

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **TESE** será disponibilizado somente a partir de 27/07/2023.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS E
BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA**



LARISSA NAIARA CARVALHO GONÇALVES

**CARACTERIZAÇÃO DO BIOFILME DE *Histoplasma
capsulatum* EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE
CRESCIMENTO *in vitro* E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS
NA INTERAÇÃO DESSES BIOFILMES COM MACRÓFAGOS
ALVEOLARES MURINOS**

Araraquara-SP
2021

LARISSA NAIARA CARVALHO GONÇALVES

CARACTERIZAÇÃO DO BIOFILME DE *Histoplasma capsulatum* EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO *in vitro* E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS NA INTERAÇÃO DESSES BIOFILMES COM MACRÓFAGOS ALVEOLARES MURINOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como um dos pré-requisitos para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Marisa Fusco Almeida
Coorientadores: Dr.^a Caroline Barcelos Costa Orlandi
Dr. Luis R. Martinez

Araraquara-SP
2021

G636c Gonçalves, Larissa Naiara Carvalho.
Caracterização do biofilme de *Histoplasma capsulatum* em diferentes condições de crescimento *in vitro* e identificação de proteínas na interação desses biofilmes com macrófagos alveolares murinos / Larissa Naiara Carvalho Gonçalves. – Araraquara: [S.n.], 2021.
186 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Ana Marisa Fusco Almeida.
Coorientadora: Caroline Barcelos Costa Orlandi.
Coorientador: Luis R. Martinez.

1. *Histoplasma capsulatum*. 2. Biofilme. 3. Macrófagos. 4. Infecção. 5. Proteoma. I. Almeida, Ana Marisa Fusco, orient. II. Orlandi, Carolina Barcelos Costa, coorient. III. Martinez, Luis R. coorient. IV. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Caracterização do biofilme de *Histoplasma capsulatum* em diferentes condições de crescimento in vitro e identificação de proteínas na interação desses biofilmes com macrófagos alveolares murinos

AUTORA: LARISSA NAIARA CARVALHO GONÇALVES

ORIENTADORA: ANA MARISA FUSCO ALMEIDA

COORIENTADORA: CAROLINE BARCELOS COSTA ORLANDI

COORIENTADOR: LUIS R. MARTINEZ

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ANA MARISA FUSCO ALMEIDA (Participação Virtual)
.Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Profa. Dra. MARIA LUCIA TAYLOR DA CUNHA E MELLO (Participação Virtual)
Department of Microbiology and Parasitology - School of Medicine / Universidade Autônoma do México

Prof. Dr. ALLAN JEFFERSON GUIMARÃES (Participação Virtual)
Departamento de Microbiologia e Parasitologia / Universidade Federal Fluminense

Profa. Dra. CHRISTIANE PIENNA SOARES (Participação Virtual)
Departamento de Análises Clínicas / UNESP/Câmpus de Araraquara

Araraquara, 27 de julho de 2021

LARISSA NAIARA CARVALHO GONÇALVES

**CARACTERIZAÇÃO DO BIOFILME DE *Histoplasma capsulatum* EM
DIFERENTES CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO *in vitro* E
IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS NA INTERAÇÃO DESSES
BIOFILMES COM MACRÓFAGOS ALVEOLARES MURINOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como um dos pré-requisitos para a obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida – Orientadora
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP)

Profa. Dra. Maria Lucia Taylor da Cunha e Mello
Universidade Autônoma do México (UNAM)

Prof. Dr. Allan Jefferson Guimarães
Universidade Federal Fluminense (UFF)

Profa. Dra. Christiane Pienna Soares
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP)

*Aos meus pais Marilza e João, à minha irmã Luara, aos meus avós e ao meu amor Vinicius,
por todo incentivo e apoio incondicional. Sem vocês nada disso seria possível. As palavras
são insuficientes para agradecer o amor tão grande que tenho por vocês!*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus que guiou os meus passos, me deu sabedoria, saúde, forças e todas as condições para que eu pudesse lutar em busca dos meus sonhos. Sem Sua proteção diária e Sua grande misericórdia poderia “desdobrar-me em mil”, porém tenho a absoluta certeza que não seria tudo tão perfeito como foi.

À minha orientadora Prof^a Dra. Ana Marisa Fusco Almeida pela oportunidade de ingressar na pós-graduação, por ter aberto as portas do seu laboratório, pelos desafios que me foram dados e pela confiança depositada. Agradeço pela sua paciência, dedicação e insistência para que este trabalho fosse realizado. Obrigada por acreditar no meu potencial e pelo incentivo, sempre me impulsionando a dar o melhor de mim. Serei sempre muito grata por tudo!

À minha querida coorientadora Dra. Caroline Barcelos Costa Orlandi pela ajuda durante todos esses anos. Uma pessoa extremamente motivadora e otimista, sempre dando ânimo e incentivo. Obrigada pela oportunidade de me orientar, pelos ensinamentos durante todos estes anos, por acreditar em mim, tornando realidade algo que eu acreditava ser apenas sonho. E, acima de tudo, muito obrigada minha amiga por sua amizade e todos os momentos que compartilhamos dentro e fora do laboratório. Sentirei muitas saudades!

Ao Prof. Dr. Luis R. Martinez pelas sugestões valiosas em algumas partes deste trabalho, pela boa vontade e disponibilidade. Muito obrigada!

À Prof^a Dra. Maria José Soares Mendes Giannini pelos ensinamentos, pela valiosa contribuição e sugestões que redundaram nesta tese. Agradeço por todas as discussões e oportunidades concedidas que ajudaram muito no meu crescimento profissional e pessoal.

Agradeço com importância especial à minha família: aos meus pais Marilza e João e à minha irmã Luara, por serem a melhor família, meu alicerce, minha estrutura e a força que me impulsiona nas realizações dos meus objetivos. Nada faria sentido se não tivesse como compartilhar tamanha felicidade com vocês. Agradeço pela educação, por sempre me incentivarem em todas as minhas escolhas, por me apoiar nos momentos mais difíceis quando tudo parecia impossível e por acreditar que um dia tudo valerá a pena! Amo vocês!

Ao meu namorado, meu amor e meu melhor amigo Vinícius, pela paciência e compreensão em todos os momentos, pelo seu incentivo principalmente nos momentos mais difíceis, pelas palavras amigas e confortantes e por acreditar que eu seria capaz. Muito

obrigada meu amor! Você foi fundamental para que eu chegasse até aqui!

À família Gonçalves/Carvalho pela torcida e apoio todos esses anos. Especialmente aos meu avós João (*in memoriam*) e Dayse pela vida cheia de amor que vocês me deram, por me permitirem sonhar, por me apoiarem em tudo e sempre torcerem pelo meu sucesso. Sei que onde o senhor estiver meu avô, seu coração está cheio de orgulho! Ao meu cunhado Guilherme, pelos momentos de descontração e risadas. À minha segunda família Barcelos/Vester pela torcida, em especial à minha sogra, a qual considero uma segunda mãe, por todas as orações, incentivo e carinho.

À Rosângela Moraes (Rô) pelo auxílio na reversão das cepas e na parte básica da micologia, por tornar nossos dias mais leves e melhores, por nos fazer rir mesmo quando está de mau humor. Obrigada por toda ajuda, apoio, incentivo e conselhos, seja no laboratório, seja na vida. Você é muito especial! À nossa vizinha de laboratório e amiga Marisinha, pela alegria e pela disponibilidade sempre que precisamos. Já sinto saudades. Muito obrigada!

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Micologia do Departamento de Análises Clínicas e Núcleo de Proteômica da UNESP: Mônica Yonashiro, Natália Strohmayr, Priscila Lacerda, Mariana Galeane, Cláudia Santos, Paulo César Gomes, Kaila Alarcón, Jaqueline Derissi, Junya Singulani, Patrícia Akemi, Haroldo Oliveira, Caroline Marcos, Lariane Teodoro, Nathália Fregonezi, Angélica Romão, Marina Fontes, Francine Neves, Marcos Vinício da Silva, Jean Bonatti, Letícia Garcia, Marina Dorisse, Samanta Silva, Ana Carolina Pires, Carolina Vaso, Núura Bila, Caroline Barcelos e Rosângela Moraes. Agradeço imensamente pela ajuda, companhia diária, dedicação, pelos aprendizados e pelas lições dos momentos bons ou ruins. Aprendi e cresci muito durante todo este período do doutorado e sou grata a cada um de vocês. Muito obrigada por tudo!

Em especial, agradeço à Carol Vaso, Núura e Carol Barcelos pela ajuda fundamental para concretização deste trabalho, pelas oportunidades de trabalho em conjunto, pela amizade, companheirismo, apoio, por compartilhar os conhecimentos, pelos conselhos, pelos almoços, risadas e choros, viagens, poucas, mas inesquecíveis, por todos os momentos que compartilhamos juntos dentro ou fora do laboratório. Vocês são muito especiais! Sentirei muitas saudades!

Aos técnicos do laboratório de microscopia confocal e microscopia eletrônica de varredura da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araraquara, Paula Barbugli e Evandro Nakandakari, por todo suporte e pela aquisição dos dados.

As funcionárias do Departamento de pós-graduação, Claudia, Daniela, Aniele, Vanessa e Denise pela disponibilidade e auxílio e por vocês atenderem sempre a todos com educação, carinho e muita paciência!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida durante o doutorado (Processo nº 42048/2019-4).

Muito obrigada!

“Em seu coração o homem planeja o seu caminho, mas o Senhor determina os seus passos”.

(Provérbios 16:9)

RESUMO

A histoplasmose é uma micose sistêmica, causada pelo fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum*. Biofilmes são comunidades sésseis de microrganismos, que se agrupam de maneira organizada a um substrato ou que se aderem uns aos outros, e estão envolvidos por uma matriz extracelular que eles mesmos produzem. A capacidade desses fungos em formar biofilmes, um fenótipo que pode induzir resistência e aumentar a virulência, foi descrita. Além disso, também foi estabelecida uma correlação entre o modo de infecção de *H. capsulatum* e a formação dessas comunidades. O presente estudo teve como objetivo aprofundar o estudo dos biofilmes formados por diferentes cepas de *H. capsulatum* (EH-315, G186A e G217B), por meio da verificação da influência de quatro meios de cultura (BHI, HAM-F12, DMEM e RPMI) e diferentes atmosferas de oxigênio (microaerofilia e aerobiose) no desenvolvimento dessas comunidades. Adicionalmente, também objetivou-se estudar a interação entre células planctônicas e derivadas de biofilme após a infecção em macrófagos alveolares, verificando seu comportamento e sua capacidade de infecção, bem como averiguar a formação de biofilme em ambiente ácido, mimetizando o ambiente intracelular no macrófago e realizando uma análise proteômica por técnica de *shotgun*, a fim de identificar proteínas exclusivas nessas condições para a futura busca de alvos antifúngicos. A padronização do crescimento fúngico foi conduzida a partir da construção de curvas de crescimento, por meio de contagem de colônias, verificação da viabilidade celular com azul de Tripán e densidade óptica. A formação dos biofilmes foi caracterizada utilizando técnicas de microscopia óptica, e colorimétricas, como o ensaio de redução de XTT, coloração por cristal violeta e safranina, além de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para observação das topografias. A interação com os macrófagos alveolares foi observada por microscopia de fluorescência e confocal para posterior análise proteômica em espectrômetro de massas. Nos ensaios de caracterização dos biofilmes, verificou-se que, embora todos os meios de cultura tenham estimulado a maturação das comunidades, o HAM-F12 proporcionou o melhor desenvolvimento de biomassa e material polissacarídico. Em relação às atmosferas de O₂, ambas estimularam um excelente desenvolvimento das comunidades, porém, em condições de baixo O₂, foi observada uma quantidade exuberante de matriz extracelular quando comparada aos biofilmes formados em aerobiose, principalmente no meio HAM-F12. Nos biofilmes formados em BHI, RPMI e DMEM observou-se uma reversão significativa do fenótipo de levedura para hifa, exigindo uma investigação mais aprofundada. Na interação com macrófagos, observou-se a formação de aglomerados fúngicos em macrófagos. No entanto, a formação dos aglomerados, bem como a fluorescência da marcação com o anticorpo anti-Hsp60 e o sofrimento celular foram mais expressivos na infecção com as células derivadas de biofilme. Além disso, as células derivadas de biofilme exibiram maior taxa de infecção após 1, 5 e 24 horas comparada as células planctônicas. O ambiente ácido não foi impeditivo para a formação de biofilmes maduros. Nos ensaios de proteômica, observou-se diferentes perfis proteicos nas condições testadas, com 72 proteínas exclusivamente expressas pelo biofilme quando comparado ao crescimento planctônico. A grande maioria dessas proteínas é relacionada a funções citoplasmáticas. Os dados proteômicos das células derivadas de biofilme também revelaram um aumento de proteínas

envolvidas no estresse, defesa, virulência e na obtenção de energia e uma redução de proteínas envolvidas na síntese proteica e no processo metabólico. No proteoma da infecção pelas células derivadas do biofilme foram identificadas 6 proteínas exclusivas comparada ao controle (biofilme), a maioria classificadas como nucleares, permitindo um entendimento parcial sobre as vias associadas à sobrevivência e adaptação do fungo ao ambiente do hospedeiro. Esses resultados apresentam avanços no campo dos biofilmes e contribuem para estudos futuros que podem provar o papel dessas comunidades na interação patógeno-hospedeiro. Além disso, abrem novas possibilidades para o estudo de alvos com o intuito de estabelecer novas estratégias terapêuticas para histoplasmose.

Palavras-chave: *Histoplasma capsulatum*; biofilme; macrófagos; infecção; proteoma.

ABSTRACT

Histoplasmosis is a systemic mycosis, caused by the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. Biofilms are sessile communities of microorganisms, which group together in an organized way a substrate or adhere to others and are surrounded by an extracellular matrix of their own. Fungal abilities to form biofilms, a phenotype that can induce resistance and increase virulence, was made available. Furthermore, a correlation between the mode of infection of *H. capsulatum* and a formation of these communities has also been published. This study aimed to deepen the study of biofilms formed by different strains of *H. capsulatum* (EH-315, G186A and G217B), by verifying the influence of four culture media (BHI, HAM-F12, DMEM and RPMI) and different oxygen atmospheres (microaerophilia and aerobiosis) in the development of these communities. Additionally, it was also aimed to study an interaction between planktonic and biofilm-derived cells after infection in alveolar macrophages, verifying their behavior and their capacity for infection, as well as verifying the formation of biofilm in an acidic environment, mimicking the intracellular environment in the macrophage and performing a proteomic analysis by *shotgun* technique, in order to identify unique proteins in these conditions for a future search for antifungal targets. The standardization of fungal growth was conducted from the construction of growth, through colony counting, verification of cell viability with Trypan blue and optical density. The formation of biofilms was characterized using optical and colorimetric microscopy techniques, such as the XTT reduction assay, crystal violet and safranin staining, in addition to scanning electron microscopy (SEM) for observation of topographies. The interaction with alveolar macrophages was observed by fluorescence and confocal microscopy for further proteomic analysis in a mass spectrometer. In biofilm characterization tests, it was found that, although all culture media have stimulated the maturation of communities, HAM-F12 provided the best development of biomass and polysaccharide material. In relation to the O₂ atmospheres, both stimulated an excellent development of the communities, however, under low O₂ conditions, an exuberant amount of extracellular matrix was observed when compared to the biofilms formed in aerobiosis, mainly in the HAM-F12 media. In biofilms formed in BHI, RPMI and DMEM, an explained reversion of the phenotype from yeast to hypha was observed, requiring further investigation. In the interaction with macrophages, the formation of fungal clusters in macrophages was observed. However, the formation of clusters, as well as the fluorescence of the labeling with the anti-Hsp60 antibody and the cellular suffering were more expressive in the infection with cells derived from biofilm. Furthermore, biofilm-derived cells exhibited a higher infection rate after 1, 5 and 24 hours compared to planktonic cells. The acidic environment was not an impediment to the formation of mature biofilms. In proteomics assays, different protein profiles were observed under the conditions tested, with 72 specially expressed by the biofilm when compared to planktonic growth. The vast majority of these proteins are related to cytoplasmic functions. Proteomic data from biofilm-derived cells also revealed an increase in proteins involved in stress, defense, virulence and energy acquisition and a reduction in proteins involved in protein synthesis and the metabolic process. In the proteome of infection by biofilm-derived cells, 6 unique proteins were identified compared to the control (biofilm), most classified as nuclear, allowing a partial

understanding of the pathways associated with the adaptation and adaptation of the fungus to the host's environment. These results present advances in the field of biofilms and contribute to future studies that can prove the role of these communities in the host-pathogen interaction. Furthermore, they open up new possibilities for the study of targets in order to establish new therapeutic strategies for histoplasmosis.

Keywords: *Histoplasma capsulatum*; biofilm; macrophages; infection; proteome.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição global da histoplasmose de acordo com o número de cepas existentes XXXIII
- Figura 2.** Ciclo biológico de *H. capsulatum*..... XXXVI
- Figura 3.** Representação esquemática das etapas do desenvolvimento de biofilmes em fungos filamentosos e leveduriformes.....XLIV
- Figura 4.** Curvas de crescimento da cepa EH-315 de *H. capsulatum* nos meios BHI, HAM-F12, DMEM e RPMI. Carga fúngica e densidade óptica em condição de aerobiose (A e B) e microaerofilia (C e D)LXX
- Figura 5.** Curvas de crescimento da cepa G186A de *H. capsulatum* nos meios BHI, HAM-F12, DMEM e RPMI. Carga fúngica e densidade óptica em condição de aerobiose (A e B), microaerofilia (C e D)LXXI
- Figura 6.** Viabilidade celular da cepa EH-315 de *H. capsulatum* com trypan blue nos meios BHI, HAM-F12, DMEM e RPMI nos tempos 24-168 horas em condição de microaerofilia (A) e aerobiose (B) LXXII
- Figura 7.** Viabilidade celular da cepa G186A de *H. capsulatum* com trypan blue nos meios BHI, HAM-F12, DMEM e RPMI nos tempos 24-168 horas em condição de microaerofilia (A) e aerobiose (B) LXXII
- Figura 8.** Cinética da viabilidade celular dos biofilmes formados por diferentes cepas de *H. capsulatum*: (AB) EH-315, (CD) G186A e (EF) G217B e em diferentes condições: (ACE) biofilme formado em microaerofilia e (BDF) em aerobiose, em função do tempoLXXIV
- Figura 9.** Comparação entre a viabilidade celular dos biofilmes maduros formados em meio HAM-F12 das cepas EH-315, G217B e G186A de *H. capsulatum*LXXV
- Figura 10.** Cinética das biomassas produzidas pelo biofilme de diferentes cepas de *H. capsulatum*: (AB) EH-315, (CD) G186A e (EF) G217B e em diferentes condições: (ACE) biofilme formado em microaerofilia e (BDF) em aerobiose, em função do tempo LXXVII
- Figura 11.** Comparação entre a produção de biomassa dos biofilmes maduros formados em meio HAM-F12 pelas cepas EH-315, G217B e G186A de *H. capsulatum* LXXVIII
- Figura 12.** Cinética da quantidade de matriz extracelular e estruturas polissacarídicas produzidas pelos biofilmes das diferentes cepas de *H. capsulatum*: (AB) EH-315, (CD) G186A e (EF) G217B e em diferentes condições: (ACE) biofilme formado em microaerofilia e (BDF) em aerobiose, em função do tempo..... LXXX
- Figura 13.** Comparação entre a quantidade de matriz extracelular e estruturas polissacarídicas dos biofilmes maduros formados em meio HAM-F12 pelas cepas EH-315, G217B e G186A de *H. capsulatum*LXXXI

| | |
|--|----------|
| Figura 14. Análise morfológica dos biofilmes da cepa EH-315 de <i>H. capsulatum</i> em microaerofilia no equipamento <i>In Cell Analyzer (GE Healthcare)</i> | LXXXIII |
| Figura 15. Análise morfológica dos biofilmes da cepa EH-315 de <i>H. capsulatum</i> em aerobiose no equipamento <i>In Cell Analyzer (GE Healthcare)</i> | LXXXIV |
| Figura 16. Análise morfológica dos biofilmes da cepa G186A de <i>H. capsulatum</i> em microaerofilia no equipamento <i>In Cell Analyzer (GE Healthcare)</i> | LXXXV |
| Figura 17. Análise morfológica dos biofilmes da cepa G186A de <i>H. capsulatum</i> em aerobiose no equipamento <i>In Cell Analyzer (GE Healthcare)</i> | LXXXVI |
| Figura 18. Análise morfológica dos biofilmes da cepa G217B (GFP) de <i>H. capsulatum</i> em microaerofilia no equipamento <i>In Cell Analyzer (GE Healthcare)</i> | LXXXVII |
| Figura 19. Análise morfológica dos biofilmes da cepa G217B (GFP) de <i>H. capsulatum</i> em aerobiose no equipamento <i>In Cell Analyzer (GE Healthcare)</i> | LXXXVIII |
| Figura 20. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa EH-315 formado em meio BHI sob condição de microaerofilia | XC |
| Figura 21. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa EH-315 formado em meio HAM-F12 sob condição de microaerofilia | XCI |
| Figura 22. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa EH-315 formado em meio DMEM sob condição de microaerofilia | XCII |
| Figura 23. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa EH-315 formado em meio RPMI sob condição de microaerofilia | XCIII |
| Figura 24. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme da cepa EH-315 formado em meio BHI sob condição de aerobiose | XCIV |
| Figura 25. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme da cepa EH-315 formado em meio HAM-F12 sob condição de aerobiose | XCV |
| Figura 26. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme da cepa EH-315 formado em meio DMEM sob condição de aerobiose..... | XCVI |
| Figura 27. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme da cepa EH-315 formado em meio RPMI sob condição de aerobiose | XCVII |
| Figura 28. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa G186A formado em meio BHI sob condição de microaerofilia | XCVIII |
| Figura 29. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa G186A formado em meio HAM-F12 sob condição de microaerofilia | XCIX |
| Figura 30. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa G186A formado em meio DMEM sob condição de microaerofilia | C |

| | |
|--|--------|
| Figura 31. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa G186A formado em meio RPMI sob condição de microaerofilia | CI |
| Figura 32. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa G186A formado em meio BHI sob condição de aerobiose | CII |
| Figura 33. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa G186A formado em meio HAM-F12 sob condição de aerobiose | CIII |
| Figura 34. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa G186A formado em meio DMEM sob condição de aerobiose..... | CIV |
| Figura 35. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa G186A formado em meio RPMI sob condição de aerobiose | CV |
| Figura 36 Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa G217B formado em meio BHI sob condição de microaerofilia | CVI |
| Figura 37. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa G217B formado em meio HAM-F12 sob condição de microaerofilia..... | CVII |
| Figura 38. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa G217B formado em meio DMEM sob condição de microaerofilia | CVIII |
| Figura 39. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa G217B formado em meio RPMI sob condição de microaerofilia | CIX |
| Figura 40. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa G217B formado em meio BHI sob condição de aerobiose | CX |
| Figura 41. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa G217B formado em meio HAM-F12 sob condição de aerobiose | CXI |
| Figura 42. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa G217B formado em meio DMEM sob condição de aerobiose..... | CXII |
| Figura 43. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa G217B formado em meio RPMI sob condição de aerobiose | CXIII |
| Figura 44. Interação de macrófagos alveolares AMJ2-C11 com células planctônicas (A, B, C e D) e células derivadas de biofilme (E, F, G e H) da cepa EH-315 de <i>H. capsulatum</i> após 15 min de infecção (A-E); 1 hora de infecção (B-F); 5 horas de infecção (C-G) e 24 horas de infecção (D-H)..... | CXVIII |
| Figura 45. Intensidade de fluorescência da proteína Hsp60 na infecção pelas células planctônicas e derivadas de biofilme de <i>H. capsulatum</i> em macrófagos alveolares AMJ2-C11 utilizando o software <i>Investigator 1000 Workstation</i> | CXIX |
| Figura 46. Infecção das células planctônicas da cepa EH-315 após 15 minutos de infecção (A, B, C e D). As letras E, F, G e H indicam a infecção pelas células derivadas de biofilme da mesma cepa e com o mesmo período de incubação | CXXI |

