primária de macrófagos peritoneais após tratamento com diferentes concentrações de farnesol.** As diferenças morfológicas foram determinadas por meio da coloração de violeta de cresil após 10h de tratamento com 10 $\mu$ M e 100 $\mu$ M de farnesol em meio de cultura com 2% SFB. Os fotos mostrados são representativos de um experimento realizado em duplicata.

No entanto, da mesma forma que com as linhagens comerciais, os macrófagos peritoneais primários não podem ser utilizados para verificar o efeito do farnesol sobre a infecção de células de mamíferos (figura V). Cabe destacar, novamente, que será necessário realizar novos experimentos com farnesol, SFB e fungo para determinar em que concentrações seria interessante investigar e que coincida com a faixa permitida para cada linhagem, seja ela comercial ou primária.

Em nenhum dos dois casos, exemplificados na figura V com macrófagos peritoneais, a morfologia das células foi afetada. Não se observou este padrão de destruição celular em nenhuma das condições experimentais. Observaram-se, em todos eles, células intactas, mesmo que aparentem diferentes quantidades.

## 8.2 Anexo II: Participação em Congressos

### 8.2.1 Pôsteres:

1. De-Souza-Silva, C. ; Oliveira, AA ; DERENGOWSKI, L. S. ; SILVA, Simoneide S ; SILVA-PEREIRA, I. . Novel time reducing way to test viability in the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in ex-vivo assays. In: VI Congresso latinoamericano de Micologia, 2008, Mar del Plata. VI Congresso latinoamericano de Micologia, 2008. p. 287-287.

#### **Novel time-reducing way to test viability in the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in ex-vivo assays.**

Una nueva forma de verificar la viabilidad del hongo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* en ensayos ex-vivo.

De-Souza-Silva C\*1; Oliveira AA\*1; Derengowski L\*1; Silva SS\*1; Silva-Pereira I1. 1 Depto de Biologia Celular - CEL/IB Laboratório de Biologia Molecular. E-mail: cdssilva@gmail.com

The dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* is the etiologic agent of Paracoccidioidomycosis. The main host defense mechanism against this infection is the cell-mediated immune response, and in its absence, or in susceptible hosts, *P. brasiliensis* can survive and replicate within nonactivated macrophages and pneumocytes. Hence, the study of the interaction between host cells and fungus is important. The MTT assay has been used in anticancer drug screening assays to measure cell viability, proliferation and cytotoxicity. It has also started being used in others areas. Our group has studied and compared the results of the MTT assay with the traditional ways used to check *P. brasiliensis* viability in experiments *ex vivo*, since the usual tests are time consuming. We found a direct correlation between *P. brasiliensis* CFU counts from *ex vivo* studies with human epithelial cell line A549 with isolates Pb01 with the MTT signal with a slight difference since the MTT assay does not give the fungus to recover from damage received as plating does. In conclusion, we believe that the use of MTT assay for viability testes in *P. brasiliensis* will reduce time and effort to obtain results.

### 8.2.2 Pôsteres como co-autora:

1. DERENGOWSKI, L. S.; Bráz, S.V. ; De-Souza-Silva, C. ; MELLO-DE-SOUSA, T. M. ; Bão, S.N. ; KYAW, Cynthia M ; SILVA-PEREIRA, I. . Antagonistic effect of farnesol, a *Candida albicans* quorum sensing molecule, on *Paracoccidioides brasiliensis* growth and morphogenesis.. In: X International Congress on Paracoccidioidomycosis, 2008, Medellín. Anais do X International Congress on Paracoccidioidomycosis, 2008.
2. Souza-e-Silva, L. F.; Kerr, N.; De-Souza-Silva, C.; Oliveira, L. M. D.; DERENGOWSKI, L. S.; SILVA-PEREIRA, I. . Effect of farnesol, a quorum-sensing molecule of *Candida albicans*, in the gene expression of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: VI Congresso latino Americano de Micologia, 2008, Mar del Plata. VI Congresso latino Americano de Micologia, 2008. p. 187-187.

