



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Pós-graduação em Patologia Molecular

Efeito de Drogas Moduladoras da
estrutura da cromatina sobre a
interação entre Macrófagos Murinos
e *Paracoccidioides brasiliensis*

Luana de Castro Oliveira

Brasília, dezembro de 2012

Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Pós-graduação em Patologia Molecular

Efeito de Drogas Moduladoras da
estrutura da cromatina sobre a
interação entre Macrófagos Murinos
e *Paracoccidioides brasiliensis*

Luana de Castro Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Márcio José Poças Fonseca

Co-orientadora: Dra. Lorena Derengowski

Brasília, dezembro de 2012

Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Pós-graduação em Patologia Molecular

Efeito de Drogas Moduladoras da estrutura
da cromatina sobre a interação entre
Macrófagos Murinos e *Paracoccidioides*
brasiliensis

Luana de Castro Oliveira

Dissertação de mestrado apresentada
ao programa de pós graduação em
Patologia Molecular, da Faculdade de
Medicina da Universidade de Brasília,
para obtenção do título de mestre em
patologia molecular.

Brasília, dezembro de 2012

Orientador: Prof. Dr. Márcio José Poças Fonseca

Co-orientadora: Dra. Lorena Derengowski

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Patrícia Albuquerque, Universidade de Brasília;

Prof. Dr. Aldo Henrique Pacheco Tavares, Universidade de Brasília;

Dr. Thiago Machado Mello de Sousa, Universidade de Brasília
(suplente).

"Não, filho, caminhando a carroça, acomodam-se as abóboras."
José H. Prado Flores

AGRADECIMENTOS

A Deus, que é força e vida em minha vida, que escreve minha história na palma de Sua mão todos os dias e traz luz ao meu caminho, ajudando a firmar cada passo que dou com a certeza de que tudo está sob o Seu olhar. Sem Ele nada eu seria, e nada alcançaria.

À minha mãe, amor, força, apoio, lágrimas, sorrisos e carinho. Que desde o ventre me amou incondicionalmente; que me ajuda a perdoar. Ao meu pai, amor, carinho, lágrimas e sorrisos; que me ajuda a compreender e perdoar. Ao meu irmão, pela paciência e principalmente pelo grande presente que me deu há 8 meses, o pequeno Benjamim que, mesmo sem saber quem é ou quem sou, renovou de forma incalculável meu sorriso, meu amor e minha esperança na vida. A esse pequeno também sou felizmente grata.

Ao Saulo, pelo amor que me dedica, todo dia, mais e maior, com o qual me ensina que juntos podemos potencialmente mais. És um dos maiores incentivos que tenho, sem você não teria chegado até aqui. Parte da luz de amor Divina em minha vida com certeza se reflete em você. Deixo aqui também um agradecimento especial à Cléia e à Dona Ângela, por todo o carinho recebido, por todos os domingos maravilhosos de descanso e companhia.

Aos amigos de ontem e hoje. Grazieli e Ellen, por me fazerem perceber a força da amizade ao longo do tempo. Carol Sá e Daiana, pela irmandade e por um amor que é puro presente de Deus. Padre Paulinho, pela paternidade, pela amizade e por tanto amor que nem sei merecer. Déborah, Celiane, Mariana, Juliana, Natália, Antônio Leonardo, Laura, Pedro e Daniella, pelos momentos de alegria, que não se acabam e não se contam. Carol Fagundes e Tatiane, pela amizade renovada e a força na jornada. Stephanie, pelo companheirismo, sempre. Anderson e Aninha, meus amigos de fé hoje e sempre. Thiago, Alessandra, Luísa, Arthur, Manoj, Tamísia, Egídio, André, Kim, Lívia, Ana Maria, Thaiene, Juliana, Luiz, Cristina, Glênia, Ingrid, Jéssica, Rodrigo, Vinícius e todos os incontáveis dançarinos que trouxeram música, ritmo, alegria e amor aos meus dias e noites. Eu amo todos vocês.

Ao Márcio, pela orientação, oportunidade concedida, paciência e compreensão. Por me fazer perceber o grande potencial que tenho. Pelo grande aprendizado e amadurecimento que me proporcionou ao longo desses dois anos.

Aos companheiros de laboratório. Thaís Amanda, mais que companheira, sempre presença, disposição e simpatia; espero ter contribuído em tua vida o mesmo que acrescentastes à minha. Calliandra, grande professora, amiga, pesquisadora e companheira, de onde partiu muito do meu conhecimento técnico no laboratório, quem muito me ensinou não

só sobre ciência. Lorena, grande professora e orientadora, que muito contribuiu com suas dicas, *insights* e experiência, sem a qual eu teria dado voltas desnecessárias, ajudando-me a superar meus medos e fraquezas (talvez ela nem saiba disso), acreditando no meu potencial. Grande Raphael Bonadio, sem as almas murinas que você levou embora encrencada eu estaria, obrigada pela presteza sempre bem-humorada. Bárbara e Natália B., grandes companheiras de lanches e almoços, vocês alegraram muito todos os meus dias. Fernanda, Fabiana, Natália V., Ricardo, Samia, Daniel, Robson, Tatiane, Carol, Paty, Érika, Gabriel, Galina, Marciano e Thiago, companheiros de laboratório que muito contribuíram para o meu amadurecimento e conhecimento – técnico e científico-, sem os quais eu não teria chegado até aqui. Ana Camila e Pedro, pela amizade e incentivo. Torço por todos!

À professora Ildinete, pela oportunidade, credibilidade e aprendizado. Aos professores da Biomol, Lídia, Andrea e Marcelo, pela grande contribuição no meu aprendizado.

Aos técnicos, Dona Fátima, Dona Ivonildes e Thompson, sempre uma grande ajuda em meio à correria dos experimentos.

A todos do laboratório de Biologia Molecular, por todo o incentivo e ajuda que sempre recebi com muita prontidão. Os meus mais sinceros desejos de sucesso a todos.

A todos os amigos que, próximos ou distantes, são a família que Deus me permitiu escolher, amparo, carinho e alegria, transmitindo força em minha vida.

À Universidade de Brasília e aos funcionários que a compõem, por proporcionar a oportunidade de acesso à educação e à cultura.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À sociedade brasileira.

RESUMO

O fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), micose sistêmica humana mais comum na América Latina. O local de contato inicial entre o fungo *P. brasiliensis* e o hospedeiro é o epitélio respiratório. A resistência do hospedeiro à PCM está associada à ativação de células fagocíticas ao longo da infecção. Os antifúngicos atualmente utilizados no combate à PCM apresentam desvantagens como a alta incidência de efeitos colaterais e o aumento de casos de resistência. A epigenética refere-se a modificações nos padrões de expressão gênica herdáveis ao longo de sucessivas divisões celulares ou de sucessivas gerações de um indivíduo, e que não envolvem mudanças na sequência de nucleotídeos do DNA. As principais marcas epigenéticas envolvem a metilação de citosinas em ilhas CpG no DNA e as modificações pós-traducionais de histonas. Drogas como a 5-aza-2'-deoxi-citidina (5-AZA, inibidor de DNA metiltransferases), tricostatina A (TSA) e butirato de sódio (BS, inibidores de histona desacetilases) vêm sendo empregadas para modular estados epigenéticos. Em fungos patogênicos como *C. albicans* e *C. neoformans*, a administração de moduladores epigenéticos levou a uma diminuição no crescimento e viabilidade das leveduras. No presente estudo, avaliamos os efeitos biológicos de 5-AZA, TSA e BS sobre leveduras de *P. brasiliensis* e sobre uma linhagem de macrófagos murinos. As mais altas concentrações de drogas que não interferiram no crescimento celular foram definidas como BS 1 mM, TSA 20 nM e 5-AZA 1 µM, para macrófagos J774, e BS 10 mM, TSA 1,5 µM e 5-AZA 2 µM para leveduras de *P. brasiliensis*. 5-AZA provocou um aumento do índice de internalização das leveduras pelas células J774 com 2h e 6h de infecção, enquanto BS provocou aumento em 2h e TSA não afetou esse índice. A análise do acúmulo de mensageiros de genes relacionados à resposta imune revelou uma diminuição dos níveis de transcritos de *MyD88* em macrófagos tratados com BS, ao passo que 5-AZA elevou os níveis de transcritos desse adaptador. O acúmulo de transcritos *NF-κB* diminuiu quando os macrófagos foram infectados e tratados com 5-AZA e BS, enquanto TSA não teve efeito. O mensageiro de *TNF-α*, em macrófagos infectados tratados com 5-AZA, também teve aumento significativo de acúmulo, o que não aconteceu no tratamento com TSA ou BS. Os níveis do transcrito de *IL-6* foram afetados apenas pela administração de TSA, que elevou o acúmulo dos mensageiros dessa interleucina. Nas culturas infectadas e tratadas com TSA observou-se uma diminuição do nível de *TNF-α* secretado, enquanto o tratamento com BS provocou um aumento dessa citocina no sobrenadante. Nossos dados indicam que alterações epigenéticas

possam participar da regulação da resposta de fagócitos quando em contato com células fúngicas, e que mais de uma via de sinalização pode estar relacionada a essa resposta.

ABSTRACT

The dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* is the etiologic agent of Paracoccidioidomycosis (PCM), the most prevalent deep mycosis in Latin America. The first contact between the fungus and the host is the respiratory epithelium. The host resistance to PCM is related to the activation of phagocytic cells during the course of the infection. The antifungals used against PCM show many disadvantages, as high incidence of side effects and increasing fungal resistance. The term epigenetic refers to modifications in the genetic expression patterns, heritable through cell divisions or individuals generations, which do not implicate in changes in the sequence of nucleotides of the DNA. The main epigenetic marks are the cytosine methylation in DNA CpG islands and histones post-translational modifications. Drugs such as 5-aza-2'-deoxy-cytidine (5-AZA, methyltransferase inhibitor), trichostatin A (TSA) and sodium butyrate (SB, histone desacetylase inhibitors) have been used to modulate epigenetic states. In pathogenic fungi such as *C. albicans* and *C. neoformans*, the use of epigenetic modulators led to a lower growth rate and yeasts viability. In the present work we evaluated the biological effects of 5-AZA, TSA and SB on *P. brasiliensis* yeast cells and on a lineage of murine macrophages. The highest drug concentrations that did not affect cell growth were SB 1 mM, TSA 20 nM and 5-AZA 1 μ M, to the macrophages, and SB 10 mM, TSA 1,5 μ M and 5-AZA 2 μ M, to *P. brasiliensis* yeast cells. 5-AZA induced a higher internalization yeasts index by the macrophages within 2h and 4h of infection, while SB had the same effect with 2h of infection and TSA did not affect this index. The transcripts accumulation analysis of genes related to the immune response showed a down modulation of the *MyD88* transcript levels in macrophages treated with SB, whilst 5-AZA up regulated the transcript levels of this gene. The *NF- κ B* transcript level was lower when macrophages were infected and treated with 5-AZA and SB, while TSA did not show any effect. *TNF- α* transcripts accumulation was also upregulated in macrophages infected and treated with 5-AZA, what was not observed with TSA or SB. *IL-6* transcripts level was only affected by the TSA administration, which upregulated it. In cultures infected and treated with TSA, there was a lower level of secreted *TNF- α* , while SB had the opposite effect, increasing this cytokine in the supernatant. Our data indicate that epigenetic modifications can participate in the regulation of the phagocytes response to fungal cells and that alternative signaling pathway can be related to this answer.

ÍNDICE

Lista de Siglas e abreviaturas	xiv
Lista de figuras	xvi
Lista de Tabelas	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O fungo <i>P. brasiliensis</i>	1
1.2. Paracoccidioidomicose (PCM)	3
1.2.1. <i>Imunologia e patogênese</i>	3
1.2.2. <i>Tratamento da PCM</i>	6
1.3. A Herança Epigenética e Fungos Patogênicos	8
1.3.1. <i>A Herança Epigenética</i>	8
1.3.2. <i>Regulação epigenética em fungos patogênicos</i>	10
1.4. Drogas Moduladoras de Estados Epigenéticos	12
1.4.1. <i>Inibidores de histona desacetilases (iHDAC)</i>	12
1.4.1.1. <i>Butirato de Sódio (BS)</i>	13
1.4.1.2. <i>Tricostatina A (TSA)</i>	14
1.4.2. <i>Inibidores da metilação do DNA</i>	14
1.5. Mensageiros da resposta imune inata	15
1.5.1. <i>Fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88)</i>	16
1.5.2. <i>Fator Nuclear kappa B (NF-κB)</i>	18
1.5.3. <i>Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF-α)</i>	18
1.5.4. <i>Interleucina 6 (IL-6)</i>	19
2. JUSTIFICATIVA	21
3. OBJETIVOS	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1. Manutenção e propagação das células	23
4.1.1. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	23
4.1.2. <i>Cultura de células ATCC J774</i>	23
4.2. Soluções	24
4.3. Determinação das concentrações dos moduladores epigenéticos a serem administradas às células	25

4.3.1. Avaliação da viabilidade do isolado Pb18 de <i>P. brasiliensis</i> em presença das drogas moduladoras	25
4.3.2. Avaliação da viabilidade dos macrófagos murinos J774 em presença dos moduladores epigenéticos	26
4.4. Determinação do índice de internalização/aderência das leveduras de <i>P. brasiliensis</i> pelos macrófagos J774	27
4.5. Avaliação do efeito dos moduladores epigenéticos sobre o acúmulo de transcritos de genes murinos relacionados à resposta imune	28
4.5.1. Desenho de oligonucleotídeos para genes murinos relacionados à resposta imune	28
4.5.2. Infecção <i>in vitro</i> dos macrófagos J774 por leveduras de <i>P. brasiliensis</i> e extração do RNA total dos macrófagos	29
4.5.3. Extração do RNA total dos macrófagos J774	29
4.5.4. Tratamento do RNA total com DNase I livre de RNases	30
4.5.5. Síntese dos cDNAs	30
4.5.6. PCR quantitativo em tempo real	31
4.5.6.1. Análise do acúmulo de transcritos de genes murinos relacionados à resposta imune	31
4.6. Dosagem de citocinas no sobrenadante de culturas de macrófagos	32
4.7. Análise Estatística dos Resultados	33
4.7.1. Avaliação da viabilidade do isolado Pb18 de <i>P. brasiliensis</i> e dos macrófagos murinos J774 em presença de moduladores epigenéticos	33
4.7.2. Análise do acúmulo de transcritos de genes murinos relacionados à resposta imune	33
4.7.3. Análise da dosagem de citocinas no sobrenadante	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1. Efeito das drogas moduladoras de estados epigenéticos sobre o crescimento e viabilidade de <i>P. brasiliensis</i> e de macrófagos peritoneais murinos da linhagem ATCC J774	35
5.1.1. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	35

5.1.2. <i>Macrófagos peritoneais murinos da linhagem ATCC J774</i>	35
5.2. Efeito das drogas moduladoras de estados epigenéticos sobre a internalização de <i>P. brasiliensis</i> por macrófagos J774	39
5.2.1. <i>Análise do efeito dos moduladores epigenéticos sobre o índice de internalização de leveduras de <i>P. brasiliensis</i> por células J774</i>	39
5.2.2. <i>Análise do efeito dos moduladores epigenéticos sobre a morfologia de macrófagos J774 infectados por leveduras de <i>P. brasiliensis</i></i>	40
5.3. Análise da ação de moduladores epigenéticos sobre o acúmulo de transcritos de mensageiros da resposta imune inata do hospedeiro	45
5.3.1. <i>Análise do efeito dos moduladores epigenéticos sobre o acúmulo dos mensageiros de MyD88 em células J774 infectadas por <i>P. brasiliensis</i></i>	46
5.3.2. <i>Análise do efeito dos moduladores epigenéticos sobre o acúmulo dos mensageiros de NF-κB nas células J774 infectadas por <i>P. brasiliensis</i></i>	48
5.3.3. <i>Análise do efeito dos moduladores epigenéticos sobre o acúmulo dos mensageiros de TNF-α nas células J774 infectadas por <i>P. brasiliensis</i></i>	50
5.3.4. <i>Análise do efeito dos moduladores epigenéticos sobre o acúmulo dos mensageiros de IL-6 nas células J774 infectadas por <i>P. brasiliensis</i></i>	52
5.4. Análise dos efeitos das drogas moduladoras de estados epigenéticos sobre a secreção de TNF-α no sobrenadante das culturas	54
6. CONCLUSÕES	56
7. PERSPECTIVAS	57
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-AZA	5-aza-2'-deoxi-citidina
ANOVA	Análise de Variância
BS	Butirato de sódio
°C	Graus Celsius
cDNA	Sequencia de DNA complementar
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Desoxirribonuclease
DNMT	DNA metiltransferase
dNTP	Desoxirribonucleotideo
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
IgG	Imunoglobulina G
IL-6	Interleucina 6
IFN- γ	Interferon gamma
iDNMT	Inibidor de DNA metiltransferase
iHDAC	Inibidor de histona desacetilase
g	Gramas
h	Hora
HAT	Histona acetilase
HDAC	Histona acetiltransferase
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
M \emptyset	Macrofago
mRNA	RNA mensageiro

MTT	Brometo 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium
MyD88	Proteína adaptadora mielóide 88
NF-κB	Fator nuclear kappa B
OD	Densidade ótica ou absorbância
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PRR	Receptor de reconhecimento padrão
PBS	Tampão de fosfato
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PCM	Paracoccidioidomicose
PCR	Reacao em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogenionico
RNA	Acido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
RT-PCR	Amplificacao por PCR de um produto de transcricao reversa (cDNA)
SFB	Soro fetal Bovino
Tm	Temperatura de fusão
TLR	Receptor <i>Toll-like</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TSA	Tricostatina A
U	Unidade enzimatica
V	Volume
v/v	volume/volume
XTT	Sal 2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide
YPD	Yeast Peptone Dextrose (meio YPD)
μg	micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
%	Por cento

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Resumo da classificação clínica da PCM em humanos (adaptado de Bernard, 2008).	05
Figura 02. Estrutura química dos inibidores de histona desacetilases (Mai e Altucci, 2009).	13
Figura 03. Inibidores da DNA metiltransferase (Mai e Altucci, 2009).	15
Figura 04. Sinalização através de TLR, por vias independente (direita) e dependente (esquerda) de MyD88, responsáveis pela ativação de NF- κ B e pela indução de citocinas pró-inflamatórias (revisto por Mogensen, 2009).	18
Figura 05. Efeito de drogas moduladoras de estados epigenéticos sobre o crescimento e viabilidade de <i>P. brasiliensis</i> .	36
Figura 06. Efeito de drogas moduladoras de estados epigenéticos sobre o crescimento e viabilidade de macrófagos peritoneais murinos da linhagem ATCC J774.	37
Figura 07. Efeito de drogas moduladoras de estados epigenéticos sobre a morfologia de macrófagos peritoneais murinos da linhagem ATCC J774.	38
Figura 08. Efeito de drogas moduladoras de estados epigenéticos sobre a internalização de <i>P. brasiliensis</i> pelas células J774.	40
Figura 9.1. Morfologia de macrófagos peritoneais murinos da linhagem ATCC J774 infectados por <i>P. brasiliensis</i> .	41
Figura 9.2. Efeito de 5-AZA sobre a morfologia de macrófagos peritoneais murinos da linhagem ATCC J774 infectados por <i>P. brasiliensis</i> .	42
Figura 9.3. Efeito de BS sobre a morfologia de macrófagos peritoneais murinos da linhagem ATCC J774 infectados por <i>P. brasiliensis</i> .	43
Figura 9.4. Efeito da TSA sobre a morfologia de macrófagos peritoneais murinos da linhagem ATCC J774 infectados por <i>P. brasiliensis</i> .	44
Figura 10. Perfil eletroforético do RNA total extraído de macrófagos infectados ou não por 24h com o isolado Pb18 de <i>P. brasiliensis</i> , em cultivos contendo moduladores epigenéticos, tratados com DNase I livre de RNases.	46
Figura 11. Acúmulo dos mensageiros de MyD88 em células J774 quando infectadas por <i>P. brasiliensis</i> e tratadas com moduladores epigenéticos durante 24h.	47

Figura 12. Acúmulo dos mensageiros de NF- κ B em células J774 infectadas por <i>P. brasiliensis</i> e tratadas com moduladores epigenéticos durante 24h.	49
Figura 13. Acúmulo dos mensageiros de TNF- α em células J774 infectadas por <i>P. brasiliensis</i> e tratadas com moduladores epigenéticos durante 24h.	51
Figura 14. Acúmulo dos mensageiros de IL-6 em células J774 infectadas por <i>P. brasiliensis</i> e tratadas com moduladores epigenéticos durante 24h.	53
Figura 15. Dosagem de TNF- α no sobrenadante das culturas de células J774 infectadas por <i>P. brasiliensis</i> e tratadas com moduladores epigenéticos durante 24h.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Dados gerais dos oligonucleotídeos sintetizados	28
Tabela 02. Grupos experimentais de macrófagos infectados por <i>P. brasiliensis</i> e tratados com drogas moduladoras dos estados epigenéticos	45

1 INTRODUÇÃO

Infecções fúngicas invasivas constituem uma importante causa de morbidade e mortalidade principalmente em indivíduos imunodeprimidos, visto que o número destes na população tem crescido com o aumento da prevalência de câncer, quimioterapia, transplantes de órgãos e doenças autoimunes (Romani 2004; Katragkou e Roilides, 2011; Harrison e Armstrong-James, 2012;). Além disso, tem-se sugerido que o aquecimento global levará novas doenças fúngicas em mamíferos (Garcia-Solache e Casadevall, 2010). Apesar da existência de terapias antifúngicas altamente ativas, tem sido observado que a resposta do hospedeiro é limitada, a menos que o sistema imune seja reconstituído (Harrison e Armstrong-Jame, 2012). Além disso, o desenvolvimento da resistência pelos microrganismos somado a tratamentos por longos períodos de tempo, passíveis de efeitos colaterais, corroboram a necessidade de novas abordagens terapêuticas para essas infecções (Carrillo-Munoz *et al.*, 2006; Harrison e Armstrong-James, 2012).

Os fungos dimórficos, especialmente os ascomicetos como *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Penicillium marneffeii*, *Sporothrix schenckii* e *Coccidioides immitis* representam uma classe importante de patógenos, sendo o *P. brasiliensis* o mais prevalente na América Latina (Restrepo, 1985; Rappleye e Goldman, 2006; Romani 2011).

1.1 O fungo *P. brasiliensis*

O fungo dimórfico *P. brasiliensis* é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), a micose sistêmica humana mais comum na América Latina (Franco, 1987; Brummer, Castaneda e Restrepo, 1993; Mcewen *et al.*, 1995; Restrepo, Mcewen e Castaneda, 2001). Cerca de 10 milhões de pessoas podem estar infectadas e aproximadamente 2 % destas desenvolvem a doença (Restrepo, Mcewen e Castaneda, 2001). No Brasil, entre 1996 e 2006, a PCM foi a primeira causa de morte devido a micoses sistêmicas em pacientes imunocomprometidos e, em geral, fica em décimo como causa de morte entre doenças parasito-infecciosas (Prado, Silva e Laurenti, 2009; Marques, 2012;). Ajello e Polonelli (1985) foram os primeiros a relatar a PCM em áreas não endêmicas. Desde então, relatos de

casos clínicos nos Estados Unidos, Europa e Japão têm sido mais comuns (Ajello e Polonelli, 1985; Kamei, Sano e Kikuchi, 2003; Buitrago, Bernal-Martines e Castelli, 2011).

O fungo *P. brasiliensis* é um fungo termodimórfico encontrado como micélio a 25°C e levedura a 37°C (revisto por San-Blas, 1993). A fase micelial, forma infectante, produz colônias com crescimento lento (de três a quatro semanas), apresentando ao microscópio hifas septadas pequenas (Marques, 1998). A forma leveduriforme está presente geralmente no exsudato de hospedeiros, como cães, tatus e pacientes; e apresenta estruturas ovóides que se reproduzem por geminação (de Almeida, 2005; Bagagli *et al.*, 2006; Bagagli *et al.*, 2008). Essa transição morfológica é determinada pela temperatura ambiente e correlacionada à invasão do hospedeiro (revisto Felipe *et al.*, 2005). Esporadicamente esse fungo tem sido isolado do solo, das fezes de morcegos, de pinguins e de rações caninas (revisto po Franco *et al.*, 2000; Bagagli, 2008). Apesar disso, esses achados não se repetem, além do fato de que a doença tem um prolongado período de latência e ausência de surtos, o que resulta na dificuldade em traçar um microambiente definido para o fungo (Brummer *et al.*, 1993; Franco *et al.*, 2000; Bagagli, 2008). Estudos demonstram que o *P. brasiliensis* apresenta um crescimento micelial favorável em solos argilosos ou arenosos com alta humidade, ausência de alumínio iônico e bases fracas (Tercarioli *et al.*, 2007). A dificuldade em isolar a forma saprofítica do fungo combinada à baixa produção de conídios infecciosos em condições laboratoriais e aos achados sobre a interação parasito-hospedeiro (longo período de latência, indução de infecções crônicas, recidiva em pacientes tratados) levaram alguns autores a propor um possível ciclo de vida associado ao hospedeiro (Bagagli *et al.*, 2006).

