

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 24/03/2019.

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

NAYLA DE SOUZA PITANGUI

**REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL, METABÓLICA E PERFIL DE MICRORNAs
DOS BIOFILMES DE *Histoplasma capsulatum*: GENES, METABÓLITOS E RNAs
NÃO CODIFICANTES COMO ALVOS TERAPÊUTICOS E/OU BIOMARCADORES**

Araraquara

2017

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

NAYLA DE SOUZA PITANGUI

**REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL, METABÓLICA E PERFIL DE MICRORNAs
DOS BIOFILMES DE *Histoplasma capsulatum*: GENES, METABÓLITOS E RNAs
NÃO CODIFICANTES COMO ALVOS TERAPÊUTICOS E/OU BIOMARCADORES**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Biotecnologia aplicadas à Farmácia da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara –
UNESP como pré-requisito para obtenção do título de
Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida

Coorientador: Dr. Paulo César Gomes

Araraquara

2017

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

P681r Pitangui, Nayla de Souza
Regulação transcricional, metabólica e perfil de MicroRNAs dos biofilmes de *Histoplasma capsulatum*: genes, metabólitos e RNAs não codificantes como alvos terapêuticos e/ou biomarcadores / Nayla de Souza Pitangui. – Araraquara, 2017.
243 f. : il.

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

Orientadora: Ana Marisa Fusco Almeida.

Coorientador: Paulo César Gomes.

1. Transcriptômica. 2. Metabolômica. 3. MicroRNAs. 4. *Histoplasma capsulatum*.
5. Biofilmes. I. Almeida, Ana Marisa Fusco, orient. II. Gomes, Paulo César, coorient. III. Título.

CAPES: 40500005

NAYLA DE SOUZA PITANGUI

REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL, METABÓLICA E PERFIL DE MICRORNAs DOS BIOFILMES DE
Histoplasma capsulatum: GENES, METABÓLITOS E RNAs NÃO CODIFICANTES COMO ALVOS
TERAPÊUTICOS E/OU BIOMARCADORES

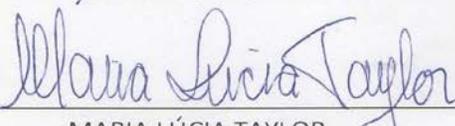
Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual
Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como
requisito para a obtenção do título de Doutor(a) em
Biotecnologia e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

Araraquara, 24 de março de 2017.

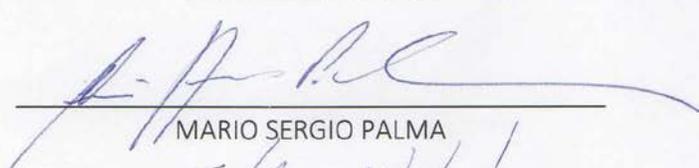
BANCA EXAMINADORA



ANA MARISA FUSCO ALMEIDA



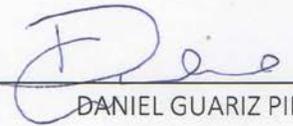
MARIA LÚCIA TAYLOR



MARIO SERGIO PALMA



GUILHERME TARGINO VALENTE



DANIEL GUARIZ PINHEIRO

Este trabalho foi desenvolvido na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/SP – UNESP, sendo a doutoranda contemplada com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES – e contou com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (processo nº 2013/05853-1) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq Universal (processo nº 480316/2012-0).

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcuta

Dedicatória

A quem esteve constantemente em meus pensamentos aliviando qualquer aflição e aplaudindo as minhas vitórias: Deus, meus pais Arnaldo e Sônia, meu marido Anderson e a minha jóia preciosa Tomás.

Agradecimentos

Acima de tudo, demonstro minha maior gratidão a Deus, por me capacitar física e intelectualmente para o desenvolvimento deste trabalho e por estar traçando os melhores caminhos para a minha vida.

Aos meus pais que, em primeiro lugar, me deram uma base sólida e me fazem viver diariamente o verdadeiro sentido de “família”. Como é bom saber que tenho vocês, que sempre me incentivam com suas opiniões que nunca falham sobre os meus caminhos e com seus aplausos que enchem o coração e que fazem todo o esforço valer a pena. Vocês são os meus maiores e melhores professores da vida. A minha gratidão é eterna por tudo o que representam e fazem. Amo vocês meus exemplos!

Ao meu marido, Anderson, por todo seu carinho, proteção e amor. Que esteve comigo em todos os momentos desta jornada, tornou os meus dias muito mais leves com o seu carinhoso “Bom dia meu amor”, enfrentou sol, chuva e frio pra que eu não ficasse sozinha e acreditou em mim quando eu mesma não acreditei. Impossível não agradecer ainda sua paciência. Amo você minha fortaleza!

Ao meu filho amado Tomás, que com toda certeza, tem sido a melhor experiência de toda a minha vida e que tem me incentivado a alcançar os meus maiores sonhos. “Antes deles a gente acha que não vai dar. Que não vai ter tempo, que vai sobrar cansaço. Que está com sono e então “deixa pra amanhã, não tem problema”... mas eles chegam e provam que amanhã vai ser tarde, que na verdade, o cansaço é que a gente deixa pra depois. Que o tempo se multiplica. Que a força se reproduz. Eles nos mostram que o trabalho agora é garantia de escola, viagens, alegria, brinquedos, comida, vacinas, roupinhas e leite. Eles chegam e chacoalham tudo. Eles chegam e tiram tudo do lugar, mas na verdade eles criam novos lugares para tudo. E assim a gente vai... se desdobra para que não falte nada, e não só isso; a gente se vira em mil e uma para que, além de não faltar, que ainda sobre; sobre, principalmente, alguns minutinhos ao lado deles”. Amo você minha vida!

A minha querida irmã Camila, minha sobrinha Amelie e ao meu cunhado Fábio, que mesmo do outro lado do mundo estão presentes em meus pensamentos e me fizeram entender que quanto maior a distância, maior também é o amor e a alegria do reencontro. Amo vocês minha saudade!

A minha avó Amélia (in memoriam) que acompanha todas as etapas da minha caminhada e que acalenta meu coração nas horas mais críticas! Amo você eternamente minha companheira!

A minha avó Lourdes, por todo amor e carinho!

Aos meus sogros Beta e Silvio, aos meus cunhados Danilo, Fabiana e Gustavo, e aos meus sobrinhos Leo e Lara, por me acolherem desde sempre em sua casa e no coração. Hoje nós sabemos que nossa família é o nosso bem maior. Amo vocês minha família!

A minha confidente pessoal e profissional, aquela que transmite todo o seu conhecimento e experiência, aquela que não mede esforços pra me fazer o bem, que se doa de todo o coração, que passa meses sem me ver, mas não passa uma semana sem se preocupar comigo, que me deseja o melhor e que me ensinou muito sobre a vida acadêmica. Minha irmã de coração, Janaína!

Aquele por quem a afinidade foi imediata, que muito, mas muito mais que um co-orientador soube me ouvir em quantas situações pessoais e profissionais foram necessárias, aquele mineiro que devagar me faz repensar em minhas fraquezas e quer o meu melhor, que assumiu, junto comigo, várias das minhas preocupações e que foi fundamental para o êxito deste trabalho. Meu amigo e professor Paulo!

Aquela que foi meu porto seguro em Araraquara, não importa o que havia, eu sabia que poderia contar com ela a qualquer hora do dia ou da noite! Ela me transmitiu dicas valiosas para ter sucesso em cultura de células, microscopia, citometria de fluxo e maternidade! Minha gratidão é eterna por todo o seu apoio minha grande amiga e mãe do Augusto, Claudia!

A quem, graças a Deus, cruzou meu caminho e embora tenha sido por pouco tempo, ocupou um lugar enorme em meu coração e em minha vida! Minha amiga e mãe exemplar Thais Bernardi!

A minha comadre e madrinha que me acompanha desde a faculdade! Aquela que passou comigo por muitas experiências ao longo destes 12 anos, dividindo trabalhos e preocupações! A minha amiga Fernanda Gullo!

A companheira das horas de almoço, café e desabafo! A quem esteve sempre presente nos últimos 4 anos e se dispôs de coração! A quem me deixou mais segura em Araraquara, minha amiga Natália!

A quem tenho imensa admiração e respeito pela sua dedicação incansável à carreira acadêmica. Ah como sou grata por ter conhecido este exemplo de profissional, que não mede esforços e nem distância para transmitir sua experiência e conhecimento! Com toda a certeza a colaboração com ela tornou possível a concretização deste trabalho! Meus sinceros agradecimentos a Professora Maria Lucia Taylor! Agradeço ainda a companheira científica

Gabriela Rodríguez-Arellanes por todo o conhecimento compartilhado e pela sua disponibilidade de ajudar em todas as necessidades!

A orientadora deste trabalho, que me deu a grande oportunidade de ingressar em um laboratório no qual pude contar com uma estrutura física e científica gigantesca e que, acima de tudo, confiou em meu trabalho. Agradeço a ela por ter permitido que eu fizesse parte deste time. Aquela que se desdobra em mil para que tudo possa correr bem. Com toda certeza ela foi fundamental para o meu crescimento profissional. Agradeço a professora, orientadora, mãe e mais um milhão de funções que ela agarra com unhas e dentes, Ana Marisa Fusco Almeida!

A profa. Maria José Soares Mendes Giannini, que me inspira tanto com sua postura pessoal e profissional. Aquela que mesmo ausente se fez tão presente e contribuiu tanto para que “o dar o melhor de mim mesma” fosse feito. Você é um exemplo de sucesso. Obrigada Zezé!

Ao professor Francisco Javier Enguita, que me proporcionou a exploração de um mundo novo na investigação dos microRNAs.

Ao professor Mario Sergio Palma, por abrir as portas do seu laboratório e acreditar em nosso trabalho!

Ao professor Alessandro Varani, pela sua disponibilidade em colaborar com o desenvolvimento deste trabalho dominando as ferramentas de bioinformática!

A técnica do laboratório, Rosângela, por toda ajuda e por compartilhar sua infinita experiência comigo. Hoje acredito que ela conhece cada fungo como ninguém e é sempre muito bom contar com o conhecimento dela. Muito obrigada Rô!

A Rosemira pelo seu querer bem com o coração mais puro e verdadeiro.

A Junya de Lacorte, por quem tenho admiração pela sua dedicação ao trabalho de forma séria e comprometida. Aquela que me ensinou com tanta paciência. Obrigada pela nossa parceria!

