



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS 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 memorian*) 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, Níura 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, Níura 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 <i>H. capsulatum</i>	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 <i>H. capsulatum</i> 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 <i>H. capsulatum</i> 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 <i>H. capsulatum</i> 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 <i>H. capsulatum</i> 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 <i>H. capsulatum</i> : (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	LXXIV
Figura 9. Comparação entre a viabilidade celular dos biofilmes maduros formados em meio HAM-F12 das cepas EH-315, G217B e G186A de <i>H. capsulatum</i>	LXXV
Figura 10. Cinética das biomassas produzidas pelo biofilme de diferentes cepas de <i>H. capsulatum</i> : (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 <i>H. capsulatum</i>	LXXVIII
Figura 12. Cinética da quantidade de matriz extracelular e estruturas polissacarídicas produzidas pelos biofilmes das diferentes cepas de <i>H. capsulatum</i> : (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 <i>H. capsulatum</i>	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 <i>H. capsulatum</i> (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 <i>H. capsulatum</i> em macrófagos alveolares AMJ2-C11	CXXIX
Figura 52. Cinética da viabilidade celular do biofilme da cepa EH-315 de <i>H. capsulatum</i> 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 <i>H. capsulatum</i> 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 <i>H. capsulatum</i> 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 <i>H. capsulatum</i> 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 <i>H. capsulatum</i> 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 <i>H. capsulatum</i> 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 <i>H. capsulatum</i> 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 <i>H. capsulatum</i> ; (B) controle (biofilme da cepa EH-315 de <i>H. capsulatum</i> 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

AGS1 - 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 cabônico

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-Hidrocloreto

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 Tripan	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

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

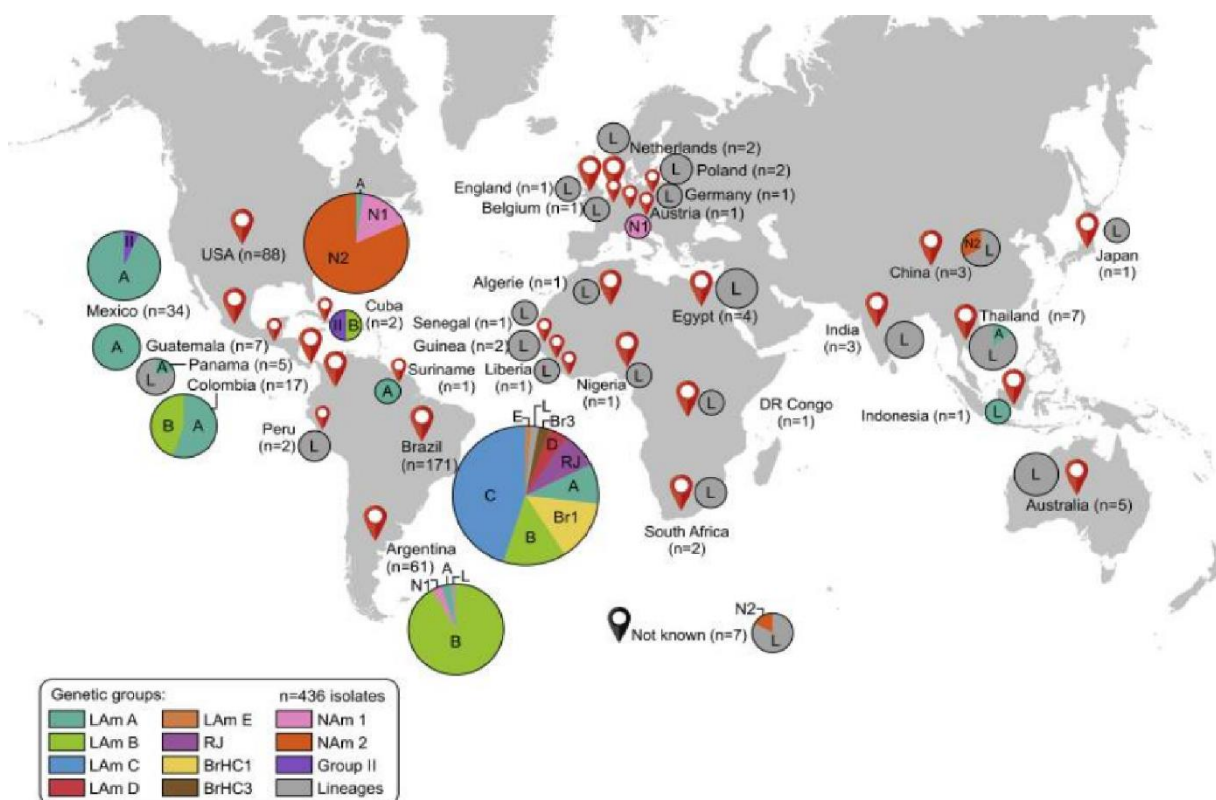
As infecções fúngicas invasivas têm aumentado durante as duas últimas décadas na América Latina e no mundo inteiro e o número de pacientes em risco tem crescido drasticamente (LEE; LAU, 2017; RODRIGUES et al., 2020) (**Figura 1**). Estima-se que aproximadamente 1,2 bilhões de pessoas são acometidas mundialmente 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 histoplasmosse pulmonar aguda é pouco diagnosticada e muitas vezes confundida com a tuberculose ou a leishmaniose (ANTINORI, 2014). Surto de histoplasmosse 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

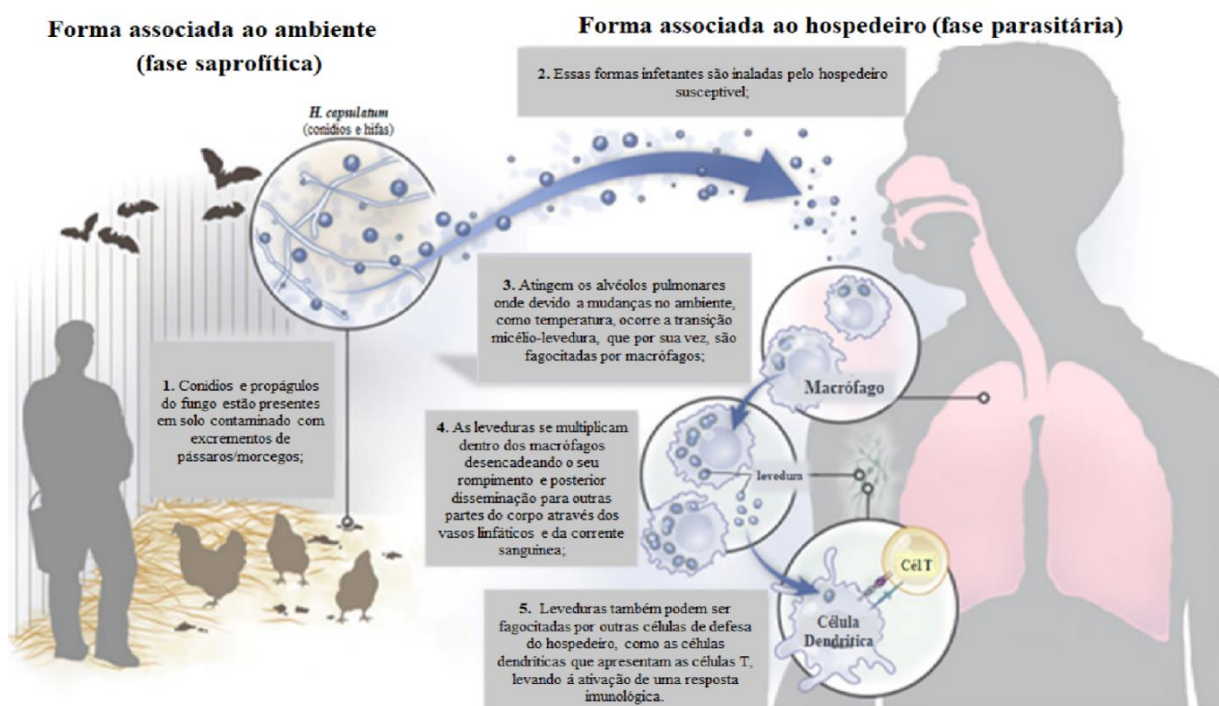
A patogenia da histoplasmosse inicia-se pela inalação de conídios e/ou fragmentos de hifas presentes na natureza e disseminados pelo ar (PASSOS et al., 2015; WHEAT et al., 2016; RIDDELL et al., 2019) (**Figura 2**). Uma vez inaladas, estas formas de disseminação entram em contato com o hospedeiro, onde 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; BRAJTURG; 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; BRAJTURG; 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 (AGS1), 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 AGS1 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).

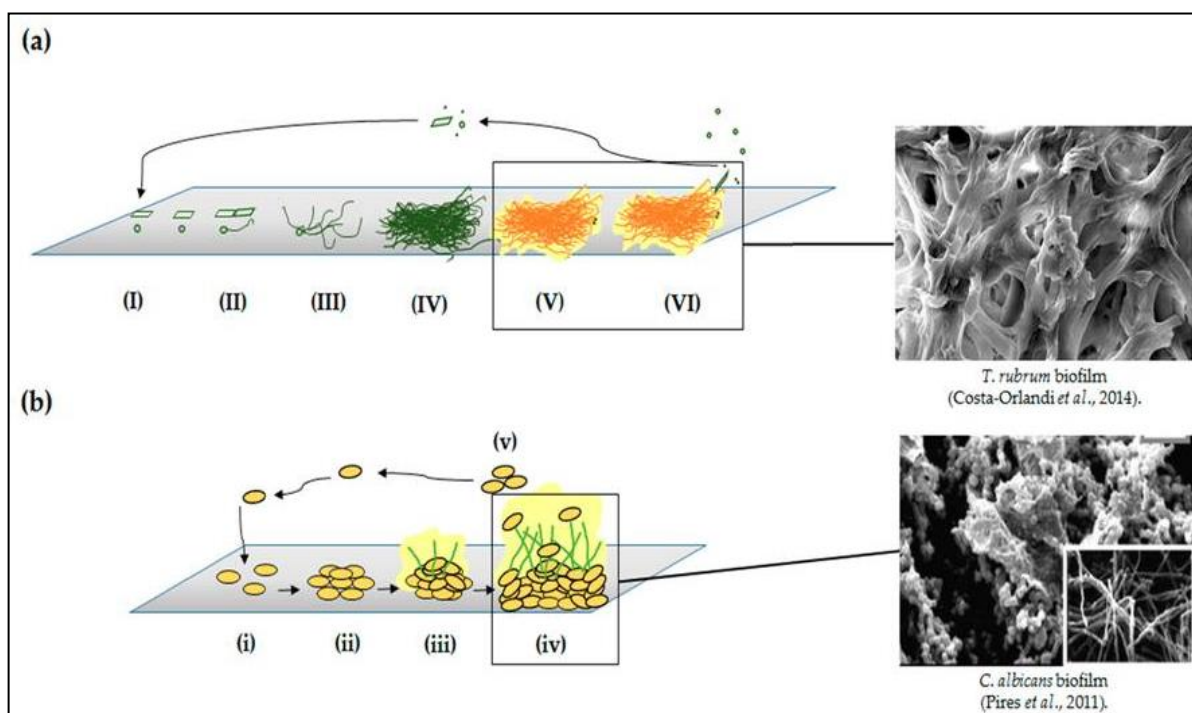
Outro fator que contribui para a virulência de *H. capsulatum* é a produção de melanina, um pigmento de alta massa molecular ocasionada pela polimerização oxidativa de agentes fenólicos, que causam uma coloração geralmente marrom ou preta, capaz de reduzir a sensibilidade dos fungos aos mecanismos de 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 micelial 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 artroconídios. 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 espectrômetria 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 espectrômetria 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.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar a formação de biofilmes por diferentes cepas de *H. capsulatum* em diferentes meios de cultura e atmosferas de O₂, bem como identificar proteínas exclusivas em células planctônicas, biofilme maduro e em células do biofilme recuperadas da infecção em macrófagos alveolares murinos por análise proteômica utilizando o método *shotgun*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a curva de crescimento de células planctônicas de *H. capsulatum* em diferentes meios de cultura e atmosferas de O₂;
- Caracterizar a formação de biofilmes *in vitro* pelas diferentes espécies de *H. capsulatum*, verificando a influência de diversos meios de cultura e atmosferas de O₂ no desenvolvimento dessas comunidades, através da quantificação da viabilidade celular, formação da biomassa e polissacarídeos (MEC), bem como sua topografia;
- Avaliar o padrão de infecção de células planctônicas e derivadas do biofilme de *H. capsulatum* em macrófagos das linhagens AMJ₂-C11, bem como quantificar a interação em ambas as condições pela contagem de unidade formadoras de colônias por mL (UFC/mL);
- Verificar e caracterizar a formação de biofilme *in vitro* em pH ácido, mimetizando o ambiente intracelular macrofágico pela cepa EH-315 de *H. capsulatum*;
- Identificar proteínas exclusivas em células planctônicas e biofilme, bem como em células do biofilme recuperadas da infecção em macrófagos das linhagens J774 A.1;
- Classificar funcionalmente em categorias as proteínas obtidas envolvidas no biofilme e na interação dos biofilmes com macrófagos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MICRORGANISMOS

Para a realização dos ensaios, foram utilizadas duas cepas de referência de *H. capsulatum*, cepa G217B (ATCC 26032), sem α -1,3-glucana na superfície da célula de levedura, cedida gentilmente pelo professor Dr. Allan Jefferson Guimarães da Universidade Federal Fluminense (UFF) do Rio de Janeiro e cepa G186A (ATCC 26029), cedida pela professora Dra. Roseli Maria Zancopé Oliveira da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) do Rio de Janeiro. A terceira cepa empregada é a EH-315, cedida em colaboração com o grupo de pesquisa liderado pela professora Dra. Maria Lúcia Taylor da UNAM (Universidade Nacional do México). Essa cepa foi isolada do intestino de morcego infectado do gênero *Mormoops megalophylla*, capturado em uma caverna no estado de Guerrero no México, depositada na Coleção de Culturas de *H. capsulatum* do Laboratório de Imunologia de Fungos do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Faculdade de Medicina da Universidade Nacional Autônoma do México (UNAM) e registrada no banco de dados da Federação Mundial para Coleção de Culturas sob o número LIH-UNAM WDCM817. De acordo com a categorização filogenética, no presente trabalho de tese de doutorado, foi estudada a espécie linhagem humana H81 (G186A), a espécie Nam2 (G217B) e a espécie BAC-1, atualmente Nam3 (EH-315).

A fase leveduriforme de cada cepa foi mantida em meio *F-12 Nutrient Mixture* (Ham-F12) (Gibco) suplementado com glicose (18.2 g/L) (Synth), ácido glutâmico (1 g/L) (Synth), Hepes (6 g/L) (Sigma-Aldrich), e L-cisteína (8.4 mg/L) (Synth), e incubadas a 37°C por 5 dias sob agitação (150 rpm).

3.2. REVERSÃO DA FORMA MICELIAR PARA A LEVEDURIFORME

Como as cepas estavam armazenadas em sua forma filamentosa, foi necessária a reversão para a forma leveduriforme. A manutenção da fase miceliar foi feita em ágar Sabouraud dextrose (Difco, BD biosciences) acrescido de cloranfenicol 0,1% e incubadas à temperatura de 28°C. Para a conversão das células leveduriformes, os micélios foram subcultivados em ágar *Brain Heart Infusion* (BHI-broth) (Kasvi), suplementado com 10% de sangue de carneiro e 1% de L-cisteína. Os tubos foram incubados a 37°C em microaerofilia, com repiques subsequentes até a total reversão (FRESSATTI et al., 1992).

3.3. INFECÇÃO E REISOLAMENTO DE *H. capsulatum* APÓS PASSAGEM EM MONOCAMADAS DE FIBROBLASTOS DE PULMÃO (MRC-5)

Após o processo de reversão e os repiques consecutivos, monocamadas de fibroblastos de pulmão MRC-5 (ATCC® CCL-171™), provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), foram infectadas com as cepas de *H. capsulatum* EH-315 e G186A para a manutenção de sua virulência. As linhagens celulares foram mantidas em garrafas próprias para cultivo de células, juntamente com o meio *Dulbecco's Modified Eagle's medium* (DMEM, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Brasil) e incubadas em estufa em condições padrão (37°C, 5% de CO₂, umidificado) por 24 horas, para total adesão das células. O fungo foi subcultivado em caldo BHI suplementado com 1% de glicose e 0,1% de L-cisteína e incubado a 37°C, sob agitação (150 rpm) por 120 hrs (Pitangui et al., 2012). As células fúngicas foram lavadas 3 vezes com *Phosphate-buffered saline* (PBS) pH 7,2 estéril e, após, foi preparada uma suspensão fúngica no meio DMEM acrescido de SFB de modo a se obter uma concentração celular de 1×10^6 leveduras/mL.

Para a infecção, o meio de cultura das células foi removido e 3 mL de meio novo foram adicionados, juntamente com 1 mL da suspensão fúngica. As garrafas foram incubadas por 72 hrs nas mesmas condições anteriores (37°C, 5% de CO₂, umidificado). Após esse período, o sobrenadante foi desprezado e as células infectadas foram lavadas 3 vezes com PBS estéril. Foram acrescentados 2 mL de água milli-Q estéril refrigerada por 5 minutos para que houvesse lise das células. O lisado foi plaqueado em tubos de ágar BHI suplementado com 1% de glicose e 0,1% de L-cisteína, que, em seguida, foram incubados a 37°C em microaerofilia até o seu crescimento (BRUMMER et al., 1990; ANDREOTTI et al., 2005; DEL VECCHIO et al., 2009; SILVA et al., 2015).

3.4. CURVA DE CRESCIMENTO

As curvas de crescimento das cepas de *H. capsulatum* EH-315 e G186A em diferentes meios foram realizadas de acordo com Goughenour et al., 2015 com modificações. Inicialmente, para preparação do inóculo, as leveduras obtidas a partir do reisolamento de monocamadas de fibroblastos de pulmão foram suspensas em PBS estéril, homogeneizadas, contadas em câmara de Neubauer e ajustadas à concentração de 1×10^6 leveduras/mL nos meios [BHI suplementado com 1% de glicose e 1% de L-cisteína, *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640) com L-glutamina, acrescido de 2% de glicose, sem bicarbonato de sódio e tamponado com MOPS (Sigma-Aldrich), DMEM suplementado com 10% de SFB e

HAM-F12 suplementado como descrito no item 3.1]. Em seguida, 200 µL das suspensões fúngicas preparadas dos diferentes meios foram adicionados a placas de 96 poços (Kasvi), que, posteriormente, foram incubadas a 37°C em aerobiose com agitação de 150 rpm e em microaerofilia formada em jarra com vela (MANDAL et al., 2014 e CARR et al., 2015), sem agitação por um período de 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 hrs. As análises foram feitas de três maneiras: por meio de densidade óptica no comprimento de onda de 530nm; por contagem de células viáveis pela coloração com azul de Tripan e através da contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL), possibilitada pelo plaqueamento em ágar BHI suplementado com 1% de glicose, 0,1% de L-cisteína, acrescidos de cloranfenicol 0,1%.

3.5. CARACTERIZAÇÃO DA FORMAÇÃO DOS BIOFILMES DE *H. capsulatum* EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE NUTRIENTES E ATMOSFERAS DE O₂

Após os resultados da curva de crescimento e a verificação do melhor meio, o fungo foi subcultivado, a partir do ágar BHI, em meio HAM-F12 suplementado e incubado a 37°C, sob agitação (150 rpm) por cinco dias (fase exponencial de crescimento) (ALLEENDOERFER; BIOVIN; DEEPE, 1997; NOSANCHUCK et al., 2003; BALTAZAR et al., 2018; GUIMARÃES et al., 2019). O conteúdo foi dispensado em tubos cônicos de 50 mL (Corning), que foram centrifugados a 5000 rpm, à temperatura de 30°C por 10 min. O sobrenadante contendo o meio foi removido e os *pellets* foram lavados 3 vezes após a centrifugação com PBS estéril. Após as lavagens, as células foram ressuspensas em PBS estéril, homogeneizadas em vórtex, contadas na câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi verificada utilizando o azul de Tripan na proporção de 1:1. Certificado ao menos 90% de viabilidade, as células foram contadas e novas suspensões fúngicas foram preparadas em PBS estéril, de modo a atingir uma concentração final de 5×10^6 leveduras/mL (PITANGUI et al., 2012). Duzentos microlitros foram adicionados às placas de 96 poços (Kasvi), que foram incubadas por 12 h período de pré-adesão (tempo pré-estabelecido) em duas condições (aerobiose, a 37°C com agitação a 150 rpm e em atmosfera de microaerofilia formada em jarra com velas (MANDAL et al., 2014; CARR et al., 2015), a 37°C, sem agitação). Após os períodos de pré-adesão, os sobrenadantes foram removidos e as células foram lavadas com PBS estéril para a remoção das células não aderentes. Por fim, 200 µL de diferentes meios de cultura (BHI, HAM-F12, DMEM + SFB e RPMI-1640), foram adicionados aos poços das placas, que foram novamente incubadas a 37°C nas mesmas condições mencionadas anteriormente por um intervalo de tempo de 24 à 168 hrs (COSTA-ORLANDI et al., 2017).

3.5.1. Determinação da viabilidade celular do biofilme pelo ensaio de redução do XTT

A viabilidade celular dos biofilmes formados nos diferentes meios e condições de aerobiose e microaerofilia, foi verificada por meio do ensaio de redução de XTT [2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-(2H)-tetrazólio-5-carboxanilida]. As células foram preparadas em placas de 96 poços, conforme o item 3.5. Após 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 hrs de incubação, os sobrenadantes dos biofilmes formados nos diferentes meios e estágios de desenvolvimento foram removidos e as células foram lavadas com PBS estéril para a remoção do excesso de meio de cultura, bem como das células não aderentes. Foram preparadas soluções de XTT (Thermo Fisher Scientific) (1 mg de sal/mL de PBS) e menadiona (Sigma-Aldrich) (1mM em PBS). Em seguida, 50 µL de solução de XTT + 4 µL de solução de menadiona foram adicionados aos poços das placas, que posteriormente foram incubadas a 37°C por 3 hrs. As placas foram lidas em espectrofotômetro Biotek Epoch™2 e a densidade óptica foi verificada no comprimento de onda de 490nm. Em presença de atividade metabólica, o sal de tetrazólio é convertido a sais de formazana, resultando em alteração colorimétrica (amarelo para laranja) que se correlaciona com a viabilidade celular. Em todos os experimentos, o meio HAM-F12 isento da formação de biofilme foi incluído como controle negativo (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006; PITANGUI et al., 2012; COSTA-ORLANDI et al., 2014).

3.5.2. Quantificação da biomassa pela coloração com Cristal Violeta

A quantificação da massa total dos biofilmes foi conduzida por coloração com cristal violeta. Os biofilmes foram formados de acordo com o descrito nos itens 3.5. e 3.5.1. Após a incubação, os meios de cultura foram removidos e 200 µL de metanol foram adicionados aos poços por 15 min. O sobrenadante foi aspirado e as placas foram submetidas a secagem em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados a cada poço, 200 µL de solução de cristal violeta (Dinâmica) a 0,1% por 20 min. Após esse período, os sobrenadantes foram aspirados e os poços foram lavados com água destilada estéril até que o excesso de coloração fosse removido e os biofilmes foram descorados pela adição de 200 µL de ácido acético (Synth) a 33%. Por fim, as placas foram lidas em espectrofotômetro Biotek Epoch™2, no comprimento de onda de 570nm (Marcos-Zambrano et al., 2014; Oliveira et al., 2018). Os valores da absorbância serão proporcionais à quantidade de biomassa do biofilme, compreendida por leveduras e MEC (quanto maior a quantidade de material biológico, maior a coloração e o valor da absorbância) (COSTA-ORLANDI et al., 2014).

3.5.3. Quantificação do material polissacarídico pela coloração com Safranina

O material polissacarídico dos biofilmes foi quantificado pela coloração com safranina, conforme descrito por Seidler; Salvenmoser; Muller (2008) e Costa-Orlandi et al., 2014. Após os intervalos de tempo, os meios de cultura foram removidos e 50 µL de solução de safranina a 1% foram adicionados aos poços por 5 min. Em seguida, o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e as placas foram lavadas com 200 µL de solução salina estéril a 0,85%, até que os sobrenadantes ficassem límpidos. Por fim, as placas foram lidas em espectrofotômetro Biotek Epoch™2, no comprimento de onda de 492nm.

3.5.4. Análise morfológica dos biofilmes

O desenvolvimento dos biofilmes formados nos diferentes meios de cultura e atmosferas de O₂ foi observado nos tempos de 12, 24, 48 72, 96, 120, 144 e 168 hrs por meio de microscopia óptica no equipamento *In cell Analyzer 2000* (GE Healthcare). A análise das imagens foi realizada pelo software *In Cell Investigator Image Analysis* (PITANGUI et al., 2012; COSTA-ORLANDI et al., 2014).

3.5.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a MEV, os biofilmes foram formados em placas de 24 poços (Kasvi) e as amostras foram processadas conforme descrito por Martinez e Fries (2010) e Costa-Orlandi et al., 2014, com pequenas modificações. Após a maturação, os biofilmes foram lavados três vezes com PBS estéril para remover células não aderentes. As comunidades foram posteriormente fixadas com adição de 800 µL de solução de glutaraldeído 2,5% (Sigma-Aldrich) e as placas incubadas sob refrigeração a 4°C por 24 hrs. Após esse período, foram realizadas três lavagens com solução salina estéril 0,85%. As amostras foram posteriormente desidratadas com concentrações crescentes de etanol (Vetec) (25-100%) e secas à temperatura ambiente. O fundo das placas foi cortado com bisturi e, antes da análise ao microscópio eletrônico de varredura, as amostras foram montadas em cilindros de alumínio com prata e colocadas em evaporador de alto vácuo para o revestimento de ouro. As características topográficas dos biofilmes foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (Jeol 6610LV Scan JSM- da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araraquara, SP, Brasil).

3.6. ENSAIOS DE INTERAÇÃO ENTRE MACRÓFAGOS ALVEOLARES AMJ₂-C11 E CÉLULAS PLANCTÔNICAS E DERIVADAS DE BIOFILME DE *H. capsulatum*

3.6.1. Cultura de células AMJ₂-C11

Os macrófagos alveolares murinos AMJ₂-C11 (ATCC[®] CRL-2456), obtidos do Banco de Células do Rio de Janeiro são originados de camundongos da espécie *Mus musculus*. As células foram mantidas em garrafas próprias para a cultura de células e em meio DMEM (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, São Paulo, Brasil). As garrafas foram incubadas a 37°C, com atmosfera umidificada com 5% de CO₂, até obter 90% de confluência.

3.6.2. Infecção de macrófagos AMJ₂-C11 por células planctônicas e derivadas de biofilme de *H. capsulatum*

Estes ensaios foram realizados a fim de verificar a interação de células derivadas de biofilme da cepa *H. capsulatum* EH-315 em macrófagos, para posterior análise proteômica da infecção.

Após a obtenção da confluência, as células foram lavadas, centrifugadas, ressuspendidas e contadas em hemocítmetro. As suspensões foram preparadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, de modo a obter uma concentração celular de 5×10^3 macrófagos/poço. Cerca de 500 e 200 μ L do volume correspondente foi distribuído em placas de 24 poços (contendo lâminulas redondas estéreis) e 96 poços, respectivamente. As placas foram incubadas a 37°C, com atmosfera umidificada com 5% de CO₂ por 24 hrs para a adesão das células.

O fungo sob condições planctônicas e de biofilme foi cultivado conforme descrito no item 3.5. Em seguida, as células foram preparadas, os biofilmes desfeitos com o auxílio de vórtex e as células provenientes dos dois fenótipos foram centrifugadas, lavadas com PBS estéril, contadas em hemocítmetro e ressuspendidas em meio DMEM com 10% de SFB, de forma a obter uma concentração de 5×10^3 leveduras/poço na placa (PITANGUI et al., 2016). As placas foram incubadas a 37°C, em diferentes tempos de infecção: 15 min, 1 h, 5 hrs e 24 hrs. Após cada período de incubação, o sobrenadante foi removido e os poços foram lavados três vezes com PBS estéril para remoção de células não internalizadas. A interação das células planctônicas e derivadas do biofilme de *H. capsulatum* com os macrófagos foi observada no equipamento *In Cell Analyzer* (GE Healthcare), em magnificação de 10X e pelo microscópio confocal de varredura à laser Zeiss LSM 800 da Faculdade de Odontologia da UNESP de

Araraquara em magnificação de 63X. A interação também foi quantificada de forma comparativa para ambas as condições através da contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL).

3.6.3. Imunofluorescência Indireta

As monocamadas infectadas e seus respectivos controles (monocamadas sem infecção, e a suspensão fúngica) foram fixadas com 200 e 500 μ L de solução de paraformaldeído a 4% a temperatura de 4°C, “*overnight*”. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com PBS estéril, e as células foram permeabilizadas com Triton X-100 (Sigma-Aldrich) a 0,5% durante 30 min à temperatura ambiente. Após esse período o sobrenadante foi removido e foi adicionada uma solução de albumina de soro bovino (BSA) (Sigma-Aldrich) a 2%, seguido de incubação por 1 h à temperatura ambiente. Posteriormente, os poços foram lavados novamente com PBS estéril, o sobrenadante foi removido e foi adicionado o anticorpo primário monoclonal anti-Hsp60 (10 μ g/mL), diluído em BSA 2%, seguido de incubação por 1 h à temperatura ambiente. Esse anticorpo foi gentilmente cedido pelo Dr. Joshua Nosanchuk, dos Departamentos de Doenças Infecciosas e de Microbiologia e Imunologia da Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY, Estados Unidos. Em seguida, foram realizadas três lavagens com PBS estéril e foi adicionado o anticorpo secundário goat anti-mouse IgG conjugado com Alexa Fluor[®]594 (Thermo Fisher Scientific) (1 μ g/mL) por 1 h, com incubação à temperatura ambiente. Subsequentemente, foi adicionado FITC (Sigma-Aldrich) (0,5 mg/mL) por 1 h à temperatura ambiente, seguido do corante bisbenzimidá, Hoechst 34580 (Sigma-Aldrich) (0,5 μ g/mL) por 15 min, a 37°C. Por fim, foram realizadas três lavagens com PBS estéril a fim de remover o excesso de coloração. As lamínulas contidas nos fundos das placas foram cuidadosamente retiradas dos poços e vertidas sob 4 μ L de Fluoromount-G (Sigma-Aldrich), depositado previamente sobre lâminas de microscopia. As imagens foram feitas no microscópio de fluorescência confocal Zeiss LSM 800 e processadas através do software *ZEN 3.3 blue edition* e no equipamento *In Cell Analyzer 2000* (GE Healthcare) e analisadas pelo software *In Cell Investigator 1000 Workstation* (PITANGUI et al., 2016 com modificações). Dois experimentos independentes foram realizados.

3.6.4. Taxa de infecção de células planctônicas e derivadas de biofilme de *H. capsulatum* em macrófagos AMJ₂-C11 por contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL)

Os ensaios foram realizados conforme descrito no item 3.6.1 e 3.6.2. Após cada período de incubação, o sobrenadante foi removido e os poços foram lavados três vezes com PBS estéril para remoção de leveduras não internalizadas. Os macrófagos foram lisados pela adição de 500 µL de água gelada estéril, por 10 min. As leveduras foram recuperadas por centrifugação a 5000 rpm, à temperatura de 30°C por 10 min, plaqueadas em ágar BHI suplementado com 0,1% de cisteína, 1% de glicose, 0,1% de cloranfenicol e incubadas a 37°C por aproximadamente 2 semanas (CHAVES et al., 2019 com modificações). A condição controle foi obtida incubando 5×10^3 células de leveduras em meio DMEM suplementado com 10% de SFB por 24 hrs a 37°C com 5% de CO₂. Os ensaios foram conduzidos em triplicata, em três experimentos independentes.

3.7. ENSAIO DE FORMAÇÃO DO BIOFILME DE *H. capsulatum* EM pH ácido

O ensaio foi realizado conforme descrito no item 3.5. Em resumo, o fungo foi cultivado em meio HAM-F12 suplementado e incubado a 37°C, sob agitação (150 rpm) por 5 dias. Os inóculos foram preparados em PBS estéril de modo a atingir uma concentração final de 5×10^6 leveduras/mL. Em seguida, 200 µL e 1000 µL do inóculo foram adicionados a placas de 96 e 24 poços, respectivamente. As placas foram incubadas a 37°C, por 12 horas, sem agitação, para que fosse realizada a pré-adesão do biofilme. Após esse período, o sobrenadante foi gentilmente removido dos poços, e os mesmos foram lavados por cerca de 2 vezes com PBS estéril para remoção das células não aderentes. Por fim, 200 µL e 1000 µL de meio HAM-F12 (pH 4.5) foram adicionados aos poços das placas de 96 e 24 poços, que foram novamente incubadas a 37°C por 24 à 168 hrs (GONÇALVES et al., 2020).

3.7.1. Determinação da viabilidade celular do biofilme pelo ensaio de redução do XTT

A viabilidade celular dos biofilmes formados em diferentes condições fisiológicas de pH e diferentes intervalos de tempo (24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas) foram verificadas através do ensaio de redução de XTT [2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-(2H)-tetrazólio-5-carboxanilida]. Para o teste, foram preparadas soluções-estoque de XTT (1 mg de sal/mL de PBS) e menadiona (1mM em PBS). Em seguida, 50 µL de solução de XTT + 4 µL de solução de menadiona foram adicionados aos poços das placas de 96 poços e incubadas a 37°C por 3 hrs. A mudança colorimétrica foi medida utilizando um espectrofotômetro Biotek Epoch™2

na densidade óptica de 490nm. Em todos os experimentos, o meio HAM-F12 (pH 4.5) isento da formação de biofilme foi incluído como controle negativo (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006; PITANGUI et al., 2012; COSTA-ORLANDI et al., 2014).

3.7.2. Quantificação da biomassa do biofilme por coloração com Cristal Violeta

Para a quantificação da biomassa, os biofilmes foram formados em placas de 96 poços, em meio HAM-F12 (pH 4.5), até a maturação. Em seguida, o meio de cultura foi retirado de cada poço e as células aderidas lavadas três vezes com PBS estéril. Após, 200 µL de metanol foram adicionados aos poços por 15 min. O sobrenadante foi aspirado e as placas foram submetidas a secagem em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados a cada poço, 200 µL de solução de cristal violeta a 0,1% por 20 min. Após esse período, os poços foram novamente lavados com água até que o excesso de coloração fosse removido e os biofilmes foram descorados pela adição de 200 µL de ácido acético a 33%. Por fim, as placas foram lidas em espectrofotômetro Biotek Epoch™2, no comprimento de onda de 570nm (MARCOS-ZAMBRANO et al., 2014; Oliveira et al., 2018).

3.7.3. Quantificação do material polissacarídico do biofilme pela coloração com Safranina

O material polissacarídico produzido pelos biofilmes foram quantificados pela coloração com safranina, conforme descrito no item 3.5.3. Após os intervalos de tempo, os meios de cultura foram removidos e 50 µL de solução de safranina a 1% foram adicionados aos poços por 5 min. Em seguida, os poços foram lavados com 200 µL de solução salina estéril a 0,85%, até que os sobrenadantes ficassem límpidos. Por fim, as placas foram lidas em espectrofotômetro Biotek Epoch™2, no comprimento de onda de 492nm.

3.7.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a MEV, o biofilme formado nas lamínulas em pH ácido, foi processado conforme descrito no item 3.5.5. Após a maturação, os poços foram lavados três vezes com PBS estéril e os biofilmes foram fixados com 800 µL de solução de glutaraldeído 2,5% por 24 hrs a 4°C. As amostras foram novamente lavadas e desidratadas com concentrações crescentes de etanol (25-100%) e secas à temperatura ambiente. Os fundos das placas foram cortados com a ajuda de um bisturi e, antes da análise ao microscópio eletrônico de varredura, as amostras foram montadas em cilindros de alumínio com prata e colocadas em evaporador de alto vácuo para o revestimento de ouro e então, as características topográficas dos biofilmes foram analisadas

em microscópio eletrônico de varredura (Jeol 6610LV Scan JSM- da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araraquara, SP, Brasil).

3.8. ANÁLISE PROTEÔMICA

3.8.1. Culturas planctônicas e formação de biofilmes de *H. capsulatum*

Para a verificação do perfil proteômico foi utilizada a cepa EH-315 de *H. capsulatum*. O fungo sob condições planctônicas e de biofilme foi cultivado como descrito nos itens 3.1 e 3.5, respectivamente. Os biofilmes foram formados nos fundos de placas de 24 poços, enquanto que as células planctônicas em erlenmeyers. Após a maturação dos biofilmes, o meio de cultura foi removido e foram feitas três lavagens com PBS estéril para remoção de células não aderentes. Posteriormente, foi adicionado tampão Tris-HCl 20mM (pH 8,8) nos poços, e o biofilme aderido foi raspado com o auxílio de ponteiros e transferido para tubos de fundo cônico de 50 mL (PIRES et al., 2016). Para a cultura planctônica, as células foram cultivadas por 144 horas a 37°C com agitação (150 rpm) em 200 mL de meio de cultura HAM-F12. Após o período de incubação, o conteúdo do erlenmeyer foi transferido para tubos cônicos de 50 mL. Ambas as amostras foram centrifugadas, lavadas duas vezes com PBS estéril e armazenadas a -80°C.

3.8.2. Cultura de células J774 A.1

Nos ensaios de proteômica foi utilizada a linhagem celular de macrófagos alveolares murinos J774 A.1 (ATCC[®] TIB-67) originadas de camundongos *Mus musculus*, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan, do Departamento de Ciências Biológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP. Estas foram cultivadas em garrafas próprias para cultivo de células, juntamente com o meio DMEM (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), contendo 10% de SFB (Cultilab, Campinas, São Paulo, Brasil). As garrafas de cultura foram mantidas a 37°C com atmosfera umidificada com 5% de CO₂, até obter 90% de confluência.

3.8.3. Infecção de macrófagos alveolares J774 A.1 por células derivadas de biofilme de *H. capsulatum*

Após a obtenção da confluência, as células foram raspadas com o auxílio de *cell scraper* (Kasvi) e lavadas com PBS estéril. As células foram ressuspensas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB para serem contadas em câmara de Neubauer, de modo a obter uma concentração de 1×10^6 macrófagos/poço na placa. Três mil microlitros da

suspensão de J774 A.1 foram semeados em placas de 6 poços (TPP®, Trasadingen, Switzerland), incubados a 37°C, com atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Após 24 hrs de incubação o meio de cultivo foi removido e um meio novo contendo uma mistura de DMEM e *phorbol-12-myristate-13-acetate* (PMA) (Sigma-Aldrich) na concentração de 150 ng/mL foi adicionado aos poços por 1 h para ativação dos macrófagos. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e cada poço foi inoculado com 3.000 µL da suspensão padronizada de 5 x 10⁶ leveduras/mL de células derivadas de biofilme de *H. capsulatum* em DMEM sem suplementos. Os macrófagos alveolares foram infectados em uma Multiplicidade de Infecção (MOI) de 5 leveduras para cada macrófago (5:1) (Fecher et al., 2016; Friedrich et al., 2019; GUIMARÃES et al., 2019). As placas foram então incubadas por mais 24 hrs nas mesmas condições. Após o período de incubação, o sobrenadante foi removido e os poços foram lavados suavemente três vezes com PBS estéril, para remoção de leveduras não internalizadas. Cerca de 1.000 µL de água gelada estéril foram adicionados em cada poço das placas de 6 poços por 10 min, para que ocorresse a lise dos macrófagos. Finalmente, as células foram transferidas para tubos de 50 mL, centrifugadas a 8.000 rpm por 10 min, 4°C e armazenadas em freezer -80°C. A condição controle foi obtida incubando 5 x 10⁶ células derivadas de biofilme de *H. capsulatum* em meio DMEM sem suplementos por 24 horas a 37°C com 5% de CO₂ (PARENTE-ROCHA et al., 2015; CHAVES et al., 2019).

3.8.4. Obtenção de extratos proteicos

Os extratos proteicos resultantes das condições a serem analisadas (células planctônicas, células provenientes de biofilme e células de biofilme recuperadas da infecção em macrófagos) foram obtidos por maceração mecânica em almofariz de porcelana contendo nitrogênio líquido. Em seguida, tampão de lise celular 20mM Tris-HCl (pH 8,8), mix de inibidores de proteases (GE, Healthcare), PMSF (*Phenylmethylsulfonyl fluoride*, Sigma Aldrich) e pérolas de vidro (5 mm) foram adicionadas. As amostras foram submetidas a agitação em vórtex cinco vezes por 1 min cada, intercalados com 1 min de incubação em banho de gelo. O lisado foi então centrifugado a 5.000 rpm por 15 min a 4°C (ALMEIDA et al., 2020 com modificações). Após a centrifugação, os sobrenadantes foram coletados e a eles foi adicionada uma solução de ácido tricloroacético (TCA) 10% em Acetona 90% v/v. As amostras foram mantidas “overnight” a 4°C para precipitação proteica. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 min a 4°C, e após esse período o precipitado das amostras foi coletado, liofilizado e estocado a -80°C.

As concentrações proteicas foram determinadas pelo método de Bradford e validadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (1D SDS-PAGE).

