

RESSALVA

**Atendendo solicitação do autor,
o texto completo deste
documento será disponibilizado
somente a partir de 03/03/2028.**

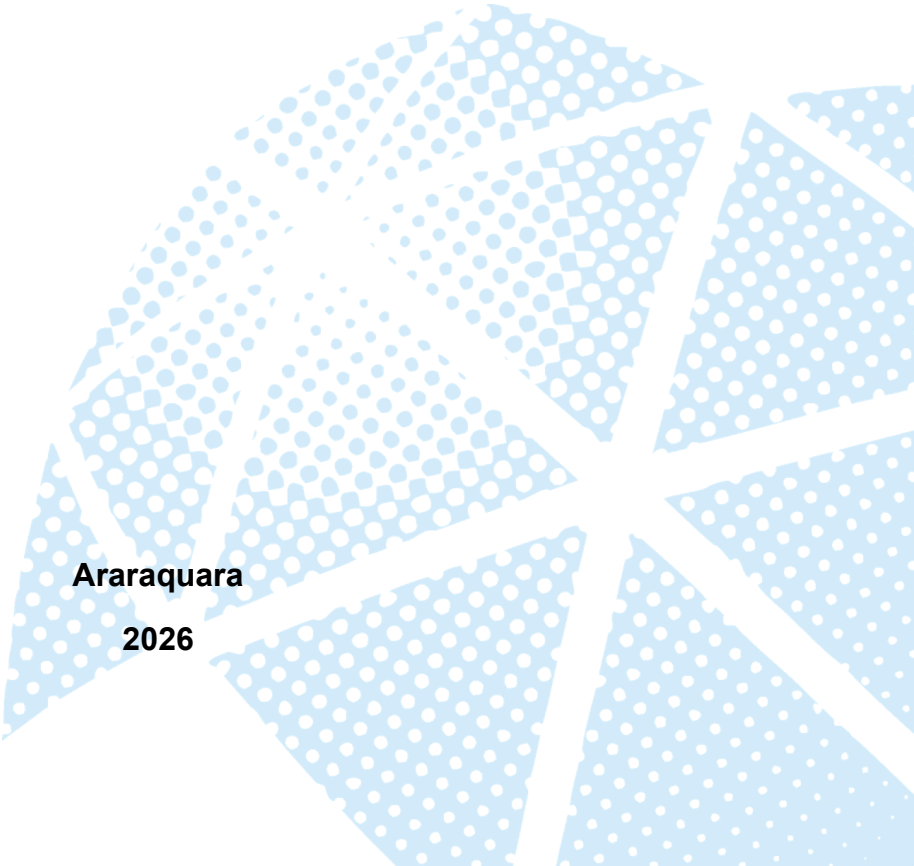
**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – CAMPUS DE ARARAQUARA**

HENRIQUE GOMES MARTINS

**AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Paracoccidioides brasiliensis* EM
MODELO TRIDIMENSIONAL DE ESFEROIDE QUANTO AO PAPEL DA ADESINA
14-3-3 E FORMAS DE CONTROLE**

Araraquara

2026



HENRIQUE GOMES MARTINS

**AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Paracoccidioides brasiliensis* EM
MODELO TRIDIMENSIONAL DE ESFEROIDE QUANTO AO PAPEL DA ADESINA
14-3-3 E FORMAS DE CONTROLE**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, em Araraquara, para obtenção do título de grau acadêmico Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Análises Clínicas

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria José Soares Mendes Giannini

Coorientador: Dr. Kelvin Sousa dos Santos

Araraquara

2026

M386a Martins, Henrique Gomes.
Avaliação da formação de biofilme de *Paracoccidioides brasiliensis* em modelo tridimensional de esferoide quanto ao papel da adesina 14-3-3 e formas de controle / Henrique Gomes Martins. – Araraquara, 2026.
78 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara. Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de conhecimento: Micologia.

Orientadora: Maria José Soares Mendes Giannini.
Coorientador: Kelvin Sousa dos Santos.

1. Paracoccidioidomicose. 2. Biofilmes. 3. Técnicas de cultura de Células. 4. Micoses. I. Giannini, Maria José Soares Mendes, orient. II. Santos, Kelvin Sousa dos, coorient. III. Título.

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara
Vilma Bruna Mastelari Costa - CRB 8/10938

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Paracoccidioides brasiliensis* EM MODELO TRIDIMENSIONAL DE ESFEROIDE QUANTO AO PAPEL DA ADESINA 14-3-3 E FORMAS DE CONTROLE

AUTOR: HENRIQUE GOMES MARTINS

ORIENTADORA: MARIA JOSÉ SOARES MENDES GIANNINI

COORDENADOR: COORDENADOR: KELVIN SOUSA DOS SANTOS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências, área de conhecimento: Micologia pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARIA JOSÉ SOARES MENDES GIANNINI (Participação Presencial)
Departamento de Análises Clínicas / UNESP / Câmpus de Araraquara - FCF

Prof. Dr. JAMES VENTURINI (Participação Virtual)
Faculdade de Medicina (FAMED) / Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

Profa. Dra. VALERIA VALENTE (Participação Presencial)
Departamento de Análises Clínicas / UNESP / Câmpus de Araraquara - FCF

Araraquara, 03 de março de 2026.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia Clínica e no Núcleo de Proteômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil. Processo nº 2024/03014-7.

*À memória de meu pai, Hélio da Silva Martins,
por tudo o que foi e por tudo o que permanece.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por me dar a vida, a saúde e a sabedoria para levar a vida de forma leve e positiva. Por me cercar de amor onde quer que eu esteja. Por seus propósitos para mim, que são maiores do que eu consigo imaginar.

À minha mãe, Edna Martins, que é meu alicerce e base de sabedoria, educação, amor incondicional, cuidado e respeito. Obrigado por me tornar o que sou hoje. Obrigado por me deixar vir para São Paulo, sei que não foi fácil, tive que preparar bastante o terreno com a Sra. mas olha só mãe: está dando certo!

Ao meu irmão caçula, Helinho, a pessoa que mais amo nesse mundo. Sinto tua falta todos os dias. Prometo fazer o possível para assistir *O Grinch* todo natal contigo, como sempre fizemos.

Ao meu pai, Hélio Martins, que foi o maior exemplo de homem e pai para mim. Que mesmo nos puxões de orelha, me transformou no homem que sou hoje. O Sr. teria muito orgulho de saber onde eu estou hoje.

Ao meu parceiro, Felipe Tashiro, por topar comigo a audácia de sair de Manaus e tentar a vida em SP. Obrigado por me dar uma família. Sem dúvida, você foi essencial na minha vida. Te devo muito e te amo para sempre!!!

Aos meus irmãos Herbert, Leidyane e Hannah. Aos meus sobrinhos Heitor, Dorian, Bartolomeu, Taylor e Júlia. Eu amo vocês demais. Desculpa estar longe da vida de vocês, estou tentando ser o tio rico kkkk.

A toda a minha família: avós, tios/tias, primos/primas e cunhados/cunhadas. Amo vocês!

À minha orientadora, Profa. Dr. Maria José Soares Mendes Giannini, por acreditar e confiar em mim. Por ser *full time*, como o Pb, na sua orientação, mesmo sendo tão requisitada. Pelos *feedbacks* tão importantes e oportunos. Aprendi ensinamentos que levarei para sempre, tanto na vida pessoal quanto na profissional.

Ao Kelvin Sousa dos Santos, por tantos ensinamentos. Antes de coorientador, você é meu melhor amigo! Me ensinou sobre pesquisa, cultura de células e cultura pop. Obrigado por tornar esse momento da minha vida mais leve, quando sempre topa um barzinho nos dias difíceis (e nos fáceis também). Você foi essencial!

A Prof. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida, por coordenar todos os alunos do Núcleo de Proteômica e por me acolher como seu aluno, me ensinando e fazendo de tudo para que minha pesquisa desse certo.

Às minhas professoras de micologia, Maria Zeli e Ana Karla, sem dúvidas, vocês me formaram para o que sou hoje: um APAIXONADO por fungos!

Aos amigos que a Micologia Clínica e Proteômica me deram: Bruna, Rafaela Matheus, Bruno, Beatriz, Isabela e Samanta. Vocês deixaram tudo melhor e mais leve! Muito obrigado por todo o aprendizado, pelas discussões, conversas, cafés e risadas. Quem tem amigo tem tudo. Que bom que eu tive vocês.

A todos que me ajudaram de alguma forma nessa caminhada, vocês foram muito importantes: Ana Karla, Débora, Panta, Claudinha, Nicoli, Luana, Júlia, Mirela, Victor Prevato, Lucas Calisto, Vitória, Geanne, Rita e Vini Borges. O companheirismo, a amizade e a ajuda de vocês foram essenciais para minha trajetória acadêmica e pessoal.