A todos os companheiros desta vida acadêmica desafiadora, que em algum momento certamente me ajudaram nesta caminhada científica: Lili, Mari, Priscila, Carol Tatoo, Mônica, Rodrigo, Haroldo, Aline, Laranja, Panta, Fer Sangalli, Carol Mineira, Regina, Jaque, Warley, Ana Cerejón, Suélen, Julhiany, Fati, Wanessa, Luana, Kayla, Fernando Rogério Pavan, Paula Carolina de Souza, Gabriela Guimarães Sousa Leite, Felipe Oliveira, Camila Fernandes, Bibiana, Leticia, Maysa, Rosana, Marina, Christiane Pienna, Alexandra Ivo de Medeiros, Rondinelli Herculano, Natan, Mateus, Bruna, Andrei Moroz, Marisinha, Iracilda Zeppone Carlos, Eliana, Maria Célia Bertolini, Iguatemy Lourenço Brunetti, Renata Pires, Eliana Gertrudes de Macedo Lemos e Rosely Maria Zancopé Oliveira.

A dedicação das funcionárias da secretaria de pós-graduação, fundamentais para o bom andamento das atividades acadêmicas. Obrigada Claudia, Daniela, Flávia e Joyce!

A minha madrinha e comadre Cynthia Silva, que tem acompanhado de perto todas as etapas mais importantes da minha vida e que torce verdadeiramente pelo meu sucesso.

As minhas amigas farmacêuticas, que estão sempre dispostas a ouvir e dividir qualquer dificuldade: Bruna, Carol, Dani, Gi Spósito, Tha Frezin e Thais Ferreira. E aquelas que sempre me acompanham na caminhada da vida: Fawana, Aila e Graciele.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelo suporte financeiro.

Enfim, a todos aqueles citados aqui e os que por ventura eu tenha me esquecido, que contribuíram direta ou indiretamente para minha travessia nesta etapa tão importante da minha carreira. Muito obrigada!

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação Esquemática das tecnologias “Ômicas” e suas moléculas.	34
Figura 2. Crescimento de leveduras de <i>H. capsulatum</i> em culturas planctônicas e biofilmes.	51
Figura 3. Eletroferograma da Integridade do RNA.	52
Figura 4. Validação das bibliotecas de cDNA.	53
Figura 5. Diagramas de Venn do transcriptoma de <i>H. capsulatum</i> .	59
Figura 6. Perfil transcriptômico de <i>H. capsulatum</i> .	60
Figura 7. Ensaio de Viabilidade de Mø AMJ2-C11 infectados com leveduras de <i>H. capsulatum</i> após 5 h.	65
Figura 8. Fold Change Plot dos transcritos diferencialmente expressos em biofilmes vs. culturas planctônicas da cepa EH-315 de <i>H. capsulatum</i> .	68
Figura 9. Fold Change Plot dos transcritos diferencialmente expressos em culturas planctônicas da cepa EH-315 vs. culturas planctônicas da cepa 60I de <i>H. capsulatum</i> .	71
Figura 10. Fold Change Plot dos transcritos diferencialmente expressos em biofilmes da cepa EH-315 vs. biofilmes da cepa 60I de <i>H. capsulatum</i> .	74
Figura 11. Fold Change Plot dos transcritos diferencialmente expressos em biofilmes vs. culturas planctônicas da cepa 60I de <i>H. capsulatum</i> .	76
Figura 12. Perfis de citometria ilustrando a intensidade de fluorescência (FI) de leveduras de <i>H. capsulatum</i> na infecção de células fagocíticas AMJ2-C11, analisadas por citômetro de fluxo FACSCanto™.	77
Figura 13. Perfis de citometria ilustrando a intensidade de fluorescência (FI) de leveduras de <i>H. capsulatum</i> na infecção de células fagocíticas AMJ2-C11, analisadas por citômetro de fluxo FACSCanto™.	78
Figura 14. Perfil de infecção de diferentes cepas de <i>H. capsulatum</i> à Mø alveolares murinos.	78
Figura 15. Ensaio de Viabilidade de Mø THP-1 like infectados com leveduras de <i>H. capsulatum</i> após 5 h.	80

Figura 16. Perfis de citometria ilustrando a intensidade de fluorescência (FI) de leveduras de <i>H. capsulatum</i> na infecção de Mø THP-1 like e, analisadas por citômetro de fluxo FACSCanto™.	81
Figura 17. Perfis de citometria ilustrando a intensidade de fluorescência (FI) de leveduras de <i>H. capsulatum</i> na infecção de Mø THP-1 like e, analisadas por citômetro de fluxo FACSCanto™.	82
Figura 18. Perfil de infecção de diferentes cepas de <i>H. capsulatum</i> à Mø humanos.	82
Figura 19. Eletroferograma da Integridade do RNA de Mø THP-1 like.	84
Figura 20. Volcano Plot dos perfis de miRNAs detectados em Mø infectados com leveduras de <i>H. capsulatum</i> .	86
Figura 21. Fold Change Plot dos miRNAs diferencialmente expressos em Mø THP-1 não infectados e infectados com leveduras de <i>H. capsulatum</i> .	90
Figura 22. Análise de agrupamento hierárquico da expressão de miRNAs aberrantes em Mø infectados com leveduras de <i>H. capsulatum</i> .	93
Figura 23. Redes de interação miRNA-RNA.	95
Figura 24. Redes de interação miRNA-RNA.	101
Figura 25. Produção de polissacarídeos totais por <i>H. capsulatum</i> .	103
Figura 26. Perfil cromatográfico (1) dos metabólitos de leveduras de <i>H. capsulatum</i> .	104
Figura 27. Perfil cromatográfico (2) dos metabólitos de leveduras de <i>H. capsulatum</i> .	105
Figura 28. Diagramas comparativos dos metabólitos de biofilmes e culturas planctônicas de <i>H. capsulatum</i> por massas moleculares.	106
Figura 29. Sobreposição dos metabólitos totais detectados nas amostras de biofilmes e culturas planctônicas da cepa EH-315 de <i>H. capsulatum</i> por LC-MS/MS.	107
Figura 30. Metabólitos de massas moleculares comuns entre biofilmes e culturas planctônicas da cepa EH-315 de <i>H. capsulatum</i> distribuídos em um range de 200-1800 Da.	109
Figura 31. Diagramas comparativos dos metabólitos de biofilmes e culturas planctônicas de <i>H. capsulatum</i> por intensidade relativa.	110
Figura 32. Metabólitos de massas moleculares comuns entre biofilmes e culturas planctônicas da cepa EH-315 de <i>H. capsulatum</i> , mas produzidos com intensidades	111

diferentes.

Figura 33. Metabólitos de massas moleculares exclusivas dos biofilmes e das culturas planctônicas da cepa EH-315 de *H. capsulatum* distribuídos em um range de 200-2400 Da. 113

Figura 34. Representação esquemática do perfil metabólico de *H. capsulatum* em biofilmes e em culturas planctônicas. 114

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Conteúdo das placas comerciais (Exiqon) Human miRNome, Painéis I e II, V4.	46
Tabela 2. Concentração de RNA obtido após extração utilizando o Kit RNeasy Plant Mini Kit®.	52
Tabela 3. GDEs pela cepa EH-315 em biofilmes e em crescimento planctônico.	55
Tabela 4. GDEs pelas cepas EH-315 e 60I em crescimento planctônico.	56
Tabela 5. GDEs pelas cepas EH-315 e 60I em biofilmes.	57
Tabela 6. GDEs pela cepa 60I em biofilmes e em crescimento planctônico.	58
Tabela 7. Categorização funcional dos genes com expressão significativamente alterada em biofilmes vs. culturas planctônicas da cepa EH-315 de <i>H. capsulatum</i> obtidos por RNA-Seq.	64
Tabela 8. Categorização funcional dos genes com expressão significativamente alterada em culturas planctônicas da cepa EH-315 vs. culturas planctônicas da cepa 60I de <i>H. capsulatum</i> obtidos por RNA-Seq.	67
Tabela 9. Categorização funcional dos genes com expressão significativamente alterada nos biofilmes da cepa EH-315 vs. biofilmes da cepa 60I de <i>H. capsulatum</i> obtidos por RNA-Seq.	70
Tabela 10. Categorização funcional dos genes com expressão significativamente alterada em biofilmes da cepa 60I vs. culturas planctônicas de <i>H. capsulatum</i> obtidos por RNA-Seq.	73
Tabela 11. Concentração de RNA obtido após extração utilizando o Kit RNeasy Plant Mini Kit®.	83
Tabela 12. miRNAs diferencialmente expressos em MØ THP-1 não infectados e infectados com leveduras de <i>H. capsulatum</i> .	88
Tabela 13. Vias associadas aos genes-alvo regulados pelos miRNAs diferencialmente expressos por MØ infectados com <i>H. capsulatum</i> .	98

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN – acetonitrila

BCRJ – banco de células do Rio de Janeiro

BHI-broth – meio infusão cérebro-coração caldo

Cbp1 – Calcium binding protein

CBSI – *Candida* bloodstream infections

cDNA – DNA complementar

CFSE – 5(6)-Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl Ester

CID – decomposição induzida por colisão

Ct – Cycle threshold

DL₅₀ – Dose Letal 50%

DMEM – Dulbecco's modified Eagle's medium

DNA – ácido desoxirribonucleico

EF-1 α – elongation factor 1-alpha

EPB41 – Erythrocyte protein band 4.1

EthD-1 – homodímero de etídio

ESI – fonte de ionização “electrospray”

FI – intensidade de fluorescência

FR – Forward-reverse

GAPDH – Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GC/MS – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

GDEs – Genes Diferencialmente Expressos

GO – gene ontology

HBF – high biofilm formers

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

Hsp60 – Heat shock protein 60 kDa

IP-PGC-TOF/MS – cromatografia de pareamento iônico-coluna de carbono grafítico poroso acoplada a um sistema de espectrometria de massas do tipo tempo de voo

LC-ESI-MS – cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas por ionização electrospray

LC-MS – cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

LC-MS/MS – cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial

LCMS-IT-TOF – espectrômetro de massas híbrido que combina as tecnologias Ion Trap e tempo de voo