Apesar da observação de variabilidade morfológica e com respeito a virulência significativa nos isolados de *P. brasiliensis*, este foi por muito tempo considerado uma espécie única, conclusão baseada principalmente em aspectos microscópicos característicos (Bagagli, 2008). Achados recentes sobre a diversidade molecular desse fungo têm trazido à tona a discussão sobre seus diferentes fenótipos de crescimento, a formação de colônias miceliais, sua transição micélio-levedura, sua microscopia leveduriforme, a virulência, a tolerância térmica e suas manifestações clínicas (Mendes, 1994; Macoris *et al.*, 2006; Bagagli, 2008). Matute *et al.* (2006) determinaram três espécies crípticas de *P. brasiliensis*, das quais duas são espécies filogenéticas (PS2, composta de isolados brasileiros e venezuelanos; PS3, restritos à Colômbia) e uma espécie parafilética (S1, que tem habitat mais amplo ao longo das áreas endêmicas). Também foi observado que S1 e PS2 são espécies recombinantes sexuais, que apesar disso são reprodutivamente isoladas entre si, e que PS3 é uma espécie clonal

(Matute *et al.*, 2006). Estudos posteriores mostram dois isolados, Pb01 e IFM54648, que não se encaixam em nenhum dos três grupos anteriormente determinados, sendo deles filogeneticamente distintos (Carrero *et al.*, 2008). Estudos mais recentes propõem uma nova descrição do isolado Pb01 como uma nova espécie do gênero *Paracoccidioides*, baseados em marcadores filogenéticos nucleares e mitocondriais, em características morfológicas exclusivas e num possível longo período de isolamento genético (Teixeira *et al.*, 2009; Salgado-Salazar *et al.*, 2010). Tamanha é a diferença entre Pb01 e as espécies anteriormente descritas por Matute *et al.* (2006) que Teixeira *et al.* (2009) e Salgado-Salazar *et al.* (2010) sugerem a descrição formal dessa nova espécie a ser denominada como *Paracoccidioides lutzii*, em homenagem ao micologista brasileiro Adolpho Lutz, primeiro a descrever o fungo *P. brasiliensis* em 1908 (Teixeira *et al.*, 2009; Salgado-Salazar *et al.*, 2010).

1.2. Paracoccidioidomicose (PCM)

1.2.1. Imunologia e patogênese

A patogênese da PCM não está ainda precisamente definida, principalmente devido à falta de conhecimento sobre o habitat e sobre o ciclo de vida de seu agente etiológico (Brummer *et al.*, 1993; Restrepo *et al.*, 2001). Baseado, entretanto, em experimentos com animais e dados clínicos, acredita-se que a infecção ocorra pela inalação de conídios ou de fragmentos de micélio da fase saprofítica do fungo, que atingem primeiramente o sistema respiratório do hospedeiro (Brummer, *et al.*, 1993; Mcewen e Castaneda, 2001). Ao alcançar os bronquíolos terminais e os alvéolos pulmonares, os conídios e/ou fragmentos de hifa inalados se transformam em células leveduriformes, que produzem a infecção capaz de se disseminar para os demais tecidos (revisto por Restrepo, 1985; Mendes-Giannini *et al.*, 2008; Fortes *et al.*, 2011). Estudos clínicos sugerem que a susceptibilidade ao fungo é dependente de vários fatores do hospedeiro, como a resposta imunológica associada ao perfil genético, o estado nutricional e o perfil hormonal (Calich *et al.*, 1985; Borges-Walmsley *et al.*, 2002; Huffnagle e Deepe, 2003; Romani, 2004; Franco *et al.*, 2006; Bernard, 2008; Calich *et al.*, 2008; Marques, 2012). Dentre outros fatores relacionados ao patógeno, o sucesso do parasitismo associado à virulência, à carga fúngica e ao fenótipo da célula fúngica são importantes (Ferreira *et al.*, 2004; Romani, 2011). A adesão dos fragmentos infectantes de *P.*

brasiliensis durante a infecção das células hospedeiras é o primeiro passo crucial para a subsequente invasão, colonização e crescimento, quando vários fenótipos podem se desenvolver (Mendes-Giannini *et al.*, 2000; Borges-Walmsley *et al.*, 2002; Mendes-Giannini *et al.*, 2005, Gonzalez *et al.*, 2005; Mendes-Giannini *et al.*, 2008). Em seguida, a internalização das leveduras de *P. brasiliensis* pelas células endoteliais do hospedeiro pode representar um mecanismo pelo qual as formas leveduriformes acessam a corrente sanguínea e espalham-se por outros tecidos (Mendes-Giannini *et al.*, 2004; Mendes-Giannini *et al.*, 2008).

Durante a infecção humana por *P. brasiliensis*, as primeiras células a encontrarem o fungo são possivelmente os macrófagos alveolares, as células dentríticas e as células epiteliais alveolares que, apesar de funcionarem como uma barreira física passiva à infecção, podem contribuir ativamente com a resposta imune por meio de eventos de sinalização (Mendes-Giannini *et al.*, 2008). Além disso, as células epiteliais e endoteliais podem funcionar como um reservatório do fungo, que evade assim de macrófagos diferenciados, evento que pode colaborar na disseminação do patógeno (Mendes-Giannini *et al.*, 2005; Filler e Sheppard, 2006; Mendes-Giannini *et al.*, 2008). A aderência a essas células varia de acordo com a espécie filogenética do fungo e está correlacionada à sua virulência: espécies mais virulentas em animais exibem maior adesão *in vitro* (Hahn *et al.*, 2003).

O sistema imune inato pulmonar é bem desenvolvido e composto por um lado de um braço humoral (lactoferrinas, lisozimas, proteínas surfactantes, defensinas) e de um braço celular, composto principalmente por macrófagos alveolares e células dentríticas que expressam numerosos receptores de reconhecimento padrão (PRR), que interagem com os padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) específicos, o que desencadeia vias de sinalização celular que culminam no deslocamento de células dentríticas aos órgãos linfoides e na expressão de genes de citocinas, quimiocinas, interferons e moléculas co-estimulatórias que induzem a ativação e a maturação de diferentes células do sistema imune nos linfonodos mediastinais (Levitz, 2004; Lambrecht, 2006; van der Veerdonk *et al.*, 2008; Mogensen, 2009;). Dessa forma, os macrófagos têm um papel duplo na PCM: podem funcionar como instrumento para a disseminação da infecção ou para a sua contenção, e em ambos os casos os eventos são críticos ao resultado da infecção, com o balanço de citocinas atuando nessa “decisão” (Bernard, 2008; Calich *et al.*, 2008).

A infecção por *P. brasiliensis* pode resultar tanto em uma condição assintomática quanto em uma doença aguda, causando inicialmente lesões pulmonares seguidas de

disseminação para outros tecidos e órgãos (Borges-Walmsley et al., 2002). A classificação clínica da PCM pode ser dividida conforme a figura 01.

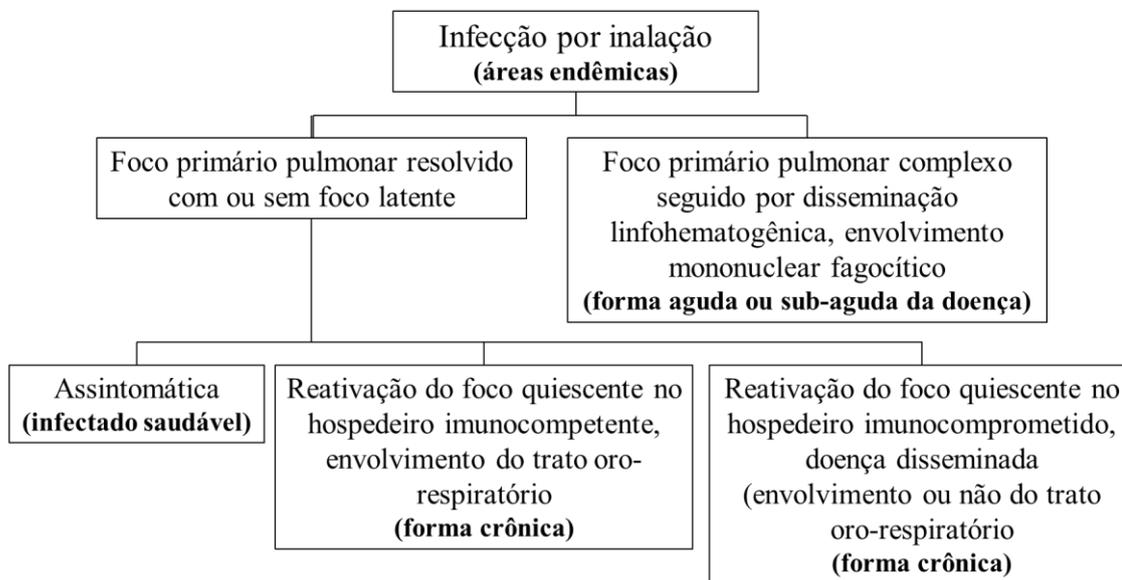


Figura 01. Resumo da classificação clínica da PCM em humanos (adaptado de Bernard, 2008).

Como mencionado anteriormente, os macrófagos alveolares são provavelmente as primeiras células e entram em contato com *P. brasiliensis*, e são, possivelmente, importantes na contenção inicial da proliferação das leveduras por mecanismos não específicos ou do sistema imune inato, fagocitando o fungo, que pode entrar em replicação intracelular na ausência de TNF- α (Moscardi-Bacchi et al., 1994; Borges-Walmsley et al., 2002; Calich et al., 2008). Estudos mostram que IFN- γ ativa os macrófagos, que produzem então o intermediário reativo do nitrogênio, óxido nítrico (NO), inibindo a transformação dos conídios de *P. brasiliensis* em leveduras provavelmente por um mecanismo de restrição de ferro (Cano et al., 1994; Gonzales et al., 2000; Calich et al., 2008). IFN- γ também estimula os macrófagos infectados com o fungo a secretarem TNF- α e, juntas, essas citocinas aparentemente conferem resistência ao fungo e o controle da infecção (Karhawi et al., 2000; Souto et al., 2000). Além disso, quando macrófagos alveolares foram analisados após infecção pulmonar por *P. brasiliensis*, não se detectou peróxido de hidrogênio em células derivadas de animais suscetíveis, enquanto células de animais resistentes produziram níveis aumentados desse metabólito no curso da infecção (Cano et al., 1995).

Como revisto por Borges-Walmsley *et al.* (2002), quando Bava *et al.* (1991) desafiaram pacientes saudáveis com gp43, antígeno de *P. brasiliensis* secretada, esses apresentaram níveis substanciais de IFN- γ , IL-2 e IL-10, refletindo uma resposta imune balanceada e efetiva, ao contrário de pacientes com PCM, que apresentam baixos níveis de IL-2, IFN- γ e TNF- α (Bava *et al.*, 1991; Cisalpino *et al.*, 1996; Karhawi *et al.*, 2000). Estudos posteriores mostram que, na ausência de resposta imune primária capaz de suprimir o foco de infecção, a imunidade celular é ativada, e o volume e virulência do inóculo inicial possivelmente direcionam o perfil citocínético para um padrão de resposta imune Th1 (resposta imune pró-inflamatória mediada por células) ou Th2 (resposta imune mediada por anticorpos) (Antachopoulos e Roilides, 2005; revisto por Bernard, 2008; Marques, 2012). Quando o perfil citocínético Th1 prevalece, há a predominância de IL-12, IFN- γ e TNF- α , com uma evolução balanceada da interação parasita-hospedeiro e posterior infecção subclínica (Karhawi *et al.*, 2000; Bernard *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2002; Peracoli *et al.*, 2003; Mamoni *et al.*, 2006). Com a supressão da resposta Th1 e um padrão citocínético predominantemente Th2, encontram-se altos níveis de IL-4, IL-5, e IL-10, além da produção de imunoglobulinas específicas combinadas a subclasses de anticorpos IgG, evoluindo para a forma clínica (Karhawi *et al.*, 2000; Bernard *et al.*, 2001; Mello, 2002; Oliveira *et al.*, 2002; Peracoli *et al.*, 2003; Mamoni *et al.*, 2006).

1.2.2. Tratamento da PCM

Os antifúngicos atualmente comercializados, quando comparados aos antibióticos, se apresentam em um número comparativamente menor, a grande maioria deles foi desenvolvida no século passado, apresentam muitos efeitos adversos e são passíveis de desenvolvimento de resistência microbiana (revisto por Labro, 2012).

Os principais agentes antifúngicos em uso são classificados de acordo com o seu mecanismo de ação: compostos que alteram a membrana celular (anfotericina B, miconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol, dentre outros), rompimento da função microtubular (griseofulvina), compostos que alteram o metabolismo dos ácido nucléicos (flucitosina), inibidores da parede celular (equinocandinas) e mais recentemente drogas iodadas, como o iodeto de potássio, com mecanismo de ação ainda pouco elucidado (Adriole, 2000, Bem-Ami *et al.*, 2008).

O tratamento da PCM inclui o uso de antifúngicos, monitoramento nutricional e isenção do consumo de álcool e tabaco, tratamento de eventuais sequelas e comorbidades e a

prevenção de doenças oportunistas; devendo ser baseado na severidade patológica de cada paciente (Ramos-e-Silva e Saraiva, 2008; Marques, 2012). Muitas drogas são atualmente utilizadas no tratamento da PCM (Marques, 2012). Até 1940 a PCM era considerada uma patologia sem cura, quando Ribeiro (1940) introduziu as sulfonamidas no tratamento de pacientes afetados e observou uma melhora em seu quadro clínico (Brummer, Castaneda e Restrepo, 1993). Logo outros derivados de sulfonamidas foram empregados e continuam sendo empregados como medicamentos ativos contra essa infecção fúngica (Brummer, Castaneda e Restrepo, 1993; Ferreira, 2009; Marques, 2012). A combinação sulfametoxazol-trimetropina (co-trimoxazol) é o tratamento empregado com maior frequência em crianças com formas severa de PCM e uma opção no tratamento de casos de infecção clínica moderada, além do uso em alguns casos de PCM no sistema nervoso central, para os quais os tratamentos mais utilizados são o fluconazol e recentemente o voriconazol (Brummer, Castaneda e Restrepo, 1993; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006; Ferreira, 2009; Pedroso *et al.*, 2009; Marques, 2012). O itraconazol é considerado a melhor opção no tratamento inicial de formas clínicas moderadas e, em casos severos, anfotericina B é o medicamento de escolha, apesar de sua alta incidência de efeitos adversos (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006; Ferreira, 2009; Marques, 2012). É importante notar que, dentre os derivados azólicos, o cetoconazol é raramente utilizados devido à incidência de efeitos adversos severos (hepatotoxicidade, inibição da produção de cortisol, dentre outros (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006; Ferreira, 2009).

Os critérios para a definição da cura desta micose são clínicos (restauração das lesões epiteliais e mucosas e desaparecimento de sintomas), radiológicos (desaparecimento de anormalidades radiológicas com estabilização de sequelas pulmonares) e imunológicos (estabelecimento e estabilidade de níveis de resposta imune sorológicos baixos em amostras coletadas seis meses após o fim do tratamento), seguidos de acompanhamentos anuais dos mesmos critérios (Del Negro *et al.*, 2000).

1.3. A Herança Epigenética e Fungos Patogênicos

1.3.1. A Herança Epigenética

O termo epigenética foi empregado pela primeira vez pelo embriologista inglês Conrad H. Waddington, em 1947, para descrever os mecanismos pelos quais o genótipo poderia levar ao desenvolvimento do organismo (revisto por Jablonka & Lamb, 2002). Apesar de não corresponderem ao conceito atual, os estudos de Waddington deixaram importante legado, uma vez que foram pioneiros a postular a plasticidade do genoma e a existência de variação não diretamente ligada ao DNA (revisto por Jablonka & Lamb, 2002).

Atualmente, a epigenética é definida como o estudo de modificações herdáveis nos padrões de expressão gênica que são, ao contrário das mutações, não atribuíveis a alterações na sequência de DNA (revisto por Gibney e Nolan, 2010). Essas modificações podem ser herdáveis tanto entre células mãe e filha (herança mitótica) quanto entre gerações (herança meiótica), tornando-se então uma das explicações de como células e organismos com sequências idênticas de DNA possuem diferenças fenotípicas dramáticas (revisto por Hamilton, 2011). Mecanismos epigenéticos são cruciais no controle de processos celulares regulares como desenvolvimento, diferenciação celular e proteção contra genomas virais, e parecem ser essenciais à integração de sinais endógenos e ambientais durante a vida de uma célula ou organismo (Herceg, 2007; Vaissiere *et al.*, 2008). Exposições ambientais e alterações na dieta dos organismos podem desregular padrões epigenéticos, sendo assim objetos de estudos que podem explicar a associação entre o estilo de vida e o risco do desenvolvimento de doenças, como câncer, a plasticidade neuronal, distúrbios comportamentais, doenças autoimunes e obesidade (Jirtle e Sjöinner, 2007; Herceg, 2007; Vaissiere *et al.*, 2008). Sendo assim, a reversão de mudanças epigenéticas representa um alvo potencial de novas estratégias terapêuticas e desenho de medicamentos (Selaru *et al.*, 2009).

Os principais fenômenos epigenéticos envolvem metilação de citosinas no DNA, modificações covalentes pós-traducionais em histonas (como metilação, acetilação, fosforilação e ubiquitinação) e na estrutura da cromatina, silenciamento gênico mediado por RNAs não-codantes e perda de *imprinting* genômico, sendo as duas primeiras modificações estudadas de forma mais intensiva no contexto de transcrição gênica e eventos anormais que levam a processos oncogênicos (Vaissiere *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009; Gibney, 2010).

A metilação do DNA é a adição covalente de um grupo metil ao carbono cinco (C₅) de bases citosinas em ilhas CpG na sequência de DNA, por DNA metiltransferases (DNMTs) e

com a participação de um grupo S-adenosil-L-metionina como doador do radical metil (revisto por Vaissiere *et al.*, 2008; Mai e Altucci, 2009; Hamilton, 2011). A metilação de citosinas é controlada por dois tipos de DNMTs em humanos: metiltransferases de manutenção (DNMT1) e *de novo* (DNMT3a e DNMT3b) (Bestor, 2000; Bird, 2002; Hamilton, 2011). Durante o desenvolvimento inicial, os padrões de metilação são estabelecidos pelas metiltransferases *de novo* DNMT3A e DNMT3B (Reik, 1999). Entre gerações celulares, os padrões dos sítios CpG metilados e desmetilados são reproduzidos com alta fidelidade pela metiltransferase de manutenção DNMT1 (Bird, 2002). Ilhas CpG existem em regiões promotoras de aproximadamente metade do total de genes da célula eucariótica, e por isso a metilação do DNA possui um importante papel em um grande número de funções centrais celulares, e tem também sido relacionada ao silenciamento de elementos transponíveis e à defesa contra sequências virais (revisto por Bird, 2002; Jaenisch e Bird, 2003; Hamilton, 2011).

O nucleossomo é a unidade básica da cromatina, constituindo-se de um complexo de 147 pares de base de DNA que envolvem um octâmero de histona, compostas por duas cópias de cada subunidade – H2A, H2B, H3 e H4 –, com caudas variáveis que se estendem além da estrutura nucleossômica (revisto por Kim *et al.*, 2009; Hamilton, 2011). Existem vários tipos de modificações pós-traducionais que podem afetar a cauda de histonas, e essas incluem a metilação, a acetilação, a ubiquitinação e sumoilação de lisinas e a fosforilação de serinas e treoninas (revisto por Kouzarides, 2007; Hamilton, 2011). Uma das modificações de histonas mais bem estudadas é a acetilação dos resíduos de lisina por enzimas denominadas histona acetiltransferases (HAT): em geral, a acetilação dos resíduos de lisinas de histonas é associada à ativação da transcrição, enquanto a desacetilação, realizadas por enzimas denominadas histonas desacetilases (HDAC), é ligada à repressão transcricional (Vaissiere *et al.*, 2008; Kim, 2009; Hamilton, 2011). A especificidade dos substratos das HATs e HDACs não é restrita a histonas, mas a um número contínuo e crescente de proteínas citoplasmáticas (Brosch *et al.*, 2008). A acetilação neutraliza o resíduo de lisina carregado positivamente na cauda histônica, reduzindo a força da ligação entre a cauda e o DNA, o que deixa o complexo DNA/histona mais frouxo e acessível a fatores de transcrição (Gibney, 2010). Metilação das histonas, especialmente dos resíduos de lisina, podem exercer diferentes efeitos sobre a transcrição gênica, dependentes do número de grupos metil e das posições dos resíduos de lisina (Kim, 2009; Hamilton, 2011).

Existe uma comunicação bastante estreita entre a metilação do DNA e a acetilação de histonas, apesar de os mecanismos subjacentes a esses eventos serem pouco entendidos (Vaissiere *et al.*, 2008). Por exemplo, a hipermetilação de ilhas CpG em regiões promotoras de genes desencadeia a desacetilação de histonas locais, e, do mesmo modo, a hipoacetilação parece tornar o DNA alvo sensível à metilação de citosinas (Vaissiere *et al.*, 2008). Além disso, a administração de inibidores de HDAC (iHDAC), como a Tricostatina A (TSA), que reestabelecem a habilidade celular de acetilar histonas, foi responsável pelo aumento da desmetilação de promotores previamente hipermetilados (Dong *et al.*, 2007; Ou *et al.*, 2007). Inversamente, agentes desmetilantes do DNA como a 5-aza-2'-deoxi-citidina (5-AZA) são também capazes de recuperar um estado transcricional ativo por meio da indução da acetilação de histonas (Kawamoto *et al.*, 2007).

1.3.2. Regulação epigenética em fungos patogênicos

Em contraste ao rápido e crescente conhecimento a respeito da regulação epigenética em outros eucariotos, estudos a respeito da regulação epigenética em fungos ainda são limitados (Brosch *et al.*, 2008), sendo mais avançados em organismos modelo como *Saccharomyces cerevisiae* (e.g. Makovets *et al.*, 2008; Mazor & Kupiec, 2009; Neves-Costa *et al.*, 2009; Patel *et al.*, 2009; Riesen & Morgan, 2009;), *Schizosaccharomyces pombe* (e.g. Hansen *et al.*, 2006; Anderson *et al.* 2009; Laurence & Volpe, 2009) e *Neurospora crassa* (e.g. Catalanotto *et al.*, 2004; Nolan *et al.*, 2005). Apesar das informações de *S. cerevisiae* e *N. crassa*, se mostrarem de grande importância, deve-se estar atento a possíveis diferenças em fungos patogênicos, devido a, principalmente, diferenças metabólicas importantes no reino fungi (Tamaru e Selker, 2001; Brosch *et al.*, 2008).

Informações a respeito de eventos epigenéticos em patógenos ao homem restringem-se aos fungos *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus*.

Em *A. fumigatus*, apesar do número reduzido de estudos acerca da regulação da estrutura da cromatina, viu-se que a metilação da lisina 9 da histona 3 (H3K9) é necessária ao crescimento e desenvolvimento normais do fungo (Palmer *et al.*, 2008). Por ser um fungo oportunista principalmente em pacientes imunocomprometidos, como os acometidos por distúrbios hematológicos, aos quais o uso de agentes hipometilantes é comumente associado, Bem-Ami *et al.* (2010) verificaram que o tratamento *A. fumigatus* de com a droga 5-AZA induz uma alta frequência de mutantes com formação de conídios dependente da luz defeituosa e totalmente patogênico em moscas e modelos murinos. Ainda, os estudos sobre a

expressão gênica do fungo sob a ação do inibidor de DNMT revelarem uma expressão diferencial de proteínas regulatórias (Bem-Ami *et al.*, 2010).

Em *C. albicans* vários estudos com inibidores de HDAC e de DNMT, em especial 5-AZA, TSA e butirato de sódio (BS), foram conduzidos para a análise dos efeitos dessas drogas sobre o crescimento, a transição fenotípica branco-opaco, formação do tubo germinativo e sensibilidade a agentes antifúngicos (Smith e Edlind, 2002; Lohse *et al.*, 2009; Lohse e Johnson, 2010).

Em estudos sobre os efeitos mínimos da administração de agentes inibidores de HDAC, não foram encontrados efeitos de TSA e BS sobre o crescimento de *C. albicans*, com concentrações máximas de até dez vezes as concentrações utilizadas em células tumorigênicas (Smith e Edlind, 2002). O mesmo estudo mostra ainda a ausência de efeitos dos agentes desmetilantes sobre a formação do tubo germinativo do fungo, além do aumento de sua sensibilidade aos antifúngicos azólicos itraconazol e fluconazol, provavelmente pela redução da expressão de genes superexpressos na presença dos antifúngicos testados (Smith e Edlind, 2002). Estudos recentes, ao contrário, mostram uma redução da viabilidade de *C. albicans* em torno de 50% nas mesmas concentrações anteriores, além da total inibição da filamentação das leveduras em concentrações levemente menores de butirato de sódio (Nguyen *et al.*, 2011). Tais informações ilustram que a ação do BS sobre *C. albicans* ainda precisa ser mais profundamente investigada.

Outro estudo, que identificou regiões metiladas no genoma de *C. albicans*, relata que a metilação no fungo ocorre largamente ao longo de genes estruturais e regula a transcrição gênica de forma dependente da transição branco-opaco e do metabolismo de ferro (Mishra *et al.*, 2011). A transição fenotípica da forma branca para a opaca afeta várias funções metabólicas como a susceptibilidade a drogas e a virulência aumentada de leveduras da fase branca em modelos murinos de infecção cutânea, além de regular a expressão de uma variedade de genes específicos de cada forma fenotípica (Kvaal *et al.*, 1997, 1999; Vargas *et al.*, 2000; Soll, 2001). Estudos posteriores descrevem a ordem de eventos ligados à regulação gênica durante a transição entre as formas fenotípicas do fungo, descrevendo implicações de cada fenótipo sobre a habilidade de sobrevivência em um hospedeiro humano, no qual o fungo muda todo o seu transcrito imediatamente antes que ocorra a transição para melhor sobreviver no organismo hospedeiro (Lohse e Johnson, 2010).

