UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Graduação Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia

MARCOS VINÍCIO DA SILVA

Análise comparativa proteômica de *Histoplasma capsulatum* nas formas planctônica e biofilme através de espectrometria de massas

Araraquara, SP

2023

MARCOS VINÍCIO DA SILVA

Análise comparativa proteômica de *Histoplasma capsulatum* nas formas planctônica e biofilme através de espectrometria de massas

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", para obtenção do grau de Engenheiro(a) de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador(a): Prof.(a). Dr.(a). Ana Marisa Fusco Almeida
Coorientador.(a): Prof.(a). Dr.(a). Larissa Naira Carvalho Gonçalves

Araraquara, SP

2023

Silva, Marcos Vinício da.
S586a Análise comparativa proteômica de *Histoplasma capsulatum* nas formas planctônica e biofilme através de espectrometria de massas / Marcos Vinício da Silva. – Araraquara: [s.n.], 2023.
36 f. : il.

Orientadora: Ana Maria Fusco Almeida.
Coorientadora: Larissa Naira Carvalho Gonçalves.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

1. Análise proteômica. 2. Biofilmes. 3. *H. capsulatum*. I. Almeida, Ana Maria Fusco, orient. II. Gonçalves, Larissa Naira Carvalho, coorient. III. Título.

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

Esta ficha não pode ser modificada

AGRADECIMENTOS

Primeiro queria agradecer minha mãe e meu pai que sempre estiveram ao meu lado, sempre acreditaram que eu conseguiria mesmo quando os outros disseram o contrário, essas duas pessoas são e vão sempre ser meu porto seguro. Também gostaria de agradecer muito algumas pessoas do Laboratório de Proteômica e Micologia que sempre se dispuseram a me ensinar desde aquele simples passo de ligar a autoclave, até preparar meios de cultura além de toda carga de conhecimento técnico para se estar em um laboratório, deixo aqui meu agradecimento a Carol Barcelos, a Niura, Carol Vaso, Rosangela, por todo o ensinamento, por todos os momentos de descontração que fazia cada dia na banca, algo sensacional. E eu não poderia esquecer da minha orientadora e minha coorientadora que estiveram sempre ao meu lado desde o início do desenvolvimento do projeto até quando chegamos aos resultados, eu sou muito grato a vocês Ana Marisa e Larrissa, boa parte da bagagem de conhecimento que adquiri e da pessoa que sou hoje foi justamente pela orientação de vocês, e por isso eu vou ser eternamente grato.

RESUMO

Histoplasma capsulatum é um fungo globalmente disseminado com áreas endêmicas no Brasil. Esse fungo dimórfico está presente naturalmente no solo, especialmente na presença de fezes de morcegos e pássaros e é capaz de mudar sua morfologia miceliar para leveduriforme quando inalado pelo hospedeiro, causando assim uma infecção aguda nos alvéolos pulmonares. Em indivíduos imunodeprimidos a infecção pulmonar pode se tornar sistêmica, espalhando-se por outros tecidos e levando pacientes à morte. Além da mudança morfológica, outro passo essencial para a infecção é a formação de biofilme, o qual facilita a instalação do fungo nas células hospedeiras através da produção de diversos componentes extracelulares, aumentando sua resistência à resposta imune do paciente e aos antifúngicos disponíveis no mercado. O estudo do proteoma do biofilme se mostra essencial para o conhecimento de proteínas presentes somente na condição de biofilme ou na condição planctônica, assim como a regulação das mesmas nas diferentes condições. A técnica eletroforética SDS-PAGE não foi suficiente para a separação satisfatória das proteínas, provavelmente devido a presença de interferentes hidrolisados. Utilizando a uma abordagem por espectrometria de massas, no entanto, pudemos observar prováveis proteínas diferenciais do crescimento de biofilme e planctônico destacando-se as proteínas envolvidas na proteção contra o estresse oxidativo e síntese energética mais presentes nos biofilmes.

Palavras-Chave: Análise Proteômica; Biofilmes; *H. capsulatum*.

ABSTRACT

Histoplasma capsulatum is a globally disseminated fungus with endemic areas in Brazil. This dimorphic fungus is naturally present in the soil, especially in the presence of bat and bird feces, and is capable of changing its mycelial morphology to a yeast-like one when inhaled by the host, thus causing an acute infection in the pulmonary alveoli. In immunosuppressed individuals, pulmonary infection can become systemic, spreading to other tissues and leading patients to death. In addition to the morphological change, another essential step for infection is the formation of a biofilm, which facilitates the installation of the fungus in host cells through the production of several extracellular components, increasing its resistance to the patient's immune response and to the antifungal agents available on the market. The study of the biofilm proteome is essential for the knowledge of proteins present only in the biofilm condition or in the planktonic condition, as well as their regulation in different conditions. The SDS-PAGE electrophoretic technique was not sufficient for the satisfactory separation of the proteins, probably due to the presence of hydrolyzed interferents. Using a mass spectrometry approach, however, we could observe probable differential proteins of biofilm and planktonic growth, highlighting the proteins involved in protection against oxidative stress and energy synthesis more present in biofilms.

Keywords: Proteomic Analysis; Biofilms; *H. capsulatum*.

Lista de Figuras

Figura 1. Eletroforese SDS-PAGE**.** 24
Figura 2. Diagrama de Venn. 25
Figura 3. Distribuição das proteínas identificadas da cepa EH-315 de *H. capsulatum*. 26

Lista de Tabelas

Tabela 1. Concentração de proteínas totais de *H. capsulatum* em células planctônicas e em biofilme determinadas pelo método de Bradford. 23
Tabela 2. Proteínas presentes somente no biofilme (score maior que 100)..... 29
Tabela 3. Proteínas presentes somente no planctônico (score maior que 100). 29

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 10

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 12

2.1. PROTEÔMICA 12

2.2. ESPECTOMETRIA DE MASSAS 14

2.3. FUNGOS 15

3. OBJETIVOS 18

4. METODOLOGIA 18

4.1. Microrganismo 18

4.2. Análise Proteômica 19

4.2.1. Preparo da massa celular, lise e obtenção da fração proteica 19

4.2.2. Determinação da concentração de proteínas totais: Método de Bradford 20

4.2.3. Eletroforese SDS-PAGE 20

4.2.4. Digestão Enzimática 21

4.2.5. Análise proteicas por shotgun 21

4.2.6. Identificação das proteínas: Espectrometria de Massas 22

4.2.7. Análise funcional das proteínas identificadas 22

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 23

5.1. Quantificação Proteica 23

5.2. Eletroforese SDS-PAGE 24

5.3. Resultado da Análise Proteômica (*shotgun*) 25

6. **CONCLUSÃO** 31

7. REFERÊNCIAS 33

1. INTRODUÇÃO

Histoplasma capsulatum variedade *capsulatum* é um patógeno fúngico dimórfico que tem distribuição mundial. Na natureza o fungo encontra-se em fezes de morcegos e aves em locais como cavernas e galinheiros, ambientes que apresentam temperatura e umidade perfeita para o seu desenvolvimento (KAUFFMAN, 2007). 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 sistêmica, particularmente em indivíduos imunocomprometidos, causando a doença denominada histoplasmose (DAMASCENO et al., 2019; NOSANCHUK et al., 2002).

A histoplasmose é descrita como uma micose amplamente distribuída nas Américas, particularmente 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 e sudeste da Ásia (DAMASCENO et al., 2019). No Brasil ela se tornou amplamente disseminada por volta dos anos de 1980 com o surgimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e surtos de histoplasmose aguda que 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 (FAIOLLA et al., 2013; FERREIRA; BORGES, 2009; PASSOS et al., 2014).

