



Universidade Federal De São Paulo  
Campus Diadema

Yasmin Nascimento de Barros

**Avaliação do papel da hipóxia na modulação da parede celular do  
fungo *Paracoccidioides brasiliensis***

Diadema  
Setembro/2021

Yasmin Nascimento de Barros

**Avaliação do papel da hipóxia na modulação da parede celular  
fungo *Paracoccidioides brasiliensis***

Dissertação apresentada para a para  
obtenção do título de Mestre em  
Ciências Farmacêuticas, ao Programa  
de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do  
Instituto de Ciências Ambientais,  
Químicas e Farmacêuticas da  
Universidade Federal de São Paulo –  
Campus Diadema.

Orientador: Prof. Dr. Wagner Luiz Batista

Diadema  
Setembro/2021

### Dados Internacionais da Catalogação na Publicação (CIP)

Barros, Yasmin Nascimento de

Avaliação do papel da hipóxia da modulação da parede celular do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* / Yasmin Nascimento de Barros – Diadema, 2021.

85f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –  
Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema, 2021.

Orientador: Wagner Luiz Batista

1. *Paracoccidioides brasiliensis*. 2. Hipóxia. 3. Parede celular. 4. B-glucana. 5. cAMP/PKA.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS AMBIENTAIS, QUÍMICAS E FARMACÊUTICAS**

**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Chefe do Departamento:** Dr. Luiz Elidio Gregorio

**Coordenador do Curso de Pós-Graduação:** Dr. João Paulo dos Santos Fernandes

**Vice-Coordenadora do Curso de Pós-Graduação:** Dra. Daniela Oliveira de Melo

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Celular e Bioquímica de Fungos e Protozoários da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, Campus Diadema.

Recebeu apoio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Processo: 2017/04592-0), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Processo 141726/2017-2) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) – Código de financiamento 001.

*A Nelmário, Cleya, Yvia e Samuel  
por todo incentivo, apoio, carinho e cuidado*

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador, Dr. Wagner Luiz Batista, pela dedicação, cuidado e principalmente por seus ensinamentos que foram de grande valia para meu desenvolvimento e aprendizado. Meus sinceros respeito e admiração.

À Dra. Cristina Nakayama e seu aluno Vitor Vital, por toda ajuda na padronização da atmosfera com baixas concentrações de oxigênio. Agradeço também pela disponibilidade do laboratório e dos equipamentos necessários para o desenvolvimento do projeto.

À Dra. Patrícia Xander, por sua ajuda nos experimentos de citometria de fluxo. Sua tranquilidade, paciência e amor pelo que faz é inspirador.

À Marina Valente Navarro, pelos ensinamentos, por toda parceria e tempo dedicado a me ajudar, seja dentro ou fora do laboratório. Obrigada por estar sempre presente e me acolher tão bem.

Aos meus queridos amigos Wilson Dias Segura e Beatriz Furue, por toda ajuda, carinho, cuidado e pela amizade que construímos.

Aos integrantes e ex-integrantes do laboratório pela convivência e colaborações: Talita Dupin, Andreza Ueoka, Natasha Reis, Paula Meneghetti, Rafael Pedro Madeira, Rafael Souza, Rogéria Zauli, Richard Maciente, Ivy Martins, Aline Moraes e Pedro Henrique Manfio.

As queridas professoras e pesquisadoras do laboratório Dra. Ana Cláudia Trocoli Torrecilhas e Dra. Patrícia Santos Lopes pela convivência e por todos os ensinamentos.

Aos professores Dra. Renata Pascon, Dr. Marcelo Vallim, Dra. Karen Spadari Ferreira e Dra. Suzan Pantarotto por estarem sempre dispostos a ajudar na solução

de problemas durante os experimentos. Além da disponibilidade de equipamentos e materiais que foram essenciais para o desenvolvimento deste estudo.

Aos meus pais, irmã e toda minha família pelo apoio, incentivo, compreensão e também pelo apoio financeiro durante todo o longo período em que estive sem bolsa. Obrigada por acreditar e investir em mim, sem vocês não seria possível.

Ao meu namorado Samuel Rocha Silva que foi meu maior companheiro nessa jornada, longe de nossas famílias, cuidamos um do outro nos momentos difíceis e compartilhamos juntos os momentos de alegria.

Ao meu grande professor e orientador da graduação, Dr. Alfredo Dias que me encorajou a dar esse grande passo. Obrigada por cada conversa, conselhos e por todo carinho e cuidado que você tem por mim.

Por fim, agradeço a CAPES, CNPq e à FAPESP pelo financiamento do trabalho.

## RESUMO

Fungos termodimórficos do gênero *Paracoccidioides* são os agentes etiológicos da paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica com ocorrência na América Latina. A interação entre *Paracoccidioides* spp. e seu ambiente extracelular, são de grande importância para o sucesso do estabelecimento do fungo no hospedeiro. Embora os fungos patogênicos respondam a diferentes estresses, tais como: altas temperaturas, ROS/RNS, alterações de pH e limitação de macro e micronutrientes, pouco se conhece sobre como os fungos patogênicos humanos respondem à limitação de oxigênio, particularmente quando condições hipóxicas são encontradas no tecido hospedeiro. Neste sentido, o objetivo do trabalho é avaliar a modulação dos componentes da parede celular de *Paracoccidioides brasiliensis* em resposta a ambientes com baixas concentrações de oxigênio. Os resultados demonstram um aumento viabilidade de *P. brasiliensis* quando incubado a baixas concentrações de oxigênio. Além disso, genes envolvidos na síntese de  $\alpha$ -glucana aumentaram ao mesmo tempo que genes relacionados a síntese de  $\beta$ -glucana reduzem sua expressão relativa em resposta a hipóxia. Ensaio de interação entre  $\beta$ -glucana e Dectina-1 por citometria de fluxo demonstrou que em baixas concentrações de oxigênio, há uma redução da interação entre  $\beta$ -glucana e seu receptor. Além disso, Leveduras de *P. brasiliensis* apresentam uma resistência à fagocitose quando submetido à hipóxia. Em adição, a via de cAMP-PKA não parece estar envolvida na modulação dos componentes de parede celular de leveduras de *P. brasiliensis* sob baixas concentrações de oxigênio. Por fim, as leveduras submetidas a hipóxia apresentaram uma menor suscetibilidade ao antifúngico fluconazol. Em conjunto, os resultados encontrados nesse trabalho sugerem uma modulação da parede celular do fungo patogênico *P. brasiliensis* em resposta à hipóxia.

**Palavras chaves:** 1. *Paracoccidioides brasiliensis*, 2. Hipóxia, 3. Parede celular, 4.  $\beta$ -glucana, 5. cAMP/PKA.

## ABSTRACT

Thermodimorphic fungi of the genus *Paracoccidioides* are the etiologic agents of paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic mycosis occurring in Latin America. The interaction between *Paracoccidioides* spp. and extracellular environment, have great importance for the successful establishment of the fungus in the host. Although pathogenic fungi respond to different stresses, such as high temperatures, ROS/RNS, pH changes and macro and micronutrient limitations, little is known about how human pathogenic fungi respond to oxygen limitation, particularly when hypoxic conditions are encountered in the host tissue. In this sense, the objective of the work is to evaluate the modulation of the cell wall components of *Paracoccidioides brasiliensis* in response environments with low concentrations of oxygen. In view of the studies being conducted, the partial results demonstrate an increased viability of *P. brasiliensis* when incubated at low oxygen concentrations. In addition, genes involved in the synthesis of  $\alpha$ -glucan increased at the same time that genes related to  $\beta$ -glucan synthesis reduced their relative expression in response to hypoxia. Interaction assay between  $\beta$ -glucan and Dectin-1 by flow cytometry demonstrated that at low oxygen concentrations, there is a reduction in the interaction between  $\beta$ -glucan and its receptors. In addition, *P. brasiliensis* yeasts show resistance to phagocytosis when submitted to hypoxia. Finally, the cAMP-PKA pathway does not appear to be involved in the modulation of cell wall components of *P. brasiliensis* yeasts under low oxygen concentrations. Finally, the yeasts submitted to hypoxia showed a lower susceptibility to the antifungal fluconazole. Together, the results found in this work suggest a modulation of the cell wall of the pathogenic fungus *P. brasiliensis* in response to hypoxia.

**Key words** 1. *Paracoccidioides brasiliensis*, 2. Hypoxia, 3. Cell Wall, 4.  $\beta$ -glucan, 5. cAMP/PKA.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática da parede celular das espécies de <i>Paracoccidioides</i> .....	22
<b>Figura 2.</b> Perfil de sensibilidade à hipóxia em leveduras de <i>P. brasiliensis</i> .....	41
<b>Figura 3.</b> Suscetibilidade de células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i> a condição de hipóxia.. ..	42
<b>Figura 4.</b> Perfil de crescimento de <i>P. brasiliensis</i> na presença de agentes perturbadores da parede celular.. ..	44
<b>Figura 5.</b> Análise da expressão genes envolvidos na morfogênese da parede celular de <i>P. brasiliensis</i> crescido em condições de hipóxia.....	47
<b>Figura 6.</b> Análise da expressão de genes envolvidos na síntese de quitinas e ergosterol de <i>P. brasiliensis</i> crescido em condições de hipóxia. ....	49
<b>Figura 7.</b> Análise de citometria de fluxo de leveduras de <i>P. brasiliensis</i> submetido a condição de hipóxia. ....	51
<b>Figura 8.</b> Quantificação de componentes de parede de <i>P. brasiliensis</i> após incubação em baixas concentrações de oxigênio. ....	52
<b>Figura 9.</b> Atividade de PKA e dosagem de cAMP em leveduras de <i>P. brasiliensis</i> em resposta a hipóxia.....	54
<b>Figura 10.</b> Leveduras de <i>P. brasiliensis</i> cultivadas em condições de hipóxia são mais resistentes a fagocitose. ....	56
<b>Figura 11.</b> Perfil de suscetibilidade antimicrobiano em leveduras de <i>P. brasiliensis</i> cultivadas em condições de hipóxia.....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – Graus Celsius

**cAMP** – Monofosfato Cíclico de Adenosina

**CLRs** – Receptores de Lectina do tipo C

**DNA** – Ácido desoxirribonucléico

**dNTP** – Desoxirribonucleotídeo 5' trifosfato

**EDTA** – Ácido etilenodiamino tetracético

**H** – Hora

**H<sub>2</sub>O** – Água

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Péroxido de hidrogênio

**mg** – Miligrama

**min** – Minuto

**mL** – Mililitro

**mM** – Milimolar

**NOD** – Poteínas de Ligação ao Domínio da Oligomerização

**PAMPs** – Padrões Moleculares Associados a Patógenos

**PCM** – Paracoccidiodomicose

**PCR** – Reação em cadeia da polimerase

**pH** – Potencial de hidrogênio

**PKA** – Proteína Quinase A

**PRRs** – Receptores de Reconhecimento de Padrões

**RNA** – Ácido Ribonucleico

**RNS** – Espécie Reativa de Nitrogênio

**ROS** – Espécie Reativa de Oxigênio

**Rpm** – Rotação por minuto

**SREBP** – Proteínas de Ligação a Elemento Regulador de Esterol

**TLR** – Receptores Toll-*like*

**UFC** – Unidades Formadoras de Colônias

**µL** – Microlitro

$\mu\text{M}$  – Micromolar

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	10
1.1. Paracoccidioidomicose (PCM).....	10
1.2. <i>Paracoccidioides</i> spp.....	14
1.3. Relação parasita hospedeiro .....	15
1.4. A parede celular e a transição dimórfica de fungos do gênero <i>Paracoccidioides</i> .....	21
1.5. Adaptação a ambientes com baixas concentrações de oxigênio e a modulação da parede celular .....	23
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	27
2.1. Objetivo geral .....	27
2.2. Objetivos específicos .....	27
<b>3. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS</b> .....	28
3.1. Isolado de <i>P. brasiliensis</i> (Pb18) .....	28
3.2. Condições de crescimento de <i>P. brasiliensis</i> em cultivo de hipóxia .....	28
3.3. Ensaio de viabilidade celular .....	28
3.4. Ensaio de sensibilidade de leveduras de <i>P. brasiliensis</i> à hipóxia.....	29
3.5. Ensaio de suscetibilidade a agentes perturbadores da síntese da parede celular.....	29
3.6. Extração de RNA de <i>P. brasiliensis</i> .....	30
3.7. Tratamento do RNA com DNase .....	31
3.8. Síntese de cDNA.....	31
3.9. Análise quantitativa por PCR em tempo real (qPCR) .....	31

3.10. Ensaio de exposição de $\beta$ -glucana na parede celular de <i>P. brasiliensis</i> por citometria de fluxo .....	34
3.11. Quantificação de quitina e manana na parede celular de <i>P. brasiliensis</i> por citometria de fluxo .....	35
3.12. Ensaio de fagocitose in vitro e avaliação da carga fúngica (Unidade Formadora de Colônia - UFC) .....	36
3.13. Atividade de PKA .....	36
3.14. Dosagem de cAMP .....	37
3.15. Ensaio de acúmulo de glicogênio .....	37
3.16. Ensaio de sensibilidade a antifúngico .....	38
3.17. Análise dos Resultados .....	39
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>
4.1 Viabilidade do fungo patogênico <i>P. brasiliensis</i> em resposta à hipóxia .....	40
4.2. Agentes perturbadores de parede celular e o crescimento do fungo submetido a ambientes com baixas concentrações de oxigênio .....	42
4.3 Modulação da expressão de genes da parede celular de <i>P. brasiliensis</i> .....	45
4.4 Modulação dos componentes parede de leveduras de <i>P. brasiliensis</i> em resposta à hipóxia .....	49
4.5. Regulação da via cAMP-PKA e acúmulo de glicogênio em leveduras de <i>P. brasiliensis</i> quando submetido a hipóxia .....	53
4.6. Suscetibilidade de células fúngicas à resposta imunológica em condição de hipóxia .....	54
4.7. Perfil de suscetibilidade a antifúngico em leveduras de <i>P. brasiliensis</i> submetidas à hipóxia .....	56
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>59</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>68</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>69</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Paracoccidioidomicose (PCM)

Fungos do gênero *Paracoccidioides* são os agentes etiológicos da paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica com ocorrência na América Latina e que afeta principalmente os trabalhadores rurais (CHAVES et al., 2021). A manipulação do solo contaminado levam trabalhadores agrícolas a exposição a aerossóis contendo partículas fúngicas que são inaladas e podem levar ao desenvolvimento da doença (COLOMBO et al., 2011). No Brasil, a incidência de PCM varia de 1 a 3 novos casos por 100.000 habitantes/ano. O país é responsável por 80% dos casos, sendo que os estados de São Paulo, Paraná, Goiás e Rondônia possuem o maior número de casos relatados (MARTINEZ, 2017). Nos últimos anos tem-se observado aumento de relatos de casos nas regiões centro-oeste e norte, com microepidemias em diferentes regiões do Brasil. Fatores ambientais, decorrentes da abertura de novas fronteiras agrícolas com a derrubada de florestas contribuíram para o atual panorama desta micose (MILLINGTON et al., 2018). A regiões Norte, Sul e Sudeste possuem o maior índice de mortalidade e hospitalizações (CHAVES et al., 2021). Na região de Ribeirão Preto, Sudeste do país, a incidência de casos entre os anos de 1980 e 1999 foi de 1,5 a 3,7 por 100.000 habitante/ano (MARTINEZ, 2017; VIEIRA et al., 2014). Em Rondônia, região Norte, 30 a cada 100.000 habitantes foram diagnosticados com PCM no período de 1997 e 2012 (VIEIRA et al., 2014). Durante um período de 18 meses, 102 casos de PCM foram diagnosticados no estado do Pará, localizado no Sul do Brasil (MARQUES, 2013). Até o ano de 2020 a PCM não era uma doença de notificação compulsória, o que dificultava o conhecimento da sua real prevalência e incidência. Entretanto, a partir da Portaria Nº 264, de 17 de fevereiro de 2020, Artigo 1º, a PCM passou a fazer parte da Lista Nacional de Notificação

Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde Pública (LDNC). Espera-se que a partir de agora os dados epidemiológicos sejam mais precisos em relação a prevalência e incidência da PCM no país.

Além do Brasil, a PCM é uma doença distribuída em diversos países da América Latina, como: Peru, Uruguai, Paraguai, Argentina, Colômbia, Equador e México (CHAVES et al., 2021). Casos importados de pacientes residentes ou que visitaram área endêmicas também foram relatados em países como Áustria, Japão, Espanha, Itália, Portugal, França, Bulgária, entre outros (FERREIRA et al., 2018; VAN DAMME et al., 2006; WAGNER et al., 2021). Esta micose representa um importante problema de Saúde Pública devido ao seu alto potencial incapacitante e a quantidade de mortes prematuras que provoca principalmente para segmentos sociais específicos, como os trabalhadores rurais (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

A PCM já foi identificada em animais domésticos e selvagem, principalmente em tatus, animais que vivem em tocas subterrâneas. Apesar de não ter sido isolado da natureza, acredita-se que o solo é a principal forma de infecção, tanto para humanos quanto para animais (FRANCO et al., 2000). Diante disso, as atividades que envolvem o manejo do solo são os maiores fatores de risco para contaminação em humanos (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

PCM é doença granulomatosa caracterizada pelo polimorfismo de lesões, as quais podem afetar vários órgãos, em particular pele, linfonodos, pulmão, mucosas oral, nasal e gastrointestinal, glândulas supra-renais e o sistema nervoso central (ALMEIDA, 2005). Embora exista grande variação quanto à evolução da PCM de um indivíduo para outro, duas manifestações clínicas principais estão bem estabelecidas: a forma aguda ou subaguda (juvenil) e a forma crônica (adulto) (BOCCA et al., 2013; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

A forma juvenil é mais comum em pacientes imunocomprometidos (DA SILVA et al., 2016), entretanto pode acometer crianças, adolescentes e adultos de até 30 anos, onde os indivíduos podem apresentar presença de lesões, perda de peso, linfonodos aumentados e o acometimento de diversos órgãos. Nos adultos acima de 30 anos, a forma clínica predominante é a crônica, que possui progressão lenta, podendo permanecer latente por anos até que se manifeste. Quando a PCM não é diagnosticada e tratada adequadamente, o indivíduo pode apresentar formas disseminadas graves e letais, com rápido e progressivo envolvimento dos pulmões, tegumento, gânglios, baço, fígado e órgãos linfóides (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

Apesar de não haver diferença na suscetibilidade entre homens e mulheres, a distribuição por sexo é uma característica importante da doença no qual a proporção de homens que desenvolvem a doença e relação as mulheres é de 13:1 (QUEIROZ-TELLES; ESCUISSATO, 2011; RESTREPO et al., 2008; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). A presença de receptores de membrana de  $17\beta$ -estradiol, inibem a transição de *P. brasiliensis* da forma de micélio (infectante), para a forma de levedura (patogênica), etapa importante para o desenvolvimento da doença. Devido a isso, mulheres possuem uma proteção maior que os homens em relação ao desenvolvimento da doença, mas, quando se trata de infecção, o risco entre indivíduos do sexo masculino e feminino é o mesmo (RESTREPO et al., 1984; SHANKAR et al., 2011). Em contrapartida, mulheres na infância, menopausa ou que possui algum tipo de deficiência hormonal, podem desenvolver a doença devido a deficiência de  $17\beta$ -estradiol (DOS SANTOS; MAIA; GOLDANI, 2004).