C. neoformans, patógeno oportunista humano causador da criptococose, responde a estresses variados, como contato com células fagocíticas, altas temperaturas e altos níveis de

gás carbônico, por meio da indução de fatores de virulência importantes como a melanina antioxidante e a cápsula polissacarídica antifagocítica (Alspaugh *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2001). Estudos com linhagens mutantes deficientes do gene *GCN5*, de uma histona acetiltransferase revelam a dificuldade de crescimento das leveduras mutantes em situações de estresse, como o crescimento defeituoso em temperaturas elevadas e altas concentrações salinas, a espessura da cápsula polissacarídica reduzida, a virulência e o potencial patogênico diminuídos em modelos murinos e a expressão diferencial significativa de 417 genes da levedura (O’Meara *et al.*, 2010). O tratamento de células não portadoras da deleção com um inibidor de HAT mimetizou os mesmos efeitos da cepa mutante (O’Meara *et al.*, 2010).

Estudos posteriores com *C. neoformans*, utilizando Butirato de Sódio, um inibidor da HDAC, mostram a inibição do crescimento da levedura de uma forma dose-dependente, além do bloqueio à formação do biofilme, da formação da cápsula, da produção de melanina e do aumento da susceptibilidade das células fúngicas ao tratamento com fluconazol (Nguyen *et al.*, 2011). O mesmo estudo mostra ainda a inibição do crescimento de *C. albicans* e *C. parapsilosis* e o aumento da sensibilidade a antifúngicos azólicos induzidos pelo butirato de sódio, assim como o aumento do índice de fagocitose de *C. albicans* e *C. neoformans* por macrófagos peritoniais murinos quando tratados com a mesma droga (Nguyen *et al.*, 2011).

1.4. Drogas Moduladoras de Estados Epigenéticos

1.4.1. Inibidores de histona desacetilases (iHDAC)

Existem vários iHDAC estruturalmente distintos atualmente explorados como terapias, classificando-se em quatro principais classes químicas (Figura 2): ácidos graxos de cadeia curta, ácidos hidroxâmicos, tetrapeptídeos cíclicos e benzamidas (Minucci e Pelicci, 2006). De uma forma geral, os iHDACs são capazes de interagir com o domínio catalítico das HDACs para bloquear a habilidade de reconhecimento do substrato dessas enzimas, resultando assim no reestabelecimento relevante da expressão gênica (Finnin *et al.*, 1999). Apesar de o mecanismo geral de ação desta classe ser similar entre os grupos químicos, diferentes iHDACs podem afetar diferentes HDACs, gerando certa especificidade de ação de cada composto (Smith e Workman, 2009). Por exemplo, a HDAC7 expressa em humanos apresenta especificidade de inibição e é sensível ao grupo dos ácidos hidroxâmicos, como a

Tricostatina A (TSA), mas não se liga a bezamidas, tetrapeptídeos cíclicos ou ácidos graxos de cadeia curta (Schuetz *et al.*, 2008). Grande parte dos iHDAC atualmente utilizados, como o TSA e o butirato de sódio, são inibidores reversíveis e competitivos da atividade desacetilase (Sekhavat *et al.*, 2007).

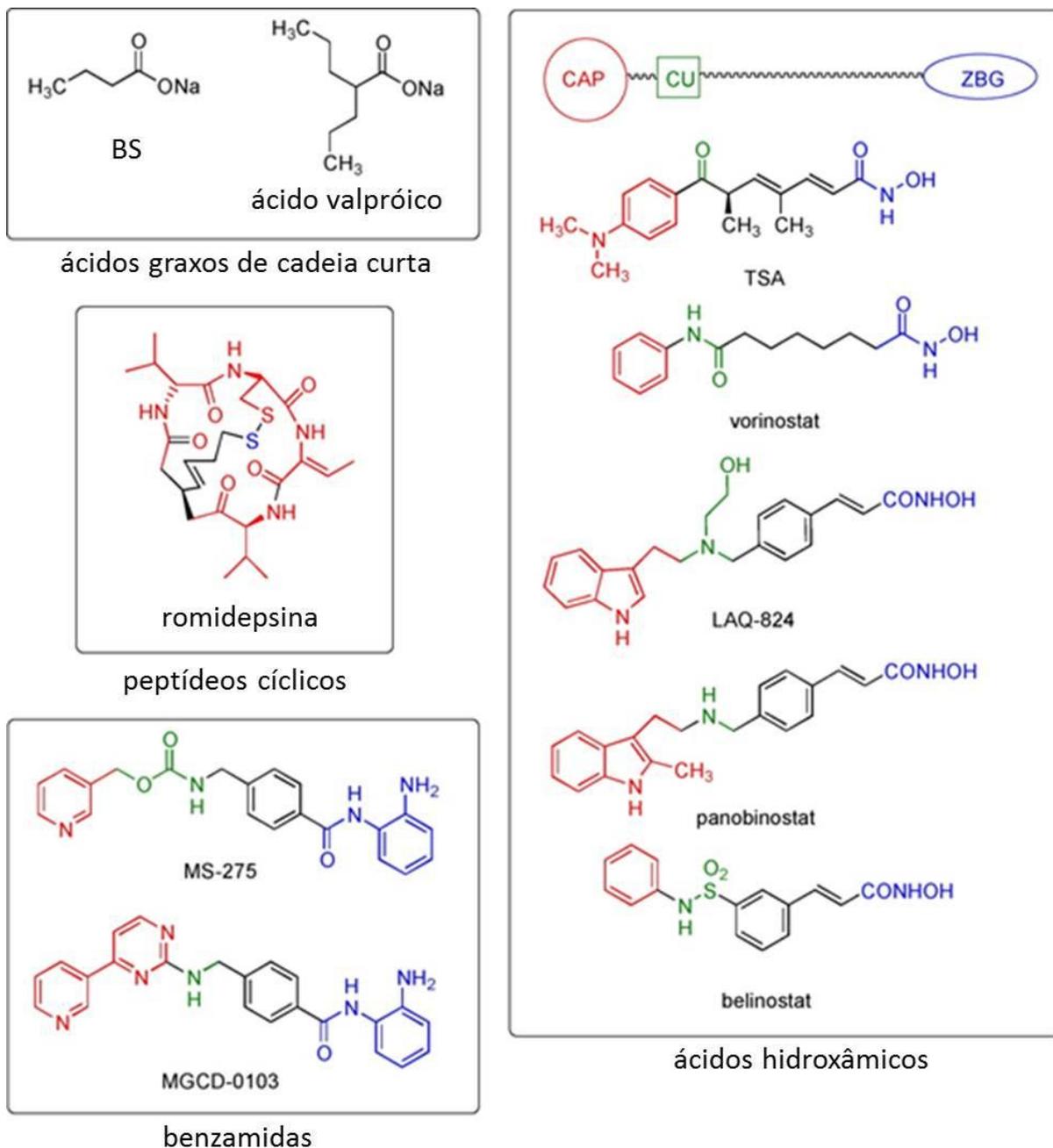


Figura 02. Estrutura química dos inibidores de histona desacetilases (Mai e Altucci, 2009).

1.4.1.1. Butirato de Sódio (BS)

O Butirato de Sódio (Figura 02), produto da fermentação de fibras gerado por bactérias anaeróbicas do intestino, é um exemplo da classe química dos ácidos graxos de cadeia curta (Mai e Altucci, 2009). O mecanismo de ação do BS como um iHDAC ainda não foi totalmente elucidado, possivelmente o grupo químico carboxílico atua como um ligante de zinco, ou ainda compete com o acetato liberado pela reação de desacetilação (Mai e Altucci, 2009). Talvez pelo fato de ser produzido em pequenas concentrações no intestino, o butirato tem sido descritos por suas atividades farmacológicas de inibição de alguns tipos de câncer, como o de colo, de próstata, do endométrio e do colo uterino, quando em altas concentrações milimolares (Gilbert *et al.*, 2001).

1.4.1.2. Tricostatina A (TSA)

O ácido hidroxâmico Tricostatina A (Figura 2) foi isolado primordialmente de *Streptomyces hygroscopicus* como um antifúngico ativo contra *Trichophyton*, gênero fúngico associado ao desenvolvimento de onicomicoses (Tsuji *et al.*, 1976; Welsh *et al.*, 2010). Aproximadamente dez anos depois foi verificada acidentalmente sua capacidade de acetilação a partir da análise de células tratadas com TSA (Yoshida *et al.*, 1990). A estrutura química da TSA é caracterizada por um grupo fenil ligado, por um grupo carbonil, a uma cadeia insaturada alifática (Mori e Koseki, 1988). Essa droga possui um centro quiral no carbono seis (C₆), e o composto produzido naturalmente apresenta a configuração R, enquanto o enantiômero S demonstrou ser biologicamente inativo (Mori e Koseki, 1988). A TSA inibe as HDACs classe I (HDAC1, HDAC2 e HDAC3) e classe II (HDAC4, HDAC6, HDAC7 e HDAC9) em concentrações nanomolares (Khan *et al.*, 2008). O provável mecanismo de ação da TSA diz respeito à ligação do grupo fenil no topo da volta do bolso ativo da enzima, onde normalmente existe uma lisina acetilada, impedindo assim a ação enzimática; enquanto a função ácida do composto quelar íons de zinco no fundo do sítio ativo, determinando assim um efeito inibitório (Finnin *et al.*, 1999; Vanini *et al.*, 2004).

1.4.2. Inibidores da metilação do DNA

Nos últimos anos muitos inibidores das enzimas DNA metiltransferases (iDNMTs) têm sido desenvolvidos (Figura 3) (Gravina *et al.*, 2010). Os primeiros a serem relatados são dois análogos da citidina, 5-aza-citidina e 5-aza-2'-deoxi-citidina (Jones e Taylor, 1980). A 5-aza-2'-deoxicitidina (5-AZA) foi sintetizada pela primeira vez em 1964 por Sorm *et al.* Esses

compostos, em altas concentrações, são incorporados ao DNA e sofrem então um ataque nucleofílico no carbono seis (C₆) do anel pirimidínico pelo grupo tiol das DNMTs, que liga a ele o seu grupo metil, formando assim um complexo covalente DNA-enzima estável, que persiste sem a perda de um próton no C₅, como acontece em citosinas (Griffiths e Gore, 2008; Mai e Altucci, 2009). Em doses menores de 5-AZA, especula-se a depleção das DNMTs celulares (Griffiths e Gore, 2008). O resultado, em ambos os casos, é a reativação da expressão gênica de genes silenciados (revisto por Marks, 2012).

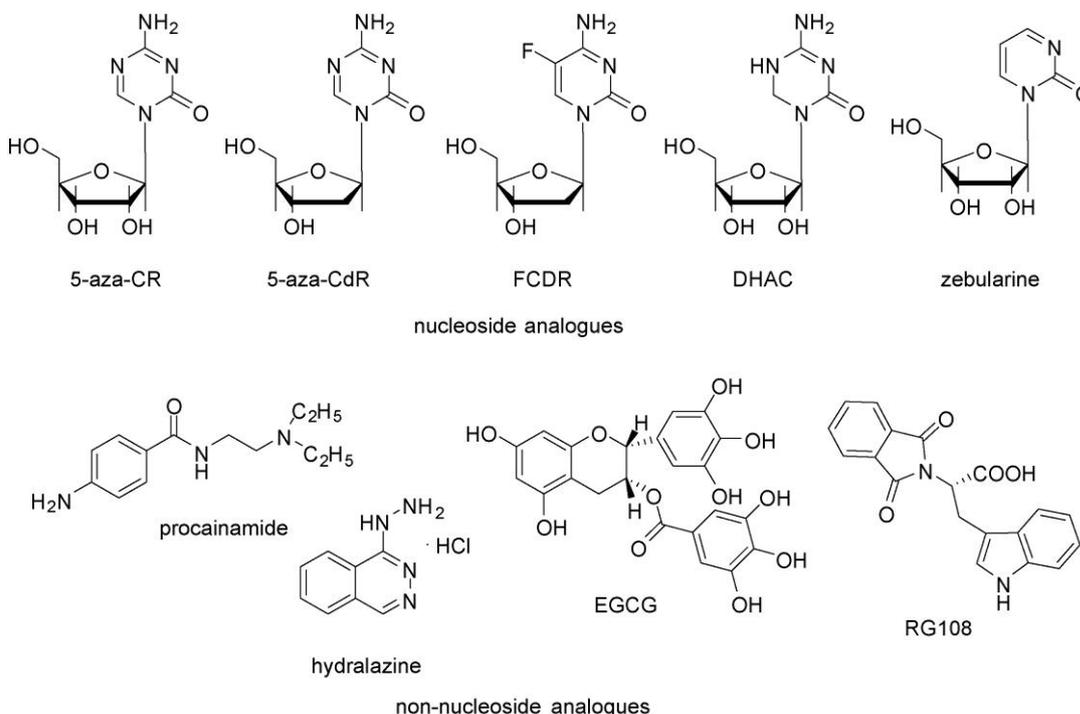


Figura 03. Inibidores da DNA metiltransferase (Mai e Altucci, 2009).

1.5. Mensageiros da resposta imune inata

O papel da resposta inflamatória é o combate à infecção e ao dano tecidual (revisto por Newton e Dixit, 2012). Uma vez que fungos ultrapassam barreiras físicas do hospedeiro, eles encontram uma série de mecanismos de defesa da imunidade inata, que conferem rápido reconhecimento da infecção microbiana por meio de um repertório limitado de receptores, capazes de reconhecer um grupo de moléculas conservadas padrão que são comuns a extensos

grupos de espécies microbianas (revisão por Janeway e Medzhitov, 2002; Blanco e Garcia, 2008). Um ponto crítico na defesa do hospedeiro é a produção de fatores quimiotáticos, a fim de recrutar efetivamente leucócitos para o sítio da infecção fúngica (Blanco e Garcia, 2008).

Nos tecidos, células da resposta imune, como macrófagos, mastócitos, células dendríticas e até mesmo fibroblastos, têm um papel essencial na defesa do hospedeiro contra o patógeno: o reconhecimento de estruturas moleculares conservadas de componentes microbianos, conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), percebidas pelo hospedeiro por meio de receptores de reconhecimento padrão (PRRs), presentes em grande parte das células do sistema imune inato (Blanco e Garcia, 2008; Kumar *et al.*, 2011; Newton e Dixit, 2012; Olive, 2012). O reconhecimento efetivo dos PAMPs leva à rápida indução de respostas imunes do hospedeiro pela ativação de vias de sinalização complexas que culminam na indução da resposta inflamatória mediada por diferentes citocinas e quimiocinas (Medzhitov, 2007; Kumar *et al.*, 2009; Kwai e Akira, 2010).

Membros da família dos receptores *Toll-like* (TLR) são os principais PRRs em células de mamífero (Janeway e Medzhitov, 2002; Romani, 2004; Newton e Dixit, 2012;). Esses receptores são proteínas transmembrânicas tipo I, contendo repetições ricas em leucinas, que são reconhecidas pelas PAMPs no ambiente extracelular, e um domínio receptor citoplasmático Toll/Interleucina 1 (TIR), responsável pela sinalização em cascata intracelular por meio de proteínas adaptadoras portadoras de um domínio de ligação a TIR, como o fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), que ativa fatores de transcrição nucleares e leva à produção de citocinas pró-inflamatórias (Akira *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2009; Mogensen, 2009; Kumar *et al.*, 2011; Newton e Dixit, 2012). TLR2 e TLR4 são os principais tipos de receptores transmembrânicos envolvidos na resposta a fungos patogênicos (Akira *et al.*, 2006). Alguns fungos patogênicos usam estratégias baseadas nesse sistema de reconhecimento como forma de evasão ao sistema imune: escape do reconhecimento pelos PRRs ou ainda indução de uma resposta imune de produção de citocinas anti-inflamatórias (Netea *et al.*, 2006). Por isso, neste trabalho, será feita a investigação do acúmulo de mensageiros em células do hospedeiro infectadas por *P. brasiliensis* relacionados à proteína adaptadora MyD88, ao fator de transcrição nuclear que ela ativa, fator nuclear kappa B (NF- κ B), e a duas citocinas pró-inflamatórias induzidas por esse fator nuclear: fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina seis (IL-6).

1.5.1. Fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88)

À exceção de TLR3, todos os TLRs conhecidos recrutam a proteína adaptadora MyD88, levando à rápida ativação de NF- κ B, MAPKs/AP-1 e IRF5 (fator regulador de interferon 5) e à indução da produção de citocinas pró-inflamatórias (revisto por Newton e Dixit, 2012; Olive, 2012). Essa sinalização, como sinalizada na figura 04, envolve o recrutamento de membros da família de quinases associadas ao receptor de interleucina 1 (IRAK) até MyD88 por meio de interação entre os denominados domínios de morte (DD, *death domains*) (Li *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2010). Primeiramente, IRAK4 é ativado e recrutado por MyD88 e, em seguida, ativa IRAK1 e IRAK2 por fosforilação, seguido pelo recrutamento do fator associado ao receptor de TNF 6 (TRAF6) que, ubiquitinado, recruta a quinase transformante de crescimento 1 ativada pelo fator b (TAK1) (Deng *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2011). A poliubiquitinação de TAK1 recruta o inibidor de κ B quinase (IKK), que é então fosforilado por TAK1, levando à degradação do inibidor de κ B e à migração concomitante de NF- κ B ao núcleo celular, fator que estimula a transcrição de vários genes relacionados à resposta pró-inflamatória (Hacker e Karin, 2006; Bhoj e Chen, 2009; Kumar *et al.*, 2011; Newton e Dixit, 2012).

Estudos recentes sugerem o envolvimento de TLR2 e TLR4 no reconhecimento e internalização de *P. brasiliensis* por monócitos humanos, indicando o importante papel desses PRRs na resposta imune contra o fungo (Loures *et al.*, 2009; Loures *et al.*, 2010). Posteriormente, Loures *et al.* (2011) verificaram que a ausência de sinalização por MyD88 por macrófagos peritoniais murinos resultou em habilidade fungicida reduzida, quando em contato com *P. brasiliensis*, além de uma aumentada propagação de células fúngicas para órgãos como fígado e baço. Como resultado, estabeleceu-se que uma infecção severa caracterizada por ausência de citocinas de resposta Th1, Th2 e Th17, expansão diminuída de células T reguladoras, lesões fúngicas severas em vários órgãos e altas taxas de mortalidade em murinos (Loures *et al.*, 2011). Por outro lado, González *et al.* (2008), em um estudo com modelos murinos de defesa contra a infecção por *P. brasiliensis*, observaram que a resposta do hospedeiro a esse patógeno é independente de MyD88, e indica que TLR2, TLR4 e dectina-1 não possuem um papel crucial no reconhecimento das leveduras do patógeno (González *et al.*, 2008). Estudos como esses demonstram que o papel dos receptores TLR2 e TLR4 na resposta a *P. brasiliensis* ainda permanece pouco elucidado.

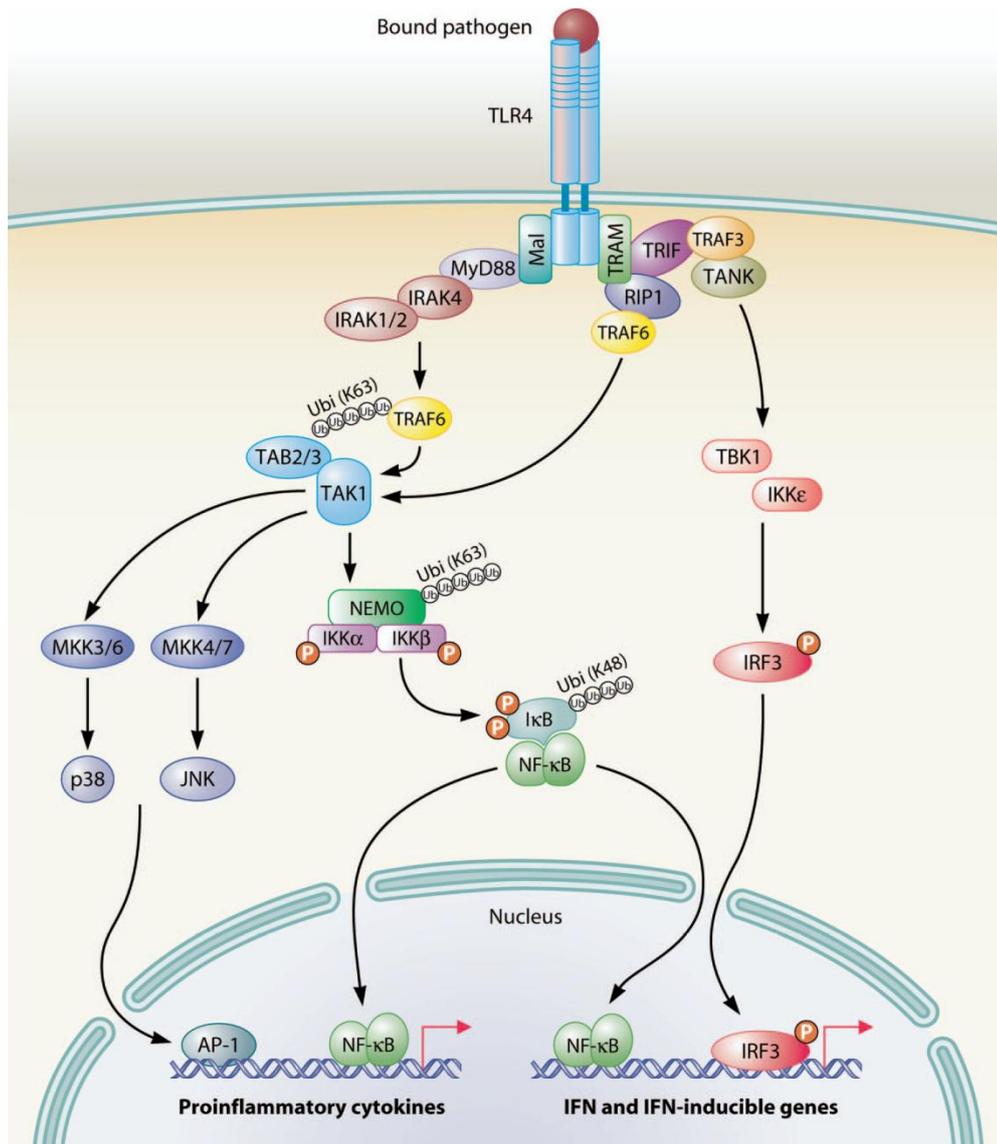


Figura 04. Sinalização através de TLR, por vias independente (direita) e dependente (esquerda) de MyD88, responsáveis pela ativação de NF-κB e pela indução de citocinas pró-inflamatórias (revisto por Mogensen, 2009).

1.5.2. Fator Nuclear kappa B (NF-κB)

Como descrito, NF-κB é um fator de transcrição nuclear ativado pelo sinal desencadeado a partir de grande parte dos TLRs, que recrutam a proteína adaptadora MyD88 e levam, por sucessivas sinalizações intracelulares, à translocação de NF-κB ao núcleo, que dirige a expressão de um grande número de genes pró-inflamatórios, como interleucina 6 (IL-6) e TNF-α, responsáveis tanto pela resposta imune inata quanto adaptativa (revisto por Mogensen, 2009; Haddad e Abdel-Karim, 2011; Newton e Dixit, 2012). Juntas, as proteínas induzidas por NF-κB participam na ativação e recrutamento de leucócitos aos sítios de inflamação (revisto por Mogensen, 2009).

Vários genes apresentam elementos responsivos a NF- κ B em suas regiões regulatórias, sendo que seus padrões de expressão variam significativamente de acordo com os sinais recebidos (Vanden Berghe *et al.*, 2006). Um grande número de evidências sugere que a regulação do padrão de expressão desses genes, junto à integração de diversos sinais, ocorra por mudanças epigenéticas na estrutura da cromatina (Vanden Berghe, 2006).

1.5.3. Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α)

Diferentes células do sistema imune, principalmente células dendríticas, macrófagos e linfócitos, produzem TNF- α , que é expresso na forma de uma proteína precursora transmembrânica tipo II, e adquire sua forma madura secretada após a clivagem pela metaloproteinase denominada enzima conversora de TNF alfa (TACE) (Black *et al.*, 1997). O grande alcance de funções da família TNF pode ser explicado pela presença de dois tipos de receptores de TNF (TNF-R) em praticamente todos os tipos celulares: TNF-RI e TNF-RII, envolvidos em vias de sinalização de IKK e proteína-quinases ativadas por mitógenos (MAPK), levando à ativação de vários fatores de transcrição, como NF- κ B (Vandenabeele *et al.*, 1995). TNF-RII contém um domínio de ligação ao fator associado ao TNF-R (TRAF), que é mediador intracelular de diferentes proteínas sinalizadoras, participante na via de sinalização de IKK (Carpentier *et al.*, 2004). Dessa forma, TNF- α pode ser classificada como uma citocina que age amplificando a resposta inflamatória (revisito por Newton e Dixit, 2012).

A produção de TNF- α pelos macrófagos em resposta aos componentes da parede celular de *P. brasiliensis* é necessária ao acúmulo e diferenciação dos macrófagos em células epitelióides e à persistência de granulomas (Figueireido *et al.*, 1993). Além disso, TNF- α endógeno através do receptor p55, em conjunto com IFN- γ , são mediadores da resistência à infecção por *P. brasiliensis* e indutores da produção de óxido nítrico *in vivo* (Souto *et al.*, 2000).

1.5.4. Interleucina 6 (IL-6)

IL-6 é uma citocina pleiotrópica predominantemente expressa em monócitos ou macrófagos ativados, além de células endoteliais ativadas de tecidos inflamados (Moller e Villiger, 2006). É induzível por lipopolissacarídeos (LPS), TNF- α e alguns interferons, e se liga a um receptor específico, IL-6R, que é heterodimerizado com duas unidades da glicoproteína transmembrânica gp130. O complexo formado entre IL-6 e esse receptor leva à ativação celular pela sinalização da via STAT-3 ou pela via MAPK (Moller e Villiger, 2006).