LBF – low biofilm formers

LNA – Locked Nucleic Acid

MØ – macrófagos

MEC – matriz extracelular

miRNAs – microRNAs

MOI – multiplicidade de infecção (Multiplicity of infection)

ncRNAs – RNAs não-codificantes

NGS – Next Generation Sequencing

pb – pares de bases

PBS – phosphate-buffered saline

PCR – reação em cadeia pela polimerase

PEI – polissacarídeos extracelulares insolúveis

PES – polissacarídeos extracelulares solúveis

PI – polissacarídeos intracelulares

PMA – phorbol 12-myristate 13-acetate

PMSF – Phenylmethylsulfonyl fluoride

QS – quorum-sensing

RIN – RNA integrity number

RNA – ácido ribonucléico

RNAi – RNA de interferência

RNA_m – RNA mensageiro

RNA_r – RNA ribossomal

RNA_t – RNA transportador

RP – HPLC – Reversed phase high-performance liquid chromatography

RPKM – reads per kilobase por million

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

RQ – quantificação relativa (Fold Change)

RT-qPCR – reverse transcription-quantitative PCR

SFB – soro fetal bovino

S/N – relação sinal-ruído

TCA – ácido tricloroacético

TFA – ácido trifluoroacético

UFLC – Ultra Fast Liquid Chromatograph

UV – ultravioleta

YPS3 – yeast-phase-specific

RESUMO

Histoplasma capsulatum variedade *capsulatum* é um patógeno fúngico dimórfico causador de uma importante micose sistêmica, denominada histoplasmose. A patogenia da histoplasmose ocorre como resultado da inalação dos microconídios da fase miceliar, que afetam primariamente os pulmões onde ocorre a diferenciação em leveduras, que posteriormente, induzem uma infecção pulmonar e disseminação para outros órgãos, particularmente em indivíduos imunocomprometidos. Recentemente, foi estabelecida uma correlação entre o modo de infecção de *H. capsulatum* e a formação de biofilmes, estruturas caracterizadas como redes tridimensionais complexas que induzem, entre outros, a resistência antifúngica. Por esta razão, é emergente a identificação de um novo alvo e/ou biomarcador que possa ser selecionado, a fim de estabelecer um novo regime terapêutico e/ou ferramenta diagnóstica para a histoplasmose. Com base nisto, este trabalho tem como objetivo analisar a regulação transcricional codificante e metabólica diferencial entre as duas formas de crescimento de *H. capsulatum*, em biofilmes e em crescimento planctônico, bem como determinar o perfil de microRNAs (miRNAs) aberrantes em células hospedeiras em resposta à infecção com leveduras livres e biofilmes. O sequenciamento completo das regiões transcritas foi realizado utilizando a plataforma HiSeq da Illumina e a investigação do padrão de miRNAs em macrófagos (M ϕ) hospedeiros infectados foi conduzida empregando uma técnica de RT-qPCR (reverse transcription-quantitative PCR). Subsequentemente, a produção de polissacarídeos totais foi determinada em amostras de culturas planctônicas, biofilmes e sobrenadante dos biofilmes e, adicionalmente, a abundância dos metabólitos de natureza não proteica e pequenos peptídeos nestas formas de crescimento foi estabelecida por LC-MS/MS. Em resumo, os dados obtidos revelaram que a estruturação das leveduras em biofilmes induz uma regulação negativa nos processos transcacionais direta (genoma codificante – RNAm) e indiretamente (genoma não-codificante – miRNAs) e, nos processos metabólicos das leveduras, resultante da: a) expressão reprimida da maioria dos genes (\approx 80% down-regulated) quando as leveduras livres passam a organizarem-se em biofilmes; b) superexpressão de todos os miRNAs alterados na comparação de células infectadas com biofilmes vs. leveduras planctônicas; c) intensidade relativa reduzida (DOWN) da maioria dos metabólitos (57%) produzidos pelas células em biofilmes em relação à intensidade nas homólogas livres, considerando os metabólitos com a mesma massa molecular entre biofilmes e culturas planctônicas e; d) produção significativamente menor de metabólitos exclusivos pelas culturas em biofilmes (8%) vs. células planctônicas (18%). Por conseguinte, no presente estudo, através das abordagens desenvolvidas foram indicadas as moléculas (genes, miRNAs

e metabólitos) que constituem uma fonte potencial para delinear: a) um marcador de biofilmes na infecção às células hospedeiras; b) novos protótipos para a terapêutica da histoplasmose e; c) novos biomarcadores como ferramentas diagnósticas para a histoplasmose.

Palavras-chave: Transcriptômica. Metabolômica. MicroRNAs. *Histoplasma capsulatum*. Biofilmes.

ABSTRACT

Histoplasma capsulatum variety *capsulatum* is a dimorphic fungal pathogen that causes an important systemic mycosis, called histoplasmosis. The pathogenesis of histoplasmosis occurs as a result of the inhalation of mycelial microconidia, which primarily affect the lungs where differentiation occurs in yeast, which subsequently induce pulmonary infection and dissemination to other organs, particularly in immunocompromised individuals. Recently, a correlation was established between the mode of infection of *H. capsulatum* and the formation of biofilms, structures characterized as complex three-dimensional networks that induce, among others, antifungal resistance. For this reason, it is emerging the identification of a new target that can be selected in order to establish a new therapeutic strategy for histoplasmosis. Based on this, this work aims to analyze the differential transcriptional and coding transcriptional regulation between the two forms of growth of *H. capsulatum* in biofilms and planktonic growth, as well as to determine the profile of aberrant microRNAs (miRNAs) in host cells post-infection with free yeasts and biofilms. Complete sequencing of the transcribed regions was performed using the Illumina HiSeq platform and the investigation of the miRNA pattern in infected host macrophages (M ϕ) was conducted using a reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR) technique. Subsequently, the production of total polysaccharides was determined in samples of planktonic cultures, biofilms and supernatant of the biofilms and, additionally, the abundance of non-protein metabolites and small peptides in these growth forms was established by LC-MS/MS. In summary, the data obtained showed that the structure of yeasts in biofilms induces a negative regulation in the direct (coding genome - mRNA) and indirectly (non-coding genome - miRNAs) transcriptional processes and in the yeasts metabolic processes, resulting from: a) suppressed expression of most genes (\approx 80% down-regulated) when the free yeasts are organized in biofilms; b) overexpression of all altered miRNAs in the comparison of cells infected with biofilms vs. planktonic yeasts; c) reduced relative intensity (DOWN) of most of the metabolites (57%) produced by cells in biofilms compared to the intensity in the free homologues, considering the metabolites with the same molecular mass between biofilms and planktonic cultures; d) significantly lower production of exclusive metabolites by cultures in biofilms (8%) vs. planktonic cells (18%). Accordingly, in the present study, the approaches performed indicated molecules (genes, miRNAs and metabolites) that are a potential source for delineating: a) a marker of biofilms in infection to host cells; b) new prototypes for histoplasmosis therapy and; c) new biomarkers as diagnostic tools for histoplasmosis.

Key words: Transcriptomic. Metabolomic. MicroRNAs. *Histoplasma capsulatum*. Biofilms.

SUMÁRIO

Índice de Figuras	X
Índice de Tabelas	XIII
Lista de Abreviaturas	XIV
Resumo	XVII
Abstract	XIX
Capítulo I – Tese	23
1. Introdução	24
2. Objetivos	33
2.1. Objetivo geral	33
2.2. Objetivos específicos	33
2.3. Representação Esquemática	33
3. Materiais e Métodos	35
3.1. Microrganismos e condições de cultivo	35
3.2. Culturas planctônicas e formação dos biofilmes de <i>H. capsulatum</i>	36
3.3. Análise transcriptômica	36
3.3.1. Extração do RNA das cepas EH-315 e 60I de <i>H. capsulatum</i> para sequenciamento em larga escala (Illumina Hi Seq) utilizando o kit RNeasy Plant Mini Kit®	36
3.3.2. Quantificação e avaliação da pureza e integridade do RNA das amostras	37
3.3.3. Construção das bibliotecas de DNA complementar (cDNA)	37
3.3.4. Clusterização e sequenciamento dos transcritos das cepas EH-315 e 60I de <i>H. capsulatum</i> em biofilmes e em crescimento planctônico	39
3.3.5. Análise dos dados de sequenciamento	39
3.3.6. Identificação, categorização funcional e localização de domínios proteicos	40
3.4. Determinação da viabilidade celular e porcentagem de infecção em Mø alveolares (AMJ2-C11) por diferentes cepas de <i>H. capsulatum</i>	40
3.4.1. Cultura de células AMJ2-C11	40
3.4.2. Determinação da viabilidade celular após infecção de células AMJ2-C11 utilizando o kit Live/Dead®	41
3.4.3. Infecção por <i>H. capsulatum</i> às células AMJ2-C11 e determinação da porcentagem de infecção por citometria de fluxo	42
3.5. Screening de miRNAs expressos em células hospedeiras após interação com <i>H.</i>	43

<i>capsulatum</i>	
3.5.1. Seleção de cepas e condições de cultivo	43
3.5.2. Seleção da linhagem celular	43
3.5.3. Cultura de células THP-1	43
3.5.4. Determinação da viabilidade celular após infecção de Mø THP-1 like utilizando o kit Live/Dead®	44
3.5.5. Ensaio de infecção de <i>H. capsulatum</i> em Mø THP-1 like e determinação da porcentagem de infecção por citometria de fluxo	44
3.5.6. Obtenção do RNA total, quantificação e avaliação da integridade	45
3.5.7. Síntese de cDNA	45
3.5.8. Quantificação dos miRNAs por PCR-Real Time	45
3.5.9. Análise bioinformática dos miRNAs diferencialmente expressos	46
3.6. Análise metabolômica	47
3.6.1. Determinação de polissacarídeos totais em amostras de culturas planctônicas, biofilmes e sobrenadante dos biofilmes de <i>H. capsulatum</i>	47
3.6.2. Extração dos metabólitos	48
3.6.3. Análises cromatográficas	48
3.6.4. Análises de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS)	49
3.6.5. Análise dos dados de LC-MS/MS	49
4. Resultados e Discussão	50
4.1. Culturas planctônicas e formação dos biofilmes de <i>H. capsulatum</i>	50
4.2. Análise transcriptômica	51
4.2.1. Quantificação e avaliação da pureza e integridade do RNA das amostras	51
4.2.2. Construção das bibliotecas de cDNA	52
4.2.3. Sequenciamento dos transcritos de <i>H. capsulatum</i> em biofilmes e em crescimento planctônico	53
4.3. Determinação da viabilidade celular e porcentagem de infecção em Mø alveolares (AMJ2-C11) por diferentes cepas de <i>H. capsulatum</i>	74
4.3.1. Determinação da viabilidade celular após infecção de células AMJ2-C11 utilizando o kit Live/Dead®	74
4.3.2. Determinação da porcentagem de infecção às células AMJ2-C11 por citometria de fluxo	77