Sendo assim, a infecção é adquirida por via respiratória, a partir da inalação de microconídios ou fragmentos de hifas presentes na natureza e disseminados através da propagação no ar (WHEAT et al., 2016). Uma vez inaladas, estas formas de disseminação atingem os alvéolos pulmonares e devido às mudanças de ambiente (temperatura, nutrientes etc.) levam o fungo a um estado de estresse, onde ocorre uma diferenciação de conídios em leveduras que por sua vez são fagocitadas por macrófagos alveolares (Mø) (SAHAZA et al., 2014). As leveduras se multiplicam dentro dos fagolisossomas e, nessa fase, em contraste a função usual dos Mø de eliminar os microrganismos nocivos, estas células propiciam um ambiente favorável e protetor para a sobrevivência e replicação da

fase leveduriforme de *H. capsulatum*, a qual se caracteriza como o morfotipo parasitário-virulento deste fungo (GUIMARÃES; DE CERQUEIRA; NOSANCHUK, 2011)

Após a infecção, as manifestações clínicas abrangem desde um quadro assintomático, estado que ocorre com grande parte dos hospedeiros imunocompetentes após baixa exposição ao inóculo, à infecção disseminada e rapidamente fatal em hospedeiros imunocomprometidos (GLADIEUX, 2018; MITTAL et al, 2019)

Adicionalmente, os fatores de virulência desenvolvidos pelo fungo são essenciais para o sucesso da infecção. Dentre eles destacam-se: a) a transição micélio-levedura induzida pela temperatura, a qual se denomina dimorfismo térmico; b) uma proteína de choque térmico (Hsp60); c) um polissacarídeo da parede celular, denominado α-(1-3)-glucano; d) uma proteína extracelular específica da fase leveduriforme (YPS3); e) os mecanismos para aquisição de ferro; f) uma pequena proteína secretada que é capaz de se ligar ao Ca^{2+} em baixas concentrações (Cbp1); g) a produção de melanina e por fim : h) a formação dos biofilmes de *H. capsulatum* (EDWARDS; ALORE; RAPPLEYE, 2011; HOLBROOK; RAPPLEYE, 2008; SOKOL-ANDERSON; BRAJTBURG; MEDOFF, 1986).

Os biofilmes são comunidades sésseis de microrganismos, nas quais as células aderem a um substrato ou interface circundados por uma matriz extracelular (MEC) de polissacarídeos. Os microrganismos estruturados em biofilmes exibem altos níveis de resistência aos antimicrobianos em função da baixa perfusão de fármacos, favorecendo o desenvolvimento de fenótipos resistentes (CARRETO-BINAGHI et al, 2015; COSTA-ORLANDI et al., 2017).

Neste sentido, nosso grupo tem explorado aspectos únicos e determinantes para a formação dos biofilmes de *H. capsulatum in vitro* e correlações entre o modo de infecção de *H. capsulatum* e a formação desses biofilmes (PITANGUI *et al.*, 2012, 2016). Diante desta problemática, é reafirmada a necessidade da identificação de novos alvos que possa ser selecionado, a fim de estabelecer uma nova estratégia terapêutica para a histoplasmose.

Atualmente as plataformas "Ômicas" dispõem de ferramentas e abordagens extremamente promissoras para investigação de alvos e/ou biomarcadores da interação fungo-célula hospedeira, no que diz respeito à quantificação das mudanças globais na abundância de transcritos de RNA mensageiro (RNAm) (transcriptômica), proteínas (proteômica/secretômica) e outros componentes biomoleculares (metabolômica) em

diferentes condições as quais uma célula ou organismo estiver submetido (OZSOLAK; MILOS, 2011).

O proteoma pode determinar informações sobre os processos celulares envolvidos, fisiologia e função celular, bem como fluxos metabólicos. Seguindo um fluxo de trabalho baseado em métodos de fracionamento, quantificação, espectrometria de massa (MS) e bioinformática. (WESTMAN; TAHERZADEH; FRANZÉN, 2012).

Análises *shotgun* têm possibilitado a identificação de proteínas em larga escala, contribuindo para a caracterização da dinâmica das variações que ocorrem em diferentes perfis proteicos expressos em diferentes condições ambientais à que são expostos os microrganismos. Dentre estas novas tecnologias, os equipamentos do tipo LC-MS/MS, compostos por um cromatógrafo líquido (LC) acoplado a um espectrômetro de massas (MS), têm fornecido resultados confiáveis para tais análises (AOKI et al., 2013; LASKAY et al., 2013). Dessa maneira a análise por *shotgun* foi definida para dar início as investigações das proteínas envolvidas na conformação planctônica e biofilme do *H. capsulatum* dada a capacidade de identificação e grau de acuracidade dessa metodologia que a faz uma ferramenta essencial na identificação de proteínas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. PROTEÔMICA

O termo proteômica foi introduzido por Marc Wilkins em 1995 e remete ao estudo das proteínas, desde suas estruturas, composições, funções e interações no ambiente em que se encontram. O campo da proteômica é capaz de trazer respostas a várias questões, na área médica, agrícola, microbiológica, alimentos, dentre outros, podendo estar relacionadas a uma proteína especifica com funções já descritas ou mesmo uma função desconhecida da mesma, bem como encontrar evidências da presença de uma proteína que possa estar relacionada a uma determinada atividade observada e até catalogar proteínas desconhecidas (AL-AMRANI et al., 2021).

A proteômica pode ser categorizada em três grandes áreas de estudos baseados na identificação, caraterização e funções das proteínas. Dadas as características intrínsecas das proteínas a vários fatores externos que podem alterar tanto suas expressões como estruturas, existem várias metodologias que compõe o campo da proteômica, cada qual possuindo objetivos específicos de estudos (GALLARDO; ORTEA; CARRERA, 2013).

Uma metodologia muito conhecida e aplicada na separação de proteínas é a eletroforese em gel de poliacrilamida, cujo intuito é separar as diferentes proteínas por tamanho aplicando um campo elétrico que induz as proteínas carregadas negativamente a migrarem em direção ao eletrodo positivo passando pelos poros do gel, onde as proteínas menores tem sua passagem facilitada e as maiores levam mais tempo. A própria técnica de eletroforese possui suas variações dependendo do objetivo específico do estudo, por exemplo, a aplicação do SDS (Dodecil sulfato de sódio), um detergente iônico que tem como objetivo equalizar as diferentes cargas das proteínas, se ligando a elas por meio de interações hidrofóbicas consequentemente desnaturando essas proteínas no processo, mas garantindo uma melhor separação por peso molecular ao realizarem a corrida no gel (NOWAKOWSKI; WOBIG; PETERING, 2014).

A cromatográfica é uma outra técnica de separação de proteínas amplamente utilizada que parte dos mesmos princípios da eletroforese de separação por tamanho e carga, porém na cromatografia utiliza-se de duas fases para separação e identificação de proteínas, a fase móvel (um solvente ou tampão) que tem a função de carregar as proteínas passando pela fase estacionária (sólida) que normalmente tem mais ou menos afinidade dependendo da proteína. Existem vários tipos de cromatografia, como a cromatografia em gel (separação por tamanho), cromatografia por troca iônica (separação por carga), cromatografia por afinidade (separação pela ligação covalente das proteínas de interesse ao suporte, que seria a fase estacionária da coluna), dentre outras, o uso dessas diferentes técnicas varia dependendo do objetivo buscado no estudo (COSKUN, 2016).

O campo da proteômica passou por grandes mudanças no decorrer dos anos. Antes da revolução genômica as técnicas disponíveis para o estudo das proteínas eram baseadas em métodos enzimáticos onde os produtos das reações eram observados através da absorção ultravioleta (UV) em espectrofotômetros, como por exemplo a degradação de Edman onde polipeptídios sofriam degradação química gradual da parte N-terminal á C-terminal para posterior sequenciamento identificando os aminoácidos por absorção (UV), essa metodologia começou a ser substituída como método convencional a partir da década de 1990 quando uma grande variedade de estratégias baseadas na espectrometria de massas começou a surgir (DOMON; AEBERSOLD, 2006). A implementação da espectrometria de massas que alinha a tecnologia necessária para a quebra das proteínas em peptídeos e posteriormente aminoácidos, juntamente com o uso da bioinformática para identificar diferentes tipos de proteínas em uma amostra proporcionou uma grande revolução na área de estudos proteômicos (YU; STEWART; VEENSTRA, 2010).

A aplicabilidade de todas essas técnicas em sinergia, fez da proteômica um campo de estudo amplo e indispensável para qualquer estudo molecular que envolva a necessidade de encontrar mecanismos biológicos presentes em determinadas funções, marcadores diagnósticos, pesquisa por novos medicamentos e vacinas e até melhoramento genético aplicáveis na agricultura (CHO, 2007).