Muitas das atividades biológicas dessa interleucina são mediadas pelo IL-6R solúvel de ocorrência natural, que forma um complexo com IL-6 que se liga a gp130 e desencadeia respostas celulares, o que é descrito na literatura científica como IL-6-trans-sinalização (revisto por Jones, 2005). Logo, a bioatividade de IL-6 pode ser governada pela concentração local de IL-6R solúvel (revisto por Jones, 2005).

IL-6 é considerada tradicionalmente uma ativadora de respostas inflamatórias de fase aguda e um fator estimulatório de linfócitos, com características tanto pró quanto anti-inflamatórias (Kishimoto *et al.*, 1995; ; Xing *et al.*, 1998; Atreya *et al.*, 2000; Moller e Villiger, 2006). Ao mesmo tempo em que é crítica na regulação da resposta imune aguda, IL-6 possui um papel ainda mais crucial na manutenção de infecções crônicas (Hurst *et al.*, 2001). A interação de IL-6 com outros mediadores inflamatórios, como NF- κ B, pode estar relacionada a funções distintas exercidas por essa interleucina (revisto por Jones, 2005).

2 JUSTIFICATIVA

Dados o longo tempo de duração, os efeitos colaterais do tratamento, os diferentes aspectos clínicos da PCM e o desenvolvimento de resistência dos isolados de *P. brasiliensis* às terapias antifúngicas (Brummer, Castaneda e Restrepo, 1993; Labro, 2012), faz-se necessário aprofundar os estudos da interação patógeno-hospedeiro no nível molecular. Tendo em vista a importância da regulação epigenética nos mais diferentes modelos de estudos, consideramos relevante verificar se a regulação diferencial de genes do hospedeiro relacionados à resposta imune inata também envolve eventos epigenéticos, o que traria importantes informações a respeito da biologia do *P. brasiliensis* para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar o efeito de drogas moduladoras de estados epigenéticos sobre a interação entre macrófagos da linhagem ATCC J774 e *P. brasiliensis*.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Determinar a concentração máxima das drogas que macrófagos da linhagem ATCC J774 e células leveduriformes de *P. brasiliensis* podem tolerar, sem comprometimento do crescimento celular.
- b) Verificar o efeito das drogas sobre a internalização de *P. brasiliensis* por macrófagos da linhagem ATCC.
- c) Investigar o efeito das drogas sobre o acúmulo de mensageiros de genes cujos produtos estão associados à resposta imune inata, no modelo de macrófagos da linhagem ATCC infectados por *P. brasiliensis*.
- d) Avaliar o efeito das drogas sobre a liberação de citocinas pelos macrófagos da linhagem ATCC quando infectados por *P. brasiliensis*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Manutenção e propagação das células

4.1.1. *Paracoccidioides brasiliensis*

O isolado Pb18 de *P. brasiliensis*, na forma de levedura, foi mantido por repiques semanais em meio sólido Fava-Netto (protease peptona 0,3%, peptona 1,0%, extrato de carne 0,5%, dextrose 4,0%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,5% e ágar 1,6%; pH 7,2), a 37°C, e foi utilizado nos experimentos após 5-7 dias de crescimento.

Para cada experimento, o isolado Pb18 foi diluído no meio de cultura apropriado em tubos de polipropileno de 15mL e, juntamente com pérolas de vidro, agitado gentilmente em vortex para que os grumos de células fossem desfeitos. A seguir, a solução foi deixada em repouso durante vinte minutos para a sedimentação dos grumos ainda presentes e permitir que, no sobrenadante, somente leveduras isoladas (livre de grumos) permanecessem. O sobrenadante foi então transferido para um novo tubo e o número de células viáveis determinado por contagem em câmara de Neubauer (Boeco, Germany). A viabilidade do fungo foi determinada por meio do corante vital verde Janus (Goihman-Yahr *et al.*, 1980). Em nossos experimentos, empregamos culturas de fungos com uma viabilidade mínima de 90%.

4.1.2. *Cultura de células ATCC J774*

As células ATCC J774 foram mantidas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* – DMEM (GIBCO®) em pH 7,2, suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO®) e acrescido de antibiótico a 25mg/L (Garamicina – sulfato de gentamicina 120mg/mL, Schering-Plough®).

As culturas foram estabelecidas a partir de passagem inicial de 10^5 células em frascos de cultura de poliestireno de 25 cm², ou 2×10^5 células em frascos de 75 cm² e mantidas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ e 70% de umidade. Para estabelecimento e manutenção de subculturas, as células foram soltas do fundo do frasco com espalhador (*scraper*) para frasco (TPP®). A solução de células era transferida para um tubo de centrífuga e centrifugada a 750 x g por 8 minutos. O número de células viáveis foi determinado por contagem em câmara de Neubauer (Boeco, Germany) e, sua viabilidade, por meio do corante vital azul de tripan. Em seguida, as células foram passadas a um novo frasco para propagação.

4.2. Soluções

PBS (phosphate saline buffer, tampão fosfato) 1X

NaCl 137,0 mM

KCl 2,7 mM,

Na₂HPO₄ 10,0 mM

KH₂PO₄ 2,0 mM

O volume final foi completado com H₂O destilada, o pH ajustado para 7,4 e a esterilização realizada por autoclavagem a 120°C durante quinze minutos.

Meio sólido Fava-Netto

Protease peptona 0,3 %

Peptona 1,0 %

Extrato de carne 0,5 %

Dextrose 4,0 %

Extrato de levedura 0,5 %

NaCl 0,5 %

Ágar 1,6 %

O volume final foi completado com H₂O destilada, o pH ajustado para 7,2 e a esterilização realizada por autoclavagem a 120°C durante quinze minutos.

Tampão Tris-acetato EDTA (TAE)

Tris-base 4,84 g

EDTA 0,5 M 2,00 mL

Ácido acético 1,14 mL

H₂O q.s.p 1000,00 mL

O pH foi ajustado para 8,5

Tampão de Amostra (5X) para análise de RNA por eletroforese

Glicerol	50,0 % (v/v)
Azul de bromofenol	0,1 % (p/v)
Xileno cianol	0,1 % (p/v)

Solução de Brometo de etídio

Solução estoque: 10,0 mg/mL em H₂O destilada

PBS-Tween 0,05% - Tampão de lavagem - ELISA

Tween 20	500 µL
Solução PBS 1X q.s.p.	1000 mL

Solução de Parada (*Stop Solution*) ELISA

H₂SO₄ 2 N
H₂O miliQ q.s.p.

Preparo das soluções de drogas moduladoras da conformação da cromatina

Neste estudo foram utilizadas as seguintes drogas com ação sobre a estrutura da cromatina: 5-aza-2'-deoxicitidina (inibidor de DNA metiltransferase, Sigma-Aldrich®), diluída em H₂O mili-Q estéril e armazenada a -20°C; Butirato de sódio (inibidor de histona desacetilase, Cayman Chemical®), diluído em H₂O mili-Q estéril e armazenado à temperatura ambiente (seu resfriamento causa precipitação do composto); e Tricostatina A (inibidora de histona desacetilase, Cayman Chemical®), diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) e armazenada a -20°C. A partir das soluções estoque foram feitas diluições, de acordo com as concentrações requeridas em cada experimento.

4.3. Determinação das concentrações dos moduladores epigenéticos a serem administradas às células

4.3.1. Avaliação da viabilidade do isolado Pb18 de P. brasiliensis em presença das drogas moduladoras

A avaliação do crescimento de *P. brasiliensis* foi realizada pelo ensaio colorimétrico com o sal sódico XTT (2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-

carboxanilide inner salt, Sigma-Aldrich®) que, ao ser reduzido por enzimas mitocondriais, passa da cor amarela ao tom alaranjado, devido à formação de um de seus derivados formazanos, também solúvel (Berridge *et al.*, 2005; Marshall *et al.*, 1999).

Para verificar o efeito das drogas 5-aza-2'-deoxicitidina (5-AZA), Butirato de sódio (BS) e Tricostatina A (TSA) sobre o crescimento do isolado Pb18, células da forma leveduriforme desse isolado foram incubadas em duas placas de 96 poços (2×10^5 células por poço; volume final de 100µL), em meio DMEM contendo os moduladores epigenéticos em diferentes concentrações, em triplicata: para 5-AZA, testou-se 0,5 µM; 1 µM; 2 µM e 4 µM; para BS, 1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM e 25 mM; e para TSA, 1,5 µM; 3 µM; 6 µM e 9 µM. Uma placa foi incubada a 37°C por 24h, e a outra a 37°C por 48h, ambas sob agitação (150rpm). Após o tempo de incubação de cada placa, foram adicionados 100µL do sal sódico XTT na concentração final de 0,5mg/mL, e as placas incubadas a 37 °C e 5 % CO₂ por cinco horas sob a proteção da luz. Em seguida, as placas foram centrifugadas a 4000 rpm durante 10 minutos, e o sobrenadante de cultura transferido para outra placa de 96 poços, procedendo-se à leitura da absorbância a 490nm empregando-se um espectrofotômetro de placa de 96 poços.

4.3.2. Avaliação da viabilidade dos macrófagos murinos J774 em presença dos moduladores epigenéticos

A viabilidade dos macrófagos J774 foi determinada pelo ensaio colorimétrico com o reagente MTT (brometo 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium; Invitrogen), um sal metabolizado ao nível da cadeia respiratória, principalmente por enzimas desidrogenases, convertendo por uma reação redox o composto solúvel MTT ao composto insolúvel formazano, de coloração roxa. Essa conversão só ocorre em células viáveis, sendo então proporcional ao número de células vivas (Mosmann, 1983; Hussain, Nouri e Oliver, 1993; Freimoser *et al.*, 1999; Stentelairea *et al.*, 2001).

Para verificar o efeito das drogas sobre o crescimento dos macrófagos J774, células viáveis dessa linhagem foram incubadas por 24 ou 48 horas a 37°C e 5% CO₂ em placas de 96 poços (5×10^4 células por poço; volume final de 200µL), em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), na presença dos moduladores epigenéticos em diferentes concentrações, em triplicata: para 5-AZA testou-se 0,1 µM; 0,2 µM; 0,3 µM; 0,4 µM; 0,5 µM; 1 µM; 2 µM e 3 µM; para BS testou-se 1 mM; 2,5 mM; 5 mM e 10 mM; e para TSA testou-se 10 nM; 20 nM; 40 nM; 60 nM e 80 nM. Ao final do tempo de incubação, removeu-se o sobrenadante e 200µL de uma solução contendo 0,5 mg/mL de MTT e 1 µM de

Menadiona em DMEM suplementado com 2% de SFB foram adicionados aos poços. Ao final de quatro horas de incubação a 37°C e 5% CO₂ sob a proteção da luz, o sobrenadante foi descartado e 100µL de DMSO foram adicionados por cinco minutos aos poços para solubilizar o sal de formazano formado no interior das células (Carmichael *et al.*, 1987; Comley e Turner, 1990). Procedeu-se à leitura da absorbância a 490nm empregando-se um espectrofotômetro de placa de 96 poços.

4.4. Determinação do índice de internalização/aderência das leveduras de *P. brasiliensis* pelos macrófagos J774

Para a determinação do índice de internalização/aderência, 10⁵ macrófagos J774 ressuspensos em meio DMEM suplementado com 10 % de SFB foram cultivados em placas de 24 poços a 37 °C e 5 % CO₂ até a sua aderência (cerca de 4h) à placa e duplicação (cerca de 17h). Os macrófagos foram então infectados com um inóculo de leveduras de *P. brasiliensis* ressuspensas em meio DMEM® suplementado com 10 % SFB na proporção de macrófago:levedura 5:1 e incubados por 2h, 4h e 6h, a 37 °C e 5 % CO₂ na presença ou ausência (controle) dos moduladores epigenéticos nas concentrações estabelecidas pelos ensaios de viabilidade, em triplicata. Após o tempo de incubação, os poços foram lavados três vezes com PBS para eliminar os fungos não internalizados ou aderidos, e as células fixadas com 500µL de metanol durante a noite. Após a fixação as amostras foram coradas com Giemsa stain® diluído em água bidestilada e fotografadas em microscópio invertido. Um mínimo de 200 células ou três campos foram fotografados em cada poço, e o número de macrófagos contendo leveduras internalizadas e/ou aderidas foi determinado utilizando-se o programa de computador Image J 1.46 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>). O índice de internalização/aderência foi calculado pelo número total de macrófagos com leveduras internalizadas dividido pelo número total de macrófagos contados por poço, multiplicado por 100, resultando em um índice percentual.

4.5. Avaliação do efeito dos moduladores epigenéticos sobre o acúmulo de transcritos de genes murinos relacionados à resposta imune

4.5.1. Desenho de oligonucleotídeos para genes murinos relacionados à resposta imune

Foram desenhados oligonucleotídeos específicos para alguns genes murinos relacionados à resposta imune: *nf- κ b* (fator de transcrição nuclear kappa B), *tnf- α* (fator de necrose tumoral alfa), *il-6* (interleucina 6) e *myd88* (proteína adaptadora de diferenciação mielóide de resposta primária).

Os oligonucleotídeos foram desenhados com base nas sequências obtidas do banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*; <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>). A partir delas, utilizou-se o *software* Primer 3 <<http://frodo.wi.mit.edu/>> para a identificação de sequências que, selecionadas, foram analisadas com o programa *Oligo Analyzer*, da *Integrated DNA Technologies* (IDT) e sintetizadas pela mesma companhia. As características dos oligonucleotídeos estão descritas na Tabela 01.

O controle interno selecionado para os experimentos de Real Time PCR foi o gene β -actina (ACTB), que codifica para uma das isoformas da proteína citoesquelética actina, e cuja expressão é constitutiva.

Tabela 01. Dados gerais dos oligonucleotídeos sintetizados

Iniciador	Sequencia de nucleotídeos (5'→3')	T _m
ACTB	Actbf: GCAGATGTGGATCAGCAAGC	58°C
	Actbr: CAAAGCCATGCCAATGTTGT	58,1°C
NF- κ B (p105)	nfkbf: AGCCAGCTTCCGTGTTTGT	58,3°C
	nfkbr: AGGGTTTCGGTTCAGTATTCC	58,6°C
TNF- α	tnff: GTACCTTGCTACTCCCAGGTTCTCT	58,4°C
	tnfr: GTGGGTGAGGAGCACGTAGTC	58,3°C
IL-6	il6r: TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC	57°C
	il6f: TAGTCCTTCTACCCCAATTTC	58,4°C
MyD88	myd88f: ACTGGCCTGAGCAACTAGGA	57,2°C
	myd88r: CGTGCCACTACCTGTAGCAA	57,1°C

4.5.2. Infecção *in vitro* dos macrófagos J774 por leveduras de *P. brasiliensis* e extração do RNA total dos macrófagos

Um inóculo de 10^6 macrófagos, a partir de culturas prévias dessas células de duas a seis passagens, foi feito em garrafas de poliestireno de 25 cm² em 5 mL de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. Seguiu-se incubação a 37°C e 5% de CO₂ até que as células estivessem totalmente aderidas (cerca de 4h) e duplicadas (cerca de 17h). Os frascos tiveram então o meio descartado e substituídos por uma das condições testadas: a) meio DMEM suplementado com 10% de SFB; b) meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e uma das drogas moduladoras do estado epigenético na concentração viável selecionada; c) leveduras de *P. brasiliensis* na proporção macrófago:levedura 5:1 em meio DMEM suplementado com 10% de SFB; ou d) leveduras de *P. brasiliensis* na proporção macrófago:levedura 5:1 em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e uma das drogas na concentração viável selecionada. As culturas foram então incubadas a 37°C e 5% CO₂ por vinte e quatro horas. O sobrenadante foi armazenado para posterior dosagem de citocinas, as células aderidas aos frascos foram lavadas três vezes com PBS a 37°C e procedeu-se à extração do RNA total dos macrófagos.

4.5.3. Extração do RNA total dos macrófagos J774

O RNA total das células infectadas e não infectadas foi extraído pela adição de 1mL do reagente TRIzol (Invitrogen®) a cada frasco de cultura, de acordo com as recomendações do fabricante. Após homogeneização, a solução foi transferida a tubos para centrifuga de polipropileno de 1,5mL (livres de DNase, RNase, pirogênios, minerais ou metais pesados), aos quais foram adicionados 200µL de clorofórmio, seguido de vigorosa agitação. Os tubos foram então centrifugados (13680 x g/15min/4°C) e a fase aquosa foi coletada e transferida a um novo tubo, ao qual foram adicionados 500µL de isopropanol, seguindo-se incubação por dez minutos a temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas (13680 x g /10min/4°C) e tiveram seus sobrenadantes descartados. O *pellet* foi lavado duas vezes com 1mL de etanol 75% (13680 x g /5min/4°C) e, após a segunda lavagem, teve seu sobrenadante descartado, sendo colocado para secar a temperatura ambiente. O sedimento foi então ressuspensionado em 50µL de H₂O milliQ livre de RNases. As amostras de RNA tiveram suas concentrações determinadas por espectrofotometria e suas integridades avaliadas por

eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo na concentração final de 0,5 µg/mL, ambos em condições livres de RNases (Sambrook e Russel, 2001).

4.5.4. Tratamento do RNA total com DNase I livre de RNases

Cerca de 10µg de cada amostra de RNA total foram submetidos ao tratamento com DNase I livre de RNases (Promega®) a fim de eliminar contaminação por DNA genômico. As condições de tratamento com DNase I para um volume final de 100 µL foram:

- a) Tampão de reação de DNase 1X
- b) 10U da enzima DNase livre de RNases
- c) 10µg de RNA.

As amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos, e a reação foi finalizada pela adição de 10µL do tampão de inativação da enzima e incubação a 65°C por 10 minutos. O RNA foi então precipitado com etanol 100%, acetato de sódio 0,3 M e glicogênio na concentração de 50 µg/mL, a -20°C durante a noite (Sambrook e Russel, 2001). Após centrifugação (13680 x g /5min/4°C), o sedimento foi lavado duas vezes com 1mL de etanol 75% (13680 x g /5min/4°C) e, após a segunda lavagem, teve seu sobrenadante descartado, sendo colocado para secar em temperatura ambiente e ressuspensionado em 15µL de H₂O miliQ livre de RNases. O RNA total tratado com DNase I livre de RNases foi novamente quantificado por espectrofotometria e avaliado quanto à integridade por eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo na concentração final de 0,5 µg/mL, ambos em condições livres de RNases (Sambrook e Russel, 2001).

4.5.5. Síntese dos cDNAs

Após o tratamento com DNase I, a primeira fita de DNA complementar (cDNA) foi sintetizada a partir de 2µg de cada amostra de RNA. A essa quantidade de RNA total foi adicionado 1,0 µg do iniciador Oligo(dT)₁₈ (IDT®) e 1,0 µL de dNTP Mix (10 mM), ajustando-se o volume com H₂O Milli Q para 13,0 µL. A mistura foi incubada a 65°C por cinco minutos, seguida de resfriamento imediato por incubação no gelo por cerca de um minuto. Um volume de 7µL da mistura abaixo foi então adicionado a cada amostra:

- a) Tampão de transcriptase reversa 1X;
- b) DTT 8,0mM;
- c) 0,4mM dNTPs;
- d) 200U da enzima de transcriptase reversa, SuperScript™ III (Invitrogen®).

As amostras foram incubadas então a 50°C por uma hora, seguido por aquecimento a 70°C por quinze minutos para inativação da enzima.

4.5.6. PCR quantitativo em tempo real

A reação de PCR em tempo real foi realizada empregando-se o equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems®), preparada em um volume final de 10µL para cada amostra, contendo:

- a) 5,0µL de SyBr Green Master Mix (Applied Biosystems®);
- b) 0,4 µM de cada oligonucleotídeo (*forward* e reverso), listados na tabela 1;
- c) 1,0µL da diluição 1:8 dos cDNAs obtidos na reação de síntese.

As condições de ciclagem foram as programadas para o reagente SyBr Green, sendo compostas por:

- (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) 40 vezes.

A utilização de SyBr Green demanda cuidadosa padronização, pois este fluoróforo intercala-se a qualquer dupla fita de DNA presente na reação, o que pode afetar a quantificação do produto de PCR específico pela formação de dímeros de oligonucleotídeos ou de produtos de PCR inespecíficos. A fim de confirmar a especificidade da amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à análise da curva de desnaturação (*melting curve*), na qual cada fragmento de DNA amplificado, com uma temperatura de dissociação (T_m) específica, pode ser diferenciado entre os produtos resultantes.

4.5.6.1. Análise do acúmulo de transcritos de genes murinos relacionados à resposta imune

O método utilizado para a avaliação da variação do acúmulo de transcritos foi o de comparação do valor dos ciclos para o *threshold* (C_T), que é ajustado na região associada a um crescimento exponencial dos produtos de PCR (Livak e Schmittgen, 2001). A quantidade

de transcritos do gene alvo é normalizada em relação à referência endógena (ACTB) e a um calibrador, que geralmente é a amostra controle. Os dados têm como base de cálculo a equação $2^{-\Delta\Delta C_T}$, onde $\Delta\Delta C_T = (\Delta C_T \text{ experimento} - \Delta C_T \text{ controle})$, $\Delta C_T \text{ experimento} = (C_T \text{ do gene de interesse no experimento} - C_T \text{ do gene constitutivo no experimento})$ e $\Delta C_T \text{ controle} = (C_T \text{ gene de interesse no controle} - C_T \text{ gene constitutivo no controle})$. A equação $2^{-\Delta\Delta C_T}$ é baseada na amplificação exponencial da PCR e sua derivação e validação foram anteriormente descritas (Livak e Schmittgen, 2001).

4.6. Dosagem de citocinas no sobrenadante de culturas de macrófagos

Os sobrenadantes das culturas de infecção *in vitro* dos macrófagos J774 por leveduras de *P. brasiliensis* foram centrifugados a $850 \times g$ por 8 minutos para a remoção de leveduras ou células. Os sobrenadantes desta centrifugação foram então coletados e transferidos para novos tubos para centrífuga de polipropileno de 2,0mL e armazenados a -20°C até o momento do uso.

A dosagem de citocinas foi realizada pelo método de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), um teste imunoenzimático que permite a detecção de anticorpos específicos, com o kit imunoenzimático eBioscience®. Utilizando-se uma placa de 96 poços de fundo chato, foram adicionados aos poços 50 μL de solução do anticorpo de captura (eBioscience®) diluídos em PBS 1X segundo a concentração de uso específica para cada anticorpo, e utilizando um anticorpo específico para cada placa. As placas foram então cobertas com filme de PVC e incubadas a 4°C durante a noite. O sobrenadante foi então descartado vertendo-se diretamente a placa sobre um recipiente de descarte e os poços lavados por cinco vezes com tampão de lavagem (PBS-Tween 0,05%), permitindo-se uma incubação de um minuto com esse tampão. Em seguida, as placas foram bloqueadas com 50 μL do diluente de ensaio 1X (*assay diluent*, eBioscience®), composto por albumina de soro bovina (BSA), por uma hora a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as placas foram novamente lavadas por cinco vezes com tampão de lavagem, como descrito anteriormente. Em seguida, foram feitas diluições seriadas do TNF- α recombinante (*recombinant TNF- α* , eBioscience®) nos poços apropriados. As amostras foram agitadas vigorosamente em *vortex* para a perfeita diluição de seus componentes e foram adicionados 50 μL aos demais poços das placas, que foram incubadas a 4°C durante a noite. Em seguida, os

sobrenadantes foram descartados e as placas lavados como anteriormente. Foram acrescentados aos poços 50µL do anticorpo de detecção específico (*detection Ab*, eBioscience®) diluído no diluente de ensaio (*assay diluent*, eBioscience®) e incubados por uma hora em temperatura ambiente. Após nova lavagem como as anteriores, foram adicionados 50µL de estreptavidina (*Avidin-HRP*, eBioscience®), seguindo-se incubação por 30 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado, e as placas foram lavadas sete vezes como anteriormente. Foram adicionados então 50µL de solução de substrato (*Substrate Solution*, eBioscience®) às placas, que foram incubadas sob a proteção da luz por quinze minutos. Por fim, foram adicionados 50µL de solução de parada e as reações foram analisadas quanto à absorbância a 450nm em espectrofotômetro de placa de 96 poços.

4.7. Análise Estatística dos Resultados

4.7.1. Avaliação da viabilidade do isolado Pb18 de P. brasiliensis e dos macrófagos murinos J774 em presença de moduladores epigenéticos

Foram feitas as normalizações dos resultados com o teste de Shapiro-Wilk para verificar se as análises de variância (ANOVA) foram respeitadas. Satisfeita essa condição, foi feito o teste *two-way* ANOVA e o pós-teste de Bonferroni, comparando-se os dois parâmetros testados, tempo e concentração dos moduladores epigenéticos, comparados com o controle, somente células. Valores de *p* inferiores a 0,05 representam uma diferença estatística significativa entre os grupos.

4.7.2. Análise do acúmulo de transcritos de genes murinos relacionados à resposta imune

Para a análise destes dados, foram feitas as normalizações dos resultados com o teste de Shapiro-Wilk para verificar se as análises de variância (ANOVA) foram respeitadas. Satisfeita essa condição, foi realizado o teste *one-way* ANOVA e o pós-teste de Tukey, que compara todos os pares de colunas, utilizando-se os resultados obtidos pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Valores de *p* inferiores a 0,05 representam uma diferença estatística significativa entre os grupos.