Aos meus amigos de Manaus, minha amada terra natal: Raíssa, Sangely, Beatriz, Rana, Bini, Yasmin, Rayara, Caio, Mellissa, Vini Luz, Matheus, Nicácio, Isis, Karen, Ariane, Marília, Aryane, Vanderson, Paulo, DD, Kailane, Renan. Obrigado por tudo, pois mesmo de longe, se mantiveram presentes e fazem parte da minha trajetória. Eu amo vocês!!! Desculpa se esqueci de alguém.

Ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia (CAPES 7), por todo o aprendizado e o estímulo oferecidos, que auxiliaram na minha formação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil. Processo nº 2024/03014-7.

“Sair dessa cidade”, dizia Dorner, “significa sair de um espaço, mas, sobretudo, de um tempo. Já imaginaste o privilégio de alguém que, ao deixar o porto de sua cidade, pode conviver com outro tempo?”

Milton Hatoum
Escritor amazonense

RESUMO

A paracoccidioidomicose é uma micose sistêmica causada pelo fungo patogênico termodimórfico do gênero *Paracoccidioides*. Vários fatores determinantes da virulência, como o dimorfismo, mudanças na composição da parede celular, adesinas e a formação de biofilme, têm sido relatados e podem desempenhar papel relevante em sua patogênese. A relevância dos biofilmes para as infecções humanas precisa ser mais bem estudada no âmbito de modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, com foco em demonstrar fatores relacionados à sua formação, à virulência e a fármacos antibiofilmes, como, por exemplo, modelos de cultura celular tridimensional (3D) mais fiéis ao que é observado em modelos *in vivo*. Neste contexto, entende-se a importância de avaliar o papel da adesina 14-3-3 em *P. brasiliensis* na formação de biofilme, comparando o isolado atenuado (aPb18) com o virulento (vPb18) em queratinócitos de pele humana (HaCaT) e fibroblastos dérmicos humanos (HDFa) em modelo tridimensional (3D), com ênfase na paracoccidioidomicose cutânea e na aplicação de estratégias de controle. Para isso, biofilmes foram formados e caracterizados para posterior infecção em modelos tridimensionais de esferoide, de pele reconstruída e de fio de sutura. Além disso, RT-qPCR, microscopia eletrônica de varredura e de fluorescência confocal, foram utilizadas para visualização e análise dessas interações. O isolado vPb18 apresentou maior capacidade de formação de biofilme, com estruturas mais densas e organizadas, maior produção de matriz extracelular e maior virulência nos modelos de *Galleria mellonella*, esferoides celulares e pele humana reconstruída, quando comparada à aPb18. As análises de RT-qPCR indicaram diferenças no perfil de expressão gênica, principalmente em condições planctônicas, para 14-3-3 e GEL3, sugerindo associação com as fases iniciais de crescimento e de adaptação celular. Porém, os outros genes analisados — 14-3-3, GEL3, enolase e Fsk1 — não apresentaram diferenças expressivas entre os biofilmes e a pele infectada em ambos os isolados. Adicionalmente, o composto L7CF182 mostrou atividade contra células planctônicas, mas baixa eficácia, na mesma concentração, frente aos biofilmes, reforçando a importância do estudo desse modo de crescimento e da busca por novas estratégias antifúngicas.

Palavras-chave: paracoccidioidomicose cutânea; biofilme; adesina 14-3-3; 1,3- β -glucana; modelos de cultura 3D.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis is a systemic mycosis caused by the thermomorphogenic pathogenic fungus of the genus *Paracoccidioides*. Several virulence determinants, including dimorphism, changes in cell wall composition, adhesins, and biofilm formation, have been reported and may play a significant role in its pathogenesis. The relevance of biofilms in human infections still needs to be further investigated using in vitro, ex vivo, and in vivo models, with a focus on identifying factors related to their formation, virulence, and the development of antibiofilm drugs. For example, three-dimensional (3D) cell culture models are considered more representative of what is observed in vitro systems. In this context, it is important to evaluate the role of the 14-3-3 adhesin in *P. brasiliensis* during biofilm formation, comparing the attenuated strain (aPb18) with the virulent strain (vPb18) in human skin keratinocytes (HaCaT) and human dermal fibroblasts (HDFa) using a three-dimensional (3D) model, with emphasis on cutaneous paracoccidioidomycosis and the application of control strategies. For this purpose, biofilms were formed and characterized prior to infection in three-dimensional spheroid models, reconstructed skin, and suture thread models. In addition, RT-qPCR, scanning electron microscopy, and confocal fluorescence microscopy were used to visualize and analyze these interactions. The vPb18 strain showed greater biofilm-forming capacity, with denser, more organized structures and increased extracellular matrix production, as well as higher virulence in *Galleria mellonella*, cellular spheroids, and reconstructed human skin models, compared with aPb18. RT-qPCR analyses indicated differences in gene expression profiles, mainly under planktonic conditions, for 14-3-3 and GEL3, suggesting an association with early growth stages and cellular adaptation. However, the other genes analyzed — 14-3-3, GEL3, enolase, and Fks1 — did not show significant differences in biofilms or infected skin between the two strains. This result was obtained after 120 h of biofilm growth and could explain this result. Additionally, the compound L7CF182 showed activity against planktonic cells but low efficacy against biofilms, underscoring the importance of studying this growth mode and the need to develop new antifungal strategies.

Keywords: cutaneous paracoccidioidomycosis; biofilm; 14-3-3 adhesin; 1,3- β -glucan; 3D culture models.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Endemicidade da Paracoccidioidomicose no mundo	19
Figura 2 – Habita natural e forma de transmissão da paracoccidioidomicose.....	21
Figura 3 - Repique de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb14-3-3 aRNA.....	38
Figura 4 - Leveduras de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> 14-3-3 aRNA.....	39
Figura 5 – Indução da interação celular <i>in vitro</i> de <i>P. brasiliensis</i> com pneumócitos A549.....	40
Figura 6 – Microscopia das isolados atenuada e virulenta de <i>P. brasiliensis</i>	41
Figura 7 - Curvas de sobrevivência de <i>G. mellonella</i> infectadas com diferentes isolados de <i>P. brasiliensis</i>	41
Figura 8 - Avaliação do índice de saúde de <i>G. mellonella</i> após infecção com diferentes isolados de <i>P. brasiliensis</i>	42
Figura 9 - Quantificação de material polissacarídico por safranina, comparando o biofilme do isolado vPb18 com aPb18.....	44
Figura 10 - Cinética de formação do biofilme comparando os isolados vPb18 e aPb18.....	45
Figura 11 - Quantificação de biomassa por Cristal Violeta comparando o biofilme dos isolados vPb18 e aPb18.....	46
Figura 12 – Maturação de biofilmes de aPb18 e vPb18.....	47
Figura 13 – Micrografia da formação de biofilme do isolado aPb18.....	48
Figura 14 – Micrografia da formação de biofilme do isolado aPb18.....	49
Figura 15 – Microscopias de fluorescência confocal do biofilme de aPb18 e vPb18 em 120 h.....	50
Figura 16 – Microscopias de fluorescência confocal do biofilme de aPb18 e vPb18 em 120 h.....	51
Figura 17 – Esferoides com células HDFa.....	52
Figura 18 – Esferoides com células bicultivo de HDFa e HaCaT.....	52
Figura 19 - Parâmetros de caracterização do esferoide de HDFa.....	53
Figura 20 - Parâmetros de caracterização do esferoide de bicultivo.....	54
Figura 21 – Viabilidade Celular de HDFa em esferoide e monocamada.....	54
Figura 22 – Viabilidade Celular de HDFa e HaCaT em esferoide e monocamada.....	55
Figura 23 – Micrografias dos esferoides bicultivo infectados com aPb18 e vPb18.....	56

Figura 24 – Micrografias de pele: sadia, infectada com aPb18 e com vPb18.....	57
Figura 25 – Micrografias de biofilme de aPb18 em fio de sutura.....	58
Figura 26 – Micrografias de biofilme de vPb18 em fio de sutura.....	59
Figura 27 – Expressão gênica diferencial de células planctônicas de aPb18 e vPb18.....	60
Figura 28 – Expressão gênica diferencial de células planctônicas de aPb18 e vPb18.....	61
Figura 29 – Expressão gênica diferencial de células planctônicas de aPb18 e vPb18.....	62
Figura 30 - Atividade metabólica dos biofilmes de aPb18 e vPb18 frente ao tratamento com L7CF182 e anfotericina B.....	65
Figura 31 - Biomassa dos biofilmes de aPb18 e vPb18 frente ao tratamento com L7CF182 e anfotericina B.....	66
Figura 32 – Matriz Polissacarídica dos biofilmes de aPb18 e vPb18 frente ao tratamento com L7CF182 e anfotericina B.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Índice de Saúde das larvas de <i>Galleria mellonella</i>	29
Tabela 2. Desenho da sequência <i>forward</i> e <i>reverse</i> dos <i>primers</i> que serão utilizados para as futuras reações de qPCR.....	35
Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) dos compostos L7CF frente às isolados vPb18 e aPb18 de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MEC: Matriz Extra Celular