### 8.3 Anexo III: Participação em artigo

#### **Antimicrobial effect of farnesol, a *Candida albicans* quorum sensing molecule, on *Paracoccidioides brasiliensis* growth and morphogenesis**

Lorena da S Derengowski<sup>1</sup>, Calliandra De-Souza-Silva<sup>1</sup>, Shélida V Braz<sup>2</sup>, Thiago M Mello-De-Sousa<sup>1</sup>, Sônia N Bão<sup>2</sup>, Cynthia M Kyaw<sup>3</sup>, Ildinete Silva-Pereira<sup>1§</sup>

Laboratórios de <sup>1</sup>Biologia Molecular, <sup>2</sup>Microscopia Eletrônica and <sup>3</sup>Microbiologia, CEL/IB, Universidade de Brasília – Brasília-DF, 70910-900, Brasil.

---

§Corresponding author: Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Celular, Laboratório de Biologia Molecular, 70910-900, Brasília, DF, Brasil. Fax: +55 61 349 8411.

Email addresses:

LSD: [lorena.bio@gmail.com](mailto:lorena.bio@gmail.com), SVB: [shelidabraz@gmail.com](mailto:shelidabraz@gmail.com), CDSS: [cdssilva@gmail.com](mailto:cdssilva@gmail.com), TMMDS: [thiagodemello@gmail.com](mailto:thiagodemello@gmail.com), SNB [snbao@unb.br](mailto:snbao@unb.br), CMK: [malta@unb.br](mailto:malta@unb.br), ISP: [xocolau@unb.br](mailto:xocolau@unb.br); [ildinetesp@gmail.com](mailto:ildinetesp@gmail.com)

---

#### **Abstract**

**Background:** Farnesol is a sesquiterpene alcohol produced by many organisms, and also found in several essential oils. Its role as a quorum sensing molecule and as a virulence factor of *Candida albicans* has been well described. Studies revealed that farnesol affects the growth of a number of bacteria and fungi, pointing to a potential role as an antimicrobial agent.

**Methods:** Growth assays of *Paracoccidioides brasiliensis* cells incubated in the presence of different concentrations of farnesol were performed by measuring the optical density of the cultures. The viability of fungal cells was determined by MTT assay and by counting the colony forming units, after each farnesol treatment. The effects of farnesol on *P. brasiliensis* dimorphism were also evaluated by optical microscopy. The ultrastructural morphology of farnesol-treated *P. brasiliensis* yeast cells was evaluated by transmission and scanning electron microscopy.

**Results:** In this study, we describe the effects of farnesol on *Paracoccidioides brasiliensis* growth and dimorphism. Concentrations of this isoprenoid ranging from 25 to 300  $\mu$ M strongly inhibited *P. brasiliensis* growth. The MIC of farnesol for *P. brasiliensis* was estimated at 25  $\mu$ M, while the MLC at around 30  $\mu$ M. When employing levels which don't compromise cell viability (5 to 15  $\mu$ M), it was shown that farnesol also affected the morphogenesis of this fungus. About 60% of inhibition in hyphal development following *P. brasiliensis* yeast cells treatment with 15  $\mu$ M of farnesol for 48 h was observed. At these farnesol concentrations was also observed significant hyphal shortening. Electron microscopy experiments showed that, despite of a remaining intact cell wall, *P. brasiliensis* cells treated with farnesol concentrations above 25  $\mu$ M exhibited a fully cytoplasmic degeneration.

**Conclusion:** Our data indicate that farnesol acts as a potent antimicrobial agent against *P. brasiliensis*. The fungicide activity of farnesol against this pathogen is probably associated to cytoplasmic degeneration. In concentrations that do not affect fungal viability, farnesol retards the germ-tube formation of *P. brasiliensis*, suggesting that the morphogenesis of this fungus is controlled by environmental conditions.