4.7.3. Análise da dosagem de citocinas no sobrenadante

Para a análise destes dados, foram feitas as normalizações dos resultados com o teste de Shapiro-Wilk para verificar se as análises de variância (ANOVA) foram respeitadas. Satisfeita essa condição, foi realizado o teste *one-way* ANOVA e o pós-teste de Tukey, que compara todos os pares de colunas. Valores de p inferiores a 0,05 representam uma diferença estatística significativa entre os grupos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Efeito das drogas moduladoras de estados epigenéticos sobre o crescimento e viabilidade de *P. brasiliensis* e de macrófagos da linhagem ATCC J774

5.1.1. *Paracoccidioides brasiliensis*

Para a avaliação do efeito das drogas epigenéticas 5-AZA, TSA e BS sobre o crescimento do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* leveduras foram crescidas em diferentes concentrações de cada modulador epigenético, em triplicata, por 24h e 48h.

Ao analisar o efeito de 5-AZA sobre as leveduras de *P. brasiliensis*, verificou-se que as células fúngicas permanecem viáveis em concentrações que variam de 0,5 μM a 4 μM , durante 24h e 48h de contato com o modulador (Figura 5A). Da mesma forma, concentrações milimolares de butirato de sódio (BS), entre 1 mM e 20 mM também não influenciaram a viabilidade das leveduras (Figura 5B). Esse dado confirma achados da literatura de que esse inibidor exerce suas atividades farmacológicas em concentrações milimolares em células de mamífero e fungos patogênicos, como *C. albicans* e *C. neoformans* (Gilbert *et al.*, 2001; Nguyen *et al.*, 2011). TSA, testada em concentrações entre 1,5 μM e 9 μM , também se mostrou compatível com a viabilidade do isolado de *P. brasiliensis* por 24h e 48h (Figura 5C). Com relação ao controle do experimento com TSA, que apresentou resultado distinto dos controles com outras drogas, esclarecemos que os dados de TSA refletem informações obtidas em experimentos distintos, e os resultados encontrados podem refletir diferenças no inóculo inicial de leveduras (Figura 05).

5.1.2. Macrófagos da linhagem ATCC J774

O efeito de 5-AZA, BS e TSA sobre o crescimento e a viabilidade de J774 foi analisado quando do tratamento dessa linhagem celular com diferentes concentrações das três drogas testadas em triplicata, durante intervalos de 24h e 48h.

Concentrações de 5-AZA entre 0,1 μM e 2 μM não afetam o crescimento ou a viabilidade de J774 em um intervalo de 24h (Figura 6A). Sendo assim, definiu-se a concentração de 1 μM de 5-AZA como viável ao crescimento normal de J774 por até 48h (Figura 6A). Quando linhagens celulares de mieloma humano são tratadas com 5-AZA em concentrações entre 1 μM e 20 μM , Khong *et al.* (2008) percebem uma sobrevivência celular

prolongada em mais de sete dias. É curioso observar que concentrações de 3 μM e 2 μM levaram a um aumento no número de macrófagos viáveis em 24h e 48h de tratamento, respectivamente (Figura 6A).

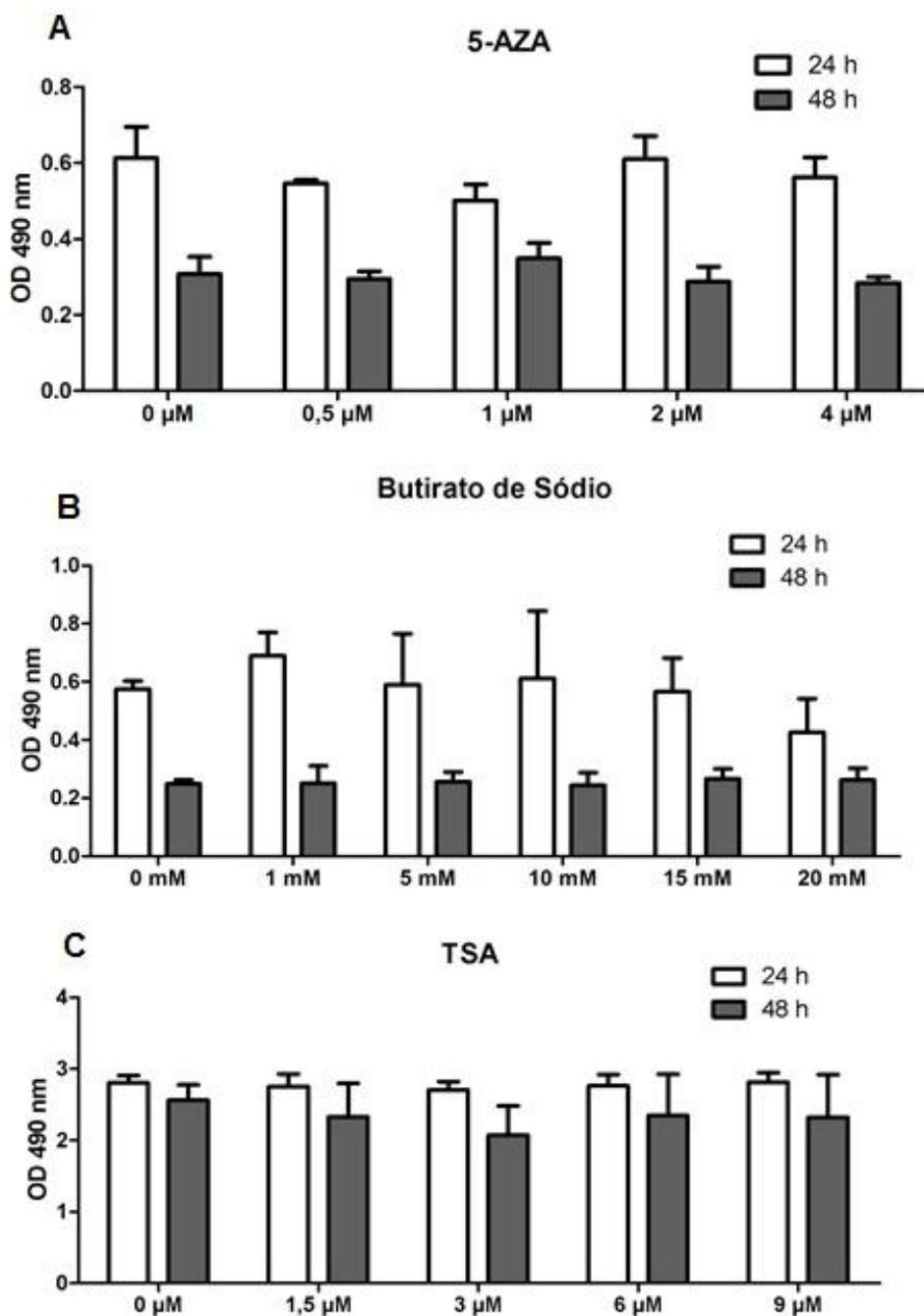


Figura 05. Efeito de drogas moduladoras de estados epigenéticos sobre o crescimento e viabilidade de *P. brasiliensis*. O crescimento das leveduras do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* foi medido pela análise com XTT após 24h e 48h de tratamento com (A) 5-aza-2'-deoxi-citidina (5-AZA), (B) Butirato de Sódio (BS) e (C) Tricostatina A (TSA). A formação do derivado formazano de XTT foi avaliada a 490nm. Os dados são derivados do

experimento em triplicata (média \pm desvio-padrão) e não apresentam diferença significativa quando diferentes concentrações são comparadas no mesmo intervalo de tempo.

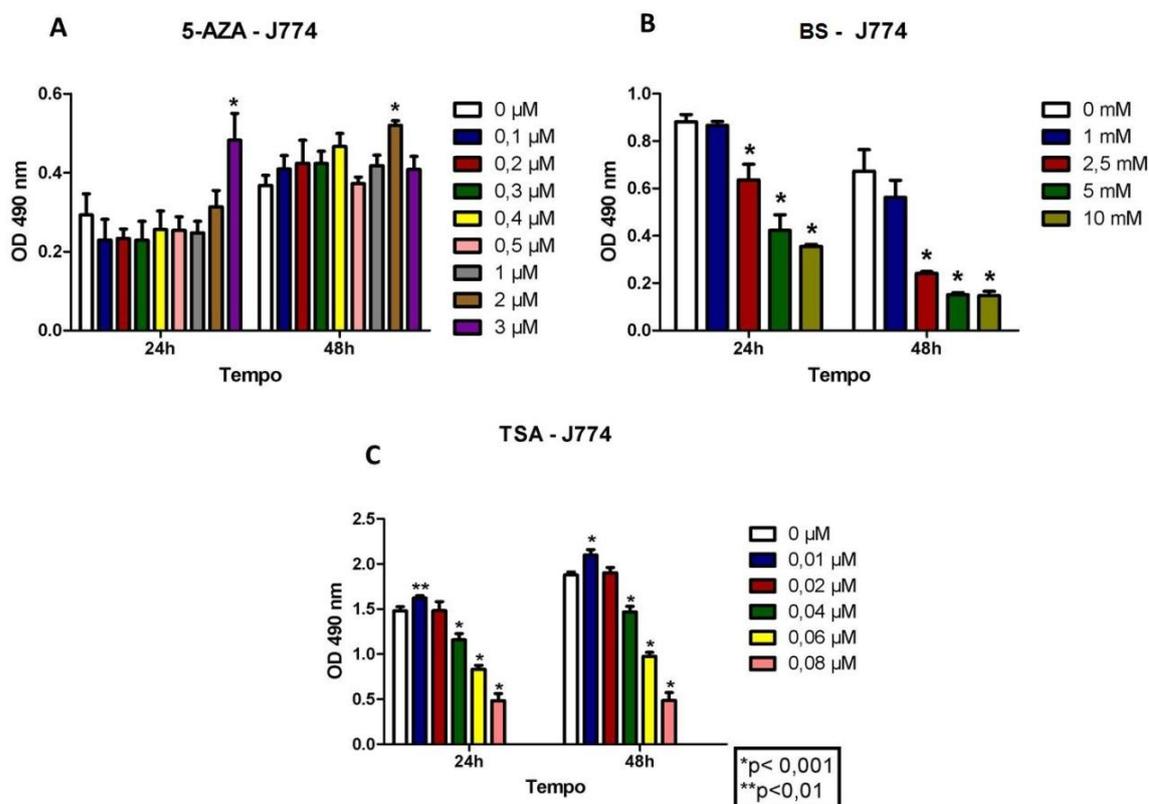


Figura 06. Efeito de drogas moduladoras de estados epigenéticos sobre o crescimento e viabilidade de macrófagos da linhagem ATCC J774. O crescimento das células J774 foi medido pela análise com MTT após 24h e 48h de tratamento com (A) 5-aza-2'-deoxi-citidina (5-AZA), (B) Butirato de Sódio (BS) e (C) Tricostatina A (TSA). A formação do derivado formazano de MTT foi avaliada a 490nm. Os dados são derivados do experimento em triplicata (média \pm desvio-padrão); *p<0,001; **p<0,01.

A análise do efeito do butirato de sódio sobre a viabilidade de células J774 revela uma diminuição do crescimento em concentrações de 2,5 mM, 5 mM e 10 mM, nos intervalos de 24h e 48h (Figura 6B). Sendo assim, a concentração determinada como viável ao crescimento da linhagem celular de J774 na presença de butirato de sódio por até 48h foi de 1 mM (Figura 6B). Nguyen *et al.* (2011) relataram que a mesma linhagem de macrófagos murinos mantém seu crescimento inalterado em concentração de 20 mM e 40 mM, no entanto em intervalos de tempo inferiores ao do presente estudo (2h e 4h) (Nguyen *et al.*, 2011).

TSA foi o modulador epigenético com concentrações mais tóxicas aos macrófagos: a tolerância a essa droga foi de 0,02 μ M (Figura 6C). Curiosamente, a 0,01 μ M levou a um aumento o seu crescimento em ambos os intervalos de tempo, 24h e 48h (Figura 6C). A

concentração de TSA definida para os experimentos subsequentes foi então fixada em 0,02 μM .

A análise morfológica após 24h da administração de diferentes concentrações dos moduladores epigenéticos às células J774 revelou que estas não apresentaram alteração da forma ou do tamanho em relação ao controle não tratado quando em presença de concentrações viáveis de 5-AZA ou BS (Figura 7B-E). Entretanto, a concentração determinada como viável de TSA levou a uma ligeira alteração da forma fusiforme desses macrófagos em favor de uma forma levemente ovoide na maioria da população celular (Figura 7F). Como descrito pelo ensaio de viabilidade dessas células, concentrações maiores que 0,02 μM de TSA são tóxicas às células (Figura 7G).

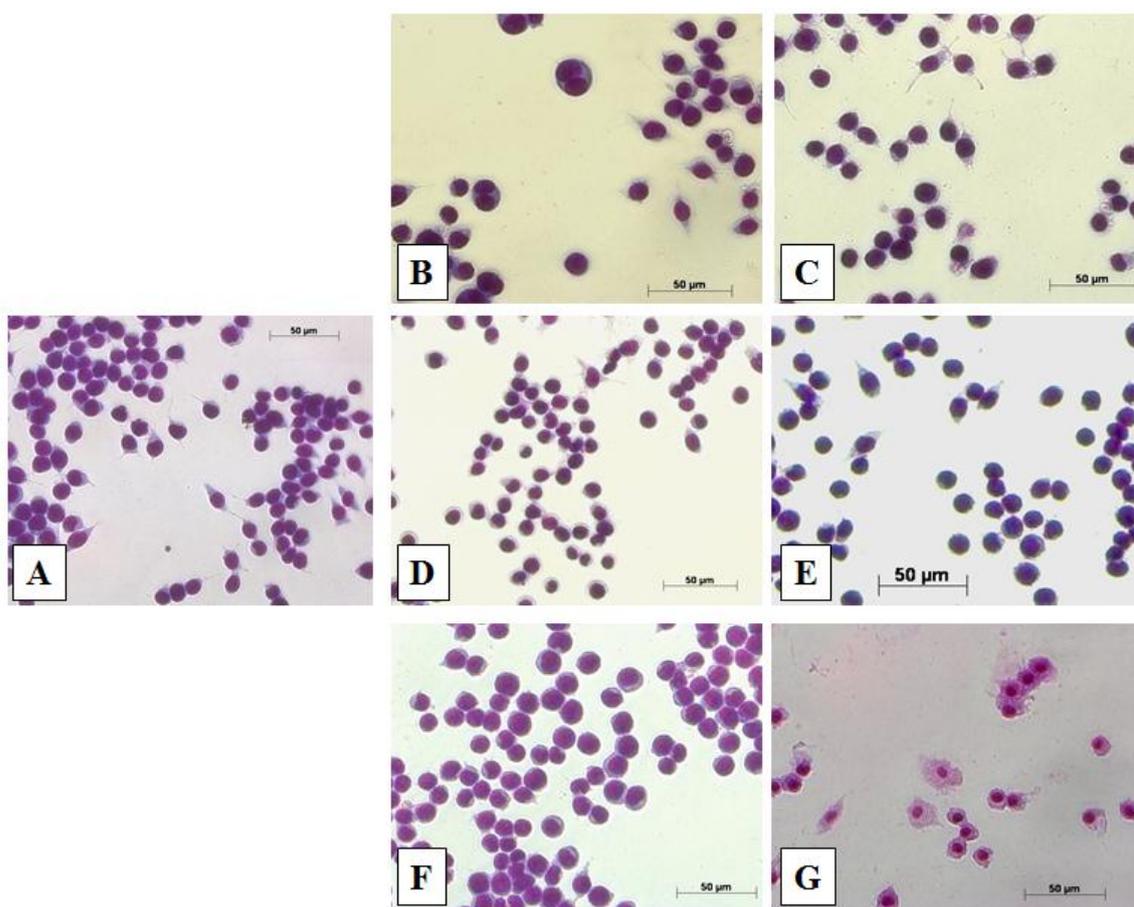


Figura 07. Efeito de drogas moduladoras de estados epigenéticos sobre a morfologia de macrófagos da linhagem ATCC J774. As células J774 foram mantidas em contato com (B) 1 μM de 5-AZA; (C) 2 μM de 5-AZA; (D) 1mM de BS; (E) 5mM de BS; (F) 0,02 μM de TSA; (G) 3 μM de TSA ou (A) na ausência de drogas por 24 horas, seguidas de coloração com Giemsa Stain® e análise por microscópio invertido, no aumento de 32x.

5.2. Efeito das drogas moduladoras de estados epigenéticos sobre a internalização de *P. brasiliensis* por macrófagos da linhagem J774

*5.2.1. Análise do efeito dos moduladores epigenéticos sobre o índice de internalização de leveduras de *P. brasiliensis* por células J774*

Para a análise do efeito dos moduladores epigenéticos 5-AZA, BS e TSA sobre a internalização de leveduras do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* pelos macrófagos peritoneais murinos J774, estes foram infectados com o fungo por 2h, 4h e 6h em triplicata para cada intervalo de tempo, na presença ou ausência de cada droga nas concentrações viáveis determinadas anteriormente (Figuras 5 e 6). Foi calculado o índice de internalização/aderência das leveduras pelos macrófagos, visto que não é possível determinar a diferença entre leveduras aderidas ou internalizadas pelos macrófagos neste tipo de preparação microscópica, então, não foi possível calcular o índice de fagocitose.

O tratamento de macrófagos infectados por leveduras de *P. brasiliensis* com 1 μ M de 5-AZA aumentou o índice de internalização/aderência nos intervalos de duas e seis horas de infecção (Figura 8). Este é um dado inédito sobre a influência de um inibidor de metiltransferase sobre a interação patógeno-hospedeiro neste modelo de infecção, e pode indicar tanto uma resposta imune inata da célula hospedeira amplificada quanto uma repressão da capacidade evasiva do patógeno, visto que ambos estiveram em contato com o iDNMT por iguais intervalos de tempo. É interessante observar que essa mesma droga foi capaz de aumentar a proliferação de macrófagos em concentrações maiores anteriormente testadas (Figura 6A). Dessa forma, infere-se a possibilidade do desenvolvimento de uma resposta imune amplificada pela célula hospedeira quando infectada pelo fungo em detrimento da repressão da capacidade evasiva fúngica, causada pela administração de 5-AZA (Figura 8).

Foi verificado que o butirato de sódio na concentração de 1 mM aumentou a internalização/aderência das leveduras de *P. brasiliensis* pelos macrófagos após duas horas de infecção (Figura 8). Recentemente Nguyen *et al.* (2011) apresentam dados semelhantes relacionados à internalização de *C. albicans* e *C. neoformans* pela mesma linhagem de macrófagos. Nessa publicação, uma concentração de 40 mM de butirato de sódio (quarenta vezes maior que a concentração utilizada em nosso estudo) mostrou-se capaz de aumentar significativamente tanto a fagocitose das leveduras dos dois patógenos pelos macrófagos quanto o combate e morte das leveduras fagocitadas pelos macrófagos (Nguyen *et al.*, 2011).

Por fim, TSA foi a única entre as três drogas administradas que não alterou o número de leveduras internalizadas/aderidas pelos macrófagos em nenhum intervalo de tempo (Figura 8). Foi realizado um ensaio de internalização com 24h e 48h (dados não mostrados), mas nestes intervalos de tempo não foi possível verificar internalização das leveduras de *P. brasiliensis* pelos macrófagos de forma significativa.

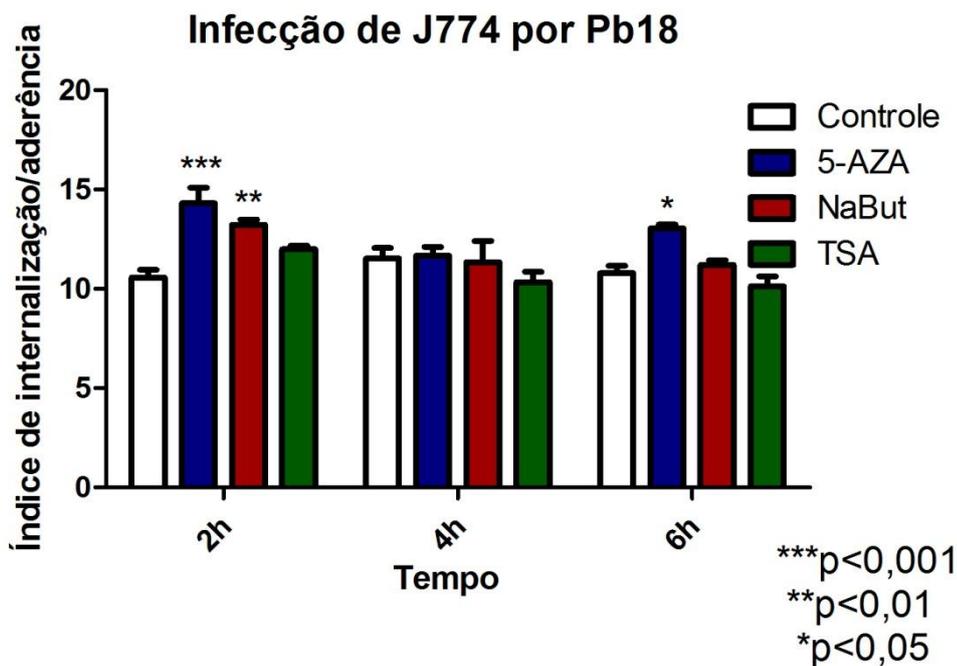


Figura 08. Efeito de drogas moduladoras de estados epigenéticos sobre a internalização de *P. brasiliensis* pelas células J774. O tratamento com os moduladores epigenéticos 5-aza-2'-deoxi-citidina (5-AZA), Butirato de Sódio (BS) e Tricostatina A (TSA) foi realizado durante a infecção dos macrófagos murinos pelas leveduras do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* por 2h, 4h ou 6h, seguida de coloração das células com o corante Giemsa Stain® e posterior contagem do número de células contendo leveduras internalizadas/aderidas dividido pelo número total de células contabilizadas para cada amostra. Representativo de um experimento em triplicata. Os dados são derivados do experimento em triplicata (média ± desvio-padrão); *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

5.2.2. Análise do efeito dos moduladores epigenéticos sobre a morfologia de macrófagos J774 infectados por leveduras de *P. brasiliensis*

A análise morfológica das amostras referentes à internalização das leveduras pelos macrófagos revelou que o tamanho ou a forma dos macrófagos não são alterados em virtude do tratamento com 5-AZA ou BS em nenhum dos intervalos testados, quando comparadas às amostras sem a presença das drogas (Figuras 9.1 a 9.4). No entanto, a mesma alteração

morfológica apresentada anteriormente no tratamento de macrófagos com TSA (Figura 7F) pode ser observada quando macrófagos são infectados pelas leveduras de *P. brasiliensis* e tratadas com TSA por 6h (Figura 9.4).

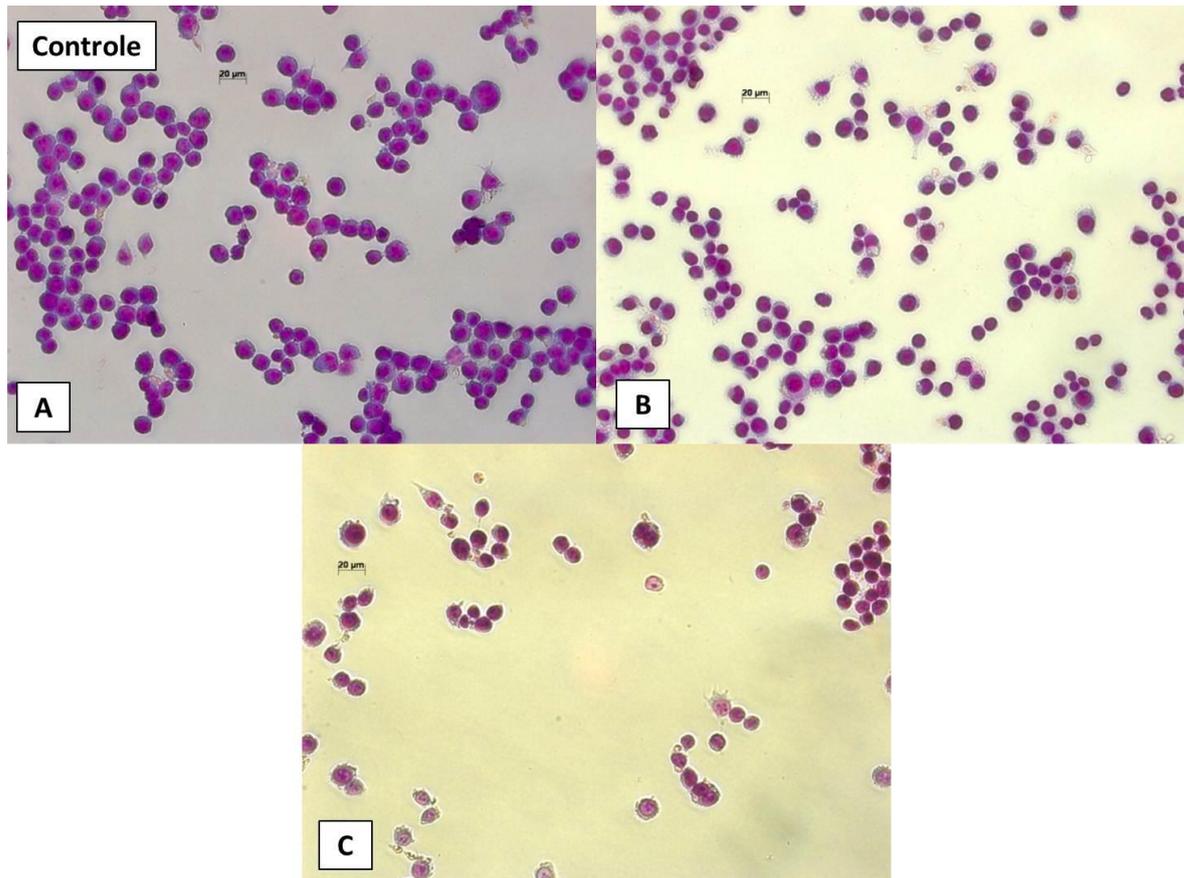


Figura 9.1. Morfologia de macrófagos da linhagem ATCC J774 infectados por *P. brasiliensis*. Infecção dos macrófagos murinos pelas leveduras do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* por 2h (A), 4h (B) ou 6h (C), seguida de coloração das células com o corante Giemsa Stain® e posterior análise em microscópio invertido, no aumento 32x.