4.4. Screening de miRNAs expressos em células hospedeiras após interação com <i>H. capsulatum</i>	78
4.4.1. Determinação da viabilidade celular após infecção de Mø THP-1 like utilizando o kit Live/Dead®	78
4.4.2. Determinação da porcentagem de infecção em Mø THP-1 like por citometria de fluxo	81
4.4.3. Quantificação e avaliação da pureza e integridade do RNA das amostras	82
4.4.4. Análise da expressão de miRNAs em células THP-1 após infecção com leveduras de <i>H. capsulatum</i>	85
4.5. Análise metabolômica	102
4.5.1. Produção de polissacarídeos totais em amostras de culturas planctônicas, biofilmes e sobrenadante dos biofilmes de <i>H. capsulatum</i>	102
4.5.2. Análises cromatográficas	103
4.5.3. Análises de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS)	105
4.5.3.1. Fracionamento das amostras	105
4.5.3.2. Abundância total de metabólitos dos biofilmes e das culturas planctônicas	106
4.5.3.3. Abundância de metabólitos com massas moleculares comuns entre biofilmes e culturas planctônicas	107
4.5.3.3.1. Abundância dos metabólitos por range de massas moleculares	107
4.5.3.3.2. Abundância dos metabólitos por intensidade relativa	110
4.5.3.4. Abundância de metabólitos com massas moleculares exclusivas dos biofilmes e das culturas planctônicas	112
4.5.3.5. Representação esquemática do perfil metabólico de <i>H. capsulatum</i> em biofilmes e culturas planctônicas	114
5. Conclusões	119
6. Referências	120
Capítulo II – Artigos	129

1. INTRODUÇÃO

Histoplasma capsulatum variedade *capsulatum* é um patógeno fúngico dimórfico, que quando inalado na fase miceliar afeta primariamente os pulmões e, em geral, indivíduos imunocomprometidos, causando uma importante micose sistêmica denominada histoplasmose (Rodríguez-Cerdeira *et al.*, 2012).

As infecções fúngicas invasivas têm aumentado durante as duas últimas décadas na América Latina e no mundo inteiro e, o número de pacientes em risco tem crescido drasticamente (Sifuentes-Osornio, Corzo-León e Ponce-De-León, 2012). Estima-se que aproximadamente 1,2 bilhões de pessoas são acometidas mundialmente por algum tipo de doença fúngica e, este dado se torna ainda mais alarmante considerando o número de pessoas que morrem anualmente por uma doença fúngica, um número que supera as mortes causadas por malária e tuberculose, com uma estimativa de 1,5 a 2 milhões de pessoas (Denning e Bromley, 2015).

A histoplasmose é descrita como uma micose amplamente distribuída nas Américas, com uma particular epidemia nos vales dos rios Ohio e Mississipi nos Estados Unidos, México, Brasil e algumas regiões das Guianas (*Guiana Shield*) (Damasceno *et al.*, 2016). Além disso, microfocos são registrados no leste dos Estados Unidos, sul da Europa e sudeste da Ásia. Atualmente, tem sido descrito como um patógeno de ampla dispersão geográfica em vista das oito populações genéticas de *H. capsulatum* distribuídas mundialmente entre as latitudes 54° Norte e 38° Sul (Kasuga *et al.*, 2003; Anderson *et al.*, 2006, Calanni *et al.*, 2013), de maneira que tais populações foram classificadas em clados, sendo: (i) clado Norte Americano classe 1; (ii) clado Norte Americano classe 2; (iii) clado Latino Americano grupo A; (iv) clado Latino Americano grupo B; (v) clado Australiano; (vi) clado Holandês; (vii) clado Euro-Asiático e; (viii) clado Africano (Kasuga *et al.*, 2003).

No Brasil, micoses sistêmicas ocasionadas por *H. capsulatum* são relativamente comuns, sendo descritas em casos clínicos isolados ou na ocorrência de surtos (Brilhante *et al.*, 2012; Myint *et al.*, 2014). Neste contexto, Oliveira, Unis e Severo (2006) relataram 26 surtos de histoplasmose no Brasil desde 1958, envolvendo 184 pacientes, com o número de casos por surto variando de 2 – 13. No entanto, estes dados não são otimizados uma vez que a histoplasmose pulmonar aguda é pouco diagnosticada e muitas vezes confundida com a tuberculose ou a leishmaniose (Antinori *et al.*, 2014).

De fato, surtos de histoplasmose aguda têm sido registrados em diversos Estados brasileiros, entre eles São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Mato Grosso, Minas Gerais,

Goiás, Amazonas e Rio Grande do Sul, nos quais os indivíduos são infectados após exposição aos propágulos fúngicos em ambientes contaminados, envolvendo também pacientes imunocompetentes (Ferreira e Borges, 2009; Faiolla *et al.*, 2013; Passos *et al.*, 2014). Em áreas endêmicas, aproximadamente 10% dos indivíduos imunocompetentes desenvolvem os sintomas da doença (Damasceno *et al.*, 2016). Apesar disso, indivíduos HIV-positivos estão predispostos a infecções fúngicas em função das alterações significativas em sua resposta imune celular (Colombo *et al.*, 2012).

Tendo, portanto, uma distribuição mundial, *H. capsulatum* é encontrado preferencialmente em excrementos de morcegos e aves na sua fase miceliar, a qual se caracteriza como o morfotipo geofílico, sapróbio-infectivo deste fungo, sendo capaz de permanecer no ambiente por períodos prolongados, fator que favorece sua disseminação (Rodríguez-Cerdeira *et al.*, 2012).

Sendo assim, a patogenia da histoplasmose inicia-se quando *H. capsulatum* é adquirido pela inalação de microconídios infectivos ou fragmentos de hifas, que atingem os alvéolos pulmonares, onde ocorre a diferenciação de microconídios em leveduras, que por sua vez são fagocitadas por macrófagos (M ϕ). As leveduras se multiplicam dentro dos fagolisossomas e, nessa fase, em contraste a função usual dos M ϕ 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 (Tagliari *et al.*, 2012).

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. O papel da imunidade celular na defesa contra *H. capsulatum* é bem estabelecido (Deepe, 2009; Antonello *et al.*, 2011; Kroetz e Deepe, 2012; Deepe e Buesing, 2012). De fato, a forma disseminada da histoplasmose é mais comumente associada à reativação de focos quiescentes em indivíduos imunocomprometidos, em particular em pacientes infectados com o HIV (Marques *et al.*, 2015). Segundo Ferreira e Borges (2009), entre 107 casos de histoplasmose disseminada diagnosticados na enfermaria de Doenças Infecciosas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, Brasil, apenas um dos casos foi associado a um paciente imunocompetente.

Adicionalmente, os fatores de virulência desenvolvidos pelo fungo são essenciais para o sucesso da infecção. Entre eles destacam-se: a) a transição micélio-levedura induzida pela temperatura, a qual se denomina dimorfismo térmico; b) os mecanismos para aquisição de

ferro; c) uma pequena proteína secretada que é capaz de se ligar ao Ca^{2+} em baixas concentrações (Cbp1); d) uma proteína de choque térmico (Hsp60); e) uma proteína extracelular específica da fase leveduriforme (YPS3); f) um polissacarídeo da parede celular, denominado α -(1-3)-glucano; g) a produção de melanina e; h) a formação dos biofilmes de *H. capsulatum*, que constituem estruturas cruciais no desenvolvimento de infecções, uma vez que microrganismos estruturados em biofilmes exibem altos níveis de resistência aos antimicrobianos em função da baixa perfusão de drogas, favorecendo o desenvolvimento de fenótipos resistentes (Weaver, Sheehan e Keath, 1996; Nosanchuk *et al.*, 2002; Rappleye, Engle e Goldman, 2004; Bohse e Woods, 2007; Pitangui *et al.*, 2012; Sardi *et al.*, 2014).

Um biofilme pode ser definido como uma comunidade sésil de microrganismos, individualizado por células aderentes a um substrato, interface ou adesão célula-célula, circundadas por uma matriz extracelular (MEC) de polissacarídeos e que diferem profundamente das células homólogas livres em relação ao crescimento, expressão gênica e tradução de proteínas (Costerton *et al.*, 1995). De fato, nosso grupo tem explorado aspectos únicos e determinantes para a formação dos biofilmes de *H. capsulatum in vitro* e suas possíveis implicações na infecção às células hospedeiras. Da mesma forma, outros investigadores caracterizaram recentemente a susceptibilidade antifúngica reduzida de biofilmes de *H. capsulatum in vitro* frente aos agentes antifúngicos itraconazol e anfotericina B, bem como frente à farnesol sozinho e combinado com antifúngicos, indicando os biofilmes como os prováveis implicadores das infecções fúngicas recorrentes (Brilhante *et al.*, 2015).

Diante deste contexto, a gravidade destas formações resistentes na patogênese da histoplasmose se torna ainda mais relevante em vista dos relatos recentes que descrevem clinicamente a identificação de infecções por *H. capsulatum* em indivíduos com dispositivos médicos ou implantes cirúrgicos e ainda, relatos de histoplasmose endovascular em pacientes com implantes vasculares (Carreto-Binaghi *et al.*, 2015).

Neste sentido, estudos prévios publicados pelo nosso grupo estabeleceram uma correlação entre o modo de infecção de *H. capsulatum* e a formação dos biofilmes (Pitangui *et al.*, 2012; Sardi *et al.*, 2014; Pitangui *et al.*, 2016). Diante desta problemática, é reafirmada a emergência da identificação de um novo alvo que possa ser selecionado, a fim de estabelecer um novo regime terapêutico para a histoplasmose. Neste contexto, atualmente as abordagens “Ômicas” constituem ferramentas extremamente promissoras para a investigação de alvos e/ou biomarcadores dos biofilmes microbianos, 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 e Milos, 2011; Muszkieta *et al.*, 2013). Tais ferramentas tiveram início na chamada Era Pós-Genômica e foram desenvolvidas para solucionar as limitações que permeiam a genômica de um organismo em questão. O sequenciamento genômico reflete a informação genética através de técnicas que identificam a sequência de nucleotídeos no genoma do organismo. Assim, é fato que aspectos tais como sequência, número e sintenia dos genes contidos no núcleo de uma célula se mantêm estáticos durante o ciclo celular, no entanto existe um equilíbrio dinâmico entre: a) transcrição gênica, b) tradução proteica e, c) produção de subprodutos metabólicos de acordo com a condição biológica a qual a célula é sujeita, definindo então diferentes transcriptomas, proteomas e metabolomas para a mesma célula ao longo de sua diferenciação celular (De Hoog and Mann, 2004).