Em relação ao diagnóstico clínico, ainda é muito difícil identificar a doença devido a sinais e sintomas que se assemelham a tuberculose, histoplasmose,

neoplasia, linfoma de Hodgkin, doença de Crohn e dentre outras diversas condições patológicas, o que dificulta o diagnóstico clínico. Diante disso, o diagnóstico diferencial se torna importante, principalmente em pacientes que vivem em regiões endêmicas e/ou imunossuprimidos (CHAVES et al., 2021). Para tanto, além da suspeita de PCM, o diagnóstico diferencial leva em consideração a suspeita de tuberculose, histoplasmose, coccidioidomicose, blastomicose, linfoma, sífilis e leishmaniose (BONIFAZ; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ; PERUSQUÍA-ORTIZ, 2011; CHAVES et al., 2021).

O método referência de diagnóstico laboratorial de PCM é o isolamento de leveduras de *P. brasiliensis* de material clínico como escarro e/ou tecidos *in vitro*. Além disso, pode ser feito a identificação microscópica de células leveduriformes de *P. brasiliensis*, na qual é possível visualizar uma parede celular espessa com múltiplos brotamentos no formato de “Roda de Leme” ou “*Mickey Mouse*” que medem cerca de 5–15 µm (RODRIGUES et al., 2020). O diagnóstico da doença também pode ser feito utilizando os testes sorológicos como ELISA, *imunoblotting*, imunodifusão (TABORDA; TRAVASSOS; BENARD, 2021). A glicoproteína de 43 kDa, a Gp43 (PUCCIA et al., 1986), é um antígeno primário muito utilizado nos teste sorológicos para detectar anticorpos circulantes, entretanto, não é sensível para *P. lutzii*, possuindo alta sensibilidade apenas para *P. brasiliensis* (DE CAMARGO, 2008; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

Em relação ao tratamento, os fungos do gênero *Paracoccidioides* são sensíveis a diversas classes de antifúngicos, como: azóis, sulfonamidas e polienos (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). Entretanto, para casos leves e moderados, o itraconazol é a farmacoterapia de escolha para PCM. Quando o itraconazol não pode ser utilizado, devido a sua interação com diversos medicamentos, a associação entre

sulfametoxazol e trimetopima (Cotrimoxazol) pode ser a segunda escolha para o tratamento da PCM. Os casos graves, além do uso do itraconazol ou cotrimoxazol, também é recomendado uma farmacoterapia prolongada com Anfotericina B. O tempo de tratamento varia de acordo com a medicação e com o desenvolvimento da doença, podendo durar de 9 a 24 meses (DO CARMO SILVA et al., 2020; TABORDA; TRAVASSOS; BENARD, 2021).

## 1.2. *Paracoccidioides* spp.

O agente etiológico da PCM foi descrito em 1908 por Adolpho Lutz (LUTZ, 1908), após examinar lesões orais em 2 pacientes, classificando como hifoblastomicose pseudococcídica. Entretanto, apenas no ano de 1903 foi denominado *Paracoccidioides brasiliensis* por Floriano de Almeida, o primeiro pesquisador a isolar o fungo (LACAZ, 1994). O gênero *Paracoccidioides* é composto por 5 espécies: *P. brasiliensis*, *P. lutzii*, *P. venezuelensis*, *P. restrepiensis* e *P. americana* (TURISSINI et al., 2017) e são classificados taxonomicamente como pertencentes ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Eurotiomycetes, ordem Onygenales, família Ajellomycetaceae, gênero *Paracoccidioides*.

Os *Paracoccidioides* spp são fungos termodimórficos, que se apresentam na forma de: i) micélio, quando saprófitas no ambiente, ou então cultivado em temperaturas inferiores a 28°C, ou ii) levedura, quando encontrado nos tecidos dos hospedeiros infectados ou cultivados a 36°C (BAGAGLI et al., 2006). Diante disso, o dimorfismo termo-dependente é essencial para a patogenicidade fúngica e o desenvolvimento da doença (ARANTES et al., 2015). Em relação as características macroscópicas, a forma de micélio possui bordas irregulares e aspecto esbranquiçado ou marrom. As características microscópicas são filamentos alongados de hifas hialinas septadas, ramificadas e multinucleadas. Macroscopicamente, as leveduras

possuem bordas irregulares, com aspecto cerebriforme e coloração creme. Ao microscópio, apresenta-se de forma esférica, oval ou alongada, multinucleada e com multibrotamentos (LACAZ, 1994; SAN-BLAS, 1993; TABORDA; TRAVASSOS; BENARD, 2021).

A infecção ocorre pela inalação de conídios e/ou propágulos do fungo presentes no solo, os quais se diferenciam em levedura nos pulmões do hospedeiro, estabelecendo assim a infecção (MARTINEZ, 2017). A transição dimórfica e a interação com as proteínas da matriz extracelular (ECM) e a imunidade celular do hospedeiro mediada por células do sistema imune inato e adaptativo são as primeiras etapas para o início da relação patógeno-hospedeiro, e nesse processo estão envolvidos fatores de virulência fúngica, adaptação, adesão e invasão. O desenvolvimento da paracoccidiodomicose vai depender do estado imunológico do hospedeiro e da sua resposta frente ao patógeno (GIUSIANO, 2021).

### **1.3. Relação parasita hospedeiro**

A interação entre *Paracoccidioides* spp. e seu ambiente extracelular, seja em seus estágios de vida livre ou dentro do hospedeiro, tem impulsionado a evolução molecular desses fungos, particularmente nos componentes microbianos envolvidos na virulência (MATUTE et al., 2008). No entanto, a virulência não é uma propriedade microbiana independente porque não pode ser definida independentemente de um hospedeiro. A virulência é o resultado da interação entre um hospedeiro e um microrganismo, onde o hospedeiro tem como objetivo controlar efetivamente possíveis danos que podem ser causados pelo patógeno. Assim, no contexto da “estrutura de resposta a danos”, um fator de virulência é um componente microbiano que pode danificar um hospedeiro suscetível (CASADEVALL; PIROFSKI, 2009).

Os fungos são capazes sintetizar várias substâncias que são importantes na relação parasita-hospedeiro. O gênero *Paracoccidioides* spp. possuem mecanismos adesão e invasão essenciais na adaptação ao estresse gerado nos tecidos do hospedeiro (MENDES-GIANNINI et al., 1994, 2000). A colonização desses tecidos é um processo complexo que geralmente envolve um ligante do patógeno e um receptor da célula hospedeira. O colágeno, fibronectina, laminina são proteínas da matriz extracelular (MEC) presentes no tecido do hospedeiro no qual o microrganismo pode interagir (DE OLIVEIRA et al., 2015; MENDES-GIANNINI et al., 2006). Células leveduriformes de *Paracoccidioides* spp., com auxílio de moléculas de adesinas, como gp43 (glicoproteína de 43 kDa), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), trifosfato isomerase, malato sintase, isocitrato liase e 14-3-3, são capazes de reconhecer componentes da matriz extracelular do hospedeiro. As adesinas atuam na invasão tecidual e disseminação de microrganismos, possuindo um papel importante no processo de patogenicidade do *Paracoccidioides* spp (DE OLIVEIRA et al., 2015). Os padrões de virulência de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* foram comparados com o perfil de adesão, sendo possível observar maiores taxas de adesão aos componentes da matriz extracelular, maiores níveis na expressão de adesinas e maior virulência do *P. brasiliensis* em relação ao *P. lutzii*. Durante a interação patógeno-hospedeiro as adesinas mais expressas foram a enolase e a proteína 14-3-3. Além disso, a inibição dessas adesinas prejudicou a virulência fúngica (PUCCIA; VALLEJO; LONGO, 2016).

A transição dimórfica, mais especificamente da forma miceliana para a forma leveduriforme, é essencial para o desenvolvimento da doença em *P. brasiliensis* (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). Durante a transição acontecem alterações morfológicas e da composição da parede celular que fungo utiliza como estratégia para evadir da resposta imunológica (GIUSIANO, 2021). Para tanto, diversas

proteínas participam desse processo de transição. A GTPase RAS é uma proteína que desempenha um papel importante em outros diversos processos celulares, como: síntese de cAMP, diferenciação e morfogênese celular, organização do citoesqueleto e expressão de genes de virulência (WANG et al., 2004). Em *P. brasiliensis* a manutenção da fase leveduriforme parece ser dependente da atividade da GTPase RAS, possuindo um importante papel na interação patógeno-hospedeiro (FERNANDES et al., 2008). Outra proteína capaz de induzir modulação da resposta imune do hospedeiro é a Paracoccina (PCN), uma proteína fúngica de múltiplos domínios com atividades tanto lectina quanto enzimática (COLTRI et al., 2006; PITANGUI et al., 2020). O silenciamento da PCN tornou as leveduras de *P. brasiliensis* menos resistentes à atividade fungicida dos macrófagos, levou à agregação de células fúngicas e bloqueou a transição morfológica da levedura para o micélio, demonstrando ser um potencial fator de virulência fúngica (FERNANDES et al., 2017).

O sucesso da remoção microbiana após uma invasão no hospedeiro mamífero depende de sua imunidade celular, mediada pelas células dos sistemas inato e adaptativo (THIND; TABORDA; NOSANCHUK, 2015). Uma resposta inicial envolve células dendríticas, macrófagos, monócitos, linfócitos T e B, células NK (natural killers) e neutrófilos polimorfonucleados (PMN) (SANTOS et al., 2020b). Quando a forma saprofítica atinge os alvéolos pulmonares do hospedeiro após a inalação, ocorre a transição dimórfica e o início da resposta imune do hospedeiro com a ativação de fagócitos que tem o objetivo de eliminar o patógeno (GIUSIANO, 2021). Para tanto, o *Paracoccidoides* spp. possui seus próprios determinantes virulentos (CAMACHO; NIÑO-VEGA, 2017), e utiliza de várias estratégias e mecanismos para se adaptar ao ambiente estressor, como por exemplo: modular a apoptose do hospedeiro (ACORCI et al., 2009), realizar adaptações metabólicas e a expressão de genes para atingir um

“modo de inanição”, como o aumento da síntese de glicose por gliconeogênese e produção de etanol (LIMA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2021), degradação de aminoácidos e utilização de ácidos graxos por beta-oxidação (CHAVES et al., 2019; GIUSIANO, 2021; OLIVEIRA et al., 2021). As células leveduriformes de *Paracoccidoides* spp. conseguem sobreviver dentro das células fagocíticas, como parasita intracelular facultativo (BRUMMER et al., 1989) e utiliza-se dessa habilidade para se transportar para outros órgãos por via circulatória, mecanismo conhecido como “Cavalo de Tróia” (GIUSIANO, 2021).

O reconhecimento de antígenos fúngicos como quitina,  $\beta$ -glucanas e mananas por células do sistema imune também é importante para o início da resposta imune inata (THIND; TABORDA; NOSANCHUK, 2015). Esses antígenos fúngicos são conhecidos como padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), que são reconhecidos pelas células do sistema imune inato através de receptores, chamados de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como os receptores Toll-like (TLR), proteínas de ligação ao domínio da oligomerização (NOD-) e receptores da lectina do tipo C (CLRs) (CALICH et al., 2008). Os CLRs conseguem reconhecer as  $\beta$ -glucanas e mananas encontradas na parede celular dos fungos, induzindo uma resposta imune pró-inflamatória, como a fagocitose, estresse oxidativo, produção de citocinas e quimiocinas a partir de células efectoras inatas e a ativação da imunidade adaptativa (GOYAL et al., 2018). A Dectina-1 é um CLR importante no reconhecimento específico de  $\beta$ -glucanas, um polissacarídeo presente na parede celular de *P. brasiliensis* (PUCCIA; VALLEJO; LONGO, 2016). A síntese de  $\alpha$ -glucana para mascarar a exposição de  $\beta$ -glucanas na parede celular de patógenos fúngicos é uma forma de se esconder da imunidade inata (WAGENER; STRIEGLER; WAGENER, 2020).

Em um estágio tardio, uma resposta efetiva das células T deve levar à geração de citocinas Th1, como fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interferon gama (IFN- $\gamma$ ), resultando em uma ativação clássica de macrófagos para produzir espécies reativas de espécies (ROS) e nitrogênio (RNS) que matam fungos ou inibem seu crescimento (GAUTHIER; KLEIN, 2008; THIND; TABORDA; NOSANCHUK, 2015). No entanto, o fungo tenta resistir à morte por meio da montagem de respostas robustas de estresse oxidativo e nitrosativo que podem promover a sobrevivência dos fungos (CASTILHO et al., 2018; MIRAMÓN; KASPER; HUBE, 2013; PARENTE-ROCHA et al., 2018; PARENTE et al., 2015; PATTERSON et al., 2013). O estresse oxidativo e nitrosativo desencadeia mudanças na expressão gênica importantes para a expressão de virulência fúngica e patogenicidade, como a expressão de superóxido dismutases (SODs), sistema glutational/tiorredoxina, peroxidase do citocromo C (CCP) e catalases (CATs) (PARENTE et al., 2015; TAMAYO et al., 2017). O sistema de defesa de *P. brasiliensis* é eficaz contra ROS e RNS geradas pelo hospedeiro (CAMACHO; NIÑO-VEGA, 2017; CASTILHO et al., 2018), podendo até se beneficiar desse ambiente utilizando essas moléculas para auxiliar em seu crescimento e proliferação (HANIU et al., 2013; CHAVES et al., 2017; NAVARRO et al., 2020).

A formação do granuloma também é uma resposta imunológica importante do hospedeiro contra o fungo (TRISTÃO et al., 2017). O granuloma foi descoberto primeiro em pulmões tuberculosos, sendo associado posteriormente a outras condições inflamatórias, podendo ser infecciosas ou não infecciosas (PAGÁN; RAMAKRISHNAN, 2018). A forma crônica e grave da PCM apresenta granulomas soltos com lesões multifocais e disseminada. Já na forma leve, as lesões são caracterizadas por granulomas unifocais e localizados (DE CAMARGO; DE FRANCO, 2000). A função do granuloma é promover a exposição do patógeno a ambientes

estressores, como pH ácido, restrição de oxigênio e nutrientes, com o objetivo de inibir o crescimento e replicação fúngica (HENINGER et al., 2006; TSAI et al., 2006). No entanto, o patógeno pode se abrigar no granuloma como forma de se proteger da destruição pelo hospedeiro (CHAN; FLYNN, 2004), sua persistência no interior do granuloma está relacionado com recidivas da doença (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

A formação do granuloma acontece devido ao estímulo persistente de patógenos ao hospedeiro (RAMAKRISHNAN, 2012). O granuloma é caracterizado por um agregado compacto de células maduras, circundado por fibroblasto e colágeno (KETELUT-CARNEIRO et al., 2019). Durante o processo de maturação do granuloma, citocinas e quimiocinas produzidas por macrófagos infectados levam ao recrutamento de fagócitos e linfócitos (TRISTÃO et al., 2017). Uma citocina importante nesse processo é a TNF- $\alpha$  (EGEN et al., 2008). O estudo de Souto et al. (2000) demonstrou que camundongos deficientes de TNF- $\alpha$  são altamente suscetíveis à infecção por *P. brasiliensis*, não sendo capazes de formar granulomas organizados, apresentando uma alta carga fúngica nas lesões e alta taxa de mortalidade (SOUTO et al., 2000). A resposta T helper 1 (Th1) está associada à resistência a infecção por induzir a ativação de macrófagos, que por sua vez, controlam o crescimento fúngico (TRISTÃO et al., 2017), enquanto a suscetibilidade está associada a um desequilíbrio na resposta Th2 (KETELUT-CARNEIRO et al., 2019). A interleucina-17 (IL-17) exerce um papel importante na infecção por *P. brasiliensis*, uma vez que células que expressam IL-17, como os linfócitos Th17, foram encontradas dentro e ao redor dos granulomas de pacientes diagnosticados com PCM (PAGLIARI et al., 2011).

Diante de todo o exposto, a modulação da parede celular de *P. brasiliensis* é de extrema importância para o reconhecimento imunológico e adaptação das células

fúngicas ao ambiente estressor gerado pelo hospedeiro. Nesse processo estão envolvidos diversos mecanismos que auxiliam nessa adaptação, principalmente na modulação de açúcares de parede que já se demonstraram essenciais na evasão da resposta imunológica (PUCCIA et al., 2011; PUCCIA; VALLEJO; LONGO, 2016).