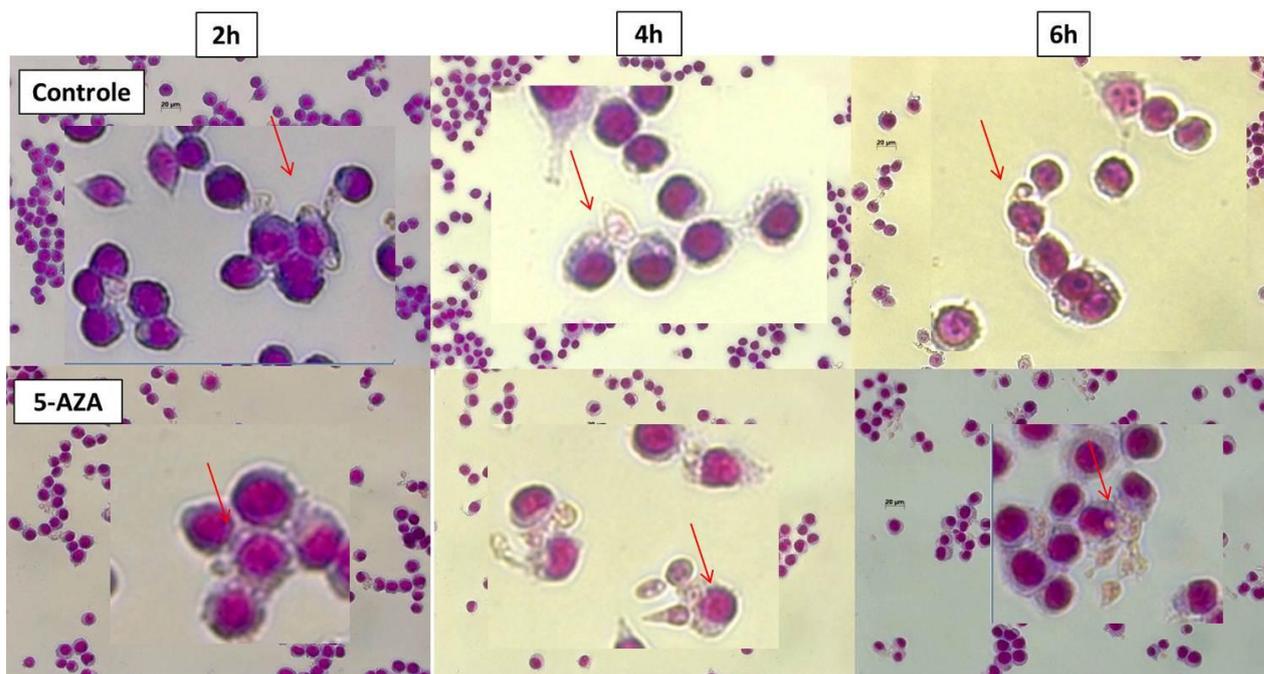


Figura 9.2. Efeito de 5-AZA sobre a morfologia de macrófagos da linhagem ATCC J774 infectados por *P. brasiliensis*. O tratamento com iDNMT 5-aza-2'-deoxi-citidina (5-AZA) foi realizado durante a infecção dos macrófagos murinos pelas leveduras do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* por 2h , 4h ou 6h, seguida de coloração das células com o corante Giemsa Stain® e posterior análise em microscópio invertido, no aumento 32x.

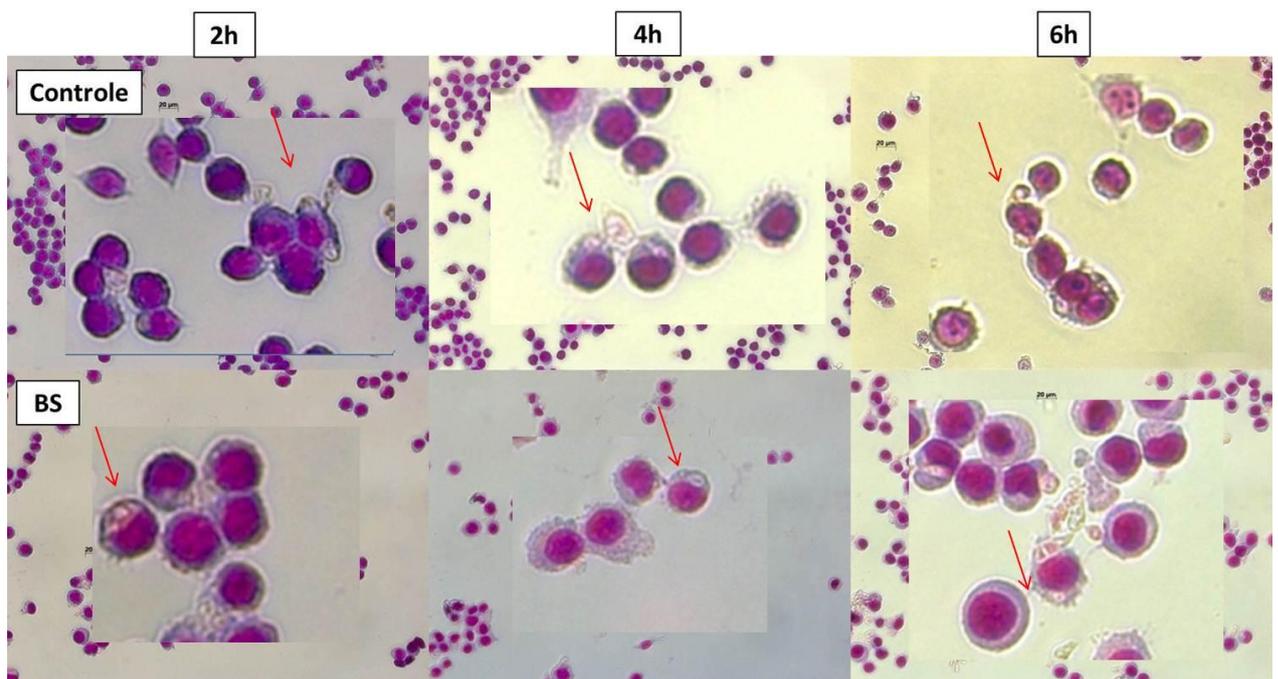


Figura 9.3. Efeito de BS sobre a morfologia de macrófagos da linhagem ATCC J774 infectados por *P. brasiliensis*. O tratamento com o iHDAC Butirato de Sódio (BS) foi realizado durante a infecção dos macrófagos murinos pelas leveduras do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* por 2h, 4h ou 6h, seguida de coloração das células com o corante Giemsa Stain® e posterior análise em microscópio invertido, no aumento 32x.

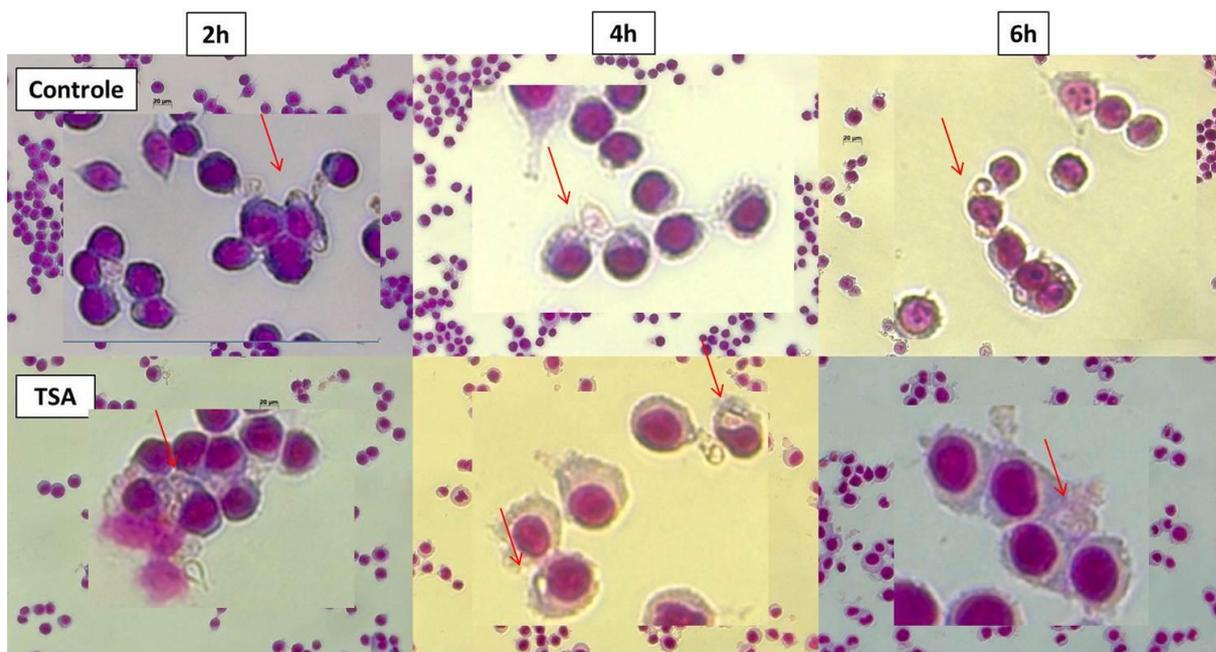


Figura 9.4. Efeito da TSA sobre a morfologia de macrófagos da linhagem ATCC J774 infectados por *P. brasiliensis*. O tratamento com o iHDAC Tricostatina A (TSA) foi realizado durante a infecção dos macrófagos murinos pelas leveduras do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* por 2h, 4h ou 6h, seguida de coloração das células com o corante Giemsa Stain® e posterior análise em microscópio invertido, no aumento 32x.

5.3. Análise da ação de moduladores epigenéticos sobre o acúmulo de transcritos de mensageiros da resposta imune inata do hospedeiro

Drogas moduladoras de estados epigenéticos podem levar ao restabelecimento da expressão de genes silenciados tanto pela indução da desmetilação das regiões promotoras por iDNMTs, como faz 5-AZA, quanto pela inibição da desacetilação de histonas pelos iHDACs, BS e TSA; em ambos os casos levando a uma maior acessibilidade de regiões codantes do DNA ao aparato transcricional (Vaissiere *et al.*, 2008; Kawamoto *et al.*, 2007; Dong *et al.*, 2007). Em *C. albicans*, a administração de moduladores epigenéticos aumentou a susceptibilidade a agentes antifúngicos (Lohse e Johnson, 2010). Apesar disso, a escassez de dados moleculares sobre a administração de drogas moduladoras de estados epigenéticos na interação patógeno-hospedeiro abre uma grande lacuna entre os efeitos epigenéticos e suas bases moleculares.

Neste contexto, foi realizada a análise do acúmulo de mensageiros de determinados genes a partir do RNA total dos macrófagos J774 infectados ou não (controle) por leveduras de *P. brasiliensis* durante 24h, tratados ou não (controle) com os moduladores epigenéticos nas concentrações viáveis às células J774, conforme descrito no item 5.1.2 (tabela 02). O perfil eletroforético do RNA total recuperado dos macrófagos das amostras em triplicata, conforme descrito na tabela 02, seguido de tratamento com DNase I livre de RNAses para eliminar possível contaminação com DNA genômico é mostrado na figura 10.

Tabela 02. Grupos experimentais de macrófagos infectados por *P. brasiliensis* e tratados com drogas moduladoras dos estados epigenéticos. MØ = macrófago.

Grupo	Amostra correspondente
1	MØ
2	MØ + droga moduladora do estado epigenético
3	MØ + Pb18
4	MØ + Pb18 + droga moduladora do estado epigenético

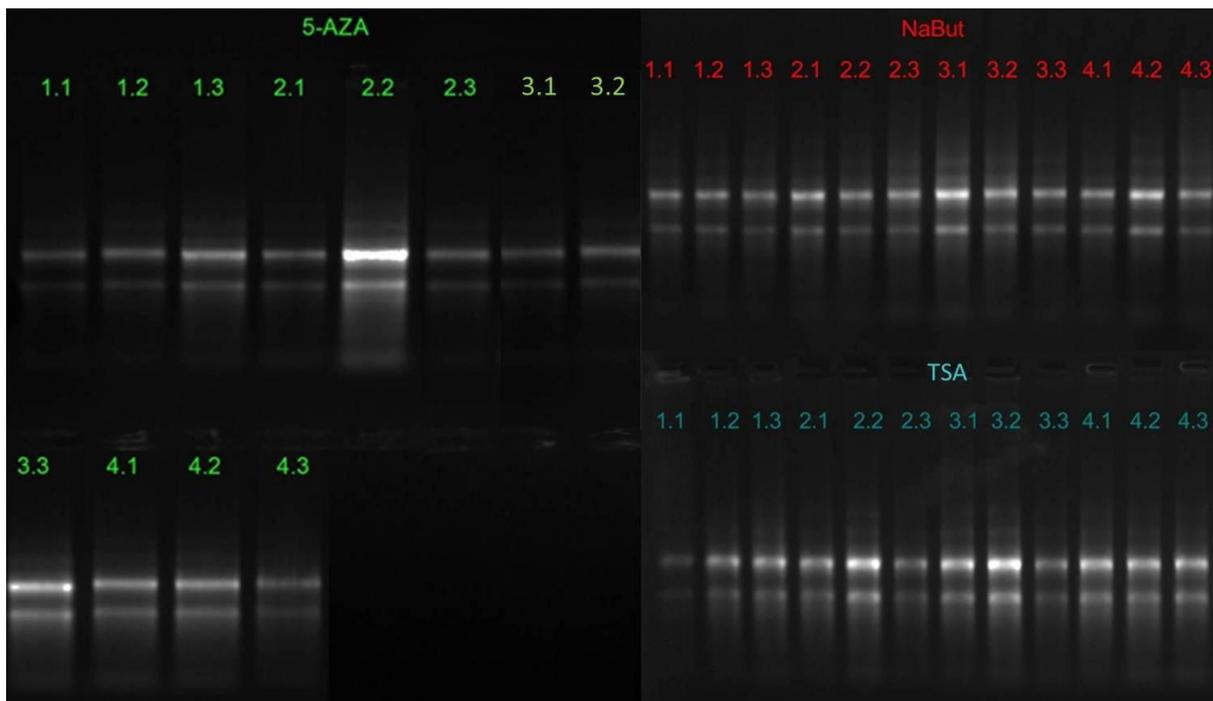


Figura 10. Perfil eletroforético do RNA total extraído de macrófagos infectados ou não por 24h com o isolado Pb18 de *P. brasiliensis*, em cultivos contendo moduladores epigenéticos, tratados com DNase I livre de RNases. Aproximadamente 0,5µg de RNA total de cada amostra foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL.

A figura 10 revela integridade dos RNAs ribossomais e a ausência de sinais de presença de DNA genômico, validando assim o RNA total obtido dos macrófagos para uso em experimentos posteriores. Após a confirmação da ausência de DNA genômico por PCR (dados não mostrados), o RNA total foi utilizado para a construção do cDNA e, do total sintetizado, uma alíquota foi empregada para análise por PCR em tempo real do padrão de acúmulo de mensageiros de alguns genes do hospedeiro: *MYD88* (proteína adaptadora), *NF-KB* (fator de transcrição nuclear), *TNF- α* (fator de necrose tumoral, amplificador da resposta imune) e *IL-6* (interleucina reguladora da resposta imune). O controle interno utilizado foi o gene de β -actina, *actb*.

5.3.1. Análise do efeito dos moduladores epigenéticos sobre o acúmulo dos mensageiros de *MyD88* em células J774 infectadas por *P. brasiliensis*

A proteína adaptadora MyD88 é recrutada durante a ativação de vários TLRs, inclusive TLR4, ativado por PAMPs de diferentes classes fúngicas (revisto por Mogensen,

2009). Dessa forma, essa é uma proteína alvo de investigações que podem esclarecer, no nível molecular, vias ativadas e/ou reprimidas pela infecção de macrófagos por *P. brasiliensis*.

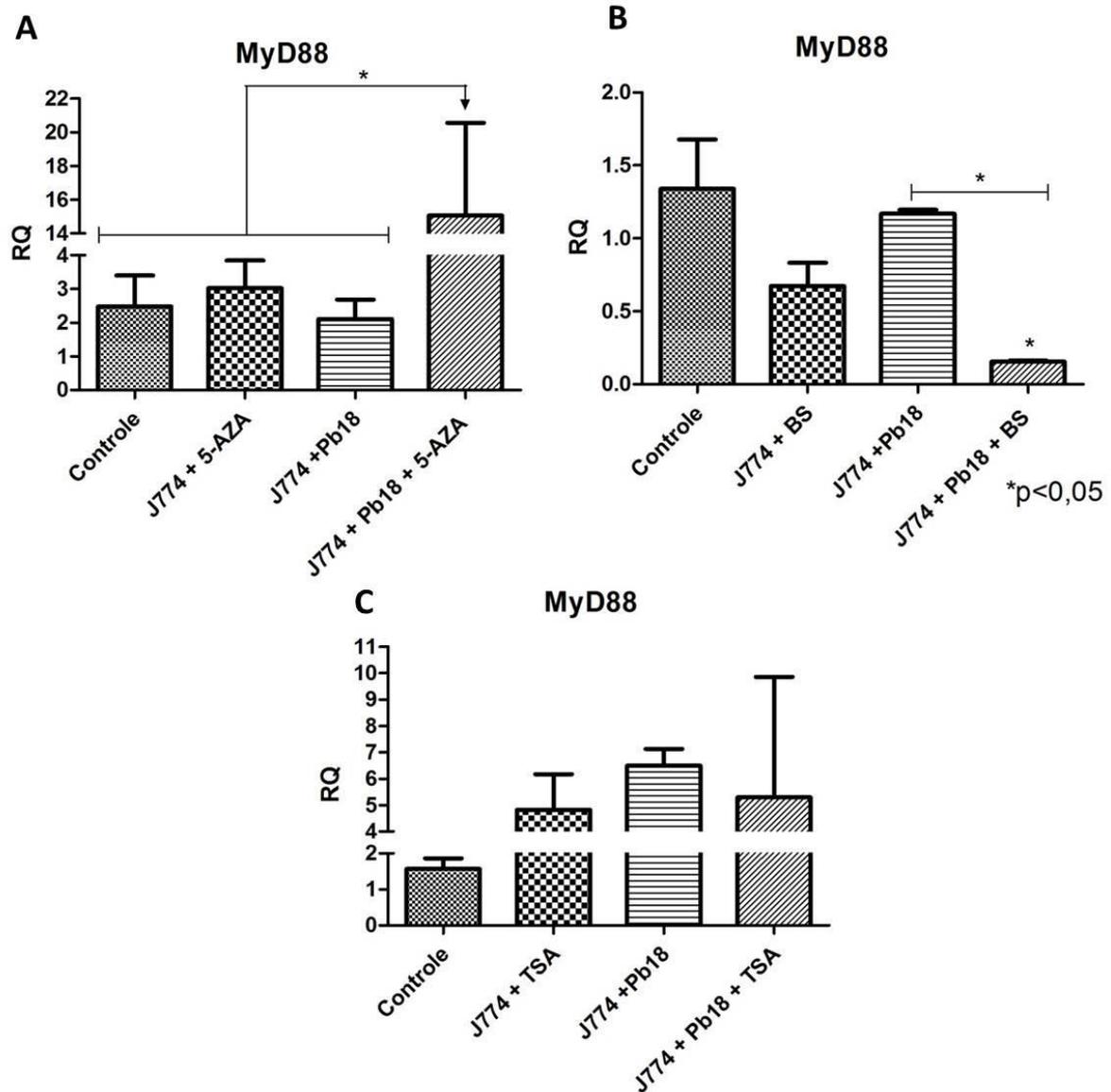


Figura 11. Acúmulo dos mensageiros de MyD88 em células J774 quando infectadas por *P. brasiliensis* e tratadas com moduladores epigenéticos durante 24h. O acúmulo de mensageiros de MyD88 foi calculado segundo o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ quando macrófagos infectados ou não (controle) por *P. brasiliensis* foram tratados ou não (controle) com (A) 5-AZA, (B) BS ou (C) TSA. Experimento em duplicata. As barras de erro indicam o erro padrão da média (SEM); *a* e *b* são estatisticamente distintos; $p < 0,05$.

A figura 11A revela que o tratamento de macrófagos infectados pelas leveduras de *P. brasiliensis* com 5-AZA provocou considerável aumento nos níveis de transcritos de MyD88, comparado a todos os outros grupos. O resultado obtido pode sugerir a existência de mecanismos celulares sinalizados por MyD88 na ativação de vias moleculares que participam da resposta imune às leveduras e que essa sinalização seja amplificada em uma situação de desmetilação do DNA.

Quando foi realizada a administração de butirato de sódio, o grupo de macrófagos infectados por *P. brasiliensis* e tratados com o modulador epigenético apresentou considerável redução dos níveis de mensageiros de MyD88, em relação ao controle e ao grupo de macrófagos infectados pelas leveduras e sem tratamento com a droga (Figura 11B). TSA pareceu não afetar de forma significativa os níveis de transcritos desse gene sob as condições testadas (Figura 11C). Assim, a acetilação de histonas não parece afetar a regulação de MyD88 em nosso modelo experimental. 5-AZA e BS agem por mecanismos epigenéticos distintos, apesar de funcionarem em conjunto. Dessa forma, a ação sobre diferentes enzimas pode explicar o efeito contrário que foi encontrado com a administração dessas drogas moduladoras de estados epigenéticos.

Loures *et al.* (2011) verificaram que a ausência de MyD88 em macrófagos peritoneais murinos leva a lesões fúngicas severas em vários órgãos e ao aumento da mortalidade no modelo murinho utilizado. Nossos resultados, junto a achados anteriores, podem indicar o crítico papel de MyD88 na ativação de resposta imune de macrófagos em contato com leveduras de *P. brasiliensis*, possivelmente em favor da resposta do hospedeiro. Experimentos posteriores, como a contagem das unidades formadoras de colônias de macrófagos infectados por *P. brasiliensis* sob a ação dessa droga poderiam elucidar a ação de 5-AZA sobre o fungo e sobre as células hospedeiras. Nesse sentido, 5-AZA poderia ser investigada como potencial adjuvante do tratamento da PCM.

5.3.2. Análise do efeito dos moduladores epigenéticos sobre o acúmulo dos mensageiros de NF- κ B nas células J774 infectadas por *P. brasiliensis*

Como descrito anteriormente, NF- κ B é um dos mediadores das respostas imune adaptativa e inata, e nesta última pode ser ativado por meio do sinal desencadeado por grande parte dos TLRs, quando estimulados por PAMPs, por vias que podem recrutar também MyD88 (Mogensen, 2009; Newton e Dixit, 2012).

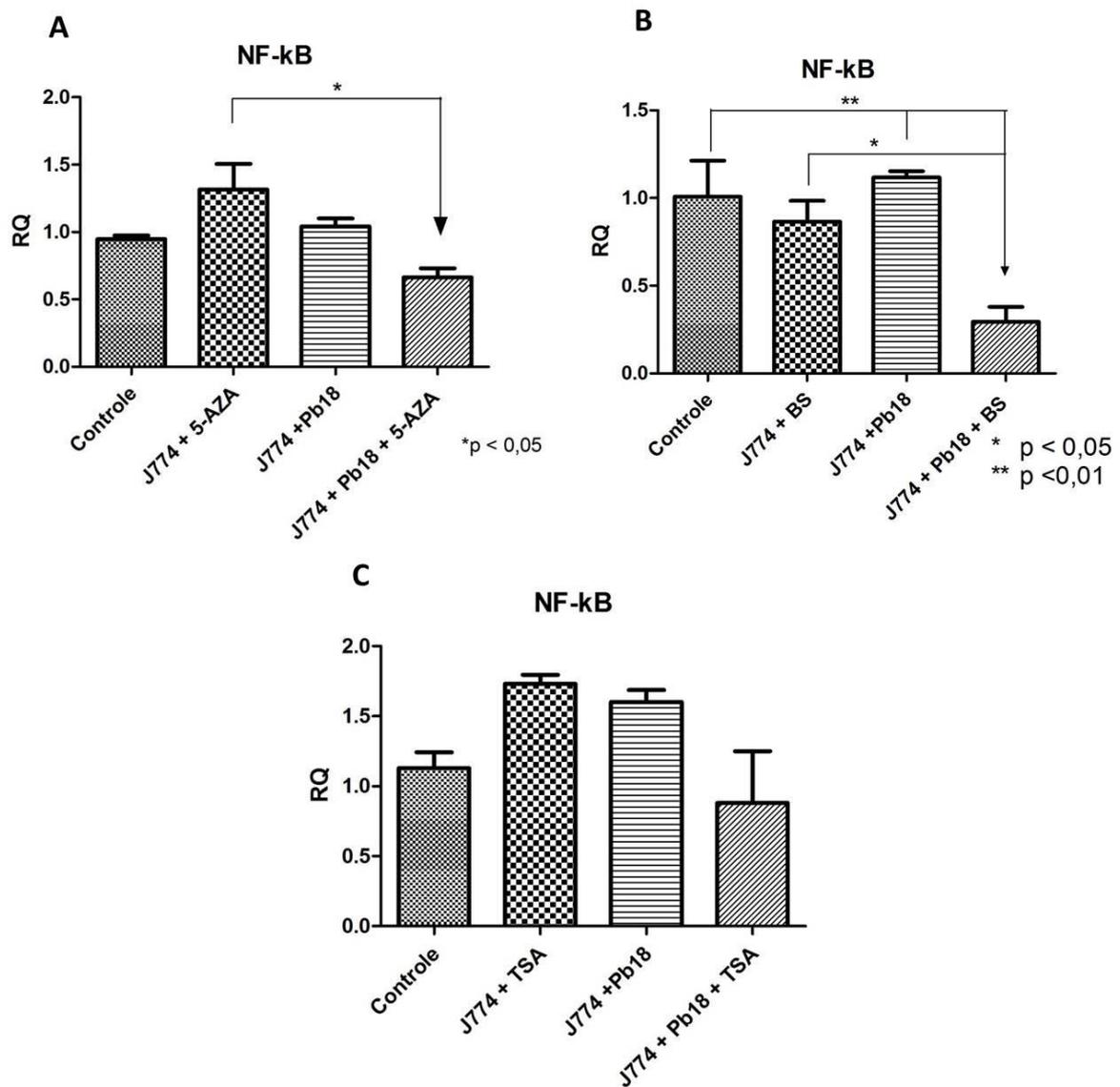


Figura 12. Acúmulo dos mensageiros de NF-κB em células J774 infectadas por *P. brasiliensis* e tratadas com moduladores epigenéticos durante 24h. O acúmulo de mensageiros de NF-κB foi calculado segundo o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ quando macrófagos infectados ou não (controle) por *P. brasiliensis* foram tratados ou não (controle) com (A) 5-AZA, (B) BS ou (C) TSA. As barras de erro indicam o erro padrão da média (SEM).