- Figura 47.** Infecção das células planctônicas da cepa EH-315 após 1 hora de infecção (**A, B, C e D**). A infecção pelas células derivadas de biofilme da mesma cepa com 1 hora de infecção (**E, F, G e H**)CXXIII
- Figura 48.** Infecção pelas células planctônicas da cepa EH-315 com 5 horas de infecção (**A, B, C e D**). Infecção após 5 horas pelas células derivadas de biofilme (**E, F G e H**)CXXV
- Figura 49.** Infecção pelas células planctônicas da cepa EH-315 após 24 horas (**A, B, C e D**) e pela mesma cepa derivada de biofilme (**E, F, G e H**)..... CXXVII
- Figura 50.** Controle de macrófagos alveolares murinos AMJ2-C11 (**A**) e controle da cepa EH-315 de *H. capsulatum* (**B**).CXXVIII
- Figura 51.** Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL) em diferentes tempos de interação de células planctônicas e derivadas de biofilme da cepa EH-315 de *H. capsulatum* em macrófagos alveolares AMJ2-C11 CXXIX
- Figura 52.** Cinética da viabilidade celular do biofilme da cepa EH-315 de *H. capsulatum* em diferentes condições fisiológicas de pH pelo ensaio de redução do XTT CXXXII
- Figura 53.** Comparação da viabilidade celular do biofilme maduro da cepa EH-315 de *H. capsulatum* em diferentes condições fisiológicas de pH obtida pelo ensaio de redução do XTT CXXXIII
- Figura 54.** Cinética do desenvolvimento da biomassa do biofilme da cepa EH-315 de *H. capsulatum* quantificada pela coloração por cristal violeta em diferentes condições fisiológicas de pH.....CXXXIV
- Figura 55.** Comparação do desenvolvimento da biomassa dos biofilmes maduros da cepa EH-315 de *H. capsulatum* em diferentes condições fisiológicas de pH através da coloração por cristal violeta.....CXXXIV
- Figura 56.** Cinética da matriz extracelular e estruturas polissacarídicas produzidas pelos biofilmes da cepa EH-315 de *H. capsulatum* quantificada pela coloração com safranina em diferentes condições fisiológicas de pH CXXXV
- Figura 57.** Comparação da quantidade de matriz extracelular e estruturas polissacarídicas produzidas pelos biofilmes maduros da cepa EH-315 de *H. capsulatum* em diferentes condições fisiológicas de pH através da coloração com safranina.....CXXXVI
- Figura 58.** Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa EH-315 formado em pH 4.5 (ácido) (**A, B e C**) e pH neutro (7.2) (**D, E e F**) CXXXVIII
- Figura 59.** SDS-PAGE dos componentes proteicos da cepa EH-315 de *H. capsulatum* sob condições planctônicas e em biofilme CXLI
- Figura 60.** Diagramas de Venn representando o número de proteínas exclusivas em cada amostra e o número de proteínas expressas em ambas as condições. (**A**) crescimento planctônico vs. biofilme da cepa EH-315 de *H. capsulatum*; (**B**) controle (biofilme da cepa EH-315 de *H. capsulatum* na condição controle) vs. infecção de células derivadas de biofilmes em macrófagos J774 A.1. CXLII

Figura 61. Classificação funcional de proteínas exclusivas da cepa EH-315 de *H. capsulatum* identificadas no crescimento planctônico (A) e em biofilme (B) com base no banco de dados UniProt. CXLIV

Figura 62. Classificação funcional de proteínas exclusivas do biofilme da cepa EH-315 de *H. capsulatum* durante a condição controle (A) e durante a infecção em macrófagos J774 A.1, após 24h (B) com base no banco de dados UniProt. CL

Figura 63. Localização subcelular das proteínas exclusivas identificadas nas células planctônicas, no biofilme da cepa EH-315 de *H. capsulatum*, no controle (células do biofilme de *H. capsulatum* durante a condição controle) e na infecção pelas células do biofilme de *H. capsulatum* em macrófagos alveolares J774 A.1, após 24 horas com base no servidor WoLF PSORT. CLV

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração de proteínas totais de *H. capsulatum* em células planctônicas e em biofilme, bem como em macrófagos J774 A.1 infectados com células derivadas de biofilme da cepa EH-315 de *H. capsulatum*, determinadas pelo método de Bradford. Os ensaios foram conduzidos em triplicata, em três experimentos independentes.....CXXXIX

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN - Acetonitrila

AGSI - Gene codificador da proteína α -1,3 -glucana sintase

AMJ₂-C11 - Células de macrófagos alveolares murinos

ATCC - *American Type Culture Collection*

Bad1p - Homólogo da adesina Bad1p de *Blastomyces dermatitidis*

BHI - *Brain Heart Infusion*

BSA - Albumina de soro bovino

CaCl₂ - Cloreto de cálcio

CBP1 - *Calcium-binding protein*

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CLSM - Microscopia confocal de varredura a laser

CO₂ - Gás carbônico

CR3 - Receptores para o sistema complemento em diferentes tipos celulares

Dectina-1 - Maior receptor de fagócitos de reconhecimento de β -glucanas

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's médium*

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DTT - Ditioneitol

Eng-1 - Glucanase secretada por *H. capsulatum*

FITC - *Fluorescein isothiocyanate*

GCPSR - *Genetic Concordance Phylogenetic Species Recognition*

g- grama

h -Hora

HAART - Terapia antirretroviral altamente ativa

Ham-F12 - Meio de cultivo para macrófagos

H⁺ATPase - Bomba de prótons

H. capsulatum - *Histoplasma capsulatum*

HIV - *Human Immunodeficiency Virus*

hrs - Horas

Hsps - *Heat shock proteins*

ITS - *Internal Transcribed spacer*

J774 A.1 - Células de macrófagos alveolares murinos

kDa – Kilodalton

kPa - Quilopascal

L – Litro

m - massa

M – Molar

MEC - Matriz extracelular

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

mg – Miligramas

min – Minutos

mL – Mililitros

MLST- *Multilocus sequence typing*

mM – Milimolar

mm – Milímetro

MOI - *Multiplicity of Infection*

MOPS - Ácido 3-(N-morfolina) propanossulfônico

MRC-5 - Células de fibroblastos de pulmão humano

MS - Espectrometria de massas

n – Número

ng – Nanograma

nm – Nanômetros

ns – Não significante

O₂ – Oxigênio

°C - *Graus Celsius*

% - Porcentagem

PBS - *Phosphate buffered saline*

PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida

pH - Potencial de hidrogênio

PLAAC - Mistura de inibidores de protease composto de pepstatina, leupeptina, aprotinina, antipaina e quimiostatina

PMA - *Phorbol-12-myristate-13-acetate*

PMSF - *Phenylmethylsulfonyl fluoride*

QS - *Quorum sensing*

RAPD - *Random amplified polymorphic DNA*

RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphisms*

rpm - Rotações por minuto

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*

ROS - Espécies reativas de oxigênio

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SFB - Soro fetal bovino

SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

TCA - Ácido tricloroacético

TEMED – Tetrametiletenodiamida

TFA - Ácido trifluoroacético

Tris-HCl - Tris-Hidrocloroeto

UFC - Unidades formadoras de colônia

vs- versus

XTT - [2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-(2H)-tetrazólio-5-carboxanilida]

Yps3 - *Yeast-phase-specific*

µg - Microgramas

μL – Microlitros

z -carga

SUMÁRIO

Capítulo 1

| | |
|--|---------------|
| 1. INTRODUÇÃO | XXVIII |
| 1.1. REVISÃO HISTÓRICA..... | XXVIII |
| 1.2. <i>Histoplasma capsulatum</i> | XXVIII |
| 1.3. TAXONOMIA..... | XXX |
| 1.4. EPIDEMIOLOGIA..... | XXXII |
| 1.5. PATOGENIA | XXXIV |
| 1.6. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS..... | XXXVII |
| 1.7. TERAPÊUTICA | XXXVIII |
| 1.8. FATORES E MECANISMOS DE VIRULÊNCIA..... | XL |
| 1.9. BIOFILMES | XLIII |
| 1.10. ABORDAGENS PROTEÔMICAS..... | XLVI |
| 2. OBJETIVOS | LI |
| 2.1. OBJETIVO GERAL..... | LI |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | LI |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | LIII |
| 3.1. MICRORGANISMOS..... | LIII |
| 3.2. REVERSÃO DA FORMA MICELIAR PARA A LEVEDURIFORME | LIII |
| 3.3. INFECÇÃO E REISOLAMENTO DE <i>H. capsulatum</i> APÓS PASSAGEM EM MONOCAMADAS DE FIBROBLASTOS DE PULMÃO (MRC-5)..... | LIV |
| 3.4. CURVA DE CRESCIMENTO..... | LIV |
| 3.5. CARACTERIZAÇÃO DA FORMAÇÃO DOS BIOFILMES DE <i>H. capsulatum</i> EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE NUTRIENTES E ATMOSFERAS DE O ₂ | LV |
| 3.5.1. Determinação da viabilidade celular do biofilme pelo ensaio de redução do XTT | LVI |
| 3.5.2. Quantificação da biomassa pela coloração com Cristal Violeta..... | LVI |
| 3.5.3. Quantificação do material polissacarídico pela coloração com Safranina | LVII |
| 3.5.4. Análise morfológica dos biofilmes..... | LVII |
| 3.5.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) | LVII |
| 3.6. ENSAIOS DE INTERAÇÃO ENTRE MACRÓFAGOS ALVEOLARES AMJ ₂ -C11 E CÉLULAS PLANCTÔNICAS E DERIVADAS DE BIOFILME DE <i>H. capsulatum</i> ... | LVIII |
| 3.6.1. Cultura de células AMJ ₂ -C11 | LVIII |
| 3.6.2. Infecção de macrófagos AMJ ₂ -C11 por células planctônicas e derivadas de biofilme de <i>H. capsulatum</i> | LVIII |

| | |
|---|-------------|
| 3.6.3. Imunofluorescência Indireta | LIX |
| 3.6.4. Taxa de infecção de células planctônicas e derivadas de biofilme de <i>H. capsulatum</i> em macrófagos AMJ ₂ -C11 por contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL)..... | LX |
| 3.7. ENSAIO DE FORMAÇÃO DO BIOFILME DE <i>H. capsulatum</i> EM pH ácido..... | LX |
| 3.7.1. Determinação da viabilidade celular do biofilme pelo ensaio de redução do XTT | LX |
| 3.7.2. Quantificação da biomassa do biofilme por coloração com Cristal Violeta | LXI |
| 3.7.3. Quantificação do material polissacarídico do biofilme pela coloração com Safranina..... | LXI |
| 3.7.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) | LXI |
| 3.8. ANÁLISE PROTEÔMICA | LXII |
| 3.8.1. Culturas planctônicas e formação de biofilmes de <i>H. capsulatum</i> | LXII |
| 3.8.2. Cultura de células J774 A.1 | LXII |
| 3.8.3. Infecção de macrófagos alveolares J774 A.1 por células derivadas de biofilme de <i>H. capsulatum</i> | LXII |
| 3.8.4. Obtenção de extratos proteicos..... | LXIII |
| 3.8.5. Determinação da concentração de proteínas totais: Método de Bradford..... | LXIV |
| 3.8.6. Análise do perfil proteico por eletroforese em gel de poli(acrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) | LXIV |
| 3.8.7. Digestão enzimática..... | LXV |
| 3.8.8. Análise de proteínas por <i>shotgun</i> | LXV |
| 3.8.9. Identificação de proteínas | LXVI |
| 3.8.10. Análise funcional dos dados de proteômica | LXVI |
| 3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA | LXVI |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | LXIX |
| 4.1. CURVA DE CRESCIMENTO..... | LXIX |
| 4.1.1. Carga fúngica e Densidade óptica | LXIX |
| 4.1.2. Verificação da viabilidade celular por utilização de azul de Tripán | LXIX |
| 4.2. ENSAIOS DE FORMAÇÃO DOS BIOFILMES DE <i>H. capsulatum</i> | LXXIII |
| 4.2.1. Determinação da viabilidade celular dos biofilmes pelo ensaio de redução do XTT..... | LXXIII |
| 4.2.2. Quantificação da biomassa por coloração com Cristal Violeta..... | LXXVI |
| 4.2.3. Quantificação da matriz extracelular e estruturas polissacarídicas por coloração com Safranina | LXXIX |
| 4.2.4. Análise morfológica dos biofilmes formados em diferentes meios | LXXXI |
| 4.2.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos biofilmes formados em diferentes meios..... | LXXXIX |

| | |
|--|---------------|
| 4.3 ENSAIOS DE INTERAÇÃO ENTRE MACRÓFAGOS ALVEOLARES E CÉLULAS PLANCTÔNICAS E DERIVADAS DE BIOFILME DE <i>H. capsulatum</i> | CXVII |
| 4.3.1. <i>IN Cell Analyzer 2000 System light microscopy</i> | CXVII |
| 4.3.2. Microscopia Confocal de Varredura à Laser (CLSM) | CXIX |
| 4.3.3. Taxa de infecção de células planctônicas e derivadas de biofilme de <i>H. capsulatum</i> em macrófagos AMJ2-C11 por contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL)..... | CXXIX |
| 4.4. ENSAIO DE FORMAÇÃO DO BIOFILME DE <i>H. capsulatum</i> em pH ácido... CXXXI | |
| 4.4.1. Determinação da viabilidade celular do biofilme pelo ensaio de redução do XTT | CXXXI |
| 4.4.2. Quantificação da massa do biofilme por coloração com Cristal Violeta | CXXXIII |
| 4.4.3. Quantificação da matriz extracelular e estruturas polissacarídicas por coloração com Safranina | CXXXV |
| 4.4.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos biofilmes formados em pH ácido | CXXXVI |
| 4.5 ANÁLISE PROTEÔMICA | CXXXIX |
| 4.5.1. Determinação das proteínas totais | CXXXIX |
| 4.5.2. Análise do perfil proteico por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) | CXL |
| 4.5.3. Análise proteômica por <i>shotgun</i> | CXLI |
| 4.5.4. Análise funcional das proteínas exclusivas no crescimento planctônico e em biofilmes de <i>H. capsulatum</i> | CXLII |
| 4.5.5. Análise funcional de proteínas exclusivas do biofilme da cepa EH-315 de <i>H. capsulatum</i> identificadas durante a infecção em macrófagos alveolares J774 A.1. | CXLVIII |
| 4.5.6. Localização Subcelular | CLIV |
| 5. CONCLUSÕES..... | CLVIII |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | CLXI |

Capítulo 1

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. REVISÃO HISTÓRICA

A histoplasmose foi descrita pela primeira vez no ano de 1905 por Samuel Taylor Darling, ao observar a presença de numerosos corpos arredondados e ovais no interior de macrófagos alveolares em materiais de necrópsia. O microrganismo foi denominado *Histoplasma capsulatum* pela presença do que acreditava-se ser uma cápsula e por estar presente no interior de histócitos (DARLING, 1906). Seu reconhecimento de natureza fúngica foi observada por Rocha Lima em 1912, e posteriormente, em 1934, De Monbreun realizou estudos *in vitro* e *in vivo*, verificando a transição da fase miceliar para a fase leveduriforme, comprovando assim, o dimorfismo do fungo (DE MONBREUN, 1934).

Nos anos de 1939 e 1940, o fungo foi isolado pela primeira vez no Brasil em material de necrópsia e em amostra de escarro de um paciente (ALMEIDA; LACAZ, 1941). De sua descoberta até 1945, a histoplasmose era conhecida como uma doença rara, de evolução fatal e de transmissão desconhecida, porém, após um estudo de Christie e Peterson (1945), descobriu-se que sua transmissão era por via inalatória. Esse estudo revelou ainda a presença de calcificações pulmonares nos pacientes.

Em 1947, *H. capsulatum* foi isolado pela primeira vez em roedores (EMMONS et al., 1947). Posteriormente, Zeidberg (1952) e Shacklette (1962) descreveram que *H. capsulatum* é capaz de crescer em solo rico em matéria orgânica, além disso, o fungo foi isolado em órgãos como o fígado e baço de morcegos insetívoros.

No Brasil, próximo aos anos sessenta, diversas microepidemias foram relatadas, os principais fatores predisponentes mais comuns eram visitas em grutas colonizadas por morcegos, minas abandonadas e galinheiros (OLIVEIRA et al., 2006). Décadas mais tarde, com o surgimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), centenas de casos foram observados, tornando essa micose um importante problema de saúde mundial (DAHER et al., 2008).

1.2. *Histoplasma capsulatum*

Histoplasma capsulatum variedade *capsulatum* é um fungo patogênico dimórfico, que tem distribuição mundial (PITANGUI et al., 2016). É considerado o agente mais prevalente nas infecções respiratórias causadas por fungos registradas nos últimos anos (HAGE et al., 2015). O fungo quando inalado na fase miceliar, causa uma doença respiratória leve, muitas vezes assintomática, mas pode evoluir para doença disseminada, particularmente em

indivíduos imunocomprometidos, causando a doença denominada histoplasmose (NOSANCHUK et al., 2002; DAMASCENO et al., 2019).

H. capsulatum apresenta-se morfológicamente em duas formas distintas: filamentosa e a leveduriforme (TELES et al., 2014). A primeira forma é encontrada na natureza na fase saprofítica, ou quando cultivada *in vitro* em temperaturas de 20°C a 30°C, este se apresenta na forma de micélio, com morfologia filamentosa de colônias branco - acastanhadas e algodonosas. Microscopicamente esta forma é caracterizada por hifas hialinas, septadas e ramificadas, contendo duas formas de propagação: macroconídios medido de 8 a 16 µm de diâmetro, geralmente redondos e microconídios medindo em torno de 2 a 5 µm, com paredes lisas ou irregulares (FERREIRA; BORGES, 2009). Já a forma leveduriforme é considerada a forma parasitária, particularmente presente em tecidos de hospedeiros mamíferos, incluindo humanos. Quando o fungo na forma miceliar é cultivado *in vitro* em temperaturas de cerca de 35 a 37°C, ocorre a conversão da forma filamentosa para a forma leveduriforme. Nessa fase o fungo apresenta microscopicamente uma morfologia oval e pequena, além de paredes refringentes e unibrotantes medindo de 2 a 4 µm de diâmetro e colônias de aspecto úmido, lisas e de coloração branco-amarelada (MITTAL et al., 2019).

No ambiente a forma saprobiótica está frequentemente associada a ambientes ricos em matérias orgânicas em decomposição com elevado teor de nitrogênio como fezes de pássaros, morcegos ou galinhas. Além disso, *H. capsulatum* é capaz de sobreviver na natureza através da adaptação a diferentes condições que esses micro nichos geralmente apresentam como condições de temperatura e nutricionais adequadas, umidade e pH (CANO; HAJJEH, 2001; ASSUNÇÃO et al., 2020).

O fungo é isolado particularmente de locais com altas concentrações de excrementos e matéria orgânica, incluindo cavernas, construções antigas ou abandonadas, forros, sótãos ou porões de casas, galinheiros, árvores ocas e parques públicos (FERREIRA; BORGES, 2009; GUPTA et al., 2016). Neste contexto, atividades exploratórias em cavernas ou grutas, limpeza de sótãos ou celeiros, demolição de edificações antigas e revolvimento de solos estão relacionadas à infecção por *H. capsulatum* e contribuem para a disseminação de fragmentos de hifas, além da dispersão dos macros e microconídeos pelo ar, expondo mesmo indivíduos que não estavam próximos e nem tiveram contato direto com áreas contaminadas (GUPTA et al., 2016).

1.3. TAXONOMIA

H. capsulatum é um microrganismo eucarioto que pertence ao reino Fungi, filo *Ascomycota*, classe *Eurotiomycetes*, ordem *Onygenales*, família *Ajellomycetaceae*, gênero *Histoplasma* (anamorfo) ou *Ajellomyces* (teleomorfo) (LACAZ et al., 2009; KASUGA et al., 2003; WOODS, 2016).

Classicamente são descritas três variedades distintas relacionadas à sua morfologia e patogenicidade: *H. capsulatum* var. *capsulatum*; *H. capsulatum* var. *duboisii* e *H. capsulatum* var. *farciminosum*. A variedade *H. capsulatum* var. *capsulatum* e *H. capsulatum* var. *duboisii* são patogênicas para o homem e a variedade *H. capsulatum* var. *farciminosum* é patogênica em equinos. As variedades apresentam distribuições diferentes, sendo que *H. capsulatum* var. *capsulatum* é endêmico no continente americano, *H. capsulatum* var. *duboisii* nas regiões oeste e central da África e Ilha de Madagascar e *H. capsulatum* var. *farciminosum* nas regiões da Europa, Ásia e África (KASUGA; TAYLOR; WHITE, 1999; ZIDA et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2016; GLADIEUX, 2018).

Nos últimos anos, devido ao aumento dos casos de histoplasmose no mundo e com o surgimento de métodos moleculares com o intuito de classificar espécies fúngicas, várias abordagens de genotipagem foram propostas para explorar as relações filogenéticas do fungo. Técnicas como a de Restrição de Fragmentos Polimórficos (*Restriction Fragment Length Polymorphisms - RFLP*), hibridização do DNA, Amplificação Aleatória de DNAs Polimórficos (*Random Amplified Polymorphic DNA – RAPD*) e Sequenciamento *ITS1/2* são frequentemente empregadas para diferenciar cepas de *H. capsulatum* de acordo com sua origem geográfica (VITE-GARIN et al., 2014).

Outra técnica aplicada ao estudo da diversidade genética é a *Multilocus Sequence Typing (MLST)*. Baseado neste método, 137 isolados de *H. capsulatum* procedentes de 25 países foram analisados por Kasuga e colaboradores (2003). Foi sugerido neste estudo, que *H. capsulatum* divide-se em pelo menos oito clados dos quais sete são espécies filogenéticas, incluindo dois clados restritos à América do Norte (Norte-América classe 1 - NAm1, e Norte-América classe 2 - NAm2), dois clados encontrados predominantemente na América Latina (Latino-América A - LAmA, e Latino-América B - LAmB), um clado restrito à Austrália, um clado encontrado entre as regiões da Holanda e Indonésia, um clado identificado entre as regiões da Europa e Ásia (Euroasiano), e um clado restrito à África. No entanto, sete desses oito clados são considerados espécies filogeneticamente relacionadas com exceção do clado

Eurasiano, que se agrupou com a espécie LAmA (KASUGA; TAYLOR; WHITE, 1999; KASUGA et al., 2003).