3.8.5. Determinação da concentração de proteínas totais: Método de Bradford

A determinação da concentração de proteínas presentes nos extratos proteicos obtidos conforme descrito no item 3.7.4 foi realizado pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Em resumo, 5 µl do extrato proteico e 250 µl do reagente de Bradford que consiste em uma mistura de Coomassie G-250 a 0,01% (m/v), 4,75% (v/v) de etanol e 8,5% (v/v) de ácido fosfórico, foram adicionados aos poços das placas de 96 poços e deixada em repouso por 10 min a temperatura ambiente. Após o tempo de reação, foi determinada a absorbância das amostras no comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro Biotek Epoch™2. As concentrações das proteínas foram determinadas utilizando-se uma solução de albumina de soro bovino (BSA) (Sigma-Aldrich) como padrão.

3.8.6. Análise do perfil proteico por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Os perfis proteicos foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio, SDS-PAGE, sob condições redutoras, utilizando sistema de tampão descontínuo de Laemmli (1970); Studier (1973). Os componentes foram primeiramente separados em gel a 12% e em gel de empilhamento a 5% de acrilamida. Para a preparação desse gel foi usada solução estoque com 30% acrilamida e 0,8% bis-acrilamida. Para o gel de separação a polimerização foi feita em solução com 1,5M de Tris- HCl, pH 8,8 e 0,4% de SDS, em presença de 0,1%v/v de N, N, N', N'- tetrametiletlenodiamida (TEMED) e 0,1% de persulfato de amônio. O gel de empilhamento foi polimerizado em presença de 0,5M de TrisHCl pH 6,8 e 0,4% de SDS, além de 0,1% de persulfato de amônio e 0,05% v/v de TEMED. Para o preparo da amostra foram utilizados 35µg de proteína de acordo com a quantificação, diluídos em tampão de amostra (1:4), que é composto de 62,5mM de Tris-HCl [tris (hidroxi-metil) aminometano] pH 6,8, 2% de SDS, 10% de glicerol, 0,5M de ditiotreitol e 0,002% de bromofenol. As proteínas foram dissociadas em banho maria por 3 min. A corrida eletroforética foi realizada com tampão composto por Tris 0,075M, glicina 0,57M e SDS 0,1%, pH 8,3, e a voltagem utilizada foi 10mA (80V) até a penetração no gel de separação, e a seguir a 20mA (120V) até o final do gel. A revelação do gel foi feita utilizando Azul de Coomassie G-250, para visualização do perfil de bandas específico.

3.8.7. Digestão enzimática

As digestões proteicas foram realizadas como descrito por (MURAD et al., 2011), com algumas modificações. Volumes correspondentes a 200 µg de proteína total foram submetidos a digestão. As amostras foram inicialmente ressuspensas em 20 µL de uma solução contendo bicarbonato de amônio 50 mM, ureia 7,5 M, posteriormente, adicionou-se 10 µL de agente redutor ditioneitol (DTT) (GE Healthcare) à 100 mM. As amostras foram incubadas a 37°C por 60 min. Em seguida adicionou-se 10 µL de iodoacetamida 400 mM, durante 60 min à temperatura ambiente, no escuro. Em sequência, para diluição das amostras foram adicionados 484 µL de tampão bicarbonato de amônio 100mM e 0,6 µL de cloreto de cálcio (CaCl₂) 1M. A digestão das proteínas foi realizada pela adição de 30 µL de uma solução de tripsina (0,05 µg/ µl) (Promega) e incubação a 37°C, por 16 horas. Após, 5 µL de ácido fórmico foi adicionado as amostras, para interromper a reação da tripsina. Finalmente, após a digestão, os peptídeos foram dessalinizados em coluna SEP-PAK C18 (Waters), submetidos à secagem em concentrador de amostras do tipo Speed Vac (Concentrator Plus Eppendorf) e estocadas a -20°C.

3.8.8. Análise de proteínas por *shotgun*

Os peptídeos foram analisados por espectrometria de massas com a utilização de um sistema electrospray - Ion Trap (ESI/IT), modelo Amazon SL (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) acoplado a um sistema Ultra Fast liquid Chromatography (UFLC) (Nexera-Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan). Foram aplicados 50 µL de cada amostra com auxílio do injetor automático (SIL-20AXR, Shimadzu). As análises cromatográficas foram realizadas sob gradiente: solução (A) - 0,05% de ácido trifluoroacético (TFA) em água, solução (B) – 0,05% de (TFA) em Acetonitrila (ACN) (2-60% de B (0-90 min), 60-90% de B (90-120 min), empregando-se uma coluna XBridge™ BEH300 C18 (2,1x100mm; 3,5 µm) (Waters). A eluição dos componentes foi monitorada por absorbância a 215 nm, com fluxo de 0,2 mL/min.

Ao longo de todo o experimento o software HyStar (Bruker Daltonics), bem como software LCMS solution (SHIMADZU) foram empregados para controle de aquisição e análise de dados. O espectrômetro de massas foi operado no modo íon positivo, com scan num intervalo de 200 a 2.200 m/z. As análises de espectrometria de massas sequenciais, isto é, espectros de fragmentação em condições de decomposição induzida por colisão (CID) (MS²) foram realizados de acordo com os mesmos parâmetros dos experimentos de MS¹, exceto a varredura que foi feita num intervalo entre 50 e 1.000 m/z. Foi usado Hélio como gás

de colisão, a uma pressão de 100 kPa. O software DataAnalysis (BRUKER Daltonics) foi usado para controle de aquisição e análise de dados.

3.8.9. Identificação de proteínas

Para aquisição dos dados de espectrômetria de massas foi utilizado o software HyStar (Bruker Daltonics), e o software DataAnalysis (Bruker Daltonics) para tratar e submeter os dados combinados de MS¹ e MS². A busca foi então executada com o software Proteinscape (versão 3.1, Bruker Daltonics), e o algoritmo Mascot (v2.3, Matrix Science, UK) foi utilizado para pesquisa de banco de dados, configurado com o banco de dados Swiss-Prot.

Os parâmetros utilizados caracterizam-se com o uso de tripsina como enzima; Carbamidometilação (C) como modificação fixa; Oxidação (M), como modificação variável; duas clivagens perdidas pela enzima como base; massa molecular do tipo: Monoisotópica; massa molecular: sem restrições; erro de tolerância de peptídeos $\pm 0,4$ Da a erro de tolerância de MSn $\pm 0,4$ Da; protonação: +2, +3, +4 para o estado da carga de peptídeos; tipo de instrumento: ESI-Trap; protein Scores significativos ($p < 0,05$), e FDR $< 1\%$ (False Discovery Rate) como valor de corte estabelecido para validar a identificação de peptídeos. Foi utilizado como referência um banco de dados NCBI para *Histoplasma capsulatum*.

3.8.10. Análise funcional dos dados de proteômica

Os bancos de dados são importantes ferramentas no estudo da proteômica, pois contém todas as sequências de proteínas e genes conhecidas e catalogadas até o presente momento. A partir dos resultados obtidos através das análises descritas anteriormente, os diagramas de Venn foram organizados usando a ferramenta Venny 2.1 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>), para determinar quais proteínas foram identificadas em comum e quais foram exclusivas entre os pares de amostras. O banco de dados Uniprot (www.uniprot.org) foi utilizado para categorizar as proteínas de acordo com a sua função. Para prever a localização subcelular das proteínas, foi utilizado a ferramenta WoLF PSORT disponível em (<https://wolfpsort.hgc.jp>). As proteínas identificadas foram organizadas manualmente em tabelas utilizando a ferramenta Microsoft Word® (Microsoft) e os gráficos foram construídos utilizando o Microsoft Excel 2010.

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os testes foram realizados em triplicata e com três experimentos independentes, com exceção do item 3.6.2 e 3.6.3, que foram realizados dois experimentos independentes.

Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando o teste t ou análise de variância com pós-teste de Bonferroni, por meio do software GraphPad Prism 5.0. Os valores de p menores que $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CURVA DE CRESCIMENTO

4.1.1. Carga fúngica e Densidade óptica

Os resultados da quantificação da carga fúngica e das leituras das densidades ópticas das cepas EH-315 e G186A crescidas nos diferentes meios e em condições de aerobiose e microaerofilia encontram-se na **figura 4.** e **figura 5.** Com relação à carga fúngica, observou-se que o meio HAM-F12, tanto para a cepa EH-315 (**Figura 4A e 4C**) quanto para a G186A (**Figura 5A e 5C**) e em ambas as condições de tensão de O₂, propiciou um maior crescimento fúngico até o tempo de 168 hrs, quando comparado aos meios BHI, DMEM e RPMI ($p < 0.001$). Além disso, observou-se que até esse período, as células permaneceram em contínua progressão.

Ao compararmos a carga fúngica obtida nas condições de aerobiose e microaerofilia com o crescimento no meio HAM-F12, no período de 168 hrs, concluiu-se que a incubação em aerobiose propiciou um maior crescimento fúngico quando comparado à condição de microaerofilia ($p < 0.01$) para ambas as cepas testadas.

Os resultados da cinética de crescimento fúngico avaliados por meio de densidade óptica corroboram com os obtidos pela carga fúngica e ratificam o meio HAM-F12 como o meio que melhor propicia o crescimento das cepas de *H. capsulatum* quando comparado aos demais ($p < 0.001$) (**Figuras 4B, 4D, 5B e 5D**).

4.1.2. Verificação da viabilidade celular por utilização de azul de Tripan

Os resultados da viabilidade celular nos diferentes intervalos de tempo e meios de cultura para a cepa EH-315, encontram-se na **figura 6.** Em ambas as condições de tensão de O₂, o meio HAM-F12 foi o que proporcionou maior estabilidade da viabilidade celular. Especificamente no tempo de 168 hrs, a viabilidade desta cepa foi maior no crescimento neste meio, quando comparada aos outros meios testados BHI ($p < 0.05$), DMEM ($p < 0.01$) e RPMI ($p < 0.01$). O mesmo foi observado para a cepa G186A (**Figura 7**), ($p < 0.001$, $p < 0.05$ e $p < 0.001$), respectivamente. O meio HAM-F12, que é utilizado para a manutenção de monocamadas de macrófagos alveolares, tem sido amplamente utilizado nos estudos com *H. capsulatum* (NOSANCHUK et al., 2003; CORDERO et al., 2016; BALTAZAR et al., 2018; GUIMARÃES et al., 2019).

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). O meio HAM-F12 proporcionou um maior crescimento fúngico, no tempo de 168 horas, quando comparado aos meios BHI, DMEM e RPMI ($p < 0,001$).

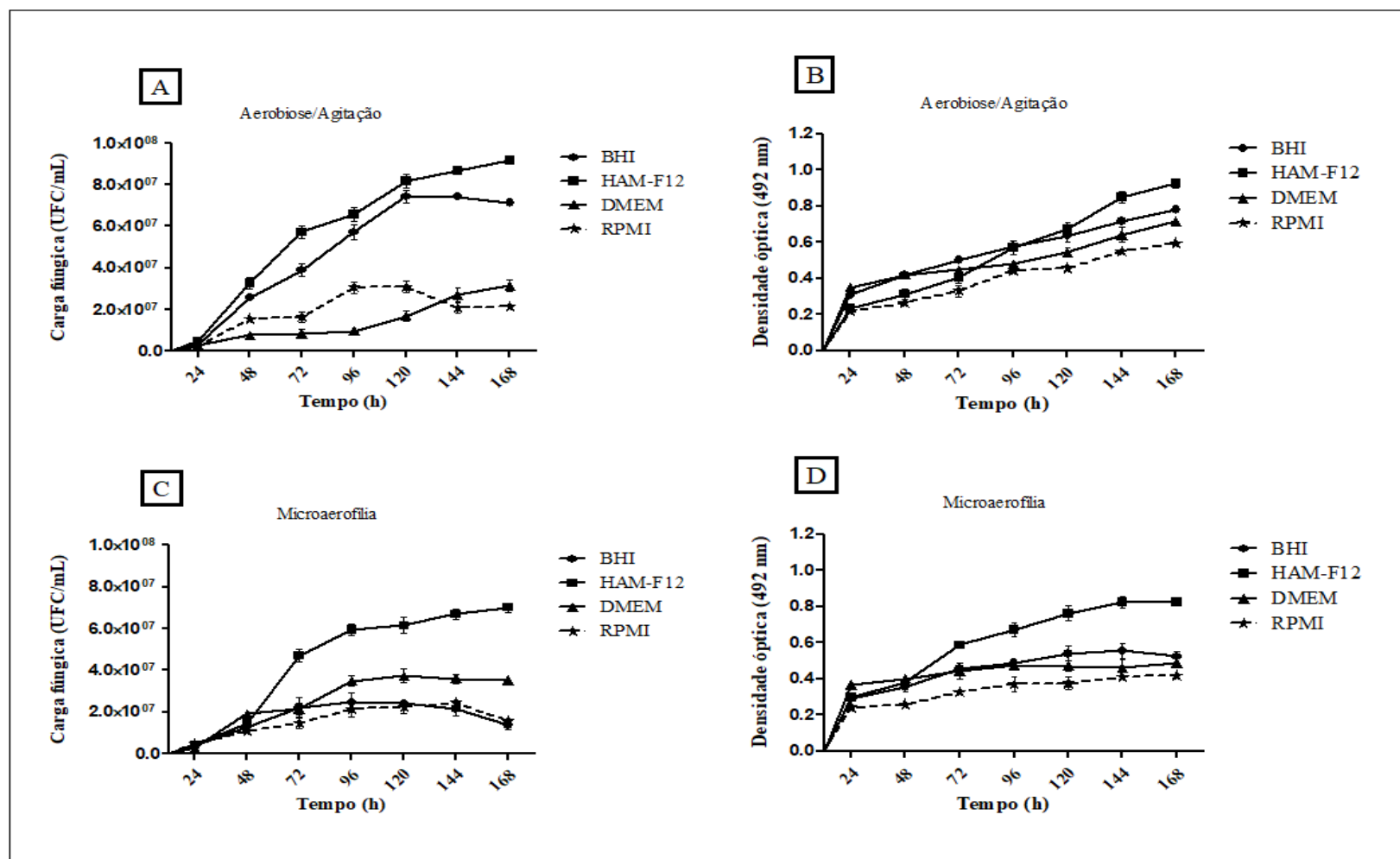


Figura 5. Curvas de crescimento da cepa G186A de *H. capsulatum* nos meios BHI, HAM-F12, DMEM e RPMI. Carga fúngica e densidade óptica em condição de aerobiose (A e B), microaerofilia (C e D). O meio HAM-F12 proporcionou um maior crescimento fúngico, no tempo de 168 horas, quando comparado aos meios BHI, DMEM e RPMI ($p < 0,001$).

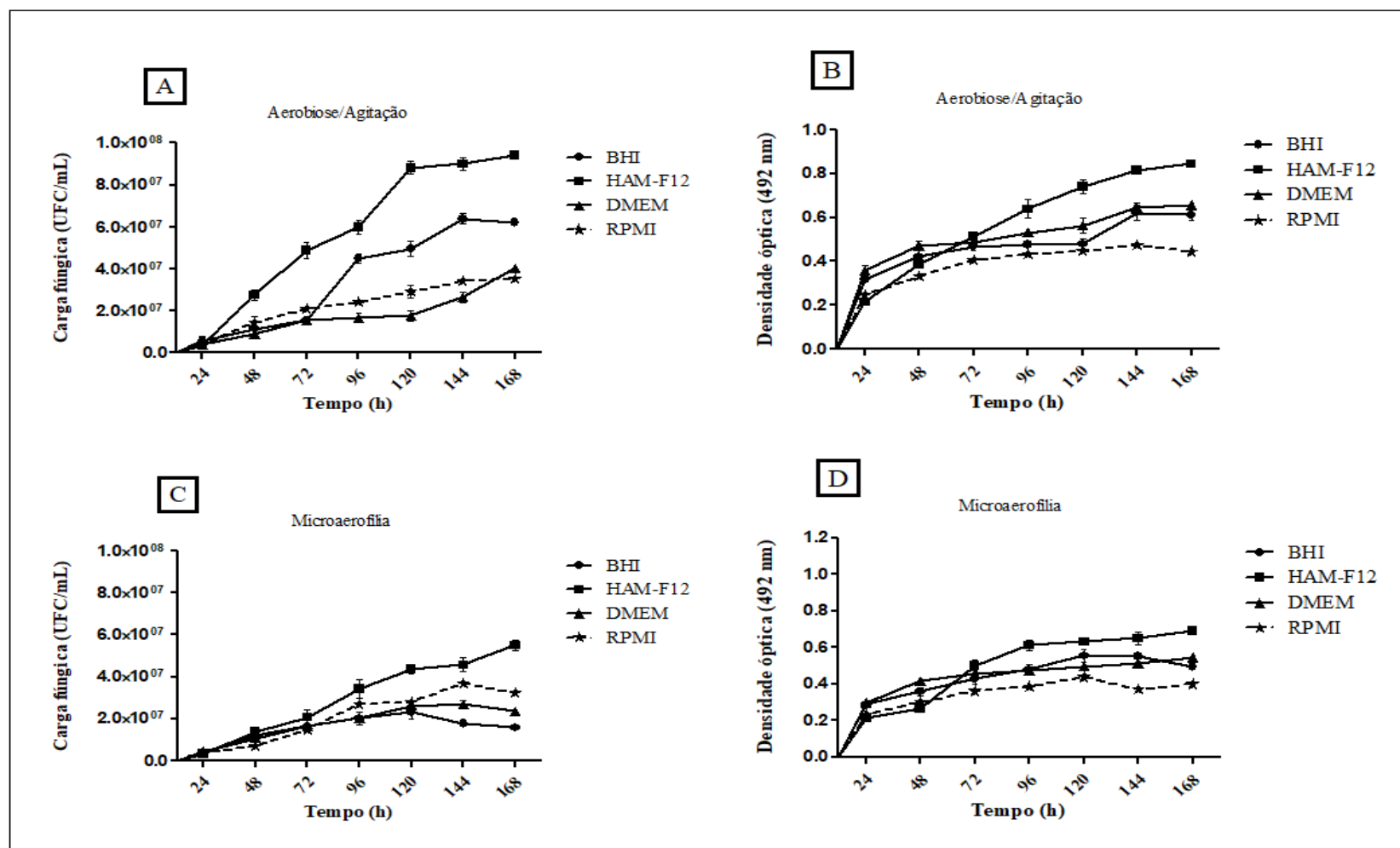


Figura 6. Viabilidade celular da cepa EH-315 de *H. capsulatum* com trypan blue nos meios BHI, HAM-F12, DMEM e RPMI nos tempos 24-168 horas em condição de microaerofilia (A) e aerobiose (B). O meio HAM-F12 foi o que propiciou maior viabilidade no tempo de 168 hrs nas duas condições quando comparado aos outros meios testados BHI DMEM e RPMI ($p<0,05$ e $p<0,01$), respectivamente.

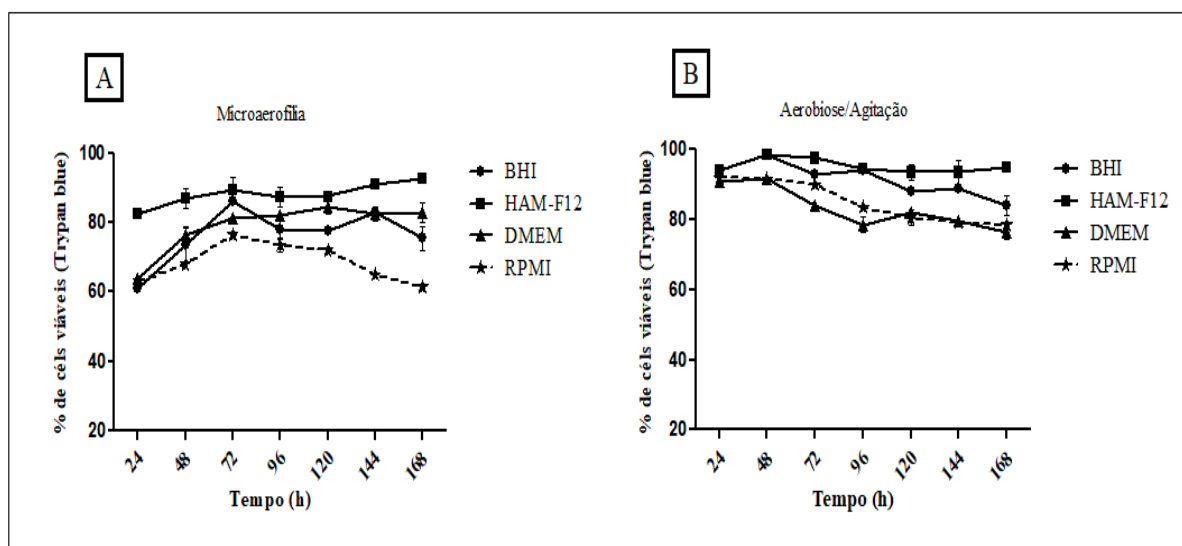
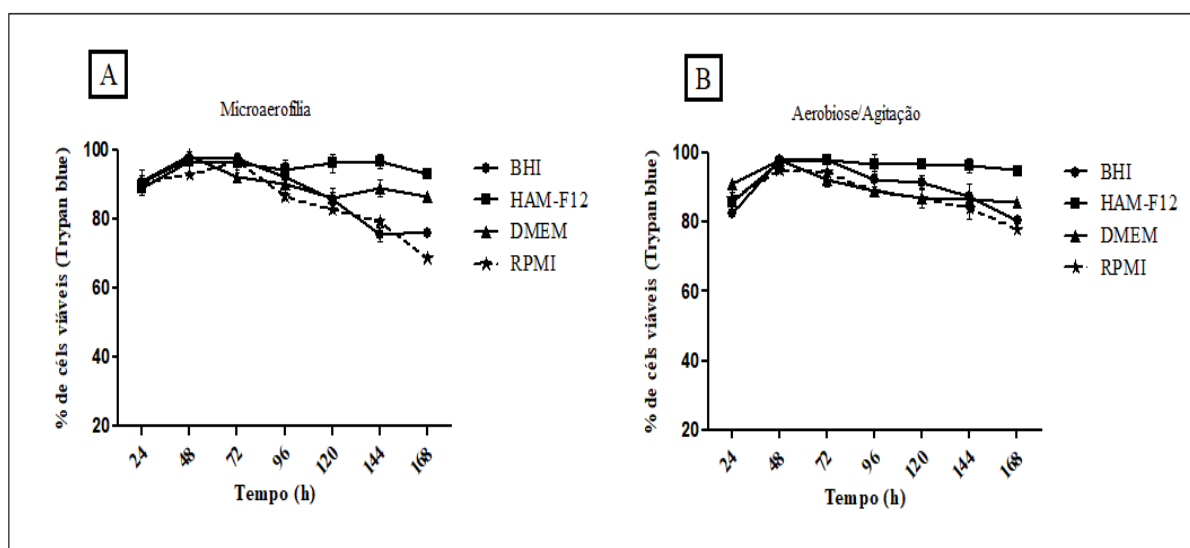


Figura 7. Viabilidade celular da cepa G186A de *H. capsulatum* com trypan blue nos meios BHI, HAM-F12, DMEM e RPMI nos tempos 24-168 horas em condição de microaerofilia (A) e aerobiose (B). O meio HAM-F12 foi o que propiciou maior viabilidade no tempo de 168 hrs nas duas condições quando comparado aos outros meios testados BHI DMEM e RPMI ($p<0,05$ e $p<0,001$), respectivamente.



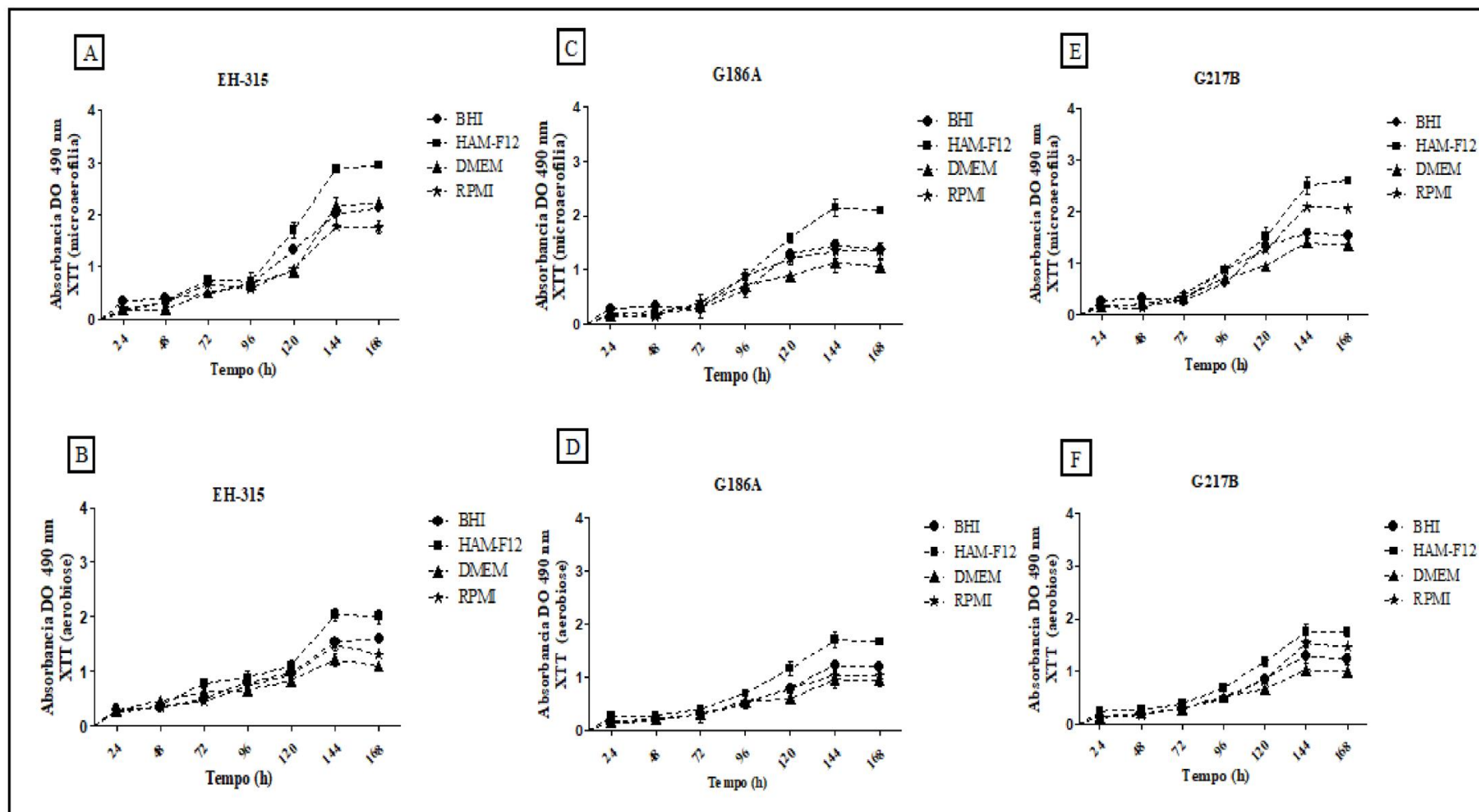
4.2. ENSAIOS DE FORMAÇÃO DOS BIOFILMES DE *H. capsulatum*

4.2.1. Determinação da viabilidade celular dos biofilmes pelo ensaio de redução do XTT

A cinética da viabilidade celular dos biofilmes formados em diferentes atmosferas de O₂ (aerobiose e microaerofilia) e em quatro meios de cultura (BHI, HAM-F12 DMEM e RPMI) pelas cepas EH-315, G186A e G217B é mostrada na **figura 8**. Os resultados indicaram um ligeiro aumento na viabilidade celular até 96 hrs de incubação para todas as cepas e na maioria das condições testadas [microaerofilia (**Figuras 8A, 8C e 8E**) e aerobiose (**Figuras 8B, 8D e 8F**)] e todos os meios de cultura. A partir desse momento, houve um aumento significativo na viabilidade celular, com crescimento exponencial até 144 hrs, seguido por uma tendência de estabilização e formação de um platô. Assim, o período de 144 hrs foi considerado o momento ideal para a maturação do biofilme em todos os meios de cultura e nas duas tensões de O₂. Estipulado o período de maturação (144 hrs), foi comparada a viabilidade celular dos biofilmes maduros em ambas as atmosferas de O₂. Para a cepa EH-315 (**Figura 8A**), a condição microaerofílica resultou em maior viabilidade celular de biofilmes maduros em todos os meios testados quando comparados à aerobiose ($p < 0,0001$). O mesmo foi observado para a cepa G186A com menor significância, nas comunidades sésseis formadas nos meios HAM-F12 e RPMI ($p < 0,01$) e BHI e DMEM ($p < 0,05$) (**Figura 8B**) e para a cepa G217B formadas nos meios HAM-F12 e RPMI ($p < 0,0001$) e DMEM ($p < 0,05$) (**Figura 8C**). No entanto, para essa mesma cepa, não foi observada significância estatística entre os biofilmes formados em ambas as condições de O₂ no meio BHI (**Figura 8C**).

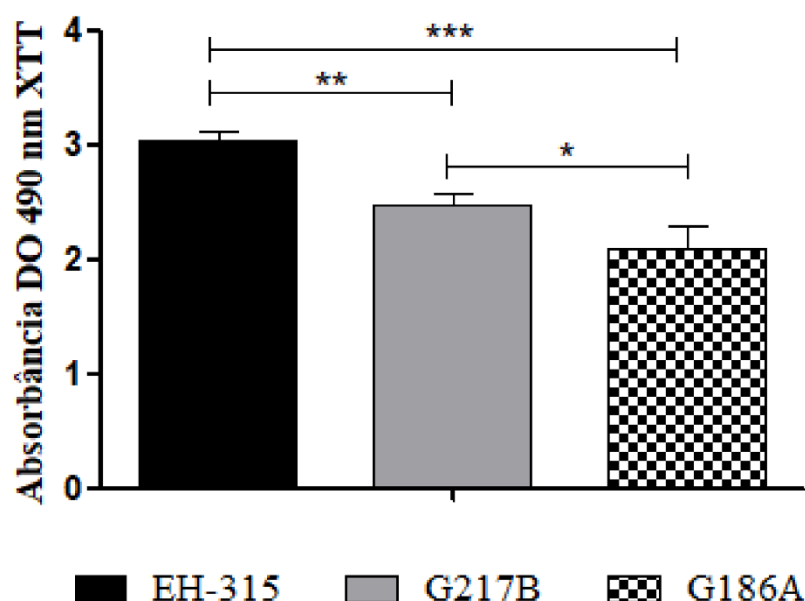
Em relação à condição de microaerofilia, o meio HAM-F12 estimulou maior viabilidade celular dos biofilmes de todas as cepas quando comparado ao meio BHI ($p < 0,01$ para a cepa EH 315 e para a cepa G186A; $p < 0,0001$ para a cepa G217B, DMEM ($p < 0,01$ para a cepa EH 315 e para a cepa G217B; $p < 0,0001$ para a cepa G186A) e RPMI ($p < 0,0001$ para a cepa EH 315 e para a cepa G186A; $p < 0,05$ para a cepa G217B (**Figuras 8A, 8C e 8E**).

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 tempo. Significância estatística: *p < 0,05.



No comparativo entre as cepas foi possível observar que G186A e G217B, formados em meio HAM-F12, tiveram viabilidade celular inferior quando comparadas a cepa EH-315 ($p<0.0001$ e $p<0.01$). O biofilme maduro da cepa G217B teve viabilidade celular superior a G186A ($p<0.05$) (Figura 9).

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*. Significância estatística: * $p<0,05$; ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$.



Os métodos colorimétricos para quantificação de biofilmes são estabelecidos na literatura e são amplamente utilizados para o estudo de biofilmes (WU et al., 2017; COSTA-ORLANDI et al., 2017). O teste de redução de XTT quantifica a viabilidade celular, para isso, as células metabolicamente ativas reduzem o sal de tetrazólio (amarelo) ao sal de formazano (laranja) (JIANG et al., 2016; CEN et al., 2018). Estudos cinéticos do desenvolvimento de biofilme pelo ensaio de XTT mostraram uma maturação de 48 hrs para *C. neoformans* (MARTINEZ; CASADEVALL, 2007), 24 hrs para *Candida spp.* (CHANDRA et al., 2001; RAMAGE et al., 2001; MUKHERJEE, 2001; BIZERRA; NAKAMURA; POERSCH, 2008; KEAN et al., 2018), 72 hrs para *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* (COSTA-ORLANDI et al., 2014) e *A. fumigatus* (BEAUVAIS; LATGÉ, 2015) e 144 hrs para *P. brasiliensis* (SARDI et al., 2015). O tempo de maturação dos biofilmes nas três cepas de *H. capsulatum*, formado neste estudo durou 144 hrs para todos os meios de cultura e atmosfera de O₂ testados. O teste XTT também demonstrou uma maior viabilidade celular para biofilmes formados pela cepa

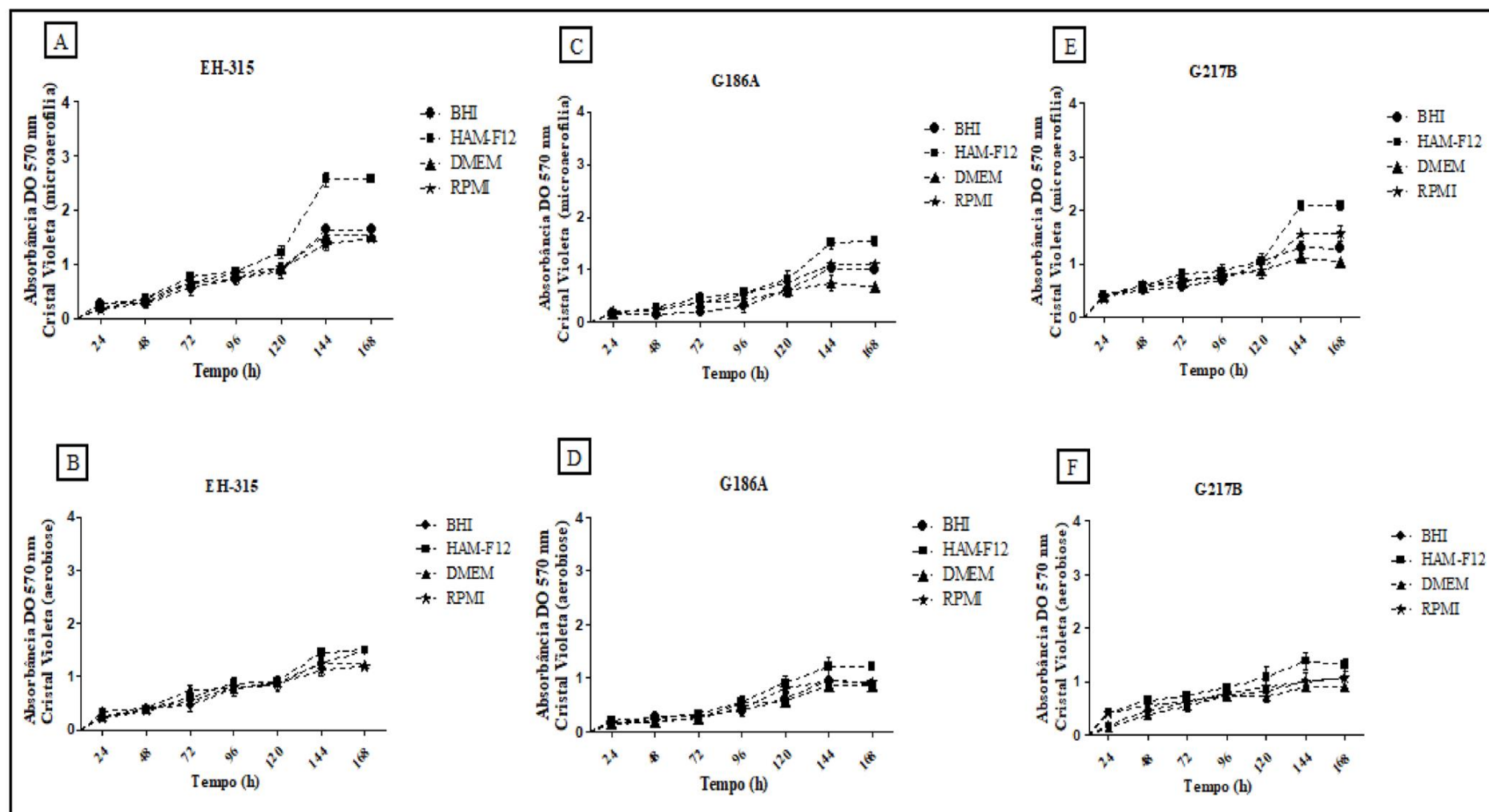
EH-315 e na condição de microaerofilia. Além disso, o meio HAM-F12 apresentou maior quantidade de células metabolicamente ativas. Muitos autores assumem que esse ensaio é uma maneira eficiente de quantificar biofilmes, entretanto, é preciso considerar a presença da matriz extracelular envolvendo o biofilme, que pode limitar o acesso de nutrientes e O₂ às células, podendo possivelmente causar alterações metabólicas, sendo essencial realizar outros testes para a caracterização completa (MARCOS-ZAMBRANO et al., 2014; ROSATO et al., 2016).

4.2.2. Quantificação da biomassa por coloração com Cristal Violeta

A cinética do desenvolvimento de biomassa em diferentes meios e atmosferas de O₂ está representada na **figura 10**. Todas as cepas EH-315 (**Figuras 10A e 10B**), G186A (**Figuras 10C e 10D**) e G217B (**Figuras 10E e 10F**), em todas as condições testadas (diferentes meios e atmosfera de O₂) mostram desenvolvimento de biomassa semelhante até o período de 120 hrs. A quantidade de biomassa continuou a crescer relativamente exponencialmente até 144 hrs. Após esse período (144 hrs), atinge um platô que corrobora os resultados da viabilidade celular, reforçando esse tempo como ideal para a maturação dos biofilmes de *H. capsulatum*. Os resultados da influência das atmosferas de O₂ na formação da massa de biofilmes maduros também são mostrados na **figura 10**. A incubação em microaerofilia proporcionou maior formação de biomassa para todas as cepas nos meios HAM-F12 ($p < 0.0001$). Para os demais meios, a condição de microaerofilia foi ligeiramente maior ($p < 0.05$) ou semelhante à aerobiose.

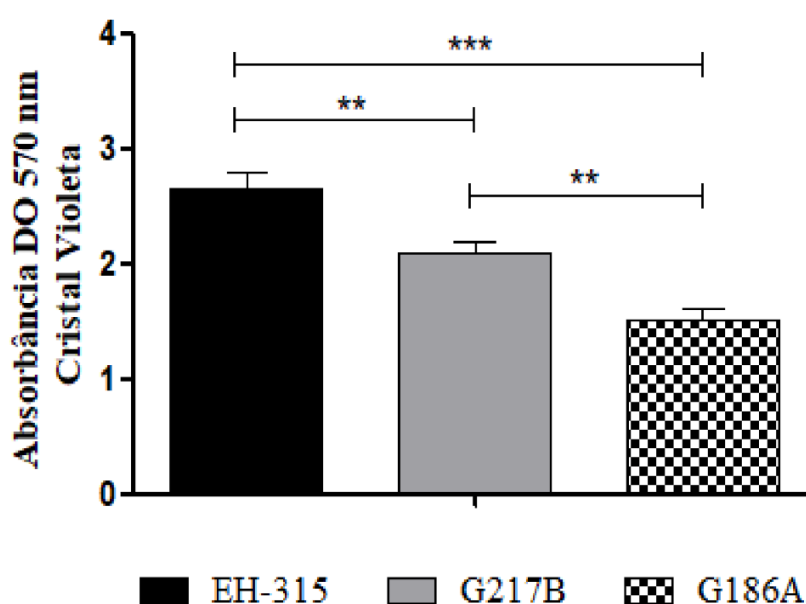
A influência dos meios nas biomassas produzidas pelos biofilmes das diferentes cepas de *H. capsulatum* em condições de microaerofilia, também foi verificada individualmente para cada cepa (**Figuras 10A, 10C e 10E**). Observou-se que o meio HAM-F12 para todas as cepas foi o que estimulou maior desenvolvimento da biomassa quando comparado aos demais ($p < 0.01$ e < 0.0001). Os resultados da quantificação da biomassa são consistentes com os encontrados na quantificação da viabilidade celular, comprovando principalmente a eficiência do meio HAM-F12 na formação do biofilme.

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. Significância estatística * $p < 0,05$.



A comparação das biomassas produzidas pelos biofilmes maduros formados em microaerofilia e no meio HAM-F12 pelas diferentes cepas são mostrados na **figura 11**. Observa-se que as cepas G217B e G186A produziram menor quantidade de biomassa quando comparadas a EH-315 ($p < 0.01$ e $p < 0.0001$). A biomassa produzida pela cepa G217B foi superior a G186A ($p < 0.01$).

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*. Significância estatística: ** $p < 0,01$ e * $p < 0,001$.