#### **1.4. A parede celular e a transição dimórfica de fungos do gênero *Paracoccidioides***

A interação entre o patógeno e o hospedeiro acontece devido aos componentes presentes na parede celular, por ser a camada mais externa das células fúngica. A parede celular dos *Paracoccidioides* é composta majoritariamente por polissacarídeos, contendo quantidade menores de proteínas, lipídeos e melanina (PUCCIA; VALLEJO; LONGO, 2016). As glucanas são um dos principais constituintes da parede celular dos fungos e, dependendo da espécie, podem estar na conformação  $\alpha$  ou  $\beta$ , e ainda podendo ser formado entre os átomos de carbono 1,3; 1,4 ou 1,6 das piranoses (anel de seis membros contendo em cinco átomos de carbono e um átomo de oxigênio). São essas ligações que definem as propriedades físicas das macromoléculas de glucana, influenciando na estrutura rigidez e elasticidade da parede celular (WAGENER; STRIEGLER; WAGENER, 2020). A quitina também é um importante componente da parede celular dos fungos, é um polissacarídeo feito de resíduos de N-acetilglucosamina (NINO-VEGA et al., 2000). As melaninas, pigmentos de carga negativa, também são encontradas na parede celular fúngica, possuindo um papel importante na proteção contra o hospedeiro (PUCCIA; VALLEJO; LONGO, 2016).

Estruturalmente, nas leveduras, esses polissacarídeos estão organizados da seguinte forma: na superfície são encontradas galactomanas, compondo a camada fibrilar externa. Posteriormente são camadas de  $\alpha$ -glucanas mais externas e  $\beta$ -



possuem a capacidade de realizar a transição como mecanismo de defesa (NEMECEK; WÜTHRICH; KLEIN, 2006). Durante a transição dimórfica acontecem mudanças na composição da parede celular que são importantes para o processo de desenvolvimento da doença (DE CURCIO et al., 2018). Neste processo diferentes proteínas participam da transição de micélio para levedura e são importante para a virulência fúngica, como por exemplo a histidina quinase reguladora do dimorfismo (DRK1) e as proteínas de choque térmico (HSP) (CHAVES et al., 2016; NUNES et al., 2005). Além disso, a via de cAMP-PKA (Proteína quinase a dependente de monofosfato cíclico de adenosina) regula vários processos fisiológicos em organismos eucarióticos (CAO et al., 2017), sendo capaz de controlar a morfologia e patogenicidade de diversos fungos patogênicos (KLOSTERMAN et al., 2007; PRADHAN et al., 2018; ZHU et al., 2017). Em *P. brasiliensis* a transição dimórfica é regulada por cAMP (CHEN et al., 2007), enquanto em *P. lutzii* a transição de micélio para levedura foi comprometida pela inibição de PKA (SESTARI et al., 2018).

### **1.5. Adaptação a ambientes com baixas concentrações de oxigênio e a modulação da parede celular**

Embora os fungos patogênicos respondam a diferentes estresses, tais como: altas temperaturas, ROS/RNS, alterações de pH e limitação de macro e micronutrientes (BHABHRA; ASKEW, 2005; BOK; KELLER; TSITSIGIANNIS, 2009; CASTILHO et al., 2018; COONEY; KLEIN, 2008; HARTMANN et al., 2011; PARENTE et al., 2015; SHAPIRO; ROBBINS; COWEN, 2011), pouco se conhece sobre como os fungos patogênicos humanos respondem à limitação de oxigênio, particularmente quando condições hipóxicas são encontradas no tecido hospedeiro. A hipóxia (baixo nível de oxigênio) representa um estresse adicional ao qual os patógenos fúngicos são expostos no hospedeiro (GRAHL et al., 2012).

Poucos estudos avaliando a tolerância a hipóxia foram feitos em fungos do gênero *Paracoccidioides*. O estudo de Sano et al. (1991), avaliou o crescimento e patogenicidade de 6 isolados de *P. brasiliensis* em condições de hipóxia e anóxia. Desses 6, um total de 5 conseguiram crescer bem sob hipóxia, além disso, esses isolados resistentes a baixas concentrações de oxigênio demonstraram ter relação com a virulência e a patogenicidade. Em anaerobiose, 2 dos 6 isolados conseguiram crescer, dentre eles o isolado Pb18 (SANO et al., 1991).

O oxigênio é importante para a ligação de proteínas heme que participam de diversos processos biológicos. No estudo de Nojosa Oliveira et al. (2020), foi possível caracterizar a fungoglobina – FglA, uma heme proteína, que está envolvida na adaptação à hipóxia em leveduras de *P. brasiliensis* (NOJOSA OLIVEIRA et al., 2020). Uma vez que a adaptação da hipóxia é um fator importante para a virulência e patogenicidade de células fúngicas, Lima et al. (2015) conseguiu caracterizar a proteína *SRBA*, ortólogo da proteína de ligação do elemento regulador de esterol (*SREBP*), um regulador chave na modulação da resposta ao estresse causado por baixas concentrações de oxigênio (LIMA et al., 2015). Além disso, análises *in silico* demonstrou que os genes regulados por *SRBA* estão envolvidos em processos como: metabolismo, energia, morfogênese fúngica, defesa e virulência. O estudo também revelou a proteína *SRBA* como um potencial alvo antifúngico (DE SOUSA et al., 2021).

A *SREBP* foi caracterizada como sensível a hipóxia, além de controlar a homeostase de ergosterol (HUGHES; TODD; ESPENSHADE, 2005; TODD et al., 2006). A *SREBP* é uma proteína precursora não ativada sintetizada no retículo endoplasmático, possuindo um domínio N-terminal (fator de transcrição) e um domínio C-terminal que se liga a proteína sensora de esterol (*Scap*) formando o complexo *SREBP-Scap*, que fica retido no retículo endoplasmático. Em baixos níveis de esterol

ou de oxigênio, a proteína *Scap* sofre uma mudança conformacional, se transporta para o Golgi, com ajuda das vesículas COPII, onde é clivada e o domínio N-terminal (*SRE1*) é liberado e então translocado para o núcleo, promovendo a transcrição dos genes envolvidos na síntese de esteróis, além de genes responsivos ao oxigênio (MIAO et al., 2020).

O perfil de resposta a hipóxia tem sido estudado em diversos fungos (GRAHL et al., 2012). Particularmente, *C. albicans* apresenta uma resposta robusta à hipóxia (BURGAIN et al., 2020; SETIADI et al., 2006; STICHTERNOOTH; ERNST, 2009; SYNNOTT et al., 2010) e, conseqüentemente, esse fungo é capaz de colonizar nichos hipóxicos, como o trato gastrointestinal (MIRANDA et al., 2009; ROSENBACH et al., 2010), bem como nichos aeróbicos, como pele e mucosa. Já foi demonstrado que o mascaramento  $\beta$ -glucanas induzido por hipóxia atenua o reconhecimento fagocitário, captação e respostas de citocinas (PRADHAN et al., 2018). Em *Aspergillus* spp. a resposta a hipóxia se dá pela maior exposição de  $\beta$ -glucanas na parede celular desse fungo, gerando uma maior ativação da resposta imune (SHEPARDSON et al., 2013). Já em *C. albicans* foi possível identificar que a via de sinalização cAMP-PKA medeia o mascaramento  $\beta$ -glucana induzido por hipóxia (PRADHAN et al., 2018).

A via da cAMP-PKA desempenha um papel importante na morfogênese da levedura-hifa, na adaptação ao estresse e na integridade da parede celular em *C. albicans* (CAO et al., 2017; FANNING et al., 2012), *Cryptococcus neoformans* (ALSPAUGH et al., 2002), *Aspergillus fumigatus* (LIEBMANN et al., 2003), *Ustilago maydis* (KLOSTERMAN et al., 2007), *Magnaporthe grisea* (LIU et al., 2007) e *Paracoccidioides lutzii* (SESTARI et al., 2018). Esta via tem sido extensivamente estudada em *Saccharomyces cerevisiae*, estando associada ao crescimento celular, metabolismo e resistência ao estresse.

Recentemente, um estudo de proteômica identificou 216 proteínas diferencialmente expressas pelo fungo patogênico *P. brasiliensis* em resposta a hipóxia (OLIVEIRA et al., 2021). Os resultados sugerem que a glicose parece estar envolvida na produção de polímeros da parede celular. Além disso, também há uma modulação da membrana plasmática e da parede celular pelo aumento de ergosterol e glucanas. Em relação a obtenção de energia, fontes alternativas de carbono são ativadas, como as moléculas de acetato e etanol que parecem estar envolvidas no processo. O estudo também identificou mecanismos de desintoxicação para neutralizar o estresse oxidativo gerado pela hipóxia, para tanto o fungo regula proteínas como glutatona peroxidase (GPX), superóxido dismutase (SOD), citocromo c peroxidase (CCP) e peroxirredoxina (OLIVEIRA et al., 2021). Diante disso, baixas concentrações de oxigênio gera uma resposta importante de patógenos fúngicos em relação a modulação da parede celular e a resposta imune, no entanto, os dados sobre como *P. brasiliensis* responde a hipóxia ainda são muito limitados e mais estudos precisam ser feitos para elucidar esses mecanismos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar a modulação dos componentes da parede celular de *Paracoccidioides brasiliensis* em resposta a ambientes com baixas concentrações de oxigênio.

### **2.2. Objetivos específicos**

2.2.1 Avaliar a modulação da expressão dos genes envolvidos na síntese da parede celular de *P. brasiliensis* submetido a condições de hipóxia;

2.2.2 Avaliar a composição da parede celular de *P. brasiliensis* submetido em condições de normóxia e hipóxia;

2.2.3 Avaliar a participação da via cAMP-PKA na resposta da modulação da parede celular de *P. brasiliensis* submetido a condições de hipóxia;

2.2.4 Avaliar o índice fagocítico e o perfil de macrófagos incubados com *P. brasiliensis* previamente cultivados em condição de hipóxia e normóxia.

### **3. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS**

#### **3.1. Isolado de *P. brasiliensis* (Pb18)**

Neste trabalho foi utilizado o isolado Pb18 de *P. brasiliensis*, o qual foi cultivado em meio YPD modificado (mYPD) caldo (0,5% de extrato de levedura, 1% de peptona de caseína e 0,5% de dextrose), a 37°C sob agitação de 100-150 rpm. Para os ensaios realizados em meio sólido foi utilizado o mYPD acrescido de 2% de ágar. Após 3 ou 4 passagens em meio sólido, o isolado Pb18 (virulento) era utilizado para infectar camundongo e novamente re-isolado, para manutenção da virulência.

#### **3.2. Condições de crescimento de *P. brasiliensis* em cultivo de hipóxia**

As leveduras de *P. brasiliensis* foram cultivadas por 5-7 dias a 37°C em meio YPD modificado. As células foram submetidas à normóxia e hipóxia. Normóxia é considerada as condições atmosféricas normais do laboratório (~21% O<sub>2</sub>). Para as condições de hipóxia (1 a 2% de O<sub>2</sub>), as leveduras de *P. brasiliensis* foram incubadas a 37°C, em frasco de vidro devidamente esterilizados e protegidos por algodão hidrofóbico, na jarra de anaerobiose (Permuton) juntamente com uma vela acesa para consumo de O<sub>2</sub> (MAITI et al., 2013) pelo tempo determinado em cada experimento.

#### **3.3. Ensaio de viabilidade celular**

Células leveduriforme de Pb18 foram crescidas em mYPD pH 6,5 a 37°C de 4 a 6 dias sob agitação (150 rpm). Em seguida as células foram contadas em câmara de Neubauer e 1x10<sup>6</sup> células viáveis foram incubadas em baixas concentrações de oxigênio por 30 min, 1, 2, 5, 10 e 24 h. Após o tempo de incubação, as leveduras foram coradas com Azul de Tripano (*Trypan blue*) e feito a contagem de células vivas

e mortas em câmara de Neubauer para o cálculo de viabilidade celular utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Células viáveis}}{\text{Total de células}} \times 100$$

Além disso, após o tempo de incubação, cada cultura de levedura foi diluída em mYPD caldo (5, 10, 50, 100 e 1000 vezes) e 5 µL de cada diluição foi aplicada em mYPD ágar e crescidas por 7 dias a 37°C. Ao final do tempo de crescimento as placas foram fotografadas. Este ensaio foi realizado em triplicata biológica.

#### **3.4. Ensaio de sensibilidade de leveduras de *P. brasiliensis* à hipóxia**

A sensibilidade de células de *P. brasiliensis* em condição de hipóxia foi investigada utilizando o ensaio de *spots*, conforme descrito por Castilho e colaboradores (2018). Células leveduriforme ( $1 \times 10^6$ ) foram diluídas em série (5, 10, 50, 100 e 1000 vezes) em mYPD caldo e 5 µL de cada diluição foi aplicada em meio mYPD ágar. Para condição de hipóxia, as placas foram incubadas em jarra de anaerobiose por 7 dias a 37°C. Para normóxia, foram incubadas por 7 dias em estufa a 37°C. Ao final do experimento, as placas foram fotografadas. Este ensaio foi realizado em triplicata biológica.

#### **3.5. Ensaio de suscetibilidade a agentes perturbadores da síntese da parede celular**

Para avaliar a sensibilidade aos agentes perturbadores de parede celular em *P. brasiliensis* foi realizado o ensaio de *spots*. Leveduras de *P. brasiliensis* foram incubadas em baixa concentração de oxigênio com 5 e 24 h. Cada amostra foi diluída em série (5, 10, 50, 100 e 1000 vezes) em mYPD caldo e 5 µL de cada suspensão foi

aplicado em meio mYPD ágar suplementado com agentes perturbadores de parede celular, como Menadiona 10  $\mu$ M, SDS 0,001%, Calcofluor White (CFW) 5  $\mu$ g/mL, Congo Red (CR) 10  $\mu$ M e NaCl 150 mM e incubadas por 7 dias em estufa a 37°C. Após este período as placas foram fotografadas. Este ensaio foi realizado em triplicata biológica.

### **3.6. Extração de RNA de *P. brasiliensis***

As amostras de *P. brasiliensis* utilizadas para a extração de RNA total foram crescidas em condições de hipóxia, conforme descrito no item 3.2. O RNA total foi obtido utilizando o método do Trizol (Invitrogen), com modificações. Para tanto, as células fúngicas foram lisadas mecanicamente por agitação por pérolas de vidro durante 10 min na presença de 1,5 mL de Trizol. Após 10 min de repouso à temperatura ambiente, a mistura foi centrifugada (1.800 x g, por 10 min a 4°C) para a remoção dos fragmentos celulares. Para cada 0,75 mL de sobrenadante recuperado foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio e a mistura agitada vigorosamente. Após 10 min de repouso à temperatura ambiente, as fases foram separadas por centrifugação (1.800 x g, por 10 min a 4°C) e a fase aquosa extraída com igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (50:49:1, v:v:v). À fase aquosa final foi adicionado um volume de isopropanol e acrescentado citrato de sódio 1,2 N/cloreto de sódio 0,8 N (0,25 mL de solução para cada 0,75 mL de Trizol inicial) para a precipitação de RNA a -20°C por toda a noite. O precipitado foi recolhido por centrifugação (1.800 x g, por 10 min a 4°C), lavado com etanol 75%, seco e ressuspendido em água esterilizada. O RNA foi quantificado por espectrofotometria (NanoDrop 2000/2000c, Thermo Fisher Scientific), analisado em gel de agarose para verificar a integridade do material extraído, aliquoteado e armazenado a -80°C.

### 3.7. Tratamento do RNA com DNase

Após obtenção do RNA, quantidades idênticas das amostras que tiveram boa qualidade e estavam íntegras foram submetidas ao tratamento com DNase (Promega) para remoção de possível contaminação com DNA genômico. Para o tratamento, foram seguidas as recomendações do fabricante. Resumidamente, as amostras foram tratadas com quantidades indicadas de DNase Buffer e DNase livre de RNase (Thermo Scientific) e depois foram incubadas a 37°C durante 30 min. Em seguida, foi adicionado 1 µL de EDTA (25 mM) e o material incubado por 10 min a 65°C.

### 3.8. Síntese de cDNA

A partir do RNA extraído, o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando o *kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription* de acordo com especificações do fabricante. Resumidamente, após tratamento do RNA com DNase, foi preparado um mix de reação utilizando 10 µL de RNA tratado com DNase, 2 µL de 10X RT Buffer, 0,8 µL de 25X dNTP Mix (100 mM), 2 µL de 10X RT Random Primers, 1 µL de MultiScribe™ Reverse Transcriptase e 4,2 µL de Nuclease-free H<sub>2</sub>O e equipamento termociclador (Eppendorff) foi programado para um ciclo de 10 min a 25°C, 120 min a 37°C, 5 min a 85°C. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até o uso.

### 3.9. Análise quantitativa por PCR em tempo real (qPCR)

A partir do cDNA de *P. brasiliensis* foram realizados experimentos de qPCR em tempo real para avaliar a expressão gênica em condições de hipóxia, conforme descrito por Batista e colaboradores (2007). Os experimentos foram realizados utilizando o sistema de detecção SYBR® Green (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) de acordo com as especificações do fabricante. As reações foram feitas em

triplicata com o volume final de 10  $\mu\text{L}$ , de acordo com a Tabela 1. Foram utilizados os genes 18S e L34 de *P. brasiliensis* como controle endógeno da reação. Para o normalizador e os genes de interesse também foi feito um controle negativo, denominado NTC (*no template control*), de acordo com a Tabela 1. As reações para qPCR em tempo real foram realizadas utilizando equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems), nas seguintes condições: 10 min a 50°C para ativação da enzima, desnaturação por 5 min a 95°C, e 40 ciclos de 95°C por 30 seg e 60°C por 1 min.