Adicionalmente, estudos recentes com maior número de isolados de *H. capsulatum* (n= 234) e utilizando diferentes métodos filogenéticos e métodos de genética populacional, identificou uma grande diversidade genética dentro do grupo das espécies filogenéticas provenientes da América Latina, sendo propostas seis novas espécies filogenéticas. Neste contexto, a antiga espécie LAmA foi subdividida em: LAmA1 (incluindo principalmente isolados do México, Colômbia, Guatemala e Honduras) e LAmA2 (incluindo isolados do México, Guatemala e Colômbia); a antiga espécie LAmB foi reagrupada em LAmB1 (contendo isolados da Argentina, Colômbia e Brasil) e LAmB2 (incluindo isolados do Rio Grande do Sul e Espírito Santo no Brasil), além de uma espécie RJ (constituído por isolados do Rio de Janeiro e São Paulo). Neste contexto os autores ainda sugeriram uma nova espécie formada por isolados fúngicos derivados de morcegos (*Tadarida brasiliensis* e *Mormoops megalophylla*) do México, denominada BAC-1 (Teixeira et al., 2016; Rodrigues et al., 2020).

Por outro lado, análises filogenéticas conduzidas por Sepúlveda e colaboradores (2017), propuseram um novo rearranjo taxonômico para o gênero *Histoplasma*, a partir de análises filogenéticas de genomas completos bem como de genes de virulência de 30 isolados. Baseado nas diferenças entre os agrupamentos genéticos, os dados indicaram que o gênero pode ser composto por pelo menos quatro espécies que diferem em virulência e genética. Sendo assim, foi sugerido neste estudo que isolados da espécie NAm1 passem a ser uma nova espécie, denominada *Histoplasma mississippiense* e isolados da espécie NAm2 *Histoplasma ohioense*. Ambas coexistem na América do Norte, uma região do mundo com numerosos casos relatados de histoplasmose. Além disso, isolados pertencentes a espécie LAmA1 são consideradas *Histoplasma suramericanum*, espécie restrita à América do Sul e os representantes da espécie LAmA2 continuam a pertencer a espécie *Histoplasma capsulatum* restrito ao Panamá e na porção norte da América do Sul (FREIFELD et al., 2009; HAGE et al., 2015; BAHR et al., 2016; SEPÚLVEDA et al., 2017).

Ainda de acordo com Sepúlveda e colaboradores (2017), foi proposto que os isolados da Austrália, Holanda e África constituem um só grupo, no entanto, não foi possível ainda redefinir a taxonomia da África, devido a necessidade de um maior número de amostras a serem analisadas que comprovem essa afirmação.

De acordo com a espécie filogenética, as manifestações clínicas, resistência aos antifúngicos, fatores de virulência podem ser diferentes, por exemplo, *H. mississippiense* é

mais resistente aos antifúngicos que o *H. ohiense* (GOUGHENOUR; BALADA-LLASAT; RAPPLEYE, 2015). Outra vertente importante são os fatores de virulência, uma vez que a maioria das espécies de *Histoplasma* utilizam α -1,3 glucana, presente na sua parede celular, para evitar o reconhecimento pelas células imunes do hospedeiro, tornando a presença desse polissacarídeo essencial para a sua virulência (SEPÚLVEDA; WILLIAMS, 2014). Não obstante, *H. ohiense* não possui α -1,3 glucana em sua parede celular e é também a única espécie que expressa Yps3, um homólogo da adesina *Bad1p* de *Blastomyces dermatitidis* presente em sua fase leveduriforme (MAXWELL et al., 2018).

Recentemente, estudos de genotipagem com 104 isolados de *Histoplasma*, identificou uma alta variabilidade genética entre os isolados brasileiros, sendo propostas três novas espécies filogenéticas: LAmC (incluindo isolados do Nordeste do Brasil, particularmente pacientes com HIV residentes em Fortaleza e Ceará); LAmD (incluindo isolados do Nordeste, Cento-Oeste e Sudeste do Brasil) e LAmE (incluindo isolados do Sudeste do Brasil) (RODRIGUES et al., 2020).

Além disso, foi proposto uma reconstrução filogenética através da análise de 176 isolados de morcegos, 30 dos quais foram isolados de morcegos selvagens, usando técnicas moleculares inseridas no método *GCPSR* (*Genetic Concordance Phylogenetic Species Recognition*). Foi sugerido nesse estudo que o antigo clado BAC-1 fosse renomeado a NAM3 com seis isolados derivados da espécie *Tadarida brasiliensis* e um isolado da espécie *Mormoops megalophylla* do México (VITE-GARÍN et al., 2021).

1.4. EPIDEMIOLOGIA

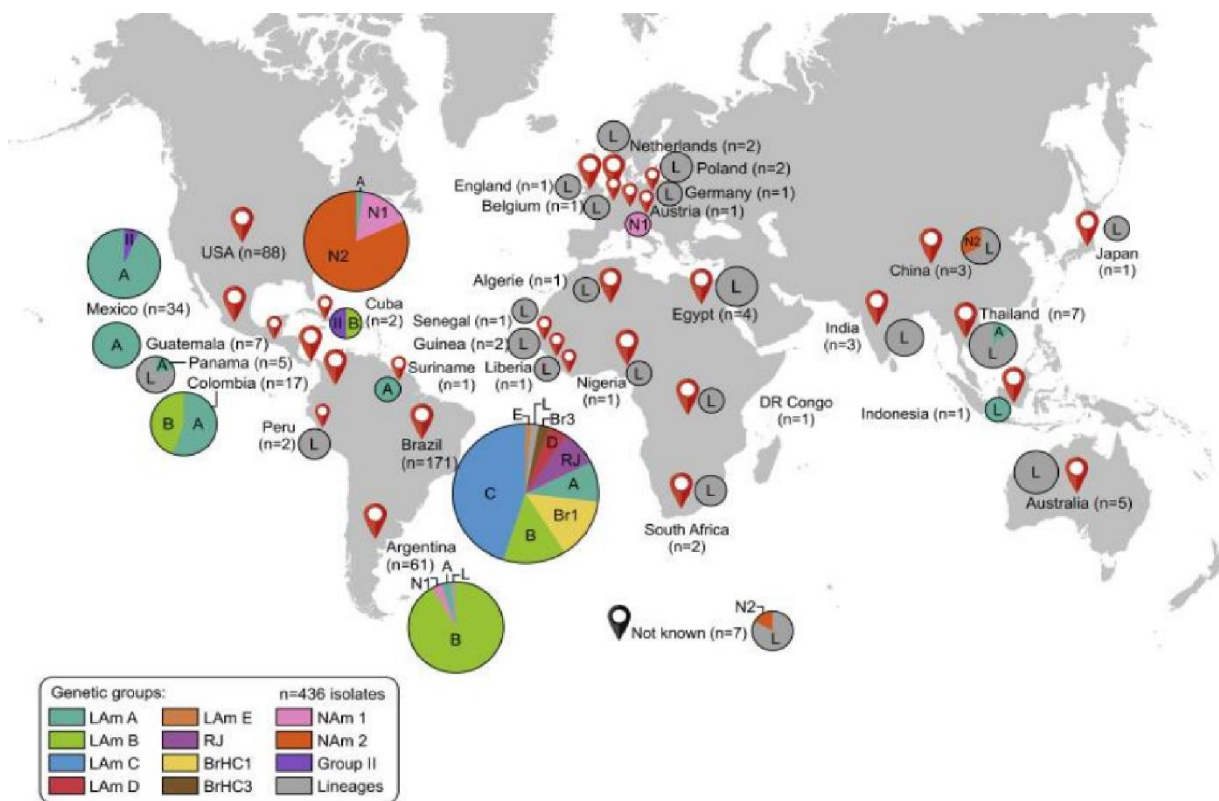
As infecções fúngicas invasivas têm aumentado durante as duas últimas décadas na América Latina e no mundo inteiro e o número de pacientes em risco tem crescido drasticamente (LEE; LAU, 2017; RODRIGUES et al., 2020) (**Figura 1**). Estima-se que aproximadamente 1,2 bilhões de pessoas são acometidas mundialmente por algum tipo de doença fúngica (KNEALE et al., 2016).

A histoplasmose é descrita como uma micose amplamente distribuída nas Américas, em especial nos vales dos rios Ohio e Mississipi nos Estados Unidos, México, Brasil e algumas regiões das Guianas (*Guiana Shield*). Além disso, microfocos são comumente registrados no leste dos Estados Unidos, sul da Europa, sudeste da Ásia e na África (CORREIA et al., 2016). Ademais, é uma das doenças infecciosas de maior prevalência entre portadores de HIV na América Latina apresentando taxa de mortalidade variando de 20% a 40% entre esses pacientes. Além disso, 19 dos 26 estados brasileiros, bem como no Distrito

Federal tem registrado diversos relatos de casos clínicos isolados ou pequenos surtos (ALMEIDA et al., 2019).

No Brasil, as infecções fúngicas são muito prevalentes, no entanto, há a ausência de notificação compulsória, sendo assim, o número de casos não é determinado (FERGUSON-PAUL et al., 2018). Há relatos de que mais de 3,8 milhões de indivíduos no Brasil podem estar sofrendo de infecções fúngicas graves, em particular pacientes que tem o sistema imunológico suprimido com câncer maligno, transplantados, asmáticos, tuberculosos, infecção por HIV e, em especial aqueles que vivem em áreas endêmicas de fungos patogênicos (GIACOMAZZI et al., 2016).

Figura 1. Distribuição global da histoplasmose de acordo com o número de cepas existentes. Fonte: Rodrigues et al., 2020.



Além disso, a histoplasmose é uma das principais infecções sistêmicas do mundo, com incidência variando de 0,1 a 1 caso por 100.000 habitantes por ano em climas temperados, 10 a 100 casos por 100.000 nos trópicos úmidos e mais de 100 casos por 100.000 sendo descritas em casos clínicos isolados ou na ocorrência de surtos (COLOMBO et al., 2012; BRILHANTE et al., 2015; MYINT et al., 2014; RODRIGUES et al., 2020). De acordo com Oliveira, Unis e Severo (2006) 26 surtos de histoplasmose no Brasil desde 1958 são relatados, envolvendo 184

pacientes, com o número de casos por surto variando de 2-13 casos. No entanto, estes dados não são otimizados uma vez que a histoplasmose pulmonar aguda é pouco diagnosticada e muitas vezes confundida com a tuberculose ou a leishmaniose (ANTINORI, 2014). Surto de histoplasmose aguda têm sido registrados em diversos estados brasileiros, entre eles São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Mato Grosso, Minas Gerais, Goiás, Amazonas e Rio Grande do Sul, nos quais os indivíduos são infectados após exposição aos propágulos fúngicos em ambientes contaminados, envolvendo também pacientes imunocompetentes (FERREIRA; BORGES, 2009; FAIOLLA et al., 2013; PASSOS et al., 2015).

Em áreas endêmicas, aproximadamente 10% dos indivíduos imunocompetentes desenvolvem os sintomas da doença (DAMASCENO et al., 2016). Indivíduos HIV-positivos estão predispostos a infecções fúngicas em função das alterações significativas em sua resposta imune celular, uma vez que podem apresentar manifestações mais graves, progressivas e muitas vezes fatais, o que requer agilidade no diagnóstico e tratamento (COLOMBO et al., 2012).

1.5. PATOGENIA

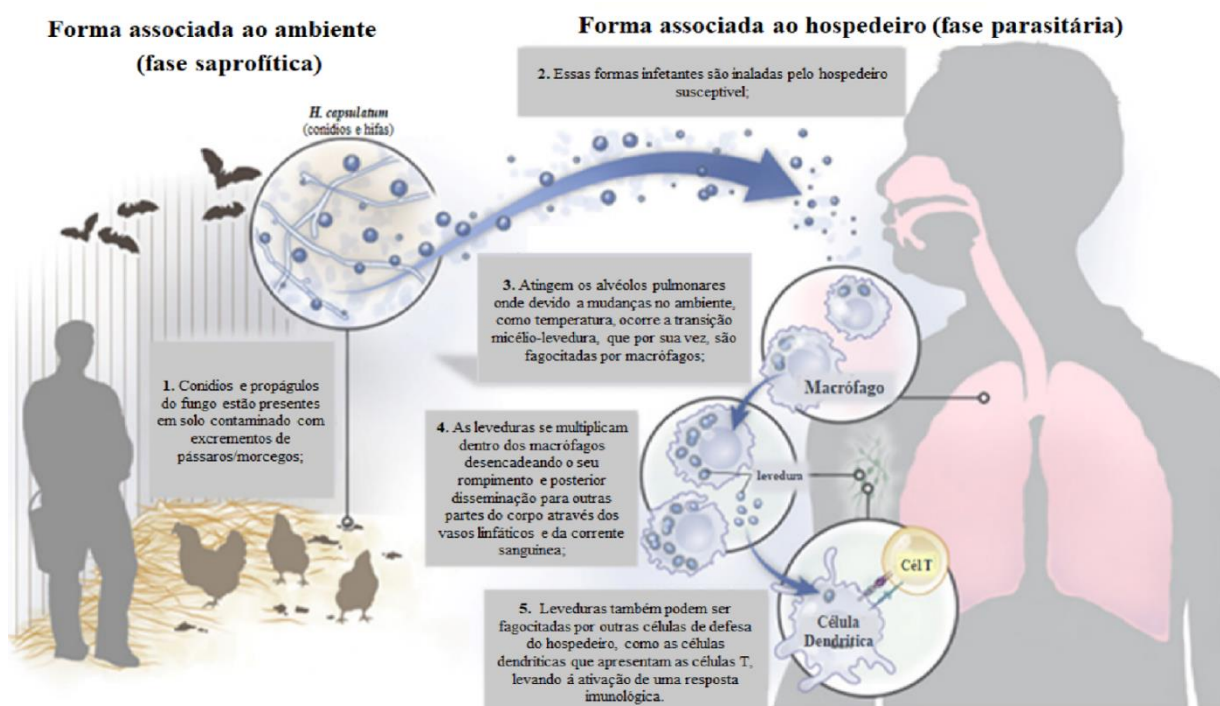
A patogenia da histoplasmose inicia-se pela inalação de conídios e/ou fragmentos de hifas presentes na natureza e disseminados pelo ar (PASSOS et al., 2015; WHEAT et al., 2016; RIDDELL et al., 2019) (**Figura 2**). Uma vez inaladas, estas formas de disseminação entram em contato com o hospedeiro, onde após mudanças que ocorrem no ambiente, como temperatura, nutrientes e pH, ocorre a transição da forma micelial para a forma leveduriforme (SAHAZA et al., 2014). Acredita-se que a mucosa nasal também seja um importante sítio de infecção inicial da doença. Neste contexto, Suarez-Alvarez et al., (2019) demonstraram a presença de leveduras de *H. capsulatum* nos linfonodos cervicais após 2 horas de infecção intranasal em morcegos e camundongos. Estas formas infectantes, por se tratarem de um corpo estranho, desencadeiam uma resposta inflamatória no hospedeiro recrutando células de defesa, principalmente macrófagos, neutrófilos e células dendríticas por meio da ativação de receptores patógeno-hospedeiro (GUIMARÃES; DE CERQUEIRA; NOSANCHUK, 2011).

Os macrófagos por se tratarem de células fagocíticas, são infectados por leveduras de *H. capsulatum*. Por sua vez, eles produzem um ambiente de estresse para o microrganismo, como a acidificação do meio intracelular, produção de radicais de O₂ e de nitrogênio, peptídeos antimicrobianos, proteases e enzimas hidrolíticas, além da restrição de nutrientes essenciais como o cálcio e o ferro, tornando um ambiente hostil e dificultando a sobrevivência do fungo dentro do organismo (WHEAT et al., 2016; SHEN et al., 2018). Por outro lado, o

fungo tem diversos mecanismos de escape como: manipulação do microambiente para manter um pH menos ácido por meio da exclusão da bomba H⁺-ATPase da membrana vacuolar; resistência a proteases lisossomais e enzimas hidrolíticas favorecidas pelos dois mecanismos descritos anteriormente; aquisição de ferro que pode ocorrer através da produção e liberação de sideróforos e pela liberação de ferro unido à transferrina resultado da diminuição do pH; aquisição de cálcio através da produção de uma proteína ligante de cálcio (CBP1), específico da fase leveduriforme e também de metais que permitem o crescimento e a proliferação de microrganismos para que possam sobreviver e se replicar dentro dos fagolisossomos, e assim estabelecer a infecção (LARA-LEMUS et al., 2014; NOSANCHUK et al., 2018; RAY; RAPPLEYE, 2019). Uma vez que os fungos conseguem sobreviver aos mecanismos iniciais de defesa do organismo (macrófagos), os mesmos se encontram protegidos dentro da célula, podendo assim se multiplicar, contrariando a função usual de macrófagos que é de eliminar células nocivas. Esta replicação da forma leveduriforme dentro dos macrófagos, desencadeia o rompimento dos mesmos, facilitando desse modo, a liberação e disseminação do patógeno através dos vasos linfáticos e da corrente sanguínea (HOLBROOK; RAPPLEYE, 2008; GARFOOT; RAPPLEYE, 2016).

Figura 2. Ciclo biológico de *H. capsulatum*, evidenciando a fase saprofítica no ambiente (1) e a fase parasitária após a sua inalação por um hospedeiro susceptível (2-5). Os conídios e propágulos do fungo presentes no ambiente (1) são inalados (2) e atingem os alvéolos pulmonares onde devido a mudanças no ambiente, como temperatura, ocorre a transição micélio-levedura, que por sua vez, são fagocitadas por macrófagos. (3) As leveduras se multiplicam dentro dos macrófagos desencadeando o seu rompimento e posterior disseminação para outras partes do corpo através dos vasos linfáticos e da corrente sanguínea (4). As células leveduriformes também podem ser fagocitadas por outras células de defesa do hospedeiro, como as células dendríticas que apresentam as células T, levando á ativação de uma resposta imunológica (5).

Fonte: <http://www.cdc.gov/fungal/diseases/histoplasmosis/index.html>.



A interação de leveduras de *H. capsulatum* com macrófagos é um componente crucial da resposta do hospedeiro à infecção, uma vez que o fungo é caracterizado como um parasita intracelular facultativo (GARFOOT; RAPPLEYE, 2016). Adicionalmente a infecção depende de interações dinâmicas da imunidade inata com a imunidade adquirida e fatores de virulência específicos do fungo (EDWARDS; RAPPLEYE, 2011; MIHU; NOSANCHUK, 2012).

O controle da infecção é baseado na ativação da imunidade celular em conjunto com a resposta inata e é observada após a segunda ou terceira semana de desenvolvimento da doença Lázár-Molnár et al., (2008). Em infecções restritas ao pulmão, as células T CD4+ induzem a produção de citocinas do tipo Th1, IFN- γ e TNF- α , as quais ativam macrófagos que são as principais células efetoras de resistência do hospedeiro ao fungo (LÁZÁR-MOLNÁR et al., 2008), o que leva à formação de reação granulomatosa e particularmente à calcificação

(NOSANCHUK; GACSER, 2008; EDWARDS; RAPPLEYE, 2011; NOSANCHUK et al., 2012). Já nas formas disseminadas, há uma resposta imune do tipo Th2, a qual induz as células efetoras a eliminarem o patógeno e consequentemente as células de memória a proteger o indivíduo contra uma resposta Th1, ocasionando uma inibição ou má formação de granulomas (NOSANCHUK; GACSER, 2008; NOSANCHUK et al., 2012).

A resposta imune inata sozinha, é incapaz de controlar a replicação do fungo, além disso, nem todos os fagócitos hospedeiros respondem ao fungo da mesma forma, como os neutrófilos e células dendríticas, que desempenham papéis importantes impedindo o crescimento fúngico e iniciando uma resposta protetora, respectivamente (HOLBROOK; RAPPLEYE, 2008; ISAAC et al., 2015; RAY; RAPPLEYE, 2019).

1.6. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A apresentação clínica da histoplasmose é influenciada pela extensão da exposição dos pacientes aos propágulos infectantes do fungo, idade, atividade ocupacional, bem como o estado imunológico do hospedeiro e a virulência da cepa infectante de acordo com as espécies filogenéticas (GUIMARÃES; NOSANCHUK et al., 2006; KAUFFMAN, 2007; WHEAT; FREIFELD et al., 2007; MITTAL et al, 2019; GLADIEUX, 2018).

Sendo assim, as classificações clínicas da histoplasmose incluem: infecção assintomática, histoplasmose pulmonar aguda, histoplasmose pulmonar crônica e histoplasmose disseminada (KAUFFMAN et al., 2007; FERREIRA; BORGES, 2009; AZAR; HAGE, 2017). O primeiro quadro se manifesta na maioria dos hospedeiros imunocompetentes após exposição ao inóculo e na grande maioria dos casos a reação inflamatória inicial é caracterizada pela formação de granuloma, resultante da inibição do crescimento das células leveduriformes pelas células de defesa. Adicionalmente só pode ser diagnosticada por meio do teste de histoplasmina (teste de reação sorológica) e evidências radiológicas, como a presença de sinais de microcalcificações nos pulmões. Os demais quadros se manifestam em pacientes imunocomprometidos, particularmente pacientes com SIDA (MANGALORE et al., 2018).

A histoplasmose pulmonar aguda apresenta gravidade em função da faixa etária, da quantidade de partículas infectantes inaladas e do estado imunológico do hospedeiro. Os sintomas mais comuns são febre, calafrios, mal-estar, cefaleia, fraqueza, tosse, entre outros, e é facilmente confundida com sintomas gripais (FORTALEZA et al., 2004; FERREIRA; BORGES, 2009).

A histoplasmose pulmonar crônica, na maioria das vezes, ocorre pela reativação de uma lesão pré-existente, que pode ter sido adquirida anos antes de surgirem os primeiros sintomas. Esse quadro clínico frequentemente ocorre em indivíduos adultos, pois em geral, essa reativação acontece quando o hospedeiro sofre alguma deficiência na imunidade celular ou apresenta doença pulmonar pré-existente, como o enfisema (KAUFFMAN, 2007). O diagnóstico é complexo devido aos sintomas serem semelhantes à tuberculose e o aspecto radiológico da lesão inicial caracteriza-se pela presença de enfisema centrolobular ou bolhoso e defeito anatômico estrutural que favorece a instalação do foco inicial da doença (WHEAT et al., 2016).

A histoplasmose disseminada é considerada a forma mais grave da doença, sendo caracterizada por evolução aguda com grande frequência de lesões orocutâneas em pacientes com SIDA, entre outras manifestações como febre alta, perda de peso, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, lesões pulmonares e comprometimento da medula óssea (MITTAL et al., 2019; GLADIEUX, 2018). A taxa de mortalidade da histoplasmose disseminada na América Latina é alta, podendo acometer 50% em pacientes com SIDA (CACERES et al., 2016). Entretanto, mundialmente foi registrado que a histoplasmose disseminada possui 71.3% de letalidade (SILVA et al., 2017).