Pb: *Paracoccidioides brasiliensis*

PCM: Paracoccidioidomicose

PCR: Polymerase Chain Reaction

RNA: Ácido Ribonucléico

RT: Transcriptase reversa/Reverse transcriptase

A549: células epiteliais pulmonares alveolares tipo I (obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro – CR039)

BHI: brain heart infusion

cDNA: complementary Deoxyribonucleic acid (DNA complementar)

CFSE: carboxyfluorescein succinimidyl ester

DNA: ácido desoxirribonucleico

DO: densidade óptica

FKS: gene 1,3- β -D-glucana synthase

GAPDH: glicose-6-fosfato desidrogenase

GEL3: beta-1,3-glucanosyltransferase

mRNA: RNA mensageiro

Pb14-3-3: proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis*

Pb14-3-3aRNA: isolado de *P. brasiliensis* com redução na expressão do gene 14-3-3

PBS: solução salina tamponada com fosfatos

XTT: 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -(2H)-tetrazolio-5-carboxanilida

aPb18: isolado atenuada de *Paracoccidioides brasiliensis*

vPb18: isolado virulenta de *Paracoccidioides brasiliensis*

ANOVA: Análise de Variância

pH: Potencial Hidrogeniônico

UFC: Unidade formadora de colônias

UV: Radiação ultravioleta

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

LISTA DE SÍMBOLOS

%: porcentagem

°C: graus Celsius

μF: microfarad

μL: microlitros

μM: micrômetro

μM: micromolar

β: letra grega que significa "beta"

cm: centímetro

h: horas

M: molar

min: minutos

mL: mililitro

mm³: milímetro cúbico

mM: milimolar

ng: nanograma

nm: nanômetro

rpm: rotações por minuto

U: unidade

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
1.1.	Paracoccidioidomicose	17
1.2.	Fatores de Virulência.....	21
1.3.	Modelos para estudo de interação patógeno-hospedeiro	22
1.4.	Terapia antifúngica: desafios e limitações	24
2.	JUSTIFICATIVA.....	26
3.	OBJETIVO	27
3.1.	Objetivo Geral	27
3.2.	Objetivos Específicos	27
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1	Isolados e condições de cultivo de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	28
4.2	Obtenção da isolado denominado virulento	28
4.3	Preparo do inóculo de <i>P. brasiliensis</i>	29
4.2.	Avaliação da virulência dos isolados de Pb18 utilizando modelo de <i>Galleria mellonella</i>	29
4.3	Formação do biofilme e parâmetros de avaliação.....	30
4.3.1	Determinação da atividade metabólica do biofilme	31
4.3.2	Quantificação da biomassa.....	31
4.3.3	Quantificação da matriz extracelular	31
4.3.4	Caracterizar a formação do biofilme de <i>P. brasiliensis</i> utilizando a microscopia eletrônica de varredura (MEV)	32
4.3.5	Determinação dos componentes do biofilme monoespécie de aPb18 e vPb18	32
4.4	Formação dos esferoides.....	33
4.4.1	Caracterização dos esferoides.....	34
4.5	Ensaio de formação de biofilme <i>in vitro</i> por <i>P. brasiliensis</i> (aPb18 e vPb18) nos esferoides	34
4.6	Ensaio de formação de biofilme <i>in vitro</i> por <i>P. brasiliensis</i> (aPb18 e vPb18) em modelo <i>ex vivo</i> de pele humana reconstruída	34
4.7	Ensaio de formação de biofilme <i>in vitro</i> por <i>P. brasiliensis</i> (aPb18 e vPb18) em fio de sutura.....	35
4.8	Analisar a expressão diferencial de genes por PCR em tempo real (qPCR) em modelo 3D após o desenvolvimento de biofilme por isolados (aPb18 e vPb18) de <i>P. brasiliensis</i>	35
4.9	Avaliação do efeito antimicrobiano dos derivados de nitrofurano por meio da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	37

4.10	Avaliação do efeito antimicrobiano dos derivados de nitrofurano sobre os biofilmes.....	38
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1	Isolado transformado Pb14-3-3 aRNA	39
5.2	<i>P. brasiliensis</i> e interação com pneumócitos	40
5.3	Isolados e condições de cultivo de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	41
5.4	Avaliação da virulência dos isolados de aPb18 e vPb18 utilizando modelo de <i>Galleria mellonella</i>	42
5.5	Formação do biofilme e parâmetros de avaliação.....	44
5.6	Caracterização dos biofilmes dos isolados aPb18 e vPb18 por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	48
5.7	Determinação dos componentes do biofilme monoespécie de <i>P. brasiliensis</i> por Microscopia de Fluorescência Confocal	50
5.8	Desenvolvimento, padronização e caracterização dos esferoides	52
5.9	Infecção dos esferoides bicultivo de HaCaT e HDFa com os isolados aPb18 e vPb18 de <i>P. brasiliensis</i>	56
5.10	Ensaio de formação de biofilme <i>in vitro</i> por <i>P. brasiliensis</i> (aPb18 e vPb18) em modelo <i>ex vivo</i> de pele humana reconstruída	57
5.11	Ensaio de formação de biofilme <i>in vitro</i> de aPb18 e vPb18 em fio de sutura.....	59
5.12	Análise da expressão gênica diferencial por qPCR em biofilmes de aPb18 e vP18.....	61
5.13	Análise da expressão gênica diferencial por qPCR em modelo de pele reconstruída após desenvolvimento de biofilme de aPb18 e vP18.....	63
5.14	Avaliação do efeito antimicrobiano do nitrofurano sobre os biofilmes.....	64
6.	CONCLUSÕES	69
	REFERÊNCIAS	

1. INTRODUÇÃO

1.1. Paracoccidioidomicose

As micoses sistêmicas representam um grave problema de saúde global, afetando tanto indivíduos imunocompetentes quanto imunossuprimidos, com morbimortalidade significativa. A dispersão geográfica de fungos patogênicos endêmicos e a carência de diagnósticos precisos têm impacto socioeconômico. Consequentemente, essas doenças impõem pesada carga aos sistemas de saúde, necessitando de maior conscientização e desenvolvimento de estratégias eficazes de controle e tratamento (Lockhart *et al.*, 2021; Salzer *et al.*, 2018).

Os fungos dimórficos endêmicos, como *Coccidioides*, *Histoplasma*, *Blastomyces*, *Sporothrix* e *Paracoccidioides*, apresentam uma distribuição geográfica particular nas Américas, com relevância epidemiológica significativa. Diferentemente de outros patógenos fúngicos, possuem a capacidade de infectar indivíduos imunocompetentes e atuam como patógenos primários. O diagnóstico dessas micoses é notoriamente complexo devido à inespecificidade dos sintomas respiratórios, que podem se confundir com pneumonias comuns, associada à baixa conscientização clínica e à limitada disponibilidade de testes sensíveis. Outro fator limitante é a subnotificação, que impacta diretamente na saúde pública, dificultando a compreensão precisa de seus nichos ecológicos e dinâmica de transmissão (Benedict *et al.*, 2021; Lockhart *et al.*, 2021)

A paracoccidioidomicose (PCM) é considerada uma micose sistêmica tropical negligenciada (OMS, 2019). Mesmo em sua mais recente diretriz (OMS, 2022), a Organização Mundial de Saúde reconhece que o Brasil possui um sistema de saúde eficaz para a detecção ativa ou passiva de casos e seu manejo, sob a responsabilidade dos serviços de vigilância do Ministério da Saúde (MS), porém, o próprio MS não incluiu a doença na Portaria GM/MS No 6.734 (2025) que dita a Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública. Ficando a critério dos estados brasileiros que instituíram essa notificação por iniciativa de sua gestão. Por isso, não há dados epidemiológicos sobre a ocorrência, a magnitude e a transcendência da paracoccidioidomicose em nível nacional (Brasil, 2025).