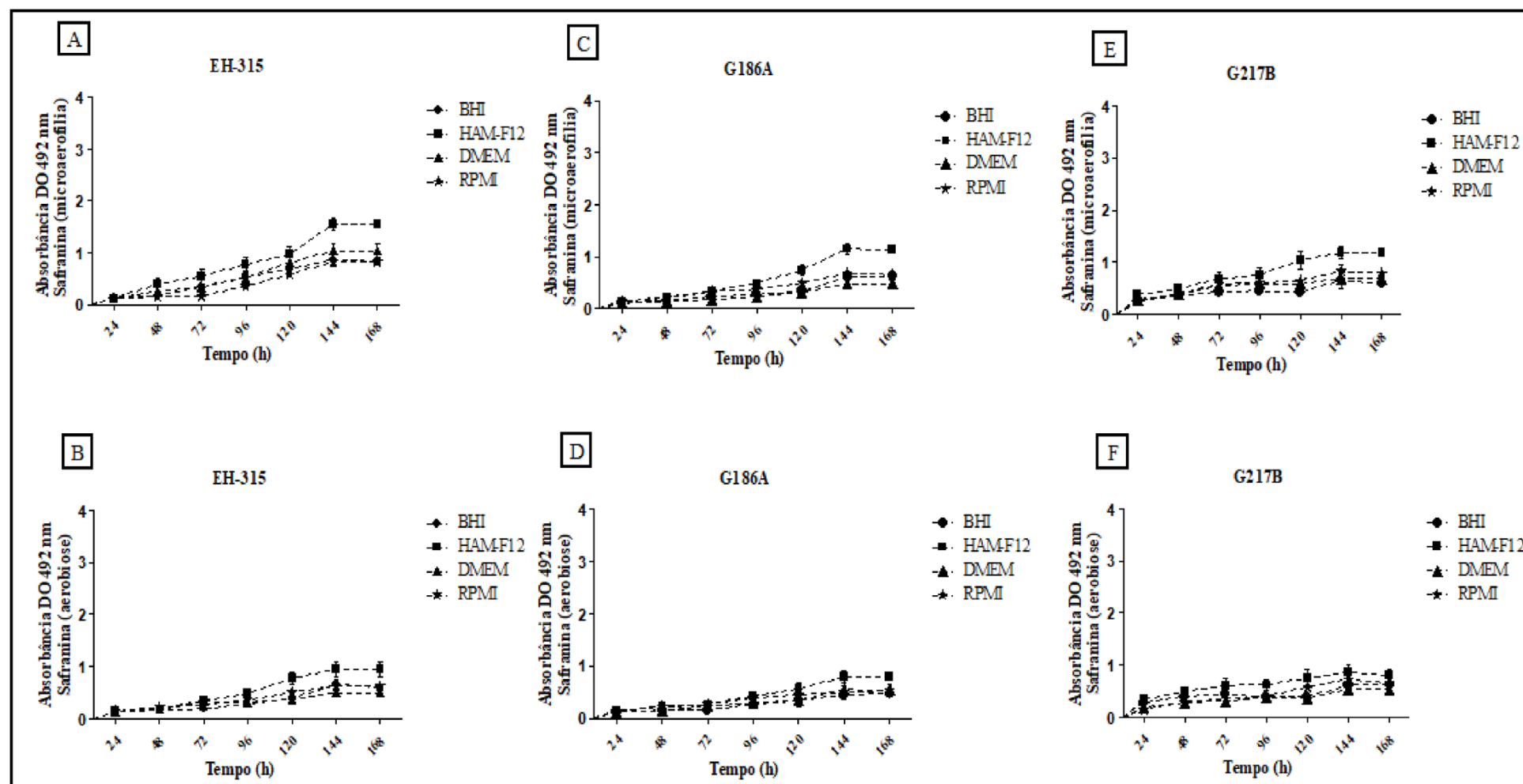
Os resultados obtidos na quantificação da biomassa pelo teste de cristal violeta mostraram uma fase estacionária no desenvolvimento da biomassa após 144 hrs e maior quantidade de massa em biofilmes formados pela cepa EH-315 no meio HAM-F12 e na condição de microaerofilia, mostrando concordância no que foi observado no ensaio XTT. O cristal violeta é um corante que se liga às moléculas carregadas negativamente da superfície do biofilme e aos polissacarídeos da matriz extracelular e é amplamente utilizado em biofilmes bacterianos e fúngicos (COSTA-ORLANDI et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2018; XU et al., 2019). Basicamente, é um ensaio capaz de quantificar a biomassa total. No entanto, a quantificação não faz diferença entre células mortas e vivas (PEETERS; NELIS; COENYE, 2008; XU et al., 2016).

4.2.3. Quantificação da matriz extracelular e estruturas polissacarídicas por coloração com Safranina

A matriz extracelular e o material polissacarídeo produzido pelos biofilmes foram quantificados pelo método de coloração com safranina. Padrões de crescimento semelhantes foram observados nos resultados anteriores dos itens 5.3.1 e 5.3.2: há um ligeiro crescimento até 144 hrs seguido de um período estacionário (**Figura 12**).

Ao verificar a influência da tensão de O_2 no desenvolvimento da matriz e do material polissacarídico dos biofilmes maduros, observou-se que ambas as tensões de O_2 proporcionaram produção extracelular significativa da matriz. Entretanto, quando comparada, a atmosfera com menor concentração de O_2 proporcionou melhor formação de material polissacarídico em relação à atmosfera com alta concentração de O_2 ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,0001$) (**Figura 12**). Quanto à influência do meio de cultura, biofilmes formados no meio HAM-F12 produziu mais matrizes extracelulares quando comparado às demais ($p < 0,01$).

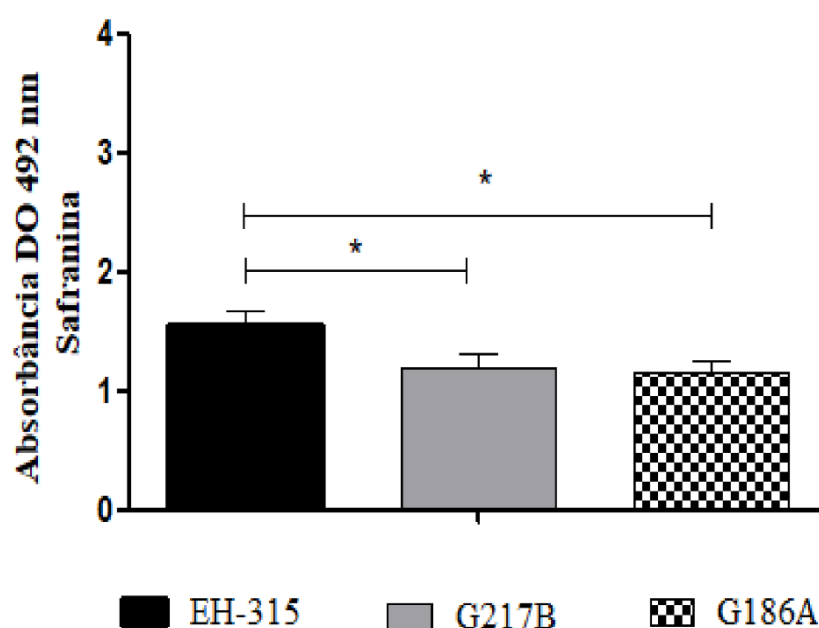
Figura 12. Cinética da quantidade de matriz extracelular e estruturas polissacarídicas produzidas pelos biofilmes das diferentes cepas de *H. capsulatum*: **(AB)** EH-315, **(CD)** G186A e **(EF)** G217B e em diferentes condições: **(ACE)** biofilme formado em microaerofilia e **(BDF)** em aerobiose, em função do tempo. Significância estatística: * $p < 0,05$.



No comparativo entre as cepas foi possível observar que a cepa EH-315 produziu mais material polissacarídico que G217B e G186A ($p < 0,05$) (**Figura 13**).

Em relação à safranina, os resultados complementam e reafirmam o que foi observado nos testes de caracterização descritos acima (XTT e cristal violeta). O ensaio de coloração de safranina é baseado no mesmo princípio que o cristal violeta, mas cora apenas a matriz extracelular e os polissacarídeos celulares (STIEFEL et al., 2016; OMMEN; ZOBK; MEYER, 2017). Estudos anteriores demonstraram a eficiência da coloração de safranina na quantificação de biofilmes de espécies de *Candida*, *Aspergillus* e dermatófitos (SEIDLER; SALVENMOSER; MULLER; 2006, 2008, COSTA-ORLANDI et al., 2014; RAMOS et al. 2017).

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*. Significância estatística: $*p < 0,05$.



4.2.4. Análise morfológica dos biofilmes formados em diferentes meios

As cinéticas de desenvolvimento dos biofilmes das cepas EH-315, G186A e G217B de *H. capsulatum* também foram avaliadas por meio de microscopia óptica (magnificação de 10X), em diferentes intervalos de tempo, utilizando o equipamento *In Cell Analyzer 2000* (GE Healthcare). As **figuras 14, 15, 16 e 17** mostram que as leveduras da cepa EH-315 (**Figuras 14 e 15**), bem como da cepa G186A (**Figuras 16 e 17**) foram capazes de aderir ao fundo das microplacas de poliestireno e formar biofilmes nos meios BHI, HAM-F12, DMEM e RPMI.

O mesmo foi observado nas **figuras 18 e 19** para os biofilmes formados pela cepa G217B. Observa-se uma biomassa consolidada em todas as condições testadas a partir de 144 hrs de incubação, no entanto, essa massa é mais intensa nas placas incubadas em condição de microaerofilia. Esses resultados corroboram com os exibidos na quantificação dos biofilmes, que apontam maior quantidade de células metabolicamente ativas, produção de biomassa e matriz extracelular nessas condições.

Figura 14. Análise morfológica dos biofilmes da cepa EH-315 de *H. capsulatum* em microaerofilia no equipamento *In Cell Analyzer* (GE Healthcare). a à g= Morfologia do biofilme no meio BHI no período de 144h à 168h; h à n= Morfologia do biofilme no meio HAM-F12 no período de 24h à 168h; o à u= Morfologia do biofilme no meio DMEM no período de 24h à 168h; v à 3a= Morfologia do biofilme no meio RPMI no período de 24h à 168h. As escalas de barras correspondem a 70µm.

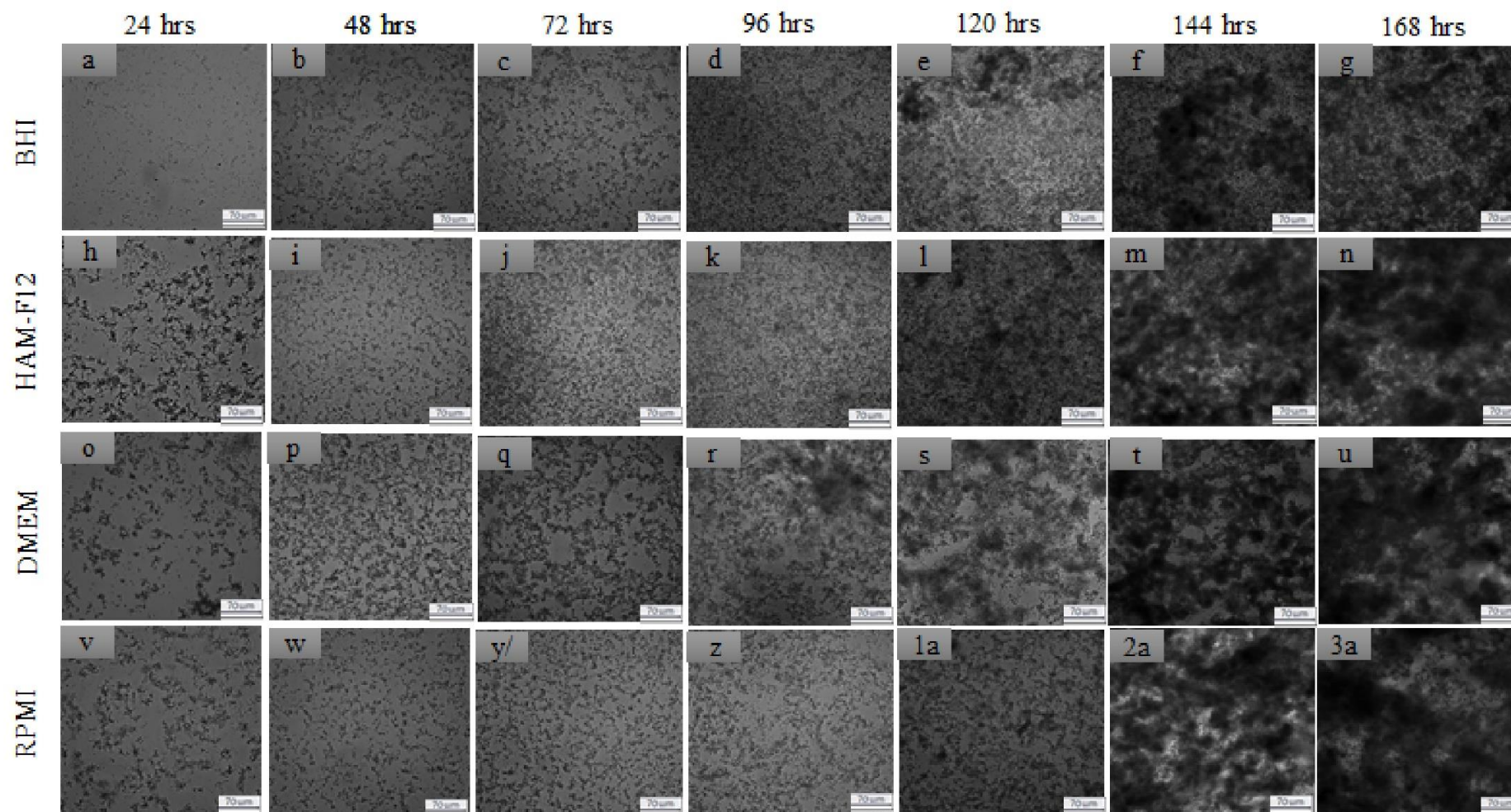


Figura 15. Análise morfológica dos biofilmes da cepa EH-315 de *H. capsulatum* em aerobiose no equipamento *In Cell Analyzer* (GE Healthcare). a à g= Morfologia do biofilme no meio BHI no período de 24h à 168h; h à n= Morfologia do biofilme no meio HAM-F12 no período de 24h à 168h; o à u= Morfologia do biofilme no meio DMEM no período de 24h à 168h; v à 3a= Morfologia do biofilme no meio RPMI no período de 24h à 168h. As escalas de barras correspondem a 70µm.

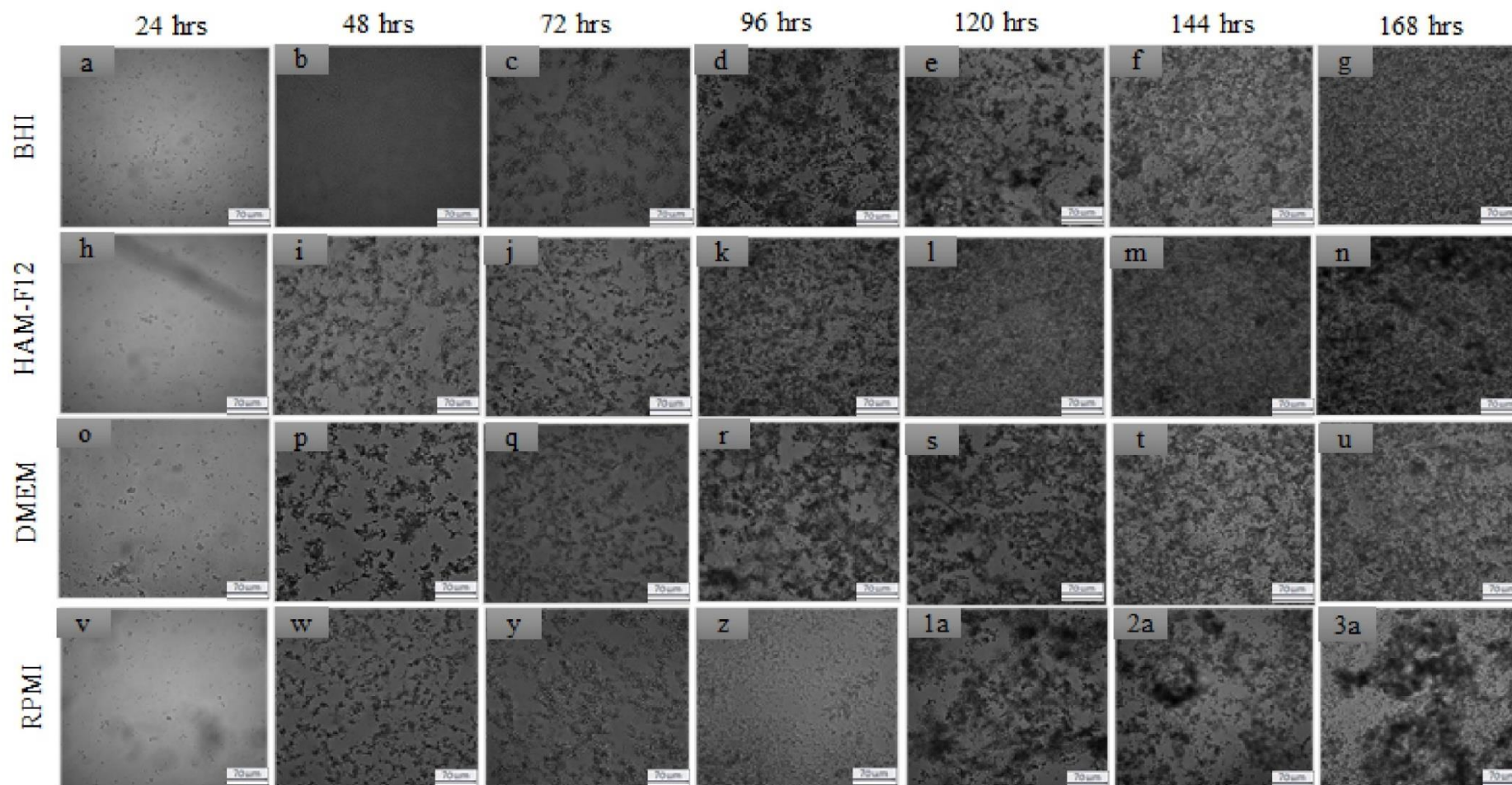


Figura 16. Análise morfológica dos biofilmes da cepa G186A de *H. capsulatum* em microaerofilia no equipamento *In Cell Analyzer* (GE Healthcare). a à g= Morfologia do biofilme no meio BHI no período de 24h à 168h; h à n= Morfologia do biofilme no meio HAM-F12 no período de 24h à 168h; o à u= Morfologia do biofilme no meio DMEM no período de 24h à 168h; v à 3a= Morfologia do biofilme no meio RPMI no período de 24h à 168h. As escalas de barras correspondem a 70µm.

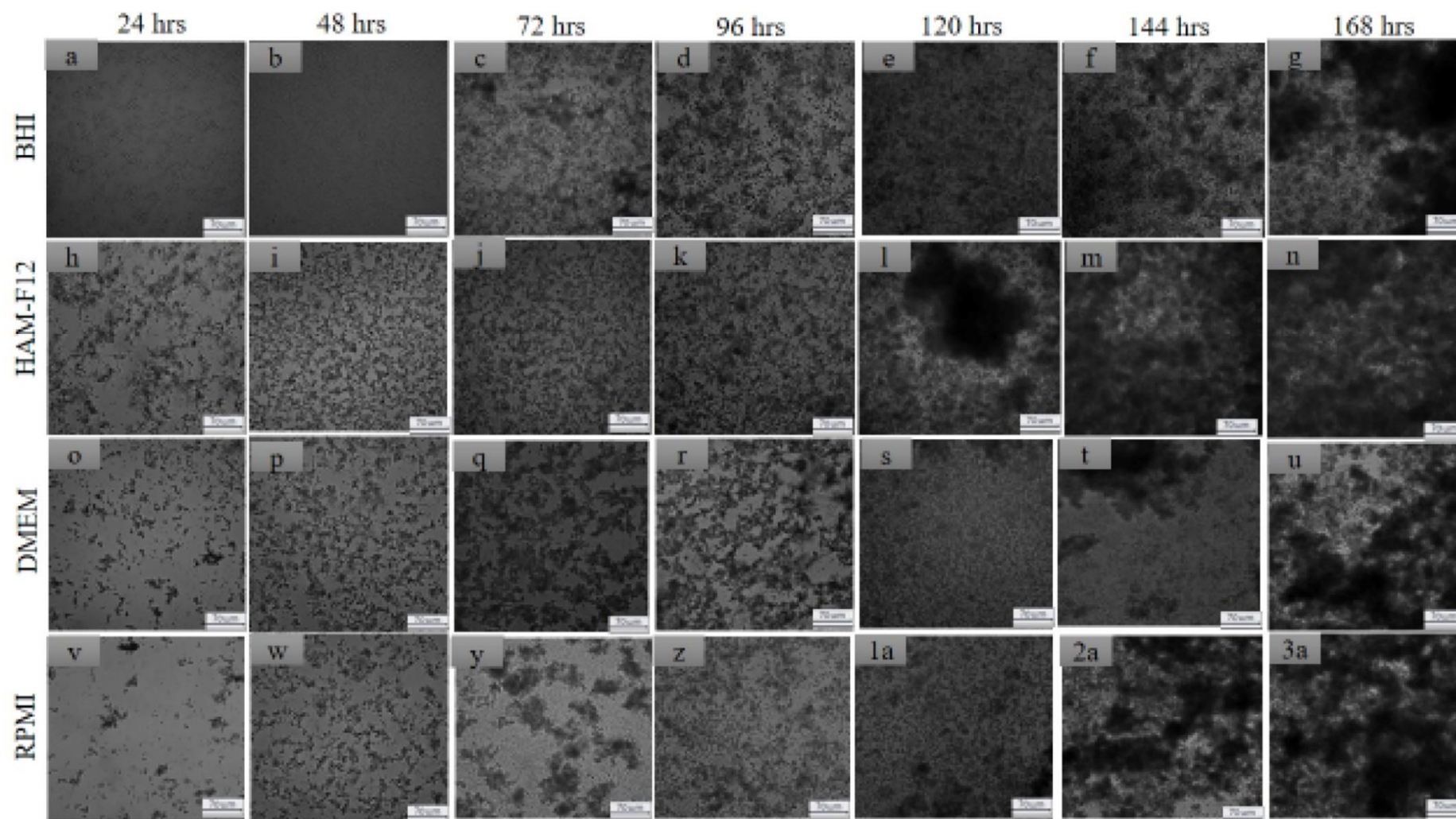


Figura 17. Análise morfológica dos biofilmes da cepa G186A de *H. capsulatum* em aerobiose no equipamento *In Cell Analyzer* (GE Healthcare). a à g= Morfologia do biofilme no meio BHI no período de 24h à 168h; h à n= Morfologia do biofilme no meio HAM-F12 no período de 24h à 168h; o à u= Morfologia do biofilme no meio DMEM no período de 24h à 168h; v à 3a= Morfologia do biofilme no meio RPMI no período de 24h à 168h. As escalas de barras correspondem a 70µm.

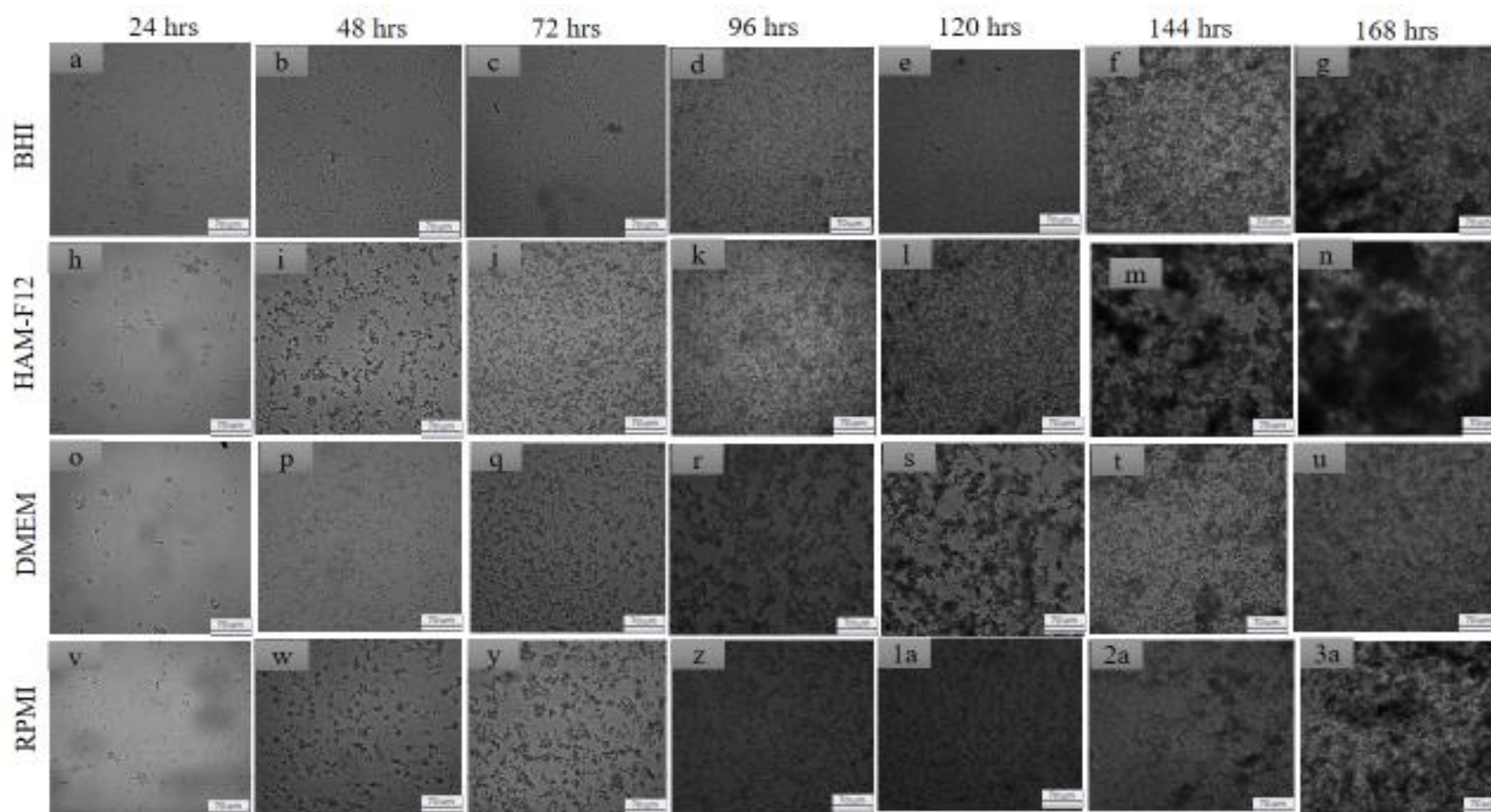


Figura 18. Análise morfológica dos biofilmes da cepa G217B (GFP) de *H. capsulatum* em microaerofilia no equipamento *In Cell Analyzer* (GE Healthcare). a à g= Morfologia do biofilme no meio BHI no período de 24h à 168h; h à n= Morfologia do biofilme no meio HAM-F12 no período de 24h à 168h; o à u= Morfologia do biofilme no meio DMEM no período de 24h à 168h; v à 3a= Morfologia do biofilme no meio RPMI no período de 24h à 168h. As escalas de barras correspondem a 70µm.

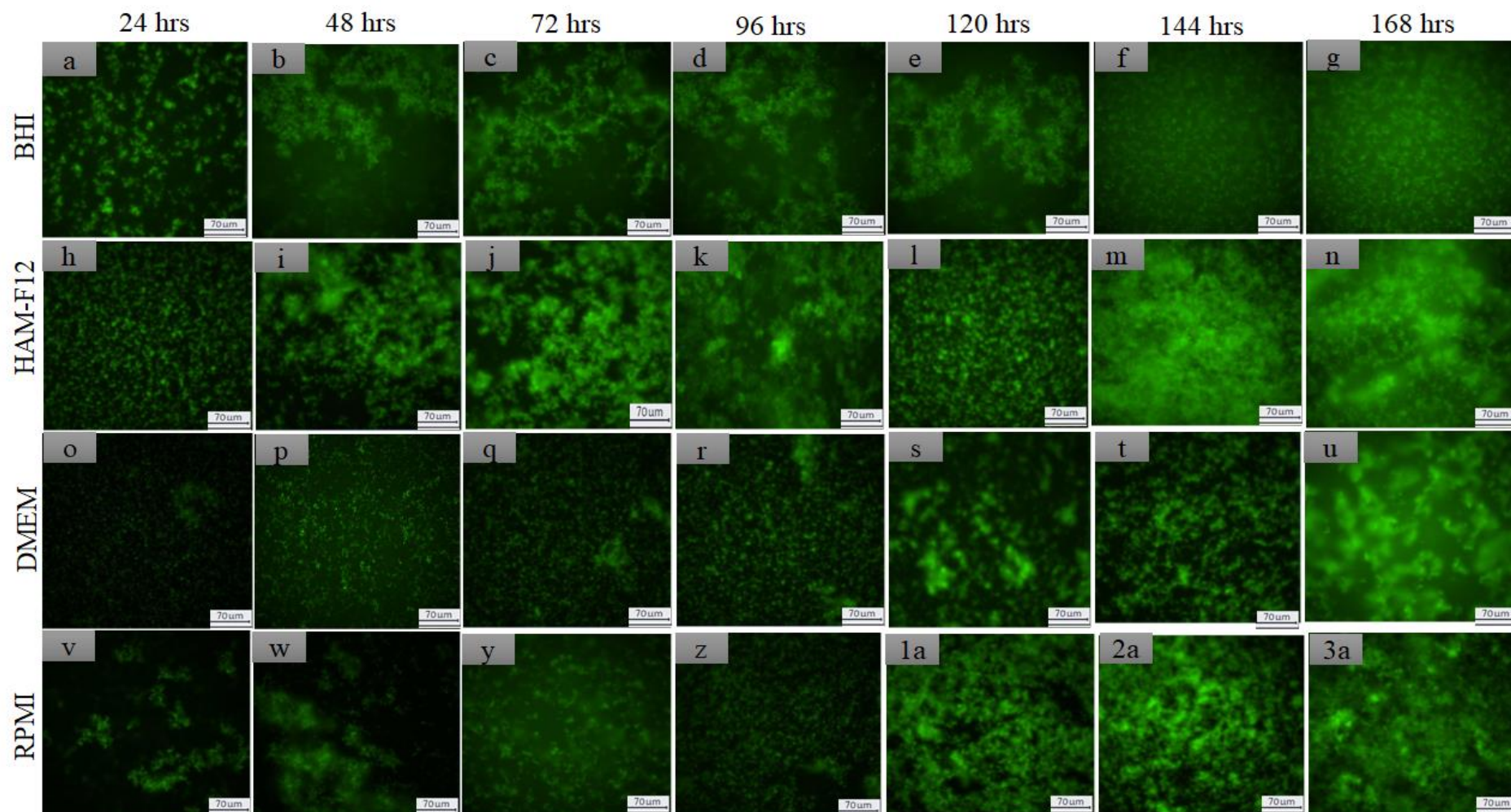
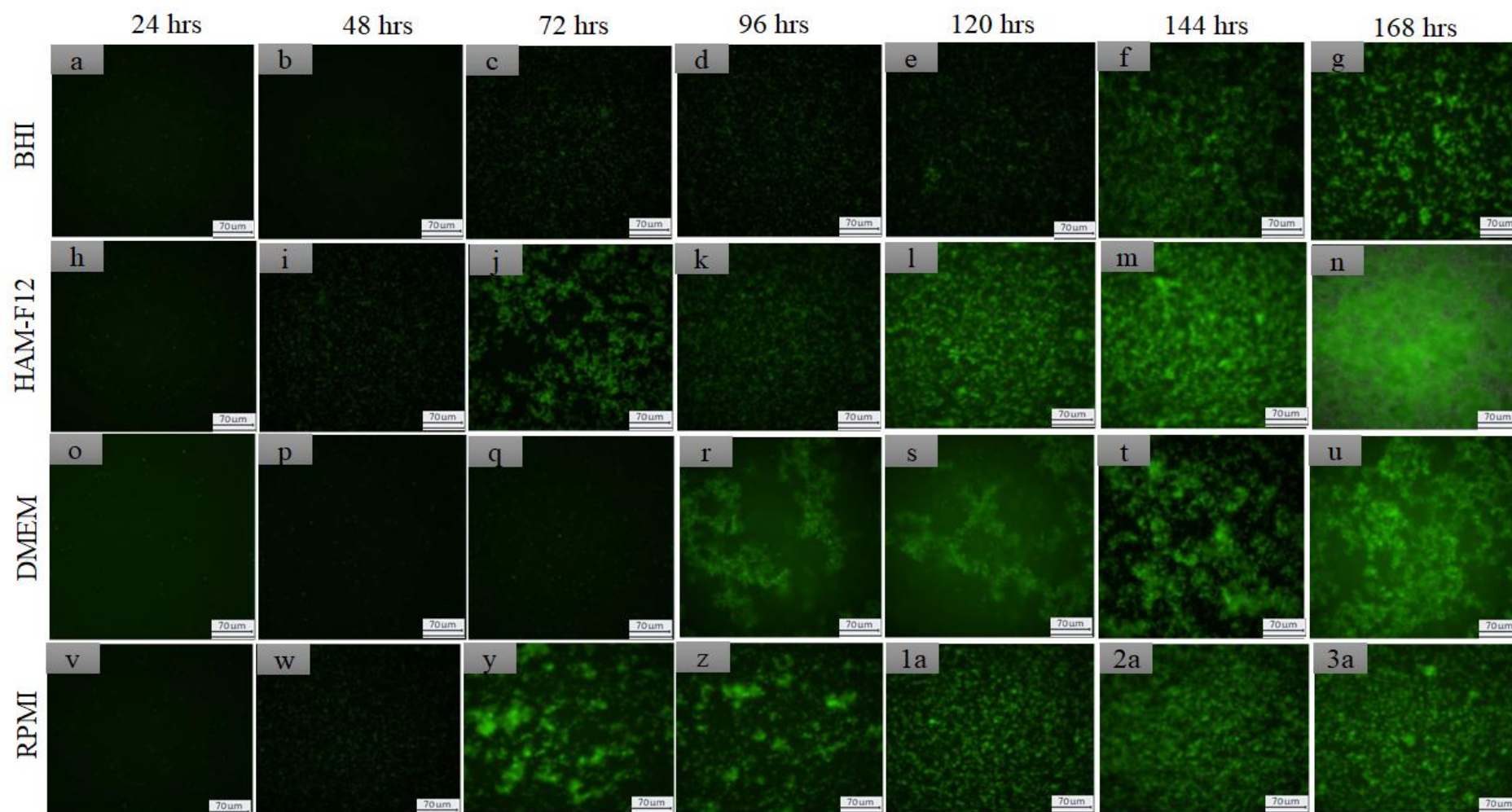


Figura 19. Análise morfológica dos biofilmes da cepa G217B (GFP) de *H. capsulatum* em aerobiose no equipamento *In Cell Analyzer* (GE Healthcare). a à g= Morfologia do biofilme no meio BHI no período de 24h à 168h; h à n= Morfologia do biofilme no meio HAM-F12 no período de 24h à 168h; o à u= Morfologia do biofilme no meio DMEM no período de 24h à 168h; v à 3a= Morfologia do biofilme no meio RPMI no período de 24h à 168h. As escalas de barras correspondem a 70µm.



4.2.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos biofilmes formados em diferentes meios

As topografias dos biofilmes maduros da cepa EH-315, G186A e da cepa G217B formados em meio BHI, HAM-F12, DMEM e RPMI e em diferentes atmosferas de O₂ foram observadas através de microscopia eletrônica de varredura. Para todas as cepas, os resultados da MEV foram concordantes com os resultados anteriores no que diz respeito à biomassa e à produção de MEC. A **figura 20** representa o biofilme maduro da cepa EH-315 formado no meio BHI, sob condição de microaerofilia. Observou-se uma biomassa compacta, formada por leveduras cobertas por grande quantidade de uma matriz extracelular densa, dando muitas vezes, um aspecto enrugado à levedura (**A**, **C** e **E**). Foi observado também a presença de grande quantidade de hifas (**F**), que não foram possíveis de serem visualizadas por microscopia óptica devido à massa densa de microrganismos. A mesma descrição pode ser aplicada para os biofilmes maduros da cepa EH-315 formados nos meios DMEM (**Figura 22**) e RPMI (**Figura 23**). A **figura 21** representa o biofilme maduro da mesma cepa formado no meio HAM-F12. Diferentemente dos biofilmes formados nos demais meios, observou-se ausência de hifas e grande quantidade de biomassa, formada por leveduras cobertas por matriz extracelular. Em microaerofilia, os quatro meios pareceram ótimos para a formação de biofilme por essa cepa, produzindo uma biomassa compacta e satisfatória e material polissacarídeo em grande quantidade.

Figura 20. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa EH-315 formado em meio BHI sob condição de microaerofilia. As setas brancas indicam uma biomassa compacta formada por leveduras cobertas por grande quantidade de matriz extracelular densa, dando muitas vezes um aspecto enrugado à leveduras, enquanto as setas vermelhas indicam algumas hifas.

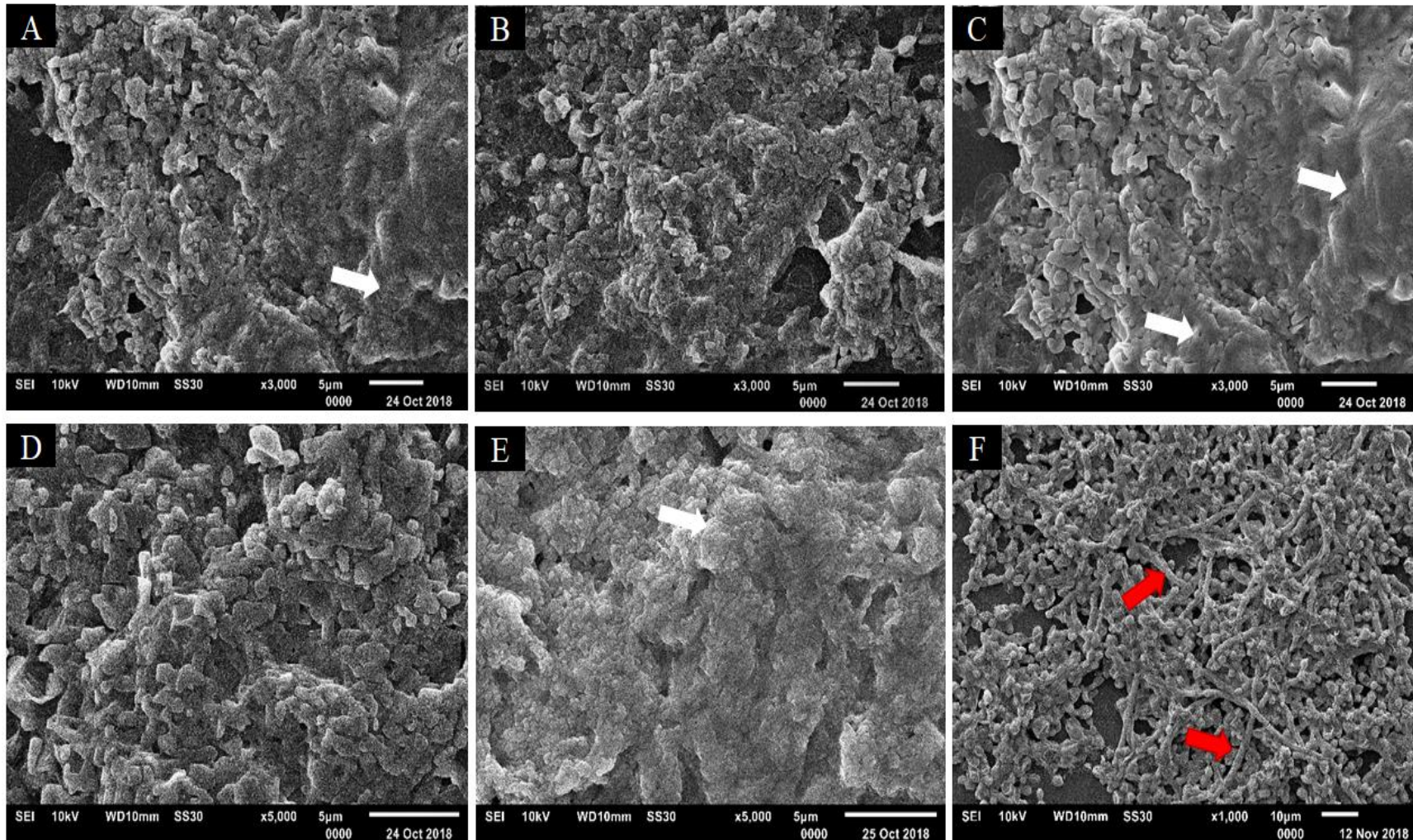


Figura 21. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa EH-315 formado em meio HAM-F12 sob condição de microaerofilia. As setas brancas indicam grande quantidade de biomassa formado por leveduras cobertas por matrizes extracelulares. Nota-se ausência de hifas.