Adicionalmente, a diferenciação gênica entre as espécies de *Histoplasma* pode levar a diferenças clínicas na manifestação da histoplasmose, não estando somente associado à doença pulmonar, mas também a lesões granulomatosas predominantemente no tecido subcutâneo, cutâneo e ósseo (ADENIS; AZNAR; COUPPIÉ, 2014; SEPÚLVEDA et al., 2017; MAXWELL et al., 2018).

1.7. TERAPÊUTICA

A terapêutica da histoplasmose varia de acordo com o estado imunológico do hospedeiro, com a manifestação clínica e a carga fúngica inalada (FERREIRA; BORGES, 2009).

Para o tratamento desta micose sistêmica, os fármacos eficazes e disponíveis comercialmente compõem diferentes opções terapêuticas. Entre elas, a anfotericina B desoxicolato é recomendada para o tratamento das formas graves, pulmonares ou disseminadas. Quando não for possível a sua administração é recomendado a anfotericina B lipossomal (KNEALE et al., 2016). O itraconazol é recomendado para o tratamento de formas leves a moderadas, sendo útil também na manutenção pós-anfotericina B. Outros azólicos, como fluconazol, podem ser administrados, sendo efetivo em até 70% dos casos (WHEAT;

FREIFELD et al., 2007; KAPLAN et al., 2009). O voriconazol e o posaconazol são conhecidos por serem medicamentos eficazes que podem ser reservados para tratamentos de resgate, embora terem demonstrado atividade *in vitro* contra *H. capsulatum*, os resultados ainda são considerados insuficientes *in vivo* (FREIFELD et al., 2009; AZAR; HAGE, 2017).

A anfotericina B é um polieno muito utilizado no tratamento de micoses sistêmicas e tem ação fungicida de amplo espectro. O seu mecanismo de ação se dá pelo anel macrolídico, que apresenta característica hidrofóbica e se liga aos esteróis, principalmente ao ergosterol da membrana celular fúngica. Uma desvantagem é que essa molécula também se liga ao colesterol da membrana plasmática humana, o que explica o potencial tóxico da anfotericina B (SOKOL-ANDERSON; BRAJTBURG; MEDOFF, 1986). A toxicidade da anfotericina B está diretamente relacionada aos rins, uma vez que quando administrada ela diminui o fluxo glomerular em até 80%, pelo fato de causar uma vasoconstrição local. Também apresenta mielotoxicidade podendo causar anemia em decorrência de uma alteração na eritropoetina por atuar diretamente na medula óssea (SOKOL-ANDERSON; BRAJTBURG; MEDOFF, 1986; WHITE; MARR; BOWDEN, 1998; SMITH; KAUFFMAN, 2012).

Os azólicos, como o itraconazol e fluconazol são conhecidos por serem fármacos de ação fungistática, e apresentam amplo espectro de ação e seletividade para o citocromo P-450 da célula fúngica. Seu mecanismo de ação baseia-se na capacidade de inibir a síntese do ergosterol, um componente vital da membrana da célula dos fungos (SPEC et al., 2018). Alguns estudos vêm demonstrando o aumento do uso de voriconazol e posaconazol como alternativa para pacientes que não respondem à terapia com itraconazol ou fluconazol (FREIFELD et al., 2009; SMITH; KAUFFMAN, 2012; WHEAT et al., 2007).

O tratamento eficaz para algumas espécies de *Histoplasma* requer tanto o diagnóstico precoce, para facilitar o início imediato da terapia, como a administração de agentes terapêuticos de amplo espectro com atividade contra os patógenos comuns e emergentes (GOUGHENOUR; BALADA-LLASAT; RAPPLEYE, 2015). Apesar da administração da anfotericina B, a taxa de letalidade na doença grave desenvolvida por pacientes como por exemplo, choque e insuficiência respiratória permanece extremamente alta (LEWIS; KHAN; PATEL, 2018). Mesmo com a terapia antirretroviral altamente ativa (HAART) e a disponibilidade no mercado de triazóis profiláticos, não há mudanças significativas nas taxas de morbidade e mortalidade em pacientes com HIV infectados pelo *H. capsulatum* (NOSANCHUK et al., 2003).

Na histoplasmose a falha terapêutica é considerada relato comum, apesar dos estudos que envolvem a terapia com anfotericina B e itraconazol, comumente utilizadas nas formas aguda e disseminada da doença (WHEAT et al., 2007). O tratamento com itraconazol e anfotericina B é limitado por diretrizes que envolvem a absorção variável, o metabolismo e a toxicidade, respectivamente (WHEAT et al., 2016).

Apesar dos fármacos disponíveis geralmente proporcionarem resultados favoráveis, já foram relatadas infecções refratárias e recidivas (FAIOLLA et al., 2013). Além disso, há relatos do surgimento de cepas resistentes ao fluconazol, bem como casos de falhas na terapêutica com itraconazol e sabe-se que a anfotericina B causa vários efeitos indesejáveis como nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (DE NATH, 2015; GOUGHENOUR; BALADALLASAT; RAPPLEYE, 2015).

Portanto, a incidência das infecções fúngicas causadas por linhagens resistentes vem aumentando e assim cresce também a urgência no desenvolvimento de terapias mais efetivas para o tratamento destas doenças (MARTINEZ et al., 2009). A descoberta de novos alvos exclusivos dos fungos e o entendimento dos mecanismos moleculares de resistência são etapas fundamentais neste processo (PERLIN; SETO-YOUNG; MONK, 1997). Estudos conduzidos por Tagliari e colaboradores (2012), relataram que as infecções fúngicas devem receber atenção considerável, devido, principalmente, ao número crescente de indivíduos imunocomprometidos e ao aumento de cepas fúngicas resistentes aos fármacos.

1.8. FATORES E MECANISMOS DE VIRULÊNCIA

Uma característica fundamental da virulência da forma leveduriforme de *H. capsulatum* é sua capacidade de evitar a detecção pelo sistema imunológico do hospedeiro. Sendo assim, para reduzir a detecção de células imunológicas e facilitar a adesão, invasão e proliferação intracelular, ocorrem mudanças não apenas na morfologia da célula fúngica mas também na composição da parede celular, aumento da expressão de moléculas antigênicas e a expressão de fatores de virulência (KLEIN; TEBBETS, 2007; GARFOOT et al., 2018; SAHAZA et al., 2019).

Dentre os fatores e mecanismos de virulência conhecidos destacam-se: o polissacarídeo α -1,3-glucana presente na parede celular do fungo (KANETSUNA; CARBONELL; AZUMA, 1974), a proteína extracelular Yps3 específica da fase leveduriforme (KEATH et al., 1989), a proteína Cbp1 capaz de se ligar ao cálcio em baixas concentrações (BATANGHARI; GOLDMAN, 1997), a proteína de choque térmico Hsp60 (GUIMARÃES et al., 2011), a proteína catalase P (JOHNSON et al., 2002) e superóxido

dismutase (Sod3) (YOUSEFF et al., 2012), os mecanismos de aquisição de ferro (Newman et al., 1994), a produção de melanina (NOSANCHUK et al., 2002) e a formação de biofilme (PITANGUI et al., 2012).

Apesar da parede celular ser uma estrutura com várias moléculas conservadas entre os fungos, sua composição varia de acordo principalmente, com o morfotipo e as espécies fúngicas (ERWIG; GOW, 2016). A parede celular de *H. capsulatum*, por sua vez, apresenta uma estrutura polissacarídica composta por α -1,3-glucana, β -1,3-glucana, quitina, proteínas e lipídios (GUIMARÃES; DE CERQUEIRA; NOSANCHUK, 2011).

Ademais, os polissacarídeos presentes na parede celular de *H. capsulatum* são compostos pelas glucanas, caracterizados por polímeros de D-glicose ligados por pontes α ou β -glicosídicas que se diferenciam de acordo com a morfologia (DOMER; HAMILTON; HARKIN, 1967; LARA-LEMUS et al., 2014; GARFOOT; RAPPLEYE, 2016; GARFOOT et al., 2017). Na forma leveduriforme *H. capsulatum* produz uma camada de α -1,3-glucana em sua parede celular que é controlada pela α -1,3 -glucana sintase (*AGSI*), importante para o bloqueio do reconhecimento pelo receptor Dectina-1 (maior receptor de fagócitos de reconhecimento de β -glucanas). Entretanto, quando há a ativação do gene α -1,3-glucana sintase o receptor não consegue induzir a resposta inflamatória contra o fungo (RAPPLEYE; EISSENBERG; GOLDMAN, 2007; EDWARDS; RAPPLEYE, 2011). Além disso, estudos demonstraram que a deleção do gene *AGSI* atenua na habilidade do fungo em causar a morte aos macrófagos e reduz a sua capacidade de colonizar os pulmões em modelo murino (RAPPLEYE; ENGLE; GOLDMAN, 2004). Já na forma micelial encontra-se predominantemente a β -1,3-glucana, que estimula a resposta imune quando reconhecida pelas células do hospedeiro (THIND; PATRI, 2017). De acordo com Garfoot e colaboradores (2016) a proteína Eng-1 é uma glucanase secretada pelo fungo que hidrolisa as ligações de β -1,3 glicosil promovendo a remoção das β -glucanas expostas, minimizando o reconhecimento das leveduras pela Dectina-1.

A proteína extracelular específica da fase leveduriforme YPS3 também é encontrada como constituinte da parede celular e liberada em quantidades significativas no meio extracelular durante o crescimento de *H. capsulatum* (BOHSE; WOODS, 2007). Além disso, estudos demonstraram que esta proteína é considerada um importante fator de virulência de *H. capsulatum*, uma vez que, mutantes para *yps3* apresentaram deficiência no processo de colonização inicial de pulmões, baço e fígado de camundongos infectados (BOHSE; WOODS, 2007).

Durante o crescimento de *H. capsulatum* no interior dos macrófagos há a expressão da proteína CBP1 (*Calcium-binding protein*), uma proteína de ligação ao cálcio, considerada um dos fatores que favorecem a sobrevivência no ambiente do fagossoma, essencial para a virulência de *H. capsulatum* (HILTY; SMULIAN; NEWMAN, 2011). Estudos conduzidos por Isaac e colaboradores (2015) com mutantes para CBP1, verificaram que esses mutantes causam morte do macrófago durante a infecção, além de induzir a expressão de várias proteínas relacionadas a resposta inflamatória. Além disso, foi visto que a forma leveduriforme induz uma resposta transcricional de genes relacionados a apoptose e lise celular dependente de CBP1 durante a interação com o macrófago.

É interessante relatar, que em *H. capsulatum*, também foram identificadas várias proteínas de superfície de choque térmico (Hsps), que são ativadas em resposta a agentes estressores como: altas temperaturas, estresse oxidativo, radiação, inflamação, exposição a toxinas, hipóxia, deficiência de nitrogênio ou privação de água, dentre elas, destacam-se: Hsp60, Hsp70, Hsp82, Hsp90 (DEEPE et al., 1996; CARUSO et al., 1987; MINCHIOTTI; GARGANO; MARESCA, 1991; ALLENDOERFER; MARESCA; DEEPE, 1996). A proteína Hsp60 é considerada uma proteína de choque térmico e uma adesina presente na superfície da célula de *H. capsulatum*, auxiliando no dobramento e montagem correta de proteínas e na supervisão deste processo (HOLBROOK; RAPPLEYE, 2008). Além disso, ela é responsável pela ligação ao receptor CR3 (CD11/CD18) do sistema de complemento dos fagócitos do hospedeiro, resultando em rápida fagocitose, aumento de sua sobrevivência e replicação intracelular (GUIMARÃES; DE CERQUEIRA; NOSANCHUK, 2011). É considerada também uma molécula altamente imunogênica importante para a terapia da histoplasmose (GUIMARÃES et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2010).

Para garantir sua sobrevivência dentro do hospedeiro e facilitar a patogênese, o fungo apresenta mecanismos para evadir as respostas protetivas, incluindo inativação das espécies de oxigênio através da produção de proteínas extracelulares, tais como a superóxido dismutase (Sod3) e catalase (CatP), caracterizadas como fatores de virulências em *H. capsulatum* (JOHNSON et al., 2002; YOUSEFF et al., 2012).

O ferro é considerado um nutriente essencial tanto para o hospedeiro quanto aos patógenos microbianos, sendo que uma forma de defesa da ação microbiana é a limitação desse elemento (TIMMERMAN, 1999). No interior dos fagócitos as concentrações de ferro são limitadas, o que dificulta a sobrevivência e multiplicação do fungo. Diante disso, *H. capsulatum* desenvolveu alguns mecanismos de escape que permitem a captação desse

elemento para dentro do fagossoma (WOODS et al., 2002; GARFOOT; RAPPLEYE, 2016; GARFOOT et al., 2017). Um desses mecanismos é a produção de sideróforos, caracterizado por compostos com alta afinidade pelo ferro, responsáveis por retirar esse elemento das proteínas carreadoras e liberá-los no citoplasma (HILTY et al., 2011; GARFOOT; RAPPLEYE, 2016). Outro modo de aquisição do ferro pelo fungo é através da acidificação do pH, promovendo a liberação do ferro ligado à transferrina (LÓPEZ et al., 2006; GARFOOT; ZEMSKA; RAPPLEYE, 2014).

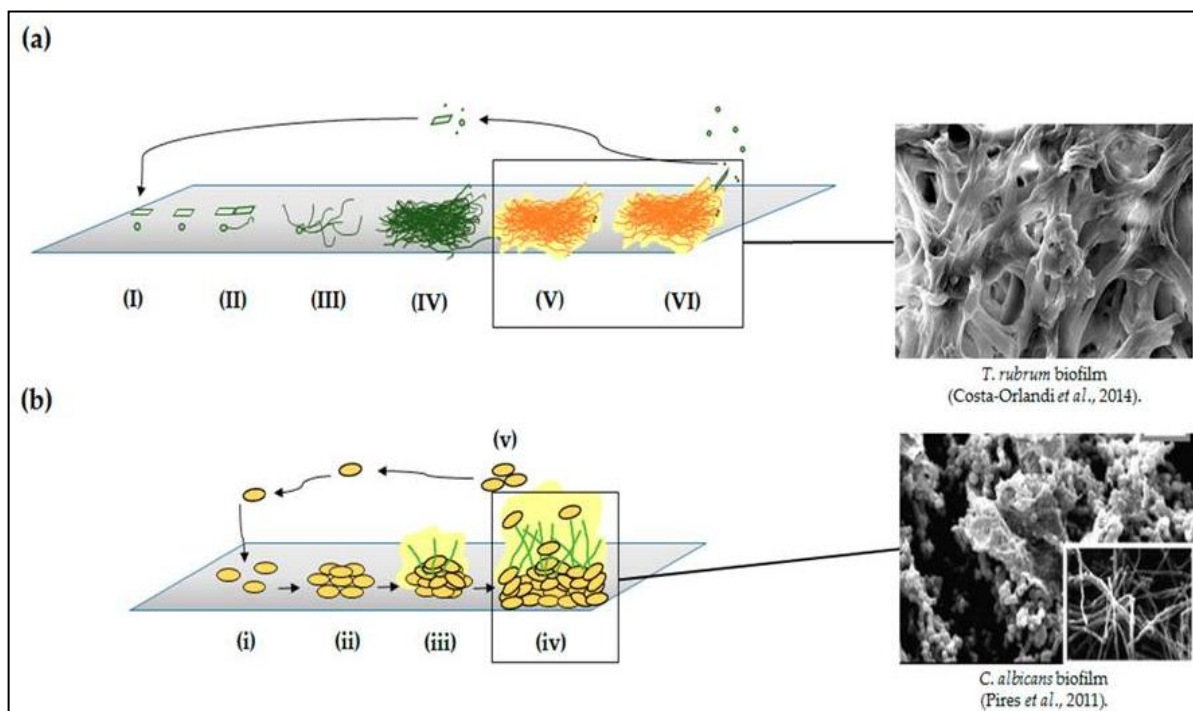
Outro fator que contribui para a virulência de *H. capsulatum* é a produção de melanina, um pigmento de alta massa molecular ocasionada pela polimerização oxidativa de agentes fenólicos, que causam uma coloração geralmente marrom ou preta, capaz de reduzir a sensibilidade dos fungos aos mecanismos de defesa do hospedeiro, tais como estresses ambientais e parasitários, radiação ultravioleta, agentes oxidantes e gerar resistência às drogas antifúngicas como: anfotericina B e caspofungina (NOSANCHUK et al., 2003; TABORDA et al., 2008; ALMEIDA-PAES et al., 2018). Tanto a forma leveduriforme quanto a miceliar de *H. capsulatum* são capazes de produzir melanina *in vitro* e *in vivo* (NOSANCHUK et al., 2002).

Além dos mecanismos de virulência já descritos, os microrganismos podem formar biofilmes, que constituem estruturas importantes no desenvolvimento de infecções. Ressalta-se que microrganismos estruturados em biofilmes exibem altos níveis de resistência aos antimicrobianos em função da baixa perfusão de fármacos, favorecendo o desenvolvimento de fenótipos resistentes (RAMAGE et al., 2009; CORDERO et al., 2016; PITANGUI et al., 2016, 2012; SHEN; RAPPLEYE, 2017).

1.9. BIOFILMES

Biofilmes são comunidades sésseis de microrganismos que se agrupam de maneira organizada a um substrato ou que se aderem uns aos outros, e estão envolvidos por uma matriz extracelular (MEC) de polissacarídeos que eles mesmos produzem (**Figura 3**). Essas comunidades se diferem das células livres (planctônicas) em relação ao crescimento, transcrição de genes e tradução de proteínas (COSTERTON et al., 1995; DONLAN; COSTERTON, 2002; MARTINEZ; CASADEVALL, 2015).

Figura 3. Representação esquemática das etapas do desenvolvimento de biofilmes em fungos filamentosos e leveduriformes. Os estágios de desenvolvimento são semelhantes, embora a morfologia e o número de estágios sejam diferentes. No primeiro modelo (a), seis foram propostos: (I) incluem a adsorção, (II) adesão ativa, (III) primeira formação de microcolônia por germinação ou desenvolvimento de monocamadas, desenvolvimento micelial (IV) e (V) maturação de biofilmes e, finalmente (VI) a dispersão de conídios ou arthroconídios. O segundo modelo corresponde ao desenvolvimento clássico do biofilme de *C. albicans* (b) que inclui cinco estágios, como em bactérias: (I) adsorção, (II) adesão, (III) formação de microcolônias, (IV) biofilme maduro e (V) dispersão (Costa-Orlandi et al., 2017).



O biofilme proporciona um ambiente estável protegido pela superfície do substrato e pela matriz extracelular, desencadeando alta resistência aos antimicrobianos, principalmente em função da dificuldade de difusão dos mesmos por meio da matriz extracelular, tornando o tratamento das infecções relacionadas ao biofilme desafiadoras. Diante deste contexto, a gravidade destas formações resistentes na patogênese da histoplasmose se torna ainda mais relevante em vista dos relatos recentes que descreveram clinicamente as infecções por *H. capsulatum* em indivíduos com dispositivos médicos ou implantes cirúrgicos e vasculares que fornecem um reservatório para o desenvolvimento de biofilmes fúngicos (RAMAGE; ROBERTSON; WILLIAMS, 2014; CARRETO-BINAGHI et al., 2015; WU et al., 2017).

O processo de formação do biofilme envolve a fase de adesão reversível das células, em que as células planctônicas, por meio de interações físico-químicas aderem sobre a superfície biótica ou abiótica (DAVIES, 2003; WORTHINGTON; RICHARDS; MELANDER, 2012; MITCHELL et al., 2015), a fase de maturação do biofilme que envolve

mecanismos de interação dos microrganismos e produção de MEC, a fase de consolidação do biofilme, a qual corresponde ao estágio de equilíbrio dinâmico, onde os microrganismos no interior dos biofilmes permanecem em constantes adaptações às alterações ambientais e finalmente, a fase de dispersão que está associada ao aumento do número de células no interior do biofilme e com isso ocorre liberação dessas células para a colonização de outros ambientes (KOSTAKIOTI; HADJIFRANGISKOU; HULTGREN, 2013; BORGHI, 2016).

A estrutura que sustenta um biofilme faz parte de um sistema fortemente regulado, dependente do sinergismo da expressão de uma variedade de genes e das condições ambientais durante o processo da infecção (RAMAGE et al., 2009; 2012). Esta regulação, no caso das células leveduriformes, é mediada por “*quorum sensing*” (comunicação célula-célula), que é utilizado para controlar algumas características do microrganismo, desde as associadas à sobrevivência até as determinantes de patogenicidade (HARDING et al., 2009; RAMAGE et al., 2009; VILA; LOPEZ-RIBOT, 2016). Neste contexto, para que haja a comunicação entre as células, a MEC contribui fortemente com as forças coesivas e adesivas para a estabilidade arquitetônica e mecânica do biofilme, atuando especialmente como uma “goma” que mantém as células unidas e ligadas à superfície (MITCHELL; KARNOWSKI; ANDES, 2016).

Com a formação completa do biofilme, é possível observar algumas características importantes do processo, entre elas os canais aquosos que permitem o transporte de água, nutrientes, metabólitos, a passagem de células planctônicas, bem como a remoção de metabólitos potencialmente tóxicos (WONGSUK; PUMESAT; LUPLERTLOP, 2016).

Vários fungos demonstraram a capacidade de colonizar superfícies e formar biofilmes, incluindo: *Candida spp.* (HAWSER; DOUGLAS, 1994), *Cryptococcus neoformans* (MARTINEZ; CASADEVALL, 2005), *Saccharomyces cerevisiae* (Verstrepen; Klis, 2006), *Aspergillus spp.* (SEIDLER; SALVENMOSER; MÜLLER, 2008), *Paracoccidioides brasiliensis* (SARDI et al., 2015), *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* (COSTA-ORLANDI et al., 2014) e *H. capsulatum* (PITANGUI et al., 2012; BRILHANTE et al., 2015).

Entretanto poucos estudos correlacionam *H. capsulatum* e a formação de biofilmes. Nosso grupo revelou pela primeira vez a formação dos biofilmes de *H. capsulatum* (PITANGUI et al., 2012). Em seguida, outros autores caracterizaram a susceptibilidade antifúngica reduzida de biofilmes de *H. capsulatum in vitro* frente aos agentes antifúngicos comerciais itraconazol e anfotericina B, bem como à farnesol sozinho e combinado com

antifúngicos, indicando os biofilmes como os prováveis implicadores das infecções fúngicas recorrentes (BRILHANTE et al., 2015). Neste contexto, estudos prévios publicados também pelo nosso grupo estabeleceram uma correlação entre o modo de infecção de *H. capsulatum* e a formação dos biofilmes (PITANGUI et al., 2016). Outros autores observaram que a incorporação *H. capsulatum* com glucanas presentes na cápsula de *Cryptococcus neoformans* propiciou um aumento da virulência e melhor formação de “películas” semelhantes a biofilmes, além da produção de uma matriz extracelular híbrida (CORDERO et al., 2016).