A ausência de notificação compulsória resulta na carência de dados precisos sobre a incidência no Brasil. Essa lacuna política contribui para sua contínua

negligência, subdiagnóstico e subnotificação, limitando o rastreamento epidemiológico preciso e a compreensão de sua disseminação. Em 2022, a OMS classificou *Paracoccidioides* spp., o fungo responsável pela paracoccidioidomicose (PCM), como um patógeno fúngico prioritário devido ao seu impacto significativo em populações suscetíveis e vulneráveis, atribuindo-o à categoria de prioridade média. A doença é endêmica na América Latina, com o Brasil como maior detentor de casos, com uma taxa de incidência anual de 10 a 30 por milhão de habitantes, o que corresponde a 80% dos casos relatados no mundo. A maioria dos casos concentra-se nos estados de São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e Rondônia. No período de 1980 a 1995, foram registrados 3.181 óbitos pela doença, correspondendo a uma taxa de mortalidade nacional de 1,45 casos por milhão de habitantes, com variações regionais significativas (Coutinho *et al.*, 2002). A PCM destacou-se como importante causa de morte por doenças infecciosas crônicas, apresentando a maior taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas e sendo responsável por quase metade das hospitalizações por esse grupo de doenças entre 1998 e 2006 (Brummer; Castaneda; Restrepo, 1993; Giacomazzi *et al.*, 2016; Martinez, 2015; Turissini *et al.*, 2017).

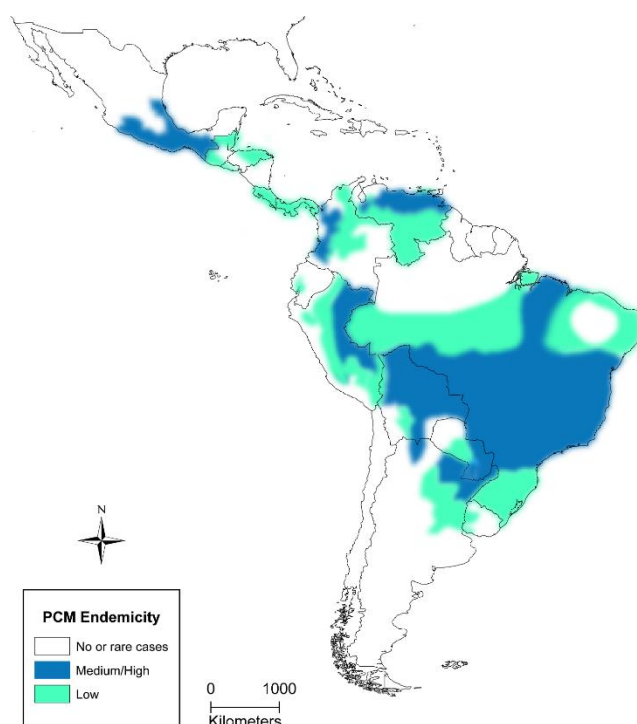
Quanto à faixa etária, a infecção é predominantemente adquirida nas duas primeiras décadas de vida. Contudo, a manifestação clínica da doença é incomum nessa fase, ocorrendo mais frequentemente em adultos de 30 a 50 anos, provavelmente por reativação de um foco latente. Estima-se que apenas 10% dos casos se manifestem até os 20 anos de idade. Um aspecto epidemiológico marcante é a distribuição por gênero, que indica uma razão de 10 a 15 homens por mulher entre os adultos acometidos. Essa disparidade, entretanto, não é observada na infância, quando a infecção e a doença se distribuem de maneira uniforme em ambos os sexos (Coutinho *et al.*, 2002; Wanke; Londero, 2018).

A trajetória de identificação da PCM iniciou em 1908, com os estudos pioneiros de Adolfo Lutz, que isolou o agente etiológico de lesões bucais de seus pacientes em São Paulo (Negro, 1982). A morfologia do fungo foi detalhada em 1912 por Alfonso Splendore, que o classificou como *Zymonema brasiliensis*. Coube a Floriano Paulo Almeida, em 1930, reclassificá-lo no gênero *Paracoccidioides*, estabelecendo a nomenclatura *P. brasiliensis*. Finalmente, o termo "paracoccidioidomicose" foi oficializado durante o primeiro simpósio internacional sobre a doença, realizado em

Medellín, Colômbia, no ano de 1971, denominação que é utilizada até hoje (Franco *et al.*, 1994).

Entre as Onygenales, a família Ajellomycetaceae inclui espécies do gênero *Paracoccidioides*, responsáveis pela PCM. Entre elas, estão *P. brasiliensis* (clado Sb1a-Sb1b), *P. americana* (PS2), *P. restrepiensis* (PS3), *P. lutzii* (semelhante a Pb01) e *P. venezuelensis* (PS4) (Turissini *et al.*, 2017b; Teixeira *et al.*, 2009, 2014;). Além disso, o gênero abrange espécies não cultiváveis, como *P. ceti* e *P. lobogeorgii* (anteriormente conhecida como *Lacazia loboi*), responsáveis por infecções subcutâneas em golfinhos e humanos (Vilela *et al.*, 2023).

Figura 1 – Endemicidade da Paracoccidioidomicose no mundo

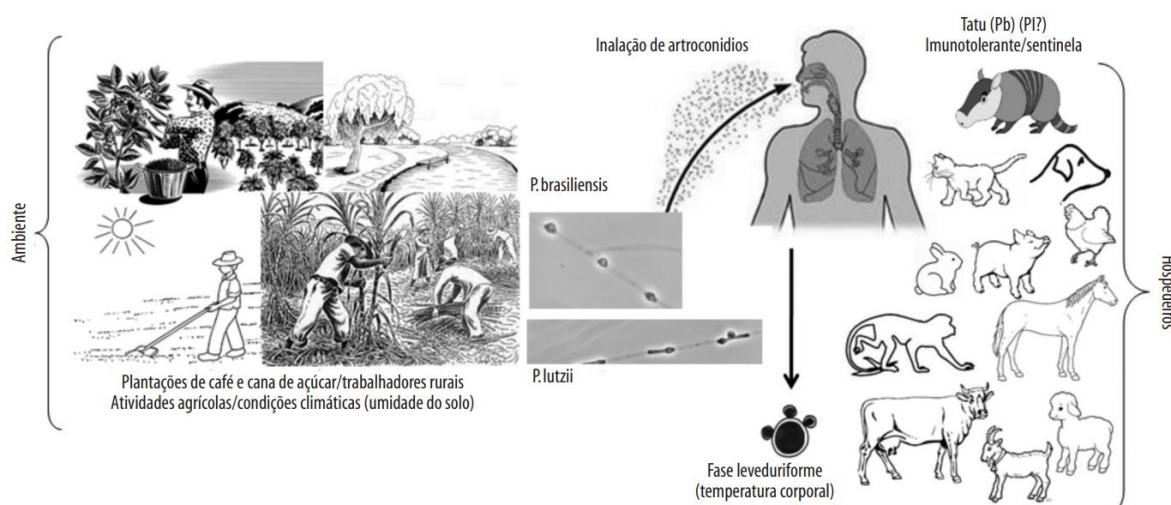


Fonte: Venturini *et al.*, (2026)

A patogenicidade do gênero *Paracoccidioides* está diretamente ligada ao seu caráter termodimórfico, uma adaptação importante para seu estabelecimento em diferentes nichos ecológicos. No ambiente, desenvolve-se na forma micelial, a temperaturas próximas de 25 °C, exibindo colônias brancas, algodonosas e rasteiras, sem produção de pigmento no verso. Micromorfologicamente, suas hifas são hialinas, septadas e ramificadas, com raros clamidósporos terminais e intercalares. No entanto, ao infectar um hospedeiro, a elevação da temperatura corporal (37 °C) desencadeia a transição para a fase leveduriforme, morfologia parasitária responsável pelo

estabelecimento da doença. Esta forma leveduriforme é microscopicamente distinta da micelial, possuindo células-mãe que emitem múltiplos brotamentos periféricos, constituindo a clássica aparência de "roda de leme", e macroscopicamente por colônias de aspecto cerebriforme e coloração creme (Franco *et al.*, 1994; Martinez, 2004).

Figura 2 – Habitat natural e forma de transmissão da paracoccidioidomicose



Fonte: Shikanai-Yasuda (2017).

O fungo é encontrado no solo em sua forma filamentosa e os esporos podem ser inalados e, a partir dos pulmões, via macrófagos alveolares e células epiteliais, ocorre a transição da forma micelial para leveduriforme, podendo se disseminar principalmente para linfonodos, mucosa oral, laringe, pele, trato digestivo, sistema nervoso central (Hahn *et al.*, 2022; Mendes *et al.*, 2017). Depois do pulmão, da mucosa oral e dos linfonodos, a pele é a estrutura mais frequentemente acometida pela doença (Mendes *et al.*, 2017). O fungo atinge a pele por disseminação hematogênica ou por contiguidade com lesões mucosas ou linfonoidais (Hahn *et al.*, 2022; Mendes *et al.*, 2017). Essas leveduras parasitam macrófagos e células gigantes, desencadeando uma reação inflamatória tecidual que pode se manifestar por meio de granulomas bem ou mal organizados (Pagliari e Sotto, 2002).