## 9 REFERÊNCIAS

- ADANY, I. et al. Differences in sensitivity to farnesol toxicity between neoplastically- and non-neoplastically-derived cells in culture. **Cancer Lett**, v. 79, n. 2, p. 175-9, May 16 1994.
- ALMEIDA, S. R.; LOPES, J. D. The low efficiency of dendritic cells and macrophages from mice susceptible to *Paracoccidioides brasiliensis* in inducing a Th1 response. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, n. 4, p. 529-37, Apr 2001.
- ANTACHOPOULOS, C.; ROILIDES, E. Cytokines and fungal infections. **Br J Haematol**, v. 129, n. 5, p. 583-96, Jun 2005.
- ARENAS, R. **Micología Médica Ilustrada**. Second. Mexico: McGraw-Hill Interamericana Editores, S. A., 2003. -.
- BAGAGLI, E. et al. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. **Infect Genet Evol**, v. 6, n. 5, p. 344-51, Sep 2006.
- \_\_\_\_\_. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 197-207, Apr-May 2008.
- BAUMGARDNER, D. J.; PARETSKY, D. P. The in vitro isolation of *Blastomyces dermatitidis* from a woodpile in north central Wisconsin, USA. **Med Mycol**, v. 37, n. 3, p. 163-8, Jun 1999.
- BENARD, G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 209-21, Apr-May 2008.
- BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. *Paracoccidioidomycosis*: an update. **Clin Microbiol Rev**, v. 6, n. 2, p. 89-117, Apr 1993.
- BRUMMER, E. et al. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. **Infect Immun**, v. 57, n. 8, p. 2289-94, Aug 1989.

BRUMMER, E.; HANSON, L. H.; STEVENS, D. A. Gamma-interferon activation of macrophages for killing of *Paracoccidioides brasiliensis* and evidence for nonoxidative mechanisms. **Int J Immunopharmacol**, v. 10, n. 8, p. 945-52, 1988.

BRUMMER, E. et al. Ultrastructure of phagocytosed *Paracoccidioides brasiliensis* in nonactivated or activated macrophages. **Infect Immun**, v. 58, n. 8, p. 2628-36, Aug 1990.

CALICH, V. L. et al. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 223-36, Apr-May 2008.

\_\_\_\_\_. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Br J Exp Pathol**, v. 66, n. 5, p. 585-94, Oct 1985.

CALICH, V. L.; VAZ, C. A.; BURGER, E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Res Immunol**, v. 149, n. 4-5, p. 407-17; discussion 499-500, May-Jun 1998.

CANO, L. E. et al. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia by pulmonary macrophages and the effect of cytokines. **J Med Vet Mycol**, v. 30, n. 2, p. 161-8, 1992.

\_\_\_\_\_. Inhibitory effect of deferoxamine or macrophage activation on transformation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia ingested by macrophages: reversal by holotransferrin. **Infect Immun**, v. 62, n. 4, p. 1494-6, Apr 1994.

\_\_\_\_\_. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. **Infect Immun**, v. 63, n. 5, p. 1777-83, May 1995.

CARMICHAEL, J. et al. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. **Cancer Res**, v. 47, n. 4, p. 936-42, Feb 15 1987.

CARRERO, L. L. et al. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal Genet Biol**, v. 45, n. 5, p. 605-12, May 2008.

CARRILLO-MUNOZ, A. J. et al. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. **Rev Esp Quimioter**, v. 19, n. 2, p. 130-9, Jun 2006.

CARVALHO, K. C. et al. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* and gp43 expression in isolates bearing known PbGP43 genotype. **Microbes Infect**, v. 7, n. 1, p. 55-65, Jan 2005.

COMLEY, J. C.; TURNER, C. H. Potential of a soluble tetrazolium/formazan assay for the evaluation of filarial viability. **Int J Parasitol**, v. 20, n. 2, p. 251-5, Apr 1990.

COSTA DA, S. et al. Transporters in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome: insights on drug resistance. **Genet Mol Res**, v. 4, n. 2, p. 390-408, 2005.

COSTA, E. O.; DINIZ, L. S.; NETTO, C. F. The prevalence of positive intradermal reactions to paracoccidioidin in domestic and wild animals in Sao Paulo, Brazil. **Vet Res Commun**, v. 19, n. 2, p. 127-30, 1995.

COSTA, E. O. et al. Delayed hypersensitivity test with paracoccidioidin in captive Latin American wild mammals. **J Med Vet Mycol**, v. 33, n. 1, p. 39-42, Jan-Feb 1995.

COUTINHO, Z. F. et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad Saude Publica**, v. 18, n. 5, p. 1441-54, Sep-Oct 2002.

COWEN, L. E. The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, n. 3, p. 187-98, Mar 2008.

CUGINI, C. et al. Farnesol, a common sesquiterpene, inhibits PQS production in *Pseudomonas aeruginosa*. **Mol Microbiol**, v. 65, n. 4, p. 896-906, Aug 2007.

CHEN, H.; FINK, G. R. Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. **Genes Dev**, v. 20, n. 9, p. 1150-61, May 1 2006.