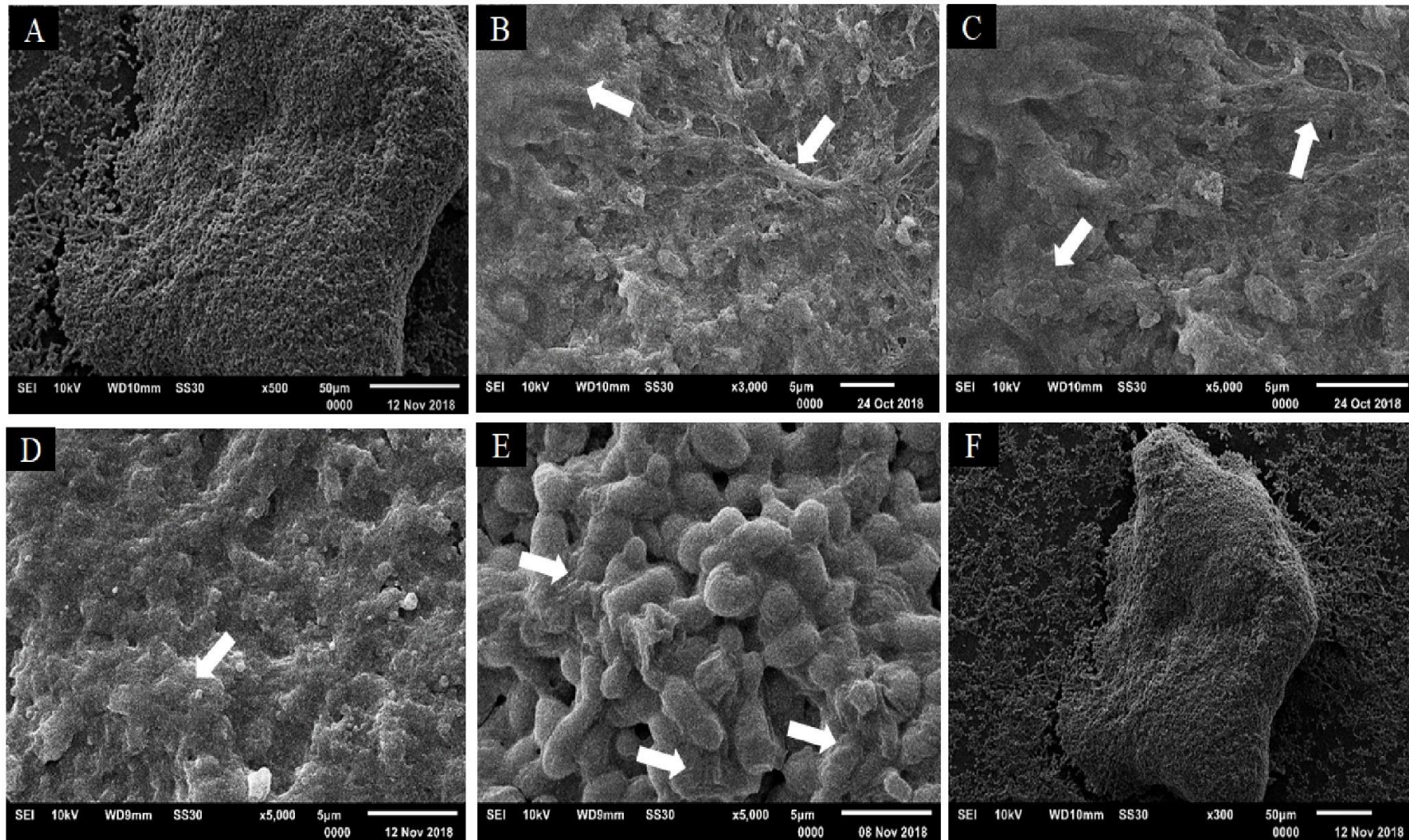


Figura 22. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa EH-315 formado em meio DMEM sob condição de microaerofilia. As setas brancas indicam uma biomassa compacta, grande quantidade de uma matriz extracelular densa recobrindo e leveduras, e as setas vermelhas apontam as hifas.

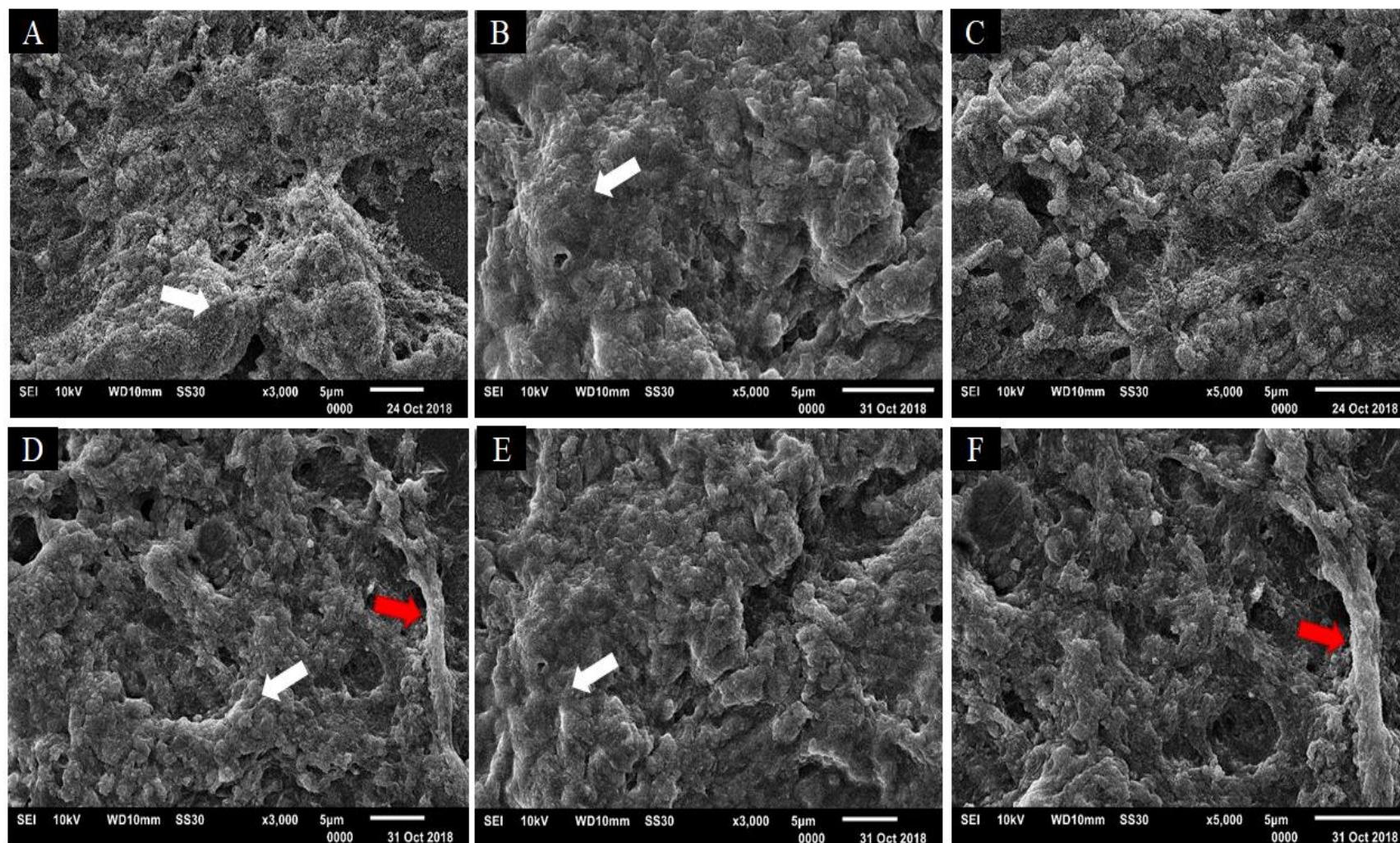
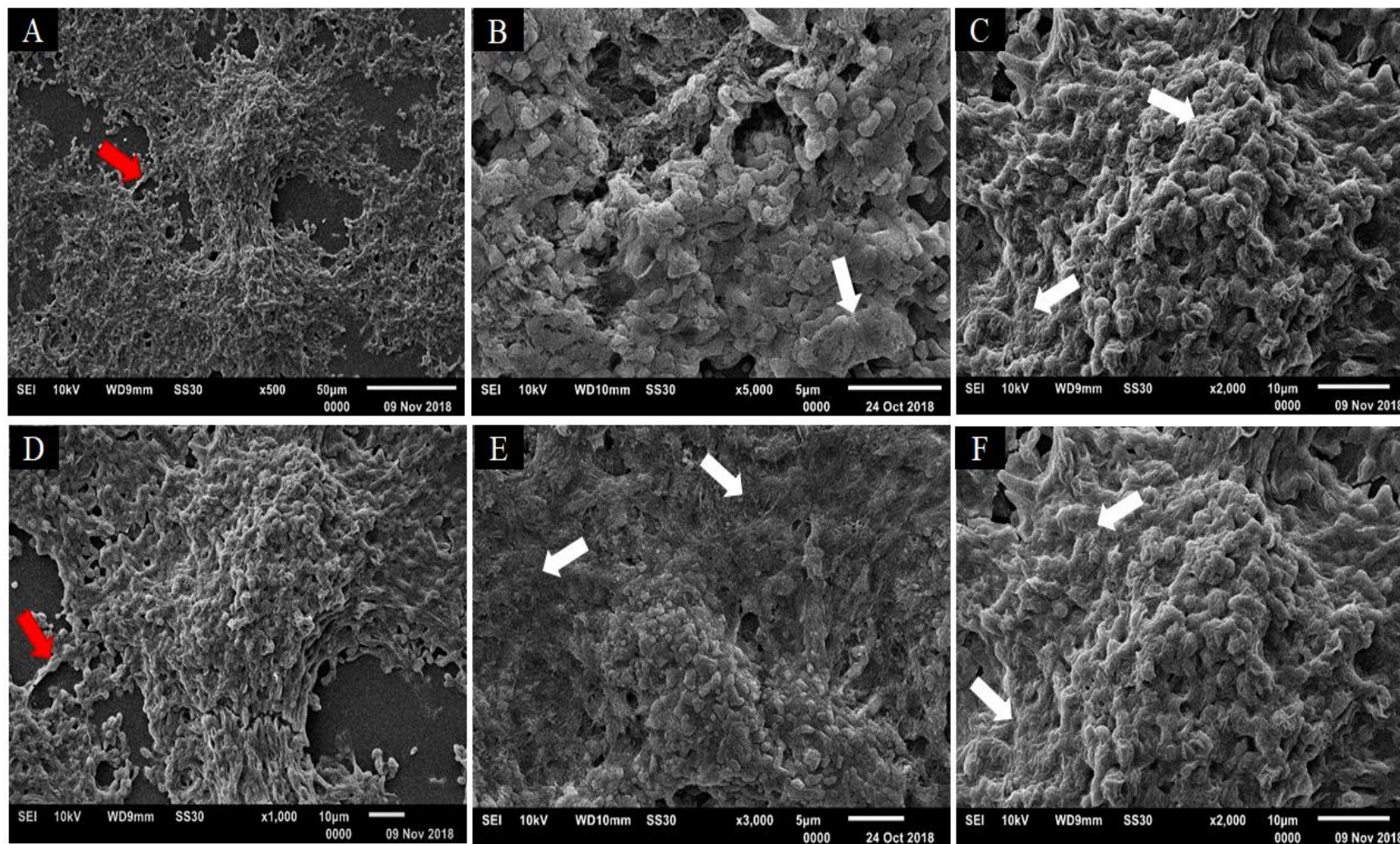


Figura 23. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa EH-315 formado em meio RPMI sob condição de microaerofilia. As setas brancas indicam a matriz extracelular dando muitas vezes, um aspecto enrugado à levedura e as setas vermelhas indicam algumas hifas recobertas pelas matrizes.



As **figuras 24 a 27** representam os biofilmes maduros da cepa EH-315 sob condição de aerobiose, formados nos meios BHI, HAM-F12, DMEM e RPMI, respectivamente. Nota-se também, nos quatro meios, a formação de uma biomassa compacta e a presença de material polissacarídico cobrindo as leveduras e hifas.

Figura 24. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme da cepa EH-315 formado em meio BHI sob condição de aerobiose. Nota-se a presença de hifas presas ao material polissacarídico apontadas pelas setas vermelhas. As setas brancas apontam a matriz extracelular densa, dando um aspecto enrugado às hifas.

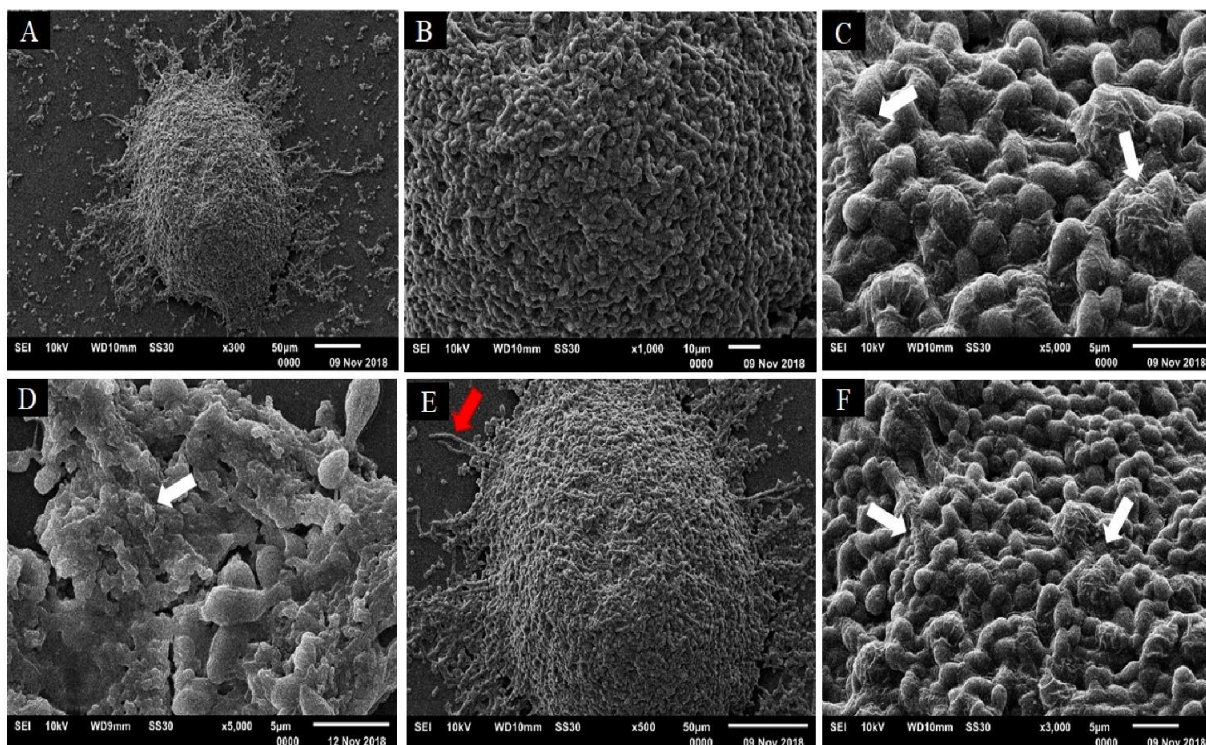


Figura 25. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme da cepa EH-315 formado em meio HAM-F12 sob condição de aerobiose. As setas brancas apontam grande quantidade de biomassa compacta e matriz extracelular densa. Nota-se a presença de hifas presas ao material polissacarídico apontadas pelas setas vermelhas.

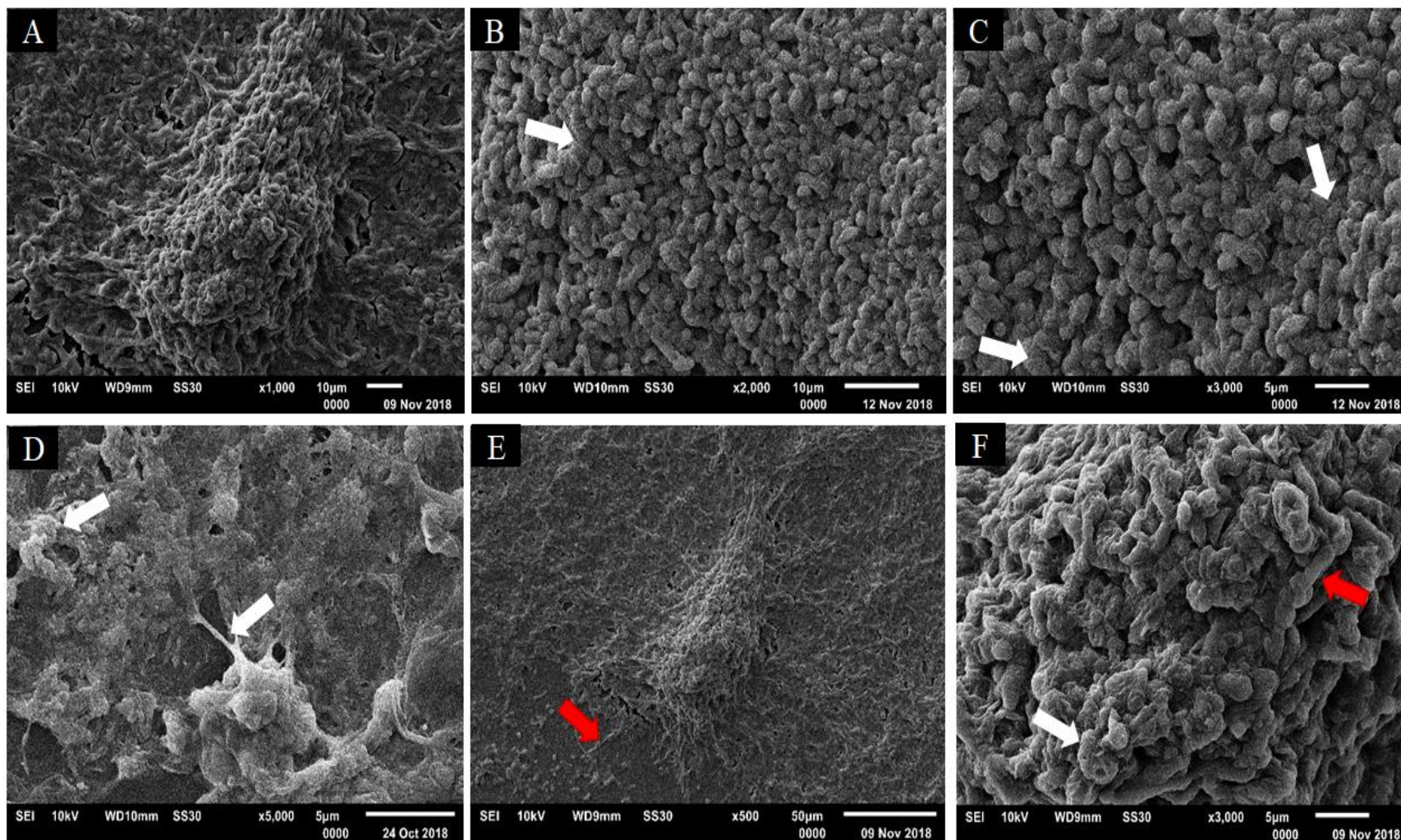


Figura 26. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme da cepa EH-315 formado em meio DMEM sob condição de aerobiose. As setas brancas apontam grande quantidade de matriz extracelular recobrindo hifas e leveduras, enquanto as setas vermelhas indicam a presença de algumas hifas.

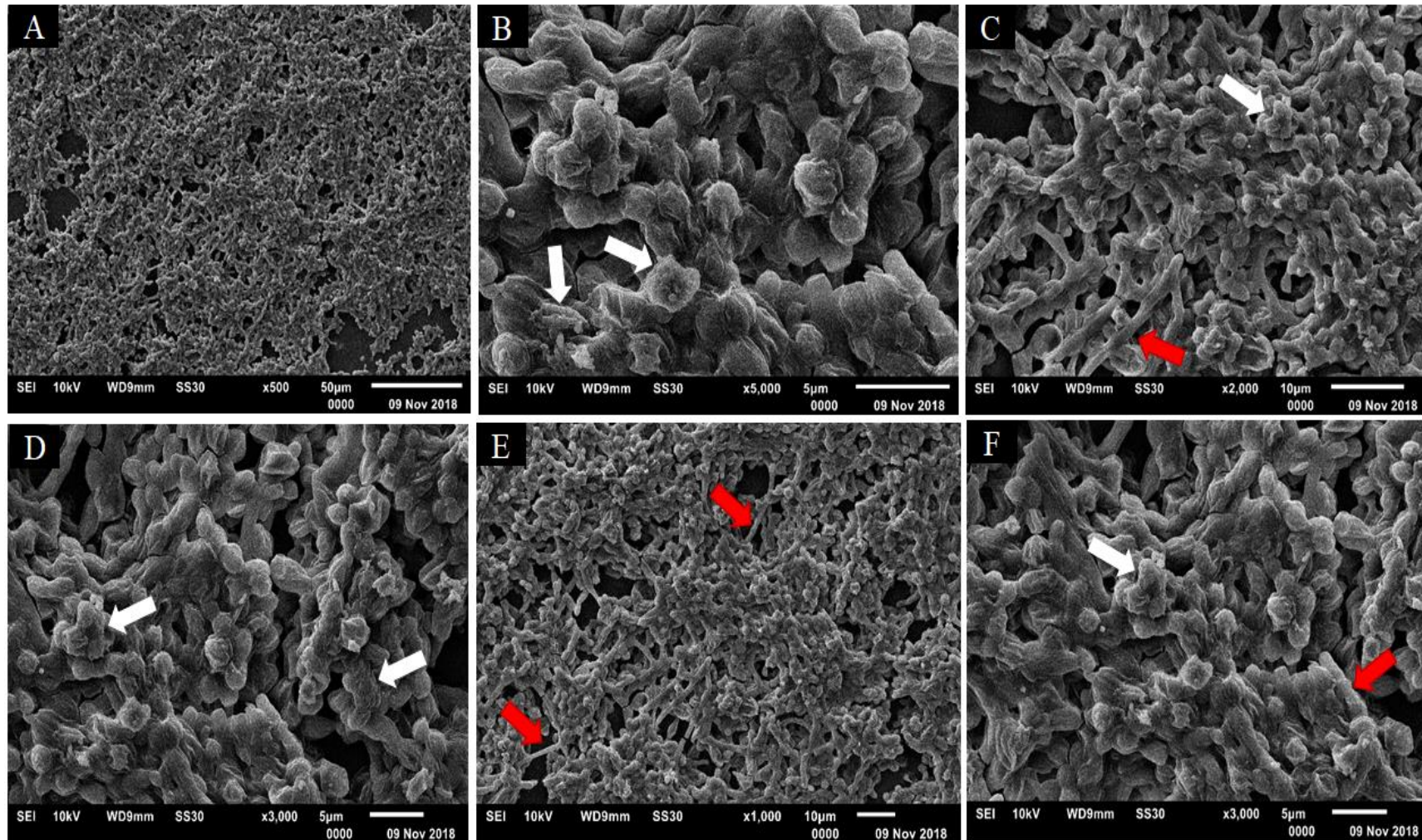
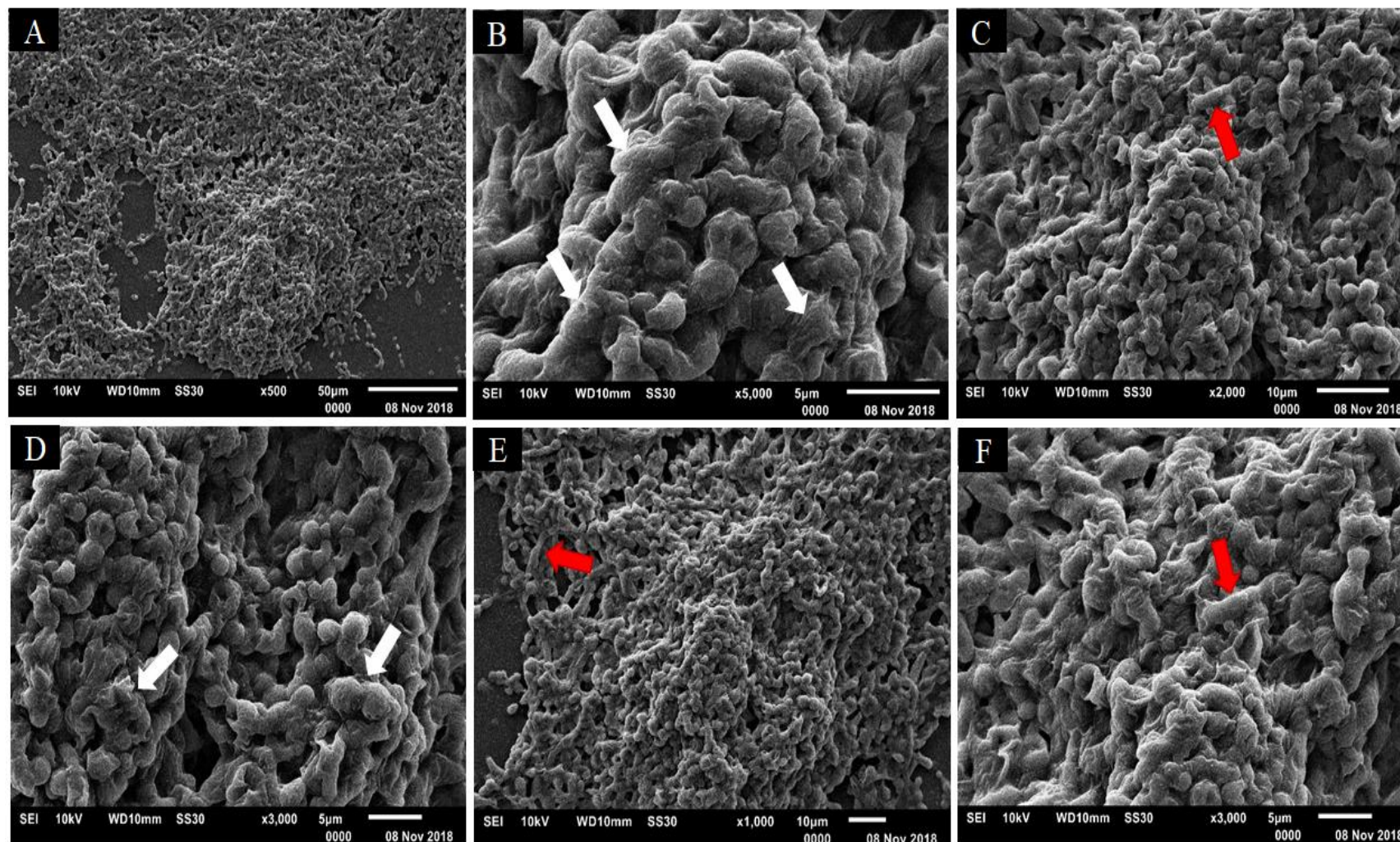


Figura 27. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme da cepa EH-315 formado em meio RPMI sob condição de aerobiose. As setas brancas apontam matriz extracelular cobrindo as leveduras e as setas vermelhas indicam as hifas recobertas pela matriz.



As **figuras 28 a 31** mostram as topografias dos biofilmes maduros da cepa G186A sob condição de microaerofilia, formados nos meios BHI, HAM-F12 DMEM e RPMI, respectivamente. Com exceção dos biofilmes formados no meio HAM, observa-se que a biomassa é menos compacta que a formada pela cepa EH-315 e que a matriz aparenta ser produzida em menor quantidade. Além disso, as hifas aparentam estar fortemente entrelaçadas sob as leveduras, porém são mais espaçadas indicadas pelas setas vermelhas.

Figura 28. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa G186A formado em meio BHI sob condição de microaerofilia. As setas brancas apontam a matriz extracelular densa, aparentemente produzida em menor quantidade. Nota-se a presença de hifas fortemente entrelaçadas sob as leveduras, porém mais espaçadas indicadas pelas setas vermelhas.

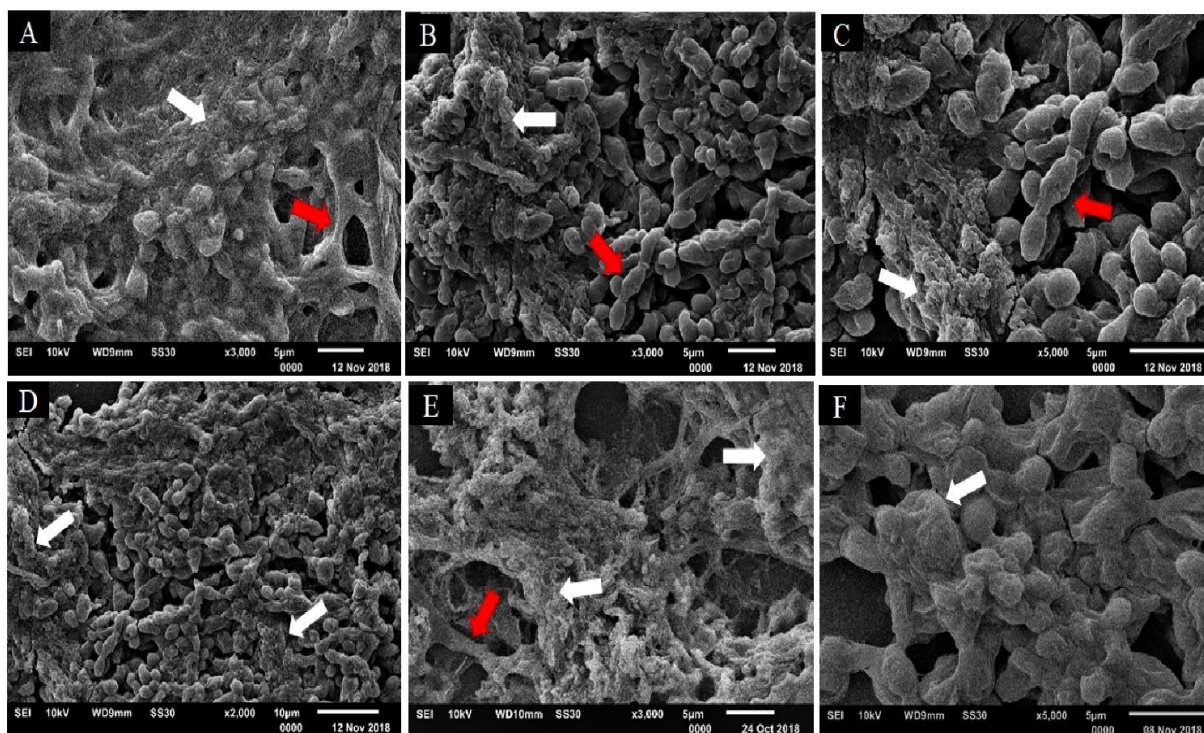


Figura 29. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa G186A formado em meio HAM-F12 sob condição de microaerofilia. As setas brancas apontam grande quantidade de matriz extracelular densa recobrindo as leveduras.

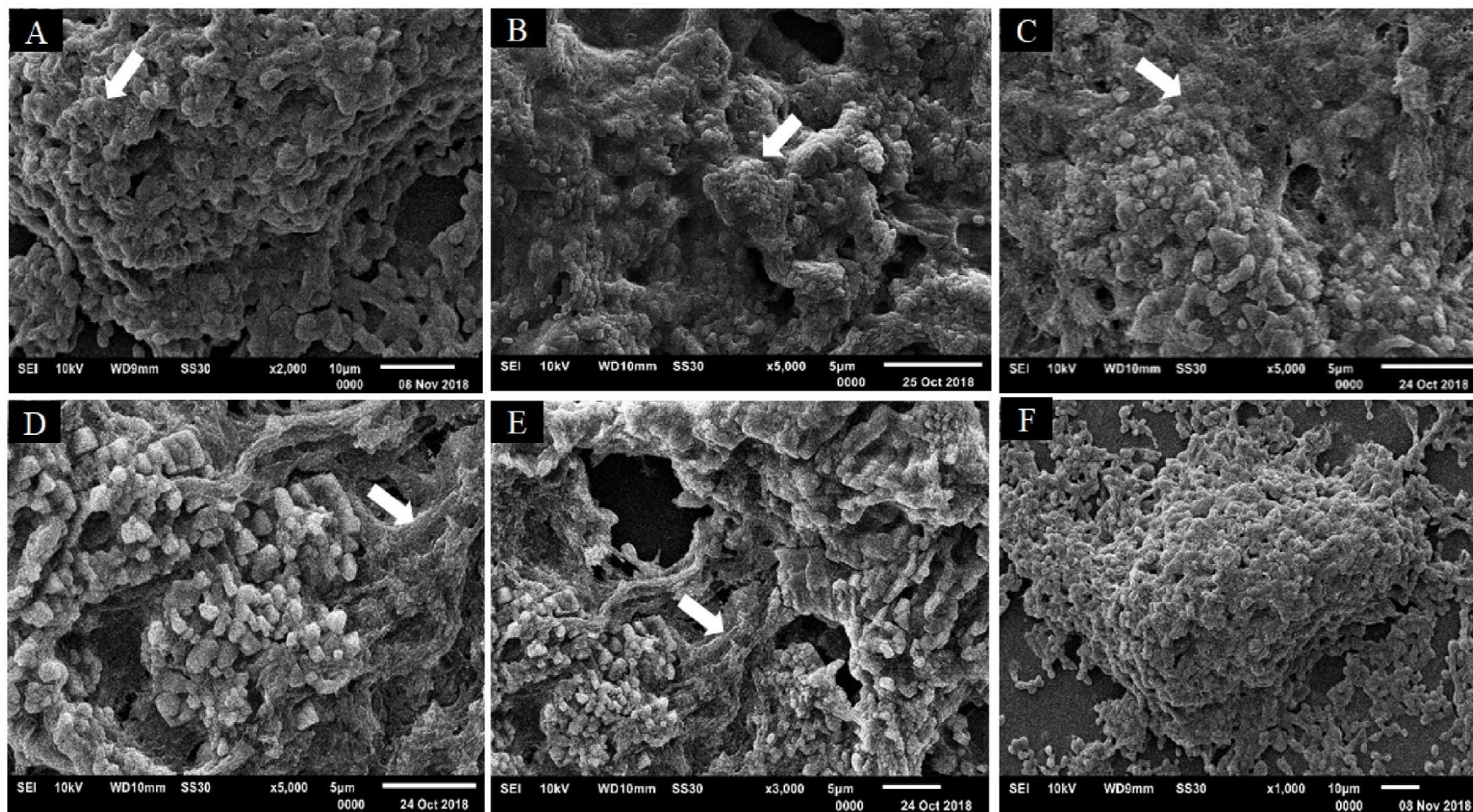


Figura 30. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa G186A formado em meio DMEM sob condição de microaerofilia. As setas brancas apontam a matriz extracelular, dando um aspecto enrugado as hifas e leveduras e uma biomassa menos compacta e mais espaçada. As setas vermelhas indicam hifas.

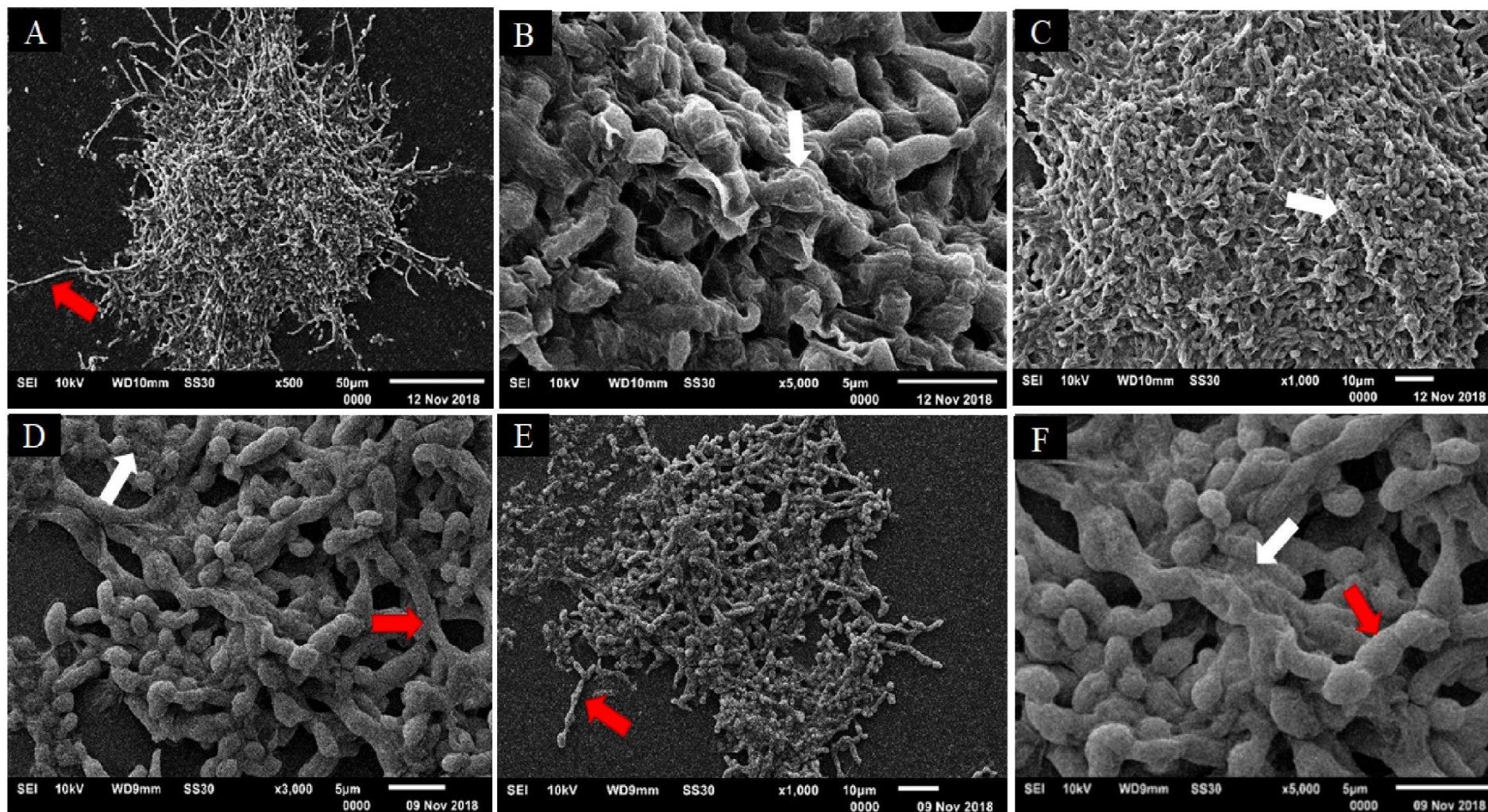
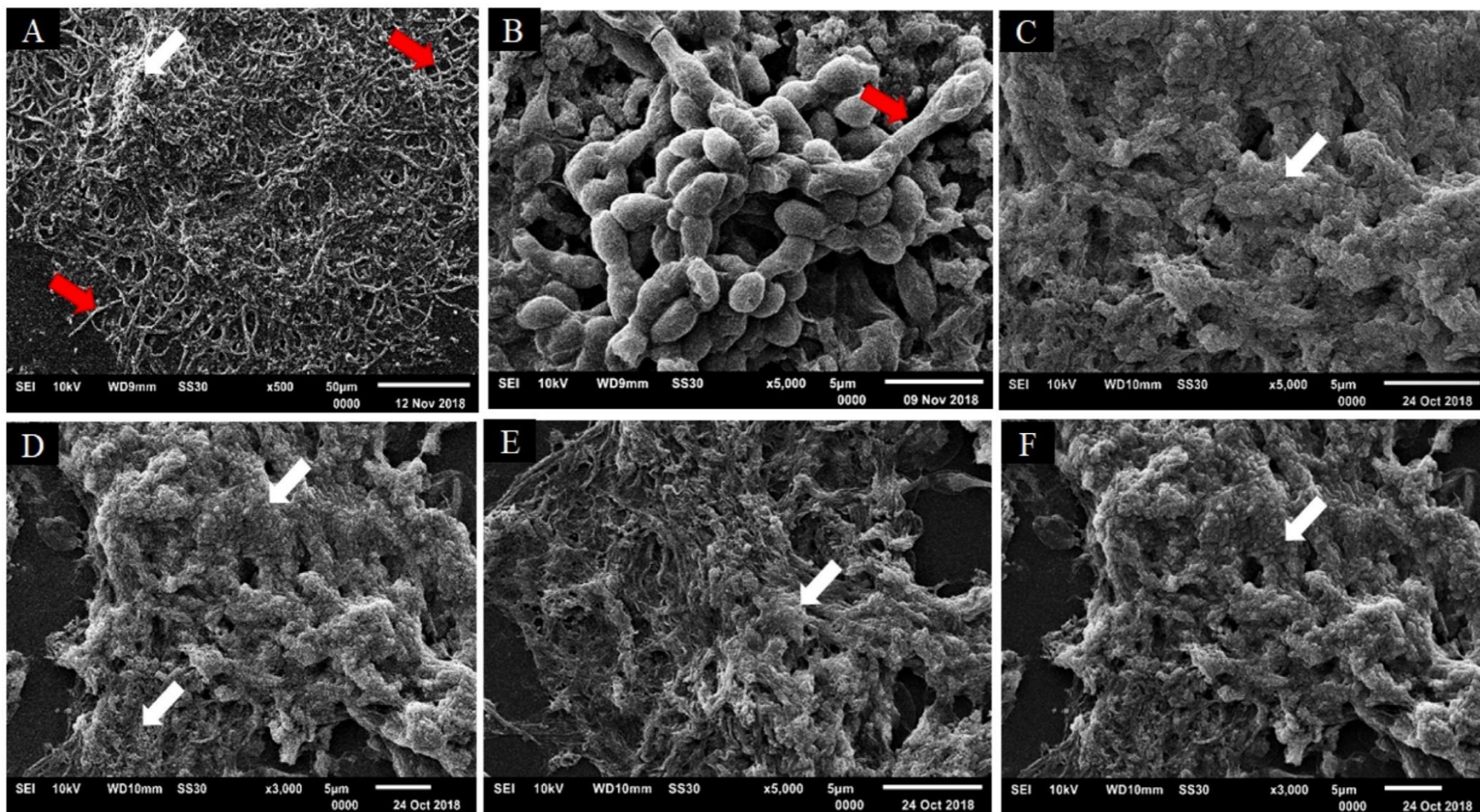


Figura 31. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa G186A formado em meio RPMI sob condição de microaerofilia. As setas brancas apontam a matriz extracelular e as setas vermelhas indicam as hifas.