A figura 12A revela que a administração de 5-AZA a macrófagos infectados por *P. brasiliensis* provocou uma diminuição do acúmulo de mensageiros de NF-κB, quando esse grupo foi comparado ao grupo no qual macrófagos estiveram em contato somente com o modulador epigenético pelo mesmo período de 24 horas, indicando que o fungo pode desencadear mecanismos inibitórios ao acúmulo deste mensageiro em presença de 5-AZA, e não somente a administração dessa droga.

No tratamento dos grupos experimentais com butirato de sódio, os níveis dos transcritos de NF- κ B são significativamente menores no grupo de macrófagos infectados pelas leveduras e tratados com a droga, quando comparado aos demais grupos (Figura 12B). Nesse caso, só a presença da droga ou do fungo não foi capaz de alterar o padrão de transcrição de NF- κ B pelos macrófagos, mas necessariamente as duas condições juntas sim, indicando um provável mecanismo de interação na repressão de NF- κ B. Além disso, o fato de os transcritos de MyD88 de macrófagos infectados pelas leveduras também sofrerem uma significativa redução em presença de BS pode indicar que a via de sinalização que ativa NF- κ B por MyD88 pode estar sendo inibida nessas condições (Figuras 11B e 12B).

Quando tratados por outro iHDAC, a TSA, os macrófagos não apresentam diferenças significativas de acúmulo de NF- κ B em diferentes condições de tratamento (Figura 12C).

Em estudos com linhagem celulares cancerígenas de colo do útero, Place *et al.* (2005) verificaram que o tratamento das células com TSA e BS foram capazes de estabilizar a subunidade α da proteína inibitória de NF- κ B, I κ B α , o que inibiu a ativação do fator de transcrição nuclear e sua translocação para o núcleo celular. Em linhagens celulares de mieloma humano, Khong *et al.* (2008) verificaram que 5-AZA inibe a translocação de NF- κ B ao núcleo de uma forma independente de I κ B. Nossos dados mostram que o tratamento de macrófagos com 5-AZA, BS e TSA não é capaz de reduzir os níveis de transcritos de NF- κ B, e sim a administração de BS e 5-AZA a macrófagos infectados, sendo que a presença do fungo na célula é o fator que desencadeia essa mudança nos níveis de transcritos. Juntos, esses dados podem sugerir a existência de mecanismos que associam a presença do fungo na célula hospedeira à indução de um perfil de transcrição de genes inibitórios da resposta imune, quando as células são tratadas com drogas moduladoras da conformação da cromatina.

5.3.3. Análise do efeito dos moduladores epigenéticos sobre o acúmulo dos mensageiros de TNF- α nas células J774 infectadas por *P. brasiliensis*

TNF- α é uma das citocinas que tem sua expressão aumentada por fatores de transcrição ativados por TLRs, como NF- κ B (Newton e Dixit, 2012).

A administração de 5-AZA aos grupos experimentais mostra um aumento significativo do acúmulo de transcritos pelos macrófagos infectados com *P. brasiliensis* em relação aos demais (Figura 13A). Curiosamente, esse mesmo inibidor de metiltransferase levou à diminuição do acúmulo dos mensageiros de NF- κ B no mesmo grupo quando comparado às amostras que receberam somente o tratamento com a droga (Figura 12A), mas não em relação

às demais. Sendo assim, é provável que, além da ativação transcricional de TNF- α por NF- κ B, outros fatores nucleares sejam responsáveis pelo aumento dos níveis de mensageiros de TNF- α em resposta ao tratamento com 5-AZA. Souto *et al.* (2000) sugerem que IFN- γ regula a expressão de quimiocinas e seus receptores, assim como os tipos celulares que infiltram o pulmão em camundongos infectados por *P. brasiliensis*. Dessa forma, esta citocina pode também estar relacionada à ativação transcricional de genes relacionados à resposta imune, como TNF- α .

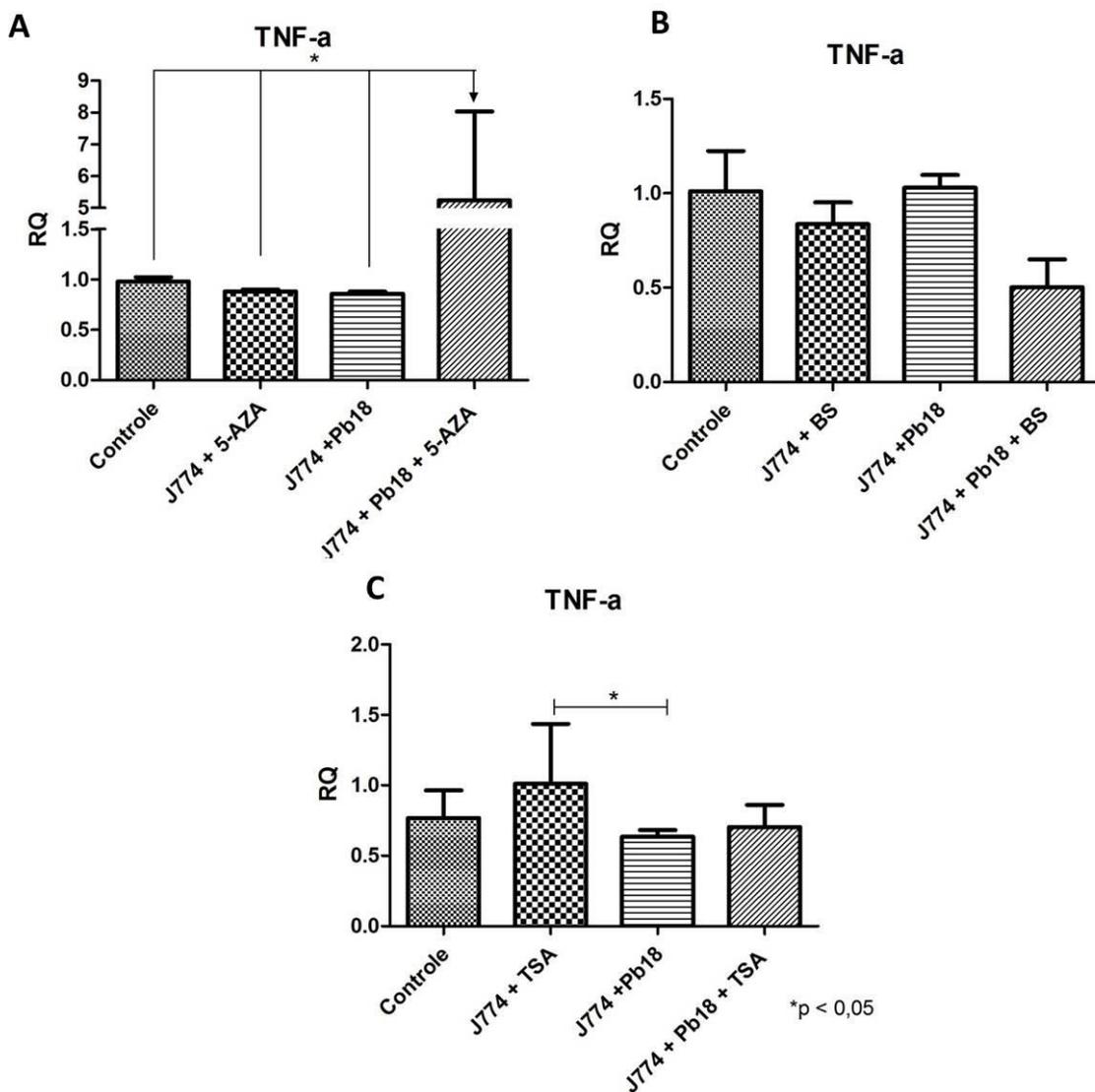


Figura 13. Acúmulo dos mensageiros de TNF- α em células J774 infectadas por *P. brasiliensis* e tratadas com moduladores epigenéticos durante 24h. O acúmulo de mensageiros de TNF- α foi calculado segundo o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ quando macrófagos infectados ou não (controle) por *P. brasiliensis* foram tratados ou não (controle) com (A) 5-AZA, (B) BS ou (C) TSA. As barras de erro indicam o erro padrão da média (SEM).

O tratamento dos macrófagos com butirato de sódio não alterou de forma significativa o acúmulo de transcritos de TNF- α acumulados (Figura 13B). Por fim, o tratamento com TSA eleva ligeiramente o acúmulo de mensageiros desse gene em células não infectadas por leveduras, quando comparado aos de macrófagos infectados não tratados com o iHDAC (Figura 13C). Em linhagem celular de cardiomiócitos humanos, Zhu *et al.* (2010) observaram que TSA foi capaz de diminuir o acúmulo de TNF- α em células estimuladas ou não por LPS, por meio do acúmulo da subunidade p65 de NF- κ B na região promotora do gene da citocina.

A resposta imune inata é composta por diferentes vias de sinalização através de TLRs, associadas a diferentes mensageiros citosólicos e proteínas adaptadoras (revisado por Mogensen, 2009). Sendo assim, o estudo dos níveis de transcrição de outros genes, relacionados a diferentes cascatas de sinalização e diferentes fatores de transcrição ativados por TLRs faz-se necessário para um melhor entendimento das vias moleculares associadas à resposta às drogas utilizadas neste estudo.

5.3.4. Análise do efeito dos moduladores epigenéticos sobre o acúmulo dos mensageiros de IL-6 nas células J774 infectadas por P. brasiliensis

IL-6 é uma citocina encontrada em resposta pro e anti-inflamatória, e pode então ser um ponto crítico para diferentes respostas imunológicas (Moller e Villiger, 2006; Jones, 2005).

O acúmulo de mensageiros de IL-6 pelos macrófagos não foi significativamente alterado pela administração de 5-AZA (Figura 14A). Do mesmo modo, o tratamento das amostras com butirato de sódio não alterou o perfil transcricional desse gene (Figura 14B) apesar de, conforme a figura 11B, o acúmulo de mensageiros de NF- κ B ser significativamente alterado pela administração de BS.

TSA, outro iHDAC utilizado, altera significativamente os níveis de transcritos de IL-6 dos macrófagos estejam estes infectados ou não por leveduras de *P. brasiliensis* (Figura 14C). Assim como o mensageiro de TNF- α (Figura 13A), o de IL-6 também tem seus níveis elevados pela administração do inibidor de histona desacetilase e estes achados não são associados ao acúmulo transcricional de NF- κ B (Figura 12A), possível ativador de ambos os genes (Mogensen, 2009). Novamente, mesmo drogas que apresentam mecanismos de ação semelhantes, como TSA e BS, não modificam de forma idêntica o acúmulo de transcritos. A investigação da ação desses moduladores de estados epigenéticos sobre HDACs específicas pode contribuir para uma análise mais precisa destes resultados.

Assim como anteriormente especulado para TNF- α , os níveis de mensageiros de IL-6 afetados pelos moduladores epigenéticos parecem regulados por vias diferentes daquela ativada pelo fator de transcrição nuclear. Citocinas como IFN- γ podem regular a expressão de quimiocinas por células do sistema imune infectadas por *P. brasiliensis* (Souto *et al.*, 2003).

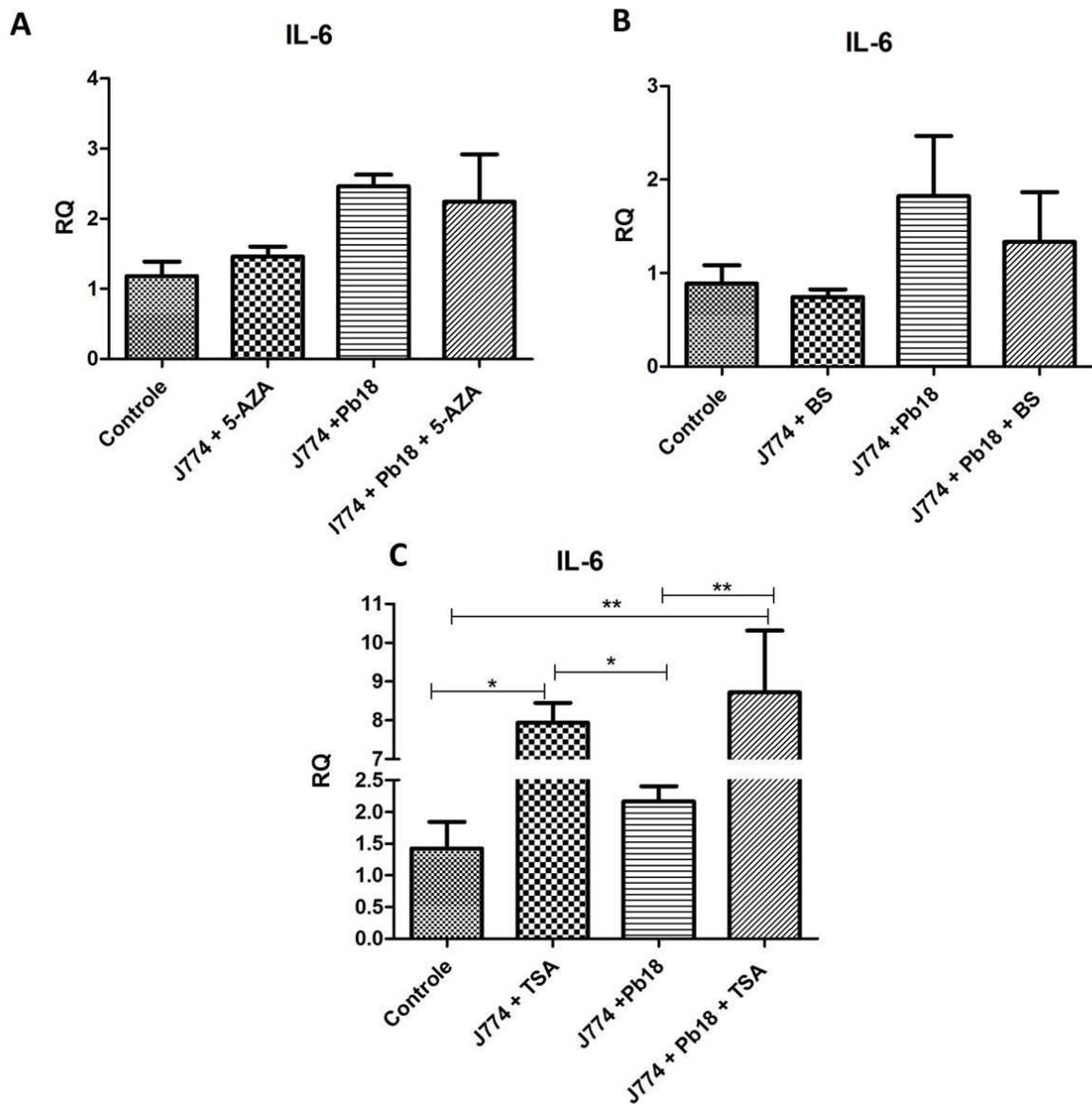


Figura 14. Acúmulo dos mensageiros de IL-6 em células J774 infectadas por *P. brasiliensis* e tratadas com moduladores epigenéticos durante 24h. O acúmulo de mensageiros de IL-6 foi calculado segundo o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ quando macrófagos infectados ou não (controle) por *P. brasiliensis* foram tratados ou não (controle) com (A) 5-AZA, (B) BS ou (C) TSA. As barras de erro indicam o erro padrão da média (SEM); * p < 0,05; ** p < 0,01.

5.4. Análise dos efeitos das drogas moduladoras de estados epigenéticos sobre a secreção de TNF- α no sobrenadante das culturas

A liberação de TNF- α pelos macrófagos pode levar a uma amplificação da resposta imunológica, já que esta citocina ativa novamente a via de transdução de sinais que resulta na translocação de NF- κ B ao núcleo celular (revisto recentemente por Newton e Dixit, 2012).

O sobrenadante das culturas de células utilizadas para a extração do RNA total foi analisado quanto à presença da citocina TNF- α por ELISA. As culturas de macrófagos tratadas com 5-AZA apresentaram alto acúmulo de transcritos quando infectadas por *P. brasiliensis* (Figura 13A). No entanto, a dosagem dessa citocina no sobrenadante das culturas não foi igualmente afetada pela droga, responsável por uma diminuição da liberação de TNF- α na presença de macrófagos não infectados por *P. brasiliensis* (Figura 15A). (2011) encontraram níveis que o tratamento de células dendríticas humanas maduras derivadas Frikeche *et al.* de sangue periférico com 5-AZA não alterou os níveis de TNF- α secretados, mas os mesmos estudos não se estendem a níveis moleculares (Frikeche *et al.*, 2011).

Por outro lado, culturas tratadas com iHDAC têm as dosagens de TNF- α no sobrenadante alteradas: enquanto o tratamento com butirato de sódio eleva os níveis da citocina (Figura 15B), a administração de TSA leva à diminuição dos mesmos níveis. Tais dados não acompanham os resultados do acúmulo de transcritos do referido gene (Figuras 13B e 13C). Estudos anteriores revelaram um menor nível de TNF- α secretado por cardiomiócitos estimulados por LPS tratados com TSA em relação a células não tratadas (Zhu *et al.*, 2010). Nossos dados sugerem mecanismos alternativos de regulação pós-transcricionais e pós-traducionais envolvidos na expressão de TNF- α quando da presença de inibidores de DNA metiltransferases e de histona desacetilases.

Embora efeitos dos moduladores epigenéticos sobre a regulação de genes da resposta imune tenham sido demonstrados em nosso modelo de infecção *in vitro*, ainda não é possível elucidar mecanismos que levam a tal resposta. No entanto, os dados aqui apresentados apontam para a relevância de uma abordagem epigenética no estudo de interações moleculares entre patógenos e hospedeiros, e sinalizam a necessidade de investigações mais profundas sobre as vias de sinalização responsáveis pela regulação da resposta imune a fungos patogênicos.

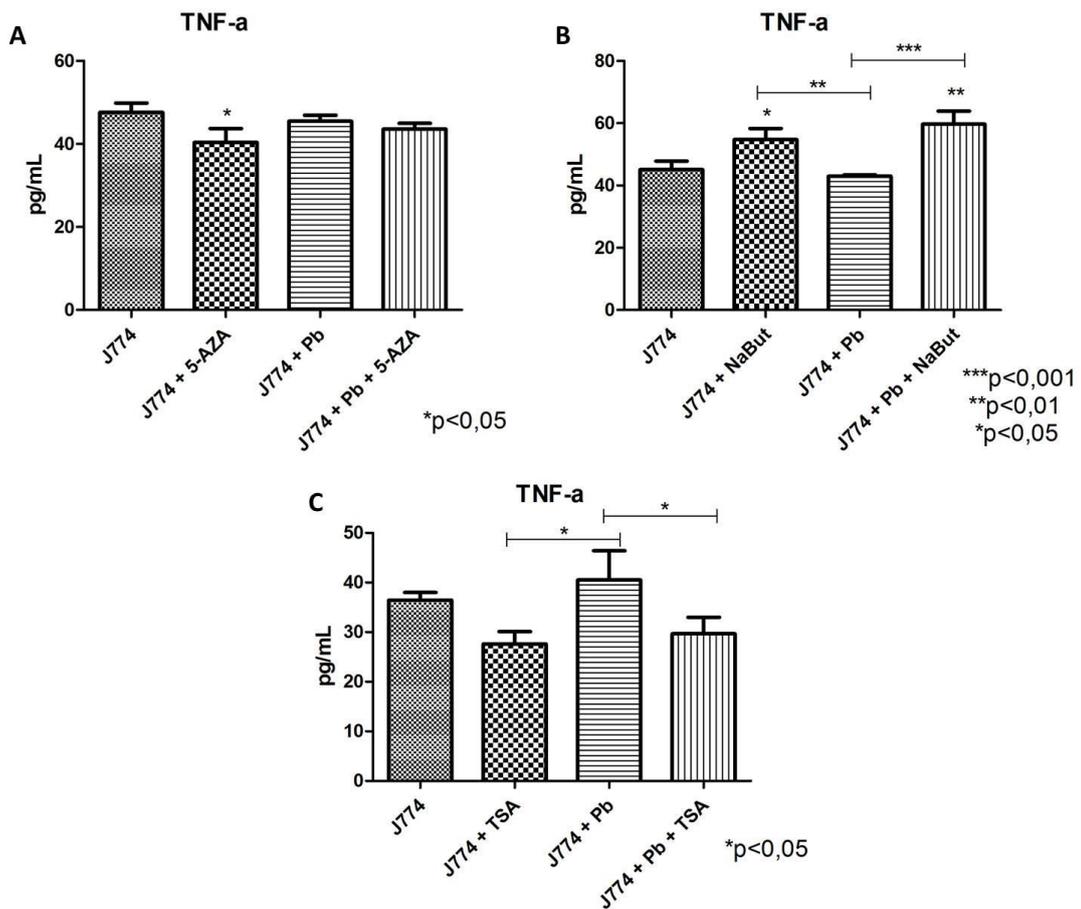


Figura 15. Dosagem de TNF- α no sobrenadante das culturas de células J774 infectadas por *P. brasiliensis* e tratadas com moduladores epigenéticos durante 24h. A dosagem de TNF- α foi feita com o sobrenadante da cultura de macrófagos infectados ou não (controle) por *P. brasiliensis* e tratados ou não (controle) com (A) 5-AZA, (B) BS ou (C) TSA, por meio do ensaio de ELISA. As barras de erro indicam o erro padrão da média (SEM).

6 CONCLUSÕES

- ✓ Macrófagos são altamente sensíveis a moduladores epigenéticos, especialmente a Tricostatina A.
- ✓ As drogas moduladoras de estados epigenéticos não alteraram a viabilidade ou o crescimento das leveduras de *P. brasiliensis* nas concentrações definidas.
- ✓ Dentre as drogas modificadoras da cromatina, 5-AZA e butirato de sódio foram capazes de afetar a internalização de *P. brasiliensis* pelos macrófagos, aumentando o índice de leveduras internalizadas nas primeiras horas de infecção.
- ✓ Os três moduladores de processos epigenéticos afetam diferencialmente a transcrição de genes relacionados à resposta imune quando células J774 estão em contato com *P. brasiliensis*, provavelmente pela regulação de inibidores e ativadores transcricionais alternativos.
- ✓ A secreção de TNF- α é afetada por drogas moduladoras de estados epigenéticos, mas tal fato não parece estar diretamente correlacionado aos níveis de transcrição gênica.
- ✓ A abordagem epigenética pode contribuir para o esclarecimento de mecanismos básicos da interação patógeno-hospedeiro.

7 PERSPECTIVAS

- ✓ Análise do perfil de metilação dos promotores dos genes analisados.
- ✓ Análise do posicionamento nucleossômico nos promotores dos genes analisados.
- ✓ Análise do acúmulo de outros genes relacionados à resposta imune.
- ✓ Estudos *ex vivo* com infecção de macrófagos peritoniais de camundongos de linhagens suscetível e resistente por *P. brasiliensis*.
- ✓ Análise do acúmulo de transcritos em intervalos de tempo menores, de 6 horas.
- ✓ Análise da produção de espécies reativas de nitrogênio pelos macrófagos infectados por *P. brasiliensis* sob o efeito das drogas moduladoras de estados epigenéticos, como um parâmetro adicional para a análise da ativação dos macrófagos em presença das drogas moduladoras de estados epigenéticos infectados por *P. brasiliensis*.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJELLO L, POLONELLI L. Imported paracoccidioidomycosis: a public health problem in non-endemic areas. **Eur J Dermatol**, v. 1, n. 3, p. 160-5, 1985.

ALSPAUGH, J., PERFECT, J. R. E HEITMAN, J. Signal transduction pathways regulating differentiation and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. **Fungal Genet Biol**, v. 25, n. 1, p. 1–14, 1998.

ANDERSON, H. E., *et al.* The fission yeast HIRA histone chaperone is required for promoter silencing and the suppression of cryptic antisense transcripts. **Mol Cell Biol**, v. 29, n. 18, p. 5158-5167, 2009.

ANDRIOLE, V. T. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal therapy. **Int. J .Antimicrob Agents**, v. 16, n. 3, p. 317–321, 2000.