1.10. ABORDAGENS PROTEÔMICAS

A análise sistemática em larga escala das proteínas totais de um tecido, órgão, compartimentos celulares ou célula foi introduzida sob o termo proteômica (DOMON; AEBERSOLD, 2006; OZSOLAK; MILOS, 2011; MUSZKIETA et al., 2013). Este termo foi introduzido no final do século XX por Wilkins e utilizado para descrever um conjunto completo de proteínas que são expressas e modificadas seguindo a expressão de todo o genoma de uma célula, tecido ou organismo (WILKINS et al., 2009; PITANGUI, 2012). A finalidade da análise proteômica é obter a mais completa e integrada visão da biologia através do estudo de todas as proteínas da célula, em preferência a estudar proteínas individuais (GRAVES; HAYSTEAD, 2002). Além disso, permite a obtenção de informações sobre níveis de expressão, interações proteína-proteína, localização celular, modificações pós-traducionais, entre outras, em função do tempo, tipo celular, espaço, e muitas outras variações (ASLAM et al., 2016). Deste modo, a análise proteômica permite evidenciar possíveis alvos que possam ser selecionados, a fim de auxiliar no desenvolvimento de testes diagnósticos, marcadores moleculares e propriedades terapêuticas (HEBERT et al., 2014; CHONG et al., 2015).

O rápido progresso da proteômica observado nos últimos anos somente foi possível através do desenvolvimento de novas técnicas que incluem a separação de proteínas e peptídeos, novos espectrômetros de massa e a análise de dados por ferramentas de bioinformática. Dentre essas novas técnicas a espectrometria de massas (MS) surgiu como uma ferramenta chave para a identificação e caracterização de proteínas em larga escala e atualmente é a base da análise proteômica por consistir em grande variedade de abordagens e instrumentação (VAN OUDENHOVE; DEVREESE, 2013).

O método *shotgun* é uma destas abordagens, e o mais amplamente utilizado devido a identificação e quantificação comparativa de proteínas em nível global, além de ser altamente específico e de baixo custo. Além disso, é um método que permite a identificação de

proteínas em uma mistura complexa, utilizando uma combinação analítica entre cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) e espectrometria de massas. O nome *shotgun* é derivado do sequenciamento de DNA que, por sua vez, teve o nome inspirado no padrão de tiro rapidamente expansivo e quase-randômico de espingardas calibre 12 (*shotgun*). Na abordagem proteômica por *shotgun*, as proteínas em uma mistura complexa são digeridas por uma enzima proteolítica e, os peptídeos resultantes são separados por HPLC. Em seguida, esses peptídeos são analisados por espectrometria de massas via sequenciamento peptídico por MS/MS para a posterior identificação das sequências dos peptídeos quando submetidas a uma busca automática em bancos de dados de proteínas, na busca da identidade da proteína correspondente, sendo uma técnica capaz de analisar as respostas biológicas de centenas de proteínas simultaneamente permitindo uma visão relativamente abrangente do metabolismo celular (CARVALHO; YATES; BARBOSA, 2012; HAMZEIY; COX, 2017; WIDBILLER et al., 2019).

Por não exigir um conhecimento prévio da composição da amostra, esse método tem sido muito utilizado em experimentos que buscam descobrir o perfil de proteínas expressas em um organismo, ou tecido, sob uma determinada condição (DOMON; AEBERSOLD, 2010). Além disso, essa abordagem vem se tornando uma estratégia de identificação poderosa para aplicação na proteômica quantitativa (ALMEIDA et al., 2020). Quanto aos resultados, por apresentarem dados robustos torna-se necessário a adição de estudos utilizando técnicas de bioinformática para a devida organização dos mesmos. Segundo Kumar e Mann (2009) a bioinformática, é um meio de análise funcional de mineração e conjuntos de dados, que levam a resultados biologicamente interpretáveis. Quando aplicada a proteômica as abordagens de bioinformática conferem gestão e alinhamento da enorme quantidade de dados para uma análise precisa com reprodutibilidade e qualidade. Para interpretar e compreender os dados gerados, é necessário filtrar e classificar as informações obtidas. Neste caso, é realizada uma análise funcional das proteínas que foram identificadas com base na conjugação do nome da proteína (LAUKENS; NAULAERTS; BERGHE, 2015).

O uso de abordagens como a proteômica e bioinformática são modalidades promissoras devido à identificação e a compreensão dos mecanismos pelos quais as proteínas são expressas e que regem o metabolismo em nível intracelular, sendo um dos maiores desafios para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos (BABRZADEH et al., 2012; SCHMIDT; FORNE; IMHOF, 2014).

A análise comparativa do proteoma entre células em formato biofilme e células planctônicas de vários patógenos bacterianos e fúngicos têm sido relatadas (THOMAS; BACHMANN; LOPEZ-RIBOT, 2006; KLEIN et al., 2012; PARK; SURETTE; KHURSIGARA, 2014; CALVILLO-MEDINA et al., 2019; BAI et al., 2019). Embora para *H. capsulatum* informações a respeito das mudanças nos perfis de proteínas entre células planctônicas e biofilme ainda não foram descritos. Dessa forma, a proteômica em fungos patogênicos tem contribuído para um melhor conhecimento dos processos envolvidos na morfogênese, virulência, resposta ao hospedeiro, bem como para o desenvolvimento de potenciais alvos antifúngicos e abordagens terapêuticas (PITARCH et al., 2003). Diante disso, marcadores biológicos podem ser identificados e caracterizados por técnicas proteômicas, auxiliando no diagnóstico precoce de doenças, como também no acompanhamento do tratamento (CASH et al., 2002).

Apesar dos esforços de vários grupos de pesquisa, a patogênese da histoplasmose ainda apresenta muitas lacunas, desde os mecanismos de interação com o hospedeiro, até os fatores de virulência (ADENIS; AZNAR; COUPPIÉ, 2014). Recentemente, um dos maiores desafios relacionados ao tratamento de doenças causadas por microrganismos, sejam eles por fungos ou não, é a formação de biofilme. Essas comunidades de microrganismos são consideradas importante fator de virulência para diversos fungos (RAMAGE et al., 2012; SARDI et al., 2015; COSTA-ORLANDI et al., 2017). Células de comunidades sésseis podem modular a atividade metabólica, a dormência e as respostas ao estresse, fatores que destacam a importância de compreender as propriedades da formação dessas comunidades para a investigação de novos alvos terapêuticos (PERCIVAL et al., 2012; PITANGUI et al., 2012; MITCHELL et al., 2015, COSTA-ORLANDI et al., 2017).

De acordo com a existência de poucos estudos relacionados a habilidade de *H. capsulatum* na formação dos biofilmes (PITANGUI et al., 2012; BRILHANTE et al., 2015), dar continuidade aos estudos dessas comunidades é de extrema importância, uma vez que esse fungo é sistêmico e a extensão das mudanças ambientais e nutricionais não foi investigada na formação desses biofilmes. Sendo assim, este trabalho objetiva verificar a influência dos nutrientes presentes nos meios de cultura BHI, HAM-F12, DMEM e RPMI, além das condições de incubação em aerobiose e microaerofilia na formação do biofilme por diferentes cepas de *H. capsulatum* usando técnicas colorimétricas e técnicas microscópicas, a fim de descobrir as melhores condições para o estudo desses biofilmes *in vitro* e melhorar a compreensão da possível formação dessas comunidades *in vivo*. Adicionalmente, o

conhecimento dos mecanismos e processos celulares na formação desses biofilmes são aspectos cruciais na compreensão dos mecanismos de virulência de *H. capsulatum*. Por outro lado, o estudo do proteoma em células de biofilme e após a infecção em macrófagos são uma necessidade urgente, pois a identificação de proteínas exclusivas nessas condições poderá auxiliar na busca de potenciais alvos antifúngicos, podendo estabelecer novas estratégias terapêuticas para a histoplasmose, uma vez que a persistência destas infecções pode estar associada aos supostos biofilmes intracelulares.

Conclusões

5. CONCLUSÕES

Com a análise dos resultados do presente trabalho pode-se concluir que:

- Com relação à carga fúngica e à viabilidade por meio de coloração com o azul de Tripán, o melhor meio de cultura para a manutenção de *H. capsulatum* é o HAM-F12, tanto para a condição de microaerofilia quanto para a condição de aerobiose;
- Nos ensaios de caracterização dos biofilmes, verificou-se que em todas as condições testadas, as cepas EH-315, G186A e G217B foram capazes de formar biofilmes *in vitro* e 144 horas foi o tempo necessário para a maturação de todas as cepas;
- Em geral, as condições de atmosfera de microaerofilia, além de preferencialmente o meio HAM-F12, foram mais propícias para o desenvolvimento dessas comunidades;
- A cepa EH-315 apresentou maior viabilidade celular, produção de biomassa e material polissacarídeo comparada as cepas G186A e G217B;
- Nos ensaios de infecção as células derivadas de biofilme parecem exibir maior formação de aglomerados em macrófagos alveolares (AMJ₂-C11) e apresentou uma intensidade de fluorescência da proteína Hsp60 mais intensa após 1, 5 e 24 horas de infecção comparada as células planctônicas;
- A maior taxa de infecção ocorreu no tempo de 24 horas tanto pelas células planctônicas quanto pelas células derivadas de biofilme;
- As células derivadas de biofilme exibiram maior habilidade em invadir macrófagos alveolares (AMJ₂-C11) após 1, 5 e 24 horas de infecção quando comparadas as células planctônicas;
- A cepa EH-315 de *H. capsulatum* é capaz de formar biofilme *in vitro* em pH ácido e 144 horas foi o tempo necessário para a maturação;
- A análise do perfil proteico de *H. capsulatum* em biofilme demonstrou diferenças quanto à intensidade das bandas e a expressão de proteínas exclusivas comparado as células planctônicas;
- A análise proteômica do biofilme de *H. capsulatum* apresentou um aumento de proteínas envolvidas no estresse oxidativo e na obtenção de energia e uma redução de proteínas envolvidas na síntese proteica e no metabolismo celular quando comparada as células planctônicas;

- A identificação das proteínas exclusivas do biofilme de *H. capsulatum* permitiu um entendimento parcial sobre as vias utilizadas por *H. capsulatum* para o desenvolvimento do biofilme;
- A identificação das proteínas exclusivas do biofilme de *H. capsulatum* durante a infecção em macrófagos nos possibilitou um entendimento parcial sobre as vias associadas à sobrevivência e adaptação do fungo ao ambiente do hospedeiro;
- A localização subcelular das proteínas exclusivas identificadas no biofilme da cepa EH-315 de *H. capsulatum* e na infecção pelas células do biofilme de *H. capsulatum* em macrófagos alveolares J774 A.1 mostra que a maioria das proteínas identificadas no biofilme foram classificadas como citoplasmáticas, enquanto na infecção foram classificadas como nucleares.

Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADENIS, A.A.; AZNAR, C.; COUPPIÉ, P. Histoplasmosis in HIV-Infected Patients: A Review of New Developments and Remaining Gaps. **Curr Trop Med Rep**, v. 1, n. 2, p. 119-128, Mar 2014.

ALBUQUERQUE, P.; CASADEVALL, A. *Quorum sensing* in fungi--a review. **Med Mycol**, v. 50, n. 4, p. 337-45. May 2012.

ALLENDOERFER, R.; BIOVIN, G.P.; DEEPE, G.S, JR. Modulation of immune responses in murine pulmonary histoplasmosis. **J Infect Dis**, v. 175, p. 905-14, Apr 1997.

ALLENDOERFER, R.; MARESCA, B.; DEEPE, G.S. JR. Cellular immune responses to recombinant heat shock protein 70 from *Histoplasma capsulatum*. **Infect Immun**, v. 64, n. 10, p. 4123-8, Oct 1996.

ALMEIDA-PAES, R.; ALMEIDA-SILVA, F.; PINTO, G.C.M.; ALMEIDA, M.A.; MUNIZ, M.M.; PIZZINI, C.V.; GERFEN, G.J.; NOSANCHUK, J.D.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M. L-tyrosine induces the production of a pyomelanin-like pigment by the parasitic yeast-form of *Histoplasma capsulatum*. **Med Mycol**, v. 56, n. 4, p. 506-509, Jun 2018.

ALMEIDA, M. A.; ALMEIDA-SILVA, F.; GUIMARAES, A. J.; ALMEIDA-PAES, R.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. The occurrence of histoplasmosis in Brazil: A systematic review. **Int J Infect Dis**, v. 86, p. 147-156, Sep 2019.

ALMEIDA, M.A.; ALMEIDA-PAES, R.; GUIMARÃES, A.J.; VALENTE, R.H.; SOARES, C.M.A.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M. Immunoproteomics Reveals Pathogen's Antigens Involved in *Homo sapiens*-*Histoplasma capsulatum* Interaction and Specific Linear B-Cell Epitopes in Histoplasmosis. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 10, p. 591121, Oct 2020.

AMICH, J.; CALERA, J.A. Zinc acquisition: a key aspect in *Aspergillus fumigatus* virulence. **Mycopathologia**, v. 178, n. 5-6, p. 379-85, Dec 2014.

ANDREOTTI, P. Interação de *Paracoccidioides brasiliensis* com células epiteliais. Caracterização de prováveis fatores de virulência. 2005. 124 (Doutorado). Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara- UNESP.

ANTINORI, S. *Histoplasma capsulatum*: more widespread than previously thought. **Am J Trop Med Hyg**, v. 90, n. 6, p. 982-983, Jun 2014.

ARCE MIRANDA, J. E.; BARONETTI, J. L.; SOTOMAYOR, C. E.; PARAJE, M. G. Oxidative and nitrosative stress responses during macrophage-*Candida albicans* biofilm interaction. **Med Mycol**, v. 57, n. 1, p. 101-113, Jan 2019.

ASLAM, B.; BASIT, M.; NISAR, M.A.; KHURSHID, M.; RASOOL, M.H. Proteomics: Technologies and Their Applications. **J Chromatogr Sci**, v. 55, n. 2, p. 182-196, 2016.

ASSUNÇÃO, L.D.P.; MORAES, D.; SOARES, L.W. *et al.* Insights into *Histoplasma capsulatum* Behavior on Zinc Deprivation. **Front Cell Infect Microbiol**, vol. 10, p. 573097, Nov 2020.

AZAR, M.M.; HAGE, C.A. Clinical Perspectives in the Diagnosis and Management of Histoplasmosis. **Clin Chest Med**, v. 38, n. 3, p. 403-415, Sep 2017.

BABRZADEH, F.; JALILI, R.; WANG, C.; SHOKRALLA, S.; PIERCE, S. *et al.* Whole-genome sequencing of the efficient industrial fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain CAT-1. **Mol Genet Genomics**, v. 287, n. 6, p. 485-94, Jun 2012.

BAI, Y.; WANG, S.; ZHONG, H.; YANG, Q.; ZHANG, F.; ZHUANG, Z.; YUAN, J.; NIE, X.; WANG, S. Integrative analyses reveal transcriptome-proteome correlation in biological pathways and secondary metabolism clusters in *A. flavus* in response to temperature. **Sci Rep**, v. 29, p. 5:14582, Sep 2015.

BALTAZAR, L.M.; ZAMITH-MIRANDA, D.; BURNET, M.C.; CHOI, H.; NIMRICHTER, L.; NAKAYASU, E.S.; NOSANCHUK, J.D. Concentration-dependent protein loading of extracellular vesicles released by *Histoplasma capsulatum* after antibody treatment and its modulatory action upon macrophages. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 8065, May 2018.

BATANGHARI, J.W.; GOLDMAN, W.E. Calcium dependence and binding in cultures of *Histoplasma capsulatum*. **Infect Immun**, v. 65, n. 12, p. 5257-61, Dec 1997.

BEYHAN, S.; SIL, A. Sensing the heat and the host: Virulence determinants of *Histoplasma capsulatum*. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 793-800, Dec 2019.

BAHR, N.C.; SAROSI, G.A.; MEYA, D.B.; BOHJANEN, P.R.; RICHER, S.M.; SWARTZENTRUBER, S.; HALUPNICK, R.; JARRETT, D.; WHEAT, L.J.; BOULWARE, D.R. Seroprevalence of histoplasmosis in Kampala, Uganda. **Med Mycol**, v. 54, n. 3, p. 295-30, Mar 2016.

BEAUVAIS, A.; LATGÉ, J.P. *Aspergillus* Biofilm *In Vitro* and *In Vivo*. **Microbiol Spectr**, v. 4, p.10.1128, 2015.

BENADUCCI, T.; SARDI, JDE, C.; LOURENCETTI, N.M.; SCORZONI, L.; GULLO, F.P.; ROSSI, S.A.; DERISSI, J.B.; DE AZEVEDO.; PRATA, M.C.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; MENDES-GIANNINI, M.J. Virulence of *Cryptococcus sp.* Biofilms *In Vitro* and *In Vivo* using *Galleria mellonella* as an Alternative Model. **Front Microbiol**, v. 9, p. 7:290, Mar 2016.

BIZERRA, F.C.; NAKAMURA, C.V.; DE POERSCH, C. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 442-50, 2008.

BORGHI. Fungal Biofilms: Update on Resistance. **Adv Exp. Medicine, Biology-Neuroscience and respiration**, v. 931, p. 37-47. 2016.

BOHSE, M.L.; WOODS, J.P. Expression and interstrain variability of the YPS3 gene of *Histoplasma capsulatum*. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 4, p. 609–615, 2007.

BOHSE, M.L.; WOODS, J.P. RNA interference-mediated silencing of the YPS3 gene of *Histoplasma capsulatum* reveals virulence defects. **Infect Immun**, v. 75, n. 6, p. 2811-2817, Jun 2007.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 1976.

BRILHANTE, R.S.N.; DE LIMA, R.A.C.; MARQUES, F.J.F.; SILVA, N.F.; CAETANO, E.P. *et al.* *Histoplasma capsulatum* in planktonic and biofilm forms: *in vitro* susceptibility to amphotericin B, itraconazole and farnesol. **J Med Microbiol**, v. 64, n. Pt 4, p. 394-399, Apr 2015.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin Microbiol Rev**, v. 6, n. 2, p. 89-117, Apr 1993.

BURGENER, A.; BUTLER, M. "Medium development," in **Cell Culture Technology for Pharmaceutical and cell-Based Therapies**, eds S. S. Ozturk and W. Hu (New York, NY: Taylor and Francis), 2006.

CALVILLO-MEDINA, R.P.; REYES-GRAJEDA, J.P.; BARBA-ESCOTO, L.; BAUTISTA-HERNANDEZ, L.A.; CAMPOS-GUILLÉN, J.; JONES, G.H.; BAUTISTA-DE, LUCIO, V.M. Proteome analysis of biofilm produced by a *Fusarium falciforme* keratitis infectious agent. **Microb Pathog**, v. 130, p. 232-241, May 2019.

CANO, M.V.; HAJJEH, R.A. The epidemiology of histoplasmosis: a review. **Semin Respir Infect**, vol. 16, n. 2, p. 109-118, Jun 2001.

CACERES, D.H.; TOBÓN, A.M.; CLEVELAND, A.A.; SCHEEL, C.M.; BERBESI DY, OCHOA, J.; RESTREPO, A.; BRANDT, M.E.; CHILLER, T.; GÓMEZ, B.L. Clinical and Laboratory Profile of Persons Living with Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immune Deficiency Syndrome and Histoplasmosis from a Colombian Hospital. **Am J Trop Med Hyg**, v. 95, n. 4, p. 918-924, Oct 2016.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G.M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P.G. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 9, p. 1327-33, May 2004.

CARR, S.V.; MARTIN, P.A.; KEYES, S.L.; TONG, L.J.; TALBOT, J.J.; MUSCATELLO, G.; BARRS, V.R. Nasofacial infection in a cat due to a novel bacterium in *Neisseriaceae*. **JFMS open reports**, v. 1:2055116915597240, Jul 2015.

CARRETO-BINAGHI, L.E.; DAMASCENO, L.S.; PITANGUI, N.DE. S.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; MENDES-GIANNINI, M.J.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M.; TAYLOR,

M.L. Could *Histoplasma capsulatum* be related to healthcare-associated infections. **Biomed Res In**, v. 2015, p. 982429, 2015.

CARUSO, M.; SACCO, M.; MEDOFF, G.; MARESCA, B. Heat shock 70 gene is differentially expressed in *Histoplasma capsulatum* strains with different levels of thermotolerance and pathogenicity. **Mol Microbiol**, v. 1, n. 2, p. 151–158, 1987.

CARVALHO, P.C.; YATES, J.R.; BARBOSA, V.C. Improving the TFold test for differential *shotgun* proteomics. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p.1652-4, Jun 2012.

CASH, P. Proteomics: the protein revolution. **Biologist (London)**, v. 49, n. 2, p. 58-62, Apr 2002.

CASU, F.; PINU, F.R.; FEDRIZZI, B.; GREENWOOD, D.R.; VILLAS-BOAS, S.G. The effect of linoleic acid on the Sauvignon blanc fermentation by different wine yeast strains. **FEMS yeast research**, v. 16, p. fow050, Aug 2016.

CASU, F.; PINU, F.R.; STEFANELLO, E.; GREENWOOD, D.R.; VILLAS-BÔAS, S.G. The fate of linoleic acid on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism under aerobic and anaerobic conditions. **Metabolomics**, v. 14, p. 103, Jul 2018.

CEN, YK.; LIN, J.G.; WANG, J.Y.; LIU, Z.Q.; ZHENG, Y.G. Colorimetric assay for active biomass quantification of *Fusarium fujikuroi*. **J Microbiol Methods**, v. 155, p. 37-41, 2018.

CHAE, H.Z.; KIM, I.H.; KIM, K.; RHEE, S.G. Cloning, sequencing, and mutation of thiol-specific antioxidant gene of *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, v. 268, n. 22, p. 16815-21, Aug 1993.

CHANDRA, J.; KUHN, D.M.; MUKHERJEE, P.K.; HOYER, L.L.; MCCORMICK, T.; GHANNOUM, M.A. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **J. Bacteriol**, v.183, p. 5385–5394, 2001.

CHAVES, E.G.A.; PARENTE-ROCHA, J.A.; BAEZA, L.C.; ARAÚJO, D.S.; BORGES, C.L.; DE OLIVEIRA, M.A.P.; SOARES, C.M.A. Proteomic Analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* During Infection of Alveolar Macrophages Primed or Not by Interferon-Gamma. **Front Microbiol**, v. 10, p. 96, Feb 2019.

CHEN, X.; ZHANG, Z.; CHEN, Z.; LI, Y.; SU, S.; SUN, S. Potential Antifungal Targets Based on Glucose Metabolism Pathways of *Candida albicans*. **Front Microbiol**, v. 17, p. 11:296, Mar 2020.

CHONG, H.S.; CAMPBELL, L.; PADULA, M.P.; HILL, C.; HARRY, E.; LI, S.S.; WILKINS, M.R.; HERBERT, B.; CARTER, D. Time-course proteome analysis reveals the dynamic response of *Cryptococcus gattii* cells to fluconazole. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e42835, 2012.

CHONG, Y.T.; KOH, J.L.; FRIESEN, H.; DUFFY, S.K.; COX, M.J.; MOSES, A.; MOFFAT, J.; BOONE, C.; ANDREWS, B.J. Yeast Proteome Dynamics from Single Cell Imaging and Automated Analysis. **Cell**, v. 161, n. 6, p. 413-24, 2015.

CLEARE, L.G.; ZAMITH, D.; HEYMAN, H.M.; COUVILLION, S.P.; NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M.L, NAKAYASU, E.S.; NOSANCHUK, J.D. Media Matters! Alterations in the loading and release of *Histoplasma capsulatum* extracellular vesicles in response to different nutritional milieus. **Cell Microbiol**, v. 4, p. e13217, May 2020.