2.2. ESPECTOMETRIA DE MASSAS

O campo da espectrometria de massas teve como base as descobertas de J. J. Thomson, no contexto da corrida pela determinação da relação massa carga (m/z) na busca pela resposta da natureza dos raios catódicos (feixes de elétrons criados ao se estabelecer uma diferença de potencial entre dois eletrodos contendo gases rarefeitos), com a ajuda de seu assistente E. Everett, Thomson criou um equipamento capaz de medir simultaneamente massa e elétron e/m (conhecido posteriormente como relação massa carga) que comprovou a natureza de partícula dos raios catódicos e foi capaz de mensurar sua massa, o que proporcionou a Thomson o Nobel de física de 1906 (GRIFFITHS, 2008).

A aplicabilidade desse grande equipamento desenvolvido por Thomson foi voltada para os estudas da natureza fundamental do átomo até a década de 1940, quando Alfred Nier, um engenheiro elétrico que teve seu campo de pesquisa de pós graduação voltado para a física, onde sua carga de conhecimento desses dois campos possibilitou a criação de projetos que melhorou e expandiu a aplicabilidade do espectrômetro de massas, sendo na época uma ferramenta chave para o início da era nuclear mas também para o início da ampliação dos horizontes para o campo da biologia molecular (DE LAETER; KURZ, 2006).

Desde então a cada passo na história surgiram melhorias e diversas variações dessa grande ferramenta nos estudos tanto no campo da física como na biologia molecular, mas foi somente entre 1922 com a utilização da espectrometria por ionização de elétrons onde cinco moléculas orgânicas simples foram analisadas tendo CH_3Br como a maior delas. Os resultados dessas análises não foram satisfatórios, trazendo muitos picos de fundo e íons moleculares extremamente pequenos. Alguns anos depois em 1931, Ernest Linder publicou uma análise do benzeno utilizando a espectrometria de massas de ionização por impacto de elétrons onde uma molécula gasosa é bombardeada com elétrons de ~70 $^{-}$eV expulsando elétrons da molécula e transformando-a em íons moleculares estáveis que são medidos ponto a ponto de acordo com o aumento do campo magnético aplicado, tendo

resultados mais precisos aplicáveis a moléculas orgânicas mais complexa (MCLAFFERTY, 2011).

No contexto da evolução da espectrometria de massas, chegamos em meados da década de 1950, quando Paul e Steinwedel desenvolveram dispositivos quadrupolos capazes de “prender” íons carregados tendo sua aplicabilidade na espectrometria de massas foi introduzia por Fischer logo depois. Esse dispositivo que hoje é amplamente utilizado, tem a capacidade de prender íons carregados mantendo-os estáveis dentro de um campo magnético que sofre variações intencionais para promover uma saída regulada desses íons com base na relação massa/carga de cada um, que são detectados logo em seguida, atualmente pode-se acopla-lo a uma coluna de Cromatografia liquida de alta eficiência (CLAE) juntamente com a ionização por eletrospray, onde a cromatografia fornece uma separação inicial da amostra e o eletrospray proporciona sua ionização (MARCH, 2016).

A evolução continua do espectrômetro de massas e de outras equipamentos e suas metodologias, forneceram as ferramentas necessárias para os estudos dos mecanismos moleculares envolvidos em diversas situações, desde o campo da genética, produção de medicamentos até o campo da medicina diagnostica na procura por marcadores específicos, alvos terapêuticos para o tratamento de doenças, genéticas, virais e até fúngicas (ASLAM et al., 2017).

2.3. FUNGOS

Existem muitas divergências nas classificações e definições no Reino Fungi, dentre as definições temos uma que classifica os fungos como microrganismos eucariotos osmoheterotróficos (dependem da matéria orgânica para sua sobrevivência). A classificação dos Reinos (animal, plantas, fungos, protista e procariotos) foram abstratamente definidos com base na organização celular (procarioto e eucariotos), multicelularidade, nível trófico (produtor, consumidor e decompositor), porém novas classificações filogenéticas começaram a redesenhar tais classificações ainda que exista muitas divergências na fronteira das ramificações filogenéticas (RICHARDS; LEONARD; WIDEMAN, 2017)

O Reino Fungi está em constante evolução quanto a sua classificação taxonômica e com a ampliação dos horizontes nas classificações filogenéticas dos fungos desde o avanço da ciência na área da biologia molecular nos últimos anos, onde se tornou possível

analisar a nível genético com maior precisão, foi possível trazer mais refinamento no processo de categorização dos fungos (RAGHUKUMAR, 2017).

Os fungos possuem diversas particularidades por serem extremamente adaptáveis ao ambiente que se encontram, podendo ser encontrados como leveduras, bolores e os que transitam para essas duas formas, fungos dimórficos que podem ser encontrados na forma de levedura a temperaturas de 37 ºC e hifas, bolores quando a temperatura diminui em torno de 25 ºC. Além da temperatura, outros fatores externos como pH, concentração de CO_2, níveis de cisteínas ou compostos contendo sulfidrila, podem influenciar no estado dimórfico desses fungos em específicos sendo esse um exemplo da adaptabilidade desses organismos (MCGINNIS; TYRING, 1996).

A grande adaptabilidade dos fungos vem acompanhada de alguns pontos positivos para sua utilização em diversos campos como a agricultura, medicina além de serem ferramentas indispensáveis na contribuição do desenvolvimento sustentável. No campo da agricultura podemos observar por exemplo, o grande desgaste que o solo vem sofrendo ao serem cultivados repetidas vezes sem o devido cuidado no ciclo de renovação de nutrientes, além do fato que em um futuro próximo os estoques de fosfatos irão se esgotar impactando na produção global de alimentos, e é nesse contexto que os fungos se mostram úteis, as micorrizas (fungos que vivem em ligação simbiótica a plantas vasculares) tem a capacidade de enriquecer o solo naturalmente contribuído para a manutenção dessa terra sem a necessidade de fatores externos (BENDER; VAN DER HEIJDEN, 2015).

A grande versatilidade dos fungos também se mostrou útil no campo da medicina, podemos citar como sendo um grande marco na história, quando no outono de 1928 Alexandre Fleming fez uma observação que iria revolucionar o campo da medicina no que diz respeito a medicamentos, quando acidentalmente o fungo *Penicillium* contaminou sua amostra contendo a bactéria *Staphylococcus aureus* e nos pontos onde o fungo crescia havia a presença de áreas (halos) sem o crescimento da bactéria, sendo esse o início da descoberta dos antibióticos (GAYNES, 2017).

Após a descoberta da penicilina, muitos pesquisadores direcionaram seus esforços na busca por outros antibióticos de origem fúngica o que proporcionou a descoberta da estreptomicina, um poderoso antibiótico para o tratamento da tuberculose que foi descoberto por Albert Schatz em 1943 isolado da bactéria *Streptomyces griseus*, na época classificada como fungo, no entanto nenhum antibiótico de origem fúngica ou de outros microrganismos se equiparou a penicilina (WAINWRIGHT, 2008).

A grande versatilidade dos fungos pode ser algo positivo do ponto de vista de utilização pelos humanos, como pode ser algo negativo quando temos essa adaptabilidade volta para os fungos patogênicos como o *Histoplama capsulatum*. Nomeado em 1905 pelo patologista Samuel Darling, é um fungo dimórfico responsável pela Histoplasmose (infecção sistêmica que acomete principalmente pacientes imunossuprimidos) (GOSSEL, 2004).

O *H. capsulatum* trata-se de um fungo dimórfico, ou seja, ele se apresenta no ambiente de duas formas distintas, como bolores no ambiente e na forma leveduriforme em tecidos ou culturas em condições especificas e temperaturas de 37 ºC, onde sua fase de micélio apresenta hifas septadas de 1 a 2,5 µm com macroconídios (estrutura de reprodução sexuada) de 8 á 14 µm na lateral terminal dos ramos e microconídios (estrutura de reprodução assexuada) de 2 a 6 µm que são as estruturas infectantes inaladas pelos hospedeiros, já a forma leveduriforme de *H. capsulatum* é oval com 2 a 4 µm de diâmetro (LINDER; KAUFFMAN, 2019).