Dessa forma, as análises transcriptômica, proteômica e metabolômica podem ser empregadas para a obtenção das diferenças entre a assinatura transcricional, traducional e metabólica de um microrganismo em biofilmes e em crescimento planctônico. Este campo de pesquisa tem adquirido novos conceitos e neste contexto Azevedo *et al.* (2009) sugeriu uma nova tendência, a chamada “biofômica” (*biofomics*) – uma abordagem “Ômica” para o campo dos biofilmes. O objetivo desta abordagem é reunir em um banco de dados o grande conjunto de dados ômicos gerados a partir dos estudos da habilidade de um microrganismo aderir à superfícies, se comunicar com células vizinhas e formar biofilmes. Tais dados coletados seriam disponíveis à comunidade científica e identificariam uma única assinatura dos biofilmes incluindo informações importantes como, fatores ambientais, fisiológicos e mutacionais que afetam a capacidade de um microrganismo desenvolver biofilmes. Isto poderia então impactar positivamente na Biologia de Sistemas e conseqüentemente no desenvolvimento de uma nova ferramenta diagnóstica e/ou terapêutica para estas formações resistentes.

O transcriptoma total comparativo constitui uma abordagem estratégica para investigar fatores envolvidos na patogênese de *H. capsulatum*. Esta análise utiliza o sequenciamento do RNA em larga escala caracterizando o transcriptoma, que corresponde ao conjunto completo de regiões transcritas em um genoma de maneira significativamente mais sensível quando comparado às abordagens de hibridização *microarray* (Wang *et al.*, 2009a). Os dados obtidos utilizando sequenciamento de RNA também têm sido utilizados para identificar novos eventos de *splicing* e quantificar a expressão de genes a partir de células cultivadas em diferentes condições experimentais (Marioni *et al.*, 2008; Mortazavi *et al.*, 2008; Sultan *et al.*, 2008; Trapnell, Pachter e Salzberg, 2009).

Segundo Wang *et al.* (2009b), plataformas de RNA-Seq são extremamente sensíveis e, neste estudo, caracteriza-se como uma ferramenta útil para categorizar, de forma inédita, os genes que representam a assinatura transcricional de *H. caspulum* em suas diferentes formas de crescimento (biofilmes e planctônico), de maneira que serão identificados genes candidatos potenciais que codificam proteínas chave e que podem ser amplamente estudados como putativos alvos terapêuticos e/ou biomarcadores durante a infecção às células hospedeiras.

Alguns estudos têm reportado alterações transcricionais nos biofilmes de espécies de bactérias, entre elas *Pseudomonas aeruginosa*, *Desulfovibrio vulgaris* e espécies de *Sulfolobus* (Manos *et al.*, 2008; Koerdt *et al.*, 2011; Clark *et al.*, 2012) e patógenos fúngicos, como *Candida albicans* (De Cremer *et al.*, 2016).

Neste contexto, muitas informações importantes têm sido obtidas a partir da utilização de métodos Ômicos empregados em estudos recentes e tais informações podem ser integradas para o desenvolvimento de uma nova terapia das infecções causadas por biofilmes fúngicos.

No âmbito das análises transcriptômicas, uma investigação recente destaca dados relevantes a cerca dos biofilmes de *C. albicans*. Tal espécie caracteriza-se como a mais prevalente e patogênica entre todas as espécies de *Candida* relacionadas às infecções sistêmicas (*Candida* bloodstream infections – CBSI) e, este fato, é decorrente da habilidade do patógeno de formar biofilmes robustos. De acordo com Rajendran *et al.* (2016), os isolados clínicos de candidemia podem ser estratificados em dois grupos, os quais podem ter: a) alto potencial de formação de biofilmes (high biofilm formers – HBF) e; b) baixo potencial de formação de biofilmes (low biofilm formers – LBF). Assim, há um fenótipo heterogêneo dos biofilmes, o qual, de acordo com a sua classificação, impacta diretamente nos resultados clínicos e na mortalidade. Os autores deste estudo constataram, por análise comparativa de RNA-Seq, que há uma expressão gênica diferencial significativa entre os isolados HBF e LBF de *C. albicans*. A partir dos resultados transcriptômicos obtidos foi possível destacar uma importância destacada para a via aspartato aminotransferase na formação dos biofilmes, a qual pode ser explorada como um potencial alvo em biofilmes fúngicos.

A abordagem metabolômica permite um melhor entendimento acerca dos fenômenos complexos que ocorrem em nível de metabólitos durante os estágios de desenvolvimento de um biofilme, identificando os metabólitos em diferentes vias celulares e os avaliando como alvos terapêuticos potenciais e/ou como marcadores do biofilme na infecção às células hospedeiras. Com esta finalidade, plataformas de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) têm sido amplamente empregadas na identificação de biomarcadores (Hou *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014). Dessa forma, neste

trabalho foi desenvolvida a padronização de uma análise metabolômica não direcionada para detecção de diversos grupos de metabólitos como moléculas de baixa massa molecular não proteicas e pequenos peptídeos, a fim de se obter posteriormente, um perfil metabólico característico de *H. capsulatum* em suas diferentes formas de crescimento. Tendo em vista o estudo do metabolismo celular, é necessário destacar algumas descrições feitas por Lindon *et al.* (2006) a partir dos seguintes conceitos: a) o metaboloma de um sistema biológico compreende o conjunto de todos os compostos químicos (intra- e extracelulares) consumidos (substratos) e excretados (metabólitos); b) o perfil metabólico, também denominado metabolômica, é definido como a investigação quantitativa de uma classe ampla de substratos intracelulares e metabólitos e; c) fingerprinting metabólico, também denominado metabonômica, constitui uma investigação qualitativa de metabólitos selecionados necessários para classificar uma amostra.

Uma investigação conduzida por Zhu *et al.* (2013) revelou o perfil metabólico dos biofilmes de *C. albicans* por uma técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS), a partir da qual foram identificados 31 metabólitos produzidos diferencialmente entre culturas de biofilmes e células planctônicas. Este estudo demonstrou ainda que a trealose é determinante para o desenvolvimento dos biofilmes de *C. albicans*, uma vez que a ausência deste metabólito resultou na formação anormal e no aumento da sensibilidade dos biofilmes aos agentes antifúngicos anfotericina B e miconazol. Adicionalmente, um estudo desenvolvido por Chen *et al.* (2014) detectou 16 metabólitos diferencialmente produzidos entre culturas planctônicas e biofilmes de *C. albicans*, dos quais a maioria foi identificada como aminoácidos ou compostos relacionados, através de um sistema de cromatografia de pareamento iônico-coluna de carbono gráfico poroso acoplada a um sistema de espectrometria de massas do tipo tempo de voo (IP-PGC-TOF/MS).

Então, em vista da complexidade e da variabilidade dos biofilmes de fungos patogênicos, a integração de diferentes dados “Ômicos” se faz necessária. A combinação dos métodos “Ômicos” constitui um campo que tem sido explorado por alguns grupos de pesquisa em função da complementariedade entre eles. Esta combinação é o principal desafio da biologia de sistemas em vista da grande quantidade de dados gerado pelos projetos “Ômicos”, os quais, uma vez integrados permitem o mapeamento e a elucidação de informações peculiares, em termos quantitativos, a cerca do comportamento de uma célula, tecido ou organismo em uma determinada condição biológica a qual estiver submetido (Moreira, 2015). Muszkietta *et al.* (2013) integraram três diferentes métodos “Ômicos”, *microarray*, RNA-seq e análise proteômica, para comparar as diferentes assinaturas transcriptômica e proteômica dos

biofilmes de *Aspergillus fumigatus*. De acordo com os autores, alguns genes foram, de fato, correspondentes às proteínas diferencialmente reguladas, no entanto, há muitos desafios que permeiam a correlação entre dados de transcriptoma e proteoma. Estes desafios referem-se ao fato de que os dados detectados do transcriptoma codificante (RNAm) não refletem todos os processos regulatórios de uma célula, tais como os processos pós-transcricionais e a regulação pós-traducional, reafirmando a necessidade de integrar as abordagens “Ômicas”. Assim, a comparação e a integração de abordagens “Ômicas” em diferentes níveis tem um potencial promissor para fornecer novas informações, que se reúnem para caracterizar a assinatura dos biofilmes microbianos, no que diz respeito à habilidade de formação, atividade fisiológica e estrutura.

De maneira adicional, a identificação dos microRNAs (miRNAs) expressos por uma célula ou organismo em uma determinada condição caracteriza o miRNoma. Assim, a identificação dos miRNAs diferencialmente expressos após interação *H. capsulatum*-célula hospedeira também constitui uma abordagem de importância cada vez mais reconhecida a ser desenvolvida neste trabalho, em vista da ocorrência generalizada dos miRNAs e suas diversas funções como moléculas regulatórias (Law *et al.*, 2013).

De fato, RNAs não-codificantes (ncRNAs) ganharam a atenção de muitos pesquisadores em função de inúmeras investigações que destacam o seu papel em diversos processos biológicos e doenças, incluindo vários tipos de cânceres humanos, doenças cardiovasculares e doenças respiratórias alérgicas, principalmente por regularem a expressão de vários genes (Garofalo, Leva e Croce, 2014; Leung e Natarajan, 2014; Liu *et al.*, 2014; Rebane e Akdis, 2014; Yao-Shu, Xiao-Lin e Yong, 2014). Entre os ncRNAs, destacam-se os miRNAs, pequenas moléculas de RNA que afetam a estabilidade dos RNAm e cujas funções regulatórias são bem estabelecidas (O'connell *et al.*, 2010).

Os miRNAs apresentam-se em cadeia simples com 19 a 23 nucleotídeos e, de forma geral, a biogênese dessas pequenas moléculas tem origem no núcleo celular chegando ao citoplasma onde reconhecem os RNAm alvos e reprimem os processos pós-transcricionais ou induzem a clivagem do RNAm (Chitwood e Timmermans, 2007; Costa, Leitão e Enguita, 2012). As proteínas Argonautas, presentes no citoplasma, estão envolvidas no processo de maturação do miRNA, permitindo sua ligação ao RNAm, para que então inicie a inibição dos processos transcricionais dos RNAm-alvo. Essa atividade regulatória que miRNAs apresentam é um processo complexo, uma vez que um único RNAm transcrito pode ser alvo de vários miRNAs, assim como um único miRNA pode regular diversos RNAm-alvo (Costa, Leitão e Enguita, 2012; Turchinovich *et al.*, 2013).