CLSI. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved Standard - Second Edition. CLSI document M38-A2.** Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute 2008.

COLOMBO, T.E.; SOARES, M.M.; D'ÁVILLA, S.C.; NOGUEIRA, M.C.; DE ALMEIDA, M.T. Identification of fungal diseases at necropsy. **Pathol Res Pract**, v. 208, n. 9, p. 549-52, Sep 2012.

CORDEIRO, R.A.; EVANGELISTA, A.J.J.; SERPA, R.; MARQUES, F.J.F.; MELO, C.V.S. *et al.* Inhibition of heat-shock protein 90 enhances the susceptibility to antifungals and reduces the virulence of *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complex. **Microbiology**, v. 162, n. 2, p. 309-317, Feb 2016.

CORDERO, R.J.; LIEDKE, S.C.; DE ARAÚJO, G.R.; MARTINEZ, L.R.; NIMRICHTER, L. *et al.* Enhanced virulence of *Histoplasma capsulatum* through transfer and surface incorporation of glycans from *Cryptococcus neoformans* during co-infection. **Sci Rep**, v. 24, n. 6, p. 21765, Feb 2016.

COSTA-ORLANDI, C.B.; SARDI, J.C.; SANTOS, C.T.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; MENDES-GIANNINI, M.J. *In vitro* characterization of *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* biofilms. **Biofouling**, v. 30, n. 6, p. 719-27, 2014.

COSTA-ORLANDI, C.B.; SARDI, J.C.O.; PITANGUI, N.S.; DE OLIVEIRA, H.C.; SCORZONI, L. *et al.* Fungal Biofilms and Polymicrobial Diseases. **J Fungi (Basel)**, v. 3, n. 2, p. e22, 2017 May.

CORREIA, F.G.; ALENCAR, C.H.; DAMASCENO, L.S.; RAMOS, I.C.; PONTES, L.B.; LEITÃO, T.M. Spatial distribution of disseminated histoplasmosis and AIDS co infection in an endemic area of Northeastern Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 49, n. 2, p. 227-31, Apr 2016.

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, DE.; KORBER, DR.; LAPPIN-SCOTT, H.M. Microbial biofilms. **Annu Rev Microbiol**, v. 49, p. 711-45, 1995.

COWAN, M.M.; WARREN, T.M.; FLETCHER, M. Mixed-species colonization of solid surfaces in laboratory biofilms. **Biofouling**, v. 3, n. 1, p. 23-34, 1991.

CRAVCHIK, A.; SIBLEY, D.R.; GEJMAN, P.V. Functional analysis of the human D2 dopamine receptor missense variants. **J Biological Chemistry**, v. 271, n. 42, p. 26013–26017, Oct 1996.

DADE, J.; DUBOIS, J.C.; PASULA, R.; DONNELL, A.M.; CARUSO, J.A.; SMULIAN, A.G.; DEEPE, G.S JR. HcZrt2, a zinc responsive gene, is indispensable for the survival of *Histoplasma capsulatum* *in vivo*. **Med Mycol**, v. 54, n. 8, p. 865-75, Nov 2016.

DAHER, E.F.; MARQUES, C.N.; LIMA, R.S.; SILVA JÚNIOR, G.B.; BARBOSA, A.S.; BARBOSA, E.S.; MOTA, R.M.; LEITE DA SILVA, S.; ARAÚJO, S.M.; LIBÓRIO, A.B. Acute kidney injury in an infectious disease intensive care unit - an assessment of prognostic factors. **Swiss Med Wkly**, v. 138, n. 9-10, p. 128-33, Mar 2008.

DAMASCENO, L. S., LEITÃO, T. M., TAYLOR, M. L., MUNIZ, M. M., & ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. The use of genetic markers in the molecular epidemiology of histoplasmosis: a systematic review. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 35, n. 1, p.19-27, Jan 2016.

DAMASCENO, L.S.; VITE-GARÍN, T.; RAMÍREZ, J.A, RODRÍGUEZ-ARELLANES, G.; ALMEIDA, M.A.; MUNIZ, M.M.; MESQUITA, J.R.L.; LEITÃO, T.D.M.J.S.; TAYLOR, M.L.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M. Mixed infection by *Histoplasma capsulatum* isolates with different mating types in Brazilian AIDS-patients. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 14, n. 61, p. e8, Feb 2019.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nat Rev Drug Discov**, v. 2, n. 2, p. 114-22, Feb 2003.

DE D, NATH, U.K. Disseminated Histoplasmosis in Immunocompetent Individuals- not a so Rare Entity, in India. **Mediterr J Hematol Infect Dis**, v. 7, n. 1, p. e2015028, Apr 2015.

DEEPE, G.S.JR.; GIBBONS, R.; BRUNNER, G.D.; GOMEZ, F.J. A protective domain of heat-shock protein 60 from *Histoplasma capsulatum*. **J Infect Dis**, v. 174, n. 4, p. 828–34, Oct 1996.

DEEPE, G.S.; GIBBONS, R.S.; SMULIAN, A.G. *Histoplasma capsulatum* manifests preferential invasion of phagocytic subpopulations in murine lungs. **J Leukoc Biol**, v. 84, n. 3, p. 669-678, Sep 2008.

DEL VECCHIO, A.; SILVA, JDE, F.; SILVA, J.L. *et al.* Induction of apoptosis in A549 pulmonary cells by two *Paracoccidioides brasiliensis* samples. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 5, p. 749-754, 2009.

DOMER, J.E.; HAMILTON, J.G.; HARKIN, J.C. Comparative study of the cell walls of the yeastlike and mycelial phases of *Histoplasma capsulatum*. **J Bacteriol**, v. 94, n. 2, p. 466-74, Aug 1967.

DOMON, B.; AEBERSOLD, R. Mass spectrometry and protein analysis. **Science**, v. 312, n. 5771, p. 212-217, Apr 2006.

DOMON, B.; AEBERSOLD, R. Options and considerations when selecting a quantitative proteomics strategy. **Nat Biotechnol**, v. 28, n. 7, p. 710-721, 2010.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin Microbiol Rev**, v. 15, n. 2, p. 167-93, Apr 2002.

DUBOIS, J.C.; PASULA, R.; DADE, J.E.; SMULIAN, A.G. Yeast Transcriptome and *In Vivo* Hypoxia Detection Reveals *Histoplasma capsulatum* Response to Low Oxygen Tension. **Medical Mycology**, v. 54, p. 40-58, Jan 2016.

DULBECCO, R.; FREEMAN, G. Plaque production by the polyoma virus. **Virology**, v. 8, p. 396–397, 1959.

EAGLE, H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. **Science**, v. 122, p. 501–514, 1955.

EDKINS, A.L.; PRICE, J.T.; POCKLEY, A.G.; BLATCH, G.L. Heat shock proteins as modulators and therapeutic targets of chronic disease: an integrated perspective. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 373, n. 1738, p. 20160521, Jan 2018.

EMMONS, C.W.; BELL, J.A.; OLSON, B.J. Naturally occurring histoplasmosis in *Mus musculus* and *Rattus norvegicus*. **Public Health Rep**, vol. 62, n. 46, p. 1642–1646, Nov 1947.

EDWARDS, J.A.; ALORE, E.A.; RAPPLEYE, C.A. The yeast-phase virulence requirement for α -glucan synthase differs among *Histoplasma capsulatum* chemotypes. **Eukaryot Cell**, v. 10, n. 1, p. 87-97, Jan 2011.

ERECIŃSKA, M.; SILVER, I.A. Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. **Respiration Physiology**, v. 128, p. 263-76, Nov 2001.

ERWIG, L.P.; GOW, N.A. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. **Nat Rev Microbiol**, v.14, n. 3, p. 163–176, Mar 2016.

FAIOLLA, R.C.; COELHO, M.C.; SANTANA, RDE. C.; MARTINEZ, R. Histoplasmosis in immunocompetent individuals living in an endemic area in the Brazilian Southeast. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 46, n. 4, p. 461-5, Jul-Aug 2013.

FECHER, R.A.; HORWATH, M.C.; FRIEDRICH, D.; RUPP, J.; DEEPE, G.S, JR. Inverse Correlation between IL-10 and HIF-1 α in Macrophages Infected with *Histoplasma capsulatum*. **J Immunol**, v. 197, n. 2, p. 565-79, Jul 2016.

FERGUSON-PAUL, K.; PARK, C.; CHILDRESS, S.; ARNOLD, S.; AULT, B.; BAGGA, B. Disseminated histoplasmosis in pediatric kidney transplant recipients-A report of six cases and review of the literature. **Pediatr Transplant**, v. 22, n. 7, p. e13274, Nov 2018.

FERREIRA, M.S.; BORGES, A.S. Histoplasmosis. **Rev Soc Bras Med Trop**, vol. 42, n. 2, p. 192-8, Mar-Apr 2009.

FERREIRA, C.; GONÇALVES, B.; VILAS BOAS, D.; OLIVEIRA, H.; HENRIQUES, M.; AZEREDO, J.; SILVA, S. *Candida tropicalis* biofilm and human epithelium invasion is highly influenced by environmental pH. **Pathog Dis**, v. 74, p. ftw101, Nov 2016.

FINKEL, J.S.; XU, W.; HUANG, D.; HILL, E.M.; DESAI, J.V. et al. Portrait of *Candida albicans* adherence regulators. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 2, p. e1002525, Feb 2012.

FORTALEZA, S.C.B.; LOPES, S.K.; BANDEIRA, T.J.; NOGUEIRA, T.N.A.; HOLANDA, M.A. Histoplasmose disseminada aguda em indivíduo imunocompetente. **Jornal Brasileiro De Pneumologia**, v. 30, n. 3, p. 270–273, 2004.

FREGONEZI, N.F.; OLIVEIRA, L.T.; SINGULANI, J.L.; MARCOS, C.M.; DOS SANTOS, C.T.; TAYLOR, M.L.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; DE OLIVEIRA, H.C.; FUSCO-ALMEIDA, A.M. Heat Shock Protein 60, Insights to Its Importance in *Histoplasma capsulatum*: From Biofilm Formation to Host-Interaction. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 10, p. 591950, Jan 2021.

FREIFELD, A.; PROIA, L.; ANDES, D.; BADDOUR, L.M.; BLAIR, J.; SPELLBERG, B.; ARNOLD, S.; LENTNEK, A.; WHEAT, L.J. Voriconazole use for endemic fungal infections. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 4, p. 1648-51, Apr 2009.

FRESSATTI, R.; DIAS-SIQUEIRA, V.L.; SVIDZINSKI, T.I.; HERRERO, F.; KEMMELMEIER, C. A medium for inducing conversion of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* into its yeast-like form. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 87, n. 1, p.53-8, Jan-Mar 1992.

FRIEDRICH, D.; ZAPF, D.; LOHSE, B.; FECHER, R.A.; DEEPE, G.S. JR.; RUPP, J. The HIF-1 α /LC3-II Axis impacts fungal immunity in human macrophages. **Infect Immun**, v. 87, n. 7, p. e00125-19, Jun 2019.

GANGULY, S.; BISHOP, A.C.; XU, W.; GHOSH, S. *et al.* Zap1 control of cell-cell signaling in *Candida albicans* biofilms. **Eukaryot Cell**, v. 10, n. 11, p. 1448-54, Nov 2011.

GARFOOT, A.L.; ZEMSKA, O.; RAPPLEYE, C.A. *Histoplasma capsulatum* depends on de novo vitamin biosynthesis for intraphagosomal proliferation. **Infect Immun**, v. 82, n. 1, p. 393-404, Jan 2014.

GARFOOT, A.L.; DEARING, K.L.; VANSCHOIACK, A.D.; WYSOCKI, V.H.; RAPPLEYE, C.A. Eng1and Exg8 Are the Major β -Glucanases Secreted by the Fungal Pathogen *Histoplasma capsulatum*. **J Biol Chem**, v. 292, n. 12, p. 4801-4810, Mar 2017.

GARFOOT, A.L.; RAPPLEYE, C.A. *Histoplasma capsulatum* surmounts obstacles to intracellular pathogenesis. **FEBS J**, v. 283, n. 4, p. 619-33, Feb 2016.

GARFOOT, A.L.; GOUGHENOUR, K.D.; WÜTHRICH, M. *et al.* O-mannosylation of proteins enables *Histoplasma* yeast survival at mammalian body temperatures. **mBio**, v. 9, p. e02121-17, Jan 2018.

GERWIEN, F.; SKRAHINA, V.; KASPER, L.; HUBE, B.; BRUNKE, S. Metals in fungal virulence. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 1, p. 42-fux050, Jan 2018.

GIACOMAZZI, J.; BAETHGEN, L.; CARNEIRO, L.C.; MILLINGTON, M.A.; DENNING, D.W.; COLOMBO, A.L.; PASQUALOTTO, A.C. The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, v. 59, n. 3, p.145-50, Mar 2016.

GLADIEUX, P. Updates in the Language of *Histoplasma* Biodiversity. **MBio**, v. 9, n. 3, p. e00181-18. May 2018.

GOUGHENOUR, K.D.; BALADA-LLASAT, J.M.; RAPPLEYE, C.A. Quantitative microplate-based growth assay for determination of antifungal susceptibility of *Histoplasma capsulatum* yeasts. **J Clin Microbiol**, v. 53, n. 10, p. 3286-95, Oct 2015.

GRAVES, P.R.; HAYSTEAD, T.A. Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 66, n. 1, p. 39-63, 2002.

GAUPP, R.; SCHLAG, S.; LIEBEKE, M.; LALK, M.; GÖTZ, F. Advantage of upregulation of succinate dehydrogenase in *Staphylococcus aureus* biofilms. **J Bacteriol**, v. 192, n. 9, p. 2385-94, May 2010.

GUIMARÃES, A.J.; NOSANCHUK, J.D.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M. Diagnosis of Histoplasmosis. **Braz J Microbiol**, v. 37, n. 1, p. 1-13, Jan 2006.

GUIMARÃES, A.J.; FRASES, S.; GOMEZ, F.J.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; NOSANCHUK, J.D. Monoclonal antibodies to heat shock protein 60 alter the pathogenesis of *Histoplasma capsulatum*. **Infect Immun**, v. 77, n. 4, p.1357-67, Apr 2009.

GUIMARÃES, A.J.; PIZZINI, C.V.; DE ABREU, ALMEIDA, M.; PERALTA, J.M.; NOSANCHUK, J.D.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using purified, deglycosylated histoplasmin for different clinical manifestations of histoplasmosis. **Microbiol Res**, v. 1, n. 1, p. e2, 2010.

GUIMARÃES, A.J.; FRASES, S.; PONTES, B.; DE CERQUEIRA, M.D.; RODRIGUES, M.L.; VIANA, N.B.; NIMRICHTER, L.; NOSANCHUK, J.D. Agglutination of *Histoplasma capsulatum* by IgG monoclonal antibodies against Hsp60 impacts macrophage effector functions. **Infect Immun**, v. 79, n. 2, p. 918-27, Feb 2011.

GUIMARÃES, A.J.; DE CERQUEIRA, M.D.; & NOSANCHUK, J.D. Surface architecture of *Histoplasma capsulatum*. **Front Microbiol**, v. 2, p. 225, Nov 2011.

GUIMARAES, A.J.; DE CERQUEIRA, M.D.; ZAMITH-MIRANDA, D.; LOPEZ, P.H.; RODRIGUES, M.L. *et al.* Host membrane glycosphingolipids and lipid microdomains facilitate *Histoplasma capsulatum* internalisation by macrophages. **Cell Microbiol**, v. 21, n. 3, p. e12976, Mar 2019.

GOMEZ-PASTOR, R.; PEREZ-TORRADO, R.; CABISCOL, E.; ROS, J.; MATAALLANA, E. Reduction of oxidative cellular damage by overexpression of the thioredoxin TRX2 gene improves yield and quality of wine yeast dry active biomass. **Microb Cell Fact**, v. 9, p. 9, Feb 2010.

GONÇALVES, B.; FERNANDES, L.; HENRIQUES, M.; SILVA, S. Environmental pH modulates biofilm formation and matrix composition in *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **Biofouling**, v. 5, p. 621–630., May 2020.

GONÇALVES, L. N. C.; COSTA-ORLANDI, C. B.; BILA, N. M.; VASO, C. O.; DA SILVA, R. A. M. et al. Biofilm Formation by *Histoplasma capsulatum* in Different Culture Media and Oxygen Atmospheres. v. 11, n. 1455, 2020-July-10 2020. Original Research.

GONG, Y.; LI, T.; YU, C.; SUN, S. *Candida albicans* Heat Shock Proteins and Hsps-Associated Signaling Pathways as Potential Antifungal Targets. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 19, p. 7:520, Dec 2017.

GUPTA, P.; SARKAR, S.; DAS, B.; BHATTACHARJEE, S.; TRIBEDI, P. Biofilm, pathogenesis and prevention--a journey to break the wall: a review. **Arch Microbiol**, vol. 198, n. 1, p.1-15, Jan 2016.

HAGE, C.A.; AZAR, M.M.; BAHR, N.; LOYD, J.; WHEAT, L.J. Histoplasmosis: Up-to-Date Evidence-Based Approach to Diagnosis and Management. **Semin Respir Crit Care Med**, vol. 36, n. 5, p. 729-45. Oct 2015.

HAM, R.G. Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined, synthetic medium. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 53, n. 2, p. 288-93, Feb 1965.

HAMZEIY, H.; COX, J. What computational non-targeted mass spectrometry-based metabolomics can gain from shotgun proteomics. **Curr Opin Biotechnol**, v. 43, p.141-146, 2017.

HARDING, M.W.; MARQUES, L.L.; HOWARD, R.J.; OLSON, M.E. Can filamentous fungi form biofilms. **Trends Microbiol**, v. 17, n. 11, p. 475-80, Nov 2009.

HAWSER, S.P.; DOUGLAS, L.J. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials *in vitro*. **Infect Immun**, v. 62, n. 3, p. 915-21, Mar 1994.

HEBERT, A.S.; RICHARDS, A.L.; BAILEY, D.J.; ULBRICH, A.; COUGHLIN E.E.; WESTPHALL, M.S.; COON, J.J. The one hour yeast proteome. **Mol Cell Proteomics**, v. 13, n. 1, p. 339-47, 2014.

HILTY, J.; GEORGE, SMULIAN, A.; NEWMAN, S.L. *Histoplasma capsulatum* utilizes siderophores for intracellular iron acquisition in macrophages. **Med Mycol**, v. 49, n. 6, p. 633-42, Aug 2011.

HOLBROOK, E.D.; RAPPLEYE, C.A. *Histoplasma capsulatum* pathogenesis: making a lifestyle switch. **Curr Opin Microbiol**, v. 11, n. 4, p. 318-24, Aug 2008.

HONG, G.; MILLER, H.B.; ALLGOOD, S.; LEE, R.; LECHTZIN, N.; ZHANG, S.X. Use of Selective Fungal Culture Media Increases Rates of Detection of Fungi in the Respiratory Tract of Cystic Fibrosis Patients. **J Clin Microbiol**, v. 55, p. 1122-1130, Apr 2017.

ISAAC, D.T.; BERKES, C.A.; ENGLISH, B.C.; MURRAY, D.H.; LEE, Y.N.; COADY, A.; SIL, A. Macrophage cell death and transcriptional response are actively triggered by the fungal virulence factor Cbp1 during *H. capsulatum* infection. **Mol Microbiol**, v. 98, n. 5, p. 910-929, Dec 2015.

JASTRZĘBOWSKA, K.; GABRIEL, I. Inhibitors of amino acids biosynthesis as antifungal agents. **Amino Acids**, v. 47, n. 2, p. 227-49, Feb 2015.

JIANG, W.; AKAGI, T.; SUZUKI, H.; TAKIMOTO, A.; NAGAI, H. A new diatom growth inhibition assay using the XTT colorimetric method. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 185, p. 13-19, Jul-Aug 2016.

JOHNSON, C.H.; KLOTZ, M.G.; YORK, J.L.; KRUF, V.; MCEWEN, J.E. Redundancy, phylogeny and differential expression of *Histoplasma capsulatum* catalases. **Microbiology**, v. 148, n. 4, p. 1129-1142, Apr 2002.

KANETSUNA, F.; CARBONELL, L.M.; GIL, F.; AZUMA, I. Chemical and ultrastructural studies on the cell walls of the yeastlike and mycelial forms of *Histoplasma capsulatum*. **Mycopathol Mycol Appl**, v. 54, n.1, p. 1-13. Oct 1974.

KAPLAN, J.E.; BENSON, C.; HOLMES, K.K.; BROOKS, J.T.; PAU, A.; MASUR, H. Centers for Disease Control and Prevention (CDC); National Institutes of Health; HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America, v. 10, n. RR-4, p.1-207. Apr 2009.

KASUGA, T.; TAYLOR, J.W.; WHITE, T.J. Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* darling. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 653-663, 1999.

KASUGA, T.; WHITE, T. J.; KOENIG, G.; MCEWEN, J.; RESTREPO, A. et al. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. **Mol Ecol**, v. 12, n. 12, p. 3383-3401, Dec 2003.

KAUFFMAN, C.A. Histoplasmosis: A clinical and laboratory update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 115-132, 2007.

KEAN, R.; DELANEY, C.; SHERRY, L.; BORMAN, A.; JOHNSON, E.M.; RICHARDSON, M.D. et al. Transcriptome assembly and profiling of *Candida auris* reveals novel insights into biofilm-mediated resistance. **mSphere**, v. 3, p. e00334-18, 2018.

KEATH, E.J.; PAINTER, A.A.; KOBAYASHI, G.S.; MEDOFF, G. Variable expression of a yeast-phase-specific gene in *Histoplasma capsulatum* strains differing in thermotolerance and virulence. **Infect Immun**, v. 57, n. 5, p. 1384-1390, May 1989.

KIM, U.J.; HAN, M.; KAYNE, P.; GRUNSTEIN, M. Effects of histone H4 depletion on the cell cycle and transcription of *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO J**, v. 7, n. 7, p. 2211-9, Jul 1988.

KIM, M.J.; KIL, M.; JUNG, J.H.; KIM, J. Roles of Zinc-responsive transcription factor Csr1 in filamentous growth of the pathogenic Yeast *Candida albicans*. **J Microbiol Biotechnol**, v. 18, n. 2, p. 242-7, Feb 2008.

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

KLEIN, M.I.; XIAO, J.; LU, B.; DELAHUNTY, C.M.; YATES, JR.; RD, KOO, H. *Streptococcus mutans* protein synthesis during mixed-species biofilm development by high-throughput quantitative proteomics. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e45795, 2012.

KNEALE, M.; BARTHOLOMEW, J.S.; DAVIES, E.; DENNING, D.W. Global access to antifungal therapy and its variable cost. **J Antimicrob Chemother**, v. 71, n. 12, p. 3599-3606, Dec 2016.

KOSTAKIOTI, M.; HADJIFRANGISKOU, M.; HULTGREN, S.J. Bacterial biofilms: Development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 4, p. 1–23, 2013.

KOVÁCS, R.; MAJOROS, L. Fungal *Quorum-Sensing* Molecules: A Review of Their Antifungal Effect against *Candida* Biofilms. **J Fungi**, v. 6, n. 3, p. 99, Jul 2020.