A imunidade da pele contra o patógeno depende de respostas inatas e adaptativas mediadas por células apresentadoras de antígenos, como as células de Langerhans, os dendrócitos dérmicos e os queratinócitos. Um estudo liderado por

Silva, Da *et al.*, (2016) demonstrou que as células de Langerhans, as principais sentinelas da epiderme, encontram-se em número reduzido e com alterações morfológicas, o que sugere uma imunidade celular deprimida secundária à infecção. Esse cenário destaca a importância das manifestações cutâneas não apenas como sinais clínicos, mas também como campos de batalha imunológicos onde o fungo busca mecanismos de evasão.

1.2. Fatores de Virulência

Vários fatores determinantes da virulência em *Paracoccidioides* spp., como o dimorfismo, mudanças na composição da parede celular, adesinas e a formação de biofilme têm sido relatados e podem desempenhar um papel relevante em sua patogênese (Camacho; Niño-Vega, 2017; Sardi *et al.*, 2015; Mendes-Giannini *et al.*, 2008).

A capacidade de formação de biofilme foi demonstrada *inicialmente in vitro* em *P. brasiliensis* (Sardi *et al.*, 2015) e posteriormente em outras espécies (Oliveira *et al.*, 2020), assim como em fios de sutura, *in vitro* e *in vivo*, confirmando a capacidade de *P. brasiliensis* formar biofilme e sugerindo que isso possa estar implicado em sua patogênese (Sardi *et al.*, 2024). Um estudo realizado por Carlton (2018) sugeriu que o silenciamento da proteína 14-3-3 (adesina) alterou a capacidade de formar biofilme e o metabolismo. Ao se comparar o isolado silenciado para a adesina 14-3-3 (Pb14-3-3 aRNA) com o isolado selvagem de Pb18, Marcos (2016) verificou aumento da expressão dos genes enolase, GAPDH e 14-3-3 em biofilmes do isolado selvagem, indicando que o silenciamento gênico pode influenciar a expressão de demais genes, bem como estar envolvido na formação de biofilme.

As proteínas da família 14-3-3 constituem um grupo de reguladores celulares altamente conservados, presentes como dímeros de baixa massa molecular, em diversas isoformas. Sua notável preservação entre espécies, superior a 60%, indica uma função biológica fundamental que se manteve ao longo da evolução. A característica definidora dessas proteínas é a capacidade de interagir com uma vasta gama de outras proteínas de modo dependente de fosforilação, um mecanismo que lhes confere múltiplos papéis na maquinaria celular (Obsilova *et al.*, 2005; Van Heusden, 2005; Wang; Shakes, 1996).

No contexto da patogenicidade fúngica, o envolvimento das 14-3-3 torna-se ainda mais significativo. Estas proteínas coordenam mecanismos de virulência

críticos, incluindo a adesão às células hospedeiras (Assato *et al.*, 2015; Marcos *et al.*, 2016), a modulação da composição da parede celular (Lottersberger *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2018), os processos de filamentação (Herod *et al.*, 2022) e a sobrevivência sob condições de estresse (Trendelewa; Zvyagilskaya, 2018). Além destas funções, também regulam a apoptose, atuando como interruptores que podem favorecer a sobrevivência ou induzir a morte celular programada, ao interagir com alvos importantes desse processo (Ichimura *et al.*, 2004).

A matriz extracelular desempenha um papel crucial na formação de biofilme e em sua gênese. Um estudo recente analisou a composição da matriz de *P. brasiliensis* e observou-se predominância de polissacarídeos (Oliveira *et al.*, 2024). A matriz, considerada a chave para diferenciar as condições de crescimento do biofilme, é modulada temporalmente ao longo da cinética de sua formação e apresenta maior expressão de genes importantes relacionados a proteínas multifuncionais, envolvidas principalmente na adesão em estágios iniciais e na iniciação do biofilme. Recentemente, avaliou-se a expressão de genes relacionados à matriz e de enzimas envolvidas na produção e modificação de carboidratos, para serem incorporados à MEC. O polissacarídeo 1,3 β -glucana está presente no biofilme de *Candida albicans*, associado à proteção do biofilme contra agentes antifúngicos (Taff *et al.*, 2012). A 1,3 β -glucana sintase (Fks1) é necessária para a produção de 1,3 β -glucana e desenvolvimento da matriz de biofilme em fungos (Douglas *et al.*, 1997; Nett *et al.*, 2007; Massey *et al.*, 2023). O gene FKS1 de *P. brasiliensis* apresentou expressão aumentada ao longo da maturação do biofilme, sugerindo que pode ser um dos componentes da MEC desse biofilme (Oliveira *et al.*, 2024). Deste modo, é necessário estudar a composição da matriz extracelular quanto à presença de 1,3- β -glucana no biofilme de *P. brasiliensis*, tanto em isolados atenuados quanto em virulentos. Este poderá ser um importante biomarcador de biofilmes, com avaliação *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

1.3. Modelos para estudo de interação patógeno-hospedeiro

A relevância dos biofilmes para as infecções humanas precisa ser mais bem estudada no âmbito de modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, com foco em identificar fatores relacionados à sua formação, à virulência e aos fármacos antibiofilmes. Este aspecto ainda foi pouco explorado neste fungo. Em nosso laboratório, os nitrofuranos

têm-se mostrado promissores (Vaso *et al.*, 2022) e pretende-se verificar sua eficácia em biofilme deste fungo.

Diferentes modelos podem ser aplicados aos estudos da interação patógeno-hospedeiro para compreender o estabelecimento da infecção. Os modelos de cultura celular tridimensional (3D) são mais fiéis ao que se observa em modelos *in vitro*. Os modelos 3D podem variar desde esferoides em monocultivo ou cocultivo de vários tipos celulares até aqueles que demonstram a funcionalidade dos órgãos *in vivo*, representados por tecidos estratificados *in vitro*. No entanto, ainda não há um consenso crítico que estabeleça as condições experimentais mais adequadas para estudar o papel dos biofilmes na interação fungo-hospedeiro (Gorzalczany; e Rodriguez Basso, 2021). O modelo 3D em forma de esferoide para avaliar as interações entre células pulmonares humanas e *Paracoccidioides* spp. foi realizado com linhagens de células pulmonares humanas A549 e MRC-5. O modelo 3D mostrou-se promissor para estudos *in vitro* de interações patógeno-hospedeiro (Dos Santos *et al.*, 2023).

O modelo 3D de esferoide de queratinócitos foi desenvolvido por Mendonça *et al.* (2025), no qual se observou um alto índice de sobrevivência celular, tanto no esferoide sadio quanto no infectado por *Trichophyton rubrum*. Além disso, parâmetros como esfericidade e diâmetro, assim como as imagens de microscopia confocal e eletrônica de varredura, no qual se observou um alto índice de sobrevivência celular, tanto no esferoide sadio quanto no infectado por *Trichophyton rubrum*. Além disso, parâmetros como esfericidade e diâmetro, assim como as imagens de microscopia confocal e eletrônica de varredura, corroboraram o avanço da compreensão da interação fungo-hospedeiro.

Assim, vários tipos de células em modelos 3D podem ser usados para simular o que ocorre na doença em humanos (Friedrich *et al.*, 2009). Diante disso, neste projeto pretende-se enfatizar a paracoccidioidomicose cutânea e, portanto, desenvolver estudos com queratinócitos e fibroblastos em cocultivo.

Os modelos murinos são referência para o estudo da interação fungo-hospedeiro e para a avaliação da eficácia de terapias antifúngicas. Um estudo pioneiro (Mackinnon, 1959) utilizou camundongos como modelos de infecção para a paracoccidioidomicose, com dois isolados na fase leveduriforme de *P. brasiliensis* (IHM 1438 e IHM 1448), por diversas vias de infecção, a fim de observar a patogênese da doença.

Os modelos murinos, embora considerados padrão para mimetizar a doença humana, apresentam limitações significativas. Estas incluem dificuldades de reprodutibilidade na infecção por via inalatória, devido à dispersão irregular do inóculo nos pulmões (Mcewen *et al.*, 1987; Restrepo *et al.*, 1992), e a longa duração dos experimentos para análise de sobrevivência, que pode estender-se por meses (Kashino *et al.*, 1990). Somadas a questões econômicas, logísticas e éticas, tais fatores restringem o uso em larga escala de mamíferos, posicionando modelos alternativos como a *G. mellonella* como uma opção viável para a pesquisa de doenças infecciosas (Fuchs *et al.*, 2010; Jacobsen, 2014).

Além de modelos celulares, outros modelos alternativos ao uso de animais mamíferos podem ser utilizados para avaliar a interação patógeno-hospedeiro, a toxicidade e o tratamento com substâncias (Oliveira *et al.*, 2015).