As **figuras 32 a 35** mostram os biofilmes formados pela cepa G186A sob condição de aerobiose formados nos mesmos meios (BHI, HAM-F12, DMEM e RPMI). A biomassa mostrou-se compacta, e a presença de hifas aparentou-se maior do que a mostrada no biofilme formado na condição de microaerofilia. Nota-se também que há poucas regiões com acúmulo de material polissacarídico, que parece estar cobrindo as hifas e leveduras como uma capa de proteção (**Figura 38B, 38F e 40D, 40E**).

Figura 32. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa G186A formado em meio BHI sob condição de aerobiose. As setas brancas apontam poucas regiões com acúmulo de material polissacarídico que parece estar cobrindo as hifas e leveduras como uma capa de proteção. A presença de hifas apontadas pelas setas vermelhas aparentou-se maior do que a mostrada no biofilme formado na condição de microaerofilia.

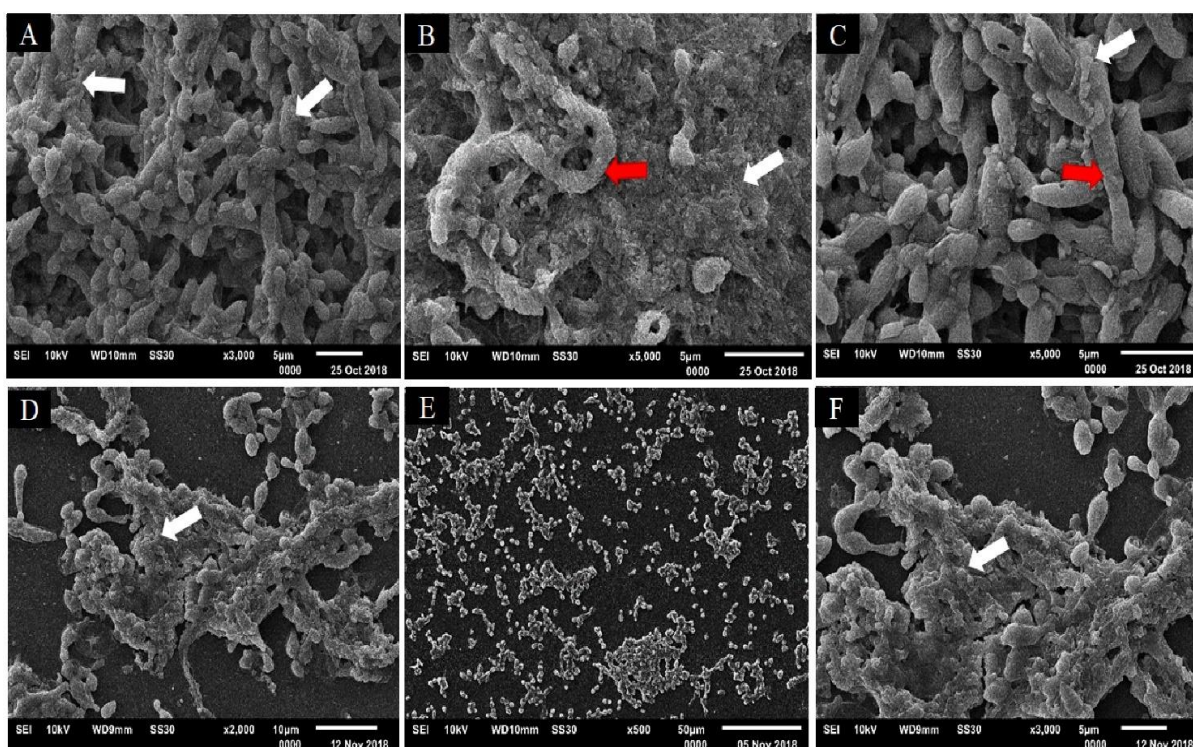


Figura 33. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa G186A formado em meio HAM-F12 sob condição de aerobiose. As setas brancas indicam uma biomassa compacta e grande quantidade de matriz extracelular. Nota-se a presença de hifas recobertas por material polissacarídico apontadas pelas setas vermelhas.

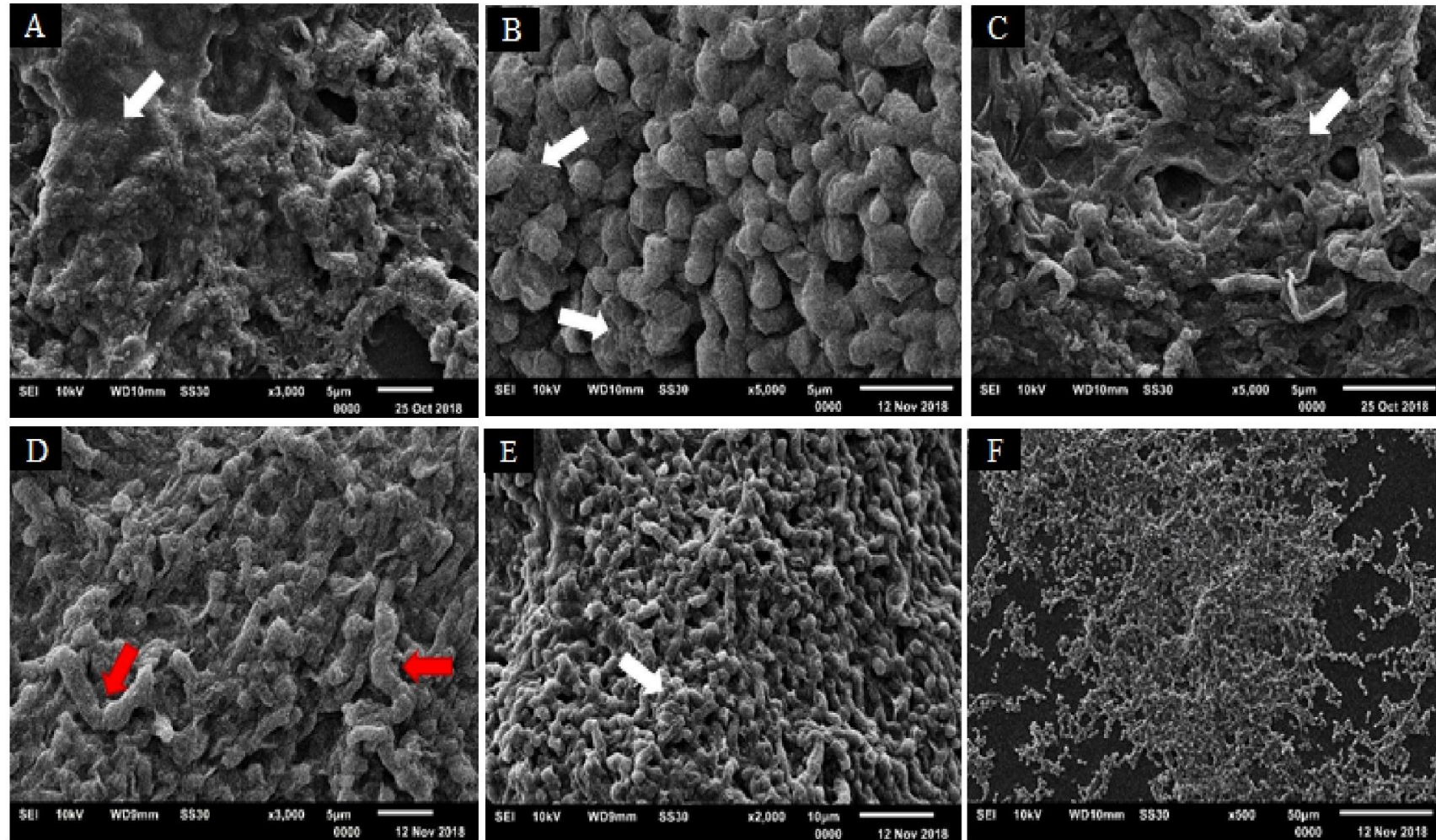


Figura 34. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa G186A formado em meio DMEM sob condição de aerobiose. As setas brancas apontam a matriz extracelular densa. Nota-se a presença de hifas apontadas pelas setas vermelhas.

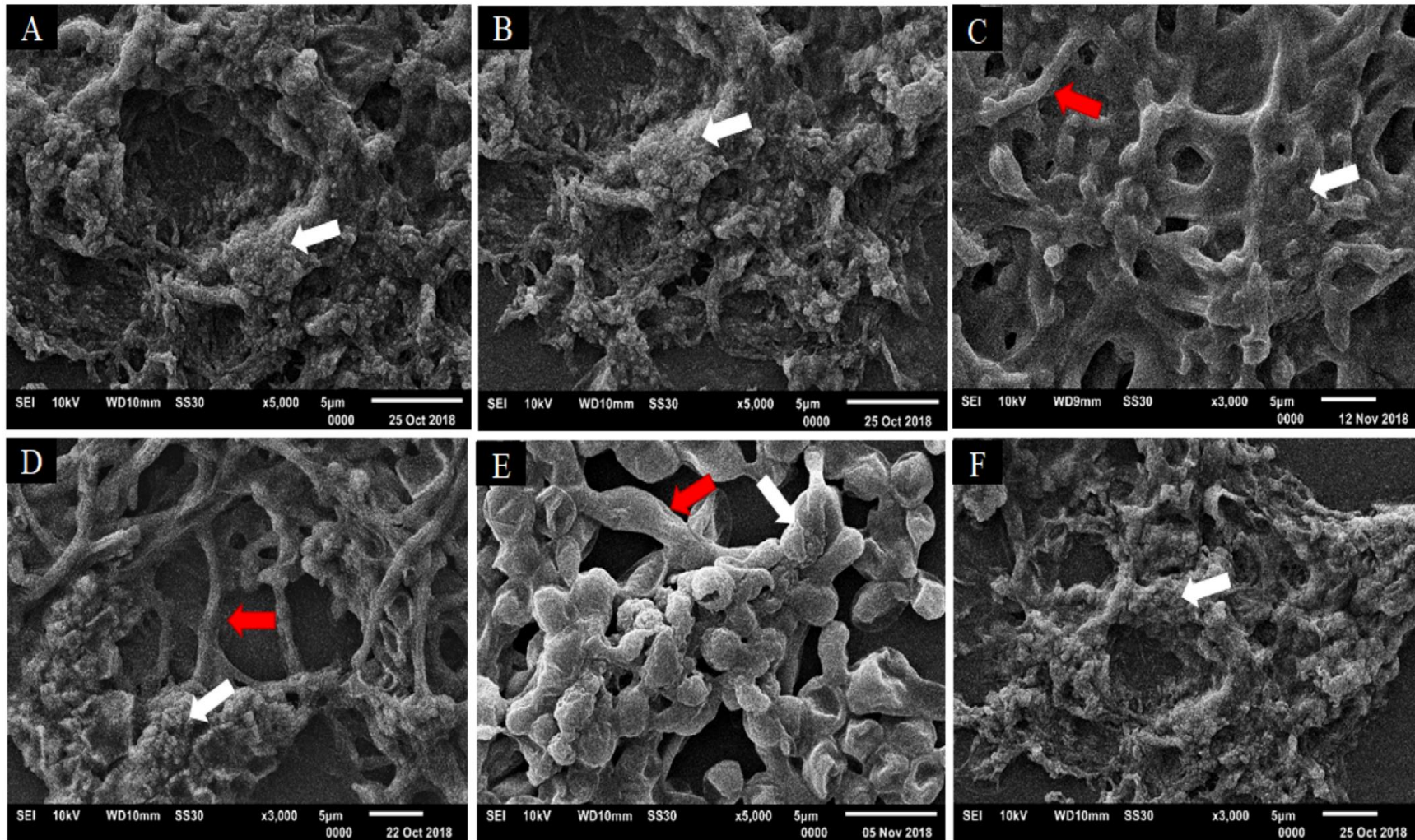
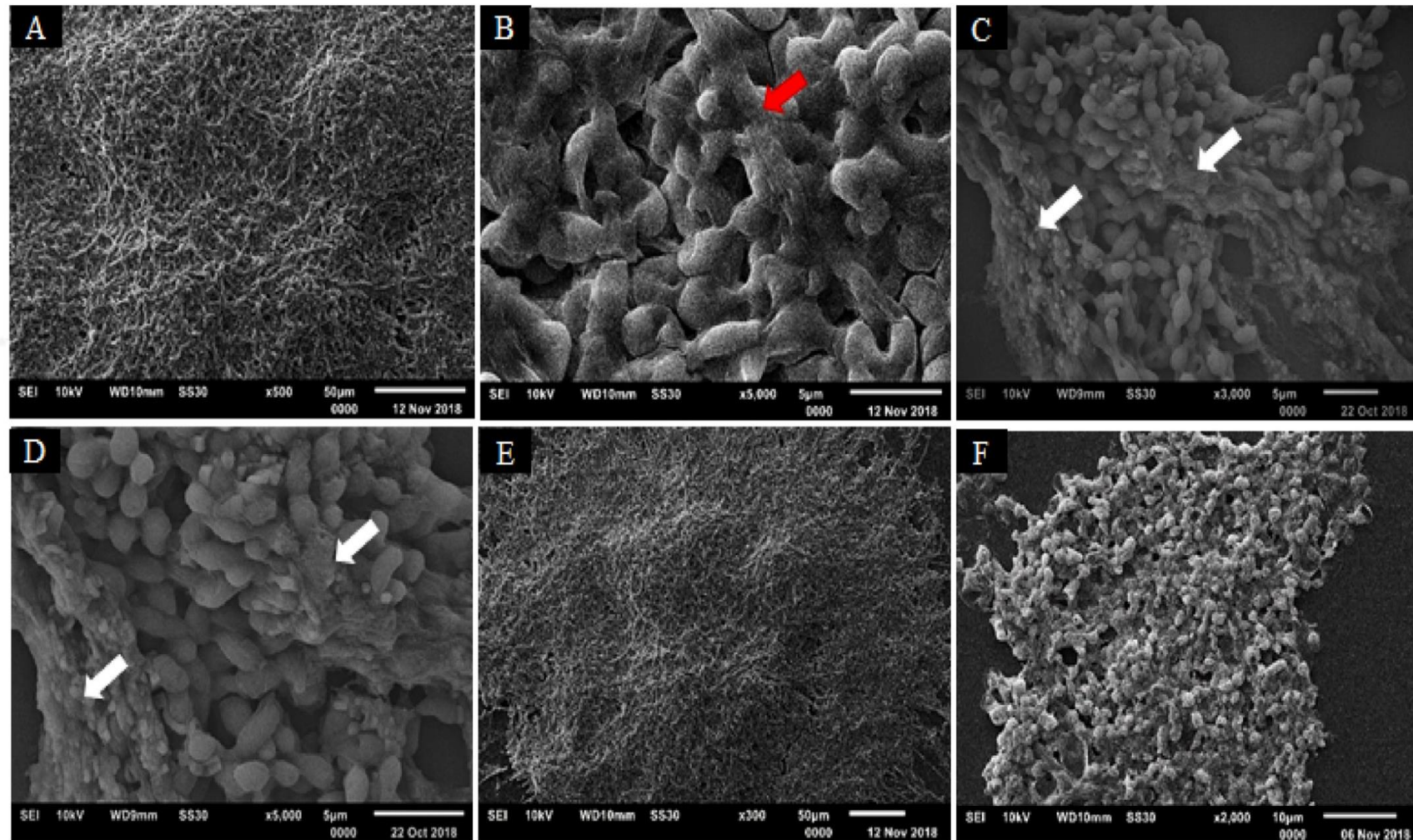


Figura 35. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa G186A formado em meio RPMI sob condição de aerobiose. As setas brancas apontam a matriz extracelular e a seta vermelha hifa.



As **figuras 36 a 39** mostram as topografias dos biofilmes maduros da cepa G217B, formados nos meios BHI, HAM-F12, DMEM e RPMI em microaerofilia. Observa-se que a matriz extracelular foi produzida em quantidade satisfatória principalmente no meio HAM-F12, apresentando semelhança com a cepa G186A. Além disso, uma biomassa menos compacta e hifas entrelaçando as leveduras também foram observadas.

Figura 36 Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa G217B formado em meio BHI sob condição de microaerofilia. As setas brancas apontam a matriz extracelular e as setas vermelhas as hifas.

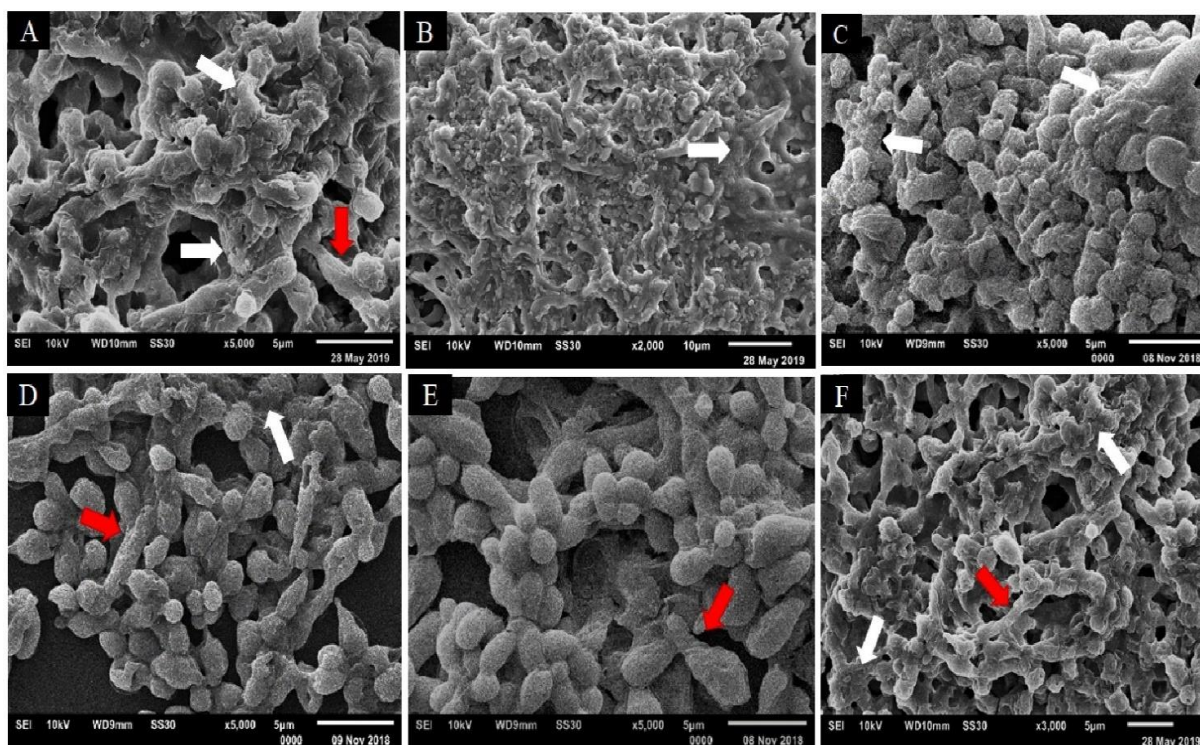


Figura 37. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa G217B formado em meio HAM-F12 sob condição de microaerofilia. As setas apontam a matriz extracelular. Nota-se também a presença de poucas hifas apontadas pelas setas vermelhas.

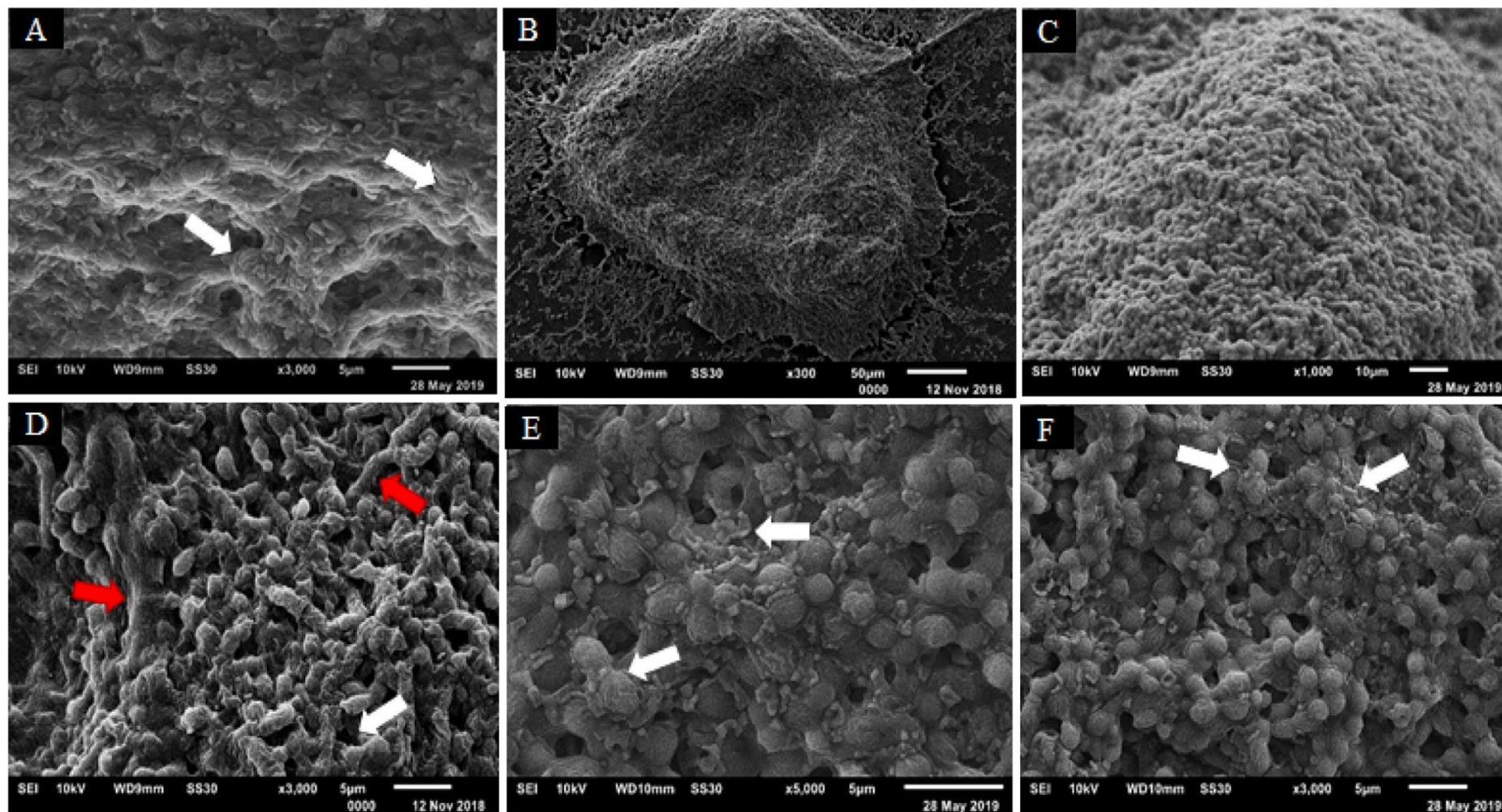


Figura 38. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa G217B formado em meio DMEM sob condição de microaerofilia. As setas brancas apontam a matriz extracelular e as setas vermelhas as hifas.

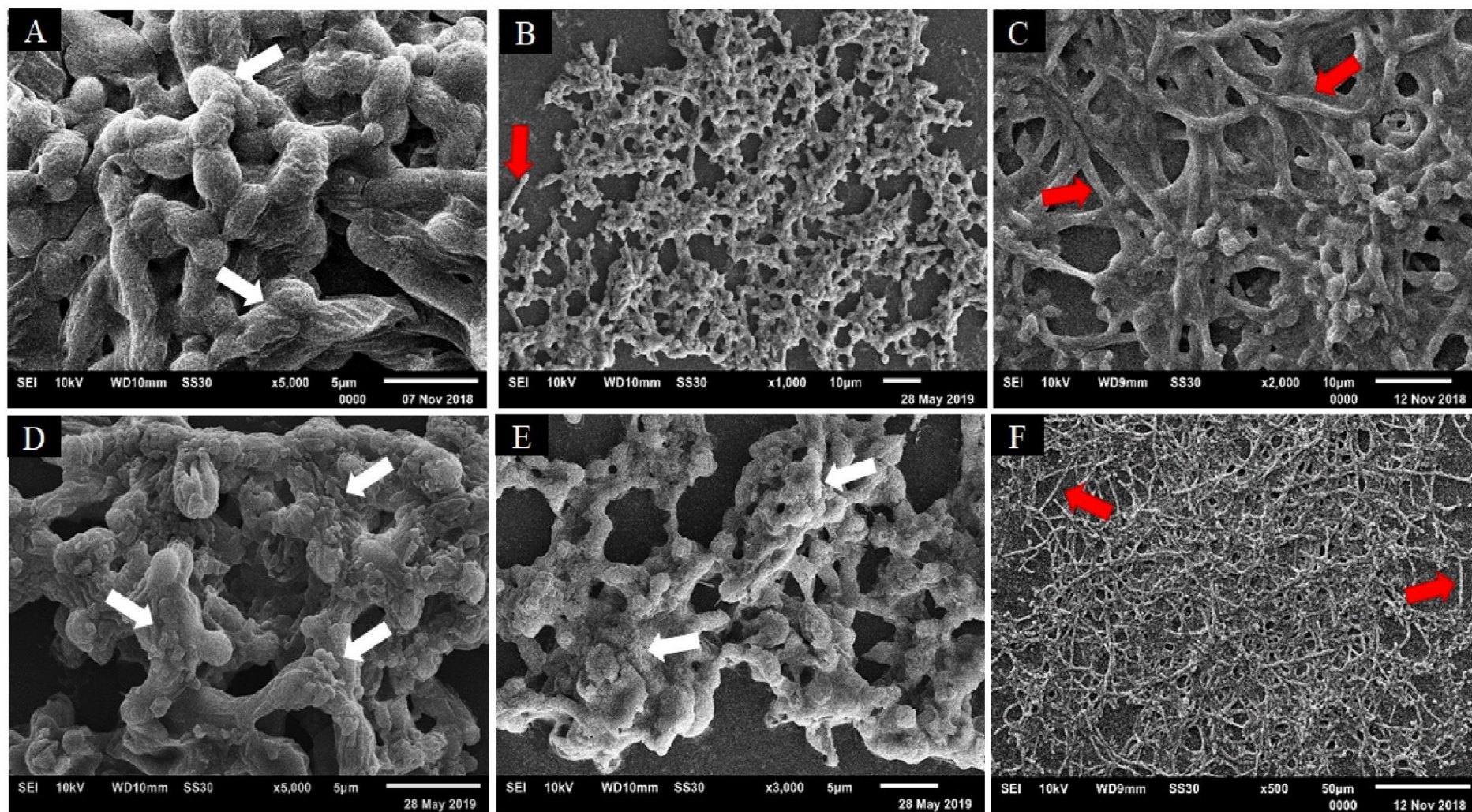
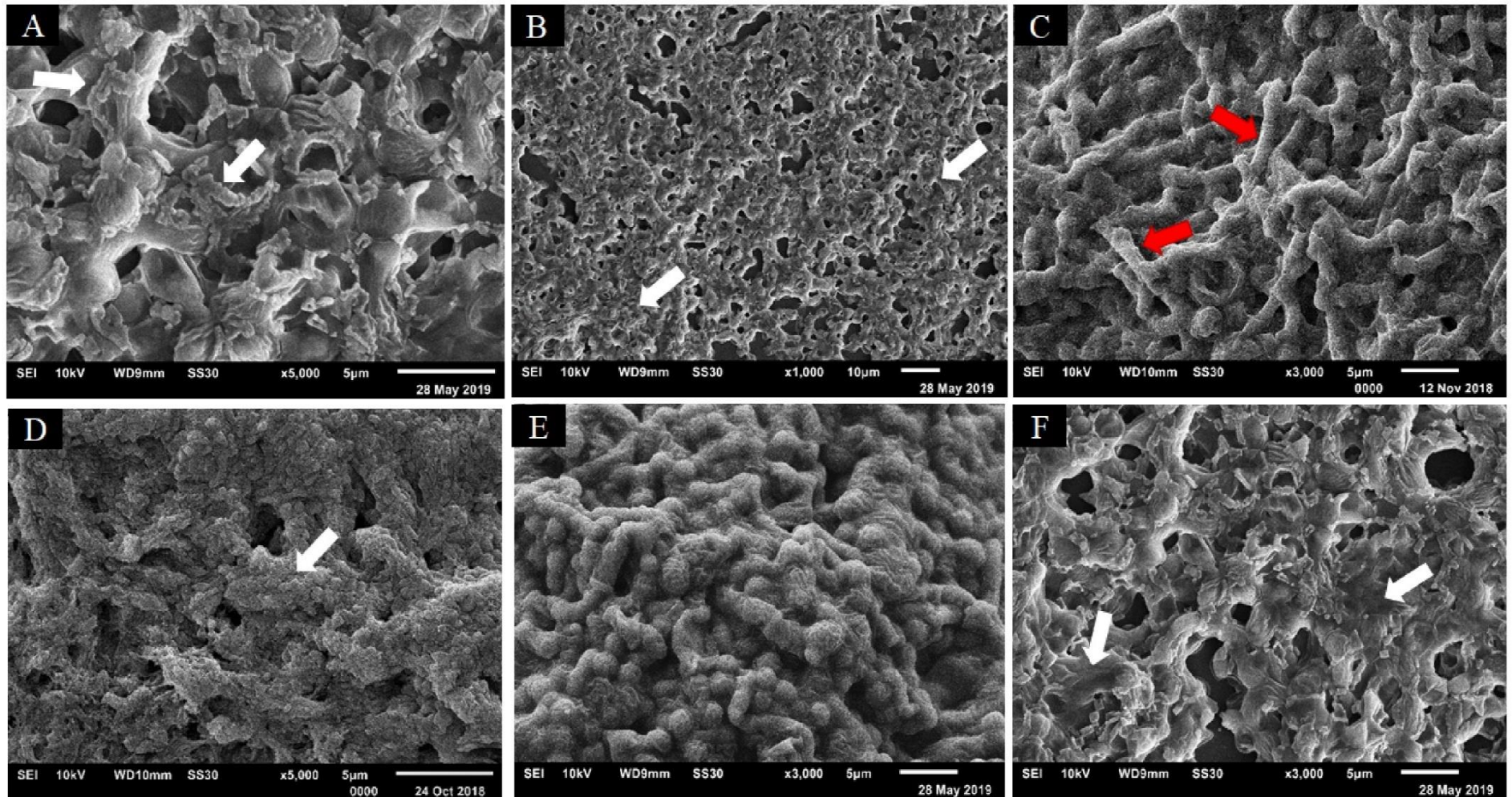


Figura 39. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa G217B formado em meio RPMI sob condição de microaerofilia. As setas brancas apontam a matriz extracelular e as setas vermelhas as hifas.



Por último, as **figuras 40 a 41** representam os biofilmes formados pela cepa G217B em aerobiose nos mesmos meios (BHI, HAM-F12, DMEM e RPMI). Nota-se que a biomassa também mostrou-se compacta, além disso, há poucas regiões com acúmulo de matriz extracelular cobrindo as hifas e leveduras e a presença de hifas também foi observada.

Figura 40. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa G217B formado em meio BHI sob condição de aerobiose. As setas brancas apontam a matriz extracelular e as setas vermelhas as hifas.

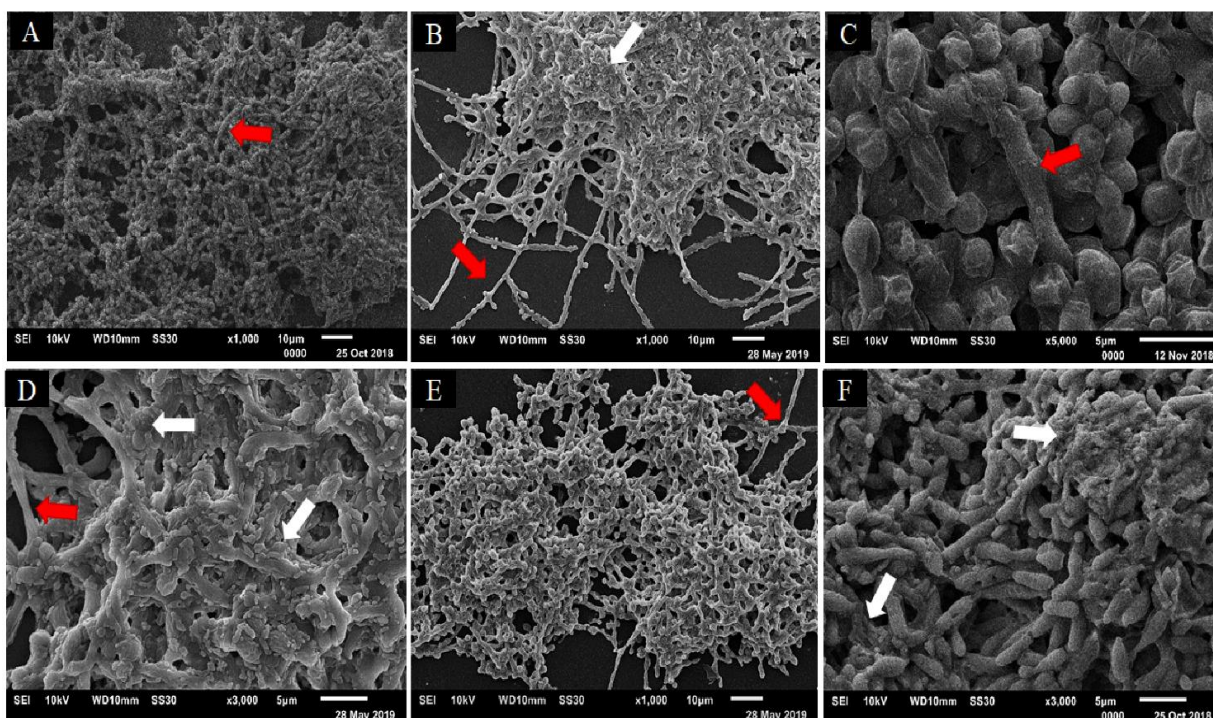


Figura 41. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa G217B formado em meio HAM-F12 sob condição de aerobiose. As setas brancas apontam a matriz extracelular e as setas vermelhas as hifas.

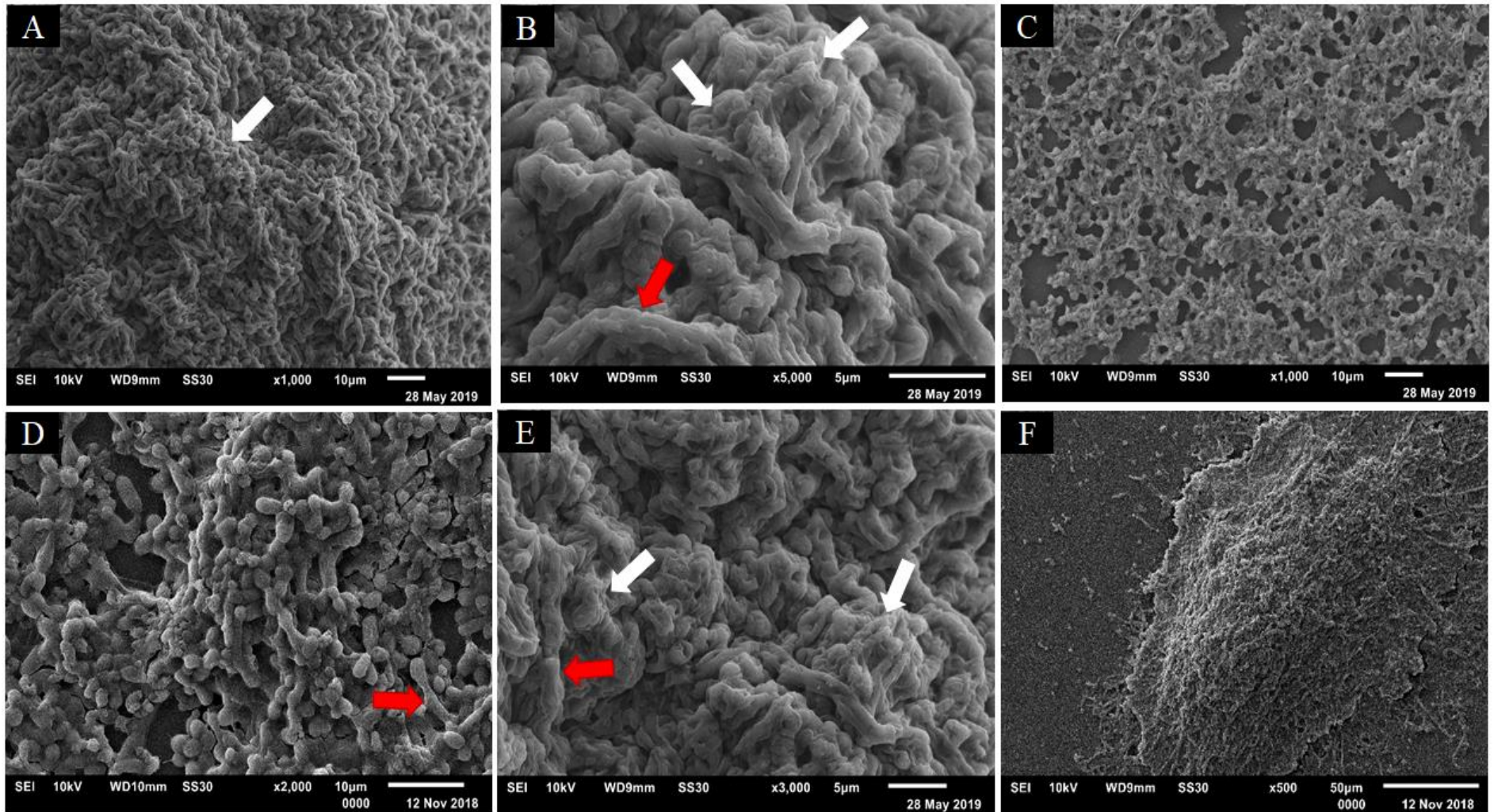


Figura 42. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa G217B formado em meio DMEM sob condição de aerobiose. As setas brancas apontam a matriz extracelular e as setas vermelhas as hifas.