KOWALSKI, C. H.; KERKAERT, J. D.; LIU, K. W.; BOND, M. C.; HARTMANN, R. et al. Fungal biofilm morphology impacts hypoxia fitness and disease progression. **Nat Microbiol**, v. 4, n. 12, p. 2430-2441, Dec 2019.

KUCHARÍKOVÁ, S.; H, TOURNU.; LAGROU, K.; VAN, DIJCK, P.; BUJDÁKOVÁ, H. Detailed comparison of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms under different conditions and their susceptibility to caspofungin and anidulafungin. **J Med Microbiol**, v. 60, n. 9, p. 1261-9, Sep 2011.

KUMAR, R.B.; DAS, A. Polar location and functional domains of the *Agrobacterium tumefaciens* DNA transfer protein VirD4. **Mol Microbiol**, v. 43, n. 6, p. 1523-32, Mar 2002.

KUMAR, C.; MANN, M. Bioinformatics analysis of mass spectrometry-based proteomics data sets. **FEBS letters**, v. 583, n. 11, p. 1703-12, Jun 2009.

KUMAR, K.; ASKARI, F.; SAHU, M.S.; KAUR, R. *Candida glabrata*: A lot more than meets the eye. **Microorganisms**, v. 7, n. 2, p. 39, Jan 2019.

KWAN, B.W.; VALENTA, J.A.; BENEDIK, M.J.; WOOD, T.K. Arrested protein synthesis increases persister-like cell formation. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, n. 3, p. 1468-73, Mar 2013.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. Tratado de micologia médica. **Ver Soc Med Trop**, 2009.

LAGREE, K.; MITCHELL, A.P. Fungal biofilms: inside out. **Microbiol Spectr**, v. 5, n. 2, p. 10.1128, Apr 2017.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 1970.

LARA-LEMUS, R.; ALVARADO-VASQUEZ, N.; ZENTENO, E.; GOROCICA, P. Effect of *Histoplasma capsulatum* glucans on host innate immunity. **Rev Iberoam Micol**, v. 31, n. 1, p. 76-80, Jan-Mar 2014.

LAUKENS, K.; NAULAERTS, S.; BERGHE, W.V. Bioinformatics approaches for the functional interpretation of protein lists: from ontology term enrichment to network analysis. **Proteomics**, v. 15, n. 5-6, p. 981-96, Mar 2015.

LÁZÁR-MOLNÁR, E.; GÁCSEK, A.; FREEMAN, G.J.; ALMO, S.C.; NATHENSON, S.G.; NOSANCHUK, J.D. The PD-1/PD-L costimulatory pathway critically affects host resistance to the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.105, p. 2658-2663, Feb 2008.

LEDTKE, C.; REHM, S. J.; FRASER, T. G.; SHRESTHA, N. K.; TAN, C. D. et al. Endovascular infections caused by *Histoplasma capsulatum*: a case series and review of the literature. **Arch Pathol Lab Med**, v. 136, n. 6, p. 640-645, Jun 2012.

LEE, H.H.; DEL POZZO, J.; SALAMANCA, S. A.; HERNANDEZ, H.; MARTINEZ, L.R. Reduced phagocytosis and killing of *Cryptococcus neoformans* biofilm-derived cells by J774.16 macrophages is associated with fungal capsular production and surface modification. **Fungal Genet Biol**, v. 132, p.103258, Nov 2019.

LEE, P.P.; LAU, Y.L. Cellular and Molecular Defects Underlying Invasive Fungal Infections- Revelations from Endemic Mycoses. **Front Immunol**, v. 28, n. 8, p.735, Jun 2017.

LEWIS, P.O.; KHAN, I.; PATEL, P. Successful stepdown treatment of pulmonary histoplasmosis with thrice-weekly liposomal amphotericin B in a hospital-associated, outpatient infusion centre: A case report. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 43, n. 2, p. 269–272, 2018.

LÓPEZ, C.E. Dimorphism and pathogenesis of *Histoplasma capsulatum*. **Rev Argent Microbiol**, v. 38, n. 4, p. 235-42, Oct-Dec 2006.

LORCHIRACHONKUL, N.; FOONGLADDA, S.; RUANGCHIRA-URAI, R.; CHAYAKULKEEREE, M. Prosthetic valve endocarditis caused by *Histoplasma capsulatum*: the first case report in Thailand. **J Med Assoc Thai**, v. 96 Suppl 2, p. S262-265, Feb 2013.

LUO, J.; VALLEN, E.A.; DRAVIS, C.; TCHEPEREGINE, S.E.; DREES, B.; BI, E. Identification and functional analysis of the essential and regulatory light chains of the only type II myosin Myo1p in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Cell Biol**, v. 165, n. 6, p. 843-55, Jun 2004.

LU, Y.; SU, C.; MAO, X.; RANIGA, P.P.; LIU, H.; CHEN, J. Efg1-mediated recruitment of NuA4 to promoters is required for hypha-specific Swi/Snf binding and activation in *Candida albicans*. **Mol Biol Cell**, v. 19, n. 10, p.4260-72, Oct 2008.

MACORIS, S.A.; SUGIZAKI, M.F.; PERAÇOLI, M.T.; BOSCO, S.M.; HEBELER-BARBOSA, F.; SIMÕES, L.B.; THEODORO, R.C.; TRINCA, L.A.; BAGAGLI, E. Virulence attenuation and phenotypic variation of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates

obtained from armadillos and patients. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 3, p. 331-4, May 2006.

MACKIE, J.; SZABO, E.K.; URGAST, D.S.; BALLOU, E.R.; CHILDERS, D.S.; MACCALLUM, D.M.; FELDMANN, J.; BROWN, A.J. Host-imposed copper poisoning impacts fungal micronutrient acquisition during systemic *Candida albicans* infections. **PLoS One**, v. 11, n. 6, p. e0158683, Jun 2016.

MANDAL, J.; SALIM, S.; PARIJA, S. Isolation of *Campylobacter* from human stool samples. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 32, p. 35-8, Mar 2014.

MANGALORE, R.P.; MOSO, M.A.; CRONIN, K.; YOUNG, K.; MCMAHON, J.H. Treatment of disseminated histoplasmosis in advanced HIV using itraconazole with increased bioavailability. **Int J STD AIDS**, v. 16, p. 956462418788129, Aug 2018.

MAO, X.; CAO, F.; NIE, X.; LIU, H.; CHEN, J. The Swi/Snf chromatin remodeling complex is essential for hyphal development in *Candida albicans*. **FEBS Lett**, v. 580, n. 11, p. 2615-22, May 2006.

MARCOS-ZAMBRANO, L.J.; ESCRIBANO, P.; BOUZA, E.; GUINEA, J. Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida spp.* isolates causing fungemia: comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. **Int J Med Microbiol**, v. 304, n. 8, p. 1192-1198, Nov 2014.

MARTINEZ, L.R.; CASADEVALL, A. Specific antibody can prevent fungal biofilm formation and this effect correlates with protective efficacy. **Infect Immun**, v. 73, n. 10, p. 6350-62, Oct 2005.

MARTINEZ, L.R.; CASADEVALL, A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents *in vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 3, p. 1021-1033, 2006.

MARTINEZ, L.R.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cell susceptibility to heat, cold, and UV light. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 73, p. 4592-4601, 2007.

MARTINEZ, L.R.; MIHU, M.R.; GÁCSEK, A.; SANTAMBROGIO, L.; NOSANCHUK, J.D. Methamphetamine enhances histoplasmosis by immunosuppression of the host. **J Infect Dis**, v. 200, n. 1, p. 131-41, Jul 2009.

MARTINEZ, L.R.; FRIES, B.C. Fungal Biofilms: Relevance in the Setting of Human Disease. **Curr Fungal Infect Rep**, v. 4, n. 4, p. 266-275, Dec 2010.

MARTINEZ, L.R.; CASADEVALL, A. Biofilm Formation by *Cryptococcus neoformans*. **Microbiol Spectr**, v. 3, n. 3, Jun 2015.

MAXWELL, C.S.; SEPULVEDA, V.E.; TURISSINI, D.A.; GOLDMAN, W.E.; MATUTE, D.R. Recent admixture between species of the fungal pathogen *Histoplasma*. **Evol Lett**, v. 2, n. 3, p. 210-220, Jun 2018.

MCTAGGART, L.R.; CHEN, Y.; POOPALARAJAH, R.; KUS, J.V. Incubation time and culture media impact success of identification of *Nocardia spp.* by MALDI-ToF mass spectrometry. **Microbiol Infect Dis**, v. 92, p. 270-274, Dec 2018.

MIHU, M.R.; NOSANCHUK, J.D. *Histoplasma* virulence and host responses. **Int J Microbiol**, p. :268123, 2012.

MINCHIOTTI, G.; GARGANO, S.; MARESCA, B. The intron-containing hsp82 gene of the dimorphic pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* is properly spliced in severe heat shock conditions. **Mol Cell Biol**, v. 11, n. 11, p. 5624–5630, 1991.

MISSALL, T.A.; LODGE, J.K.; MCEWEN, J.E. Mechanisms of resistance to oxidative and nitrosative stress: implications for fungal survival in mammalian hosts. **Eukaryot Cell**, v. 3, n. 4, p. 835-846, 2004.

MISSALL, T.A.; PUSATERI, M.E.; LODGE, J.K. Thiol peroxidase is critical for virulence and resistance to nitric oxide and peroxide in the fungal pathogen, *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol**, v. 51, n. 5. p. 1447-58, Mar 2004.

MITCHELL, K.F.; ZARNOWSKI, R.; SANCHEZ, H.; EDWARD, J.A.; REINICKE, E.L.; NETT, J.E.; MITCHELL, A.P.; ANDES. D.R. Community participation in biofilm matrix assembly and function. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 13, p. 4092-7, Mar 2015.

MITCHELL, K.F.; ZARNOWSKI, R.; ANDES, D.R. The Extracellular Matrix of Fungal Biofilms. **Adv Exp Med Biol**, v. 931, p. 21-35, 2016.

MITTAL, J.; PONCE, M.G.; GENDLINA, I.; NOSANCHUK, J.D. *Histoplasma capsulatum*: Mechanisms for Pathogenesis. **Curr Top Microbiol Immunol**, vol. 422, p. 157-191, Jul 2019.

MOORE, G.E.; GERNER, R.E.; FRANKLIN, H.A. Culture of normal human leukocytes. **JAMA**, v. 199, n. 8, p. 519-24, Feb 1967.

MUKHERJEE, P.K.; SESHAN, K.R.; LEIDICH, S.D.; CHANDRA, J.; COLE, G.T.; GHANNOUM, M.A. Reintroduction of the PLB1 gene into *Candida albicans* restores virulence in vivo. **Microbiology**, v. 147, n. 9, p. 2585-2597, Sep 2001.

MURAD, A.M.; SOUZA, G.H.; GARCIA, J.S.; RECH, E.L. Detection and expression analysis of recombinant proteins in plant-derived complex mixtures using nanoUPLC-MS(E). **J Sep Sci**, v. 34, n. 19, p. 2618-30, Oct 2011.

MUSZKIETA, L.; BEAUVAIS, A.; PÄHTZ, V.; GIBBONS, J.G.; ANTON LEBERRE. V. *et al.* Investigation of *Aspergillus fumigatus* biofilm formation by various "omics" approaches. **Front Microbiol**, v. 12, p. 4:13, 2013.

MYINT, T.; ANDERSON, A.M.; SANCHEZ, A.; FARABI, A.; HAGE, C. *et al.* Histoplasmosis in patients with human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome (HIV/AIDS): multicenter study of outcomes and factors associated with relapse. **Medicine Baltimore**, v. 93, n. 1, p. 11-8, Jan 2014.

NEWMAN, S.L.; GOOTEE, L.; BRUNNER, G.; DEEPE, G.S, JR. Chloroquine induces human macrophage killing of *Histoplasma capsulatum* by limiting the availability of intracellular iron and is therapeutic in a murine model of histoplasmosis. **J Clin Invest**, v. 93, n. 4, p. 1422–29, Apr 1994.

NOBILE, C.J.; NETT, J.E.; HERNDAY, A.D.; HOMANN, O.R.; DENEALD, J.S.; NANTEL, A, ANDES, D.R.; JOHNSON, A.D.; MITCHELL, A.P. Biofilm matrix regulation by *Candida albicans* Zap1. **PLoS Biology**, v. 7, n. 6, p. 1–15, 2009.

NOSANCHUK, J.D.; GACSER, A. *Histoplasma capsulatum* at the host-pathogen interface. **Microbes Infect**, v. 10, p. 973-7, Jul 2008.

NOSANCHUK, J.D.; GÓMEZ, B.L.; YOUNGCHIM, S.; DÍEZ, S.; AISEN, P.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.; RESTREPO, A.; CASADEVALL, A.; HAMILTON, A.J. *Histoplasma capsulatum* synthesizes melanin-like pigments *in vitro* and during mammalian infection. **Infect Immun**, v. 70, n. 9, p. 5124-31, Sep 2002.

NOSANCHUK, J.D.; STEENBERGEN, J.N.; SHI, L.; DEEPE, G.S. J.R.; CASADEVALL, A. Antibodies to a cell surface histone-like protein protect against *Histoplasma capsulatum*. **J Clin Invest**, v. 112, n. 8, p.1164-75, Oct 2003.

NOSANCHUK, J.D.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; HAMILTON, A.J.; GUIMARÃES, A.J. Antibody therapy for histoplasmosis. **Front Microbiol**, v. 2, n. 3, p. 21, Feb 2012.

NOSANCHUK, J.D.; JEYAKUMAR, A.; RAY, A, et al. Structure-function analysis and therapeutic efficacy of antibodies to fungal melanin for melanoma radioimmunotherapy. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 5466, Apr 2018.

ODKHUU, E.; KOIDE, N.; TSOLMONGYN, B.; JAMBALGANIIN, U.; NAIKI, Y.; KOMATSU, T.; YOSHIDA, T.; YOKOCHI, T. Involvement of redox balance in vitro osteoclast formation of RAW 264.7 macrophage cells in response to LPS. **Innate Immunity**, v. 21, p. 194-202, Feb 2015.

OLIVEIRA, FDE. M.; UNIS, G.; SEVERO, L.C. An outbreak of histoplasmosis in the city of Blumenau, Santa Catarina. **J Bras Pneumol**, vol. 32, n. 4, p. 375-8, 2006 Jul-Aug.

OLIVEIRA, L.T.; LOPES, L.G.; RAMOS, S.B.; MARTINS, C.H.G.; JAMUR, M.C.; PIRES, R.H. Fungal biofilms in the hemodialysis environment. **Microb Pathog**, v. 123, p. 206-212, Oct 2018.

OMMEN, P.; ZOBOK, N.; MEYER, R.L. Quantification of biofilm biomass by staining: Non-toxic safranin can replace the popular crystal violet. **J Microbiol Methods**, v. 141, p. 87-89, Oct 2017.

OSGOOD, R.; SALAMONE, F.; DIAZ, A.; CASEY, J.R.; BAJORSKI, P.; PICHICHERO, M.E. Effect of pH and oxygen on biofilm formation in acute otitis media associated NTHi clinical isolates. **Laryngoscope**, v. 125, p. 2204–2208, 2015.

OZSOLAK, F.; MIŁOS, P.M. Transcriptome profiling using single-molecule direct RNA sequencing. **Methods Mol Biol**, v. 733, p. 51-61, 2011.

PADDER, S.A.; PRASAD, R.; SHAH, A.H. *Quorum sensing*: A less known mode of communication among fungi. **Microbiol Res**, v. 210, p. 51-58, May 2018.

PALUCH, E.; REWAK-SOROCZYŃSKA, J.; JĘDRUSIK, I.; MAZURKIEWICZ, E.; JERMAKOW, K. Prevention of biofilm formation by *quorum quenching*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 104, n. 5, p. 1871-1881, Mar 2020.

PARENTE, A.F.A.; DE REZENDE, T.C.V.; DE CASTRO, K.P.; BAILÃO, A.M. *et al.* A proteomic view of the response of *Paracoccidioides* yeast cells to zinc deprivation. **Fungal Biology**, v. 117, n. 6, p. 399–410, 2013.

PARENTE-ROCHA, J.A.; PARENTE, A.F.; BAEZA, L.C.; BONFIM, S.M.; HERNANDEZ, O.; MCEWEN, J.G.; BAILÃO, A.M.; TABORDA, C.P.; BORGES, C.L.; SOARES, C. M. Macrophage Interaction with *Paracoccidioides brasiliensis* Yeast Cells Modulates Fungal Metabolism and Generates a Response to Oxidative Stress. **PloS one**, v. 10, n. 9, p. e0137619, Sep 2015.

PARK, A.J.; SURETTE, M.D.; KHURSIGARA, C.M. Antimicrobial targets localize to the extracellular vesicle-associated proteome of *Pseudomonas aeruginosa* grown in a biofilm. **Front Microbiol**, v. 3, p. 5-464, Sep 2014.

PASSOS, A.N.; KOHARA, V.S.; DE FREITAS, R.S.; VICENTINI, A.P. Immunological assays employed for the elucidation of a histoplasmosis outbreak in São Paulo, SP. **Braz J Microbiol**, v. 45, n. 4, p. 1357-61, Mar 2015.

PERCIVAL, S.L.; EMANUEL, C.; CUTTING, K.F.; WILLIAMS, D.W. Microbiology of the skin and the role of biofilms in infection. **Int Wound J**, v. 9, n. 1, p. 14-32, Feb 2012.

PERLIN, D.S.; SETO-YOUNG, D.; MONK, B.C. The plasma membrane H⁺-ATPase of fungi. A candidate drug target. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 834, p. 609–617, 1997.

PEETERS, E.; NELIS, H.J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **J Microbiol Methods**, v. 72, p.157-65, Feb 2008.

PETROVA, O.E.; SCHURR, J.R.; SCHURR, M.J.; SAUER, K. Microcolony formation by the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* requires pyruvate and pyruvate fermentation. **Mol Microbiol**, v. 86, n. 4, p. 819-35, Nov 2012.

PIRES, R.H.; CATALDI, T.R.; FRANCESCHINI, L.M.; LABATE, M.V.; FUSCO-ALMEIDA, A.M; LABATE, C.A.; PALMA, M.S.; MENDES-GIANNINI, M.J. Metabolic profiles of planktonic and biofilm cells of *Candida orthopsilosis*. **Future Microbiol**, v. 11, p. 1299-1313, Oct 2016.

PITANGUI, N.S. Análise proteômica diferencial do biofilme de *H. capsulatum* e implicações na interação fungo-hospedeiro. 2012. (Mestrado). Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara- UNESP

PITANGUI, N. S.; SARDI, J. C.; SILVA, J. F.; BENADUCCI, T.; MORAES DA SILVA, R. A. *et al.* Adhesion of *Histoplasma capsulatum* to pneumocytes and biofilm formation on an abiotic surface. **Biofouling**, v. 28, n. 7, p. 711-8, 2012.

PITANGUI, S.; SARDI JDE, C.; VOLTAN, A. R.; DOS SANTOS, C. T.; DA SILVA JDE, F. *et al.* An Intracellular Arrangement of *Histoplasma capsulatum* Yeast-Aggregates Generates Nuclear Damage to the Cultured Murine Alveolar Macrophages. **Front Microbiol**, vol. 6, p. 1526, Jan 2016.

PITARCH, A.; SÁNCHEZ, M.; NOMBELA, C.; GIL, C. Analysis of the *Candida albicans* proteome. I. Strategies and applications. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 787, n. 1, p. 101-28, Apr 2003.

RAI, M.N.; SRIRAM, B.; GORITYALA, L.D.; RUPINDER, K. Functional genomic analysis of *Candida glabrata*-macrophage interaction: role of chromatin remodeling in virulence. **Plos Pathogens**, v. 8.8, p. e1002863, 2012.

RAMAGE, G.; VANDEWALLE, K.; WICKES, B.L.; AND LÓPEZ-RIBOT, J.L. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. **Rev. Iberoam. Micol**, v. 18, p. 163–170, 2001.

RAMAGE, G.; MOWAT, E.; JONES, B.; WILLIAMS, C.; LOPEZ-RIBOT, J. Our current understanding of fungal biofilms. **Crit Rev Microbiol**, v. 35, n. 4, p. 340-55, 2009.

RAMAGE, G.; RAJENDRAN, R.; SHERRY, L.; WILLIAMS, C. Fungal biofilm resistance. **Int J Microbiol**, v. 2012, p. 528521, 2012.

RAMAGE, G.; ROBERTSON, S.N.; WILLIAMS, C. Strength in numbers: Antifungal strategies against fungal biofilms. **Int J Antimicrob Agents**, v. 43, n. 2, p. 114–120, Feb 2014.

RAMAN, S.B.; NGUYEN, M.H.; ZHANG, Z.; CHENG, S.; JIA, H.Y.; WEISNER, N.; ICZKOWSKI, K.; CLANCY, C.J. *Candida albicans* SET1 encodes a histone 3 lysine 4 methyltransferase that contributes to the pathogenesis of invasive candidiasis. **Mol Microbiol**, v. 60, n. 3, p. 697-709, May 2006.

RAMOS, L.S.; OLIVEIRA, S.S.C.; SOUTO, X.M.; BRANQUINHA, M.H.; SANTOS, A.L.S. Planktonic growth and Biofilm formation profiles in *Candida haemulonii* species complex. **Medical Mycology**, v. 55, p. 785-789, Oct 2017.

RAPPLEYE, C.A.; EISSENBERG, L.G.; GOLDMAN, W.E. *Histoplasma capsulatum* alpha-(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the beta-glucan receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 4, p. 1366-70, Jan 2007.

RAPPLEYE, C.A.; ENGLE, J.T.; GOLDMAN, W.E. RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates a role for α -(1,3)-glucan in virulence. **Molecular Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 153–165, 2004.

RATHSAM, C.; EATON, R.E.; SIMPSON, C.L.; BROWNE, G.V.; BERG, T.; HARTY, D.W.S.; JACQUES, N.A. Up-regulation of competence- but not stress-responsive proteins accompanies an altered metabolic phenotype in *Streptococcus mutans* biofilms. **Microbiology**, v. 151, n. 6, p. 1823-1837, Jun 2005.

RAVI, S.; PIERCE, C.; WITT, C.; WORMLEY, F.L.JR. Biofilm formation by *Cryptococcus neoformans* under distinct environmental conditions. **Mycopathologia**, v. 167, n. 6, p. 307-14, Jun 2009.

RAY, S. C.; RAPPLEYE, C. A. Flying under the radar: *Histoplasma capsulatum* avoidance of innate immune recognition. **Semin Cell Dev Biol**, v. 89, p. 91-98, May 2019.

RENSHAW, H.; VARGAS-MUÑIZ, J.M.; RICHARDS, A.D.; ASFAW, Y.G.; JUVVADI, P.R.; STEINBACH, W.J. Distinct roles of myosins in *Aspergillus fumigatus* hyphal growth and pathogenesis. **Infect Immun**, v. 84, n. 5, p. 1556-64, Apr 2016.

RIDDELL, J.; WHEAT, L.J. Central Nervous System Infection with *Histoplasma capsulatum*. **J Fungi**, v. 5, n. 3, p. 70, Jul 2019.