**Tabela 1:** Elementos necessários para reação de qPCR

Itens da reação	Amostra ( $\mu\text{L}$ )	NTC ( $\mu\text{L}$ )
SYBR® Green Master Mix	5	5
Oligonucleotídeo <i>sense</i> 10 pmol/ $\mu\text{L}$	1	1
Oligonucleotídeo <i>anti-sense</i> 10 pmol/ $\mu\text{L}$	1	1
cDNA	1	0
Água ultrapura	2	3

A eficiência foi avaliada a partir de um cDNA obtido previamente e diluído em série (100, 10, 1 e 0,1 ng/ $\mu\text{L}$ ). Foram preparadas reações para cada diluição e realizado o ensaio no equipamento conforme descrito anteriormente. Os valores  $C_t$  de cada ponto de diluição foram determinados e usados para fazer a curva padrão e, finalmente, calcular a eficiência dos oligonucleotídeos iniciadores a partir da equação:

$$E = 10^{(-1/slope)-1} \times 100$$

A eficiência corresponde a  $E$ , e o *slope* representa a inclinação da reta gerada a partir da curva padrão. Em seguida, eficiência dos oligonucleotídeos dos genes alvo e normalizadores foram comparadas para validar os melhores normalizadores.

Logo após a determinação da eficiência dos oligonucleotídeos, o ensaio de expressão gênica foi realizado, conforme descrito anteriormente. Após avaliar a qualidade da reação com base nas curvas de dissociação, os resultados foram analisados utilizando o programa *StepOne software* (Applied Biosystems). O método utilizado para avaliar a expressão relativa foi o  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Para a quantificação relativa, foi realizado o seguinte cálculo: inicialmente determinou-se o *cycle threshold* (CT), dado pelo número do ciclo em que o sinal de fluorescência atingiu a linha limiar (*threshold line*), ou seja, a linha em que a emissão de fluorescência está acima do ruído de fundo (*background*). O CT encontrou-se invariavelmente na região correspondente à fase exponencial da amplificação, o que torna mais acurada a estimativa de quantificação dos transcritos na amostra original. Os valores de CT dos genes de interesse foram normalizados em relação ao CT do gene constitutivo (18S e L34), resultando o  $\Delta C_t$ , representado pelo  $CT_{\text{gene}} - CT_{\text{constitutivo}}$ . Por fim, calculou-se o  $2^{-\Delta C_t}$ , sendo este valor a ser trabalhado como representante da expressão relativa para cada gene (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). As sequências dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação do gene de interesse e os normalizadores estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Oligonucleotídeos usados para qPCR

Gene	Sequência (5'-3')	ID
<i>L34</i>	Sense: AAAGGAACCGCACCAAATG Antisense: AGACCTGGGAGTATTCACGG	PADG_04402
<i>KRE6</i>	Sense: TTCCGACGAGTTCAACAAAGA Antisense: CTGCGTCACTCCATACCAAATA	PADG_07170
<i>AGN1</i>	Sense: AAATGCGGCACGGAGGAGA Antisense: AAGGGTGGTATCAAGTGCCGAGT	PADG_03169
<i>PHR2</i>	Sense: ACTGAGGACAAACACCATCAG Antisense: ACAGATCTGCAACGACGTAAA	PADG_04918
<i>FKS1</i>	Sense: GTTCCCATCACCGATCCTATTT Anti-sense: GAAGGAGAGCAAGAAGACGATAC	PADG_11846
<i>CHS2</i>	Sense: CCCGAACCTACTGCACTTTATC Antisense: TGCCCTTACCCGCTTTAATC	PADG_08636
<i>CHT3</i>	Sense: GCGAGGAATTGGGTGATAGAA Antisense: AGGGTTGACGCTATCAGAAATAA	PADG_08156
<i>CHS4</i>	Sense: ACCGGATGAGGCCACTATTACAGA	PADG_07911

<i>CHS3</i>	Antisense: GTCTGCAATCGCTGCTCAACG Sense: CGCTATGGTTAAGGATCCCGAGA	O94191_PARB
<i>ERG11</i>	Antisense: GCATCCAGGCAAGCAAGTAACA Sense: CTACGGCTACGGTTTGGTAAG	PADG_04003
<i>AMY1</i>	Antisense: CCTCACGATAGCCACAAGAAG Sense: CTCCCTCGATTCCCATCTTATG	PADG_04432
<i>GEL3</i>	Antisense: GTAGAGTTCATGGGCGAGATATT Sense: CGTTGTCAGCGGAGGTATCGTC	PADG_04918
<i>PbSRBA</i>	Antisense: AGGGCAGGTTCCGGAGTTCAGTG Sense: CGCATTACATTTACGGCAG	PADG_03295

### 3.10. Ensaio de exposição de $\beta$ -glucana na parede celular de *P. brasiliensis* por citometria de fluxo

Leveduras de *P. brasiliensis* ( $1 \times 10^6$ ) foram crescidas em condições de normóxia e incubadas por 24 h em hipóxia. As células foram centrifugadas e ressuspendidas em 1 mL de solução de bloqueio (0,5% de BSA, 5% soro de coelho, 5 mM de EDTA, 2 mM de  $\text{NaN}_3$  em PBS) por 30 min sob agitação em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a  $800 \times g$  por 2 min e lavadas 3 vezes com tampão de bloqueio sem conter soro de coelho. Posteriormente, as células foram incubadas com um receptor humano de Dectina-1 fusionado a porção FC de IgG1 de camundongo (Sino Biological, Beijing, China), em concentração de 1  $\mu\text{M}$  e volume final de 100  $\mu\text{L}$  na solução de bloqueio sem conter soro de coelho e incubadas por 60 min no gelo. As amostras foram centrifugadas a  $800 \times g$  por 2 min e lavadas 3 vezes com tampão de bloqueio sem conter soro de coelho. Posteriormente, foram incubadas no gelo por 45 min com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa-Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) diluído 1:200 e volume final de 200  $\mu\text{L}$ . Depois deste procedimento, as leveduras foram lavadas, centrifugadas e homogeneizadas em 500  $\mu\text{L}$  de PBS (pH 7,2). Em seguida foram analisadas no citômetro de fluxo (BD FACSCalibur<sup>TM</sup>, Becton

Dickinson), onde foram contabilizados o total de 10.000 eventos e os dados obtidos foram analisados no *software* FlowJo versão 10.6.2 (FlowJo, LLC, FlowJo™, Ashland, OR, USA) e os gráficos plotados em relação a porcentagem de células marcadas. Este ensaio foi realizado em triplicata biológica.

### **3.11. Quantificação de quitina e manana na parede celular de *P. brasiliensis* por citometria de fluxo**

Leveduras de *P. brasiliensis* ( $1 \times 10^6$ ) foram crescidas em condições de normóxia e incubadas por 24 h em hipóxia. Em seguida, as células leveduriformes foram centrifugadas a  $3.000 \times g$  por 5 min a  $4^\circ\text{C}$  e lavadas com 1 mL de PBS (pH 7,2). Para determinação de oligômeros de quitina foi utilizado o marcador WGA (*wheat germ agglutinin*) conjugado com FITC (Sigma-Aldrich, San Louis, MO, EUA), na concentração  $12,5 \mu\text{g/mL}$  em 1mL de PBS (pH 7,2). Para determinação de manana, as leveduras foram marcadas com Conavalina A conjugada com FITC (Sigma-Aldrich, San Louis, MO, EUA), na concentração de  $12,5 \mu\text{g/mL}$  em  $500 \mu\text{L}$  de PBS (pH 7,2). As amostras das duas marcações foram incubadas por 1 h protegidas da luz sob agitação de 800 rpm. Em seguida foram centrifugadas a  $3.000 \times g$  por 5 min a  $4^\circ\text{C}$  e lavadas 3 vezes com 1 mL de PBS (pH 7,2). Ao final do processo, as amostras foram homogeneizadas em  $500 \mu\text{L}$  de PBS (pH 7,2) e analisadas por citometria de fluxo (BD FACSCalibur™, Becton Dickinson) utilizando o canal de detecção FL-1. Cada amostra foi aplicada em triplicata experimental. Foram contabilizados o total de 10.000 eventos e os gráficos de quantificação foram gerados partir da mediana da intensidade de fluorescência (MFI). Os dados obtidos foram analisados no *software* FlowJo versão 10.6.2 (FlowJo, LLC, FlowJo™, Ashland, OR, USA). Este ensaio foi realizado em triplicata biológica.

### 3.12. Ensaio de fagocitose *in vitro* e avaliação da carga fúngica (Unidade Formadora de Colônia - UFC)

Em uma placa de 24 poços foi adicionado uma lamínula circular em cada poço. Em seguida foram adicionadas  $2 \times 10^5$  células da linhagem J774 em meio RPMI (Gibco) suplementado com 10% de SFB. Os macrófagos foram ativados com 100 ng/mL de LPS 30 min antes da interação com células de *P. brasiliensis*. Em seguida a interação foi realizada na proporção de 2:1 (leveduras:macrófagos) e incubada por 24 h a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Previamente, as leveduras de *P. brasiliensis* utilizadas neste ensaio foram incubadas na presença ou ausência de oxigênio por 5 e 24 h a 37°C. Após a interação, cada poço foi lavado com PBS (pH 7,2), e as lamínulas foram coradas com o corante panótico para hematologia (Newprov, Paraná, Brasil). O índice fagocítico foi determinado a partir do protocolo estabelecido por Popi e colaboradores (2002).

Após 48 h de fagocitose, os poços destinados a CFU foram lavados com 1 mL de água Milli-Q gelada, homogeneizados diversas vezes para acelerar o processo de lise dos macrófagos e a liberação das partículas fagocitadas. Para a recuperação do fungo foi utilizado o meio BHI suplementado com 10% de SBF, no qual foi adicionado 100 µL por placa e incubado por 7 dias a 37°C. Após o crescimento, foram contabilizadas as unidades formadoras de colônia. Este ensaio foi realizado em triplicata biológica.

### 3.13. Atividade de PKA

Para a análise da atividade de PKA, foi utilizado o *kit PKA (Protein Kinase A) Colorimetric Activity* (Thermo Fisher Scientific). Para tanto, as células de *P. brasiliensis* foram submetidas a baixas concentração de oxigênio (5 e 24 h), após o tempo de incubação, cerca de 100 µL de *pellet* foi lisado por 5 minutos com pérolas de vidro e

tampão de lise a base de Tris contido no *kit*. Em seguida, as amostras foram quantificadas utilizando Reagente de Bradford (BRADFORD, 1976) e 1 µg/mL de proteína foi utilizado para o ensaio seguindo as instruções do *Kit*. Em síntese, as amostras foram incubadas com ATP por 90 min a 37°C, logo após foi adicionado 25 µL de Donkey anti-Rabbit IgG HRP e 25 µL de anticorpo Phospho-PKA Substrate e incubado por 60 min à temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 100 µL de substrato de Tetrametilbenzidina (TBM) por 30 min e, por fim, adicionado 50 µL de solução de parada. A absorbância foi lida a 450 nm. Este ensaio foi realizado em triplicata biológica.

### 3.14. Dosagem de cAMP

Leveduras de *P. brasiliensis* foram submetidas à hipóxia por 5 e 24 h. Cerca 100 µL de *pellet* foi incubado com 1 mL de HCl 0.1M por 20 min, e em seguida foi adicionado pérolas de vidro e as células foram lisadas por 5 min. Após a lise, as amostras foram quantificadas utilizando Reagente de Bradford (BRADFORD, 1976) e 0,5 µg/mL de proteína foi utilizado para dosagem de cAMP seguindo as instruções do *Kit Cyclic AMP ELISA* (Cayman Chemical). Resumidamente, as amostras foram incubadas com cAMP ELISA Antiserum e Camp AChE Tracer por 18 h a 4°C, após o tempo de incubação, a placa foi lavada e adicionada 200 µL de Reagente de Ellman. A absorbância foi lida a 405 nm. Este ensaio foi realizado em triplicata biológica.

### 3.15. Ensaio de acúmulo de glicogênio

As células de *P. brasiliensis* ( $5 \times 10^6$  células/mL) foram estimuladas na ausência de oxigênio por 5 e 24 h. Após o estímulo, as células foram centrifugadas a 2.500 rpm por 3 min. Em seguida, os *pellets* foram ressuspensos em 1 mL de solução de iodo (0,2% de iodo e 0,4% de iodeto de potássio), incubadas por 3 min à temperatura

ambiente, centrifugadas e ressuspendidas em 30  $\mu\text{L}$  da solução de iodo. As amostras foram pipetadas em uma placa de 96 poços, foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  de PBS 1x em cada poço e as amostras foram fotografadas. Este ensaio foi realizado em triplicata biológica.

### 3.16. Ensaio de sensibilidade a antifúngico

Para avaliar o perfil de sensibilidade de leveduras de *P. brasiliensis* a fluconazol, foi utilizado o protocolo do *The Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI)* com modificações. Para tanto, o antifúngico utilizado foi diluído em DMSO, obtendo-se uma concentração de 5 mg/mL. As células leveduriforme foram crescidas em mYPD caldo por 5 dias a 37°C sob agitação, em seguida, as células foram centrifugadas a 4500 rpm, ressuspendidas em meio RMPI e incubadas em hipóxia e normóxia por 24 h. A Concentração Inibitória Mínima (MIC) foi determinada em placas de 96 poços estéreis, com 12 colunas enumeradas de 1-12 e 8 linhas identificadas de A-H. Na coluna 12, foi adicionado aos poços 200  $\mu\text{L}$  de fluconazol e RMPI de modo a concentração final ser de 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Nas colunas de 1 a 11 foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de meio RMPI (Gibco). Após esse processo, 100  $\mu\text{L}$  de cada poço da coluna 12 foi pipetado e transferido para coluna 11 da mesma linha, então o conteúdo do poço foi homogeneizado e 100  $\mu\text{L}$  desse poço foi transferido para a coluna 10, repetindo-se o processo até a linha 2 e descartando o excedente, sendo a coluna 1 o controle livre de antifúngico. Posteriormente, em cada poço (exceto aos da coluna 12) foram adicionadas  $1 \times 10^6$  leveduras de *P. brasiliensis* (100  $\mu\text{L}$ ). As placas com as células que foram incubadas por 24 h em hipóxia e a cultivadas em normóxia foram crescidas em estufa a 37°C por 7 dias. Em paralelo, uma placa com célula cultivadas em normóxia foram incubadas em jarra de anaerobiose a 37°C por 7 dias. Cada amostra foi plaqueada em duplicata experimental. Ao final do tempo de incubação, os poços foram

homogeneizados e a absorbância foi lida em 530 nm. Além disso, foi realizado ensaio de *spots*, onde 5  $\mu$ L de cada poço foi pipetado em mYPD ágar e incubado a 37°C por 7 dias. Ao final do tempo de incubação as placas foram fotografadas. Este ensaio foi realizado em triplicata biológica.

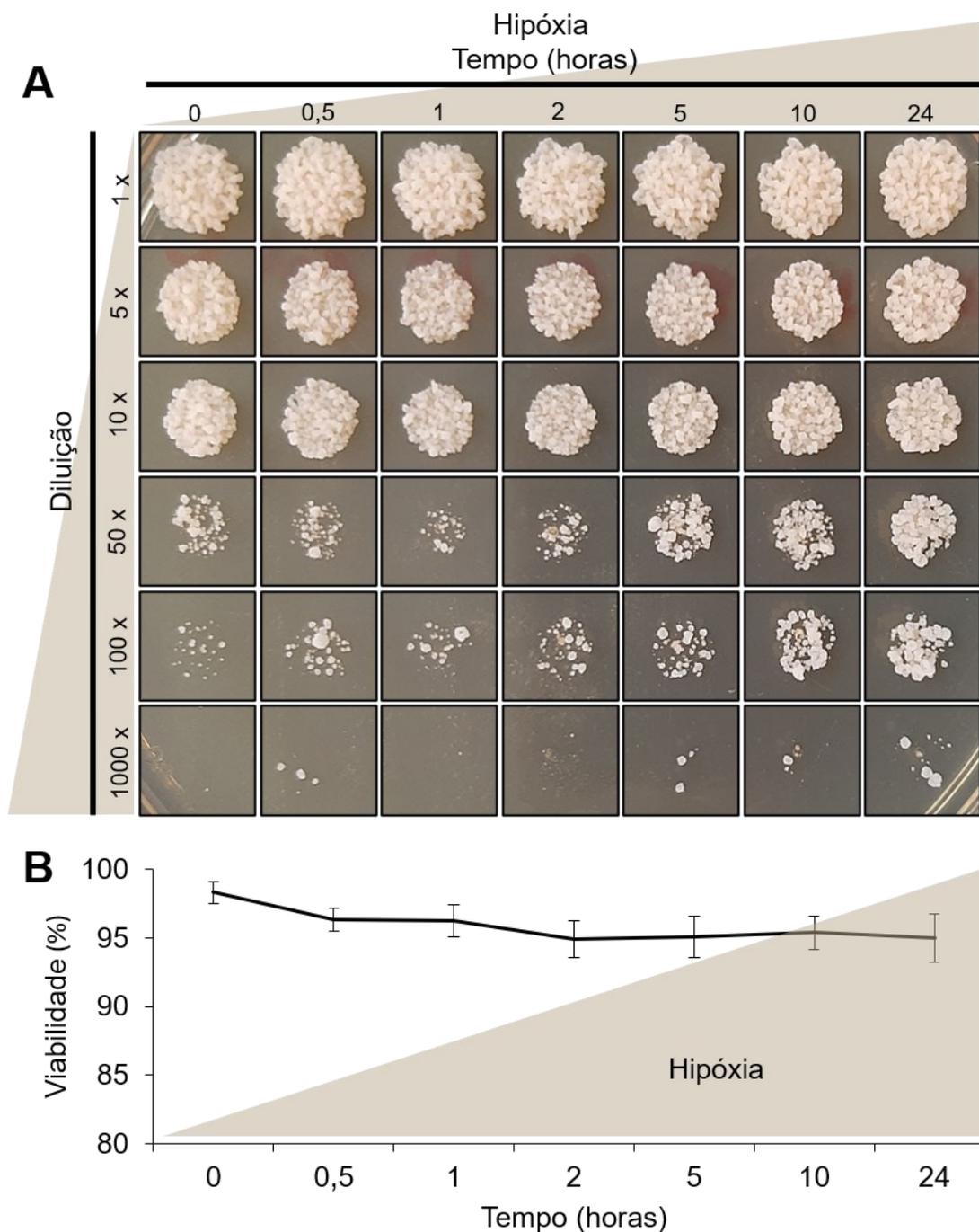
### **3.17. Análise dos Resultados**

A validação das técnicas utilizadas para a realização do trabalho foi realizada através da reprodutibilidade em pelo menos três experimentos independentes. Para avaliação dos dados foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida de teste *t-Student*. Diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Viabilidade do fungo patogênico *P. brasiliensis* em resposta à hipóxia

Já é bem estabelecido que os fungos precisam se adaptar a diferentes tipos de estresses para conseguir se desenvolver dentro do hospedeiro humano, dentre eles a hipóxia (COONEY; KLEIN, 2008). Diante disso, para entender como as leveduras de *P. brasiliensis* se comportam em uma atmosfera com baixas concentrações de oxigênio foi avaliado a viabilidade celular das leveduras cultivadas nestas condições. Na Figura 2A pode-se observar aumento da viabilidade a partir de 5 h de cultivo em condições de hipóxia e, conforme aumenta o tempo sob esse estresse, há maior crescimento fúngico. Este resultado foi observado em ensaio de *spot* (Figura 2A), quando comparado ao controle cultivado em normóxia. Além disso, a contagem de células viáveis (Figura 2B) que se manteve acima de 90% em todas as condições. Em conjunto esses resultados mostram que células leveduriformes de *P. brasiliensis* estimuladas em ambientes deficientes de oxigênio conseguem ter maior crescimento quando a concentração de oxigênio é reestabelecida.