De maneira detalhada, a biogênese dos miRNAs inicia-se no núcleo a partir de um locus específico do genoma onde há a formação de um miRNA primário (ou pri-miRNA). Este miRNA é processado pelo complexo DROSHA-DGCR8, o que resulta na formação de um miRNA precursor também chamado pré-miRNA, que por sua vez é transportado para o citoplasma através de poros nucleares pela Exportina 5. No citoplasma, os pré-miRNAs são reconhecidos pela enzima DICER, que é responsável pela clivagem do loop destes precursores, processo que culmina na obtenção de fragmentos de 19 a 23 pares de bases e que permanecem ligados a essa enzima. Este complexo, entre a DICER e o pequeno fragmento, recruta diversas proteínas da família Argonauta, que em conjunto formam o complexo RISC. Finalmente, este complexo agrupado com o miRNA maduro têm como alvo uma sequência complementar do RNAm atuando na regulação negativa da expressão gênica por induzirem a clivagem da cauda poli-A (deadenilação) através da ação de exonucleases ou por inibirem a ação dos ribossomos na tradução (Li e Rana, 2014).

Poucas investigações têm demonstrado a expressão anormal de miRNAs em células hospedeiras em resposta às infecções fúngicas. Neste contexto, são descritos os miRNAs com expressão significativamente aumentada ou diminuída em relação aos controles em células epiteliais respiratórias e Mø murinos infectados com *C. albicans* e, em monócitos humanos e células dendríticas infectadas com *A. fumigatus* (Monk *et al.*, 2010; Das Gupta *et al.*, 2014; Muhammad *et al.*, 2015; Agostinho *et al.*, 2017). Recentemente, um estudo descreveu ainda o perfil de miRNAs desregulados após a infecção por *C. albicans in vivo*, em modelo animal alternativo *Caenorhabditis elegans* e, identificaram 16 miRNAs superexpressos e 4 miRNAs reprimidos nos nematodos em resposta à infecção (Sun *et al.*, 2016). Com base nisso, os resultados obtidos no presente estudo contemplam a identificação de miRNAs desregulados em Mø hospedeiros em resposta à infecção com leveduras de *H. capsulatum* empregando a tecnologia de RT-qPCR (reverse transcription-quantitative PCR), uma plataforma que determina a abundância relativa de miRNAs nas amostras biológicas selecionadas.

Neste contexto, a identificação dos miRNAs anormalmente regulados em uma célula infectada constitui uma abordagem promissora para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas e ferramentas diagnósticas. Em vista das alternativas terapêuticas empregando miRNAs, atualmente destaca-se uma tecnologia baseada na administração de um RNA de interferência (RNAi) para regular ou mimetizar a função de um miRNA *in vivo*. Tal tecnologia fundamenta-se na utilização dos chamados antimirs ou mimics. Os antimirs caracterizam-se como oligonucleotídeos anti-sentido de cadeia simples utilizados para inibir a função de um miRNA. Embora o mecanismo de ação exato destas moléculas permaneça

desconhecido, esta ferramenta tem demonstrado eficácia *in vivo* ao atuar em um miRNA e impedir sua atividade de repressão gênica, por meio da complementariedade perfeita entre a sequência do oligonucleotídeo administrado e o miRNA-alvo (Van Rooij *et al.*, 2008). Com este intuito, a indústria farmacêutica Santaris Pharma desenvolveu uma droga experimental para o tratamento da hepatite C, nomeada Miravirsen (anteriormente conhecido como SPC3649), a qual atua como um antagonista de miR-122, um miRNA reconhecidamente importante para a replicação do vírus da hepatite C. Atualmente, a droga encontra-se em fase II de Ensaio Clínico e, quando administrada por via intravenosa ou subcutânea em chimpanzés tem impedido a função do miR-122 resultando na redução da carga viral (Borgia *et al.*, 2016). Por outro lado, as opções terapêuticas com o emprego de miRNAs também concentram-se no fornecimento sintético de um miRNA mimic. Os mimics são oligonucleotídeos curtos de fita-dupla que são reconhecidos e transportados até o complexo RISC no citoplasma celular, a partir do qual o oligonucleotídeo pode atuar como um miRNA endógeno aumentando o nível do miRNA de interesse e bloqueando potencialmente a expressão do(s) gene(s)-alvo (Van Rooij *et al.*, 2008).

Adicionalmente, no âmbito do diagnóstico, miRNAs têm sido propostos como biomarcadores estáveis de várias doenças e neste campo de pesquisa, a nova ferramenta miRview mets (Rosetta Genomics Ltd., Nova Jersey, EUA) representa o que há de mais atual e evoluído. Esta ferramenta caracteriza-se como um teste diagnóstico capaz de identificar o tecido de origem de um tumor metastático por meio da quantificação do nível de expressão de 48 miRNAs reconhecidos como biomarcadores tumorais. Assim, o teste tem a propriedade de designar o sítio primário para uma amostra de câncer com base na expressão de miRNAs do tecido tumoral (Meiri *et al.*, 2012).

Então, em linhas gerais, os objetivos propostos e executados neste projeto concentraram-se na busca de um novo alvo (terapia) e/ou candidatos a marcadores moleculares (diagnóstico) da histoplasmose em hospedeiros eucarióticos, a fim de estabelecer com clareza as vias de sinalização alteradas nos sistemas de infecção estudados. Para tanto, as tecnologias “Ômicas”, entre elas, transcriptoma e metaboloma, e um screening de miRNAs foram as abordagens empregadas para investigar a regulação transcricional, metabólica, bem como o perfil de RNAs não codificantes (miRNAs) de células leveduriformes de *H. capsulatum* estruturadas em biofilmes e os resultados obtidos são fundamentais para a consolidação do estudo da virulência dos biofilmes de *H. capsulatum* destacando informações científicas inovadoras a respeito do tema na ciência.

5. CONCLUSÕES

Os dados gerados pelo sequenciamento possibilitaram comparar as diferenças transcricionais dentro da mesma espécie (biofilmes vs. culturas planctônicas) e entre diferentes cepas (EH-315 vs. 60I). Sendo assim, a análise transcriptômica revelou genes-alvo que caracterizam a assinatura transcricional dos biofilmes e da infectividade de uma cepa e, em conclusão, destaca-se ainda que a maioria dos genes é reprimida ($\approx 80\%$ down-regulated) quando as leveduras livres passam a organizarem-se em biofilmes.

Conclui-se também que há um padrão de expressão anormal de miRNAs em Mø THP-1 em resposta à infecção com leveduras de *H. capsulatum* (cepa EH-315 em culturas planctônicas e biofilmes e cepa 60I em culturas planctônicas). Tais miRNAs identificados são responsáveis pelo destino das células infectadas, uma vez que atuam regulando negativamente a expressão de um gene (RNAm) alvo, interferindo em vias que determinam a patogênese da histoplasmose e que envolvem desde os aspectos inerentes à adesão às células hospedeiras, bem como à resposta inflamatória e ainda, à morte celular. Além disso, os resultados obtidos indicam que os genes-alvo EPB41 e NUFIP2 têm sua expressão potencialmente desregulada em células hospedeiras após a infecção com *H. capsulatum*. Assim, em vista da importância funcional reconhecida dos miRNAs identificados neste estudo, estes ncRNAs podem viabilizar uma estratégia terapêutica no futuro, a fim de reverter

a relação miRNA-RNA_m à normalidade celular, por meio do fornecimento de um determinado miRNA (mimics) ou através do bloqueio de um miRNA expresso (antagomiRs). Destaca-se ainda que no screening diferencial biofilmes vs. culturas planctônicas todos os miRNAs alterados foram superexpressos na célula infectada, fato que demonstra a atuação de tais miRNAs convergindo para a regulação negativa da expressão gênica em resposta à infecção por biofilmes.

Adicionalmente, a análise metabolômica diferencial demonstra que em biofilmes há um aumento substancial de PEI e PI comparado ao crescimento de ambas as cepas (EH-315 e 60I) em culturas planctônicas, constatando a produção de matriz extracelular, bem como maior reserva energética indispensável a estas formações. Subsequentemente, a análise de abundância dos metabólitos detectados por LC-MS/MS revelou três grupos de metabólitos, sendo a) a grande maioria de moléculas com massas moleculares comuns (74%) entre biofilmes e culturas planctônicas, das quais 95% apresentam massa molecular ≤ 800 Da e 57% têm uma intensidade relativa reduzida quando as leveduras passam a estruturarem-se em biofilmes (DOWN); b) 8% das moléculas produzidas exibiram massa exclusiva nos biofilmes, das quais a maioria (55%) apresentou massa molecular ≥ 800 Da e; c) 18% das moléculas produzidas exibiram massa exclusiva nas culturas planctônicas. Portanto, em biofilmes há uma produção significativamente menor de metabólitos exclusivos.

Em conclusão, a integração entre as abordagens desenvolvidas revela que a estruturação das leveduras em biofilmes induz uma regulação negativa que impacta nos processos transcricionais direta (genoma codificante – RNA_m) e indiretamente (genoma não-codificante – miRNAs) e, nos processos metabólicos, sugerindo uma redução significativa da atividade metabólica evidenciada tanto na biologia do fungo em biofilme (regulação transcricional e metabólica), como na interação *in vitro* biofilmes-células hospedeiras (perfil de miRNAs).

Em conjunto, através das plataformas exploradas foram identificadas (genes e miRNAs) e detectadas (metabólitos) moléculas que constituem uma fonte potencial para delinear: a) um marcador de biofilmes na infecção às células hospedeiras; b) novos protótipos para a terapêutica da histoplasmose e; c) novos biomarcadores como ferramentas diagnósticas para a histoplasmose.

6. REFERÊNCIAS

AGUSTINHO, D. P. *et al.* Dectin-1 is required for miR155 upregulation in murine macrophages in response to *Candida albicans*. **Virulence**, v. 8, n. 1, p. 41-52, 2017.