RODRIGUES, C.F.; ČERNÁKOVÁ, L. Farnesol and Tyrosol: Secondary Metabolites with a Crucial *quorum-sensing* Role in *Candida* Biofilm Development. **Genes (Basel)**, v. 11, n. 4, p. 444, Apr 2020.

RODRIGUES, A.M.; BEALE, M.A.; HAGEN, F.; FISHER, M.C.; TERRA, P.; DE HOOG, S.; BRILHANTE, R.; DE AGUIAR CORDEIRO, R.; DE SOUZA, COLLARES MAIA CASTELO-BRANCO, D.; ROCHA, M.; SIDRIM, J.; DE CAMARGO, Z.P. The global epidemiology of emerging *Histoplasma* species in recent years. **Studies in mycology**, v. 97, p. 100095, Mar 2020.

RODRIGUES, A.M.; KUBITSCHKE-BARREIRA, P.H.; PINHEIRO, B.G.; TEIXEIRA-FERREIRA, A.; HAHN, R.C.; DE CAMARGO, Z.P. Immunoproteomic analysis reveals novel candidate antigens for the diagnosis of Paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii*. **J Fungi**, v. 6, n. 4, p. 3572020, Dec 2020.

ROSATO, A.; CATALANO, A.; CAROCCI, A.; CARRIERI, A.; CARONE, A.; CAGGIANO, G.; FRANCHINI, C.; CORBO, F.; MONTAGNA, M.T. *In vitro* interactions between anidulafungin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on biofilms of *Candida spp.* **Bioorg Med Chem**, v. 24, p.1002-5, Mar 2016.

ROSENOW, E.C. Focal infection with special reference to oral sepsis. **J. Dent. Res**, p. 205–249, 1919.

ROTHBART, S.B.; STRAHL, B.D. Interpreting the language of histone and DNA modifications. **Biochim Biophys Acta**, v. 1839, n. 8, p.627-43, Aug 2014.

RUIZ, O.H.; GONZALEZ, A.; ALMEIDA, A.J.; TAMAYO, D.; GARCIA, A.M.; RESTREPO, A.; MCEWEN, J.G. Alternative oxidase mediates pathogen resistance in *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 10, p. e1353, Oct 2011.

SANTI, L.; BEYS-DA-SILVA, W.O.; BERGER, M.; CALZOLARI, D.; GUIMARÃES, J.A.; MORESCO, J.J.; YATES, JR, R.D. Proteomic profile of *Cryptococcus neoformans* biofilm reveals changes in metabolic processes. **J Proteome Res**, v. 13, n. 3, p. 1545-59, Mar 2014.

SAHAZA, J.H.; PÉREZ-TORRES, A.; ZENTENO, E.; TAYLOR, M.L. Usefulness of the murine model to study the immune response against *Histoplasma capsulatum* infection. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 37, n. 3, p. 143-52, May 2014.

SAHAZA, J.H.; DUARTE-ESCALANTE, E.; CANTEROS, C.; RODRÍGUEZ-ARELLANES, G.; REYES-MONTES, M.R.; TAYLOR, M.L. Analyses of the genetic diversity and population structures of *Histoplasma capsulatum* clinical isolates from Mexico, Guatemala, Colombia and Argentina, using a randomly amplified polymorphic DNA-PCR assay. **Epidemiol Infect**, vol. 147, p. e204, Jan 2019.

SARDI; PITANGUI NDE, S.; VOLTAN, A. R.; BRAZ, J. D.; MACHADO, M. P. *et al.* *In vitro* *Paracoccidioides brasiliensis* biofilm and gene expression of adhesins and hydrolytic enzymes. **Virulence**, v. 6, n. 6, p. 642-651, 2015.

SCHMIDT, A.; FORNE, I.; IMHOF, A. Bioinformatic analysis of proteomics data. **BMC Syst Biol**, v. 8, p. 2- S3. 2014.

SCHNEIDER, R.O.; FOGAÇA, N.S.; KMETZSCH, L.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H.; STAATS, C.C. Zap1 regulates zinc homeostasis and modulates virulence in *Cryptococcus gattii*. **PLoS One**, v. 7, p. e43773, 2012.

SEBAA, S.; BOUCHERIT-OTMANI, Z.; COURTOIS, P. Effects of tyrosol and farnesol on *Candida albicans* biofilm. **Mol Med Rep**, v. 19, n. 4, p.3201-3209, Apr 2019.

SEBÉ-PEDRÓS, A.; GRAU-BOVÉ, X.; RICHARDS, T.A.; RUIZ-TRILLO, I. Evolution and classification of myosins, a paneukaryotic whole-genome approach. **Genome Biol Evol**, v. 6, n. 2, p. 290-305, Feb 2014.

SEIDLER, M.; SALVENMOSER, S.; MÜLLER, F.M. *In vitro* effects of micafungin against *Candida* biofilms on polystyrene and central venous catheter sections. **Int J Antimicrob Agents**, v. 28, p. 568-73. Dec 2006.

SEIDLER, M.J.; SALVENMOSER, S.; MÜLLER, F.M. *Aspergillus fumigatus* forms biofilms with reduced antifungal drug susceptibility on bronchial epithelial cells. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 11, p. 4130-6, Nov 2008.

SENEVIRATNE, C.J.; WANG, Y.; JIN, L.; ABIKO, Y.; SAMARANAYAKE, L.P. *Candida albicans* biofilm formation is associated with increased anti-oxidative capacities. **Proteomics**, v. 8, n. 14, p. 2936-47, Jul 2008.

SENEVIRATNE, C.J.; WANG, Y.; JIN, L.; ABIKO, Y.; SAMARANAYAKE, L.P. Proteomics of drug resistance in *Candida glabrata* biofilms. **Proteomics**, v. 10, n. 7, p. 1444-54, Apr 2010.

SEPÚLVEDA, V.E.; MÁRQUEZ, R.; TURISSINI, D.A.; GOLDMAN, W.E.; MATUTE, D.R. Genome Sequences Reveal Cryptic Speciation in the Human Pathogen *Histoplasma capsulatum*. **MBio**, v. 8, n. 6, p. e01339-17, Dec 2017.

SEPÚLVEDA, V.E.; WILLIAMS, C.L.; GOLDMAN, W.E. Comparison of phylogenetically distinct *Histoplasma* strains reveals evolutionarily divergent virulence strategies. **mBio**, v. 5, n. 4, p. e01376-14, Jul 2014.

SERRANO-FUJARTE, I.; LÓPEZ-ROMERO, E.; CUÉLLAR-CRUZ, M. Moonlight-like proteins of the cell wall protect sessile cells of *Candida* from oxidative stress. **Microb Pathog**, v. 90, p. 22-33, Jan 2016.

SHARP, F.R.; BERNAUDIN, M. HIF1 and oxygen sensing in the brain. **Nature reviews Neurosciense**, v. 5, p. 437-48, Jun 2004.

SHEN, Q.; BEUCLER, M.J.; RAY, S.C.; RAPPLEYE, C.A. Macrophage activation by IFN- γ triggers restriction of phagosomal copper from intracellular pathogens. **PLoS Pathog**, v. 14, n. 11, p. e1007444, Nov 2018.

SHEN, Q.; RAPPLEYE, C.A. Differentiation of the fungus *Histoplasma capsulatum* into a pathogen of phagocytes. **Curr Opin Microbiol**, v. 40, p. 1-7, Dec 2017.

SHEN, Q.; RAPPLEYE, C.A. Living within the macrophage: Dimorphic fungal pathogen intracellular metabolism. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 10, p. 592259, Oct 2020.

SHEN, Q.; RAY, S.C.; EVANS, H.M.; DEEPE, G.S JR.; RAPPLEYE, C.A. Metabolism of gluconeogenic substrates by an intracellular fungal pathogen circumvents nutritional limitations within macrophages. **mBio**, v. 11, n. 2, p. e02712-19, Apr 2020.

SHIELDS, A.F.; MANKOFF, D.A.; LINK, J.M.; GRAHAM, M.M.; EARLY, J.F. *et al.* Carbon-11-thymidine and FDG to measure therapy response. **J nuclear medicine**, v. 39, p. 1757-62, Oct 1998.

SHIN, D.H.; JUNG, S.; PARK, S.J.; KIM, Y.J.; AHN, J.M.; KIM, W.; CHOI, W. Characterization of thiol-specific antioxidant 1 (TSA1) of *Candida albicans*. **Yeast**, v. 22, n. 11, p. 907-18, Aug 2005.

SILVA, J.; VICENTIM, J., OLIVEIRA, H.C.; MARCOS, C.M.; ASSATO, P.A.; ANDREOTTI, P.F.; SILVA, J.L.; SOARES, C.P.; BENARD, G.; ALMEIDA, A.M.; MENDES-GIANNINI, M.J. Influence of the *Paracoccidioides brasiliensis* 14-3-3 and gp43 proteins on the induction of apoptosis in A549 epithelial cells. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 476-84, Jun 2015.

SILVA, T.C.; TREMÉA, C.M.; ZARA, A.L.; MENDONÇA, A.F.; GODOY, C.S.; COSTA, C.R.; SOUZA, L.K.; SILVA, M.R. Prevalence and lethality among patients with

histoplasmosis and AIDS in the Midwest Region of Brazil. **Mycoses**, v. 60, n. 1, p. 59-65, Jan 2017.

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. 3532-9, Nov 2002.

SMITH, J.A.; KAUFFMAN, C.A. Pulmonary fungal infections. **Respirology**, v. 17, n. 6, p. 913-26, Aug 2012.

SPEC, A.; CONNOLLY, P.; MONTEJANO, R.; WHEAT, L.J. *In vitro* activity of isavuconazole against fluconazole-resistant isolates of *Histoplasma capsulatum*. **Med Mycol**, v. 56, n. 7, p. 834-837, Oct 2018.

SOKOL-ANDERSON, M.L.; BRAJTBURG, J.; MEDOFF, G. Sensitivity of *Candida albicans* to amphotericin B administered as single or fractionated doses. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 29, n. 4, p. 701-2, Apr 1986.

SONG, Y.; LI, S.; ZHAO, Y.; ZHANG, Y.; LV, Y.; JIANG, Y.; WANG, Y.; LI, D.; ZHANG, H. ADH1 promotes *Candida albicans* pathogenicity by stimulating oxidative phosphorylation. **Int J Med Microbiol**, v. 309, n. 6, p. 151330, Sep 2019.

STIEFEL, P.; ROSENBERG, U.; SCNEIDER, J.; MAUERHOFER, S.; MANIURA-WEBER, K.; REN, Q. Is biofilm removal properly assessed? Comparison of different quantification methods in a 96-well plate system. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 100, p. 4135-45, May 2016.

STUDIER, F.W. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. **J Mol Biol**, v. 79, n. 2, p. 237-48, Sep 1973.

SUAREZ-ALVAREZ, R.O.; PEREZ-TORRES, A.; TAYLOR, M.L. Adherence patterns of *Histoplasma capsulatum* yeasts to bat tissue sections. **Mycopathologia**, v. 170, n. 2, p. 79-87, Aug 2010.

SUAREZ-ALVAREZ, R.O.; SAHAZA, J.H.; BERZUNZA-CRUZ, M.; BECKER, I.; CURIEL-QUESADA, E.; PÉREZ-TORRES, A.; REYES-MONTES, M.; TAYLOR, M.L. Dimorphism and Dissemination of *Histoplasma capsulatum* in the Upper Respiratory Tract after Intranasal Infection of Bats and Mice with Mycelial Propagules. **Am J Trop Med Hyg**, v. 101, n. 3, p. 716-723, Sep 2019.

SUN, T.S.; JU, X.; GAO, H.L.; WANG, T.; THIELE, D.J.; LI, J.Y.; WANG, Z.Y.; DING, C. Reciprocal functions of *Cryptococcus neoformans* copper homeostasis machinery during pulmonary infection and meningoencephalitis. **Nat Commun**, v. 5, p. 5550, Nov 2014.

TABORDA, C.P.; DA SILVA, M.B.; NOSANCHUK, J.D.; TRAVASSOS, L.R. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 331-9, Apr-May 2008.

TAGLIARI, L.; TOLEDO, M.S.; LACERDA, T.G.; SUZUKI, E.; STRAUS, A.H.; TAKAHASHI, H.K. Membrane microdomain components of *Histoplasma capsulatum* yeast forms, and their role in alveolar macrophage infectivity. **Biochim Biophys Acta**, v. 18, n. 3, p. 458-66, Mar 2012.

TAHERI-TALESH, N.; XIONG, Y.; OAKLEY, B.R. The functions of myosin II and myosin V homologs in tip growth and septation in *Aspergillus nidulans*. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e31218, 2012.

TAMAYO, D.; MUÑOZ, J.F.; ALMEIDA, A.J.; PUERTA, J.D.; RESTREPO, Á.; CUOMO, C.A.; MCEWEN, J.G.; HERNÁNDEZ, O. *Paracoccidioides spp.* catalases and their role in antioxidant defense against host defense responses. **Fungal Genet Biol**, v. 100, p. 22-32, Mar 2017.

TAN, S.X.; GREETHAM, D.; RAETH, S.; GRANT, C.M.; DAWES, I.W.; PERRONE, G.G. The thioredoxin-thioredoxin reductase system can function in vivo as an alternative system to reduce oxidized glutathione in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, v. 285, n. 9, p. 6118-6126, 2010.

TAN, Y.; LEONHARD, M.; MA, S.; SCHNEIDER-STICKLER, B. Influence of culture conditions for clinically isolated non-albicans *Candida* biofilm formation. **J Microbiol Methods**, v. 130, p. 123-128, Nov 2016.

TEIXEIRA, M.; PATANE, J. S.; TAYLOR, M. L.; GOMEZ, B. L.; THEODORO, R. C. *et al.* Worldwide Phylogenetic Distributions and Population Dynamics of the Genus *Histoplasma*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 6, p. e0004732, Jun 2016.

TELES, A.J.; GOMES, A.R.; CABANA, Â.L.; OSÓRIO, L.G.; MARTINS, A.O.; WALLER, S.B.; FARIA, R.O.; MEIRELES, M.C.A. Histoplasmoses em cães e gatos no Brasil. **Science and Animal Health**, v. 2, n. 1, p. 50-66, 2014.

THOMAS, D.P.; BACHMANN, S.P.; LOPEZ-RIBOT, J.L. Proteomics for the analysis of the *Candida albicans* biofilm lifestyle. **Proteomics**, v. 6, n. 21, p. 5795-804, Nov 2006.

TIMMERMAN, M.M.; WOODS, J.P. Ferric reduction is a potential iron acquisition mechanism for *Histoplasma capsulatum*. **Infect Immun**, v. 67, n. 12, p. 6403-8, Dec 1999.

THIND, G.S.; PATRI, S. Hiding in plain sight: a case of chronic disseminated histoplasmosis with central nervous system involvement. **BMJ Case Rep**, v. 6, p. bcr-2017-220476, Jul 2017.

TRONO, J.D.; MIZUNO, K.; YUSA, N.; MATSUKAWA, T.; YOKOYAMA, K.; UESAKA, M. Size, concentration and incubation time dependence of gold nanoparticle uptake into pancreas cancer cells and its future application to X-Ray Drug Delivery System. **J Radiat Res**, v. 52, p. 103-9, 2011.

URBAN, C.; XIONG, X.; SOHN, K.; SCHRÖPPEL, K.; BRUNNER, H.; RUPP, S. The moonlighting protein Tsa1p is implicated in oxidative stress response and in cell wall biogenesis in *Candida albicans*. **Mol Microbiol**, v. 57, n. 5, p. 1318-41, Sep 2005.

VAN ACKER, H.; SASS, A.; BAZZINI, S.; DE ROY, K.; UDINE, C.; MESSIAEN, T.; RICCARDI, G.; BOON, N.; NELIS, H.J.; MAHENTHIRALINGAM, E.; COENYE, T. Biofilm-grown *Burkholderia cepacia* complex cells survive antibiotic treatment by avoiding production of reactive oxygen species. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e58943, 2013.

VAN HO, A.; WARD, D.M.; KAPLAN, J. Transition metal transport in yeast. **Annu. Rev. Microbiol**, v. 56, p. 237–261, 2002.

VAN OUDENHOVE, L.; DEVREESE, B. A review on recent developments in mass spectrometry instrumentation and quantitative tools advancing bacterial proteomics. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 97, n. 11, p. 4749-62, 2013.

VERSTREPEN, K.J.; KLIS, F.M. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. **Mol Microbiol**, v. 60, n. 1, p. 5-15, Apr 2006.

VILA, T.; LOPEZ-RIBOT, J.L. Screening the Pathogen Box for Identification of *Candida albicans* Biofilm Inhibitors. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 1, p. e02006-16, Dec 2016.

VITE-GARÍN, T.; BARCENAS, D.A.; CIFUENTES, J.; TAYLOR, M.L. The importance of molecular analyses for understanding the genetic diversity of *Histoplasma capsulatum*. **Rev Iberoam Micol**, vol. 31, n.1, p.11-5, 2014.

VITE-GARÍN, T.; ESTRADA-BÁRCENAS, D.A.; GERNANDT, D.S.; REYES-MONTES, M.D.R.; SAHAZA, J.H.; CANTEROS, C.E.; RAMÍREZ, J.A.; RODRÍGUEZ-ARELLANES, G.; SERRA-DAMASCENO, L.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; TAYLOR, J.W.; TAYLOR, M.L. *Histoplasma capsulatum* Isolated from *Tadarida brasiliensis* Bats Captured in Mexico Form a Sister Group to North American Class 2 Clade. **J Fungi**. vol. 30, n.7, p. 529. Jun 2021.

WHEAT, L.J.; FREIFELD, A.G.; KLEIMAN, M.B.; BADDLEY, J.W.; MCKINSEY, D.S.; LOYD, J.E.; KAUFFMAN, C.A; Infectious Diseases Society of America. Clinical practice guidelines for the management of patients with histoplasmosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**, v. 45, n. 7, p. 807-25, Oct 2007.

WHEAT, L. J.; AZAR, M. M.; BAHR, N. C.; SPEC, A.; RELICH, R. F. et al. Histoplasmosis. **Infect Dis Clin North Am**, v. 30, n. 1, p. 207-227, Mar 2016.

WHITE, T.C.; MARR, K.A.; BOWDEN, R.A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, n. 2, p. 382-402, Apr 1998.

WIDBILLER, M.; SCHWEIKL, H.; BRUCKMANN, A.; ROSENDAHL, A.; HOCHMUTH, E.; LINDNER, S.R.; BUCHALLA, W.; GALLER, K.M. *Shotgun* Proteomics of Human Dentin with Different Prefractionation Methods. **Sci Rep**, v. 9, n. 1, p. 4457, Mar 2019.

WIEMANN, P.; PEREVITSKY, A.; LIM, F.Y.; SHADKCHAN, Y.; KNOX, B.P. *et al.* *Aspergillus fumigatus* copper export machinery and reactive oxygen intermediate defense

counter host copper-mediated oxidative antimicrobial offense. **Cell Rep**, v. 19, n. 5. p. 1008-1021, May 2017.

WILKINS, M. Proteomics data mining. **Expert Rev Proteomics**, v. 6, n. 6, p. 599-603, 2009.

WILSON, D.; CITIULO, F.; HUBE, B. Zinc exploitation by pathogenic fungi. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 12, p. e1003034, Dec 2012.

WONGSUK, T.; PUMESAT, P.; LUPLERTLOP, N. Fungal quorum sensing molecules: Role in fungal morphogenesis and pathogenicity. **J Basic Microbiol**, v. 56, n. 5, p. 440-7, 2016 May.

WOODS, J.P. *Histoplasma capsulatum* molecular genetics, pathogenesis, and responsiveness to its environment. **Fungal Genet Biol**, v. 35, n. 2, p. 81-97, Mar 2002.

WOODS, J.P. Knocking on the right door and making a comfortable home: *Histoplasma capsulatum* intracellular pathogenesis. **Curr Opin Microbiol**, v. 6, p. 327-331, Aug 2003.

WOODS, J.P. Revisiting old friends: Developments in understanding *Histoplasma capsulatum* pathogenesis. **J Microbiol**, v. 54, n. 3, p. 265-76, Mar 2016.

WORSHAM, P.L.; GOLDMAN, W.E. Quantitative plating of *Histoplasma capsulatum* without addition of conditioned medium or siderophores. **Medical Mycology**, v. 26, p. 137-43, Jun 1988.

WORTHINGTON, R.J.; RICHARDS, J.J.; MELANDER, C. Small molecule control of bacterial biofilms. **Org Biomol Chem**, v. 10, n. 37, p. 7457-74, Oct 2012.

WU, S.; WANG, Y.; LIU, N.; DONG, G.; SHENG, C. Tackling Fungal Resistance by Biofilm Inhibitors. **J Med Chem**, v. 60, n. 6, p. 2193-2211, Mar 2017.

XU, Z.; LIANG, Y.; LIN, S.; CHEN, D.; LI, B.; LI, L.; DENG, Y. Crystal Violet and XTT Assays on *Staphylococcus aureus* Biofilm Quantification. **Curr Microbiol**, v. 73, p. 474-82, Oct 2016.

XU, K.; WANG, J.L.; CHU, M.P.; JIA, C. Activity of coumarin against *Candida albicans* biofilms. **J Mycol Med**, v. 29, p. 28-34, Apr 2019.

XU, Y.; HUANG, S. Control of the actin cytoskeleton within apical and subapical regions of pollen tubes. **Front Cell Dev Biol**, v. 8, p. 614821, Dec 2020.

YEOM, J.; SHIN, J.H.; YANG, J.Y.; KIM, J.; HWANG, G.S. (1)H NMR-based metabolite profiling of planktonic and biofilm cells in *Acinetobacter baumannii* 1656-2. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e57730, 2013.

YOSHIHARA, E.; CHEN, Z.; MATSUO, Y.; MASUTANI, H.; YODOI, J. Thiol redox transitions by thioredoxin and thioredoxin-binding protein-2 in cell signaling. **Methods Enzymol**, v. 474, p. 67-82, Jun 2010.

YOUSEFF, B.H.; HOLBROOK, E.D.; SMOLNYCKI, K.A.; RAPPLEYE, C.A. Extracellular superoxide dismutase protects *Histoplasma* yeast cells from host-derived oxidative stress. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 5, p. e1002713, 2012.

ZACCHI, L.F.; SELMECKI, A.M.; BERMAN, J.; DAVIS, D, A. Low dosage of histone H4 leads to growth defects and morphological changes in *Candida albicans*. **PLoS One**, v. 5, n. 5, p. e10629, May 2010.

ZHAO, H.; EIDE, D. The *zrt2* gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, v. 271, p. 23203-23210, 1996.

ZHANG, Y.Z.; WEI, Z.Z.; LIU, C.H. *et al.* Linoleic acid isomerase gene FgLAI12 affects sensitivity to salicylic acid, mycelial growth and virulence of *Fusarium graminearum*. **Scientific reports**, v. 7, p. 46129, Apr 2017.

ZIDA, A.; NIAMBA, P.; BARRO-TRAORÉ, F.; KORSAGA-SOMÉ, N.; TAPSOBA, P.; BRIEGEL, J.; GUIGUEMDÉ, R.T. Disseminated histoplasmosis caused by *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* in a non-HIV patient in Burkina Faso: Case report. **J Mycol Med**, vol. 25, n. 2, p.159-62, Jun 2015.