**Figura 2.** Perfil de sensibilidade à hipóxia em leveduras de *P. brasiliensis*. **(A)**  $1 \times 10^6$  células foram submetidas à hipóxia por 30 min, 1, 2, 5, 10 e 24 h. Em seguida, as células foram diluídas (diluição seriada), semeadas em ágar mYPD e incubadas por 7 dias a 37°C. **(B)** Gráfico de viabilidade celular após tempo de incubação em baixa concentração de oxigênio.

De forma a garantir que ambientes com baixas concentrações de oxigênio não inviabilizam o crescimento fúngico, leveduras de *P. brasiliensis* foram cultivadas sob hipóxia e normóxia em meio mYPD sólido por 7 dias a 37°C. Na Figura 3 é possível

observar que não há diferença de crescimento entre as leveduras cultivadas em normóxia daquelas cultivadas em ambiente deficiente de oxigênio. Esse resultado permite dizer que o *P. brasiliensis* é capaz de sobreviver e crescer quando cultivado por 7 dias em condições de baixa concentração de O<sub>2</sub>. Diante desses resultados, para conseguir avaliar adequadamente qual a resposta do *P. brasiliensis* à hipóxia, o tempo de 2 h foi padronizado como o período mínimo de incubação para induzir uma resposta de hipóxia.

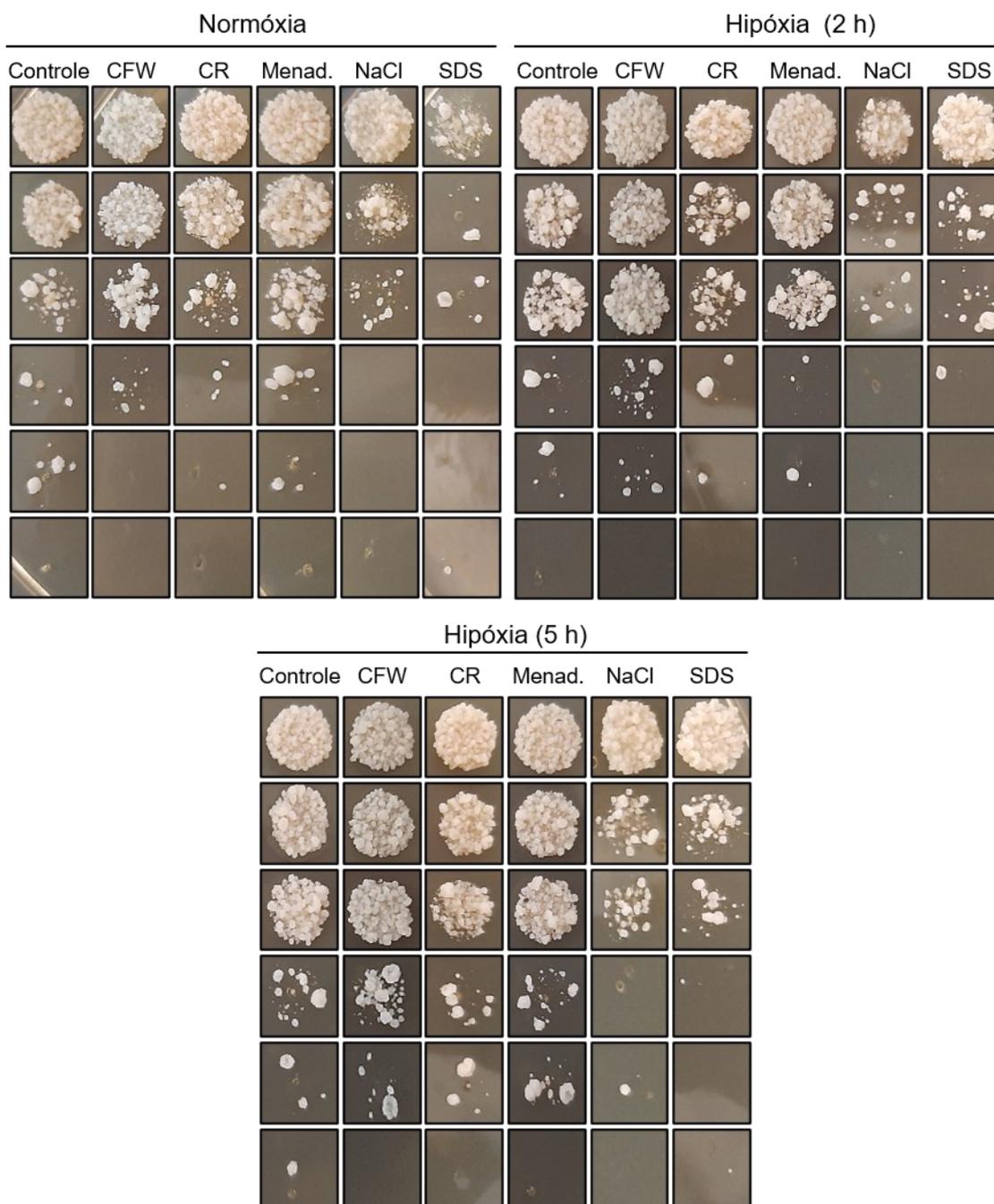


**Figura 3.** Suscetibilidade de células leveduriformes de *P. brasiliensis* a condição de hipóxia. O total de  $1 \times 10^6$  células/mL foram plaqueadas em meio mYPD sólido (diluição seriada) e submetidas à hipóxia em jarra de anaerobiose por 7 dias a 37°C.

#### 4.2. Agentes perturbadores de parede celular e o crescimento do fungo submetido a ambientes com baixas concentrações de oxigênio

Com o objetivo de avaliar a modulação da parede celular de células leveduriformes de *P. brasiliensis* em resposta à hipóxia diferentes agentes perturbadores de parede celular foram utilizados e o crescimento fúngico foi analisado. Para tanto, leveduras de *P. brasiliensis* foram submetidas à hipóxia por 2 e 5 h, plaqueadas utilizando o método de *spots* em meio YPDm ágar suplementado com diferentes agentes perturbadores de paredes e indutores de estresse, como: Menadiona 10  $\mu$ M (induz estresse oxidativo) (FÉLIX-CONTRERAS et al., 2020), SDS 0,001% (altera a membrana plasmática) (SCHROEDER; IKUI, 2019), NaCl 150 mM

(induz estresse osmótico) (ENE et al., 2015), *Calcofluor White* (CFW) 5µg/mL e *Congo Red* (CR) 10 µM. Após 7 dias de incubação, foi possível observar que a presença de agentes relacionado ao estresse osmóticos (cloreto de sódio) e membrana plasmática (SDS) reduziram o crescimento fúngico. Já a menadiona (estresse oxidativo), não apresentou diferença no crescimento fúngico em resposta a privação de oxigênio. Em contrapartida, *Calcofluor White* (CFW), *Congo Red* (CR) que estão relacionados com estresse a componentes de parede celular, como quitinas e glucanas (RAM; KLIS, 2006) apresentaram uma recuperação do crescimento em 5 h sob hipóxia quando comparado a normóxia. Este resultado indica que a hipóxia gera um mecanismo de proteção na resposta ao estresse de parede celular. Diante do resultado, prosseguimos nosso estudo a fim de avaliar a modulação dos componentes de parede celular no *P. brasiliensis* em resposta a hipóxia.



**Figura 4.** Perfil de crescimento de *P. brasiliensis* na presença de agentes perturbadores da parede celular.  $1 \times 10^6$  células foram submetidas à hipóxia por 2 e 5 h. Em seguida, as células foram diluídas, plaqueadas em meio mYPD sólido contendo diferentes agentes perturbadores da parede celular, como Menadiona 10  $\mu$ M, SDS 0,001%, Calcofluor White (CFW) 5  $\mu$ g/mL, Congo Red (CR) 10  $\mu$ M e NaCl 150 mM. Por fim, as células foram incubadas em estufa por 7 dias a 37°C.

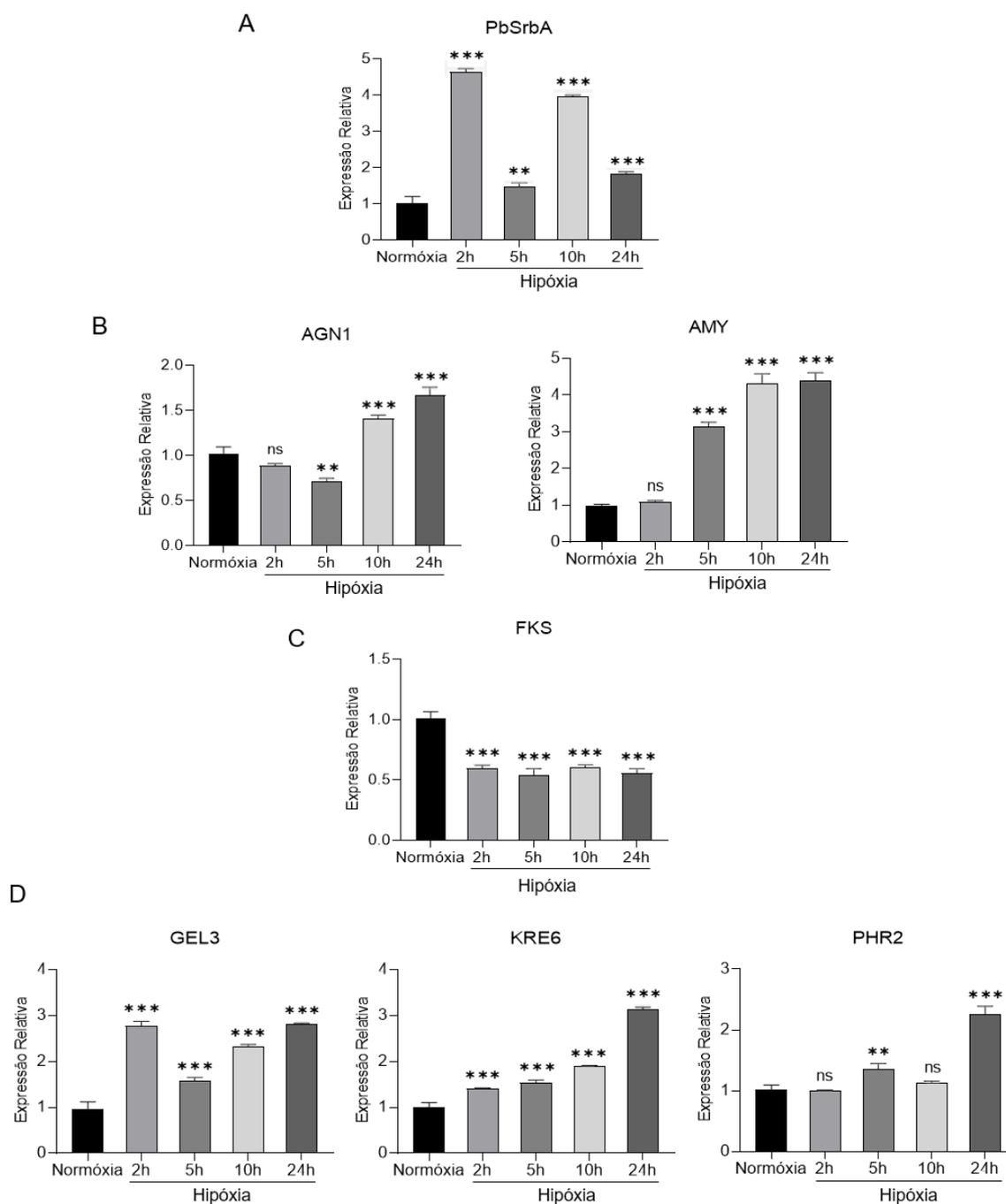
### 4.3 Modulação da expressão de genes da parede celular de *P. brasiliensis*

Inicialmente foi extraído o RNA total de *P. brasiliensis* isolado Pb18 após cultivado em condições de hipóxia. Em seguida, foi realizada a síntese do cDNA a partir do RNA extraído como descrito em materiais e métodos (item 3.6). A PCR quantitativa foi utilizada para a análise transcricional de alguns genes envolvidos na síntese e manutenção de glucana, como *KRE6* (PADG\_07170), *AGN1* (PADG\_03169), *PHR2* (PADG\_04918), *FKS1* (PADG\_11846), *AMY1* (PADG\_04432) e *GEL3* (PADG\_04918). Foram também avaliados genes relacionados com síntese e manutenção de quitina, como *CHS2* (PADG\_08636), *CHS5* (A9XTF9\_PARBR), *CHT3* (PADG\_08156), *CHS4* (PADG\_07911) e *CHS3* (O94191\_PARBR). Além do gene *PbSRBA* (PADG\_03295) que está envolvido com resposta a hipóxia e *ERG11* (PADG\_04003) que está relacionada com síntese de ergosterol.

O *PbSRBA* (PADG\_03295) é um gene importante envolvido na resposta à hipóxia (LIMA et al., 2015), apresentando-se muitas vezes como marcador desse estresse. Nas condições analisadas este gene apresentou um aumento significativo de 4,5 vezes em relação a normóxia após 2 h de estresse. A expressão variou durante o ensaio, pois em 5 e 24 h houve redução da expressão, mas os valores sempre foram maiores que a condição controle (normóxia) (Figura 5A). Entre os genes envolvidos na síntese de glucanas, o *AGN1* (PADG\_03169), o qual está relacionado com a hidrólise de  $\alpha$ -1,3-glucana, apresentou aumento da expressão quando submetido a baixas concentrações de oxigênio, chegando a ser aproximadamente 2 vezes maior em 24 h sob hipóxia, quando comparado a normóxia (Figura 5B). Ainda em relação a síntese  $\alpha$ -1,3-glucana, *AMY1* (PADG\_04432) apresentou aumento de sua expressão conforme aumenta o tempo do fungo em condições de baixas concentrações de oxigênio, chegando a 4,5 vezes após 24 h (Figura 5B). A  $\alpha$ -1,4-amilase (*AMY1*) é um

gene essencial para a síntese de  $\alpha$ -1,3-glucana e para a virulência fúngica (CAMACHO et al., 2012; MARION et al., 2006). Por outro lado, o gene *FKS1* (PADG\_11846), um importante gene envolvido com a síntese de 1-3- $\beta$ -glucana, apresentou redução em sua expressão já nas primeiras horas do fungo em condição de hipóxia, se mantendo até 24 h (Figura 5C). Esse resultado é interessante uma vez que a modulação dos níveis de  $\alpha$ -1,3-glucana e diminuição 1-3- $\beta$ -glucana pode ser considerado um fator de virulência neste fungo.