As larvas de *Galleria mellonella* têm se mostrado uma importante plataforma e uma alternativa eficaz, ética e biologicamente relevante para o estudo da virulência (Fuchs; Mylonakis, 2006; Jacobsen, 2014). A semelhança entre a imunidade inata dos insetos e dos mamíferos permitiu analisar fenômenos relacionados à patogênese, mortalidade, interação, fagocitose, melanização e formação de estruturas do tipo granuloma em um estudo que comparou as taxas de sobrevivência de larvas infectadas por *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. Com isso, a *G. mellonella* mostra-se um modelo robusto, rápido e de baixo custo para investigar a interação patógeno-hospedeiro e os fatores de virulência na paracoccidioidomicose (Scorzoni *et al.*, 2015).

O modelo alternativo *G. mellonella* destaca-se pelo baixo custo de aquisição e por não exigir instalações especializadas para sua manutenção. O tamanho relativamente grande das larvas facilita o manejo e a inoculação precisa de inóculos definidos, permitindo o emprego de um número amostral mais elevado. A possibilidade de mantê-la a 37 °C também é uma vantagem em relação a outros animais, já que essa temperatura favorece a equivalência com o organismo do hospedeiro humano. Esse modelo apresenta notáveis semelhanças com a resposta imune inata dos mamíferos. Outro aspecto importante é que o sistema imune inato da larva é composto por diversos tipos celulares, cuja densidade pode ser relacionada diretamente com a patogenicidade do fungo (Desalermos; Fuchs; Mylonakis, 2012; Fuchs; Mylonakis, 2006).

1.4. Terapia antifúngica: desafios e limitações

O reino Fungi possui uma fonte promissora de moléculas bioativas, mas também um reservatório de patógenos emergentes que evoluem rapidamente sob pressão seletiva ambiental e clínica. Diante disso, estratégias integradas são necessárias para conter a resistência aos antifúngicos, incluindo vigilância genômica, fortalecimento do diagnóstico, práticas clínicas e incentivo à pesquisa. Recentemente, a OMS publicou uma lista de patógenos fúngicos prioritários, destacando a importância global do tema e apontando a necessidade no desenvolvimento de antifúngicos com novos mecanismos de ação (Fisher *et al.*, 2022; OMS, 2022).

As opções para o tratamento da paracoccidioidomicose são limitadas na prática, apesar de estudos indicarem que as espécies de *Paracoccidioides* são sensíveis a outros antifúngicos (Restrepo *et al.*, 1980; 1987; Naranjo *et al.*, 1990; Diaz *et al.*, 1992; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006; Queiroz-Teles *et al.*, 2007; De Almeida-Campos *et al.*, 2023). Itraconazol, cotrimoxazol (sulfametoxazol-trimetoprim) e anfotericina B (desoxicolato e formulações lipídicas) são os fármacos disponíveis para tratamento da paracoccidioidomicose (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2017).

Os estudos sobre as implicações da formação de biofilmes no estabelecimento da doença e sobre sua influência no tratamento e na resistência aos antimicrobianos são de extrema relevância. Atualmente, os fármacos disponíveis no arsenal terapêutico são usados na forma planctônica do fungo e há, assim, recidivas importantes que sugerem a baixa eficácia desses antifúngicos, além de sugerir a possibilidade de estarmos diante de outras formas de associação entre microrganismos (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2017). Portanto, há necessidade de estratégias inovadoras e de novos fármacos antifúngicos.

A ausência de vigilância epidemiológica e de testes de sensibilidade amplamente disponíveis limita a detecção precoce e o manejo adequado desses casos. Além disso, o número limitado de classes de antifúngicos disponíveis agrava o problema e reforça a urgência de novos agentes terapêuticos (Fisher *et al.*, 2022; Van Rhijn; Rhodes, 2025).

6. CONCLUSÕES

- ✓ Foi possível observar que vPb18 apresentou um biofilme mais bem formado e estruturado que aPb18, quanto à presença de polissacarídeos, metabolismo, biomassa, microscopias eletrônicas de varredura e de fluorescência confocal;
- ✓ Desenvolvimento e caracterização de esferoides com as células HDFa e com HaCaT e posterior infecção com os isolados aPb18 e vPb18, como nova plataforma para estudo da relação fungo-hospedeiro;
- ✓ Observou-se que a virulência obtida por vPb18 foi capaz de matar as larvas de *G. mellonella* com mais êxito e mais rapidamente do que a aPb18;
- ✓ Utilização do modelo de pele humana reconstruída como plataforma para estudo de infecção;
- ✓ Foi determinado que os biofilmes de vPb18 são mais densos, estruturados e com maior produção de matriz extracelular, quando comparados com aPb18 em matrizes exógenas, como fio de sutura;
- ✓ Os resultados de RT-qPCR evidenciaram diferenças no perfil de expressão gênica entre vPb18 e aPb18, particularmente em condições planctônicas, nas quais a vPb18 apresentou maior expressão dos genes 14-3-3 e GEL3. Em contrapartida, nos modelos de biofilme maduro e de pele infectada, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os isolados nos genes avaliados. Esses achados indicam que as variações transcricionais entre vPb18 e aPb18 estão associadas às fases iniciais de crescimento e de adaptação celular. Assim, os dados reforçam que, no contexto experimental, deve-se investigar outros genes relacionados à virulência;
- ✓ O composto derivado dos nitrofuranos, L7CF182, mesmo em concentrações de MIC baixas (aPb18: 3,90 µg/mL e vPb18: 7,81 µg/mL), foi eficaz contra células planctônicas de *P. brasiliensis*, mas não apresentou o mesmo resultado quando utilizado para tratar biofilmes desses mesmos isolados. Demonstrando a importância de estudar os biofilmes desta espécie e a busca por novos antifúngicos capazes de atender a essa demanda.

REFERÊNCIAS

- ANDREOTTI, P. F. *et al.* Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes and Infection**, v. 7, n. 5–6, p. 875–881, maio 2005.
- ASSATO, P. A. *et al.* Functional analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* 14-3-3 adhesin expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. **BMC microbiology**, v. 15, n. 1, 4 nov. 2015.
- BANDONI, R. J. Safranin O as a Rapid Nuclear Stain for Fungi. **Mycologia**, v. 11, n. 4, p. 873–874, 1979.
- BENEDICT, K. *et al.* Symptoms in blastomycosis, coccidioidomycosis, and histoplasmosis versus other respiratory illnesses in commercially insured adult outpatients—United States, 2016–2017. **Clinical Infectious Diseases**, v. 73, n. 11, p. E4336–E4344, 1 dez. 2021.
- BILA, N. M. *et al.* 2-Hydroxychalcone as a Potent Compound and Photosensitizer Against Dermatophyte Biofilms. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 679470, 13 maio 2021.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria GM/MS nº 6.734, de 18 de março de 2025. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, 18 mar. 2025. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-gm/ms-n-6.734-de-18-de-marco-de-2025-620767223>. Acesso em: 21 set. 2025.
- BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clinical microbiology reviews**, v. 6, n. 2, p. 89–117, 1993.
- CAMACHO, E.; NIÑO-VEGA, G. A. *Paracoccidioides* Spp.: Virulence Factors and Immune-Evasion Strategies. **Mediators of inflammation**, v. 2017, 2017.
- CARLTON, J. D. B. **Importância da proteína 14-3-3 de Paracoccidioides brasiliensis na formação de biofilmes e caracterização funcional do isolado selvagem e silenciado de 14-3-3**. 2018. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara. Disponível em: https://sucupira-legado.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=5552870. Acesso em: 20 de fev. 2026
- CÁSSIA ORLANDI SARDI, J. DE *et al.* *In vitro* *Paracoccidioides brasiliensis* biofilm and gene expression of adhesins and hydrolytic enzymes. **Taylor & Francis - Virulence**, v. 6, n. 6, p. 642–651, 2015.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **The journal of tropical medicine and hygiene**, v. 42, n. 15, p. 225–226, 1939.

CATTANA, M. E. *et al.* *In vivo Paracoccidioides* sp. Biofilm on Vascular Prosthesis. **Mycopathologia**, v. 182, n. 7–8, p. 747–749, 1 ago. 2017.

CHOWDHARY, A.; SHARMA, C.; MEIS, J. F. *Candida auris*: A rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 5, p. 90, 1 maio 2017.

CHRISTINE HAHN, R. *et al.* Paracoccidioidomycosis: Current Status and Future Trends. 2022.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318–1322, 21 maio 1999.

COUTINHO, Ziadir Francisco *et al.* Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980–1995). **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, p. 1441–1454, 2002.