Presente diversas regiões do globo, *H. capsulatum* está presente em bolsões focos espalhados pelo planeta como vales do Rio Ohio e Mississipi nos Estados Unidos, na América Central e do Sul, Continente Africano (Congo, Zimbábue e África do Sul) no continente Asiático (Índia, China, Malásia, Taiwan) e na Austrália, os relatos de surtos contavam sempre com ambientes onde viviam animais como morcegos e aves (que são vetores para a disseminação do fungo, presente no sistema gastrointestinal dos morcegos e nas penas das aves) e em locais próximo a cavernas ou mesmo próximos a prédios abandonados que são ambientes propícios para o seu crescimento (WOODS, 2002).

Ao entrar em contato com o hospedeiro através do trato respiratório os microconídios de *H. capsulatum* se alojam nos álveos pulmonares onde sofrem uma transformação dada a diferença de temperatura, sendo a temperatura corporal de 37 ºC, e assumem a forma leveduriforme, essa transformação muito provavelmente ocorre após os conídios serem englobados pelos neutrófilos e macrófagos (células de defesa do organismo) e a transição varia de horas a dias, sendo a fase leveduriforme a responsável pela infecção (MITTAL et al., 2019).

Após a infecção de *H. capsulatum* os sinais não são perceptíveis, sintomáticos e até podem ser confundidos com uma gripe mas quando as células de imunidade

especificas se desenvolve a infecção é contida, no entanto em pacientes imunossuprimidos, ou que tiveram órgãos transplantados, os sinais são mais evidentes onde ocorre uma disseminação da doença por todo o corpo causando sintomas sistêmicos como febre, calafrios, perda de peso, fadiga e em casos graves choque séptico com falecia múltiplas dos órgãos (KAUFFMAN, 2008).

A dificuldade no tratamento da Histoplasmose, principalmente em pacientes imunossuprimidos pode estar ligada a formação de biofilme dessas leveduras dentro do corpo do hospedeiro, existem poucos estudos voltados para a formação do biofilme de *H. capsulatum*, mas de acordo com a pesquisa de Pitangui et al., (2012) foi possível constatar a formação dessas estruturas compostas por várias leveduras aderidas em células epiteliais alveolares o que traz uma nova perspectiva de estudo quanto ao grau de virulência acentuado desse fungo ao formar tais biofilmes. Estudos recentes conduzidos por Gonçalves et al., (2020) focados na formação dessas estruturas polissacarídicas do *H. capsulatum* mostram formas de padronização da formação desses biofilmes *in vitro* levando em consideração o meio de cultura, temperatura, pH, dentre outros fatores, que irão contribuir para o estudo dessa micose sistêmica.

3. OBJETIVOS

Realizar a análise proteica do biofilme de *Histoplasma capsulatum* em comparação à sua forma planctônica para terminar possíveis diferenças nas expressões de proteínas.

Avaliar possíveis proteínas diferencialmente expressas na fase planctônica e biofilme.

4. METODOLOGIA

4.1. Microrganismo

Os experimentos foram realizados com a cepa EH-315 de *Histoplasma capsulatum*, recuperada do intestino de um morcego infectado da espécie Mormoops, capturado em uma caverna no estado de Guerrero no México. Esta cepa foi cedida pela Profª. Drª. Maria Lúcia Taylor da Universidade Nacional do México (UNAM) e está depositada na Coleção de Culturas do Laboratório de Imunologia de Fungos do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Faculdade de Medicina da Universidade Nacional Autônoma do México (UNAM).

Para a formação dos biofilmes, foi utilizado o protocolo previamente descrito (PITANGUI et al., 2012) com modificações. Inicialmente as suspensões fúngicas foram preparadas em solução PBS estéril, de modo a atingir uma concentração final de $5x10^6$ UFC/mL. Posteriormente, 500µL do inóculo foram adicionados a placa de 24 poços. As placas foram incubadas a 37ºC por 12 horas, sem agitação, para a pré-adesão da forma leveduriforme. Após esse período, o sobrenadante foi removido dos poços, seguido de lavagens com PBS estéril. Por fim, 1000 µL de HAM-F12 (Sigma-Aldrich) suplementado com glicose (18.2 g/L), ácido glutâmico (1 g/L), HEPES (6 g/L), e L-cisteína (8.4 mg/L), foram adicionados aos poços das placas, que foram novamente incubadas em microaerofilia, a 37ºC, sem agitação por 144 horas para formação do biofilme maduro (GONÇALVES et al., 2020).

O crescimento planctônico, livre ou flutuante das leveduras de *H. capsulatum* foi realizado em erlenmeyer de 250 mL sob as mesmas condições de temperatura, nutrientes e período de incubação citadas anteriormente para a formação do biofilme maduro.

4.2. Análise Proteômica

Serão descritas as etapas envolvidas desde a lise celular, separação, quantificação e digestão proteica para posterior analise no espectrômetro de massas.

4.2.1. Preparo da massa celular, lise e obtenção da fração proteica

Após a remoção do meio foi feita a coleta do biofilme maduro retirando o meio e acrescentando PBS estéril e no caso das células planctônicas foi feita a centrifugação após essa etapa, ambas as amostras foram centrifugadas, lavadas duas vezes com PBS estéril e armazenadas a -80ºC. As células foram ressuspensas em tampão de lise celular Tris 20mM (pH 8,8), KCl 150 mM (pH 8,8), juntamente com mix de inibidores de proteases (GE, Healthcare), PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride, Sigma Aldrich) e perolas de vidro (5mm) foram adicionadas. As amostras foram submetidas a agitação por vórtex cinco vez com duração de 1 min cada, intercalando com banho de gelo. O lisado resultante foi centrifugado a 5.000 rpm por 15 min a 4ºC (ALMEIDA et al., 2020 com modificações). Após a centrifugação os sobrenadantes foram coletados e a eles foram adicionados uma solução de ácido tricloroacético (TCA) 10% em Acetona 90% v/v. As amostras foram mantidas “overnight” a 4ºC para precipitação proteica. Em seguida, as

amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 min a 4ºC, e após esse período o precipitado das amostras foi coletado, liofilizado e estocado a -80ºC.

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).

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

A determinação da concentração de proteínas presentes nos extratos proteicos obtidos conforme descrito no item 4.2.1 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 Commassie 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.

4.2.3. Eletroforese 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'-tetrametiletilenodiamida (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 10µg a 40µg 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 minutos. 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 (50V) 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.

4.2.4. Digestão Enzimática

A digestão das amostras foi realizada partindo-se de 600µg de proteínas totais foram submetidas a digestão enzimática. 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 ditiotreitol (DTT) (GE Healthcare) à 100 mM, mantendo-as incubadas à 37°C em banho seco durante 60 minutos. Seguindo-se adição de 10µL de solução de ditiotreiol (DTT) 100mM por mais 60 minutos à 37°C. Continuando o processo adicionou-se 10µL de solução de iodoacetamida (IAA) 400mM, à 25°C, protegido da luz por mais 60 minutos. Finalmente foram adicionados 484µL de solução de bicarbonato de amônio 100mM, 0,6µL de solução de cloreto de cálcio 1M e 12µL de tripsina (Promega, USA), a reação foi incubada à 37°C de 18 a 24h. Para interromper a reação foram utilizados 5µL de ácido fórmico. As amostras foram secas em speed-vac e armazenadas à -20°C até análise.

4.2.5. Análise proteicas por shotgun

Após o preparo os peptídeos foram analisados por espectrômetria 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 XBrigdeTM 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), foi empregado 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 espectrômetria de massas sequenciais, isto é, espectros de fragmentação em condições de decomposição induzida por colisão (CID) (MS^2) foram realizados de acordo com os mesmos parâmetros dos experimentos de MS^1, exceto a varredura que foi feita num intervalo entre 50 e 2.000 m/z.