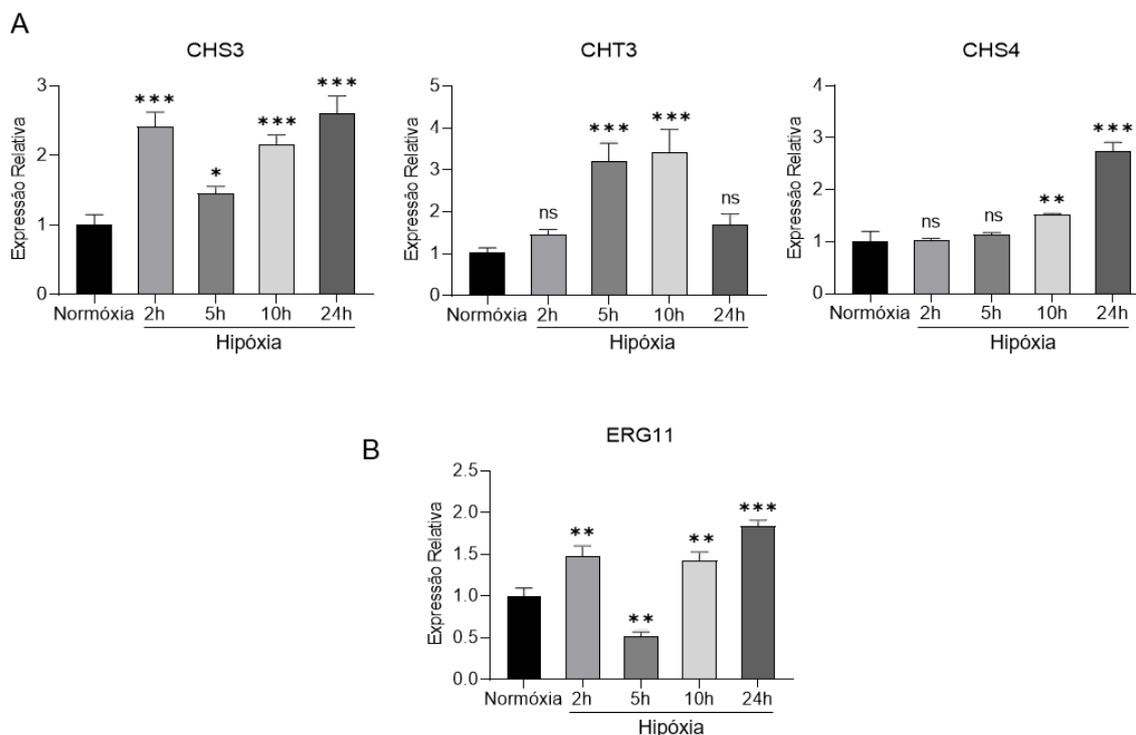
O gene *GEL3* (PADG\_04918),  $\beta$ -1,3-glucanosiltransferase, que está envolvido com a morfogênese de parede celular, apresentou aumento da expressão de aproximadamente 3 vezes após 2 h sob hipóxia, esse aumento se manteve até as 24 h (Figura 5D). Os genes *KRE6* (PADG\_07170) e *PHR2* (PADG\_04918), os quais estão envolvidos com a síntese de polímeros 1-6 e 1-3- $\beta$ -D-glucana da parede celular de levedura *in vivo* (PUCCIA et al., 2011) e morfogênese e virulência do fungo (DEGANI; POPOLO, 2019), respectivamente, tiveram comportamentos semelhantes, no qual houve aumento de expressão de aproximadamente 3 vezes em relação ao normóxia quando o fungo foi submetido por 24 h à hipóxia (Figura 5D).



**Figura 5.** Análise da expressão genes envolvidos na morfogênese da parede celular de *P. brasiliensis* crescido em condições de hipóxia. Células *P. brasiliensis* de foram incubadas em baixa concentração de oxigênio por 2, 5, 10 e 24 h. O RNA foi extraído usando o método Trizol® e realizado a PCR quantitativa em tempo real. (A) Gene responsivo a hipóxia (PbSrbA). (B) Síntese de  $\alpha$ -glucana (AGN1 e AMY). (C) Síntese de  $\beta$ -glucana (FKS). (D) Síntese de glucanas (GEL3, KRE6, PHR2). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,009$ , \*\*\* $p < 0,0009$ .

Em relação aos genes que participam da síntese de quitinas, *CHT3* (PADG\_08156), quitinase envolvida no remodelamento de quitinas na parede celular de fungos (MCCREATH; SPECHT; ROBBINS, 1995), apresentou um aumento de sua

expressão relativa de aproximadamente 3,5 vezes em 5 e 10 h sob hipóxia quando comparado a normóxia. Já o gene *CHS4* (PADG\_07911), uma quitina sintase com um papel importante na polimerização de quitinas (NIÑO-VEGA; CARRERO; SAN-BLAS, 2004), aumentou sua expressão relativa a partir de 10 h sob hipóxia. Por fim, o gene *CHS3* (O94191\_PARBR), uma quitina sintase responsável pela síntese da maioria das quitinas encontradas na parede celular dos fungos (LUU et al., 2019), apresentou aumento da sua expressão em aproximadamente 2,5 vezes em 2 h sob baixas concentrações de oxigênio, em relação ao normóxia. Esse aumento se manteve nas próximas horas (Figura 6A). Os outros genes testados, *CHS2* (PADG\_08636) e *CHS5* (A9XTF9\_PARBR) não apresentaram diferenças importantes nessas análises (dados não mostrados). Por fim, o gene relacionado com a biossíntese de ergosterol, *ERG11* (PADG\_04003) teve aumento de 1,5 vezes em 2 e 10 h, aumentando para 2 vezes após incubação de 24 h em condição de hipóxia, quando comparado ao controle (normóxia) (Figura 6B). Todos esses dados sugerem modulação nos componentes de parede celular e nos níveis de ergosterol de *P. brasiliensis* em resposta a baixas concentrações de oxigênio.



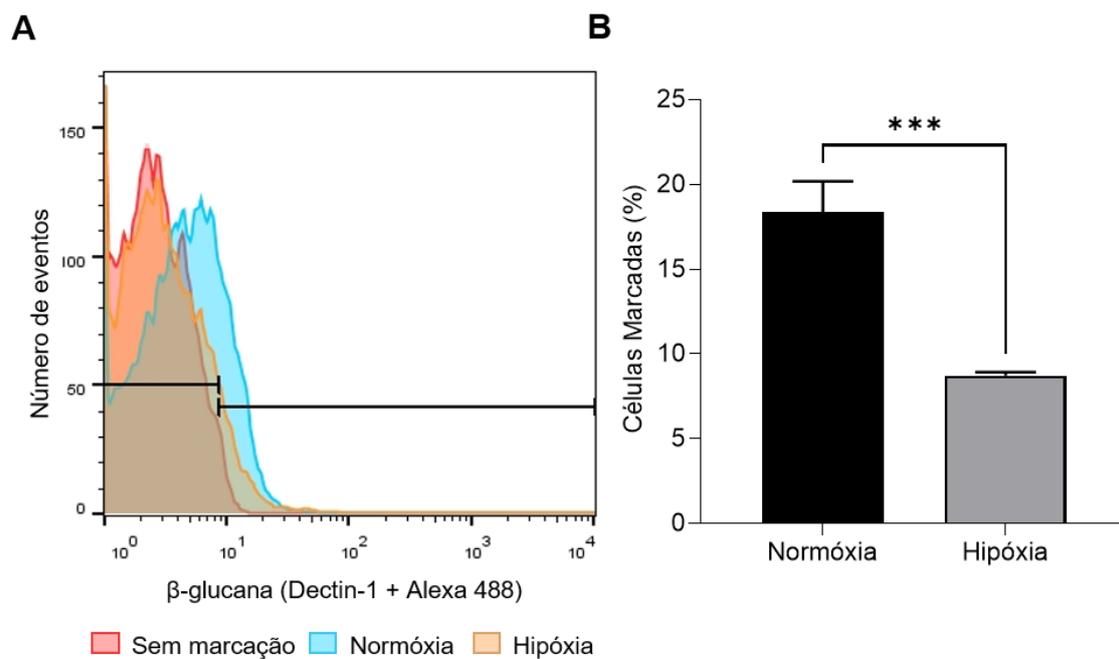
**Figura 6.** Análise da expressão de genes envolvidos na síntese de quitinas e ergosterol de *P. brasiliensis* crescido em condições de hipóxia. Células *P. brasiliensis* de foram incubadas em baixa concentração de oxigênio por 2, 5, 10 e 24 h. O RNA foi extraído usando o método Trizol® e realizado a PCR quantitativa em tempo real. (A) Síntese de quitinas (CHS3, CHT3, CHS4). (B) Síntese de ergosterol (ERG11). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,009$ , \*\*\*  $p < 0,0009$

#### 4.4 Modulação dos componentes parede de leveduras de *P. brasiliensis* em resposta à hipóxia

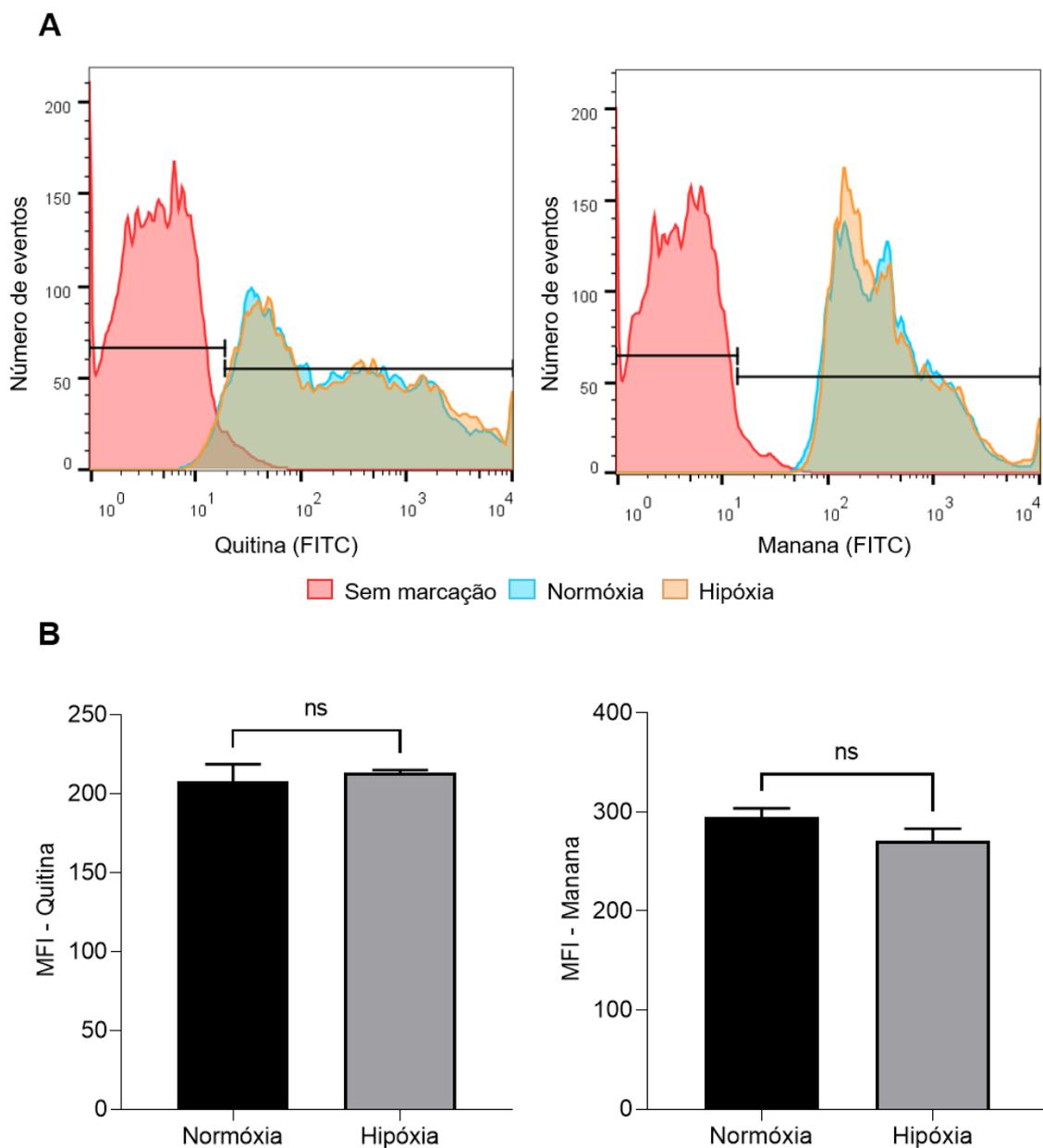
Interessantemente, o resultado de redução nos níveis da expressão de *FKS* em condições de hipóxia (Figura 5C) chamaram atenção, uma vez que as  $\beta$ -glucanas são polissacarídeos da parede celular de fungos reconhecidos pelos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), levando a ativação do sistema imunológico do hospedeiro (YOSHIMI; MIYAZAWA; ABE, 2017). As quitinas e as mananas compõe a parede celular e também são importantes na virulência fúngica (PUCCIA; VALLEJO; LONGO, 2017). Para testar o impacto da hipóxia na modulação dos componentes da parede celular de *P. brasiliensis*, células leveduriforme foram cultivadas em condições de baixas concentrações de oxigênio. As leveduras foram cultivadas em meio mYPD

em condições normóxicas e transferidas para condições hipóxicas por 24 h. Em seguida, as células foram recolhidas, para análise enquanto ainda em fase de crescimento exponencial (Materiais e Métodos), e as  $\beta$ -glucanas presentes na parede celular foram marcadas com Fc-Dectin-1 conjugado com FITC (esta sonda consiste na fusão do receptor de Dectina-1 humana com a porção Fc de IgG de camundongo). Também foram avaliados os níveis de quitinas e mananas em resposta a hipóxia. Para tanto, o marcador WGA (Wheat germ agglutinin - WGA) conjugado com FITC foi utilizado para avaliar os níveis de quitinas (GONÇALES et al., 2021) e para verificar os níveis de manana foi utilizada Concavalina A conjugada com FITC (MF et al., 2017). O WGA é uma molécula de lecitina que possui afinidade por resíduos de N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminil e oligômeros de N-acetil- $\beta$ -D-51 glucosamina (GONÇALES et al., 2021). Enquanto a Concavalina possui afinidade por resíduos terminais de  $\alpha$ -D-manose e  $\alpha$ -D-glicose (MF et al., 2017). As análises da fluorescência foram realizadas por meio de citometria de fluxo e a quantificação foi obtida através da mediana da intensidade de fluorescência (MFI) para análise de quitinas e mananas e para as  $\beta$ -glucanas foi analisado o percentual de células marcadas.

Nas análises de citometria de fluxo foi possível observar que as leveduras cultivadas em condição de hipóxia exibiram uma redução significativa de aproximadamente 50% nos níveis de marcação com Fc-Dectina-1 em relação ao grupo controle (Figura 7). Enquanto as quitinas e mananas não apresentaram diferenças significativas de marcação quando cultivadas em hipóxia e em normóxia (Figura 8). Este resultado confirma a hipótese de que há uma modulação da parede celular de *P. brasiliensis*, reduzindo a exposição de  $\beta$ -glucanas, em resposta à hipóxia. Estes dados complementam os resultados de expressão dos genes envolvidos com síntese de parede celular.



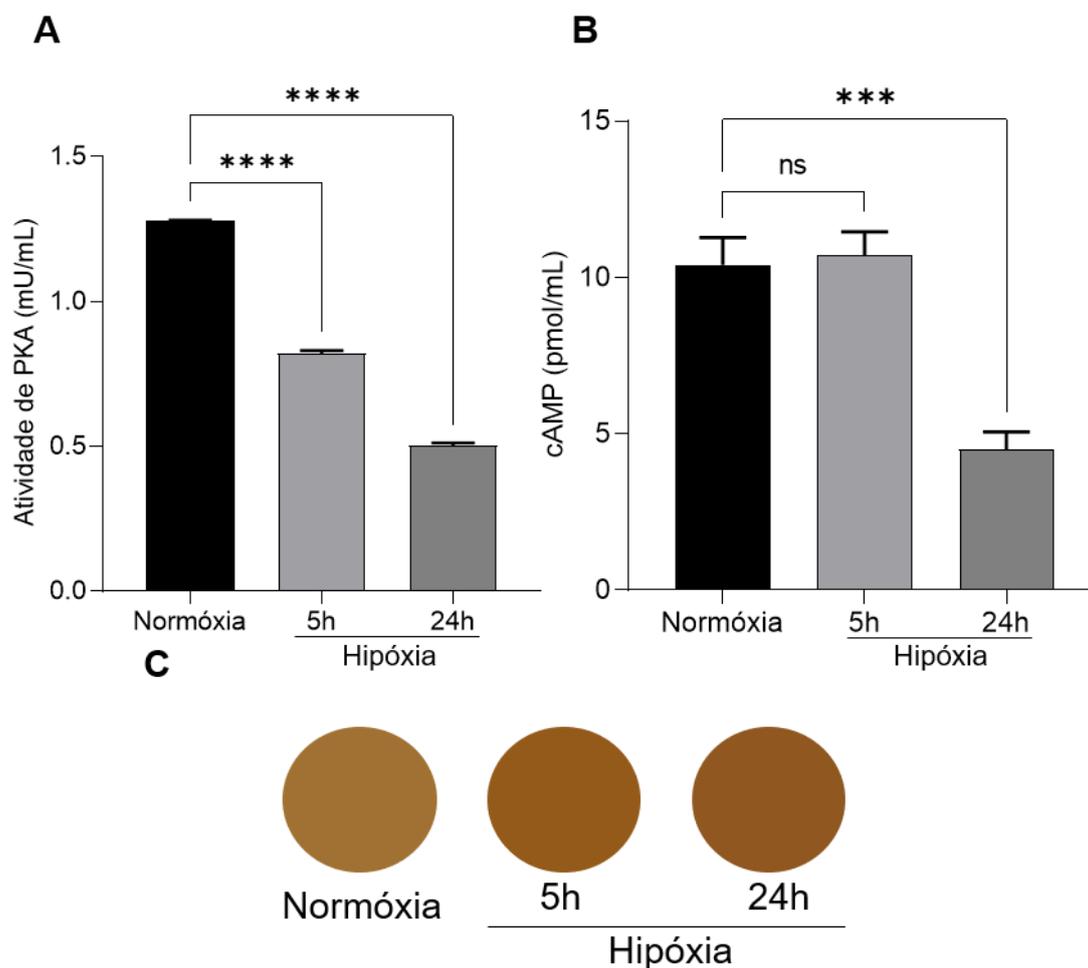
**Figura 7.** Análise de citometria de fluxo de leveduras de *P. brasiliensis* submetido a condição de hipóxia. Células *P. brasiliensis* de foram incubadas em baixa concentração de oxigênio por 24 h, incubadas com um receptor humano de Dectina-1 conjugado com Alexa-Fluor 488. Ao final da marcação, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo. (A) Histograma da análise da marcação de  $\beta$ -glucana na parede celular através de citometria de fluxo. (B) Percentual de leveduras marcadas.  $p < 0,0009$  (\*\*\*).



**Figura 8.** Quantificação de componentes de parede de *P. brasiliensis* após incubação em baixas concentrações de oxigênio. Células de *P. brasiliensis* foram submetidas à hipóxia por 24 horas e em seguida, para dosagem de quitina e manana, as leveduras foram marcação com WSA conjugado com FITC e Conavalina A conjugada com FITC, respectivamente. **(A)** Histogramas da análise da marcação de cada componente da parede celular através de citometria de fluxo. **(B)** Quantificação da intensidade de fluorescência (MFI) através da mediana.