CHEN, H. et al. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 14, p. 5048-52, Apr 6 2004.

DA SILVA, M. B. et al. Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. **Microbes Infect**, v. 8, n. 1, p. 197-205, Jan 2006.

DERENGOWSKI, L. S. et al. Antimicrobial effect of farnesol, a *Candida albicans* quorum sensing molecule, on *Paracoccidioides brasiliensis* growth and morphogenesis. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v. 8, p. 13, 2009.

\_\_\_\_\_. Antimicrobial effect of farnesol, a *Candida albicans* quorum sensing molecule, on *Paracoccidioides brasiliensis* growth and morphogenesis. **Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2009.

DIONIGI, C. P.; MILLIE, D. F.; JOHNSEN, P. B. Effects of farnesol and the off-flavor derivative geosmin on *Streptomyces tendae*. **Appl Environ Microbiol**, v. 57, n. 12, p. 3429-32, Dec 1991.

DUTTA, A. et al. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. **Parasitol Int**, v. 54, n. 2, p. 119-22, Jun 2005.

EDWARDS, P. A.; ERICSSON, J. Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. **Annu Rev Biochem**, v. 68, p. 157-85, 1999.

FELIPE, M. S. et al. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. **J Biol Chem**, v. 280, n. 26, p. 24706-14, Jul 1 2005.

FELKNER, I. C.; WYSS, O. A substance produced by competent *Bacillus cereus* 569 cells that affects transformability. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 16, n. 1, p. 94-9, May 22 1964.

FERREIRA, K. S.; ALMEIDA, S. R. Immunization of susceptible mice with gp43-pulsed dendritic cells induce an increase of pulmonary *Paracoccidioidomycosis*. **Immunol Lett**, v. 103, n. 2, p. 121-6, Mar 15 2006.

FERREIRA, K. S. et al. Interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and pulmonary dendritic cells induces interleukin-10 production and toll-like receptor-2 expression: possible mechanisms of susceptibility. **J Infect Dis**, v. 196, n. 7, p. 1108-15, Oct 1 2007.

FERREIRA, K. S.; LOPES, J. D.; ALMEIDA, S. R. Down-regulation of dendritic cell activation induced by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Immunol Lett**, v. 94, n. 1-2, p. 107-14, Jun 15 2004.

- FILLER, S. G.; SHEPPARD, D. C. Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells. **PLoS Pathog**, v. 2, n. 12, p. e129, Dec 2006.
- FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **J Med Vet Mycol**, v. 25, n. 1, p. 5-18, Feb 1987.
- FRANCO, M. et al. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. **Med Mycol**, v. 38, n. 3, p. 185-91, Jun 2000.
- FREIMOSER, F. M. et al. The MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. **Appl Environ Microbiol**, v. 65, n. 8, p. 3727-9, Aug 1999.
- FUQUA, W. C.; WINANS, S. C.; GREENBERG, E. P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. **J Bacteriol**, v. 176, n. 2, p. 269-75, Jan 1994.
- GALGIANI, J. N. et al. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast**. . NCCLS documente M27-A 1997.
- GOIHMAN-YAHR, M. et al. Studies on plating efficiency and estimation of viability of suspensions of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. **Mycopathologia**, v. 71, n. 2, p. 73-83, Jul 1 1980.
- GOMEZ-FLORES, R. et al. Determination of MICs for *Mycobacterium avium*-*M. intracellulare* complex in liquid medium by a colorimetric method. **J Clin Microbiol**, v. 33, n. 7, p. 1842-6, Jul 1995.
- GONZALEZ, A. et al. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Infect Immun**, v. 68, n. 5, p. 2546-52, May 2000.
- GREEN, L. M.; READE, J. L.; WARE, C. F. Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. **J Immunol Methods**, v. 70, n. 2, p. 257-68, May 25 1984.
- GULLUCE, M. et al. In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and

callus cultures of *Satureja hortensis* L. **J Agric Food Chem**, v. 51, n. 14, p. 3958-65, Jul 2 2003.

GUPTA, A. K.; TOMAS, E. New antifungal agents. **Dermatol Clin**, v. 21, n. 3, p. 565-76, Jul 2003.

HAHN, R. C. et al. Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and in vitro resistance to ketoconazole and trimethoprim sulphamethoxazole. **Mycoses**, v. 46, n. 8, p. 342-7, Sep 2003.