4.2.6. Identificação das proteínas: Espectrometria de Massas

Para a obtenção dos dados da espectrometria de massa foi utilizado o software HyStar (Bruker Daltonics), e o software DataAnalysis (Bruker Daltonics) para tratar e submeter os dados combinados de MS^1e MS^2. 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 ± 0,4 Da a erro de tolerância de MSn ± 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*.

4.2.7. Análise funcional das proteínas identificadas

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 predizer 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.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1.Quantificação Proteica

A quantidade de proteínas totais presente nas amostras foi analisada aplicando o método de Bradford que se baseia na ligação entre o corante azul Coommassie G250 e os grupos ácidos e básicos das proteínas. Esse corante se liga ao grupo carboxila da proteína pela força de van der waals e ao grupo amino por interações eletrostáticas ao final dessas interações temos uma mudança na coloração de marrom para azul (465 nm para 595 nm), o resultado quantitativo das concentrações de proteínas totais nas amostras de *H. capsulatum* em crescimento planctônico, 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 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 *H. capsulatum*	Planctônico	1,455	7285	1,571	8075	1,771	9429
Cepa EH-315 de *H. capsulatum*	Biofilme	0,853	3204	1,260	5966	1,095	4846

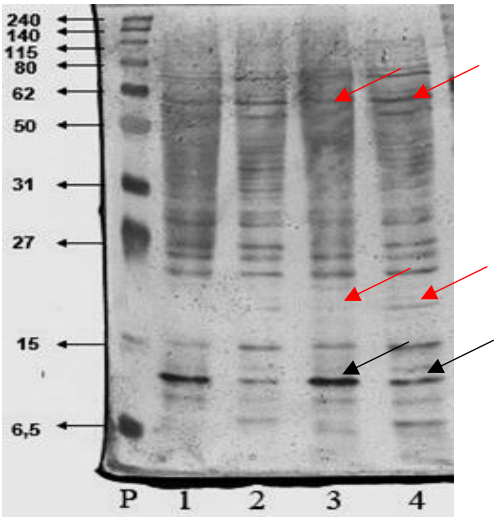
N° = número de amostra; DO = Densidade óptica.

5.2.Eletroforese SDS-PAGE

Os componentes totais da cepa de *H. capsulatum* EH-315 em formato biofilme e células planctônicas foram analisados por SDS-PAGE. O perfil eletroforético demonstrou diferenças significativas quanto à intensidade das bandas. Na **Fig.1**, foi possível observar distinções nas bandas na forma planctônica quando comparado ao biofilme, as setas em vermelho demonstram essas diferenças onde também é possível observar o aparecimento de bandas exclusiva do biofilme presentes nas faixas entre 24 a 10 kDa. Notou-se também um aumento da intensidade de outras bandas (apontadas pelas setas em preto) nas células planctônicas quando comparadas ao biofilme. Esses resultados trazem fortes indícios que há diferenças no que diz respeito a expressão de proteínas nas duas análises, além do que existem indícios de proteínas expressas apenas nas amostras de biofilme que não foram expressas nas amostras planctônicas.

O método de coloração azul de Coommassie G-250 mostrou-se reprodutível permitindo a visualização de um grande número de proteínas, sendo esse um método sensível e capaz de detectar proteínas em concentrações baixas (CANDIANO et al., 2004). No entanto a SDS-PAGE não é capaz de inferir quais proteínas estão presentes nas amostras nesse contexto a análise proteômica por *shotgun* foi usada buscando identificar essas proteínas e suas respectivas funções.

Figura 1. Eletroforese SDS-PAGE**.** Perfil proteico de *H. capsulatum* nas formas de biofilme e planctônico em gel de poliacrilamida a 12%. Padrão de proteínas (P); planctônico 20ug (1); biofilme 20ug (2); planctônico 30ug (3); biofilme 30ug (4).

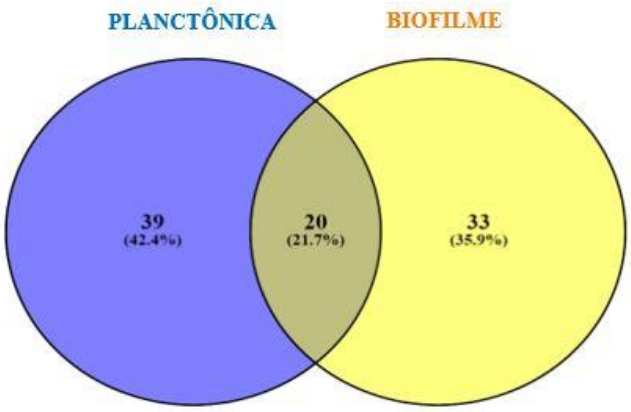


5.3.Resultado da Análise Proteômica (*shotgun*)

As amostras das células planctônicas e biofilme *H. capsulatum* foram analisadas pelo método *shotgun* após a lise celular, precipitação e digestão com tripsina onde todos esses passos levaram a formação de misturas de peptídeos complexos. Os peptídeos contidos nas amostras foram então analisados através da cromatografia liquida acoplada a espectrômetro de massas tendo a relação massa/carga (m/z) o padrão determinante para a identificação dos peptídeos, onde esses dados dos fragmentos foram comparados e com a ajuda da bioinformática essas sequências foram atribuídas as proteínas identificáveis.

A diferença na expressão proteica entre a forma planctônica em comparação ao biofilme pode nos levar a proteínas diferentemente expressas na condição de biofilme e consequentemente a um provável alvo terapêutico. Abaixo, observa-se a distribuição das proteínas relacionadas ao *H. capsulatum* encontradas, sendo 39 proteínas exclusivas do crescimento planctônico, 33 do crescimento de biofilme 20 proteínas identificadas em ambas as amostras.

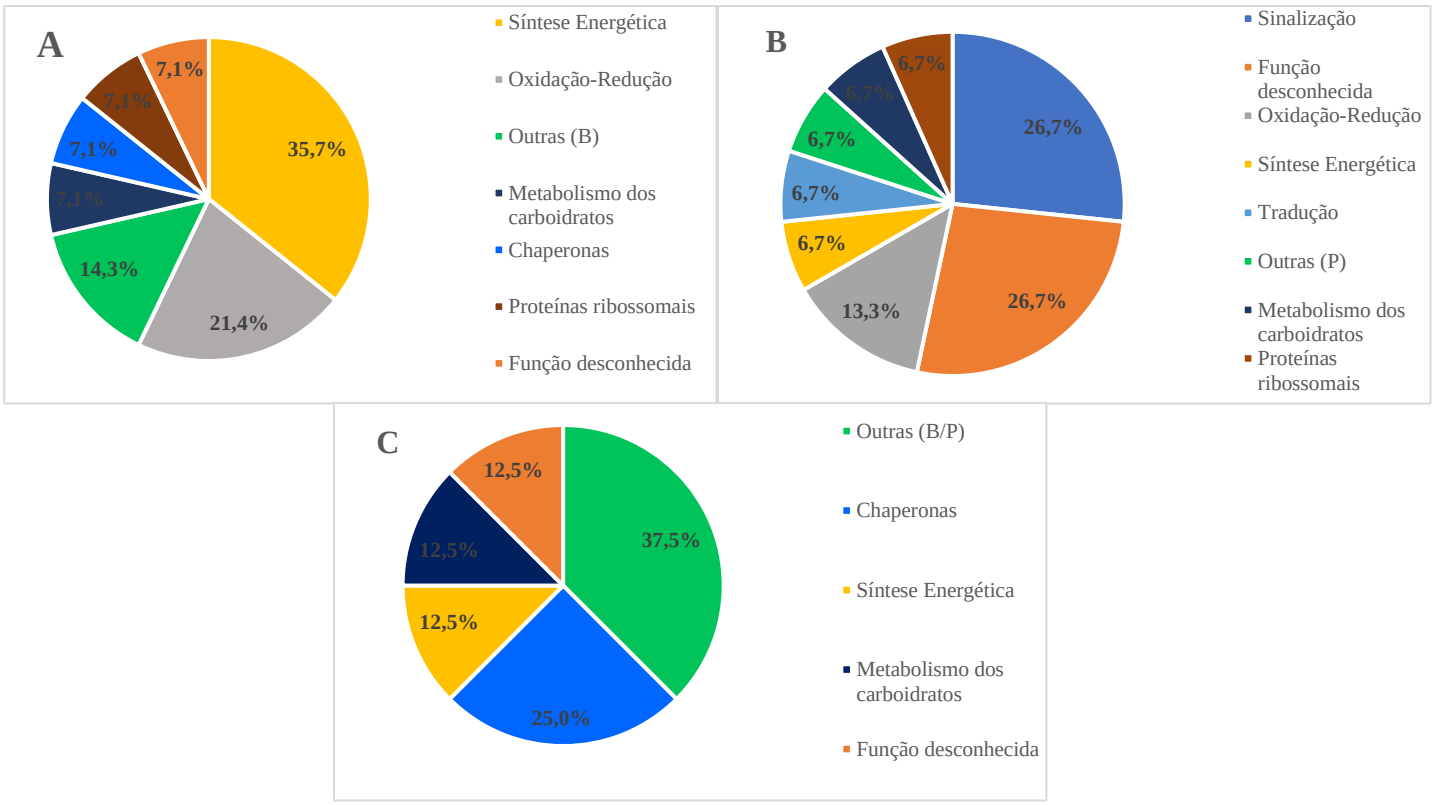
Figura 2. Diagrama de Venn. Demonstração da distribuição das proteínas encontradas em análise LC-MS/MS.