- ANDERSON, H. *et al.* Histoplasmosis cluster, golf course, Canada. **Emerg Infect Dis**, v. 12, n. 1, p. 163–165, 2006.
- ANTINORI, S. *Histoplasma capsulatum*: more widespread than previously thought. **Am J Trop Med Hyg**, v. 90, n. 6, p. 982-983, 2014.
- ANTONELLO, V. S. *et al.* Oropharyngeal histoplasmosis: report of eleven cases and review of the literature. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, n. 1, p. 26-29, 2011.
- AZEVEDO, N. F.; LOPES, S. P.; KEEVIL, C. W.; PEREIRA, M. O.; VIEIRA, M. J. Time to "go large" on biofilm research: advantages of an omics approach. **Biotechnol Lett**, v. 31, n. 4, p. 477-485, 2009.
- BESTER, E. *et al.* Planktonic-cell yield of a *Pseudomonad* biofilm. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, n. 12, p. 7792-7798, 2005.
- BISH, R. *et al.* Comprehensive Protein Interactome Analysis of a Key RNA Helicase: Detection of Novel Stress Granule Proteins. **Biomolecules**, v. 5, n. 3, p. 1441-1466, 2015.
- BOHSE, M. L.; WOODS, J. P. Expression and interstrain variability of the YPS3 gene of *Histoplasma capsulatum*. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 4, p. 609-615, 2007.
- BORGIA, G. *et al.* The therapeutic potential of new investigational hepatitis C virus translation inhibitors. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 25, n. 10, p. 1209-1214, 2016.
- BRILHANTE, R. S. *et al.* Evaluation of the genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* isolates from north-eastern Brazil. **J Med Microbiol**, v. 61, n. Pt 12, p. 1688-1695, 2012.
- BRILHANTE, R.S.N. *et al.* *Histoplasma capsulatum* in planktonic and biofilm forms: *in vitro* susceptibility to amphotericin B, itraconazole and farnesol. **J Med Microbiol**, v. 64, p. 394-399, 2015.
- BRODERICK, J. A.; SALOMON, W. E.; RYDER, S. P.; ARONIN, N.; ZAMORE, P. D. Argonaute protein identity and pairing geometry determine cooperativity in mammalian RNA silencing. **RNA**, v. 17, n. 10, p. 1858–1869, 2011.
- BÜTEPAGE, M.; ECKEL, L.; VERHEUGD, P.; LÜSCHER, B. Intracellular Mono-ADP-Ribosylation in Signaling and Disease. **Cells**, v. 4, n. 4, p. 569-595, 2015.
- BYRON, S. A. *et al.* Translating RNA sequencing into clinical diagnostics: opportunities and challenges. **Nat Rev Genet**, v. 17, n. 5, p. 257-271, 2016.
- CAIN, C. W., LOHSE, M. B., HOMANN, O. R., SIL, A., JOHNSON, A. D. A conserved transcriptional regulator governs fungal morphology in widely diverged species. **Genetics**, v. 190, n. 2, p. 511-521, 2012.
- CALANNI, L. M. *et al.* Brote de histoplasmosis en la provincia de Neuquen, Patagonia Argentina. **Rev Iberoam Micol**, v. 30, n. 3, p. 193–199, 2013.

- CALVETE, J. J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venomomics. Strategy and applications. **J Mass Spectrom**, v. 42, n. 11, p. 1405-1414, 2007.
- CARRETO-BINAGHI, L. E. Could *Histoplasma capsulatum* Be Related to Healthcare-Associated Infections?. **BioMed Res Int**, v. 2015, p. 1-11, 2015.
- CHEN, X. *et al.* Ion-pairing chromatography on a porous graphitic carbon column coupled with time-of-flight mass spectrometry for targeted and untargeted profiling of amino acid biomarkers involved in *Candida albicans* biofilm formation. **Mol Biosyst**, v. 10, n. 1, p. 74-85, 2014.
- CHITWOOD, D. H.; TIMMERMANS, M. C. Target mimics modulate miRNAs. **Nat Genet**, v. 39, n. 8, p. 935-936, 2007.
- CLARK, M. E. *et al.* Transcriptomic and proteomic analyses of *Desulfovibrio vulgaris* biofilms: carbon and energy flow contribute to the distinct biofilm growth state. **BMC Genomics**, v. 13, p. 138, 2012.
- COLOMBO, T. E. *et al.* Identification of fungal diseases at necropsy. **Pathol Res Pract**, v. 208, n. 9, p. 549-552, 2012.
- CONESA, A.; GÖTZ, S.; GARCÍA-GÓMEZ, J.M.; TEROL, J.; TALÓN, M.; ROBLES, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 18, p. 3674-3676, 2005.
- COSTA, M. C.; LEITÃO, A. L.; ENGUITA, F. J. Biogenesis and Mechanism of Action of Small Non-Coding RNAs: Insights from the Point of View of Structural Biology. **Int J Mol Sci**, v. 13, n. 8, p. 10268-10295, 2012.
- COSTERTON, J. W. *et al.* Microbial biofilms. **Annu Rev Microbiol**, v. 49, p. 711-745, 1995.
- DAMASCENO, L. S. *et al.* The use of genetic markers in the molecular epidemiology of histoplasmosis: a systematic review. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 35, n. 1, p. 19-27, 2016.
- DAS GUPTA, M., FLIESSER, M., SPRINGER, J., BREITSCHOPF, T., SCHLOSSNAGEL, H., SCHMITT, A. L., KURZAI, O., HÜNNIGER, K., EINSELE, H., LÖFFLER, J. *Aspergillus fumigatus* induces microRNA-132 in human monocytes and dendritic cells. **Int J Med Microbiol**, v. 304, n. 5-6, p. 592-596, 2014.
- DAVILA, J. I. *et al.* Impact of RNA degradation on fusion detection by RNA-seq. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 814, 2016.
- DE CREMER, K. *et al.* Stimulation of superoxide production increases fungicidal action of miconazole against *Candida albicans* biofilms. **Sci Rep**, v. 6, p. 27463, 2016.
- DE HOOG, C. L.; MANN, M. Proteomics. **Annu Rev Genomics Hum Genet**, v. 5, p. 267-293, 2004.

- DEEPE, G. S. J. *Histoplasma capsulatum*. In: MANDELL, G. L.; BENNET, J. E., *et al* (Ed.). **Principles and Practice of Infectious Diseases**. Philadelphia: Churchill Livingstone, (7th ed.), p. 3305-3318, 2009.
- DEEPE, G. S.; BUESING, W. R. Deciphering the pathways of death of *Histoplasma capsulatum*-infected macrophages: implications for the immunopathogenesis of early infection. **J Immunol**, v. 188, p. 334-344, 2012.
- DENNING, D. W.; BROMLEY M. J. Infectious Disease. How to bolster the antifungal pipeline. **Science**, v. 347, n. 6229, p. 1414-1416, 2015.
- DIAS, N. B. *et al*. Peptide diversity in the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera): a comparison of the intra- and inter-colony compositions. **Peptides**, v. 51, p. 122-130, 2014.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. A colorimetric method for the determination of sugars. **Nature**, v. 168, p. 167, 1951.
- DURAN-PINEDO, A. E., BAKER, V. D., FRIAS-LOPEZ, J. The periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* induces expression of transposases and cell death of *Streptococcus mitis* in a biofilm model. **Infect Immun**, v. 82, n. 8, p. 3374-3382, 2014.
- DWEEP, H. *et al*. miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. **Nature Methods**, v. 12, n. 8, p. 697, 2015.
- FAIOLLA, R. C. *et al*. Histoplasmosis in immunocompetent individuals living in an endemic area in the Brazilian Southeast. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 46, n. 4, p. 461-465, 2013.
- FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S. [Histoplasmosis]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42, n. 2, p. 192-198, 2009.
- GAROFALO, M.; LEVA, G. D.; CROCE, C. M. MicroRNAs as Anti-Cancer Therapy. **Curr Pharm Des**, v. 20, n. 33, p. 5328-5335, 2014.
- GHANNOUM, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clin Microbiol Rev**, v. 13, n. 1, p. 122-143, 2000.
- HARA, M. R. *et al*. S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. **Nat Cell Biol**, v. 7, n. 7, p. 665-674, 2005.
- HARRISON, J. J. *et al*. Differences in biofilm and planktonic cell mediated reduction of metalloid oxyanions. **FEMS Microbiol Lett**, v. 235, n. 2, p. 357-362, 2004.
- HOU, Y. *et al*. A metabolomics approach for predicting the response to neoadjuvant chemotherapy in cervical cancer patients. **Mol Biosyst**, v. 10, n. 8, p. 2126-2133, 2014.
- KALIA, M.; YADAV, V.K.; SINGH, P.K.; SHARMA, D.; PANDEY, H.; NARVI, S.S.; AGARWAL, V. Effect of Cinnamon Oil on Quorum Sensing-Controlled Virulence Factors and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. **PLoS One**, v. 11, n. 10(8):e0135495, 2015.

- KASUGA, T. *et al.* Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. **Mol Ecol**, v. 12, n. 12, p. 3383–3401, 2003.
- KOERDT, A. *et al.* Macromolecular fingerprinting of *Sulfolobus* species in biofilm: a transcriptomic and proteomic approach combined with spectroscopic analysis. **J Proteome Res**, v. 10, n. 9, p. 4105-4119, 2011.
- KROETZ, D. N.; DEEPE, G. S. The role of cytokines and chemokines in *Histoplasma capsulatum* infection. **Cytokine**, v. 58, n. 1, p. 112-117, 2012.
- LAW, P. T .Y. *et al.* Deep sequencing of small RNA transcriptome reveals novel non-coding RNAs in hepatocellular carcinoma. **Journal of Hepatology**, v. 58, n. 6, p. 1165–1173, 2013.
- LAWRENCE, J. R. *et al.* Optical sectioning of microbial biofilms. **J Bacteriol**, v. 173, n. 20, p. 6558-6567, 1991.
- LEE, S. Y. *et al.* Comparison of GC/MS and LC/MS methods for the analysis of propofol and its metabolites in urine. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 900, p. 1-10, 2012.
- LEUNG, A.; NATARAJAN, R. Noncoding RNAs in vascular disease. **Curr Opin Cardiol**, v. 29, n. 3, p. 199-206, 2014.
- LI, Y. *et al.* Serum metabolic profiling study of lung cancer using ultra high performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 966, p. 147-153, 2014.
- LI, Z.; RANA, T. M. Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. **Nat Rev Drug Discov**, v. 13, n. 8, p. 622-638, 2014.
- LINDON, J. N., J.; HOLMES, E. **The Handbook of Metabonomics and Metabolomics**. 1st. Amsterdam, Holanda, 572 p. 2006.
- LIU, A. M. *et al.* miR-122 targets pyruvate kinase M2 and affects metabolism of hepatocellular carcinoma. **PLoS One**, v. 9, n. 1, e86872, 2014.
- LU, T. *et al.* miRSystem: An Integrated System for Characterizing Enriched Functions and Pathways of MicroRNA Targets. **PLoS One**, v. 7, n. (8), e42390, 2012.
- LU, B.; ZENG, Z.; SHI, T. Comparative study of de novo assembly and genome-guided assembly strategies for transcriptome reconstruction based on RNA-Seq. **Sci China Life Sci**, v. 56, n. 2, p. 143-155, 2013.
- MANOS, J. *et al.* Transcriptome analyses and biofilm-forming characteristics of a clonal *Pseudomonas aeruginosa* from the cystic fibrosis lung. **J Med Microbiol**, v. 57, n. Pt 12, p. 1454-1465, 2008.
- MARIONI, J. C. *et al.* RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. **Genome Res**, v. 18, n. 9, p. 1509-1517, 2008.