HAMANN, A.; BRUST, D.; OSIEWACZ, H. D. Apoptosis pathways in fungal growth, development and ageing. **Trends Microbiol**, v. 16, n. 6, p. 276-83, Jun 2008.

HARDMAN, J. G. et al. **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics -CD-ROM**. New York: McGraw-Hill 1996.

HASTINGS, J. W.; GREENBERG, E. P. Quorum sensing: the explanation of a curious phenomenon reveals a common characteristic of bacteria. **J Bacteriol**, v. 181, n. 9, p. 2667-8, May 1999.

HAUG, J. S. et al. Directed cell killing (apoptosis) in human lymphoblastoid cells incubated in the presence of farnesol: effect of phosphatidylcholine. **Biochim Biophys Acta**, v. 1223, n. 1, p. 133-40, Aug 11 1994.

HAYTER, A. J. **Probability and Statistics for engineers and scientists**. 2. Pacific Grove, CA: Duxbury Thomson Learning, 2002.

HENSE, B. A. et al. Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing? **Nat Rev Microbiol**, v. 5, n. 3, p. 230-9, Mar 2007.

HIGA, F. et al. Simplified quantitative assay system for measuring activities of drugs against intracellular *Legionella pneumophila*. **J Clin Microbiol**, v. 36, n. 5, p. 1392-8, May 1998.

HOGAN, D. A. Talking to themselves: autoregulation and quorum sensing in fungi. **Eukaryot Cell**, v. 5, n. 4, p. 613-9, Apr 2006.

HORNBY, J. M. et al. Inoculum size effect in dimorphic fungi: extracellular control of yeast-mycelium dimorphism in *Ceratocystis ulmi*. **Appl Environ Microbiol**, v. 70, n. 3, p. 1356-9, Mar 2004.

\_\_\_\_\_. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. **Appl Environ Microbiol**, v. 67, n. 7, p. 2982-92, Jul 2001.

HUSSAIN, R. F.; NOURI, A. M.; OLIVER, R. T. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. **J Immunol Methods**, v. 160, n. 1, p. 89-96, Mar 15 1993.

INFANTE-DUARTE, C.; KAMRADT, T. Th1/Th2 balance in infection. **Springer Semin Immunopathol**, v. 21, n. 3, p. 317-38, 1999.

JABRA-RIZK, M. A. et al. Effect of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antimicrobial susceptibility. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 4, p. 1463-9, Apr 2006.

\_\_\_\_\_. Effect of farnesol on *Candida dubliniensis* biofilm formation and fluconazole resistance. **FEMS Yeast Res**, v. 6, n. 7, p. 1063-73, Nov 2006.

JIAO, H. et al. A new 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay for testing macrophage cytotoxicity to L1210 and its drug-resistant cell lines in vitro. **Cancer Immunol Immunother**, v. 35, n. 6, p. 412-6, 1992.

JOO, J. H. et al. Farnesol-induced apoptosis in human lung carcinoma cells is coupled to the endoplasmic reticulum stress response. **Cancer Res**, v. 67, n. 16, p. 7929-36, Aug 15 2007.

KASHINO, S. S. et al. Effect of macrophage blockade on the resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Mycopathologia**, v. 130, n. 3, p. 131-40, Jun 1995.

KAUFFMAN, C. A. Fungal infections. **Proc Am Thorac Soc**, v. 3, n. 1, p. 35-40, 2006.

KIRKLAND, T. N.; FIERER, J. Coccidioidomycosis: a reemerging infectious disease. **Emerg Infect Dis**, v. 2, n. 3, p. 192-9, Jul-Sep 1996.

KLEIN, B. S.; TEBBETS, B. Dimorphism and virulence in fungi. **Curr Opin Microbiol**, v. 10, n. 4, p. 314-9, Aug 2007.

KOO, H. et al. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 5, p. 1302-9, May 2002.

KUGLER, S. et al. Phenotypic variation and intracellular parasitism by *histoplasma Capsulatum*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 16, p. 8794-8, Aug 1 2000.

KUROKAWA, C. S. et al. Virulence profile of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates: association with morphologic and genetic patterns. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 47, n. 5, p. 257-62, Sep-Oct 2005.