Proteínas cujo *score* da análise mostrou-se acima de 100, foram compiladas e tiveram sua função descrita nas tabelas abaixo. O score está diretamente ligado ao número de peptídeos identificados e sua probabilidade pertencer a cada proteína.

As proteínas identificáveis foram categorizadas tendo como referência o banco de dados Uniprot, analisando as classes de proteínas identificadas do *H. capsulatum* na forma de biofilme em comparação com planctônica (**Fig. 3**). Na categoria funcional "Outras (B)" foram identificadas as proteínas 2-Metilcitrato desidrogenase, 5-metiltetra-hidroproiltriglutamato-homocisteína-metiltransferase. Na categoria funcional 'Outras (P) foi identificada a proteína hipotética conservada. Na categoria funcional "Outras (B/P)" foram identificadas as proteínas disulfidisomerase, ciclofilina A e a peptidil-prolil cis-trans isomerase.

Figura 3. Distribuição das proteínas identificadas da cepa EH-315 de *H. capsulatum*. Presentes somente nas formas biofilme (**A**) e planctônico (**B**) e as proteínas em comum biofilme/planctônico (**C**) por categoria funcional, identificadas na espectrometria de massas.



É possível notar uma maior quantidade de proteínas cuja função está relacionada a oxido-redução presentes no biofilme, em torno de 21% das proteínas identificas nas amostras de biofilmes, possuem essa função. Tal fato pode estar relacionado ao grau de proteção extra que o biofilme fornece para as células presentes no seu interior, onde essas proteínas desempenham um papel importantíssimo na homeostase celular e no impedimento do estresse oxidativo do meio externo ou até mesmo de fármacos que tem

como princípio de ação a indução desse estresse oxidativo. Na literatura já existem diversos trabalhos que relacionam o grau de resposta o estresse oxidativo com o aumento da resistência dos biofilmes microbianos. Nos resultados apresentados podemos observar um grande aumento das proteínas relacionadas aos mecanismos de defesa contra espécies reativas de O_2 (ROS) sendo tais proteínas as responsáveis por proporcionar um aumento da capacidade antioxidante dos biofilmes bem como um aumento de sua resistência nas infecções (BOLES; SINGH; WELSH, 2008; SERRANO-FUJARTE; LÓPEZ-ROMERO; CUÉLLAR-CRUZ, 2016).

Um exemplo que podemos citar é a Catalase, uma enzima importante que atua evitando o estresse oxidativo que foi identificada no biofilme. Segundo o trabalho de Johnson e colaboradores (2002) *H. capsulatum* expressa a Catalase através de três genes: CatA, regulada pela morfologia celular e o estresse oxidativo e a CatB e CatP reguladas pela fonte de carbono. A ausência dessas Catalases ocasiona uma deficiência na sobrevivência de *H. capsulatum* no momento da infecção dos macrófagos o que se justifica dado a funcionalidade dessa enzima de neutralizar os agentes (ROS) do hospedeiro (BEYHAN; SIL, 2019). Outros estudos mostram uma expressão relevante de enzimas ligadas a manutenção do estresse oxidativo em biofilmes de *Candida albicans* em comparação a células planctônicas sobre o efeito da Caspofungina (fármaco que atua na inibição da síntese de beta (1,3) -D-glucano) que evidenciou a resistência do biofilme ao antifúngico em questão (LI et al., 2021).

As chaperonas são outra classe de proteínas dais quais incluem as proteínas de choque térmico (Hsps), em que estudos anteriores mostram o papel que a Hsp60 desempenha como antígeno imunodominante, além de ser a principal ligante de superfície em macrófagos durante a infecção (GUIMARÃES et al., 2011). Estudos conduzidos pelo nosso grupo também demonstrou como a Hsp60 está relacionada com a infecção de *H. capsulatum* utilizando as larvas de *Galleria mellonella* como alvos da infecção onde foi observado uma redução da formação dos biofilmes e consequentemente um aumento da sobrevivência das larvas ao serem tratados com anticorpos anti-Hsp60 (FREGONEZI et al., 2021).

Outra diferença aparente são no número de proteínas ligadas a síntese energética e metabolismo de carboidratos que somam 36% das proteínas identificas na fase de biofilme levando em consideração que os biofilmes são em grande parte compostos por uma matriz de polissacarídeos fazendo-se necessário uma maior quantidade de proteínas que desempenham diversas funções desde transporte até síntese desses polissacarídeos

para formação do biofilme, essa diferença também foi notada no trabalho de Awadh e colaboradores (2021) analisado o perfil metabólico do *Mycoplasma pneumoniae* notou-se maiores concentrações de proteínas envolvidas nas vias metabólicas no biofilme que na fase plactônica.

Dentre essas proteínas foi identificada ATP sintase (α e β), que são responsáveis pela produção de ATP mediante um gradiente de elétrons na membrana mitocondrial, onde a ATP sintase subunidade β foi citada nos estudos conduzidos por Paino e colaboradores (2011) que sugeriram uma forte relação da interferência de interleucinas 1β humanas com a ATP sintase na formação de biofilmes na infecção por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sendo observado que essa interferência causou uma diminuição metabólica significativa do biofilme. A Tabela (2) apresenta as proteínas identificadas nas amostra do Biofilme e a Tabela (3) as proteínas identificadas no planctônico.

Tabela 2. Proteínas presentes somente no biofilme.