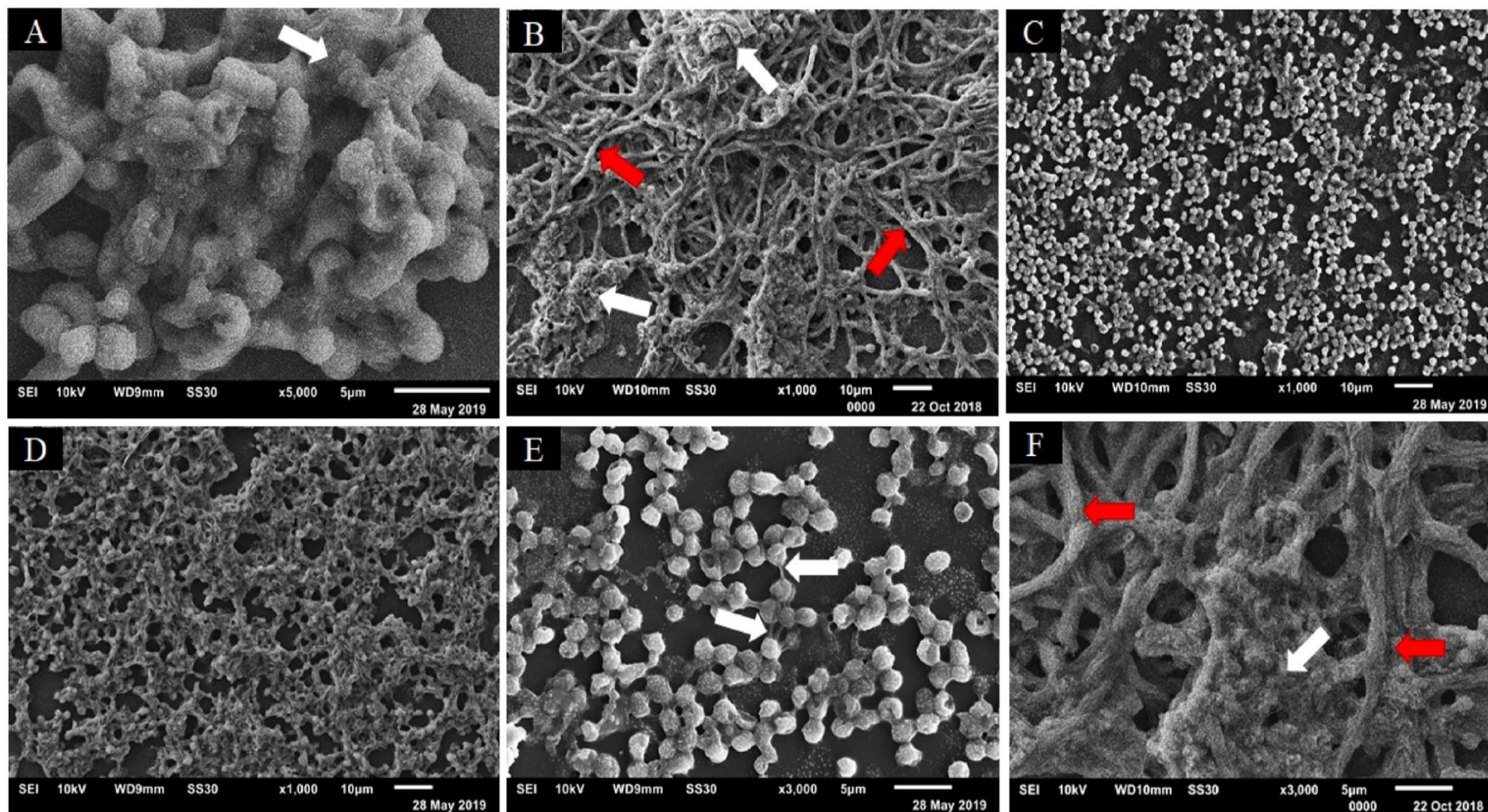
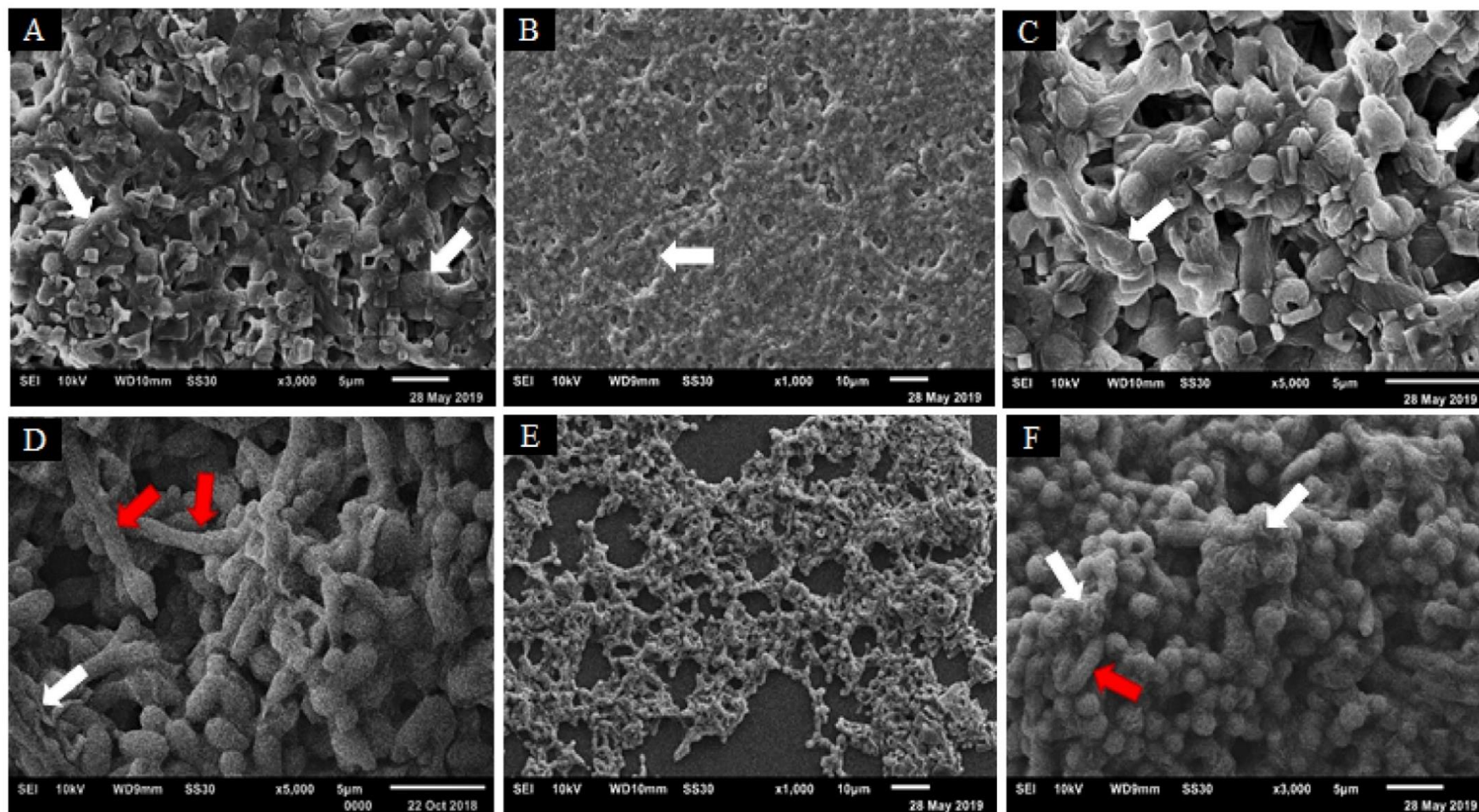


Figura 43. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro da cepa G217B formado em meio RPMI sob condição de aerobiose. As setas brancas apontam a matriz extracelular e as setas vermelhas as hifas.



Abordagens para biofilmes de fungos são amplamente discutidas na literatura. Em relação a *H. capsulatum*, o primeiro estudo sobre os biofilmes formados por esses fungos foi realizado por PITANGUI et al. (2012). Os autores usaram o meio BHI e técnicas como o ensaio de redução XTT, fluorescência, microscopia confocal e eletrônica de varredura em condições ricas em O₂. Nossos resultados mostram dados sem precedentes sobre a formação desses biofilmes usando técnicas adicionais e diferentes meios de cultura, a fim de verificar a influência em seu desenvolvimento, bem como a importância da presença de mais ou menos O₂, uma vez que esse fungo é facultativo intracelular de macrófagos alveolares (WOODS, 2003; GARFOOT; RAPPLEYE, 2016).

O desenvolvimento de biofilmes pode ser influenciado pelas condições ambientais, nutricionais temperatura e pH, que podem afetar significativamente não apenas a arquitetura do biofilme, mas também o perfil de expressão de vários genes envolvidos durante seus diferentes estágios de formação (KUCHARÍKOVÁ et al., 2011; TAN et al., 2016; LAGREE; MITCHELL, 2017). Os meios de cultura são essenciais para o crescimento e desenvolvimento de qualquer microrganismo *in vitro*. Eles são constituídos por aminoácidos, vitaminas, sais inorgânicos e podem diferir em número e quantidade (HONG et al., 2017; MCTAGGART et al., 2018). Neste trabalho, biofilmes foram formados em meio de cultura amplamente utilizado no cultivo e manutenção de fungos e linhagens celulares. A verificação de diferentes condições nutricionais na formação dessas comunidades sésseis é importante para ampliar os estudos *in vitro* e, principalmente, para que esse fenômeno seja correlacionado com a patogênese desse fungo em estudos futuros. Além disso, as características da superfície celular e o substrato também são capazes de influenciar a adesão. Estudos mostraram que o processo de adesão de bactérias na formação do biofilme é correlacionado ao aumento da concentração de nutrientes (COWAN et al., 1991). Essa hipótese corrobora com os resultados obtidos no presente trabalho, que indicaram que, o meio HAM-F12, que é um meio rico em nutrientes, forneceu o melhor desenvolvimento dos biofilmes de *H. capsulatum*, apresentando pouco ou nenhum filamento visível e, quantitativamente, foi o que estimulou maior produção de biomassa, material polissacarídico e maior viabilidade celular. Os fatores responsáveis pela adesão de *H. capsulatum* às várias superfícies ainda não foram bem elucidados, porém sabe-se que a habilidade deste fungo em aderir às células pulmonares deve-se à ação de adesinas específicas que são expressas na superfície da célula fúngica (PITANGUI et al., 2012; GARFOOT et al., 2018; SAHAZA et al., 2019).

Os meios de cultura testados neste estudo têm uma composição química diferente (**Tabela 2, Anexo 1**). O meio BHI consiste em uma infusão de cérebro-coração, hidrogenofosfato de sódio, glicose, peptona e cloreto de sódio. Esses componentes fornecem um ambiente adequado para o crescimento de microrganismos exigentes e não exigentes (ROSENOW, 1919; CLEARE et al., 2020). O meio HAM-F12 é amplamente utilizado para o cultivo e manutenção de culturas de células de mamíferos (HAM, 1965; CRAVCHIK et al., 1996). Além de sua composição usual, quando suplementado com (18,2 g / L) glicose, (1g / L) ácido glutâmico, (6g / L) HEPES e (8,4 mg / L) L-cisteína, este meio fornece um melhor crescimento de *H. capsulatum*, uma vez que esses componentes são conhecidos como fatores de crescimento do fungo (WORSHAM; GOLDMAN, 1988). Portanto, este meio é utilizado por vários autores no cultivo e manutenção de leveduras de *H. capsulatum* (ALLEENDOERFER; BIOVIN; DEEPE, 1997; NOSANCHUCK et al., 2003; CORDERO et al., 2016; BALTAZAR et al., 2018; GUIMARÃES et al., 2019; CLEARE et al., 2020). O meio RPMI-1640 é considerado adequado para o cultivo de uma variedade de células de mamíferos (MOORE et al., 1967, TRONO et al., 2011). Além disso, quando suplementado com glutamina, 2% de glicose, na ausência de sódio bicarbonato e tamponado com ácido 3-(N-morfolina) propanossulfônico (MOPS) é recomendado pelo teste de suscetibilidade do Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2008). O DMEM é amplamente utilizado como meio de cultura basal para o crescimento de várias linhagens celulares de mamíferos e pode ser suplementado com soro bovino fetal para promover melhor crescimento celular (EAGLE, 1955, DULBECCO; FREEMAN, 1959; BURGNER; BUTLER, 2006). Inicialmente, este meio de cultura foi formulado com baixa concentração de glicose e piruvato, no entanto, é frequentemente usado com alta concentração de glicose e sem piruvato de sódio (DULBECCO; FREEMAN, 1959).

O meio BHI é difícil de comparar porque é composto por infusões do cérebro-coração. Isso pode vir de diferentes animais, variando sua composição em cada lote (CLEARE et al., 2020). Os demais meios de cultura (DMEM, RPMI-1640 e HAM-F12) são meios definidos, possuem composição balanceada, além de todos os componentes conhecidos e fáceis de comparar. No entanto, a suplementação com SFB no meio DMEM utilizado neste trabalho torna limitada a comparação com outros meios. O RPMI-1640 é o único com um agente redutor da glutatona, um antioxidante importante para as células (ODKHUU et al., 2015). O meio HAM possui ácido linoléico, ácido lipóico, timidina, sulfato cúprico e sulfato de zinco como constituintes diferenciados de outros meios. Entre esses constituintes, os ácidos

linoléico e lipóico são importantes para o metabolismo energético das células (CASU et al., 2016; ZHANG et al., 2017; CASU et al., 2018). A timidina é importante na multiplicação celular (SHIELDS et al., 1998). Além disso, existe a presença de componentes metálicos, sulfato de zinco e sulfato cúprico, importantes durante a interação *Histoplasma*-hospedeiro (WILSON; CITIULO; HUBE, 2012; GERWIEN et al., 2018, CLEARE et al., 2020). O zinco e o cobre participam do centro catalítico de inúmeras enzimas e desempenham papéis importantes na funcionalidade de várias proteínas (VAN HO et al., 2002). Várias formas de aquisição de zinco e cobre por alguns fungos patogênicos foram elucidadas, incluindo *S. cerevisiae*, *A. fumigatus*, *C. albicans*, *C. neoformans*, *C. gattii*, *Paracoccidioides spp.* e *H. capsulatum* (ZHAO et al., 1996; KIM et al., 2008; NOBILE et al., 2009; GANGULY et al., 2011; FINKEL et al., 2012; SCHNEIDER et al., 2012; PARENTE et al., 2013; AMICH; CALERA, 2014; DADE et al., 2016). A limitação do acesso de micronutrientes como cobre e zinco no interior dos macrófagos inibe a viabilidade celular de *H. capsulatum* (DADE et al., 2016, CLEARE et al., 2020). Esses dados podem justificar o melhor crescimento e desenvolvimento observado nos biofilmes formados no meio HAM-F12, pois contém nutrientes que aumentam os mecanismos de metabolismo energético, divisão celular e sobrevivência das células de biofilme.

No que diz respeito às diferentes atmosferas de O₂ utilizadas no presente trabalho, elas foram testadas porque os níveis de O₂ são diferentes no corpo humano (14% nos alvéolos pulmonares, 12% no sangue arterial, 5,3% no sangue venoso) (ERECÍNSKA; SILVER, 2001; SHARP; BERNAUDIN, 2004; DUBOIS et al., 2016). A microaerofilia formada na jarra com vela é um método amplamente utilizado e é descrito na literatura como eficaz para reduzir a tensão de O₂ para o crescimento de alguns microrganismos *in vitro* (MANDAL et al., 2014; CARR et al., 2015). Embora as duas condições de tensão de O₂ testadas tenham proporcionado um bom desenvolvimento de biofilmes, em testes quantitativos, a condição de microaerofilia foi superior à condição de aerobiose, particularmente em biofilmes formados usando HAM-F12. Perfil semelhante foi observado por Osgood et al. (2015) para os biofilmes de *Haemophilus influenzae* formados na condição de microaerofilia e com pH neutro. *H. capsulatum*, sendo um patógeno sistêmico, pode se desenvolver em diferentes regiões do corpo e com diferentes tensões de O₂, portanto, é de suma importância verificar a influência de uma menor ou maior concentração de O₂ no desenvolvimento de biofilmes.

Em relação à filamentação observada nos biofilmes formados em BHI, RPMI e DMEM, são necessários mais estudos para desvelar esse processo. Uma hipótese pode estar

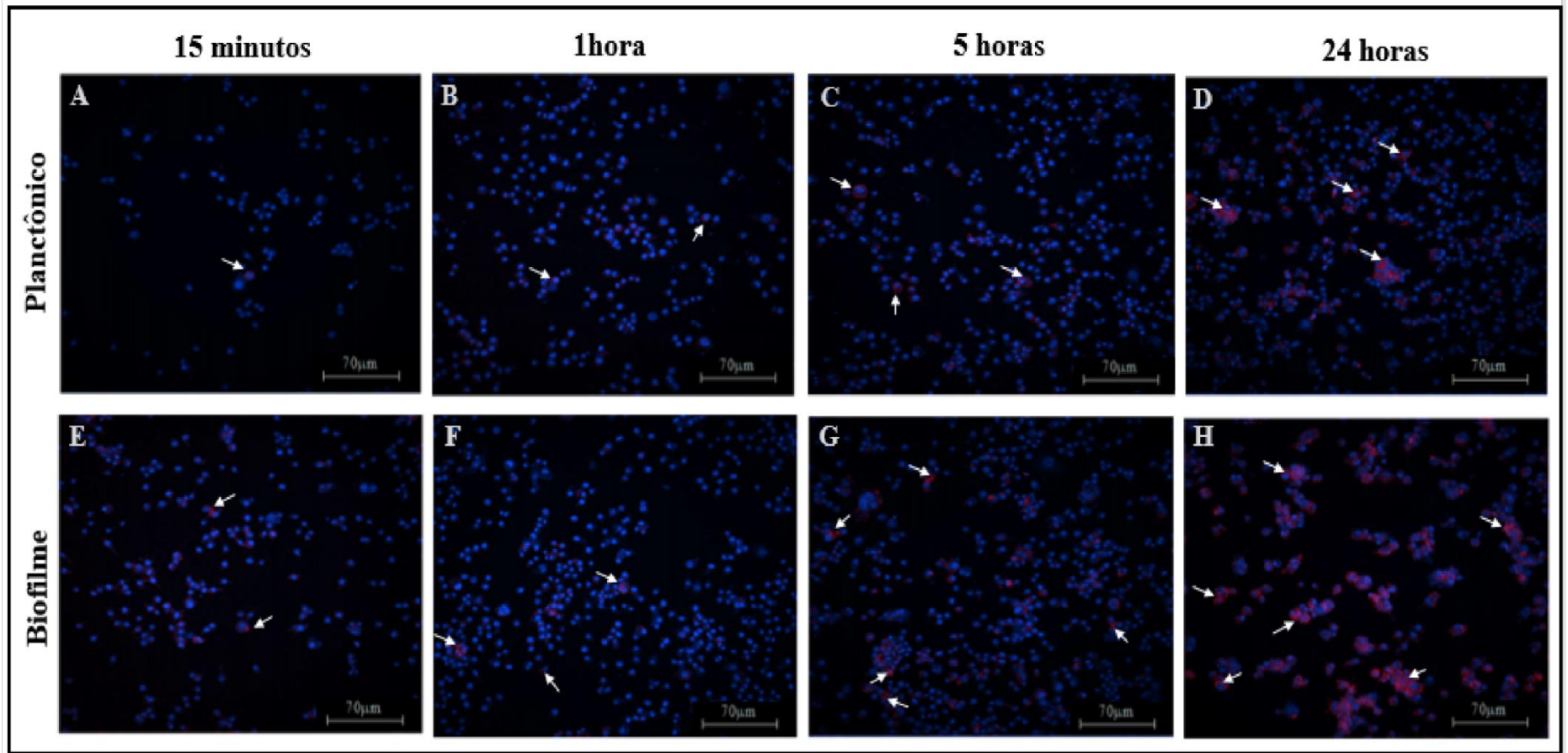
relacionada à limitação de nutrientes essenciais nesses meios, causando estresse que estimula a transição da levedura para a fase filamentosa.

4.3 ENSAIOS DE INTERAÇÃO ENTRE MACRÓFAGOS ALVEOLARES E CÉLULAS PLANCTÔNICAS E DERIVADAS DE BIOFILME DE *H. capsulatum*

4.3.1. *IN Cell Analyzer 2000 System light microscopy*

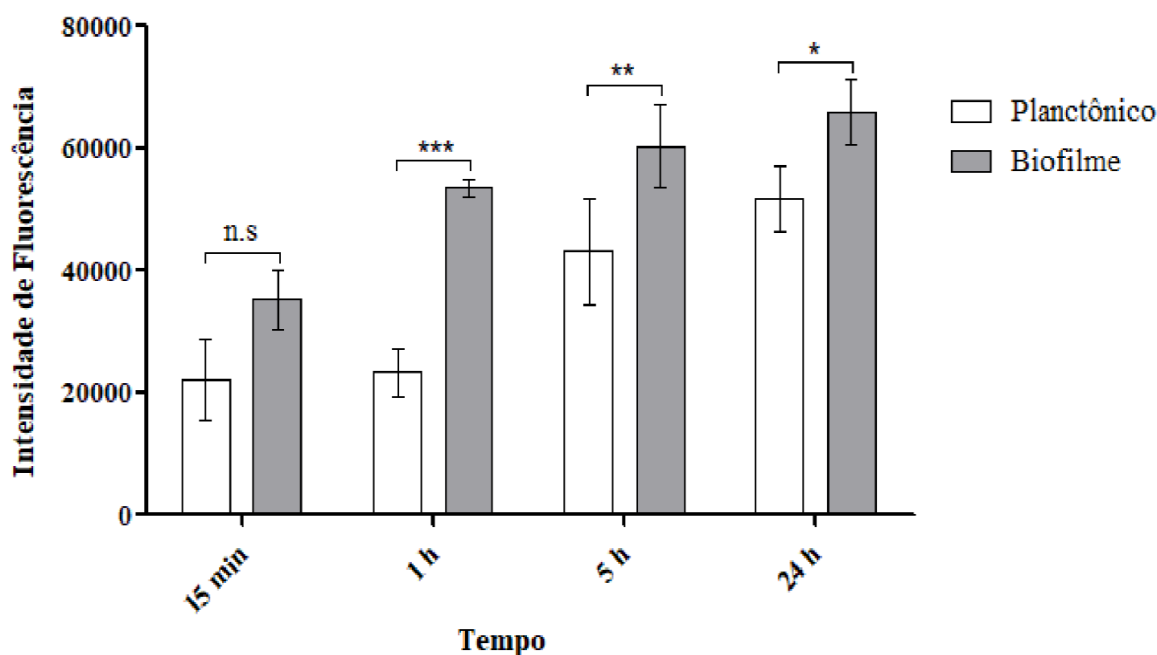
A interação de *H. capsulatum* em condições de crescimento planctônico e em formato biofilme com macrófagos alveolares AMJ₂-C11 foi avaliada em diferentes tempos de infecção, utilizando o equipamento *In cell Analyzer* (*GE Healthcare*), na magnificação de 10X. A **figura 44** mostra que a partir de 15 min de infecção tanto pelas células planctônicas como derivadas de biofilme, houve a formação de aglomerados de leveduras ao redor dos macrófagos. Nesta figura, **A, B, C e D** representam a infecção em macrófagos pelas células planctônicas após 15 min, 1 h, 5 hrs e 24 hrs, enquanto **E, F, G e H** representam a infecção pelas células derivadas de biofilme durante o mesmo período de infecção. Observa-se que na infecção pelas células derivadas de biofilme os aglomerados aparentam ser mais intensos nas superfícies dos macrófagos, quando comparado a infecção pelas células planctônicas.

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 *H. capsulatum* 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). Marcação por imunofluorescência indireta: Hoeschst 34580 em azul corando o núcleo e anticorpo monoclonal anti-Hsp60 conjugado com AlexaFluor 594 em vermelho corando as leveduras de *H. capsulatum*. As imagens foram adquiridas pelo *IN Cell Analyzer 2000* (GE Healthcare) e as escalas de barras correspondem a 70µm. Setas indicam aglomerados de leveduras ao redor dos macrófagos.



Os resultados da análise de intensidade de fluorescência da proteína Hsp60 com o software *Investigator 1000 Workstation* encontram-se na **figura 45**. Observa-se um aumento significativo na intensidade de fluorescência da proteína Hsp60 nos tempos de 1 h ($p<0,001$), 5 hrs ($p<0,01$) e 24 hrs ($p<0,05$) de infecção pelas células derivadas de biofilme quando comparado a infecção pelas células planctônicas. Não houve significância estatística no período de 15 min de infecção por ambas as condições. Esses resultados são concordantes com os observados por meio de microscopia óptica no *In cell Analyzer* (GE Healthcare).

Figura 45. Intensidade de fluorescência da proteína Hsp60 na infecção pelas células planctônicas e derivadas de biofilme de *H. capsulatum* em macrófagos alveolares AMJ2-C11 utilizando o software *Investigator 1000 Workstation*. Significância estatística: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ e n.s não significante. Valores demonstrados referentes a dois experimentos independentes.



4.3.2. Microscopia Confocal de Varredura à Laser (CLSM)

Para melhor observação da arquitetura dos aglomerados de leveduras e da morfologia geral dos macrófagos infectados, foi realizada a microscopia confocal de varredura à laser.

As **Figuras 46 a 50** representam as imagens obtidas por meio da microscopia confocal e correspondem a infecção de macrófagos alveolares AMJ₂-C11 com leveduras de *H. capsulatum* em crescimento planctônico e em biofilme após 15 min, 1 h, 5 hrs e 24 hrs de infecção. A interação foi comparada através de cortes celulares (**Figuras 46, 47, 48 e 49**). A,

B, C, E, F e H representam o corte inicial, intermediário e final da célula na magnificação de 63X, com o intuito de visualizar o local em que o fungo se encontra no momento da infecção.

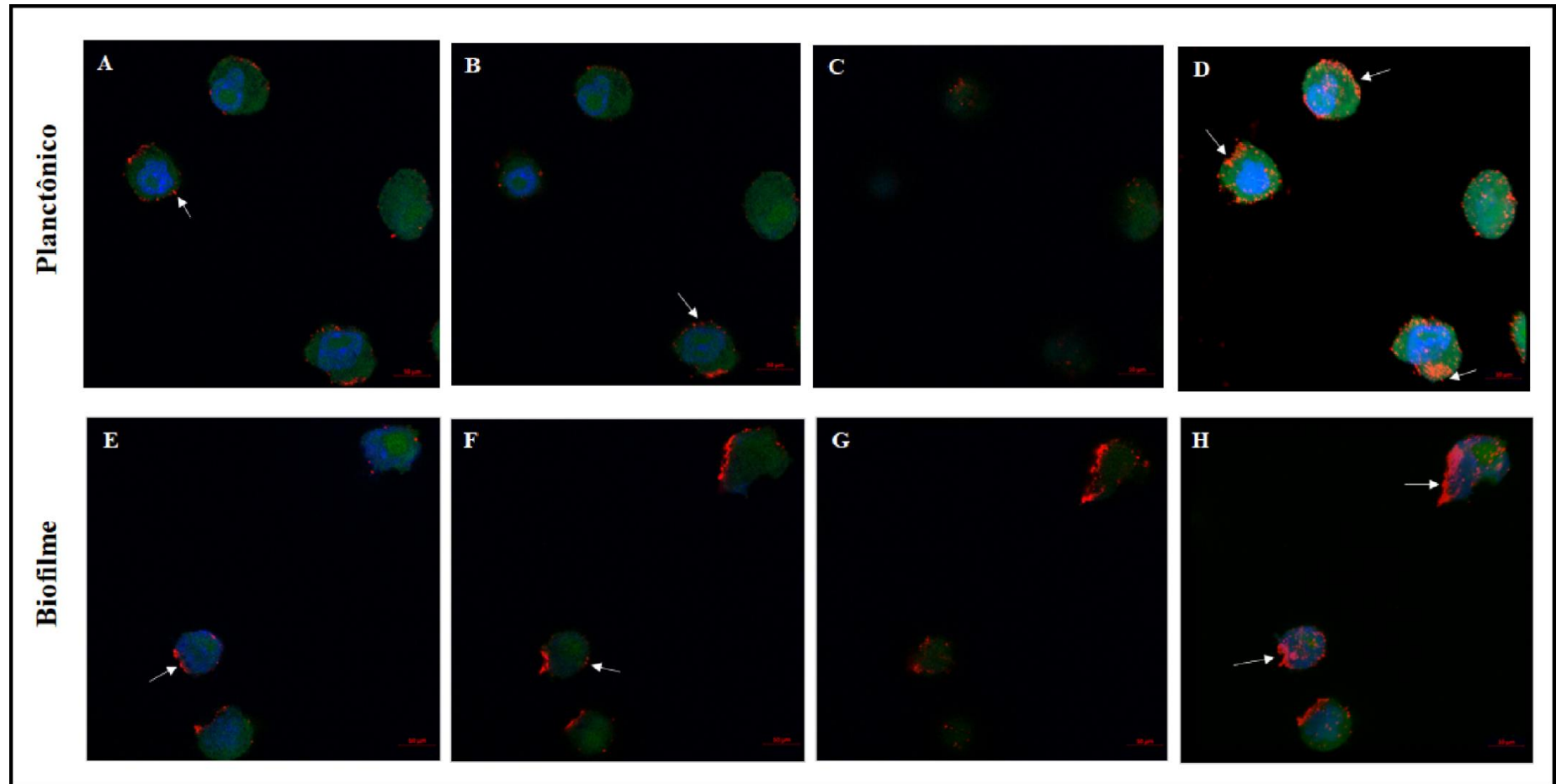
O núcleo das células é revelado pela emissão de fluorescência azul, característica do fluorocromo Hoechst 34580, enquanto o citoplasma celular é corado em verde por Faloidina marcada com FITC e as leveduras de *H. capsulatum* são evidenciadas pela emissão de fluorescência vermelha resultante da ligação com Alexa Fluor®594 (**Figuras 46, 47, 48 e 49**). Nota-se que tanto nos ensaios de infecção pelas células planctônicas como derivadas de biofilme, houve a formação de aglomerados de *H. capsulatum*. Porém, nas infecções com células derivadas de biofilme, esses aglomerados parecem ser maiores, mais densos e com a fluorescência qualitativamente mais intensa. Também foi observado que, nos maiores tempos de infecção (5 e 24 hrs), os macrófagos alveolares parecem exibir uma menor sobrevida e um maior sofrimento celular, visto a quantidade de leveduras internalizadas, no entanto, mais estudos serão necessários para comprovar essa hipótese (**Fig. 48 e 49**).

A **Figura 46 (A, B, C e D)** indicam a infecção dos macrófagos após 15 min pelas células planctônicas da cepa EH-315 de *H. capsulatum*. Observa-se que o fungo (vermelho) se encontra aparentemente na superfície celular, comprovado pelos cortes **A** e **B** (setas brancas). O corte **B** representa a área nuclear, e é possível visualizar que não há leveduras ao seu redor, o que provavelmente indica a não internalização do fungo no citosol. A **Figura 46D** representa a imagem em três dimensões (3D). Nota-se a formação de pequenos aglomerados de leveduras semelhantes à biofilmes.

A **Figura 46 (E, F, G e H)** indicam a infecção pelas células derivadas de biofilme da cepa EH-315 de *H. capsulatum* no mesmo período de tempo (15 min). Os mesmos resultados encontrados na **Figura 46 (A, B, C e D)** foram visualizados, no entanto, aparentemente, nota-se uma maior aglomeração fúngica na superfície celular (**Figura 46H** – setas) quando comparado à infecção pelas células planctônicas (**Figura 46D**).

Com relação à morfologia geral dos macrófagos, observa-se uma evidente destruição dos núcleos, observadas pelas manchas em azul (Hoechst) difusas no citoplasma da célula, o que provavelmente caracteriza mecanismos de apoptose (DEEPE et al., 2008). Também é possível observar um potencial movimento de membrana assemelhando-se ao englobamento dos aglomerados semelhantes à biofilmes por distensão da membrana plasmática e provável envolvimento do citoesqueleto de actina.

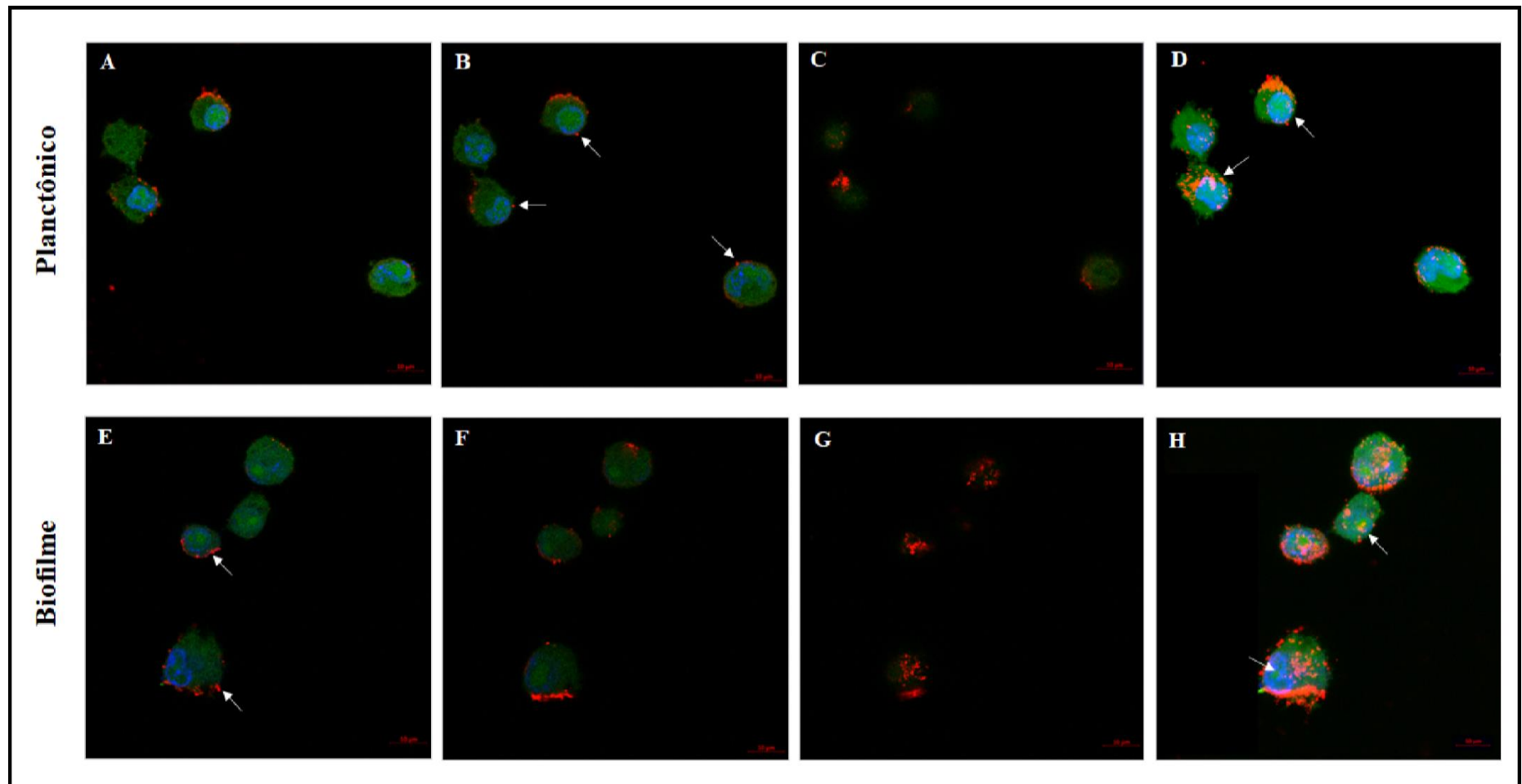
Figura 46. Infecção das células planctônicas da cepa EH-315 após 15 minutos de infecção (**A**, **B**, **C** e **D**). A seta branca na imagem **A**, indica que o fungo aparentemente se encontra na superfície celular, como também é possível verificar na imagem **B**. As letras **E**, **F**, **G** e **H** indicam a infecção pelas células derivadas de biofilme da mesma cepa e com o mesmo período de incubação. As setas nas imagens **E** e **F** indicam que o fungo também se encontra na superfície celular. A figura **D** e **H** representam a imagem da infecção em 3 dimensões (3D) e as setas indicam aglomerados de leveduras em volta da superfície do macrófago. Nota-se potencialmente uma maior aglomeração fúngica na superfície celular na infecção pelas células derivadas de biofilme quando comparado à infecção pelas células planctônicas.



Após 1 h de infecção, aparentemente já é possível observar a internalização de algumas células planctônicas pelo *H. capsulatum*, como apontado pelas setas brancas na **Figura 47 (B e D)**. Na **Figura 47D**, a coloração alaranjada/rosada supostamente indica que o fungo, após esse período, encontra-se potencialmente em contato com o invólucro nuclear da célula hospedeira. Ressalta-se que mesmo sem passar pelo formato de biofilme as leveduras planctônicas aglomeram-se mais intensamente após 1 h de infecção. Além disso, o macrófago apresenta sinais de início de assincronia de divisão núcleo-citoplasma (dupla nucleação), o que provavelmente indica a reatividade do macrófago frente a infecção.

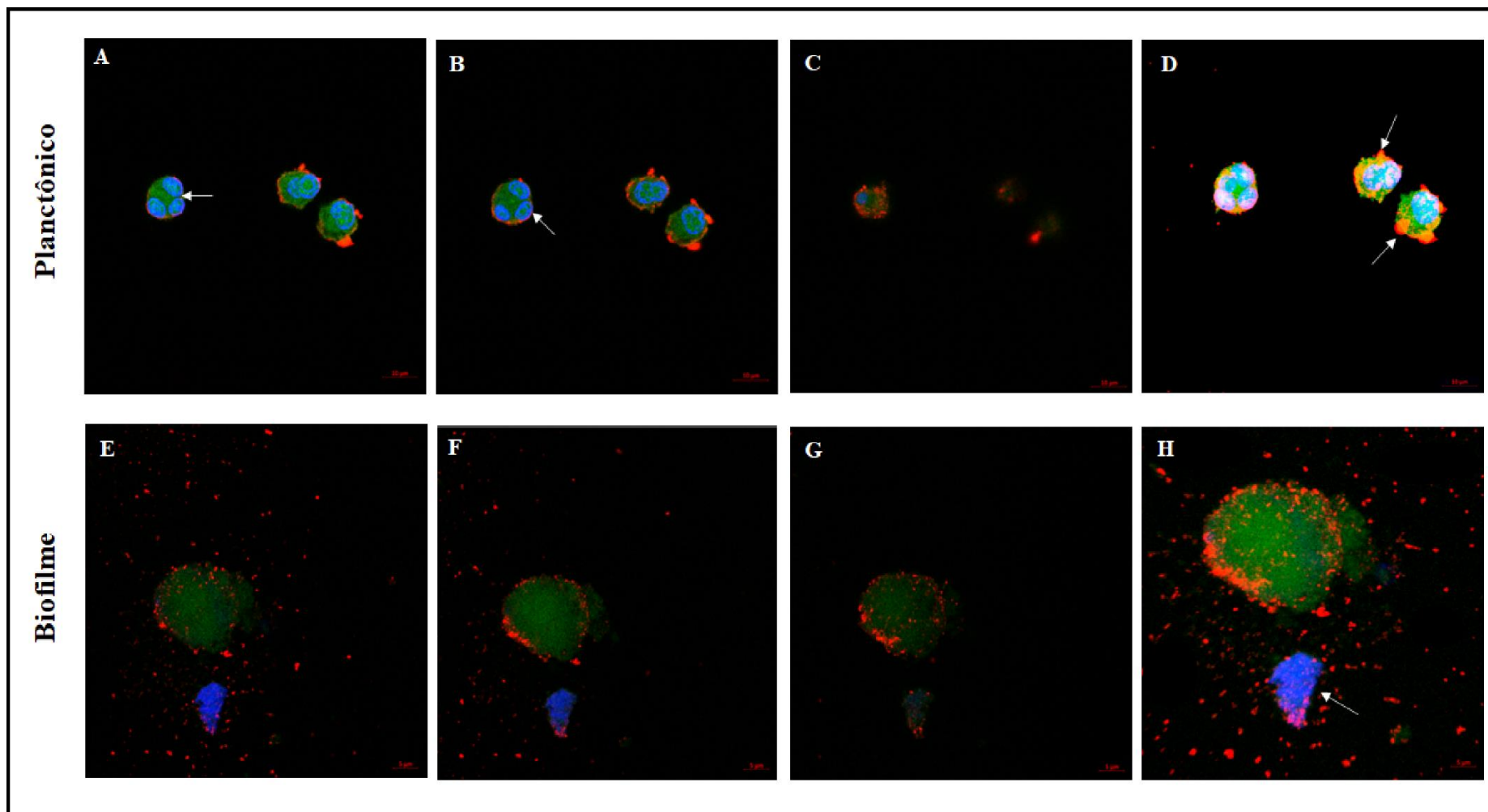
Já na infecção pelas células derivadas de biofilme após o mesmo período de tempo (1 h) (**Fig.47. E, F, G e H**) também observa-se aparentemente a internalização do fungo, devido à mudança de cor para rosa (**Fig. 47D**). Nota-se, uma alteração morfológica nuclear do macrófago potencialmente induzindo a descondensação dos nucleossomos evidentes e perceptíveis espaços intercromáticos. Esse suposto mecanismo corrobora com o estado de ativação do macrófago frente à infecção pelas células em biofilme, indicando provavelmente um potencial de infecção maior quando comparado a infecção pelas células planctônicas.

Figura 47. Infecção das células planctônicas da cepa EH-315 após 1 hora de infecção (**A, B, C e D**). As setas na Fig. **B e D** indicam que o fungo se encontra potencialmente dentro do núcleo da célula, o que é comprovado pela coloração alaranjada/rosada. A infecção pelas células derivadas de biofilme da mesma cepa com 1 hora de infecção (**E, F, G e H**). A seta na imagem **H** também indica que o fungo aparentemente se encontra no núcleo celular, devido a mudança na coloração para rosa, indicando uma invasão, além de apresentar uma potencial descondensação dos nucleossomos evidentes e perceptíveis espaços intercromáticos no núcleo (seta), o que revela a reatividade do macrófago infectado, indicando provavelmente um potencial de infecção maior.



A **Fig. 48. A, B, C e D** mostra a infecção pelas células planctônicas da cepa EH-315 após 5 hrs. É possível observar a formação de aglomerados densos internalizados nos macrófagos causando evidentemente um sofrimento celular. Além disso, nota-se um fenômeno de assincronia de divisão núcleo-citoplasma verificado pelo aumento do número de núcleos. Já a **Fig. 48. E, F, G e H** mostra a infecção pelas células derivadas de biofilme após 5 hrs. Observou-se o rompimento do macrófago com expulsão nuclear e espalhamento das leveduras, que aparentemente encontram-se aglomeradas tanto no citoplasma quanto no núcleo. Esse evento, provavelmente, causou a destruição total da célula macrofágica numa extrusão do interior para o exterior do citosol.

Figura 48. Infecção pelas células planctônicas da cepa EH-315 com 5 horas de infecção (**A**, **B**, **C** e **D**). As setas apontam os aglomerados celulares na superfície e núcleo dos macrófagos (**D**). Nota-se um fenômeno de sincronia núcleo-citoplasma verificado pelo aumento do número de núcleos (**A** e **B**). Infecção após 5 horas pelas células derivadas de biofilme (**E**, **F**, **G** e **H**). A seta na figura **H** indica o rompimento do macrófago com expulsão nuclear e espalhamento das leveduras que se encontram aglomeradas tanto no citoplasma quanto no núcleo.



Após 24 hrs de infecção pelas células planctônicas (**Fig. 49. A, B, C e D**) e derivadas de biofilme (**Fig. 49. E, F, G e H**), observa-se potencialmente que alguns macrófagos também se encontram em sofrimento e outros já em processo de morte celular com visível fragmentação nuclear, o que possivelmente caracterizaria processo de apoptose (PITANGUI et al., 2016). De acordo com Macoris et al., 2006, a morte de células com leveduras de *P. brasiliensis* internalizadas pode conceder a disseminação do fungo para órgãos e tecidos antes não colonizados. Além disso, conforme já relatado anteriormente, na infecção pelas células derivadas de biofilme, nota-se uma distorção da membrana plasmática potencialmente recrutada pela polimerização de actina com o intuito de realizar a fagocitose. A **Fig. 50** representa o controle de macrófagos alveolares murinos AMJ₂-C11 não infectados (**A**) e o controle da cepa EH-315 de *H. capsulatum* (**B**).

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**). Para as duas condições as setas indicam macrófagos aparentemente em sofrimento e outros já em processo de morte celular, com visível fragmentação nuclear, que possivelmente caracterizaria processo de apoptose. Nota-se uma distorção da membrana plasmática na infecção pelas células derivadas de biofilme com o intuito de realizar a fagocitose (**H**).