LAMBRECHT, B. N. Alveolar macrophage in the driver's seat. **Immunity**, v. 24, n. 4, p. 366-8, Apr 2006.

LAMBRECHT, B. N.; PRINS, J. B.; HOOGSTEDEN, H. C. Lung dendritic cells and host immunity to infection. **Eur Respir J**, v. 18, n. 4, p. 692-704, Oct 2001.

LEEJA, L.; THOPPIL, J. E. Antimicrobial activity of methanol extract of *Origanum majorana* L. (Sweet marjoram). **J Environ Biol**, v. 28, n. 1, p. 145-6, Jan 2007.

LUCEY, D. R.; CLERICI, M.; SHEARER, G. M. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. **Clin Microbiol Rev**, v. 9, n. 4, p. 532-62, Oct 1996.

MACLEAN, J. A. et al. Sequestration of inhaled particulate antigens by lung phagocytes. A mechanism for the effective inhibition of pulmonary cell-mediated immunity. **Am J Pathol**, v. 148, n. 2, p. 657-66, Feb 1996.

MACORIS, S. A. et al. Virulence attenuation and phenotypic variation of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos and patients. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 3, p. 331-4, May 2006.

MACHIDA, K.; TANAKA, T. Farnesol-induced generation of reactive oxygen species dependent on mitochondrial transmembrane potential hyperpolarization mediated by F(0)F(1)-ATPase in yeast. **FEBS Lett**, v. 462, n. 1-2, p. 108-12, Nov 26 1999.

MACHIDA, K. et al. Farnesol-induced generation of reactive oxygen species via indirect inhibition of the mitochondrial electron transport chain in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **J Bacteriol**, v. 180, n. 17, p. 4460-5, Sep 1998.

\_\_\_\_\_. Farnesol-induced growth inhibition in *Saccharomyces cerevisiae* by a cell cycle mechanism. **Microbiology**, v. 145 ( Pt 2), p. 293-9, Feb 1999.

MADEO, F.; FROHLICH, E.; FROHLICH, K. U. A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. **J Cell Biol**, v. 139, n. 3, p. 729-34, Nov 3 1997.

MADEO, F. et al. Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. **J Cell Biol**, v. 145, n. 4, p. 757-67, May 17 1999.

\_\_\_\_\_. Apoptosis in yeast. **Curr Opin Microbiol**, v. 7, n. 6, p. 655-60, Dec 2004.

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

\_\_\_\_\_. Microsatellite analysis of three phylogenetic species of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 6, p. 2153-7, Jun 2006.

MCEWEN, J. G. et al. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Arch Med Res**, v. 26, n. 3, p. 305-6, Autumn 1995.

MELETIADIS, J. et al. Comparison of NCCLS and 3-(4,5-dimethyl-2-Thiazyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) methods of in vitro susceptibility testing of filamentous fungi and development of a new simplified method. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 8, p. 2949-54, Aug 2000.

MELNYKOVYCH, G.; HAUG, J. S.; GOLDNER, C. M. Growth inhibition of leukemia cell line CEM-C1 by farnesol: effects of phosphatidylcholine and diacylglycerol. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 186, n. 1, p. 543-8, Jul 15 1992.

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

\_\_\_\_\_. Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: recent advances. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 237-48, Apr-May 2008.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in bacteria. **Annu Rev Microbiol**, v. 55, p. 165-99, 2001.

MIQUEL, K. et al. Competitive inhibition of choline phosphotransferase by geranylgeraniol and farnesol inhibits phosphatidylcholine synthesis and induces apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells. **J Biol Chem**, v. 273, n. 40, p. 26179-86, Oct 2 1998.

MOLINARI-MADLUM, E. E.; FELIPE, M. S.; SOARES, C. M. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates can be correlated to groups defined by random amplified polymorphic DNA analysis. **Med Mycol**, v. 37, n. 4, p. 269-76, Aug 1999.

MOSEL, D. D. et al. Farnesol concentrations required to block germ tube formation in *Candida albicans* in the presence and absence of serum. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, n. 8, p. 4938-40, Aug 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16 1983.

MURPHY, J. W. et al. Type 1 and type 2 cytokines: from basic science to fungal infections. **Med Mycol**, v. 36 Suppl 1, p. 109-18, 1998.