#### **4.5. Regulação da via cAMP-PKA e acúmulo de glicogênio em leveduras de *P. brasiliensis* quando submetido a hipóxia**

Sabendo que a sinalização de cAMP-PKA está envolvida no mascaramento de  $\beta$ -glucanas, influenciando a expressão gênica e a integridade da parede celular (CAO et al., 2017; FANNING et al., 2012; HARCUS et al., 2004), nós avaliamos a regulação dessa via em leveduras de *P. brasiliensis* submetidas a baixas concentrações de oxigênio. A Figura 9A demonstra uma redução significativa da atividade de PKA conforme aumenta a tempo sob hipóxia. Dessa forma, também foi observado uma importante redução de cAMP após 24 h em condições de baixas concentrações de oxigênio (Figura 9B). Outro fator importante para ser avaliado é os níveis de glicogênio. O glicogênio é um carboidrato de armazenamento que é acumulado quando há uma inatividade da via cAMP-PKA (SCHMELZLE et al., 2004), com isso, o acúmulo de glicogênio também foi analisado com uma leitura adicional a regulação da atividade de PKA (Figura 9C), resultado que corrobora com os achados relacionados a via de cAMP-PKA. Como demonstrado na figura 9C, há um aumento no acúmulo de glicogênio conforme se estende o tempo de incubação sob hipóxia, isso foi possível observar devido ao escurecimento da cor do sobrenadante tratado com solução de iodo. Em conjunto, esses resultados sugerem que nas condições estudadas a via cAMP-PKA não está envolvida na resposta de células leveduriformes de *P. brasiliensis* à hipóxia.

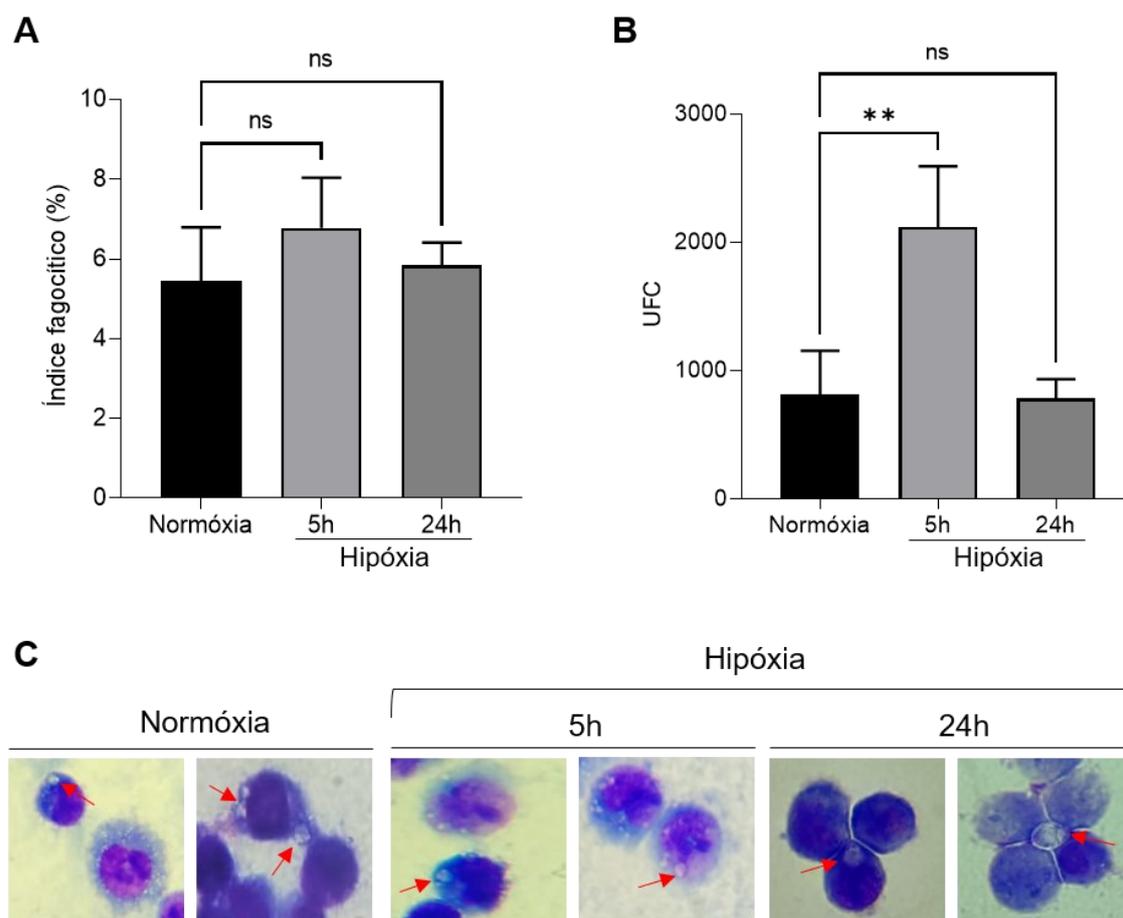


**Figura 9.** Atividade de PKA e dosagem de cAMP em leveduras de *P. brasiliensis* em resposta a hipóxia. **(A)** Quantificação da atividade de PKA **(B)** Dosagem de cAMP de células de *P. brasiliensis* após 5 e 24h sob baixas concentrações de oxigênio (\*\* $p < 0,0001$ ). **(C)** Após o tempo de incubação das leveduras em hipóxia (5 e 24 h), as células foram coradas com uma solução 0,2% de iodo e 0,4% de iodeto de potássio para a avaliação do acúmulo de glicogênio.

#### 4.6. Suscetibilidade de células fúngicas à resposta imunológica em condição de hipóxia

Como demonstrado nos resultados anteriores, a hipóxia parece estar induzindo uma modulação de genes relacionados a parede celular, além de reduzir a exposição de  $\beta$ -1-3-glucanas. Sabendo que a  $\beta$ -1-3-glucana é um PAMP importante para o reconhecimento e regulação da cascata imunológica (ERWIG; GOW, 2016), foi realizado um ensaio de fagocitose para investigar se essa alteração morfológica na

parede celular de *P. brasiliensis* era capaz de modificar o reconhecimento do macrófago ao fungo. Para tanto, foram utilizados macrófagos da linhagem J774 para a realização do ensaio de fagocitose, no qual não foi possível observar diferença no índice fagocítico de leveduras que foram submetidas a hipóxia por 5 e 24 h, do controle experimental (Figura 10A). Por outro lado, no ensaio de contagem de Unidade Formadoras de Colônia (UFC) foi possível observar que as células submetidas a baixas concentrações de oxigênio por 5 h apresentaram um maior crescimento quando em contato com os macrófagos murinos em relação ao grupo controle. Já em 24 h sob hipóxia não houve diferença significativa em relação as células cultivadas em normóxia (Figura 10B). Na figura 10C é possível observar as leveduras de *P. brasiliensis* (indicadas pela seta vermelha) de todos os grupos experimentais, fagocitadas pelo macrófago murino. Esses resultados sugerem uma resistência de leveduras de *P. brasiliensis*, quando submetidas à hipoxia, ao ambiente estressor causado pelo macrófago.



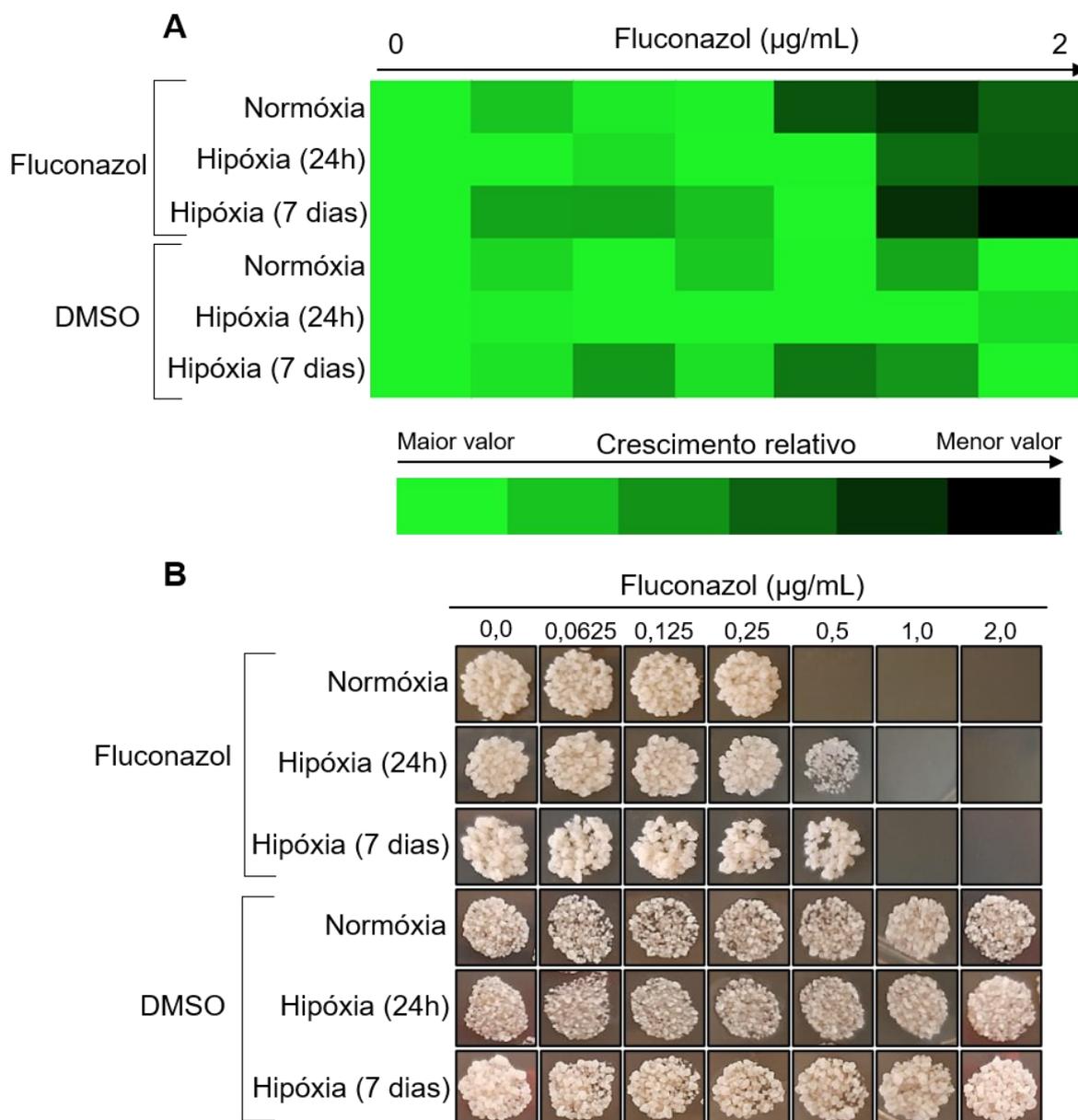
**Figura 10.** Leveduras de *P. brasiliensis* cultivadas em condições de hipóxia são mais resistentes a fagocitose. Foram plaqueadas  $2,5 \times 10^5$  células J774, em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. Em paralelo, células de *P. brasiliensis* foram submetidas à hipóxia por 5 e 24 h. A interação foi realizada na proporção de 2:1 (leveduras:macrófagos) por 18 h em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período as células foram coradas e visualizadas em microscópio óptico para realização da contagem de leveduras internalizadas. **(A)** Índice fagocítico calculado a partir da contagem de 300 células. **(B)** Ensaio de unidades formadora de colônia (CFU) de leveduras recuperadas dos macrófagos, onde  $p \leq 0,005$  (\*\*). **(C)** Figuras representativas das leveduras internalizadas em cada grupo experimental indicadas pela seta vermelha.

#### 4.7. Perfil de suscetibilidade a antifúngico em leveduras de *P. brasiliensis* submetidas à hipóxia

Diversas classes de antifúngicos demonstraram eficácia no tratamento da PCM, como: terbinafina, anfotericina B, derivados sulfamídicos e derivados azólicos (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). Os antifúngicos azólicos são nomeados de acordo com o número de átomos de nitrogênio no anel azólico, podendo ser imidazóis (clotrimazol, cetoconazol, miconazol) e triazóis (fluconazol, itraconazol, voriconazol,

posaconazol, isavuconazol) (NETT; ANDES, 2016). Os azóis funcionam a partir da inibição da 14- $\alpha$ -dimetilase, bloqueando a dimetilação de lanosterol em ergosterol, resultando na depleção de ergosterol e no acúmulo de intermediários de esterol tóxico, induzindo estresse a membrana, impedindo o crescimento e divisão das células fúngicas (NETT; ANDES, 2016; ROBBINS; WRIGHT; COWEN, 2016).

O resultado de expressão gênica demonstrou um aumento da expressão relativa de ERG11 quando as leveduras de *P. brasiliensis* foram submetidas a hipóxia (Figura 6B). Em *Candida* spp. esse gene está relacionado com a resistência a antifúngicos, mais especificamente aos derivados azólicos (FENG et al., 2016, 2017; PAUL et al., 2021). Diante disso, foi avaliada a suscetibilidade das células leveduriformes de *P. brasiliensis* submetidas a baixas concentrações de oxigênio ao antifúngico fluconazol. Para tanto, foi feito o ensaio de microdiluição em caldo como descrito em materiais e métodos (item 3.16). Foram utilizadas leveduras de *P. brasiliensis* previamente cultivadas em normóxia e por 24 h em hipóxia. Depois de plaqueadas, as células previamente cultivadas por 24 h em hipóxia e em normóxia cresceram por 7 dias em condições normais de oxigênio. Em paralelo, leveduras previamente cultivadas em normóxia foram crescidas por 7 dias em condições de hipóxia na presença de antifúngico. Ao final dos 7 dias foi realizado a leitura da DO (450 nm) e o ensaio de spot que foi crescido por mais 7 dias em condições normais de oxigênio. Com os resultados foi possível observar um crescimento das células submetidas a hipóxia na presença de 0,5  $\mu\text{g/mL}$  de fluconazol, enquanto o controle experimental apresentou um crescimento até uma concentração de 0,25  $\mu\text{g/mL}$  de antifúngico (Figura 11). Diante disso, os resultados sugerem que as células de *P. brasiliensis* submetidas a baixas concentrações de oxigênio são menos suscetíveis ao antifúngico fluconazol, daquelas cultivadas em normóxia.



**Figura 11.** Perfil de suscetibilidade antimicrobiano em leveduras de *P. brasiliensis* cultivadas em condições de hipóxia. Em placa de 96 poços foi realizada uma diluição seriada do antifúngico fluconazol (diluído em DMSO) em meio RPMI (2 a 0.0625  $\mu\text{g/mL}$ ), em seguida foram plaqueadas  $1 \times 10^6$  leveduras de *P. brasiliensis* previamente cultivadas em normóxia e por 24h em hipóxia. Depois de plaqueadas, as células cresceram por 7 dias em condições normais de oxigênio. Em paralelo, leveduras previamente cultivadas em normóxia foram crescidas por 7 dias em condições de hipóxia na presença de antifúngico. Após esse período foi feito a leitura da DO dos poços (450nm) e o ensaio de spot. **(A)** Heatmap representativo do crescimento fúngico através da DO. **(B)** Ensaio de spot de leveduras submetidas a baixas concentrações de oxigênio e tratadas com fluconazol.

## 5. DISCUSSÃO

Já se sabe que nas primeiras horas após a inalação de partículas fúngicas, as células de *Paracoccidioides* são capazes de estabelecer a infecção pulmonar (LACERDA PIGOSSO et al., 2017). Para tanto, o fungo utiliza diversos mecanismos para se adaptar ao ambiente estressor gerado pelo hospedeiro (OLIVEIRA et al., 2021), dentre eles o dimorfismo, pelo qual as células fúngicas modulam componentes da parede celular durante a transição dimórfica como forma de tentar evadir da resposta imune e sobreviver no tecido do hospedeiro (PUCCIA; VALLEJO; LONGO, 2017; TABORDA; TRAVASSOS; BENARD, 2021). A persistência de leveduras de *P. brasiliensis* no tecido do hospedeiro gera uma resposta inflamatória causada pelo reconhecimento de macrófagos que levam a formação do granuloma (RAMAKRISHNAN, 2012). Dentro do granuloma acontecem diversos tipos de estresses como forma de tentar impedir a infecção e a replicação fúngica, dentre eles a hipóxia (HENINGER et al., 2006; TSAI et al., 2006).

A hipóxia é um estresse importante gerado pelo hospedeiro, no qual o percentual de oxigênio varia de acordo com o tecido, além da presença ou ausência de resposta inflamatória (GRAHL et al., 2012; NIZET; JOHNSON, 2009; PEYSSONAU; JOHNSON, 2004). Estudos com diversos fungos já demonstraram importantes mudanças transcricionais, morfológicas, metabólicas e de virulência das células fúngicas em resposta a hipóxia (CHILDERS et al., 2020; GRAHL et al., 2012; KOWALSKI et al., 2020; PRADHAN et al., 2018; RASTOGI et al., 2020; WILLGER et al., 2012). Sabe-se que para a sobrevivência das células de *Paracoccidioides* em ambientes deficientes de oxigênio são necessárias adaptações metabólicas e respiratórias (LIMA et al., 2015; NOJOSA OLIVEIRA et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2021). Entretanto, ainda são poucos os estudos que avaliam como o *Paracoccidioides*

spp. se comporta frente ao estresse causado por ambientes com baixas concentrações de oxigênio. Diante disso, nosso trabalho teve como objetivo avaliar a resposta de leveduras de *P. brasiliensis* à hipóxia.