ANTACHOPOULOS, C.; ROILIDES, E. Cytokines and fungal infections. **Br J Haematol**, v. 129, n. 5, p. 583-96, Jun 2005.

ARMSTRONG-JAMES, D., HARRISON, T. S. Immunotherapy for fungal infections. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n.4, p. 434–439, 2012.

ATREYA, R. *et al.* Blockade of interleukin-6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in Crohn's disease and experimental colitis in vivo. **Nat Med**, v. 6, n. 5, p. 583–588, 2000.

BAGAGLI, E. *et al.* *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 197-207, 2008.

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.

BAVA, A. J. *et al.* Lymphocyte subpopulations and cytokine production in paracoccidioidomycosis patients. **Microbiol Immunol**, v. 35, n. 3, p. 167–174, 1991.

BEN-AMI R., LEWIS, R. E., KONTOYIANNIS, D. P. Immunopharmacology of Modern Antifungals. **Clin Infect Dis**, v. 47, n. 2, p. 226–235, 2008.

BEN-AMI, R., *et al.* Characterization of a 5-azacytidine-induced developmental *Aspergillus fumigatus* variant. **Virulence**, v. 1, n. 3, p. 164-173, 2010.

BENARD, G., ROMANO, C. C., CACERE, C. R. *et al.* Imbalance of IL- 2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, v. 13, n. 4, p, 248–52, 2001.

BERRIDGE, M. V., *et al.* Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. **Biotechnol Annu Rev**, v. 11, p. 127-152, 2005.

- BESTOR, T. H. The DNA methyltransferases of mammals. **Hum Mol Genet**, v. 9, n. 16, p. 2395-2402, 2000.
- BHOJ, V. G., CHEN, Z. J. Ubiquitylation in innate and adaptive immunity. **Nature**, v. 458, n. 7237, p. 430–437, 2009.
- BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes Dev**, v. 16, n. 1, p. 6–21, 2002.
- BLACK, R. A., RAUCH, C. T., KOZLOSKY, C. J. et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. **Nature**, v. 385, n. 6618, p. 729–33, 1997.
- BLANCO, J. L., M. E. GARCIA. Immune response to fungal infections. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 125, n. 1-2, p. 47-70, 2008.
- BORGES-WALMSLEY, M. I., CHEN, D., SHU, X., WALMSLEY, A. R. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends Microbiol**, v. 10, n. 2, p. 80–7, 2002.
- BROSCH, G., LOIDL, P. et al. Histone modifications and chromatin dynamics: a focus on filamentous fungi. **FEMS Microbiol Rev**, v. 32, n. 3, p. 409-39, 2008.
- BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin Microbiol Rev**, v. 6, n. 2, p. 89-117, Apr 1993.
- BUITRAGO, M. J., BERNAL-MARTINES, L., CASTELLI, M. V., et al. Histoplasmosis and paracoccidioidomycosis in a non-endemic area: a review and diagnosis. **J Travel Med**, v. 18, n. 1, p. 26-33, 2011.
- CALICH, V. L. et al. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 223-36, Apr-May 2008.
- CALICH, V. L. et al. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Br J Exp Pathol**, v. 66, n. 5, p. 585-94, 1985.
- CANO, L. E. et al. 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, 1994.
- CANO, L. E. et al. 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, 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.
- CARPENTIER, I., COORNAERT, B., BEYAERT, R. Function and regulation of tumornecrosis factor receptor type 2. **Curr Med Chem**, v. 11. n. 16, p. 2205–12, 2004.
- 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.
- CATALANOTTO, C., PALLOTTA M., et al. Redundancy of the two dicer genes in transgene-induced posttranscriptional gene silencing in *Neurospora crassa*. **Mol Cell Biol**, v. 24, n. 6, p. 2536-45, 2004.
- CISALPINO, P. S. et al. Cloning, characterization and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Biol Chem**, v. 271, n. 8, p. 4553–4560, 1996.
- 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.
- DE ALMEIDA, S. M. Central nervous system paracoccidioidomycosis: an overview. **Braz J Infect Dis**, v. 9, n. 2, p.; 126–33, 2005.
- DEL NEGRO, G. M. B., PEREIRA, C. N., ANDRADE, H. F., et al. Evaluation of tests for antibody response in the follow-up of patients with acute and chronic forms of paracoccidioidomycosis. **J Med Microbiol**, v. 49 n. 1, p. 37-46, 2000.
- DENG, L., WANG, C., SPENCER, E. et al. Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. **Cell**, v. 103, n. 2, p. 351–361, 2000.
- DONG, E., GUIDOTTI, A. GRAYSON, D. R., COSTA, E. Histone hyperacetylation induces demethylation of reelin and 67-kDa glutamic acid decarboxylase promoters. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 104, n. 1, p. 4676–4681, 2007.
- FELIPE, M. S., TORRES, F. A., MARANHAO, A. Q., et al. Functional genome of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 45, n. 3, p. 369–81, 2005.
- FIGUEIREDO, F., et al. Tumour necrosis factor production in vivo and in vitro in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the cell wall fractions thereof. **Clin Exp Immunol**, v. 93, n. 2, p. 189-194, 1993.
- FILLER, S. G.; SHEPPARD, D. C. Fungal invasion of normally nonphagocytic host cells. **PLoS Pathog**, v. 2, n. 12, p. e129, 2006.
- FINNIN, M. S., DONIGIAN, J. R., COHEN, A. et al. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. **Nature**, v. 401, n. 6749, p. 188–93, 1999.
- FORTES, M. R., et al. Immunology of paracoccidioidomycosis. **An Bras Dermatol** v. 86, n. 3, p. 516-524, 2011.
- FRANCO, M. et al. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. **Med Mycol**, v. 38, n. 3, p. 185-91, 2000.
- FRANCO, M. et al. Paracoccidioidomycose. In: Brasileiro Filho G, editor. *Bogliolo patologia*. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, p. 1387–98, 2006.

- FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **J Med Vet Mycol**, v. 25, n. 1, p. 5-18, 1987.
- 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, 1999.
- FRIKECHE, J., et al. Impact of the hypomethylating agent 5-azacytidine on dendritic cells function. **Exp Hematol**, v. 39, n. 11, p. 1056-1063, 2011.
- GARCIA-SOLACHE, M. A., CASADEVALL, A. Global warming will bring new fungal diseases for mammals. **MBio**, v. 1, n. 1, p. e00061–10, 2010.
- GIBNEY, E. R., NOLAN, C. M. Epigenetics and gene expression. **Heredity**, v. 105, n. 1, p. 4–13, 2010.
- GILBERT, J., BAKER, S.D., BOWLING, M. K., et al. A phase I dose escalation and bioavailability study of oral sodium phenylbutyrate in patients with refractory solid tumor malignancies. **Clin Cancer Res**, v. 7, n. 10, p. 2292–300, 2001.
- 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.
- GONZALEZ, A., DE GREGORI, W., VELEZ, D., et al. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of interferon-gamma activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infect Immun**, v. 68, n. 5, p. 2546–52, 2000.
- GONZALEZ, A., et al. MyD88 is dispensable for resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* in a murine model of blood-borne disseminated infection. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 54 n. 3, p. 365-374, 2008.
- GONZALEZ, A., LENZI, H. L., MOTTA, E. M. et al. Expression of adhesion molecules in lungs of mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Microb Infect**, v. 7, n. 4, p. 666–73, 2005.
- GRAVINA, G. L., et al. Biological rationale for the use of DNA methyltransferase inhibitors as new strategy for modulation of tumor response to chemotherapy and radiation. **Mol Cancer**, v. 9, p. 305, 2010.
- GRIFFITHS, E. A., GORE, S. D. DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors in the treatment of myelodysplastic syndromes. **Semin Hematol**, v. 45, n. 1, p. 23–30, 2008.
- HACKER, H., KARIN, M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. **Sci STKE**, v. 2006, n. 357, p. re13, 2006.
- HADDAD, J. J., ABDEL-KARIM, N. E. NF-kappaB cellular and molecular regulatory mechanisms and pathways: therapeutic pattern or pseudoregulation? **Cell Immunol**, v. 271, n. 1, p. 5-14, 2011.
- 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, 2003.

- HAMILTON, J. P. Epigenetics: principles and practice. **Dig Dis**, v. 29, n. 2, p. 130-135, 2011.
- HANSEN, K. R., P. T. IBARRA, et al. Evolutionary-conserved telomere-linked helicase genes of fission yeast are repressed by silencing factors, RNAi components and the telomere-binding protein Taz1. **Nucleic Acids Res**, v. 34 n. 1, p. 78-88, 2006.
- HERCEG, Z. Epigenetics and cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors. **Mutagenesis**, v. 22, n. 2, p. 91-103, 2007.
- HUFFNAGLE, G. B., DEEPE, G. S. Innate and adaptive determinants of host susceptibility to medically important fungi. **Curr Opin Microbiol**, v. 6, n. 4, p. 344-50, 2003.
- HURST, S. M., WILKINSON, T. S, MCLOUGHLIN, R. M. et al. Control of leukocyte infiltration during inflammation: IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment. **Immunity**, v. 14, n. 6, p. 705–714, 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, 1993.
- JABLONKA, E. AND M. J. LAMB. The changing concept of epigenetics. **Ann N Y Acad Sci**, v. 981, p. 82-96, 2002.
- JAENISCH, R., BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nat Genet**, v. 33, p. 245-254, 2003.
- JANEWAY, C. A., MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu Rev Immunol**, v. 20, p. 197-216, 2002.
- JIRTLE, R. L., SKINNER, M. K. Environmental epigenomics and disease susceptibility. **Nat Rev Genet**, v. 8, n. 4, p. 253-262, 2007.
- JONES, P. A., TAYLOR, S. M. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. **Cell**, v. 20, n. 1, p. 85-93, 1980.
- JONES, S. A. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. **J Immunol**, v. 175, n. 6, p. 3463-3468, 2005.
- KAMEI, K., et al. The trend of imported mycoses in Japan. **J Infect Chemother**, v. 9, n. 1, p. 16-20, 2003.
- KARHAWI, A. S., et al. Production of IFN-gamma is impaired in patients with paracoccidioidomycosis during active disease and is restored after clinical remission. **Med Mycol**, v. 38, n. 3 p. 225-229, 2000.
- KATRAGKOU, A., ROILIDES, E. Best practice in treating infants and children with proven, probable or suspected invasive fungal infections. **Curr Opin Infect Dis**, v. 24, n. 3, p. 225-229, 2011.
- KAWAI, T., AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nat Immunol**, v. 11, n. 5, p. 373-384, 2010.

- KAWAMOTO, K., et al. Epigenetic modifications of RASSF1A gene through chromatin remodeling in prostate cancer. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 9, p. 2541-2548, 2007.
- KHAN, N., et al. Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors. **Biochem J**, v. 409, n. 2, p. 581-589, 2008.
- KHONG, T., SHARKEY, J., SPENCER, A. The effect of azacitidine on interleukin-6 signaling and nuclear factor-kappaB activation and its in vitro and in vivo activity against multiple myeloma. **Haematologica**, v. 93, n. 6, p. 860-869, 2008.
- KIM, J. K., M. SAMARANAYAKE, et al. Epigenetic mechanisms in mammals. **Cell Mol Life Sci**, v. 66, n. 4, p. 596-612, 2009.
- KISHIMOTO, T., et al. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. **Blood**, v. 86, n. 4, p. 1243-1254, 1995.
- KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 693-705, 2007.
- KUMAR, H., et al. Pathogen recognition by the innate immune system. **Int Rev Immunol**, v. 30, n. 1, p. 16-34, 2011.
- KUMAR, H., et al. Pathogen recognition in the innate immune response. **Biochem J** v. 420, n. 1, p. 1-16, 2009.
- KVAAL, C., et al. Misexpression of the opaque-phase-specific gene PEP1 (SAP1) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection. **Infect Immun**, v. 67, n. 12, p. 6652-6662, 1999.
- LABRO, M. T. Immunomodulatory effects of antimicrobial agents. Part II: antiparasitic and antifungal agents. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v.10, n. 3, p. 341-357, 2012.
- LAMBRECHT, B. N. Alveolar macrophage in the driver's seat. **Immunity**, v. 24, n. 4, p. 366-8, 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, 2001.
- LAWRENCE, R. J., VOLPE, T. A. Msc1 links dynamic Swi6/HP1 binding to cell fate determination. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 4, p. 1163-8, 2009.
- LEVITZ, S. M. Interactions of Toll-like receptors with fungi. **Microbes Infect**, v. 6, n. 15, p. 1351-5, 2004.
- LI, S., et al. IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 8, p. 5567-5572, 2002.
- LIN, S. C., LO, Y. C., WU, H. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. **Nature**, v. 465, n. 7300, p. 885-890, 2010.
- LIVAK, K. J., SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

- LOHSE, M. B., JOHNSON, A. D. White-opaque switching in *Candida albicans*." **Curr Opin Microbiol**, v. 12, n. 6, p. 650-654, 2009.
- LOURES, F. V. et al. TLR2 is a negative regulator of Th17 cells and tissue pathology in a pulmonary model of fungal infection. **J Immunol**, v. 183, n. 2, p. 1279-1290, 2009.
- LOURES, F. V. et al. MyD88 Signaling Is Required for Efficient Innate and Adaptive Immune Responses to *Paracoccidioides brasiliensis* Infection. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 6, p. 2470–2480, 2011.
- LOURES, F. V. et al. Toll-like receptor 4 signaling leads to severe fungal infection associated with enhanced proinflammatory immunity and impaired expansion of regulatory T cells. **Infect Immun**, v. 78, n. 3, p. 1078-1088, 2010.
- 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, 2006.
- MAI, A., ALTUCCI, L. Epi-drugs to fight cancer: from chemistry to cancer treatment, the road ahead. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 41, n. 1, p. 199-213, 2009.
- MAKOVETS, S., et al. The telotype defines the telomere state in *Saccharomyces cerevisiae* and is inherited as a dominant non-Mendelian characteristic in cells lacking telomerase. **Genetics**, v. 178, n. 1, p. 245-57, 2008.
- MAMONI, R. L., BLOTTA, M. H. Flow-cytometric analysis of cytokine production in human paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, v. 35, n. 3-4, p. 207-216, 2006.
- MARKS, P. W. Decitabine for acute myeloid leukemia. **Expert Rev Anticancer Ther**, v. 12, n. 3, p. 299-305, 2012.
- MARQUES, S. A. Paracoccidioidomycose. **An Bras Dermatol**, v. 73, n. 5, p. 455–69, 1998.
- MARSHALL, N. J., GOODWIN, C. J., HOLT, S. J. A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. **Growth Regulation**, v. 5, p. 69-84, 1999.
- MATUTE, D. R. et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol Biol Evol**, v. 23, n. 1, p. 65-73, 2006.
- MATUTE, D. R. et al. Microsatellite analysis of three phylogenetic species of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 6, p. 2153-7, 2006.
- MAZOR, Y., KUPIEC, M. Developmentally regulated MAPK pathways modulate heterochromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Res**, v. 37, n. 14, p. 4839-49, 2009.
- MCEWEN, J. G. et al. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Arch Med Res**, v. 26, n. 3, p. 305-6, 1995.
- MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 819–826, 2007.

- MELLO, L. M., VERGARA, M. L. S., RODRIGUES, J. V. Patients with active infection with *Paracoccidioides brasiliensis* immune response characterized by high interleukin 4 and interleukin 5 production. **Hum Immunol**, v. 63, n. 2, p. 149–54, 2002.
- MENDES, R. P. The gamut of clinical manifestations. In: Franco, M., Lacaz, C. S., Restrepo-Moreno, A., Del Negro, G. editors. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton: CRC Press, p. 233–57, 1994.
- MENDES-GIANNINI, M. J. et al. Interaction of pathogenic fungi with host cells: Molecular and cellular approaches. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 45, n. 3, p. 383–94, 2005.
- MENDES-GIANNINI, M. J. et al. Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: recent advances. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 237-48, 2008.
- MENDES-GIANNINI, M. J. et al. Invasion of epithelial mammalian cells by *Paracoccidioides brasiliensis* leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell. **Microbes Infect**, v. 6, n. 10, p. 882-91, 2004.
- MENDES-GIANNINI, M. J. et al. Pathogenesis II: fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. **Med Mycol**, v. 38, p. 113–23, 2000.
- MINUCCI, S., PELICCI, P. G. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 1, p. 38–51, 2006.
- MISHRA, P. K., et al. DNA methylation regulates phenotype-dependent transcriptional activity in *Candida albicans*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 29, p. 11965-11970, 2011.
- MOGENSEN, T. H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. **Clin Microbiol Rev**, v. 22, n. 2, p. 240-73, 2009.
- MÖLLER, B., VILLIGER, P. M. Inhibition of IL-1, IL-6, and TNF- α in immune-mediated inflammatory diseases. **Springer Semin Immun**, v. 27, n. 4, p. 391–408, 2006.
- MORI, K., KOSEKI, K. Synthesis of trichostatin A, a potent differentiation inducer of Friend leukemic cells, and its antipode. **Tetrahedron**, v. 44, p. 6013–20, 1988.
- MOSCARDI-BACCHI, M. et al. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. **J Med Microbiol**, v. 40, n. 3, p. 159–164, 1994.
- 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, 1983.
- NETEA, M.G. et al. Recognition of fungal pathogens by Toll-like receptors. **Curr Pharm Des**, v. 12, n.32, p. 4195–4201, 2006.
- NEVES-COSTA, A., WILL, W. R. et al. The SNF2-family member Fun30 promotes gene silencing in heterochromatic loci. **PLoS One**, v. 4, n. 12, p. e8111, 2009.
- NEWTON, K., DIXIT, V. M. Signaling in innate immunity and inflammation. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 4, n. 3, 2012.

- NGUYEN, L. N., et al. Sodium butyrate inhibits pathogenic yeast growth and enhances the functions of macrophages. **J Antimicrob Chemother**, v. 66, n. 11, p. 2573-2580, 2011.
- NOLAN, T., L. BRACCINI, et al. The post-transcriptional gene silencing machinery functions independently of DNA methylation to repress a LINE1-like retrotransposon in *Neurospora crassa*. **Nucleic Acids Res**, v. 33, n. 5, p. 1564-73, 2005.
- OLIVE, C. Pattern recognition receptors: sentinels in innate immunity and targets of new vaccine adjuvants. **Expert Rev Vaccines**, v. 11, n. 2, p. 237-256, 2012.
- OLIVEIRA, S. J., et al. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. **Microbes Infect**, v. 4, n. 2 p. 139-144, 2002.
- O'MEARA, T. R., et al. *Cryptococcus neoformans* histone acetyltransferase Gcn5 regulates fungal adaptation to the host. **Eukaryot Cell**, v. 9, n. 8, p. 1193-1202, 2010.
- OU, J. N. et al. Histone deacetylase inhibitor Trichostatin A induces global and gene-specific DNA demethylation in human cancer cell lines. **Biochem Pharmacol**, v. 73, n. 9, p. 1297-1307, 2007.
- PALMER, J. M., et al. H3K9 methylation regulates growth and development in *Aspergillus fumigatus*. **Eukaryot Cell**, v. 7, n. 12, p. 2052-2060, 2008.
- PATEL, B. K., GAVIN-SMYTH, J. et al. The yeast global transcriptional co-repressor protein Cyc8 can propagate as a prion. **Nat Cell Biol**, v. 11, n. 3, p. 344-9, 2009.
- PEDROSO, V. S., et al. [Paracoccidioidomycosis compromising the central nervous system: a systematic review of the literature]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42, n. 6, p. 691-697, 2009.
- PERACOLI, M. T., et al. Production of pro- and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis. **Microbes Infect**, v. 5, n. 5, p. 413-418, 2003.
- PLACE, R. F., HDAC inhibition prevents NF-kappa B activation by suppressing proteasome activity: down-regulation of proteasome subunit expression stabilizes I kappa B alpha. **Biochem Pharmacol**, v. 70, n. 3, p. 394-406, 2005.
- PLIM, J., SORM, F. Synthesis of 2'-deoxy-D-ribofuranosyl-5-azacytosine. **Coll Czech Chem Commun**, v. 29, p. 2576-2577, 1964.
- PRADO, M., et al. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 513-521, 2009.
- RAMOS, E. S. M., SARAIVA LDO, E. Paracoccidioidomycosis. **Dermatol Clin**, v. 26, n. 2, p. 257-269, 2008.
- RAPPLEYE, C. A.; GOLDMAN, W. E. Defining virulence genes in the dimorphic fungi. **Annu Rev Microbiol**, v. 60, p. 281-303, 2006.
- REIK, W., et al. Dissecting de novo methylation. **Nat Genet**, v. 23, n. 4, p. 380-382, 1999.

- RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: A puzzle still unsolved. **Sabouraudia**, v. 23, n. 5, p. 323-334, 1985.
- 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.
- RIESEN, M., MORGAN, A. Calorie restriction reduces rDNA recombination independently of rDNA silencing. **Aging Cell**, v. 8, n. 6, p. 624-632, 2009.
- ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 4, p. 275-288, 2011.
- ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 1, p. 1-23, 2004.
- SALGADO-SALAZAR, C., JONES, L. R., RESTREPO, A. E MCEWEN, J. E. The human fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* (Onygenales: Ajellomycetaceae) is a complex of two species: phylogenetic evidence from five mitochondrial markers. **Cladistics**, v. 26, n.1, p. 613–624 2010.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**. 3. New York: Cold Spring Harbor, 2001.
- SAN-BLAS, G. Biochemical and physiological aspects in the dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Arch Med Res**, v. 24, n. 3, p. 267-8, 1993.
- SCHUETZ, A., MIN, J., ALLALI-HASSANI, A. et al. Human HDAC7 Harbors a Class IIa histone deacetylase-specific zinc binding motif and cryptic deacetylase activity. **J Biol Chem**, v. 283, n. 17, p. 11355–63, 2008.
- SEKHAVAT, A., SUN, J. M., DAVIE. J. R. Competitive inhibition of histone deacetylase activity by trichostatin A and butyrate. **Biochem Cell Biol**, v. 85, n. 6, p. 751–8, 2007.
- SELARU, F. M. et al. Epigenetic events in gastrointestinal cancer. **Am J Gastroenterol**, v. 104, n. 8, p. 1910–1912, 2009.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A., et al. [Guidelines in paracoccidioidomycosis]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39, n. 3, p. 297-310, 2006.
- SMITH, K. T., WORKMAN, J. L. Histone deacetylase inhibitors: anticancer compounds. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 41, n. 1, p. 21-25, 2009.
- SMITH, W. L., EDLIND, T. D. Histone deacetylase inhibitors enhance *Candida albicans* sensitivity to azoles and related antifungals: correlation with reduction in CDR and ERG upregulation. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 11, p. 3532-3539, 2002.
- SOLL, D. R. The molecular biology of switching in *Candida* in Fungal Pathogenesis: Principles and Clinical Application, edited by R. Cihlar and R. Calderone. Marcel Dekker, New York, 2001.
- SOUTO, J. T., et al. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **Am J Pathol**, v. 156, n. 5, p. 1811-1820, 2000.

- SOUTO, J. T., et al. Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice is modulated by interferon-gamma. **Am J Pathol**, v. 163, n. 2, p. 583-590, 2003.
- 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.
- TAMARU, H., E. U. SELKER. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. **Nature**, v. 414, n. 6861, p. 277-283, 2001.
- TEIXEIRA, M. M. et al. Phylogenetic analysis demonstrates a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 52, n. 2, p. 273-283, 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.
- THEODORO, R. C., et al. Dimorphism, thermal tolerance, virulence and heat shock protein 70 transcription in different isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathologia**, v. 165, n. 6, p. 355-365, 2008.
- TSUJI, N., et al. A new antifungal antibiotic, trichostatin. **J Antibiot (Tokyo)**, v. 29, n. 1, p. 1-6, 1976.
- VAISSIERE, T., et al. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. **Mutat Res**, v. 659, n. 1-2, p. 40-48, 2008.
- VAN DE VEERDONK, F. L., KULLBERG, B. J. et al. Host-microbe interactions: innate pattern recognition of fungal pathogens. **Curr Opin Microbiol**, v. 11, n. 4, p. 305-12, 2008.
- VANDEN BERGHE, W., NDLOVU, M. N. et al. Keeping up NF-kappaB appearances: epigenetic control of immunity or inflammation-triggered epigenetics. **Biochem Pharmacol**, v. 72, n. 9, p. 1114-31, 2006.
- VANDENABEELE, P. et al. Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. **Trends Cell Biol**, v. 5, n. 10, p. 392-9, 1995.
- VANNINI, A., VOLPARI, C., FILOCAMO, G. et al. Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 101, n. 42, p. 15064-9, 2004.
- VARGAS, K., et al. Elevated phenotypic switching and drug resistance of *Candida albicans* from human immunodeficiency virus-positive individuals prior to first thrush episode. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 10, p. 3595-3607, 2000.
- WELSH, O., VERA-CABRERA, L., WELSH, E. Onychomycosis. **Clin Dermatol**, v. 28, n. 2, p. 151-9, 2010.
- XING, Z., et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. **J Clin Invest**, v. 101, n. 2. P. 311-320, 1998.

YAMAMOTO, M., et al. Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling. **Nat Immunol**, v. 7, n. 9, p. 962-970, 2006.

YOSHIDA, M., et al. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. **J Biol Chem**, v. 265, n. 28, p. 17174-17179, 1990.

ZHU, H., et al. Histone deacetylase-3 activation promotes tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) expression in cardiomyocytes during lipopolysaccharide stimulation. **J Biol Chem**, v. 285, n. 13, p. 9429-9436, 2010.

ZHU, X., et al. Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. **Infect Immun**, v. 69, n. 9, p. 5589-5596, 2001.