NAVARATHNA, D. H. et al. Effect of farnesol on a mouse model of systemic candidiasis, determined by use of a DPP3 knockout mutant of *Candida albicans*. **Infect Immun**, v. 75, n. 4, p. 1609-18, Apr 2007.

\_\_\_\_\_. Exogenous farnesol interferes with the normal progression of cytokine expression during candidiasis in a mouse model. **Infect Immun**, v. 75, n. 8, p. 4006-11, Aug 2007.

NEALSON, K. H.; PLATT, T.; HASTINGS, J. W. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. **J Bacteriol**, v. 104, n. 1, p. 313-22, Oct 1970.

NICKERSON, K. W.; ATKIN, A. L.; HORNBY, J. M. Quorum sensing in dimorphic fungi: farnesol and beyond. **Appl Environ Microbiol**, v. 72, n. 6, p. 3805-13, Jun 2006.

ONO, M. A. et al. Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. **Med Mycol**, v. 39, n. 3, p. 277-82, Jun 2001.

OZER, H. et al. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of *Hippomarathrum microcarpum* (Bieb.) from Turkey. **J Agric Food Chem**, v. 55, n. 3, p. 937-42, Feb 7 2007.

RAJAGANAPATHI, J.; RAJAGOPAL, K.; EDWARD, J. K. Antifungal and cytotoxic effects of methanol extracts of three marine molluscs. **Indian J Exp Biol**, v. 39, n. 1, p. 85-6, Jan 2001.

RAMAGE, G. et al. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, n. 11, p. 5459-63, Nov 2002.

RAMSDALE, M. Programmed cell death in pathogenic fungi. **Biochim Biophys Acta**, v. 1783, n. 7, p. 1369-80, Jul 2008.

RAPPLEYE, C. A.; GOLDMAN, W. E. Defining virulence genes in the dimorphic fungi. **Annu Rev Microbiol**, v. 60, p. 281-303, 2006.

REDFIELD, R. J. Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? **Trends Microbiol**, v. 10, n. 8, p. 365-70, Aug 2002.

RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G.; CASTANEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med Mycol**, v. 39, n. 3, p. 233-41, Jun 2001.

RIDLEY, M. Evolution. Disponível em: <  
<http://www.blackwellpublishing.com/ridley/>>. Acesso em: 21/04/2009.

RIOJA, A. et al. Preferential induction of apoptosis of leukaemic cells by farnesol. **FEBS Lett**, v. 467, n. 2-3, p. 291-5, Feb 11 2000.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 1, p. 1-23, Jan 2004.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**. 3. New York: Cold Spring Harbor, 2001.

SAN-BLAS, F.; COVA, L. J. Growth curves of the yeast-like form of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Sabouraudia**, v. 13 Pt 1, p. 22-9, Mar 1975.

SAN-BLAS, G. Paracoccidioides brasiliensis: cell wall glucans, pathogenicity, and dimorphism. **Curr Top Med Mycol**, v. 1, p. 235-57, 1985.

\_\_\_\_\_. Biochemical and physiological aspects in the dimorphism of Paracoccidioides brasiliensis. **Arch Med Res**, v. 24, n. 3, p. 267-8, Autumn 1993.

SAN-BLAS, G.; NINO-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. Paracoccidioides brasiliensis and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med Mycol**, v. 40, n. 3, p. 225-42, Jun 2002.

SAVOLDI, M. et al. Farnesol induces the transcriptional accumulation of the Aspergillus nidulans Apoptosis-Inducing Factor (AIF)-like mitochondrial oxidoreductase. **Mol Microbiol**, v. 70, n. 1, p. 44-59, Oct 2008.

SEMIGHINI, C. P. et al. Farnesol-induced apoptosis in Aspergillus nidulans reveals a possible mechanism for antagonistic interactions between fungi. **Mol Microbiol**, v. 59, n. 3, p. 753-64, Feb 2006.

SEMIGHINI, C. P.; MURRAY, N.; HARRIS, S. D. Inhibition of Fusarium graminearum growth and development by farnesol. **FEMS Microbiol Lett**, v. 279, n. 2, p. 259-64, Feb 2008.

SHEA, J. M.; DEL POETA, M. Lipid signaling in pathogenic fungi. **Curr Opin Microbiol**, v. 9, n. 4, p. 352-8, Aug 2006.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. Pharmacological management of paracoccidioidomycosis. **Expert Opinion Pharmacotherapy**, v. 6, n. 3, 2005.