CRABBÉ, A. *et al.* Antimicrobial efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in a three-dimensional lung epithelial model and the influence of fetal bovine serum. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 3 mar. 2017.

CAMPOS, L. A.; FIN, M. T.; SANTOS, K. S.; GUALQUE, M. W. L.; CABRAL, A. K. L. F.; KHALIL, N. M.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MAINARDES, R. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Nanotechnology-Based Approaches for Voriconazole Delivery Applied to Invasive Fungal Infections. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 1, p. 266, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010266>. Acesso em: 31 mar. 2026.

DESALERMOS, A.; FUCHS, B. B.; MYLONAKIS, E. Selecting an Invertebrate Model Host for the Study of Fungal Pathogenesis. **PLOS Pathogens**, v. 8, n. 2, p. e1002451, fev. 2012.

DIAZ, M.; NEGRONI, R.; MONTERO-GEI, F.; CASTRO, L. G.; SAMPAIO, S. A.; BORELLI, D.; RESTREPO, A.; FRANCO, L.; BRAN, J. L.; ARATHOON, E. G. *et al.* A Pan-American 5-year study of fluconazole therapy for deep mycoses in the immunocompetent host. **Clinical Infectious Diseases**, v. 14, supl. 1, p. S68–S76, 1992. Disponível em: https://doi.org/10.1093/clinids/14.Supplement_1.S68. Acesso em: 15 fev. 2025.

DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881, 2002.

DONOFRIO, F. C. *et al.* Enolase from *Paracoccidioides brasiliensis*: Isolation and identification as a fibronectin-binding protein. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 706–713, jun. 2009.

DOS SANTOS, K. S.; OLIVEIRA, L. T.; FONTES, M. L.; MIGLIATO, K. F.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; MOROZ, A. Alginate-Based 3D A549 Cell Culture Model to Study *Paracoccidioides* Infection. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 6,

p. 634, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof9060634>. Acesso em: 15 de fev. 2025.

DOUGLAS, C. M. *et al.* Identification of the FKS1 gene of *Candida albicans* as the essential target of 1,3-beta-D-glucan synthase inhibitors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 11, p. 2471–2479, 1997.

ELLS, T. C.; HANSEN, L. T. Strain and growth temperature influence *Listeria* spp. attachment to intact and cut cabbage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 34–42, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.033>. Acesso em: 12 de fev. 2025.

ESCRIBANO, P. *et al.* Azole resistance survey on clinical *Aspergillus fumigatus* isolates in Spain. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 27, n. 8, p. 1170.e1-1170.e7, 1 ago. 2021.

FISHER, M. C. *et al.* Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 9, p. 557–571, 1 set. 2022.

FRANCO, M. *et al.* Paracoccidioidomycosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 36, n. 1, p. 58–58, fev. 1994.

FRIEDRICH, J. *et al.* Spheroid-based drug screen: Considerations and practical approach. **Nature Protocols**, v. 4, n. 3, p. 309–324, 12 fev. 2009.

FUCHS, B. B. *et al.* Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. **Virulence**, v. 1, n. 6, p. 475–482, 2010.

FUCHS, B. B.; MYLONAKIS, E. Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 346–351, ago. 2006.

GIACOMAZZI, J. *et al.* The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, v. 59, n. 3, p. 145–150, 1 mar. 2016.

GONZÁLEZ-RAMÍREZ, A. I. *et al.* Analysis and description of the stages of *Aspergillus fumigatus* biofilm formation using scanning electron microscopy. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 243-, 18 out. 2016.

GORZALCZANY, S. B.; RODRIGUEZ BASSO, A. G. Strategies to apply 3Rs in preclinical testing. **Pharmacology Research & Perspectives**, v. 9, n. 5, p. e00863, 1 out. 2021.

HEROD, S. G. *et al.* Clearance of an amyloid-like translational repressor is governed by 14-3-3 proteins. **Cell Reports**, v. 39, n. 5, 3 maio 2022.

HEUSDEN, G. P. H. VAN. 14-3-3 proteins: regulators of numerous eukaryotic proteins. **IUBMB life**, v. 57, n. 9, p. 623–629, set. 2005.

ICHIMURA, T. *et al.* Transcriptomic and proteomic analysis of a 14-3-3 gene-deficient yeast. **Biochemistry**, v. 43, n. 20, p. 6149–6158, 25 maio 2004.

JACOBSEN, I. D. *Galleria mellonella* as a model host to study virulence of *Candida*. **Virulence**, v. 5, n. 2, p. 237–239, 2014.

KASHINO, S. S. *et al.* Alterations in the pathogenicity of one *Paracoccidioides brasiliensis* isolate do not correlate with its *in vitro* growth. **Mycopathologia**, v. 111, n. 3, p. 173–180, set. 1990.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. Tratado de micologia médica Lacaz. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LOCKHART, S. R. *et al.* Endemic and Other Dimorphic Mycoses in The Americas. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 151, 1 fev. 2021.

LOH, J. M. S.; PROFT, T. *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A *streptococcus*. **Virulence**, v. 4, n. 5, p. 419–428, 2013.

LOTTERSBERGER, F. *et al.* The *Saccharomyces cerevisiae* 14-3-3 proteins are required for the G1/S transition, actin cytoskeleton organization and cell wall integrity. **Genetics**, v. 173, n. 2, p. 661–675, 2006.

MACKINNON, J. E. Pathogenesis of south american blastomycosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, n. 6, p. 487–494, 1959.

MARCOS, C. M.; DA SILVA, J. F.; DE OLIVEIRA, H. C.; MORAES DA SILVA, R. A.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. Surface-expressed enolase contributes to the adhesion of *Paracoccidioides brasiliensis* to host cells. **FEMS Yeast Research**, v. 12, n. 5, p. 557–570, 2012.

MARCOS, C. M.; DA SILVA, J. D. F.; DE OLIVEIRA, H. C.; ASSATO, P. A.; SINGULANI, J. D. L.; LOPEZ, A. M.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. Decreased expression of 14-3-3 in *Paracoccidioides brasiliensis* confirms its involvement in fungal pathogenesis. **Virulence**, v. 7, n. 2, p. 72–84, 2016.

MARCOS, C. M.; OLIVEIRA, H. C.; ASSATO, P. A.; SILVA, J. F.; BENARD, G.; SOARES, F. A.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. *Paracoccidioides brasiliensis* 14-3-3 protein is important for virulence in a murine model. **Medical Mycology**, v. 57, n. 7, p. 900-904, 2019.

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, mar. 2006.

MARTINEZ, Roberto. New trends in paracoccidioidomycosis epidemiology. **Journal of fungi**, v. 3, n. 1, p. 1, 2017.

MARTINEZ, R. Epidemiology of paracoccidioidomycosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, supl. 19, p. 11–20, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000700004>. Acesso em: 15 fev. 2026.

MARTINS, M.; HENRIQUES, M.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; OLIVEIRA, R. Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. **Mycopathologia**, v. 169, n. 5, p. 323–331, 2010.

MASSEY, J.; ZARNOWSKI, R.; ANDES, D. Role of the extracellular matrix in *Candida* biofilm antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 47, n. 6, p. 1–6, 1 nov. 2023.

MCEWEN, J. G. *et al.* Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 25, n. 3, p. 165–175, 1 maio 1987.

MEDINA-ALARCÓN, K. P. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* and *Paracoccidioides brasiliensis* Formation and Treatment of Mixed Biofilm *In vitro*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 681131, 1 nov. 2021.

MENDES, R. P. *et al.* Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. **The Open Microbiology Journal**, v. 11, n. 1, p. 224–282, 2 nov. 2017.

MENDES-GIANNINI, M. J. S. *et al.* Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: Recent advances. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4–5, p. 237–248, 17 abr. 2008.

MENDONÇA, M. B. *et al.* Biofilm development in three-dimensional models infected with *Trichophyton rubrum*. **Microbiology Spectrum**, 29 ago. 2025.

MORRIS, C. E.; MONIER, J.; JACQUES, M. Methods for observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 4, p. 1570–1576, 1997.

MOWAT, E. *et al.* Development of a simple model for studying the effects of antifungal agents on multicellular communities of *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 9, p. 1205–1212, 1 set. 2007.

NAKANO, H. *et al.* Human metallothionein gene expression is upregulated by β -thujaplicin: possible involvement of protein kinase C and reactive oxygen species. **Biological and pharmaceutical bulletin**, v. 29, n. 1, p. 55–59, 2006.

NARANJO, M. S. *et al.* Treatment of paracoccidioidomycosis with itraconazole. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 28, n. 1, p. 67–76, 1990.

NEGRO, G. ; L. C. S. ; F. A. M. DEL. **Paracoccidioidomicose, blastomicose sulamericana**. São Paulo: Savier Edusp, p. 157-160. São Paulo, 1982.