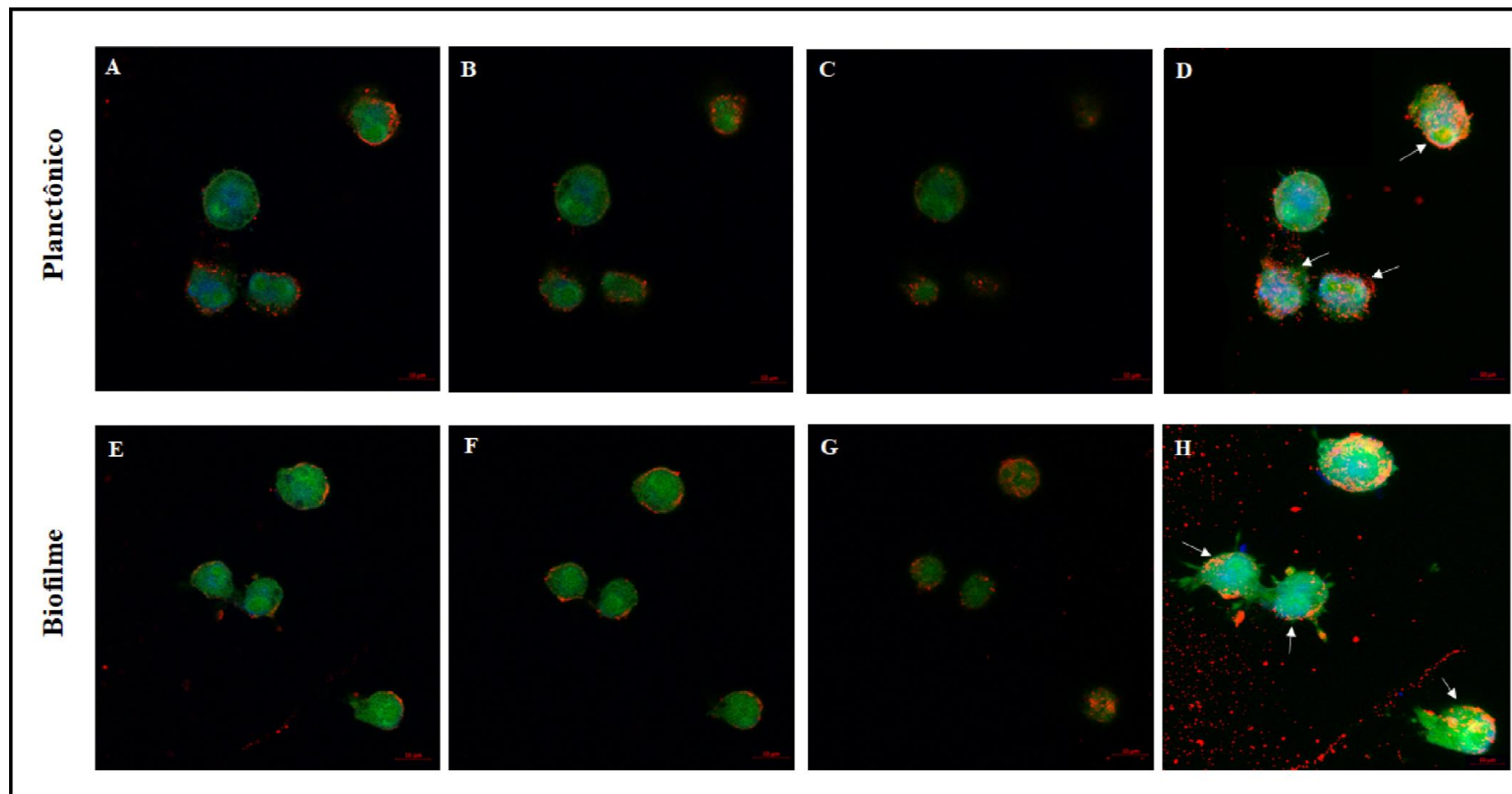
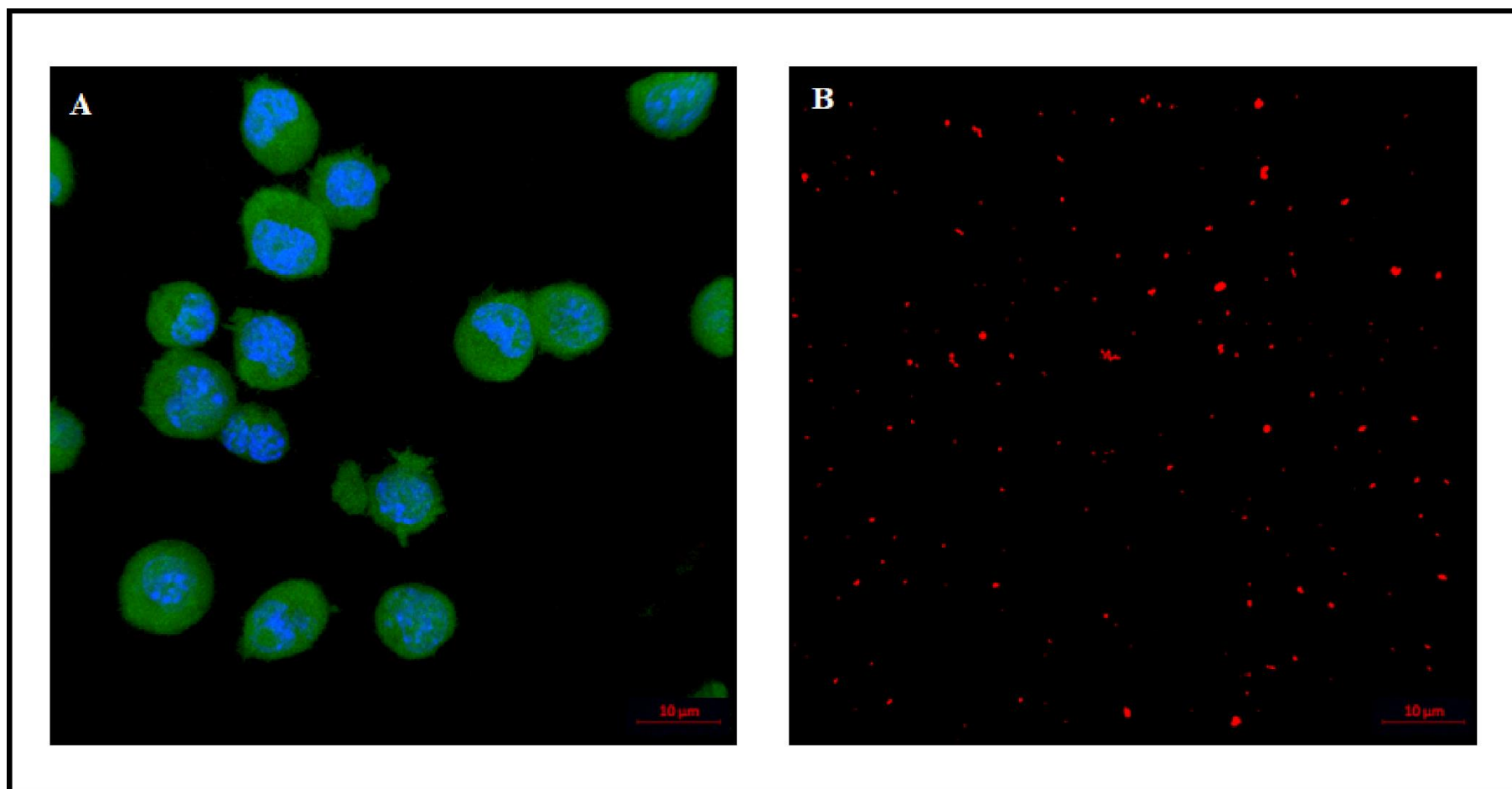


Figura 50. Controle de macrófagos alveolares murinos AMJ2-C11 (**A**) e controle da cepa EH-315 de *H. capsulatum* (**B**).

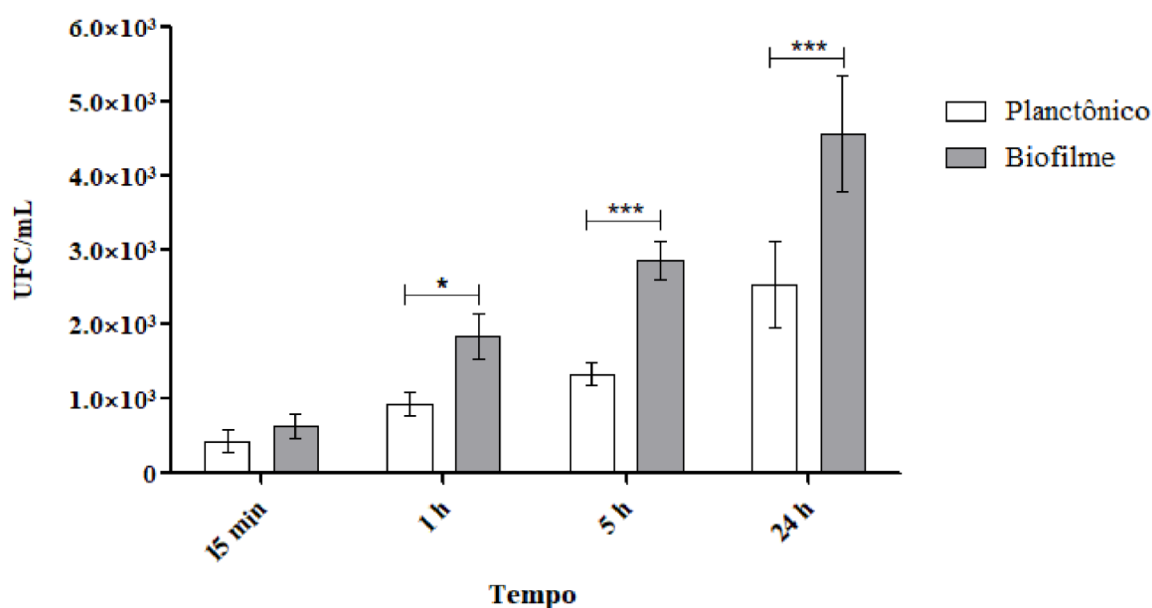


4.3.3. Taxa de infecção de células planctônicas e derivadas de biofilme de *H. capsulatum* em macrófagos AMJ2-C11 por contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL).

A taxa de infecção de células planctônicas e derivadas de biofilme da cepa EH-315 de *H. capsulatum* em macrófagos AMJ₂-C11 foi avaliada de forma comparativa e determinada através da contagem de UFC/mL (**Fig. 51**). É possível observar que a taxa de infecção foi crescente nos períodos de infecção de 15 min, 1 h, 5 hrs e 24 hrs, tanto na infecção pelas células planctônicas quanto pelas células derivadas de biofilme. Além disso, nota-se que em ambas as condições testadas, a maior taxa de infecção (UFC/mL) ocorre no tempo de 24 hrs de infecção com as células AMJ₂-C11.

Ao compararmos as duas condições de infecção, observou-se maior quantidade de unidades formadoras de colônias nas células infectadas por células derivadas de biofilme após 1, 5 e 24 h de incubação quando comparado à infecção pelas células planctônicas, o que nos leva a crer que há maior adesão e internalização do fungo originado da condição de biofilme ($p < 0,05$ e $p < 0,001$).

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. Significância estatística: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Valores demonstrados referentes a três experimentos independentes.



A interação de leveduras de *H. capsulatum* com macrófagos é crucial para patogênese da histoplasmose, visto que este fungo é considerado um patógeno intracelular facultativo, capaz de aderir e invadir células hospedeiras como, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células epiteliais (PITANGUI et al., 2016). No organismo do hospedeiro os macrófagos são a primeira linha de defesa que respondem ao fungo (NOSANCHUCK et al., 2012). Uma vez fagocitado o patógeno pode sobreviver e proliferar dentro do compartimento fagossomal de macrófagos, que atuam como um carreador translocando o fungo para os linfonodos e, posteriormente à corrente sanguínea, disseminando-se para outros órgãos (GUIMARÃES et al., 2011).

Alguns estudos têm revelado uma série de fatores produzidos por *H. capsulatum* que subvertem as defesas do hospedeiro e facilitam a internalização e proliferação intracelular das leveduras (GARFOOT; RAPPLEYE, 2016). Além disso, a maioria dos estudos de *H. capsulatum* tem demonstrado interesse na fagocitose ou enfoca a resposta imune. Entretanto, as evidências de que leveduras de *H. capsulatum* podem formar biofilme *in vitro*, bem como aderir a pneumócitos (PITANGUI et al., 2012), endotélio humano (LEDKE et al., 2012), órgãos criopreservados de morcegos (SUAREZ-ALVAREZ et al., 2010), válvulas protéticas (LORCHIRACHONKUL et al., 2013) e formar agregados ao redor do núcleo de macrófagos alveolares (PITANGUI et al., 2016), chamam a atenção para a importância da adesão e invasão de *H. capsulatum* frente à colonização, disseminação e estabelecimento da doença.

Sabe-se que a adesão as células do hospedeiro é o primeiro passo na colonização e formação de biofilmes, que são considerados um importante problema clínico relacionado a persistência da doença, resistência antifúngica e aumento no índice de mortalidade (KOWALSKI et al., 2019). Por meio de resultados preliminares e principalmente com os obtidos no presente trabalho, levantamos a hipótese de que as leveduras em formato biofilme podem adquirir características mais virulentas, específicas dessas comunidades, e que ainda, podem carregar modificações na expressão gênica, favorecendo a persistência durante a infecção no hospedeiro.

Um estudo anterior conduzido pelo nosso grupo mostrou através de técnicas microscópicas que células planctônicas da cepa EH-315 de *H. capsulatum* apresentaram tropismo pelo núcleo celular, sendo visualizadas em grupamentos ao redor do núcleo após 5 hrs de infecção em macrófagos alveolares. Esses dados podem estar relacionados a uma nova estratégia de sobrevivência intracelular adotada por *H. capsulatum* (PITANGUI et al., 2016).

Com relação as imagens de microscopia confocal os resultados complementam o que foi observado nas imagens adquiridas pelo *IN Cell Analyzer 2000* e na análise de intensidade de fluorescência da proteína Hsp60 reveladas acima. As análises evidenciaram a formação de aglomerados de leveduras mais intensos na infecção pelas células derivadas de biofilme, causando aparentemente danos mais agressivos à célula hospedeira, o que possivelmente poderia resultar em uma infecção persistente (PITANGUI et al., 2016). Miranda e colaboradores (2019) por meio de ensaios de co-cultura utilizando dois modelos experimentais avaliou a interação de biofilmes iniciais e maduros de *C. albicans* com macrófagos alveolares. Os resultados demonstraram que a interação entre biofilmes iniciais e macrófagos resultou em uma diminuição na formação de biofilme, enquanto na interação entre biofilmes maduros e macrófagos houve uma formação crescente de biofilme.

Este estudo evidenciou que as células derivadas do biofilme de *H. capsulatum* tem capacidade distinta para infectar macrófagos alveolares. Lee e colaboradores (2019) demonstraram que células derivadas de biofilme de *C. neoformans* têm maior dificuldade de serem fagocitadas por macrófagos, além de apresentarem um aumento significativo na cápsula, modificações em sua superfície e liberação de grande quantidade de polissacarídeos, sugerindo que as células com esse fenótipo podem ser difíceis de serem erradicadas pelas células do hospedeiro. Embora seja necessário a realização de estudos em modelos *in vivo* para compreender os mecanismos de virulência entre células derivadas de biofilme e células planctônicas de *H. capsulatum*, estudos utilizando *Galleria mellonella* como modelo de infecção revelam que células do biofilme de espécies de *Cryptococcus* podem contribuir para a virulência do fungo (Benaducci et al., 2016).

4.4. ENSAIO DE FORMAÇÃO DO BIOFILME DE *H. capsulatum* em pH ácido

4.4.1. Determinação da viabilidade celular do biofilme pelo ensaio de redução do XTT

A fim de averiguar a capacidade de *H. capsulatum* em formar biofilme em ambiente ácido, mimetizando o ambiente intracelular no macrófago, os biofilmes também foram caracterizados em diferentes condições fisiológicas de pH. A cinética da viabilidade celular dos biofilmes formados em diferentes condições fisiológicas de pH (neutro e ácido) pela cepa EH-315 é mostrada na **figura 52**. Até as 120 horas, houve um ligeiro aumento na viabilidade celular de ambos os biofilmes. Após as 120 horas, a viabilidade celular teve um aumento substancial até o período de 144 horas, e atinge um *plateau*, portanto o período de 144 horas foi considerado o tempo ideal de maturação dos biofilmes de *H. capsulatum* em ambas as

condições fisiológicas de pH. A viabilidade celular dos biofilmes maduros (144h) formados nas diferentes condições fisiológicas de pH foram comparadas (**Fig. 53**). O pH ácido (4.5) propiciou a formação dos biofilmes, no entanto, quando comparado aos biofilmes crescidos em pH 7.2, a viabilidade celular foi ligeiramente menor a partir de 120 h ($p < 0,001$).

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. Significância estatística: *** $p < 0,001$.

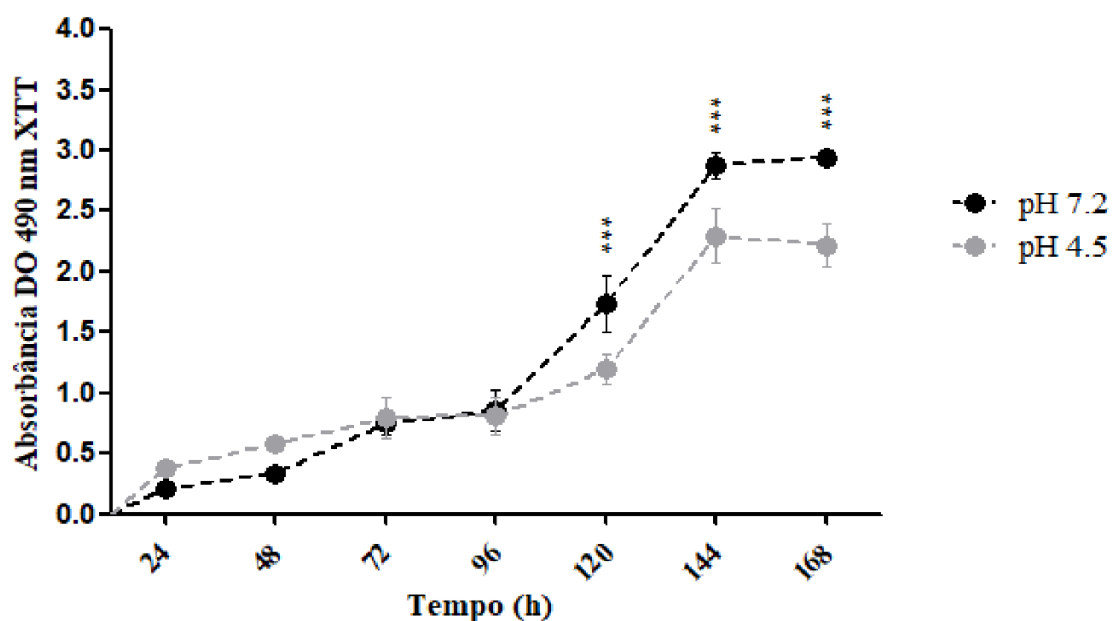
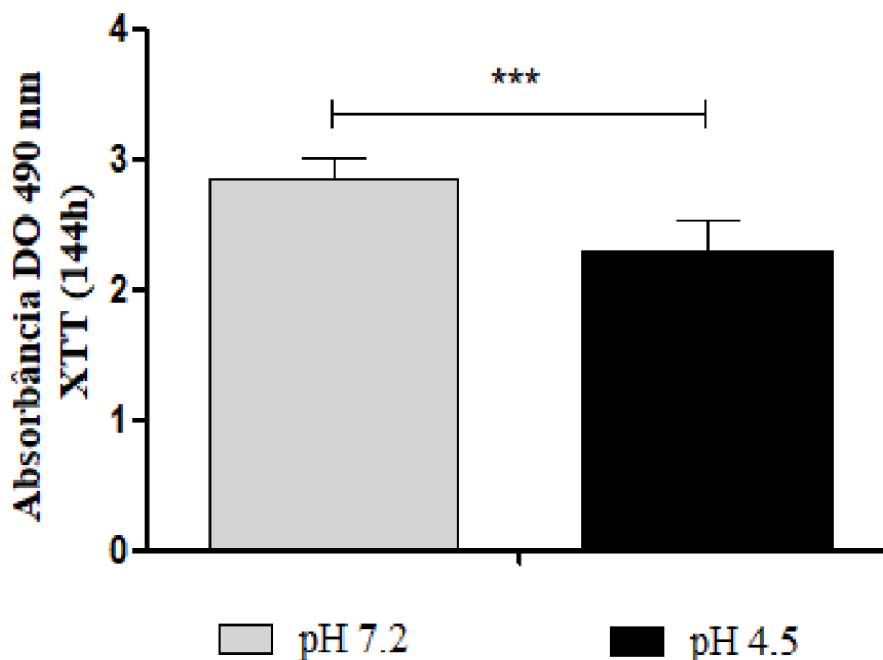


Figura 53. Comparação da viabilidade celular do biofilme maduro da cepa EH-315 de *H. capsulatum* em diferentes condições fisiológicas de pH obtida pelo ensaio de redução do XTT. Significância estatística: *** $p < 0,001$.



4.4.2. Quantificação da massa do biofilme por coloração com Cristal Violeta

A quantificação da massa dos biofilmes foi feita por coloração com cristal violeta. A **Fig. 54** mostra que de acordo com os resultados do ensaio de XTT, os biofilmes apresentaram um desenvolvimento de biomassa até as primeiras 144 horas. Após esse período o desenvolvimento da biomassa manteve-se constante em ambas as condições testadas. Os biofilmes formados pela cepa EH-315 de *H. capsulatum* em pH ácido (4.5) produziram menor quantidade de biomassa após 144 horas de incubação que os biofilmes formados em pH neutro (7.2) ($p < 0,001$) (**Fig. 55**).

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. Significância estatística: * $p < 0,5$ e *** $p < 0,001$.

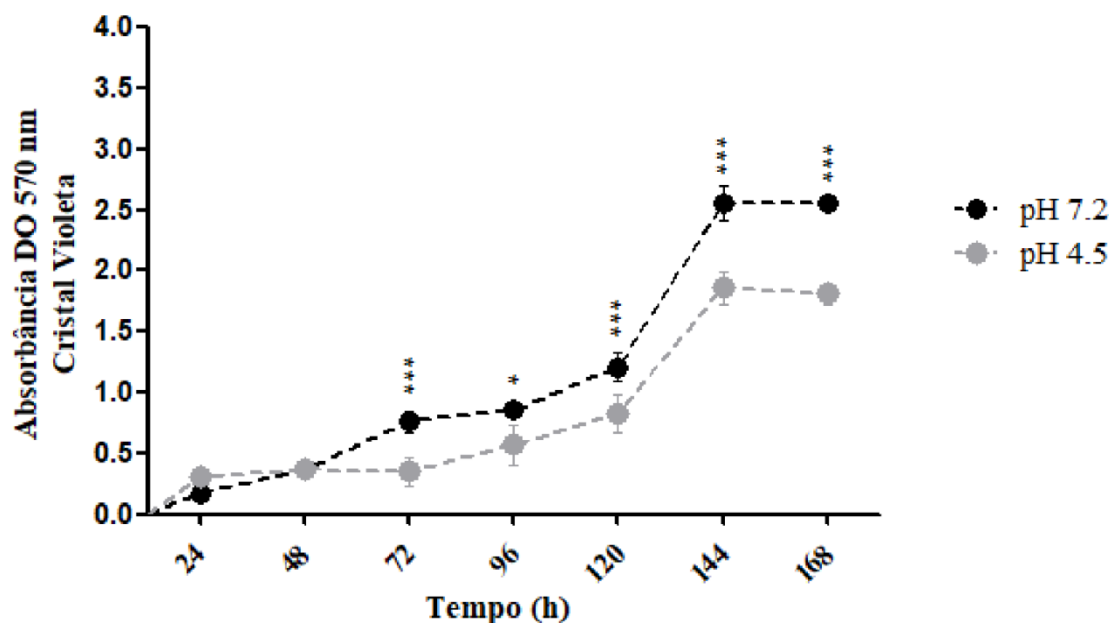
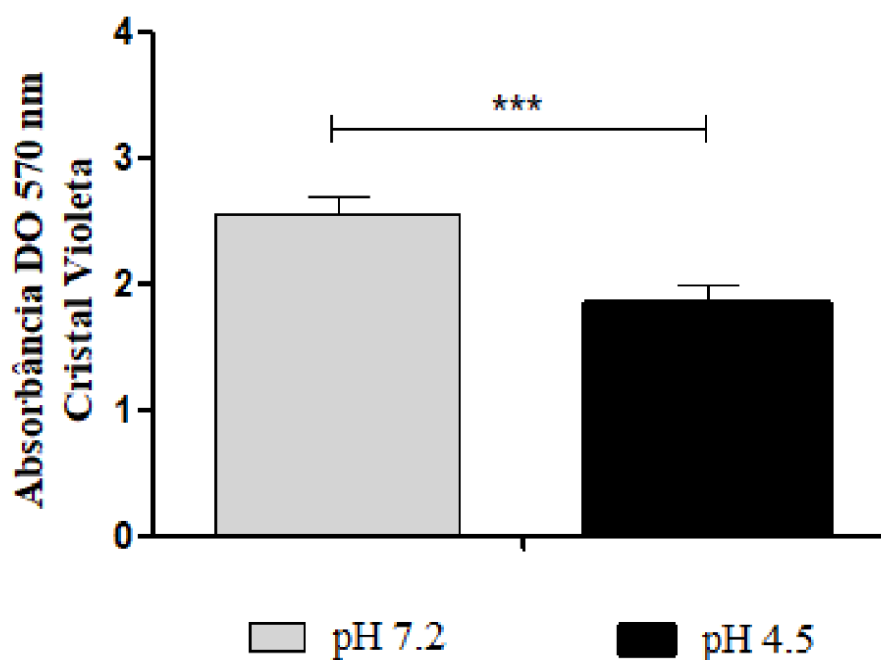


Figura 55. Comparação do desenvolvimento da biomassa dos biofilmes maduros da cepa EH-315 de *H. capsulatum* em diferentes condições fisiológicas de pH através da coloração por cristal violeta. Significância estatística: *** $p < 0,001$.



4.4.3. Quantificação da matriz extracelular e estruturas polissacarídicas por coloração com Safranina

Os resultados da cinética da quantificação das estruturas polissacarídicas e das matrizes extracelulares foram determinadas pela coloração com safrania (**Fig. 56**), bem como a influência do pH na formação de material polissacarídico e matriz extracelular do biofilme maduro (**Fig. 57**). Como nos resultados da quantificação da viabilidade celular e desenvolvimento da biomassa, as comunidades formadas em pH ácido (4.5) apresentaram menor quantidade de material polissacarídico e matriz extracelular comparativamente ao pH neutro (7.2) ($p < 0,001$).

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. Significância estatística: *** $p < 0,001$.

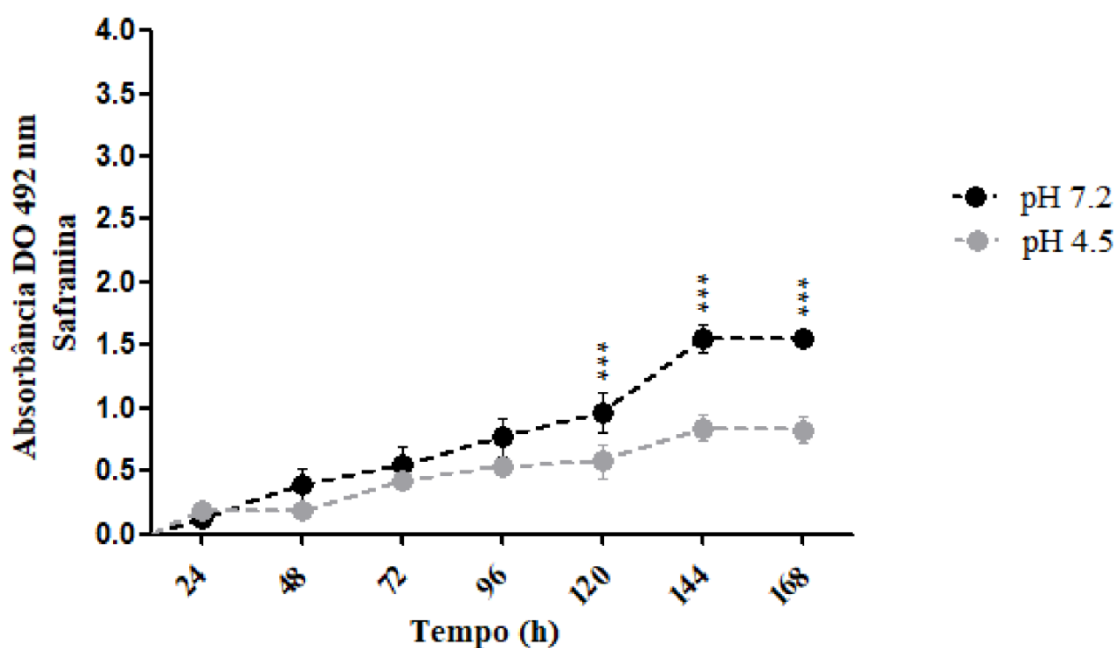
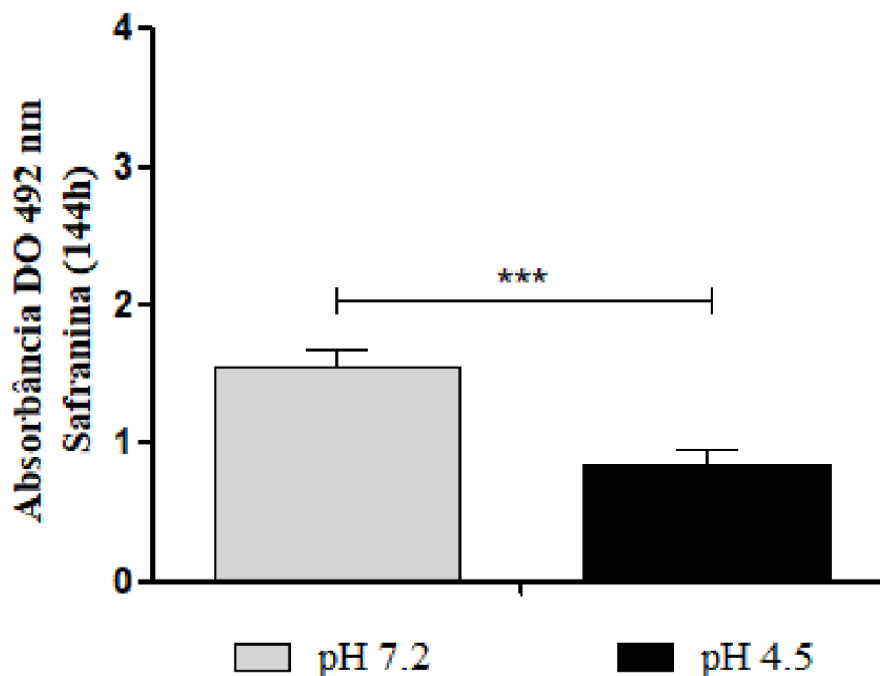


Figura 57. Comparação da quantidade de matriz extracelular e estruturas polissacarídicas produzidas pelos biofilmes maduros da cepa EH-315 de *H. capsulatum* em diferentes condições fisiológicas de pH através da coloração com safranina. Significância estatística: *** $p < 0,001$.



4.4.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos biofilmes formados em pH ácido

Para melhor visualização da topografia dos biofilmes maduros da cepa EH-315 de *H. capsulatum* formados em pH ácido (4.5), foi realizada a MEV. A **Fig. 58** mostra as topografias dos biofilmes maduros formados em pH ácido (**A, B e C**) e pH neutro (**D, E e F**). Observa-se que o biofilme formado em pH ácido (4.5) aparenta-se ser menos denso e com menor quantidade de matriz extracelular quando comparado ao biofilme formado em pH neutro (7.2).

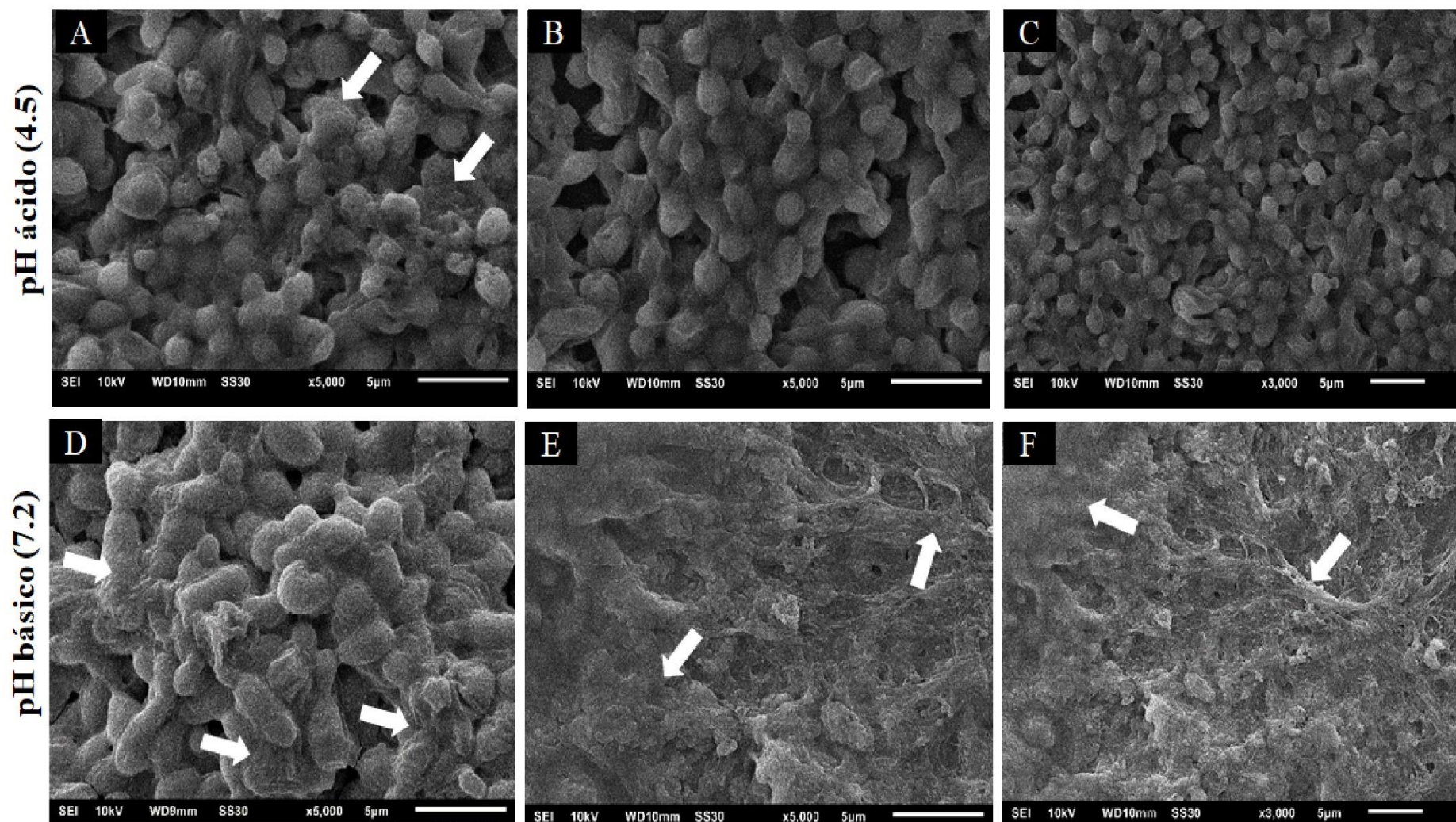
Os resultados da MEV complementam os resultados observados na quantificação dos biofilmes. O pH ácido propiciou a formação de biofilme maduro mesmo apesar de serem ligeiramente mais "fracos" com menor viabilidade celular, biomassa e matriz extracelular a partir de 120 horas, comparativamente aos biofilmes formados em pH neutro (7.2).

Embora as duas condições fisiológicas de pH (ácido/neutro) testadas tenham proporcionado o desenvolvimento de biofilmes de *H. capsulatum*, o pH neutro foi superior ao pH ácido. Perfil semelhante foi observado por Ravi et al., 2009 para os biofilmes de *C. neoformans* formados em pH neutro, sugerindo que condições semelhantes as observadas em seu *habitat* natural podem ser mais favoráveis a formação de biofilme. Outros autores

descreveram que o pH neutro favorece a formação do biofilme, bem como a colonização de *C. tropicalis* (FERREIRA et al., 2016). Além disso, estudo conduzido por Gonçalves et al., 2020 revelaram que biofilmes formados por *C. albicans* e *C. glabrata* se desenvolvem melhor em ambiente neutro comparado ao ambiente ácido produzindo maior quantidade de matriz extracelular.

Visto que *H. capsulatum* é um patógeno intracelular, capaz de sobreviver no ambiente intracelular de macrófagos, verificar a habilidade desse fungo em formar biofilme em ambiente ácido é de extrema importância. Neste contexto, os resultados obtidos sugerem fortes indícios de que a capacidade de sobreviver e multiplicar-se dentro de macrófagos pode estar relacionada a formação de biofilmes intracelulares como uma estratégia adotada por *H. capsulatum* frente as condições de acidificação. Entretanto, mais estudos são necessários para compreender esses achados.

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**). As setas apontam a matriz extracelular. Nota-se que o biofilme formado em pH ácido (4.5) aparenta-se ser menos denso e com menor quantidade de matriz extracelular.



4.5 ANÁLISE PROTEÔMICA

4.5.1. Determinação das proteínas totais

A quantidade de proteínas totais presentes nas amostras foi determinada pelo método de Bradford que consiste na interação entre as moléculas de azul de Coomassie G250 e os grupos ácidos ou básicos das proteínas. Este reagente se liga preferencialmente aos resíduos de aminoácidos básicos e aromáticos. Os resultados das concentrações de proteínas totais nas amostras de *H. capsulatum* em crescimento planctônico, biofilme, bem como em macrófagos infectados com células derivadas de biofilme da cepa EH-315 de *H. capsulatum* estão descritas na **Tabela 1**.

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.

		N° 1		N° 2		N° 3	
		DO (595nm)	Concentração de proteínas (µg/µl)	DO (595nm)	Concentração de proteínas (µg/µl)	DO (595nm)	Concentração de proteínas (µg/µl)
Microrganismo	Condição						
Cepa EH-315 de <i>H. capsulatum</i>	Planctônico	1,455	7285	1,571	8075	1,771	9429
Cepa EH-315 de <i>H. capsulatum</i>	Biofilme	0,853	3204	1,260	5966	1,095	4846
Células de macrófagos J774 A.1 + células derivadas de biofilme da cepa EH-315 de <i>H. capsulatum</i>	Infecção	0,558	1200	0,466	579	0,439	392

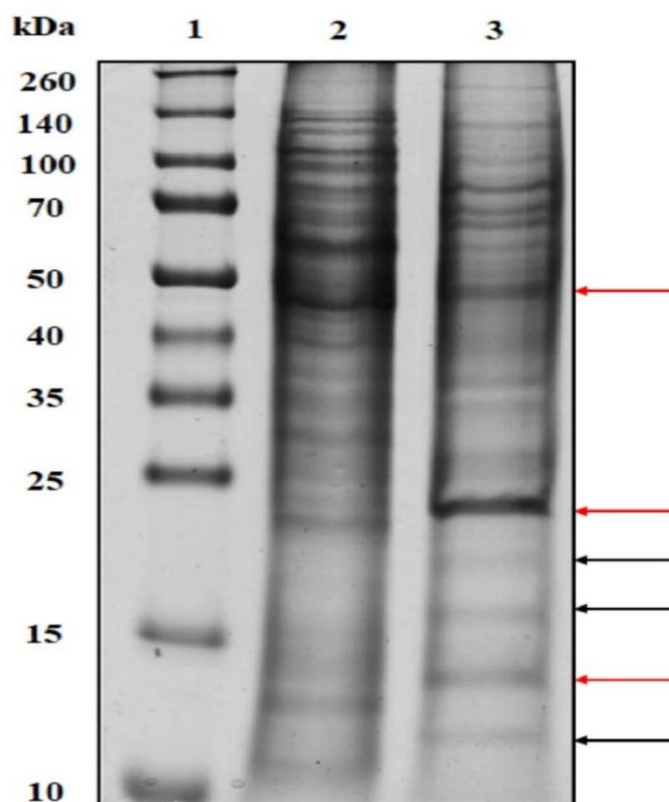
N° = número de amostra; DO = Densidade óptica.

4.5.2. Análise do perfil proteico por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

A **figura 59** refere-se à análise por SDS-PAGE dos componentes totais da cepa EH-315 de *H. capsulatum* sob condições planctônicas e em biofilme. Foi possível verificar que aparentemente o perfil eletroforético demonstrou diferenças significativas quanto a intensidade das bandas (apontadas pelas setas em vermelho), com massas moleculares correspondentes à faixa entre 50 e 10 kDa. Além disso, nota-se também o aparecimento de 3 bandas exclusivas no biofilme quando comparado ao crescimento planctônico (apontadas pelas setas em preto) e que compreendem proteínas que encaixam-se nas massas entre 24 à 10 kDa.

A técnica empregada para visualização das bandas, utilizando Azul de Coomassie G-250, pareceu ser reprodutível e compatível com a espectrometria de massas para as amostras do crescimento planctônico e biofilme. Além disso, permitiu a visualização de um grande número de proteínas, visto que consiste em um método sensível capaz de detectar proteínas em concentrações baixas (Candiano et al., 2004). No entanto, a análise SDS-PAGE não possibilitou a revelação de bandas nas amostras de infecção pelas células derivadas de biofilme em macrófagos. Dessa forma, esses dados não foram suficientes para conceder um perfil completo das proteínas diferencialmente expressas, sendo então, necessária a realização da proteômica por *shotgun* para melhor identificação e posterior análise da função das mesmas.