SINGER-VERMES, L. M. et al. Pathogenicity and immunogenicity of Paracoccidioides brasiliensis isolates in the human disease and in an experimental murine model. **Clin Exp Immunol**, v. 97, n. 1, p. 113-9, Jul 1994.

SPADARI, K.; LOPES, J. D.; ROGÉRIO, S. Down-regulation of dendritic cell activation induced by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Immunology Letters**, v. 94, p. 107-114, 2004.

SPADARI, K. et al. Interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and Pulmonary Dendritic Cells Induces Interleukin-10 Production and Toll-Like Receptor-2 Expression: Possible Mechanisms of Susceptibility. . **Journal of Infectious Disease**, v. 196, p. 1108-1115, 2007.

SPRAGUE, G. F., JR.; WINANS, S. C. Eukaryotes learn how to count: quorum sensing by yeast. **Genes Dev**, v. 20, n. 9, p. 1045-9, May 1 2006.

STENTELAIREA, C. et al. Development of a rapid and highly sensitive biochemical method for the measurement of fungal spore viability. An alternative to the CFU method. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, n. 8-9, p. 560-566, 2001.

TAYLOR, M. M. et al. Enhanced apoptosis through farnesol inhibition of phospholipase D signal transduction. **FEBS J**, v. 272, n. 19, p. 5056-63, Oct 2005.

TEIXEIRA, M. M. et al. Phylogenetic analysis demonstrates a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Molecular phylogenetics and evolution**, 2009.

TERCARIOLI, G. R. et al. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. **BMC Microbiol**, v. 7, p. 92, 2007.

TOKE, D. A. et al. Isolation and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* DPP1 gene encoding diacylglycerol pyrophosphate phosphatase. **J Biol Chem**, v. 273, n. 6, p. 3278-84, Feb 6 1998.

\_\_\_\_\_. Isolation and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* LPP1 gene encoding a Mg<sup>2+</sup>-independent phosphatidate phosphatase. **J Biol Chem**, v. 273, n. 23, p. 14331-8, Jun 5 1998.

TOMASZ, A.; HOTCHKISS, R. D. Regulation of the Transformability of Pneumococcal Cultures by Macromolecular Cell Products. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 51, p. 480-7, Mar 1964.

VISTICA, D. T. et al. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. **Cancer Res**, v. 51, n. 10, p. 2515-20, May 15 1991.

VOZIYAN, P. A.; HAUG, J. S.; MELNYKOVYCH, G. Mechanism of farnesol cytotoxicity: further evidence for the role of PKC-dependent signal

transduction in farnesol-induced apoptotic cell death. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 212, n. 2, p. 479-86, Jul 17 1995.

VUKOVIC, N. et al. Antimicrobial Activities of Essential Oil and Methanol Extract of *Teucrium montanum*. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 4, n. Suppl 1, p. 17-20, Sep 2007.

WAN, H.; DUPASQUIER, M. Dendritic cells in vivo and in vitro. **Cell Mol Immunol**, v. 2, n. 1, p. 28-35, Feb 2005.

WESTWATER, C.; BALISH, E.; SCHOFIELD, D. A. *Candida albicans*-conditioned medium protects yeast cells from oxidative stress: a possible link between quorum sensing and oxidative stress resistance. **Eukaryot Cell**, v. 4, n. 10, p. 1654-61, Oct 2005.

WISEMAN, D. A.; WERNER, S. R.; CROWELL, P. L. Cell cycle arrest by the isoprenoids perillyl alcohol, geraniol, and farnesol is mediated by p21(Cip1) and p27(Kip1) in human pancreatic adenocarcinoma cells. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 320, n. 3, p. 1163-70, Mar 2007.

ZEIDBERG, L. D. et al. Isolation of *histoplasma capsulatum* from soil. **Am J Public Health Nations Health**, v. 42, n. 8, p. 930-5, Aug 1952.

ZHANG, P. et al. Evolutionary implications for interactions between multiple strains of host and parasite. **J Theor Biol**, v. 248, n. 2, p. 225-40, Sep 21 2007.

ZHANG, X. et al. Application of a MTT assay for screening nutritional factors in growth media of primary sponge cell culture. **Biotechnol Prog**, v. 20, n. 1, p. 151-5, Jan-Feb 2004.