Nome de Entrada	Nome	Função
EDN08176.1	ATP-dependent molecular chaperone HSC82 [Histoplasma capsulatum NAm1]	Interagindo seletivamente e não covalentemente com ATP, adenosina 5'-trifosfato Auxilia na montagem covalente e não covalente de polipeptídeos de cadeia única ou complexos de múltiplas subunidades na estrutura terciária correta.
EEH02941.1	ATP synthase subunit beta [*Histoplasma capsulatum* G186AR]	Produz o ATP do ADP na presença de um gradiente de prótons através da membrana.
EEH02985.1	malate dehydrogenase [*Histoplasma capsulatum* G186AR]	Catalise da reação: (S) -malato + NAD^+ = oxaloacetato + NADH + H^+.
EEH03983.1	mannitol-1-Phosphate dehydrogenase [*Histoplasma capsulatum* G186AR]	Catalise da reação: D-manitol 1-fosfato + NAD^+ = D-frutose 6-fosfato + $NADH^+$ H^+
EER44886.1	catalase B [*Histoplasma capsulatum* H143]	Proteger as células dos efeitos tóxicos do peróxido de hidrogênio
EER37105.1	elongation factor 1 alpha [*Histoplasma capsulatum* H143]	Responsável pela liberação enzimática de aminoacil-RNAt ao ribossomo
EDN10407.1	thiol-specific antioxidant [*Histoplasma capsulatum* NAm1]	Manter a homeostase redox celular
EDN04398.1	catalase B [*Histoplasma capsulatum* NAm1]	Proteger as células dos efeitos tóxicos do peróxido de hidrogênio
EEH10246.1	ATP synthase alpha subunit [*Histoplasma capsulatum* G186AR]	Síntese de ATP acoplada ao transporte de prótons
EDN05240.1	ketol-acid reductoisomerase, mitochondrial precursor [*Histoplasma capsulatum* NAm1]	Catalisa: (2R) -2,3-di-hidroxi-3-metilbutanoato + $NADP^+$ = (2S) -2-acetolactato + H^+ + NADPH Catalisa: (2R, 3R) -2,3-di-hidroxi-3-metilpentanoato + $NADP^+$ = (S) -2-etil-2-hidroxi-3- oxobutanoato + H^+ + NADPH
EDN10185.1	hypothetical protein HCAG_05988 [*Histoplasma capsulatum* NAm1]	-
EGC42146.1	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase [*Histoplasma capsulatum* H88]	Catalisa: 5-Metiltetrahidropteroyltri-L-glutamato + L-homocisteína = tetrahidropteroyltri-L-glutamato + L-metionina
EDN08595.1	2-Methylcitrate dehydratase [*Histoplasma capsulatum* NAm1]	Esta enzima pertence à família das liases, especificamente as hidro-liases, que clivam as ligações carbono-oxigénio
EDN02146.1	fructose-bisphosphate aldolase [*Histoplasma capsulatum* NAm1]	Catalisa uma reação reversível que divide o aldol, frutose-1,6-bifosfato, em fosfato de dihidroxiacetona de triose fosfatos (DHAP) e 3-fosfato de gliceraldeído (G3P)

Tabela 3. Proteínas presentes somente no planctônico.

Nome de Entrada	Nome	Função
EGC46125.1	conserved hypothetical protein [Histoplasma capsulatum H88]	-
EDN09777.1	ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor [Histoplasma capsulatum NAm1]	Produz o ATP do ADP na presença de um gradiente de prótons através da membrana
EEH08744.1	NADP-specific glutamate dehydrogenase [Histoplasma capsulatum G186AR]	atividade oxidorredutase, atuando no grupo de doadores CH-NH2, NAD ou NADP como aceptor
EER42730.1	3 protein epsilon [Histoplasma capsulatum H143]	Proteína adaptadora implicada na regulação de um amplo espectro de vias de sinalização gerais e especializadas
EDN02350.1	hypothetical protein HCAG_00214 [Histoplasma capsulatum NAm1]	-
EEH05900.1	elongation factor 2 [Histoplasma capsulatum G186AR]	Ligação GTP Atividade GTPase Atividade do fator de alongamento da tradução
EGC44351.1	cell division control protein [Histoplasma capsulatum H88]	Interagindo seletivamente e não covalentemente com ATP, adenosina 5'-trifosfato e regulando a Divisão Celular
EER40551.1	malate dehydrogenase [Histoplasma capsulatum H143]	catalisa reversivelmente a oxidação do malato em oxaloacetato usando a redução de NAD^+ para NADH
EDN04295.1	ribosomal protein S5 [Histoplasma capsulatum NAm1]	Constituinte estrutural do ribossomo
EGC49409.1	DnaK-type molecular chaperone bipA [Histoplasma capsulatum H88]	Proteína co-translacional dependente de SRP (partícula de reconhecimento de sinal) direcionada a membrana; Processo Biosintético de beta-glucana da parede celular de alguns tipos de fungos
EDN08325.1	proliferating cell nuclear antigen [Histoplasma capsulatum NAm1]	Atua como um suporte para recrutar proteínas envolvidas na replicação do DNA
EDN06503.1	conserved hypothetical protein [Histoplasma capsulatum NAm1]	Regulação positiva do alongamento da transcrição do promotor da RNA polimerase II; Importação de proteínas no núcleo; Montagem e Desmontagem do nucleossoma; Regulação positiva da acetilação da histona H3-K9; Regulação positiva da polimerização de microtúbulos
EEH04794.1	fructose 1,6-biphosphate aldolase [Histoplasma capsulatum G186AR]	Catalisa a condensação aldólica do fosfato de di-hidroxiacetona (DHAP ou fosfato de glicerona) com gliceraldeído 3-fosfato (G3P) para formar frutose 1,6-bisfosfato (FBP) na gliconeogênese e a reação reversa na glicólise
EDN10570.1	hypothetical protein HCAG_07031 [Histoplasma capsulatum NAm1]	-
EEH07206.1	conserved hypothetical protein [Histoplasma capsulatum G186AR]	-

Algumas das proteínas identificadas corroboram com o estudo realizado por Holbrook et al. (2011) onde são descritas proteínas da fase leveduriforme de *H. capsulatum*, apesar de ser estudos diferentes era provável que algumas proteínas identificadas no lisado celular também aparecessem na análise das proteínas intracelulares de *H. capsulatum*. Também foi observado um número significante de proteínas que não tem sua função descrita na literatura e nos bancos de dados, não foi realizado nenhum estudo aprofundado sobre elas.

Nesse estudo foi proposta a realização da eletroforese unidimensional e análises *shotgun* de leveduras em crescimento planctônico e biofilme, em busca de proteínas exclusivas na forma de biofilme que poderiam indicar novos alvos terapêuticos estabelecendo assim, uma nova estratégia terapêutica para o tratamento da histoplasmose. Entretanto, devido algum entrave na etapa da digestão proteica houve a detecção de menos proteínas que o esperado, interferindo nas análises *shotgun* que possibilita a identificação de proteínas em larga escala.

Após esse estudo preliminar foi feita novas análise conduzidas pela pesquisadora Gonçalves (2021) que apresentou os resultados do proteoma do *H. capsulatum* após terem sidos retirados do processo de infecção em macrófagos alveolares murinos, os dados em questão mostram diferenças significativas no número de proteínas identificadas mas um perfil geral semelhante quanto a diferenciação das classes de proteínas identificadas na fase planctônica e biofilme tendo um aumento da expressão de proteínas ligadas a defesa e estresse oxidativo nos biofilmes.

6. CONCLUSÃO

Por meio das análises realizadas nesse trabalho pode-se concluir:

- Na análise do perfil proteico pela eletroforese foi observada a expressão de proteínas de pesos moleculares diferentes de células de biofilme em comparação com o crescimento de células planctônicas de *H. capsulatum*;
- O perfil proteico do biofilme, que é uma estrutura de resistência, está correlacionado à proteção contra fatores ambientais externos, bem como à manutenção da homeostase celular.
- A composição da matriz polissacarídica do biofilme está diretamente ligada a quantidade de proteínas cuja função tem relação com a metabolização de carboidratos bem como seu transporte para formação da própria matriz.

- Algumas das proteínas identificas desempenham fatores importantes que contribuem para o aumento da virulência das células na conformação de biofilme.
- A etapa de digestão e preparo para análise do *shotgun* pode ter influenciado no baixo número de proteínas identificadas.

7. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M.A.; ALMEIDA-PAES, R.; GUIMARÃES, A.J.; VALENTE, R.H.; SOARES, C.M.A.; ZANCOPÉ-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.

AL-AMRANI, S. et al. Proteomics: Concepts and applications in human medicine. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 12, n. 5, p. 57–69, 27 set. 2021.

AOKI, W. Time-course proteomic profile of Candida albicans during adaptation to a fetal serum. **Pathogens and disease**, v. 67, n. 1, p. 67-75, 2013. ISSN 2049-632X.

ASLAM, B. et al. Proteomics: Technologies and their applications. Journal of Chromatographic. **Science Oxford University Press**, 1 fev. 2017.

AWADH, A. A. et al. Determination of metabolic activity in planktonic and biofilm cells of Mycoplasma fermentans and Mycoplasma pneumoniae by nuclear magnetic resonance. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021.

BENDER, S. F.; VAN DER HEIJDEN, M. G. A. Soil biota enhance agricultural sustainability by improving crop yield, nutrient uptake and reducing nitrogen leaching losses. **Journal of Applied Ecology**, v. 52, n. 1, p. 228–239, 1 fev. 2015.

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.