Figura 59. SDS-PAGE dos componentes proteicos da cepa EH-315 de *H. capsulatum* sob condições planctônicas e em biofilme. **1:** representa o padrão de massa molecular; **2:** corresponde as células de levedura de *H. capsulatum* sob condições planctônicas e **3:** corresponde as células de levedura de *H. capsulatum* em formato biofilme. Os números à esquerda correspondem à massa molecular (kDa) dos padrões. As setas vermelhas indicam diferenças na intensidade das bandas e as setas pretas apontam bandas exclusivas.



4.5.3. Análise proteômica por *shotgun*

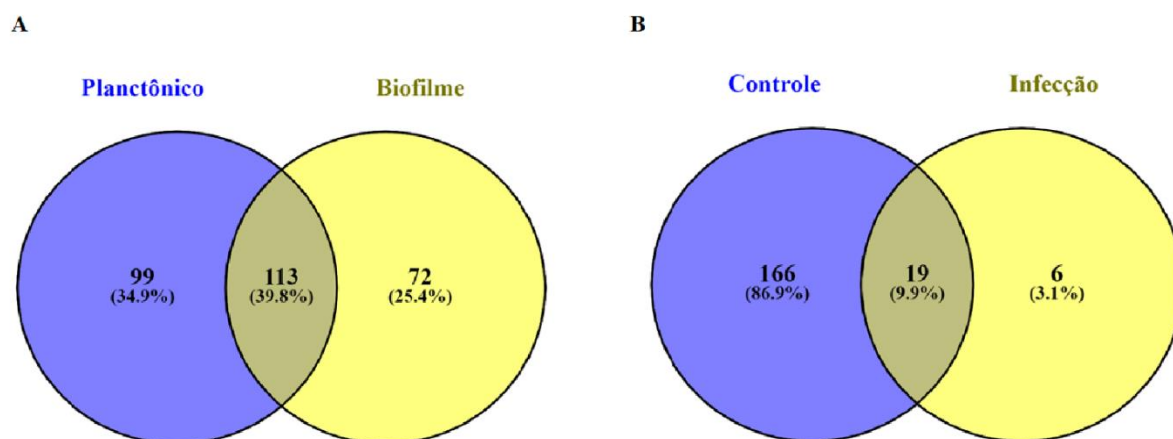
Neste trabalho a estratégia proteômica utilizada baseou-se no método *shotgun* para análise comparativa de proteínas obtidas de biofilme e células planctônicas de *H. capsulatum*, bem como para descobrir diferenças importantes de células derivadas de biofilme de *H. capsulatum* durante a infecção em macrófagos. Neste contexto, a identificação de proteínas através da análise diferencial, permitirá elucidar importantes mecanismos envolvidos na patogênese de *H. capsulatum*, e o conhecimento de moléculas envolvidas nas condições de infecção podem ajudar no melhor entendimento do processo de interação entre o patógeno e o hospedeiro.

As proteínas extraídas durante a lise celular foram precipitadas e digeridas em solução de tripsina para gerar misturas de peptídeos complexos. Os peptídeos produzidos por digestão com tripsina foram então separados e introduzidos em um espectrômetro de massas, em que suas relações massa/carga (m/z) são medidas e os espectros de fragmentação são criados. As

sequências de peptídeos e as proteínas foram subsequentemente identificadas por ferramentas de bioinformática. A análise identificou um total de 212 proteínas no crescimento planctônico (**Tabela 3, Anexo 2**), 185 proteínas em biofilme (**Tabela 4, Anexo 2**) e 25 proteínas em condição de infecção com as células derivadas de biofilme em macrófagos J774 A.1 (**Tabela 6, Anexo 2**).

Nas análises comparativas de dados visando a detecção de proteínas exclusivas foi possível a detecção de 113 proteínas em comum entre as condições de crescimento planctônico vs. biofilme, 99 proteínas exclusivas no crescimento planctônico e 72 proteínas exclusivas em biofilmes (**Fig. 60A**). Já em condição de infecção com as células derivadas de biofilmes em macrófagos alveolares J774 A.1 foram detectadas 19 proteínas em comum entre a condição controle (biofilme da cepa EH-315 de *H. capsulatum* na condição controle) vs. infecção, 166 proteínas exclusivas no controle e 6 proteínas exclusivas na infecção (**Fig. 60B**). As proteínas exclusivas foram identificadas e classificadas em categorias funcionais (**Tabela 3, 4, 5 e 6, Anexo 2**).

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.



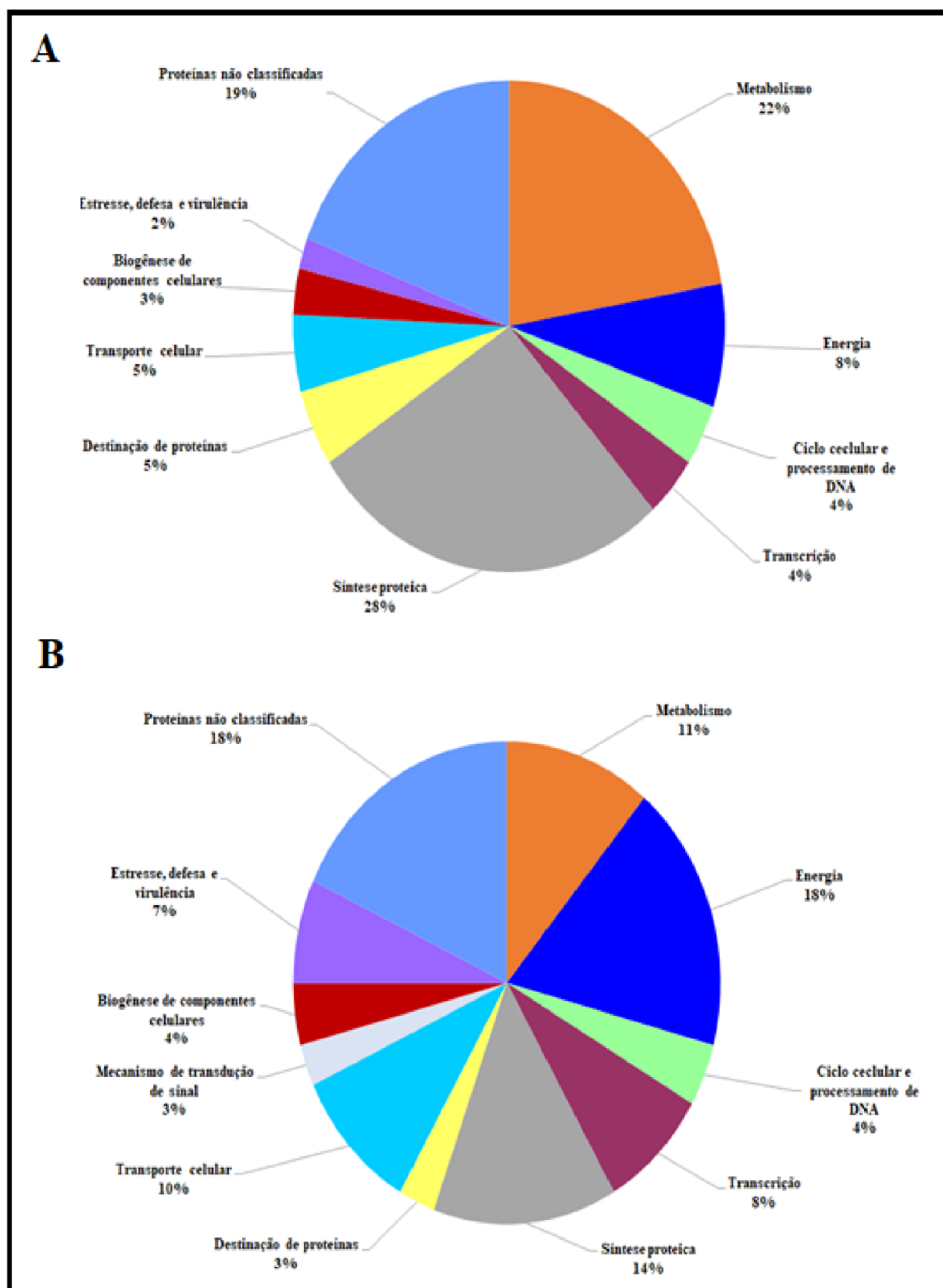
4.5.4. Análise funcional das proteínas exclusivas no crescimento planctônico e em biofilmes de *H. capsulatum*

As proteínas exclusivas detectadas no crescimento planctônico e em biofilme (**Tabela 4 e 5, Anexo 2**) foram classificadas de acordo com as categorias funcionais, com base no banco de dados Uniprot. A **fig. 61A** mostra que a maioria das proteínas exclusivas identificadas no crescimento planctônico estava relacionada à síntese de proteínas (27; 27%),

seguida pelo metabolismo (22; 22%), energia (8; 8%), destinação de proteínas (5; 5%), transporte celular (5; 5%), ciclo celular e processamento de DNA (4; 4%), transcrição (4; 4%), biogênese de componentes celulares (3; 3%) e estresse, defesa e virulência (2; 2%). Foram ainda identificadas 19 proteínas (19%) com função desconhecida descrita na literatura. Já a **fig. 61B** revela que a maioria das proteínas exclusivas detectadas em biofilme estava relacionada à energia (13; 18%), seguida pela síntese de proteínas (10; 14%), metabolismo (8; 11%), transporte celular (7; 10%), transcrição (6; 8%), estresse, defesa e virulência (5; 7%), biogênese de componentes celulares e ciclo celular e processamento de DNA (3; 4%), destinação de proteínas e mecanismo de transdução de sinal (2; 3%). Além destas, foram identificadas 13 proteínas (18%) que apresentam função desconhecida.

Entre as 72 proteínas identificadas exclusivamente em biofilme, destacamos alguns grupos funcionais que apresentam um aumento do número das proteínas quando comparado ao crescimento em condições planctônicas que são relacionados a estresse, defesa e virulência (5; 7%) e proteínas relacionadas a produção de energia (13; 18%) (**Fig. 61B**). Desta categorização, nossos dados mostram que a maioria das proteínas de estresse, defesa e virulência está envolvida ao estresse oxidativo, como *Catalase*, *Peroxidase* e *30 kDa Heat shock protein* (Hsp30), além da proteína *Carbonic anhydrase* e *Aldehyde dehydrogenase* (**Tabela 4, Anexo 2**).

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.



A literatura reporta que a ativação da resposta ao estresse oxidativo é uma hipótese que foi proposta para explicar o aumento da resistência em biofilmes microbianos. Neste contexto, nossos dados mostram a identificação de proteínas antioxidantes exclusivas no biofilme de *H. capsulatum* que podem representar um mecanismo de defesa contra espécies reativas de O₂ (ROS) (SERRANO-FUJARTE; LÓPEZ-ROMERO; CUÉLLAR-CRUZ, 2016; TAMAYO et al., 2017). Estudos conduzidos por Seneviratne e colaboradores (2008) mostraram que proteínas diferencialmente expressas entre condições de crescimento planctônico vs. biofilme estão relacionadas à resposta ao estresse oxidativo, conferindo capacidade antioxidante ao biofilme de *C. albicans*.

Por exemplo, a Catalase é uma das enzimas mais importantes que respondem ao estresse oxidativo causado por ROS, foi identificada em biofilme e acredita-se que esteja relacionado a resistência antimicrobiana (SANTI et al., 2014). Segundo Johnson e colaboradores (2002) *H. capsulatum* expressa três genes Catalase: CatA, forma filamentosa, CatB, forma leveduriforme e CatP, expresso em ambas as formas. Interessantemente, leveduras de *H. capsulatum* que não possuem nenhuma das Catalases apresentaram deficiência na sobrevivência durante a infecção em macrófagos. Isso indica que durante a infecção o fungo expressa as Catalases como um sistema antioxidante para combater ROS derivadas do hospedeiro (BEYHAN; SIL, 2019). Além disso, estudos relacionados a biofilmes bacterianos têm indicado uma superexpressão da proteína Catalase em biofilme comparado ao crescimento planctônico, mostrando evidências de sua participação na proteção de ROS em biofilme (ACKER et al., 2013). Outra proteína identificada no proteoma do biofilme de *Histoplasma* caracterizada como um importante antioxidante celular e que também atua na proteção do fungo contra o estresse oxidativo é a Peroxidase.

Adicionalmente, as proteínas de choque térmico (Hsps) são chaperonas que desempenham funções biológicas importantes durante o processo infeccioso. Recentemente nosso grupo verificou a influência da proteína Hsp60 na formação do biofilme de *H. capsulatum*. De acordo com os resultados, foi observado uma redução na formação dos biofilmes quando tratado com o anticorpo anti-Hsp60, ressaltando a importância das proteínas de choque térmico na formação do biofilme e consequentemente no estabelecimento da infecção (FREGONEZI et al., 2021). Além disso, estudos relacionados a inibição da proteína Hsp90 tem indicado um aumento da atividade antifúngica dos azólicos contra a formação de biofilme e redução na virulência de espécies de *Cryptococcus*, sugerindo que a inibição desta

proteína pode ser uma estratégia importante no desenvolvimento de novos antifúngicos (CORDEIRO et., 2016).

Em relação as alterações na produção de energia foram identificadas proteínas que estão envolvidas na via glicolítica, metabolismo de piruvato, ciclo dos ácidos tricarboxílicos e transporte de elétrons e respiração (**Tabela 4, Anexo 2**). A *Alcohol dehydrogenase* desempenha um papel importante na fermentação e foi identificada no biofilme de *H. capsulatum*. Alguns estudos relatam que a deleção do gene *ADH1* em *C. albicans* apresentam redução na virulência em termos de adesão, formação de hifas e formação de biofilmes (SONG et al., 2019). *Pyruvate decarboxylase* e *Succinato dehydrogenase* também foram identificadas. Estudos relacionados a depleção de piruvato têm mostrado uma deficiência na formação de biofilmes por *Pseudomonas aeruginosa* (PETROVA et al., 2012). Além disso, a *Succinato dehydrogenase* é regulada positivamente nos biofilmes de *Staphylococcus aureus* (GAUPP et al., 2010). Também foi identificado um maior número de proteínas relacionadas a cadeia respiratória, que tem como função gerar energia em forma de ATP, destacando-se entre elas *Minor allergen Alt a 7*, *Cytochrome c oxidase subunit 1*, *Cytochrome b2*, *Fumarate reductase*, *V-type proton ATPase catalytic subunit A* e *Quinone oxidoreductase* (**Tabela 4, Anexo 2**). Sendo assim, a identificação dessas proteínas, provavelmente parecem ter um papel fundamental para obtenção de energia, garantindo assim a sobrevivência, a manutenção da arquitetura e estrutura dos biofilmes de *Histoplasma*. É importante ressaltar que nos últimos anos as proteínas de choque térmico, bem como as proteínas envolvidas no metabolismo da glicose são intensamente investigadas por serem consideradas potenciais alvos antifúngicos (GONG et al., 2017; EDKINS et al., 2018; CHEN et al., 2020).

Além das categorias funcionais mencionadas anteriormente, destacamos alguns grupos funcionais que apresentaram uma diminuição no número de proteínas envolvidas principalmente em processos celulares como síntese proteica (10; 14%) e metabolismo celular (8; 11%). Neste contexto, é possível verificar que embora a síntese de proteínas fosse ativada, muitas proteínas relacionadas à montagem de subunidades de ribossomo foram identificadas, consistente com o rendimento de proteínas reduzido no biofilme. Chong e colaboradores (2012) através de uma análise do proteoma de *C. gatti* durante o tratamento com fluconazol revelou uma diminuição da maioria das proteínas ribossomais, sugerindo que a manutenção da síntese do ribossomo foi afetada devido a desaceleração do metabolismo ativo e do crescimento celular. Dessa forma, hipotetizamos que a biossíntese de proteínas pode ser

afetada nos biofilmes de *H. capsulatum*, conforme também proposto pelas células bacterianas que crescem em biofilmes (KWAN et al., 2013).

Proteínas envolvidas no metabolismo de aminoácidos também foram identificadas, como *Adenosylhomocysteinase*, *Aminomethyltransferase*, *Vacuolar serine protease*, *Adenosine-5'-phosphosulfate kinase* e *Adenylyl-sulfate kinase* (**Tabela 4, Anexo 2**). Os microrganismos fúngicos, incluindo as leveduras patogênicas e os fungos filamentosos, são capazes de sintetizar todos os aminoácidos essenciais para o ser humano. Adicionalmente, numerosos estudos mostraram que a inibição da via de biossíntese de aminoácidos em fungos patogênicos provoca uma deficiência no crescimento celular e uma redução da virulência, sugerindo que esta via poder ser considerada uma importante fonte para alvos antifúngicos (JASTRZEŹBOWSKA; IWONA, 2015). Concordando com nossos resultados, foi observado uma diminuição de proteínas envolvidas no metabolismo do biofilme de *C. glabrata* (SENEVIRATNE et al., 2010) e *Streptococcus mutans* (RATHSAM et al., 2005). Portanto, essas alterações no perfil metabólico podem representar uma redução na atividade metabólica, contribuindo para a persistência dos biofilmes de *H. capsulatum*. Adicionalmente, estudos mostraram uma taxa de crescimento lento para biofilmes bacterianos quando comparado com células planctônicas (PETROVA et al., 2012; YEOM et al., 2013). Além disso, nos biofilmes, as camadas mais profundas das células estão localizadas em ambiente altamente estressante com condições limitantes de nutrientes, baixo teor de O₂, alto teor de resíduos e alterações no pH, apresentando baixo índice de crescimento celular (SANTI et al., 2014).

Nossos dados corroboram parcialmente com os descritos por Santi et al., 2014 que verificaram através de uma análise proteômica por *shotgun* as diferenças de proteínas entre o biofilme e as células planctônicas de *C. neoformans*. De acordo com os resultados, as células do biofilme mostraram um aumento nas proteínas relacionadas a resposta ao estresse e uma diminuição de proteínas relacionadas a síntese proteica e ao processo metabólico, sugerindo uma estratégia adotada pelo biofilme para sobreviver e se adaptar as mudanças do ambiente.

Uma categoria funcional que merece destaque no proteoma do biofilme de *H. capsulatum* é o mecanismo de transdução de sinal/comunicação celular (2; 3%). Proteínas exclusivas como *GTP-binding protein ypt3* e *EF-hand domain-containing protein* foram identificadas (**Tabela 4, Anexo 2**). O *quorum sensing* (QS) é um mecanismo que permite a comunicação entre as células, sendo responsável pela liberação de moléculas de sinalização para o ambiente que participam da regulação da expressão gênica, controlando a morfogênese, formação de biofilmes, fatores de virulência e patogênese (PALUCH et al.,

2020). As moléculas de sinalização farnesol e tirosol, secretadas por *C. albicans* mostrou ter um papel fundamental na morfogênese, virulência e formação de biofilme (ALBUQUERQUE; CASADEVALL, 2012; PADDER; PRASAD; SHAH, 2018). Neste contexto, estudos tem demonstrado que o farnesol e o tirosol possuem efeito antifúngico e anti-biofilme (SEBAA; BOUCHERIT-OTMANI; COURTOIS, 2019). Além disso, dados anteriores *in vitro* e *in vivo* sugerem que essas moléculas de sinalização podem ter um efeito potente em combinação com antifúngicos tradicionais (RODRIGUES; CERNÁKOVÁ, 2020). Adicionalmente, vários estudos envolvendo os mecanismos de inibição do QS como estratégia terapêutica para combater biofilmes de *Candida* tem sido proposto (KOVÁCS; MJOROS, 2020). Dessa forma, nossos resultados sugerem que a identificação de moléculas de sinalização no biofilme, provavelmente, auxilia na comunicação entre as células para se adaptarem as mudanças ambientais.

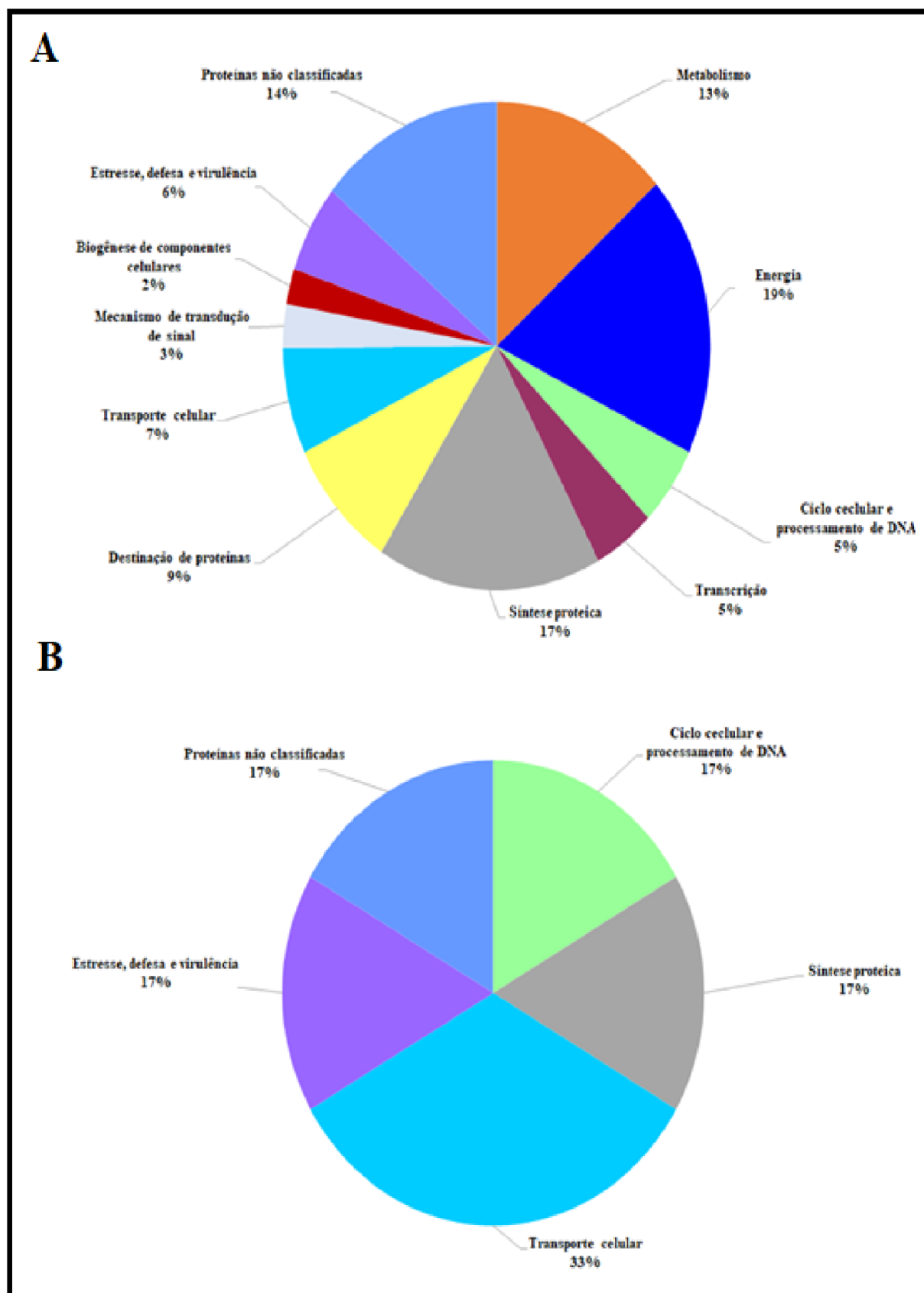
4.5.5. Análise funcional de proteínas exclusivas do biofilme da cepa EH-315 de *H. capsulatum* identificadas durante a infecção em macrófagos alveolares J774 A.1.

As proteínas exclusivas detectadas no controle (células do biofilme da cepa EH-315 de *H. capsulatum* durante a condição controle) e nas células do biofilme da cepa EH-315 de *H. capsulatum* recuperados de macrófagos infectados estão representadas na **Tabela 5 e 6, Anexo 2**, e foram classificadas de acordo com as categorias funcionais, como descrito no item 5.3.4. A **fig. 62A** mostra que a maioria das proteínas exclusivas identificadas no controle estava relacionada à energia (32; 19%), seguida pelo síntese proteica (29; 17%), metabolismo (23; 13%), destinação de proteínas (15; 9%), transporte celular (12; 7%), estresse, defesa e virulência (10; 6%), ciclo celular e processamento de DNA (9; 5%), transcrição (8; 5%), mecanismo de transdução de sinal (5; 3%) e biogênese de componentes celulares (4; 2%). Foram ainda identificadas 24 proteínas (14%) com função desconhecida descrita na literatura. Já a **fig. 62B** indica que as proteínas exclusivas detectadas nas células do biofilme recuperadas da infecção em macrófagos estava relacionada à transporte celular (2; 33%), seguida pela síntese proteica (1; 17%), estresse, defesa e virulência (1; 17%) e ciclo celular e processamento de DNA (1; 17%). Além destas, foi identificada 1 proteína (17%) que apresenta função desconhecida.

Dessa forma, foram identificadas 6 proteínas exclusivas de células do biofilme durante a infecção pertencentes a diferentes grupos funcionais. Este é o primeiro trabalho que relata a identificação de proteínas da resposta de células do biofilme de *H. capsulatum* durante a

infecção em macrófagos, visto que somente proteínas exclusivas do biofilme e não de macrófagos foram identificadas por espectrômetria de massas.

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.



Muitos estudos de resposta e adaptação do patógeno durante a infecção fundamenta-se no fato de que estes patógenos estão expostos à variações ambientais como temperatura, estresse oxidativo e limitação de nutrientes, levando a alterações no metabolismo celular (RAI et al., 2012; RODRIGUES et al., 2020). As análises proteômicas de interação de células derivadas de biofilme do fungo *Histoplasma* com macrófagos J774 A.1 revelam a presença de proteínas relacionadas à alguns processos fornecendo uma visão global da resposta do fungo nesta condição durante a infecção. As categorias mais relevantes associadas à esta condição assim como as proteínas identificadas são descritas abaixo.

4.5.5.1. Transporte celular

A aquisição de nutrientes é um desafio para patógenos intracelulares que residem em compartimentos dentro das células hospedeiras que são mais limitantes nutricionalmente do que patógenos que escapam para um citosol rico em nutrientes como a corrente sanguínea (SHEN et al., 2020). Adicionalmente, como residentes intracelulares de macrófagos, leveduras de *H capsulatum* devem adaptar-se metabolicamente aos nutrientes disponíveis no fagossoma, visto que este ambiente é considerado pobre em nutrientes (SHEN; RAPPLEYE, 2020). Além disso, estudos apontam que não há apenas uma limitação nutricional, como também, a liberação em excesso de moléculas pelo hospedeiro como forma de defesa tornando o ambiente tóxico para o fungo (SUN et al., 2014; MACKIE et al., 2016; WIEMANN et al., 2017). Neste contexto, *H capsulatum* é capaz de importar e exportar micronutrientes metálicos através de transportadores durante a infecção em macrófagos, mantendo as concentrações dos mesmos dentro dos limites homeostáticos, permitindo assim sua sobrevivência e proliferação intracelular (GARFOOT; RAPPLEYE, 2016).

Dessa forma, identificamos a proteína *SEC7 domain-containing protein* (**Tabela 6, Anexo 2**), que tem como função o movimento direcionado de proteínas para dentro ou para fora de uma célula, por meio de agentes transportadores ou poros na membrana plasmática. Assim, sugere-se que essa proteína, provavelmente facilita o transporte de resíduos tóxicas para fora do fagossomo, bem como captura substâncias que estão no citoplasma para dentro da célula, garantindo a sobrevivência e proliferação de *Histoplasma* dentro do macrófago.

A proteína *Myosin type II heavy chain* também foi identificada (**Tabela 6, Anexo 2**), e se caracteriza como componente do citoesqueleto. Em resumo, o citoesqueleto é uma rede tridimensional que abrange elementos estruturais como filamentos de actina, filamentos intermediários, microtúbulos e proteínas que se ligam a esses elementos, sendo responsáveis

pelos processos de transporte e também pelo controle das conformações do citoesqueleto. Modificações desta conformação concede o formato às células e possibilitam o seu movimento, facilitando a união entre as células (XU; HUANG, 2020). Curiosamente, muitas das funções do citoesqueleto são realizadas por meio da interação de microfilamentos de actina com moléculas motoras chamadas miosinas. As miosinas são encontradas em muitos organismos e são categorizadas em classes de acordo com suas estruturas (SEBÉ-PEDRÓS et al., 2014). Estudos tem demonstrado que a miosina de classe II é importante para processos celulares como, endocitose, citocinese, exocitose e transporte de organelas em *S. cerevisiae* (LUO et al., 2004). Taheri-Talesh e colaboradores (2012) através de uma análise de sequenciamento do genoma, descobriram que *A. nidulans* exibe um homólogo de miosina tipo II (*myoB*), e que a sua exclusão pode causar defeitos no crescimento celular. Além disso, a deleção do gene *myoB* demonstrou afetar a viabilidade celular de *A. fumigatus* (RENSHAW et al., 2016). Neste contexto, nossos resultados mostram o importante papel que este componente do citoesqueleto parece ter frente a adaptação das células do biofilme de *H. capsulatum* no ambiente do fagossomo.

4.5.5.2. Estresse, defesa e virulência

Os patógenos quando fagocitados pelo hospedeiro são submetidos à moléculas antimicrobianas como ROS que são gerados pelo complexo NADP oxidase (MISSAL et al., 2004) e que conseqüentemente necessitam de detoxificação. Sendo assim, as estratégias adotadas pelo fungo para escapar dessas moléculas incluem a detoxificação de espécies reativas, resposta ao estresse e reparo do DNA (RUIZ et al., 2011). Em nosso trabalho, o perfil proteômico de células do biofilme recuperadas de macrófagos revelou que o fungo nessa condição estimula respostas moleculares para resistir aos danos causados por meio da produção de enzimas antioxidantes que atuam no processo de detoxificação. Existem várias enzimas que constituem a defesa antioxidante, dentre elas as tioredoxinas.

Dessa forma, identificamos a proteína *Putative thiol-specific antioxidant protein* (*TSA1*) (**Tabela 6, Anexo 2**), que tem como função catalisar a redução de peróxido de hidrogênio. Estudos tem demonstrado que *TSA1* pode desempenhar algumas funções importantes para a sobrevivência de leveduras de *C. albicans* em um ambiente oxidativo desfavorável criado pelas células do hospedeiro (SHIN et al., 2005). Outros estudos relatam que a *TSA1* mostrou-se ser essencial para resistência ao estresse oxidativo em *C. albicans* e *S. cerevisiae* (URBAN et al., 2005; CHAE et al., 1993). Adicionalmente, Missal e colaboradores (2004) relatam que mutantes em *TSA1* apresentam virulência reduzida em modelos *in vivo*

infectados com *C. neoformans*, sugerindo que essa proteína parece ser essencial para a sua virulência.

O sistema tioredoxina ou sistema antioxidante é composto por várias moléculas que interagem com resíduos de cisteínas, sendo um dos principais reguladores no processo de redução de tióis na célula. A produção de ROS modula o estado tiol-redox celular e neste cenário, o sistema tioredoxina torna-se muito importante, visto que pode restaurar o balanço entre redução e oxidação celular, favorecendo assim o funcionamento normal da célula em condições de estresse (YOSHIHARA et al., 2010). Gomez-Pastor et al., 2010 observou que a superexpressão do gene codificante para a tioredoxina em *S. cerevisiae* aumenta a defesa redox, e que o sistema tioredoxina pode funcionar como uma alternativa na redução da glutadiona oxidada *in vivo*, o que aumentaria a resistência destas leveduras ao estresse oxidativo (TAN et al., 2010). Neste contexto, nossos estudos mostraram que a expressão da *TSA1* em células do biofilme após a infecção em macrófagos, provavelmente está relacionada com a proteção da célula contra os danos oxidativos derivados do hospedeiro, garantindo assim a sobrevivência no ambiente do fagossomo.

4.5.5.3. Ciclo celular e processamento de DNA

Com relação a categoria funcional de proteínas envolvidas no ciclo celular e processamento de DNA, identificamos a proteína *TAF domain-containing protein* (**Tabela 6, Anexo 2**), que se assemelha a histona H4 e é encontrada no componente central do nucleossoma. Interessantemente, o nucleossoma é caracterizado como a unidade básica da cromatina, uma estrutura dinâmica, composta de DNA e proteínas ligantes de DNA que permitem o armazenamento e utilização da informação genética de forma eficiente, e as histonas atuam como reguladores primários da atividade da cromatina (ROTHBART; STRAHL, 2014). Zachi e colaboradores (2010) avaliaram o impacto do déficit de histona H4 no crescimento e na morfologia de *C. albicans*. Os resultados mostraram que a dosagem reduzida de H4 está associada a defeitos no crescimento e também na filamentação. Da mesma forma, a depleção de histonas H4 apresentou danos no ciclo celular de *S. cerevisiae* (KIM et al., 1988). Além disso, estudos têm demonstrado que mutantes em histona, bem como remodelagem da cromatina apresentam falhas na transição micélio-levedura, na adesão em células epiteliais, na resistência ao estresse, e também na atividade antifúngica, promovendo um efeito direto na virulência de *C. albicans* (SMITH; EDLIND, 2002; MAO et al., 2006; RAMAN et al., 2006; LU et al., 2008). Dessa forma, hipotetizamos que a identificação de proteínas nucleares é fundamental para a regulação de vários processos

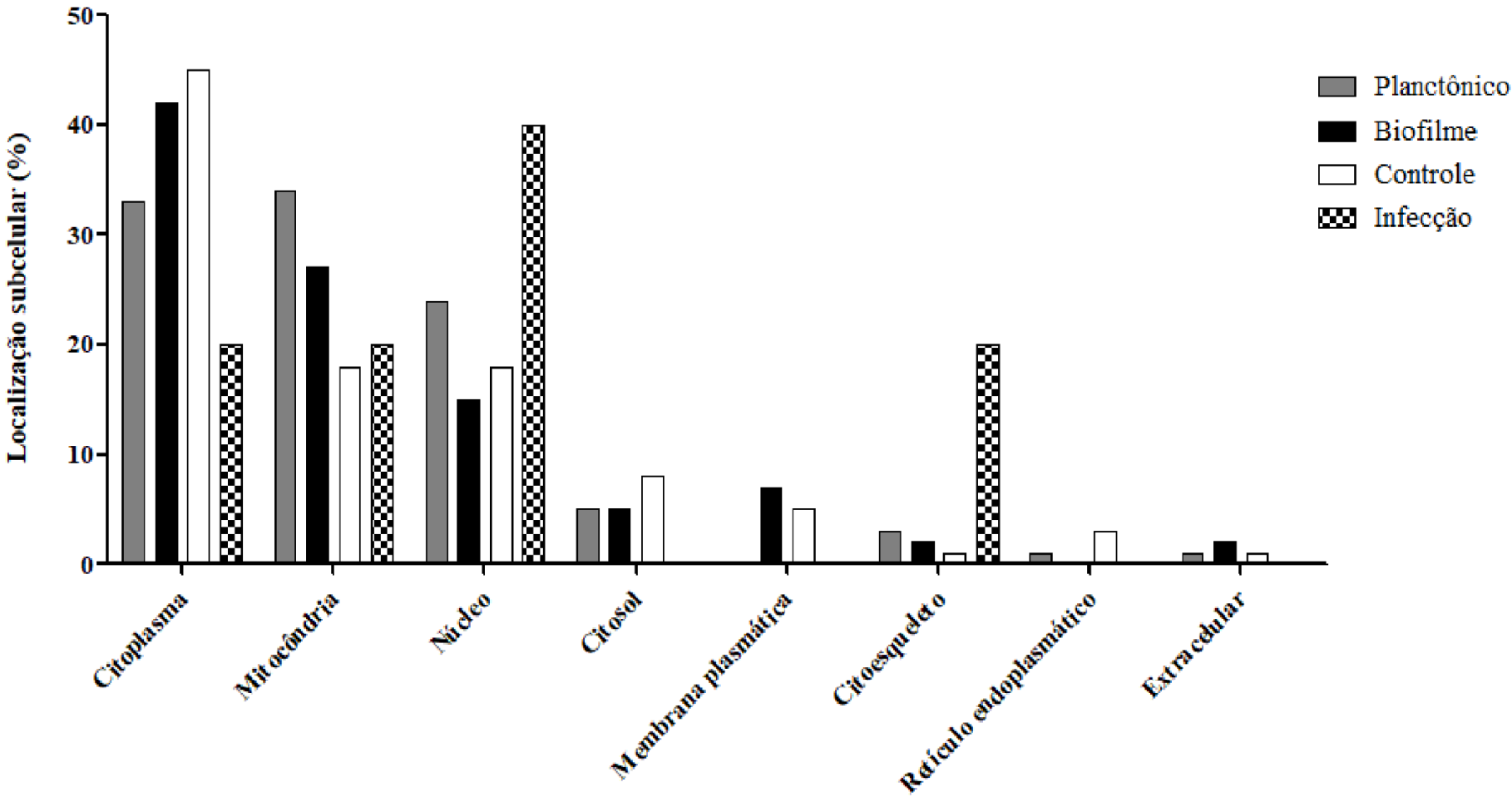
importantes relacionados ao crescimento e principalmente a patogênese, visto que a capacidade das células de *H. capsulatum* de proliferar intracelularmente é fundamental para sua patogênese, como também proposto para *C. glabrata* (KUMAR et al., 2019).

Em nosso estudo buscou-se a identificação de proteínas expressas por células do biofilme de *H. capsulatum* durante a infecção em macrófagos, nossos resultados revelou o envolvimento de proteínas em processos metabólicos essenciais a sobrevivência e adaptação do fungo ao ambiente do hospedeiro. Além disso, o perfil proteômico da resposta do fungo nessa condição durante a infecção, sugere remodelamento do metabolismo frente ao estresse oxidativo e limitação de nutrientes, permitindo a captação de nutrientes e ressalta o desenvolvimento de novas estratégias de sobrevivência do fungo.

4.5.6. Localização Subcelular

Os dados de localização subcelular de proteínas é uma importante fonte de informação útil para elucidar as funções das proteínas eucarióticas, bem como muitas vezes pode revelar seu mecanismo de ação (KUMAR et al., 2002). Sendo assim, a predição da localização subcelular das proteínas exclusivas no crescimento planctônico e em biofilme da cepa EH-315 de *H. capsulatum*, bem como no controle (células do biofilme da cepa EH-315 de *H. capsulatum* durante a condição controle) e na infecção pelas células do biofilme da cepa EH-315 de *H. capsulatum* em macrófagos J774 A.1 foram representadas na **Fig 63**. Os resultados indicam que a maioria das proteínas identificadas nas células planctônicas foram classificadas como mitocondriais (27; 34%), citoplasmáticas (26; 33%), nucleares (19; 24%), citosólicas (4; 5%), citoesqueleto (2; 3%), retículo endoplasmático e extracelulares (1; 1%). Já para as proteínas identificadas no biofilme foram classificadas como citoplasmáticas (25; 42%), seguidas das mitocondriais (16; 27%), nucleares (9; 15%), membrana plasmática (4; 7%), citosólicas (3; 5%), citoesqueleto e extracelulares (1; 2%). Para as proteínas identificadas nas células do biofilme de *H. capsulatum* durante a condição controle, a localização subcelular mostra que a maioria das proteínas foram classificadas como citoplasmáticas (66; 45%), seguidas das mitocondriais (27; 18%), nucleares (26; 18%), citosólicas (12; 8%), membrana plasmática (8; 5%), retículo endoplasmático (4; 3%), citoesqueleto (2; 1%) e extracelular (1; 1%). Já na infecção em macrófagos pelas células do biofilme os resultados mostram que a maioria delas foram classificadas como nucleares (2; 40%), seguidas das citoplasmáticas, mitocondriais e citoesqueleto (1; 20%).

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.



Com base nos resultados apresentados, o presente trabalho contribui para um melhor entendimento da formação do biofilme por *H. capsulatum* em condições *in vitro* e trazem respostas importantes acerca das vias utilizadas por *H. capsulatum* para o desenvolvimento dessas comunidades. Além disso a análise proteômica do biofilme de *H. capsulatum* durante a infecção em macrófagos elucidou vias importantes associadas à sobrevivência e adaptação utilizadas por esse fungo no ambiente do hospedeiro, podendo contribuir para um melhor entendimento no estabelecimento da infecção. Estudos complementares acerca da validação dos dados proteômicos poderiam esclarecer tais resultados. Sendo assim, esses resultados apresentam avanços significativos no campo dos biofilmes e podem contribuir para estudos futuros que podem provar o papel dessas comunidades na interação patógeno-hospedeiro. Além disso, abre portas para estudos posteriores com o intuito de estabelecer futuras opções de tratamento para a histoplasmose.

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 Tripan, 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.
- ALLEENDOERFER, 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.
- ALLEENDOERFER, 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; Aproved 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.; RAPPEYE, 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. Histoplasmosse 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.; ZANCOPÉ-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.; ZANCOPÉ-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.; ZANCOPÉ-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.; KRUFT, 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.; GÁCSE, 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.; GÁCSE, 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.; DENEALT, 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.; ZANCOPÉ-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.; ZANCOPÉ-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.; ZOBEEK, 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.

RAPPEYE, 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.; RAPPEYE, 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 Neuroscience**, 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.; EARY, 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.; ZANCOPÉ-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.; PUMEESEAT, 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.