NETT, J. *et al.* β -1,3 Glucan as a Test for Central Venous Catheter Biofilm Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 11, p. 1705–1712, 1 jun. 2007.

OBSILOVA, V. *et al.* 14-3-3 Protein interacts with nuclear localization sequence of forkhead transcription factor FoxO4. **Biochemistry**, v. 44, n. 34, p. 11608–11617, 30 ago. 2005.

OCTAVIANO, C. E.; ABRANTES, N. E.; PUCCIA, R. Extracellular Vesicles From *Paracoccidioides brasiliensis* Can Induce the Expression of Fungal Virulence Traits *In vitro* and Enhance Infection in Mice. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 834653, 28 fev. 2022.

OLIVEIRA, H. C. DE *et al.* Paracoccidioides-host Interaction: An Overview on Recent Advances in the Paracoccidioidomycosis. **Frontiers in microbiology**, v. 6, n. NOV, p. 1319, 2015.

OLIVEIRA, L. T. *et al.* Dynamics of Mono- and Dual-Species Biofilm Formation and Interactions Between *Paracoccidioides brasiliensis* and *Candida albicans*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 551256, 14 out. 2020.

OLIVEIRA, L. T. *et al.* *Paracoccidioides* spp.: the structural characterization of extracellular matrix, expression of glucan synthesis and associated genes and adhesins during biofilm formation. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, p. 1354140, 2024.

PAGLIARI, C.; SOTTO, M. N. Correlation of factor XIIIa+ dermal dendrocytes with paracoccidioidomycosis skin lesions. **Medical Mycology**, v. 40, n. 4, p. 407–410, 2002.

PAULA E SILVA, A. C. A. DE *et al.* Microplate alamarblue assay for *Paracoccidioides* susceptibility testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 1250–1252, abr. 2013.

PEÇANHA, P. M. *et al.* Paracoccidioidomycosis: What We Know and What Is New in Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 10, p. 1098, 18 out. 2022.

RAMARAO, Nalini; NIELSEN-LEROUX, Christina; LERECLUS, Didier. The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 70, p. 4392, 2012.

RESTREPO, ANGELA; JIMÉNEZ, BEATRIZ E. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. **Journal of clinical microbiology**, v. 12, n. 2, p. 279-281, 1980.

RESTREPO, C.; MACHER, A. M.; RADANY, E. H. Disseminated extraintestinal isosporiasis in a patient with acquired immune deficiency syndrome. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 87, n. 4, p. 536-542, 1987.

RESTREPO, S. *et al.* Development of pulmonary fibrosis in mice during infection with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 30, n. 3, p. 173–184, 1992.

RHIJN, N. VAN; RHODES, J. Evolution of antifungal resistance in the environment. **Nature Microbiology**, v. 10, n. 8, p. 1804–1815, 1 ago. 2025.

RIVERO-MENENDEZ, O. *et al.* Triazole Resistance in *Aspergillus* spp.: A Worldwide Problem? **Journal of Fungi**, v. 2, n. 3, p. 21, 1 set. 2016.

ROCHA, T. *et al.* A 3D printed hydrogel to promote human keratinocytes' spheroid-based growth. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 111, n. 5, p. 1089–1099, 1 maio 2023.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, MARCOS, F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, 2012. 388 p. ISBN 8527708663.

SALEH, R.; REZA, H. M. Short review on human umbilical cord lining epithelial cells and their potential clinical applications. **Stem cell research & therapy**, v. 8, n. 1, p. 222, 2017.

SALICK, M. R. *et al.* Modelling Zika Virus Infection of the Developing Human Brain *In vitro* Using Stem Cell Derived Cerebral Organoids. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, v. 2017, n. 127, p. 56404, 19 set. 2017.

SALZER, H. J. F. *et al.* Diagnosis and management of systemic endemic mycoses causing pulmonary disease. **Respiration**, v. 96, n. 3, p. 283-301, 2018.

SARDI, J. DE C. O. *et al.* Unveiling the functional significance of the 14.3.3 protein: A key player in *Paracoccidioides brasiliensis* biofilm formation. **Microbial Pathogenesis**, v. 188, p. 106537, 1 mar. 2024.

SCORZONI, L. *et al.* Comparison of virulence between *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* using *Galleria mellonella* as a host model. **Virulence**, v. 6, n. 8, p. 766–776, 1 jan. 2015a.

SEIDLER, M. J.; SALVENMOSER, S.; MÜLLER, F. M. C. *Aspergillus fumigatus* forms biofilms with reduced antifungal drug susceptibility on bronchial epithelial cells. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 11, p. 4130-4136, 2008.

SENBUSCH, V. P.; HECHLER, J.; MULLER, U. Molecular architecture of fungal cell walls. An approach by use of fluorescent markers. **European Journal of Cell Biology**, v. 30, n. 2, p. 305–312, 1 maio 1983.

SILVA, J. DE F. DA *et al.* *Paracoccidioides brasiliensis* 30 kDa Adhesin: Identification as a 14-3-3 Protein, Cloning and Subcellular Localization in Infection Models. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 30 abr. 2013.

SILVA, L. D. C. *et al.* Transcriptome Profile of the Response of *Paracoccidioides* spp. to a Camphene Thiosemicarbazide Derivative. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0130703, 26 jun. 2015.

SILVA, W. L. F. DA *et al.* *Paracoccidioides brasiliensis* interacts with dermal dendritic cells and keratinocytes in human skin and oral mucosa lesions. **Medical Mycology**, v. 54, n. 4, p. 370–376, 1 maio 2016.

Situação epidemiológica — Ministério da Saúde. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/p/pcm/situacao-epidemiologica>>. Acesso em: 21 set. 2025.

SUN, Z. *et al.* Arbuscular Mycorrhizal Fungal 14-3-3 Proteins Are Involved in Arbuscule Formation and Responses to Abiotic Stresses During AM Symbiosis. **Frontiers in microbiology**, v. 9, n. MAR, 5 mar. 2018.

TAFF, H. T. *et al.* A *Candida* Biofilm-Induced Pathway for Matrix Glucan Delivery: Implications for Drug Resistance. **PLOS Pathogens**, v. 8, n. 8, p. e1002848, ago. 2012.

TELLES, F. Q. *et al.* An open-label comparative pilot study of oral voriconazole and itraconazole for long-term treatment of paracoccidioidomycosis. **Clinical infectious diseases**, v. 45, n. 11, p. 1462-1469, 2007.

SPAGOLLA, R. N. T. *et al.* Skin irritation testing beyond tissue viability: Fucoxanthin effects on inflammation, homeostasis, and metabolism. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 2, p. 136, 2020.

TEIXEIRA, M. M. *et al.* Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 52, n. 2, p. 273–283, 1 ago. 2009.

TEIXEIRA, M. M. *et al.* *Paracoccidioides* species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 10, p. e1004397, 2014.

THOMAZ, L. *et al.* *Galleria mellonella* as a model host to study *Paracoccidioides lutzii* and *Histoplasma capsulatum*. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 139–146, 15 fev. 2013.

TRENDELEVA, T. A.; ZVYAGILSKAYA, R. A. Retrograde Signaling as a Mechanism of Yeast Adaptation to Unfavorable Factors. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 83, n. 2, p. 98–106, 1 fev. 2018.

TURISSINI, D. A. *et al.* Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 106, p. 9–25, 1 set. 2017a.

VASO, C. O. *et al.* Synthesis and Evaluation of the Antifungal and Toxicological Activity of Nitrofurantoin Derivatives. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 3, p. 593, 1 mar. 2022.

VENTURINI, James *et al.* Paracoccidioidomycosis in the 21st century: Challenges and milestones. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 20, n. 1, p. e0013819, 2026.

VILELA, R. *et al.* A taxonomic review of the genus *Paracoccidioides*, with focus on the uncultivable species. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 17, n. 4, p. e0011220, 1 abr. 2023.

WANG, W.; SHAKES, D. C. Molecular evolution of the 14-3-3 protein family. **Journal of molecular evolution**, v. 43, n. 4, p. 384–398, 1996.

WANKE, B.; LONDERO, A. T. Epidemiology and Paracoccidioidomycosis Infection. **Paracoccidioidomycosis**, p. 109–120, 31 jan. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action**. v. 1, p. 1–48, 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: a road map for neglected tropical diseases 2021–2030**.

Geneva: World Health Organization, 2020. Disponível em:

<https://www.who.int/publications/i/item/9789240010352>. Acesso em: 15 fev. 2025.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global report on neglected tropical diseases 2024**. Geneva: World Health Organization, 2024. Disponível em:

<https://www.who.int/teams/control-of-neglected-tropical-diseases/global-report-on-neglected-tropical-diseases-2024>. Acesso em: 21 de set. 2025.