- MARQUES, S. A.; HORTENSE, J.; REQUENA, C. B.; DE CAMARGO, R. M.; MARQUES, M. E. Disseminated cutaneous histoplasmosis in elderly patients. An uncommon presentation. **Rev Iberoam Micol**, v. 32, n. 2, p. 131-132, 2015.
- MARTIN, J. A.; WANG, Z. Next-generation transcriptome assembly. **Nat Rev Genet**, v. 12, n. 10, p. 671-682, 2011.
- MEIRI, E. *et al.* A second-generation microRNA-based assay for diagnosing tumor tissue origin. **Oncologist**, v. 17, n. 6, p. 801-812, 2012.
- MERRICK, W. C. Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. **Microb Rev**, v. 56, p. 291-315, 1992.
- MITCHELL, H. L., DASHPER, S. G., CATMULL, D. V., PAOLINI, R. A., CLEAL, S. M., SLAKESKI, N., TAN, K. H., REYNOLDS, E. C. *Treponema denticola* biofilm-induced expression of a bacteriophage, toxin-antitoxin systems and transposases. **Microbiology**, v. 156, n. 3, p. 774-788, 2010.
- MONK, C. E., HUTVAGNER, G., ARTHUR, J. S. Regulation of miRNA transcription in macrophages in response to *Candida albicans*. **PLoS One**, v. 5, n. 10, e13669, 2010.
- MOREIRA, L. M. **Ciências genômicas: fundamentos e aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 403 p. 2015.
- MORTAZAVI, A. *et al.* Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nat Methods**, v. 5, n. 7, p. 621-628, 2008.
- MUHAMMAD, S. A., FATIMA, N., SYED, N. I., WU, X., YANG, X. F., CHEN, J.Y. MicroRNA Expression Profiling of Human Respiratory Epithelium Affected by Invasive *Candida* Infection. **PLoS One**, v. 10, n. 8, e0136454, 2015.
- MUSZKIETA, L.; BEAUVAIS, A.; PÄHTZ, V.; GIBBONS, J. G.; ANTON LEBERRE, V.; BEAU, R.; SHIBUYA, K.; ROKAS, A.; FRANCOIS, J. M.; KNIEMEYER, O.; BRAKHAGE, A. A.; LATGÉ, J. P. Investigation of *Aspergillus fumigatus* biofilm formation by various "omics" approaches. **Front Microbiol**, v. 4, p. 13, 2013.
- MYINT, T. *et al.* Histoplasmosis in Patients With Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immunodeficiency Syndrome (HIV/AIDS): Multicenter Study of Outcomes and Factors Associated With Relapse. **Medicine (Baltimore)**, v. 93, n. 1, p. 11-18, 2014.
- NAILIS, H. *et al.* Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and -independent gene expression. **BMC Microbiol**, v. 10, p. 114, 2010.
- NOSANCHUK, J. D., GÓMEZ, B. L., YOUNGCHIM, S., DÍEZ, S., AISEN, P., ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M., RESTREPO, A., CASADEVALL, A., HAMILTON, A. J. *Histoplasma capsulatum* synthesizes melanin-like pigments *in vitro* and during mammalian infection. **Infect Immun**, v. 70, n. 9, p. 5124-5131, 2002.

O'CONNELL, R. M. *et al.* Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 2, p. 111-122, 2010.

OLIVEIRA, F. E. M.; UNIS, G.; SEVERO, L. C. An outbreak of histoplasmosis in the city of Blumenau, Santa Catarina. **J Bras Pneumol**, v. 32, n. 4, p. 375-378, 2006.

OLIVEROS, J.C. VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. Disponível em: <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>, 2007. Acesso em 20 de agosto de 2015.

OZSOLAK, F.; MILOS, P. M. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. **Nat Rev Genet**, v. 12, p. 87-98, 2011.

PABLA, N., BHATT, K., DONG, Z. Checkpoint kinase 1 (Chk1)-short is a splice variant and endogenous inhibitor of Chk1 that regulates cell cycle and DNA damage checkpoints. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 1, p. 197-202, 2012.

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

PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **J Microbiol Methods**, v. 72, n. 2, p. 157-165, 2008.

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.

PITANGUI, N. D. S. *et al.* An Intracellular Arrangement of *Histoplasma capsulatum* Yeast-Aggregates Generates Nuclear Damage to the Cultured Murine Alveolar Macrophages. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 1526, 2016.

RAJENDRAN, R. *et al.* Integrating *Candida albicans* metabolism with biofilm heterogeneity by transcriptome mapping. **Sci Rep**, v. 6, p. 35436, 2016.

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

REBANE, A.; AKDIS, C. A. MicroRNAs in Allergy and Asthma. **Curr Allergy Asthma Rep**, v. 14, n. 4, p. 424, 2014.

ROBERTS, L. D. *et al.* Targeted metabolomics. **Curr Protoc Mol Biol**, v. Chapter 30, Unit 30.2, p. 1-24, 2012.

RODRÍGUEZ-CERDEIRA, C. *et al.* Systemic Fungal Infections in Patients with human immunodeficiency virus. **Actas Dermosifiliogr**, 2012.

ROESSNER, U. *et al.* Technical advance: simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. **Plant J**, v. 23, n. 1, p. 131-142, 2000.

- SARDI, J. C. O. *et al.* Highlights in pathogenic fungal biofilms. **Rev Iberoam Micol**, v. 31, n. 1, p. 22–29, 2014.
- SARDI, J. C. *et al.* *In vitro* *Paracoccidioides brasiliensis* biofilm and gene expression of adhesins and hydrolytic enzymes. **Virulence**, v. 6, n. 6, p. 663-672, 2015.
- SENEVIRATNE, C. J.; JIN, L.; SAMARANAYAKE, L. P. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. **Oral Dis**, v. 14, p. 582–590, 2008.
- SCHULZ, W. A.; INGENWERTH, M.; DJUIDJE, C.E.; HADER, C.; RAHNENFÜHRER, J.; ENGERS, R. Changes in cortical cytoskeletal and extracellular matrix gene expression in prostate cancer are related to oncogenic ERG deregulation. **BMC Cancer**, v. 10, n. 505, p. 1-9, 2010.
- SHEARER, G. Jr. Cloning and analysis of cDNA encoding an elongation factor 1 alpha from the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. **Gene**, v. 161, n. 1, p. 119-123, 1995.
- SIFUENTES-OSORNIO, J.; CORZO-LEÓN, D. E.; PONCE-DE-LEÓN, L. A. Epidemiology of Invasive Fungal Infections in Latin America. **Curr Fungal Infect Rep**, v. 6, n. 1, p. 23-34, 2012.
- SULTAN, M. *et al.* A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 956-960, 2008.
- SUMNER, L. W.; MENDES, P.; DIXON, R. A. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**, v. 62, n. 6, p. 817-36, 2003.
- SUN, L. *et al.* microRNAs Involved in the Control of Innate Immunity in *Candida* Infected *Caenorhabditis elegans*. **Sci Rep**, v. 6, 36036, 2016.
- TAGLIARI, L.; TOLEDO, M. S.; LACERDA, T. G.; SUZUKI, E.; STRAUS, A.H.; TAKAHASHI, H. K. Membrane microdomain components of *Histoplasma capsulatum* yeast forms, and their role in alveolar macrophage infectivity. **Biochim Biophys Acta**, v. 1818, n. 3, p. 458-466, 2012.
- TISDALE, E. J. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is phosphorylated by protein kinase Ciota /lambda and plays a role in microtubule dynamics in the early secretory pathway. **J Biol Chem**, v. 277, n. 5, p. 3334-3341, 2002.
- TRAPNELL, C.; PACHTER, L.; SALZBERG, S. L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1105-11, 2009.
- TURCHINOVICH, A. *et al.* Circulating miRNAs: cell-cell communication function? **Front Genet**, v. 4, p. 119, 2013.
- VALLEJO, M. C. *et al.* Vesicle and vesicle-free extracellular proteome of *Paracoccidioides brasiliensis*: comparative analysis with other pathogenic fungi. **J Proteome Res**, v. 11, n. 3, p. 1676-1685, 2012.

- VAN ROOIJ, E.; MARSHALL, W. S.; OLSON, E. N. Toward microRNA-based therapeutics for heart disease: the sense in antisense. **Circ Res**, v. 103, n. 9, p. 919-928, 2008.
- VLACHOS, I. S. *et al.* DIANA miRPath v.2.0: investigating the combinatorial effect of microRNAs in pathways. **Nucleic Acids Res**, 40 (Web Server issue): W498-504, 2012.
- WANG, D. *et al.* Detection of multiple gene mutations in non-small-cell lung cancer by suspension *microarray*. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, v. 89, n. 48, p. 3393-3396, 2009a.
- WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nat Rev Genet**, v. 10, n. 1, p. 57-63, 2009b.
- WEAVER, C. H.; SHEEHAN, K. C.; KEATH, E. J. Localization of a yeast-phase-specific gene product to the cell wall in *Histoplasma capsulatum*. **Infect Immun**, v. 64, n. 8, p. 3048-3054, 1996.
- WEBSTER, R. H., SIL, A. Conserved factors Ryp2 and Ryp3 control cell morphology and infectious spore formation in the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 38, p. 14573-14578, 2008.
- WEN, Z. T., NGUYEN, A. H., BITOUN, J. P., ABRANCHES, J., BAKER, H. V., BURNE, R. A. Transcriptome analysis of LuxS-deficient *Streptococcus mutans* grown in biofilms. **Mol Oral Microbiol**, v. 26, n. 1, p. 2-18, 2011.
- YAO-SHU, T.; XIAO-LIN, C.; YONG, L. Roles of microRNAs in Allergic Airway Diseases. **Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao**, v. 36, n. 1, p. 114-118, 2014.
- ZHOU, Q. Y. *et al.* Metabolomics investigation of cutaneous T cell lymphoma based on UHPLC-QTOF/MS. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 15, n. 13, p. 5417-5421, 2014.
- ZHU, Z. *et al.* Time course analysis of *Candida albicans* metabolites during biofilm development. **J Proteome Res**, v. 12, n. 6, p. 2375-2385, 2013.