BOLES, B. R.; SINGH, P. K. Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 34, p. 12503–12508, 2008.

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.

CANDIANO, G. et al. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 9, p. 1327–1333, mai. 2004.

CARRETO-BINAGHI, L. E.; DAMASCENO, L. S.; PITANGUI, N. S.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; TAYLOR, M. L. Could Histoplasma capsulatum be related to Healthcare-Associated Infections. **BioMed Research International**, v.2015, 2015.

CHO, W. C. S. Proteomics Technologies and Challenges. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, 2007.

COSTA-ORLANDI, C. B. et al. Fungal biofilms and polymicrobial diseases. **Journal of Fungi**, v. 3, 2017.

COSKUN, O. Separation Tecniques: Chromatography. **Northern Clinics of Istanbul**, 2016.

DAMASCENO, L. S. et al. Mixed infection by Histoplasma capsulatum isolates with different mating types in brazilian AIDS-patients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 61, 2019.

DE LAETER, J.; KURZ, M. D. Alfred Nier and the sector field mass spectrometer. **Journal of Mass Spectrometry**, jul. 2006.

DOMON, B.; AEBERSOLD, R. Mass Spectrometry and Protein Analysis. **Science.** v. 312, p. 212-217, 2006.

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

FAIOLLA, R. C. L. et al. Histoplasmosis in immunocompetent individuals living in an endemic area in the Brazilian Southeast. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 4, p. 461–465, 2013.

FERREIRA, M.S; BORGES, A.S. Histoplasmose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**., v. 2, p. 192-198, abr. 2009.

FREGONEZI, N. F. et al. Heat Shock Protein 60, Insights to Its Importance in Histoplasma capsulatum: From Biofilm Formation to Host-Interaction. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 22 jan. 2021.

GALLARDO, J. M.; ORTEA, I.; CARRERA, M. Proteomics and its applications for food authentication and food-technology research. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 52, p. 135-141, 2013.

GAYNES, R. The discovery of penicillin: New insights after more than 75 years of clinical use. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 5, p. 849–853, 2017.

GLADIEUX, P. Updates in the Language of *Histoplasma* Biodiversity. **mBio**, v. 9, n. 3, 2018.

GONÇALVES, L. N. C. et al. Biofilm Formation by Histoplasma capsulatum in Different Culture Media and Oxygen Atmospheres. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 10 jul. 2020.

GONÇALVES, L.N.C. **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 (Doutorado) – Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP), Araraquara, 2021. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/214755/gon%C3%A7alves_lnc_dr_arafcf_par.pdf?sequence=4

GOSSEL, P. P. Drama and Discovery: The Story of Histoplasmosis (review). **Bulletin of the History of Medicine**, v. 78, n. 2, p. 503–504, 2004.

GRIFFITHS, J. A Brief History of Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 15, p. 5678–5683, 2008.

GUIMARÃES, A. J.; DE CERQUEIRA, M. D.; NOSANCHUK, J. D. Surface architecture of Histoplasma capsulatum. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 1–14, 2011.

GUIMARÃES, A. J. et al. Histoplasma capsulatum heat-shock 60 orchestrates the adaptation of the fungus to temperature stress. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, 2011.

HAGE, C. A. et al. Histoplasmosis: Up-to-Date Evidence-Based Approach to Diagnosis and Management. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 36, n. 5, p. 729–745, 2015.

HOLBROOK, E. D.; RAPPLEYE, C. A. Histoplasma capsulatum pathogenesis: making a lifestyle switch. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 318–324, 2008.

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.

KAUFFMAN, C. A. Diagnosis of histoplasmosis in immunosuppressed patients. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 21, n. 4, 2008.

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

LAEMMLI, U. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970). https://doi.org/10.1038/227680a0

LASKAY, Ünige A. et al. Practical considerations for improving the productivity of mass spectrometry-based proteomics. **CHIMIA International Journal for Chemistry**, v. 67, n. 4, p. 244-249, 2013.

LI, P. et al. Proteomic Analysis of Caspofungin-Induced Responses in Planktonic Cells and Biofilms of Candida albicans. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021.

LINDER, K. A.; KAUFFMAN, C. A. Histoplasmosis: Epidemiology, Diagnosis, and Clinical Manifestations. **Current Fungal Infection Reports**, v.13, p. 120-128, 2019.

MARCH, R. E. Ion trap mass spectrometers. In: **Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry**. [S.l.]: Elsevier, p. 330–337, 2016.

MCGINNIS, M. R.; TYRING, S. K. **Introduction to Mycology**. 4. ed. Galveston, Texas: [s.n.], 1996.

MCLAFFERTY, F. W. A century of progress in molecular mass spectrometry. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 4, p. 1–22, 19 jul. 2011.

MITTAL, J. et al. Histoplasma capsulatum: Mechanisms for pathogenesis. In: **Current Topics in Microbiology and Immunology**. [S.l.]: Springer Verlag, v. 422, p. 157–191, 2019.

NOSANCHUK, J. D. et al. Histoplasma capsulatum synthesizes melanin-like pigments in vitro and during mammalian infection. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 9, p. 5124–5131, set. 2002.

NOWAKOWSKI, A. B.; WOBIG, W. J.; PETERING, D. H. Native SDS-PAGE: High resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions. **Metallomics**, v. 6, n. 5, p. 1068–1078, 2014.

OZSOLAK, Fatih; MILOS, Patrice M. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. **Nature reviews genetics,** v. 12, n. 2, p. 87, 2011.

PAINO, A. et al. Trimeric form of intracellular ATP synthase subunit β of aggregatibacter actinomycetemcomitans binds human interleukin-1β. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, 2011.

PASSOS, A. N. et al. Immunological assays employed for the elucidation of an histoplasmosis outbreak in São Paulo, SP, **Brazilian Journal of Microbiology**, v.45, n. 4, p. 1357-1361, 2014.

PITANGUI, N. S. et al. Adhesion of Histoplasma capsulatum to pneumocytes and biofilm formation on an abiotic surface. **Biofouling**, v. 28, n. 7, p. 711-718, 2012.

RAGHUKUMAR, S. Fungi: Characteristics and Classification. In: **Fungi in Coastal and Oceanic Marine Ecosystems**. [S.I.] Springer International Publishing, p. 1–15, 2017.

RICHARDS, T. A.; LEONARD, G.; WIDEMAN, J. G. What Defines the "Kingdom" Fungi? **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 3, 19 maio 2017.

SAHAZA, J. H. et al. Usefulness of the murine model to study the immune response against Histoplasma capsulatum infection. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 37, n. 3, p. 143–152, 2014.

SARDI, J. D. C. O. et al. Highlights in pathogenic fungal biofilms. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 31, n. 1, p. 22–29, 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. **Microbial Pathogenesis**, v. 90, p. 22–33, 1 jan. 2016.

SOKOL-ANDERSON,', M. L.; BRAJTBURG,' AND, J.; MEDOFF', G. Sensitivity of Candida albicans to amphotericin B administered as single or fractionated doses antimicrobial agents and chemotherapy. **American Society for Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 701-702, 1986.

STUDIER, F. W. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. **Journal of Molecular Biology**, v. 79, n. 2, p. 237–248, 1973b.

WAINWRIGHT, M. Some highlights in the history of fungi in medicine – A personal journey. **Fungal Biology Reviews**, v. 22, n. 3, p. 97–102, 2008.

WESTMAN, J. O.; TAHERZADEH, M. J.; FRANZÉN, C. J. Proteomic Analysis of the Increased Stress Tolerance of Saccharomyces cerevisiae Encapsulated in Liquid Core Alginate-Chitosan Capsules. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 9 nov. 2012.

WHEAT, L. J. et al. Histoplasmosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 207–227, 2016.

WOODS, J. P. Histoplasma capsulatum Molecular Genetics, Pathogenesis, and Responsiveness to Its Environment. **Fungal Genetics and Biology**, v. 35, n. 2, p. 81–97, 2002.

YU, L. R.; STEWART, N. A.; VEENSTRA, T. D. Proteomics. The Deciphering of the Functional Genome. In: **Essentials of Genomic and Personalized Medicine**. [S.l.]: Elsevier Inc., p. 89–96, 2010.