Em leveduras patogênicas como a *Candida albicans* é conhecido que apresentam capacidade de crescimento em condições anaeróbicas (ROZPEĐOWSKA et al., 2011). Além disso, em condições de baixas concentrações de oxigênio, foi demonstrado uma modulação da parede celular fúngica e da resposta imunológica (BURGAIN et al., 2020; PRADHAN et al., 2018). O fungo *Aspergillus fumigatus* é outro microrganismo patogênico que consegue suportar atmosferas de 0,1% de oxigênio, além de ter a capacidade de sobreviver e crescer em anaerobiose (GRAHL et al., 2012). Em relação ao *P. brasiliensis*, pouco se sabe como esse fungo se comporta em resposta à hipóxia. Segundo Sano et al. (1991), o isolado Pb18 tem a capacidade de crescimento tanto em ambientes com baixas concentrações de oxigênio, como em anaerobiose, o que corrobora com nossos achados demonstrados nas Figuras 2 e 3, nos quais leveduras de *P. brasiliensis* conseguem sobreviver e crescer em condições de hipóxia igualmente a normóxia (Figura 3), além de ter um perfil de crescimento maior conforme aumenta o tempo sob esse estresse (Figura 2A).

Os ensaios de expressão gênica demonstraram um perfil de aumento da expressão do gene *PbSRBA*, um homólogo da Proteína de Ligação ao Elemento Regulador de Esterol (SREBP), resultado semelhante ao estudo de Lima et al. (2015). Em *A. fumigatus* e *C. neoformans*, a SREBP é caracterizada como proteína reguladora da síntese de ergosterol, além de ser fundamental na virulência e na adaptação à hipóxia (BIEN; ESPENSHADE, 2010; BLATZER et al., 2011; CHANG et al., 2007a; CHUNG et al., 2014). O trabalho de Todd et al. (2006) demonstrou um papel importante da *SREBP* em resposta a condições anaeróbicas em

*Schizosaccharomyces pombe*. Além disso, a deleção do gene *SrbA* em *A. fumigatus* impediu o crescimento do fungo em ambientes com baixas concentrações de oxigênio, demonstrando a importância desse gene na adaptação à hipóxia (WILLGER et al., 2012). Portanto, a expressão aumentada do gene *SRBA* quando leveduras de *P. brasiliensis* foram submetidas a baixas concentrações de oxigênio, nos garante que houve ativação de uma resposta à hipóxia (Figura 5A).

A proteína *SREBP* também é sensível aos níveis de ergosterol intracelular. O colesterol é um lipídio importante para membrana celular, promovendo fluidez e permeabilidade (ESPENSHADE; HUGHES, 2007). O primeiro colesterol encontrado em membrana celular foi o ergosterol, importante alvo terapêutico dos antifúngicos. *ERG* é um gene importante na síntese de ergosterol. Em fungos como *S. cerevisiae* e *C. neoformans*, o ergosterol é sensível a oxigênio, sendo bloqueado em condições de anóxia e hipóxia para ativar a absorção de ergosterol exógeno (CHANG et al., 2007; ESPENSHADE; HUGHES, 2007; SERRATORE et al., 2018). Leveduras respondem à depleção de ergosterol sinalizando mudanças estruturais na parede celular (SERRATORE et al., 2018). O aumento da expressão de *ERG11* está relacionado com resistência a antifúngicos, mais especificamente aos azóis. Estudos em *Candida* spp. demonstraram que cepas resistentes ao azóis apresentam uma expressão de *ERG11* aumentada (FENG et al., 2016, 2017; PAUL et al., 2021).

Uma análise proteômica demonstrou um aumento de *ERG11* em leveduras de *P. brasiliensis* submetidas a baixas concentrações de oxigênio (OLIVEIRA et al., 2021), resultado que corrobora com nossos achados no ensaio de qPCR no qual houve um aumento da expressão de *ERG11* em resposta a hipóxia, sugerindo a possibilidade das leveduras de *P. brasiliensis* não utilizarem essa via para a adaptação à hipóxia, no entanto esse aumento poderia auxiliar a aumentar a resistência

a antifúngicos (Figura 6B), o que nos levou a avaliar a suscetibilidade de leveduras de *P. brasilienses* submetidas a hipoxia ao antifúngico fluconazol. Os resultados obtidos demonstraram que ambientes deficientes de oxigênio tornam as leveduras de *P. brasiliensis* menos suscetíveis a antifúngico (Figura 11). Um perfil de resposta a hipoxia semelhante acontece em *A. fumigatus*, visto que a redução dos níveis de oxigênio aumenta a sensibilidade a antifúngicos (KOWALSKI et al., 2020) e a deleção do gene *SrbA*, homólogo da *SREBP*, aumentou significativamente a suscetibilidade aos antifúngicos fluconazol e voriconazol (WILLGER et al., 2012). De maneira geral, *ERG11* e *SrbA* já se demonstraram importantes para a adaptação a hipoxia, virulência fúngica e na resistência a azóis. Em conjunto, nossos dados sugerem que as células leveduriformes de *P. brasiliensis* utilizam da modulação desses genes para adaptar a privação de oxigênio no tecido do hospedeiro e levam a uma menor sensibilidade a ação antifúngica dos azólicos.

Outro aspecto abordado neste trabalho foi a modulação de componentes da parede celular no fungo cultivado em baixas concentrações de oxigênio. A modulação da parede celular é um mecanismo importante utilizado por células fúngicas para evadir da resposta imune do hospedeiro (GIUSIANO, 2021). *C. albicans* e *A. fumigatus* apresentam perfis de modulação de componentes de parede celular distintos para se adaptar a ambientes com deficiência de oxigênio (CHILDERS et al., 2020; PRADHAN et al., 2018; RASTOGI et al., 2020; SHEPARDSON et al., 2013). Diante disso, neste trabalho foi realizada uma análise do perfil de crescimento de *P. brasiliensis* submetido à hipoxia na presença de agentes estressores da parede celular como CFW e Congo Red (Figura 4), que demonstrou recuperação do crescimento fúngico quando foram submetidos a privação de oxigênio por 5 h. Esse resultado nos chamou atenção devido a resistência dessas leveduras sob estresses

que causam dano a quitinas e glucanas, moléculas majoritariamente presentes na parede celular das leveduras de *P. brasiliensis* (PUCCIA; VALLEJO; LONGO, 2016). Esse resultado nos levou a avaliar se há alguma alteração na expressão de genes relacionados à síntese da parede celular.

As quitinas são componentes da parede celular que representam 43% do peso seco da parede celular em leveduras do gênero *Paracoccidioides* (NINO-VEGA et al., 2000). Ensaios de RT-qPCR foram realizados para genes relacionados à síntese de quitinas. *CHT3* é uma quitinase envolvida no remodelamento de quitinas na parede celular de fungos (MCCREATH; SPECHT; ROBBINS, 1995). Em *C. albicans* esse gene é um regulador em condições de estresse relacionados a parede celular (DÜNKLER; WENDLAND, 2007). O gene *CHS4* é uma quitina sintase com um papel importante na polimerização de quitinas (NIÑO-VEGA; CARRERO; SAN-BLAS, 2004). Em *Penicillium chrysogenum*, esse gene se mostrou essencial para a manutenção morfológica das células fúngicas (LIU et al., 2013). Por outro lado, o gene *CHS3* é uma quitina sintase envolvida na síntese da maioria das quitinas encontradas na parede celular dos fungos (LUU et al., 2019). Em *Saccharomyces cerevisiae* a inibição ou dano de  $\beta$ -glucana leva ao aumento da expressão de *CHS3* (GARCÍA-RODRIGUEZ et al., 2000). Nossos resultados mostram um aumento da expressão desses genes envolvidos na síntese, remodelamento e manutenção de quitinas conforme aumenta o tempo do estresse gerado por baixas concentrações de oxigênio (Figura 6A). O que é consistente com dados da literatura que mostram que as células fúngicas aumentam a síntese de quitina para superar o comprometimento da integridade da parede celular (JUNG et al., 2017; WALKER et al., 2008). Esses dados sugerem que a síntese de quitina pode ser um mecanismo para a adaptação à hipóxia (Figura 6A).

Ainda sobre a modulação de componentes da parede celular, sabe-se que há um mascaramento na exposição de  $\beta$ -glucanas na parede celular de *C. albicans* quando submetida a baixas concentrações de oxigênio (CHILDERS et al., 2020; PRADHAN et al., 2018). Em contrapartida, em *A. fumigatus*, a resposta à hipóxia se dá com o aumento da exposição de  $\beta$ -glucanas na parede celular desse fungo (SHEPARDSON et al., 2013). Em *P. brasiliensis* a parede celular é composta majoritariamente por  $\alpha$ -glucanas (VILLALOBOS-DUNO et al., 2013), nossos dados mostram aumento da expressão de *AGN1* e *AMY1*, genes relacionados com a manutenção e síntese de  $\alpha$ -glucana (CAMACHO et al., 2012; MARION et al., 2006; VILLALOBOS-DUNO et al., 2013), conforme aumenta o tempo em hipóxia (Figura 5B). Ao passo que genes envolvidos na síntese de  $\beta$ -glucanas, como *FKS1*, responsável pela síntese de  $\beta$ -(1,3)-glucana (HEALEY et al., 2020), apresentou redução de sua expressão em resposta à hipóxia (Figura 5C). *KRE6*, importante no processo de síntese de  $\beta$ -(1,6)-glucanas (HAN et al., 2019), tem um aumento de sua expressão relativa em relação ao controle. Outro gene com aumento da expressão na presença de estresse gerado por privação de oxigênio foi o *PHR2*, gene importante na virulência fúngica e manutenção da parede celular (DEGANI; POPOLO, 2019). *GEL3* faz parte da família das transglicosidades (*GH72*), em *P. brasiliensis* está envolvido no processo de alongamento das cadeias de  $\beta$ -(1,3)-glucana (KAMEI et al., 2013) e demonstrou um aumento importante sob hipóxia (Figura 5D). Em *Neurospora crassa*, foi demonstrado que a família *GH72* tem um papel importante na modulação das cadeias de  $\beta$ -(1,3)-glucana, porém não está envolvida na inserção dessas  $\beta$ -glucanas nas parede celular, atuando na inserção de glicoproteínas. Diante disso, o aumento da expressão de genes envolvidos na síntese de  $\beta$ -glucana demonstrado em nossos resultados, pode ser um mecanismo de compensação relacionado a redução da

exposição de  $\beta$ -glucanas da parede celular fúngica (AO; FREE, 2017). De modo geral, esses dados sugerem uma modulação nos açúcares de parede, reduzindo a exposição de  $\beta$ -glucanas e aumentando a de  $\alpha$ -glucanas em leveduras de *P. brasiliensis* submetidas a hipóxia (Figura 5 e 6).

A infecção por fungos do gênero *Paracoccidoides* levam ao recrutamento de células do sistema imune do hospedeiro para tentar impedir o crescimento de replicação do patógeno. O reconhecimento das células fúngicas pelo hospedeiro acontece devido aos PRRs que vão reconhecer os PAMPs expostos pelos patógenos. A Dectina-1 faz parte do grupo de receptores de lectina do tipo C (CLR), sendo um receptor crucial para a imunidade protetora contra fungos, reconhecendo especificamente as  $\beta$ -glucanas (DE QUAGLIA E SILVA et al., 2019; FERIOTTI et al., 2015; GOODRIDGE; WOLF; UNDERHILL, 2009). As quitinas são moléculas reconhecidas pelo hospedeiro através de TLR-2 que induz a produção de citocinas e recrutamento de células fagocíticas (ELIEH ALI KOMI; SHARMA; DELA CRUZ, 2018). Acredita-se que as mananas, porção mais externa da parede celular de leveduras de *P. brasiliensis* (CHAVES et al., 2021; PUCCIA et al., 2011), tem uma função protetiva, mascarando as moléculas imunogênicas e protegendo as células fúngicas do reconhecimento imunológico (YADAV et al., 2020).

Nossa análise de citometria de fluxo (Figura 7), utilizando Dectina-1 para reconhecimento de  $\beta$ -glucanas, demonstrou redução da marcação das leveduras após 24 h sob baixas concentrações de oxigênio, indicando menor exposição de  $\beta$ -glucanas na parede celular de *P. brasiliensis*, o que corrobora com a modulação de gene envolvidos na síntese de  $\beta$ -glucanas e  $\alpha$ -glucanas vistas por RT-qPCR. Em relação as quitinas e mananas, a hipóxia não demonstrou diferenças significativas na quantificação dessas moléculas. Em conjunto, esses achados evidenciam a hipótese

de que células leveduriformes de *P. brasiliensis* modulam açúcares de parede em resposta ao estresse gerado por baixas concentrações de oxigênio.

Segundo estudo de Pradhan et al. (2018), há uma modulação de  $\beta$ -glucana na parede celular de *C. albicans* dependente da via de cAMP/PKA em resposta a privação de oxigênio. Além disso, essa via é importante para a virulência, metabolismo e resposta ao estresse (CAO et al., 2017; FANNING et al., 2012). Essa via também está relacionada com a integridade da parede celular (ZHU et al., 2017). Em *C. neoformans* houve comprometimento da via de cAMP-PKA em resposta a deleção de diversos genes envolvidos com a integridade da parede celular (DONLIN et al., 2014). Neste trabalho realizamos ensaio para avaliar se a via de cAMP/PKA está envolvida na modulação de  $\beta$ -glucanas da parede celular de *P. brasiliensis*. Os resultados apresentaram redução da via cAMP/PKA conforme aumenta o tempo sob hipóxia, sugerindo que nas condições testadas que a via cAMP/PKA não está envolvida nesse processo (Figura 9A e 9B). A inatividade da via cAMP-PKA aumenta o acúmulo de carboidratos de armazenamento, como glicogênio e trealose (SCHMELZLE et al., 2004), com isso, como ensaio complementar, foi avaliado o acúmulo de glicogênio (Figura 9C), que também aumentou em relação ao tempo sob hipóxia, reafirmando a redução da atividade de PKA sob essa condição.

Sabendo que as  $\beta$ -glucanas são importantes para reconhecimento de patógenos fúngicos e ativação da cascata imunológica (DE QUAGLIA E SILVA et al., 2019), avaliamos também a interação entre macrófagos e células leveduriformes de *P. brasiliensis* sob hipóxia (Figura 10). Apesar de não haver diferença significativa no índice fagocítico (Figura 10A), as leveduras submetidas a hipóxia por 5 h apresentaram crescimento maior em relação ao controle (Figura 10B). Esse resultado demonstra que células submetidas a baixas concentrações de oxigênio possuem uma

resistência maior ao ambiente estressor promovido pelo macrófago. Em *C. albicans*, ambientes com baixas concentrações de oxigênio levam ao mascaramento de  $\beta$ -glucanas e a uma evasão da resposta imune (PRADHAN et al., 2018). Em *P. brasiliensis* o reconhecimento imunológico não parece ser afetado, porém a parede celular desse fungo já é composta majoritariamente de  $\alpha$ -glucanas (PUCCIA et al., 2011), no entanto, o mascaramento de  $\beta$ -glucanas pode não ter sido expressivo o suficiente para reduzir o reconhecimento do macrófagos, visto que já é uma molécula naturalmente restrita na parede celular de leveduras de *P. brasiliensis*. Em contrapartida, a resistência ao estresse causado pelo macrófago quando submetido à hipóxia (Figura 10B) nos leva a associar aos mecanismos de resistência fúngica aos estresses causados dentro do granuloma, ainda pouco conhecido, mas que podem levar a recidivas da doença (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

Em resumo os dados obtidos durante esse trabalho, contribuíram para o melhor entendimento de como as leveduras de *P. brasiliensis* se comportam frente a privação de oxigênio. Sendo possível observar que a hipóxia gera modulação na parede celular que leva a uma possível evasão da resposta imune, além de uma resistência a antifúngico. Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar melhor a resposta de células de *P. brasiliensis* submetidas a baixas concentrações de oxigênio.

## 6. CONCLUSÕES

- Ambientes com baixas concentrações de oxigênio aumenta expressão de genes envolvidos na regulação de  $\alpha$ -glucanas e reduz a expressão de genes relacionados com síntese de  $\beta$ -glucanas;
- Há um mascaramento de  $\beta$ -glucanas na parede celular de *P. brasiliensis* quando submetidos à hipóxia;
- Leveduras de *P. brasiliensis* apresentam uma resistência à fagocitose quando submetidas à hipóxia;
- A via de cAMP-PKA não parece estar envolvida na modulação dos componentes de parede celular de leveduras de *P. brasiliensis* sob baixas concentrações de oxigênio;
- Células leveduriformes de *P. brasiliensis* apresentam uma menor sensibilidade a Fluconazol quando cultivadas sob limitação de oxigênio.

## REFERÊNCIAS

ACORCI, M. J. et al. Inhibition of Human Neutrophil Apoptosis by *Paracoccidioides brasiliensis*: Role of Interleukin-8. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 69, n. 2, p. 73–79, fev. 2009.

ALMEIDA, S. M. DE. Central Nervous System Paracoccidioidomycosis: an overview. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 2, p. 126–133, abr. 2005.

ALSPAUGH, J. A. et al. Adenylyl cyclase functions downstream of the G $\alpha$  protein Gpa1 and controls mating and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v. 1, n. 1, p. 75–84, fev. 2002.

AO, J.; FREE, S. J. Genetic and biochemical characterization of the GH72 family of cell wall transglycosylases in *Neurospora crassa*. **Fungal genetics and biology : FG & B**, v. 101, p. 46–54, abr. 2017.

ARANTES, T. D. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* AND *Paracoccidioides lutzii*, A SECRET LOVE AFFAIR. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. suppl 19, p. 25–30, 1 set. 2015.

BAGAGLI, E. et al. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 6, n. 5, p. 344–351, set. 2006.

BHABHRA, R.; ASKEW, D. S. Thermotolerance and virulence of *Aspergillus fumigatus*: Role of the fungal nucleolus. **Medical Mycology**, v. 43, n. SUPPL.1, p. 87–93, 2005.

BIEN, C. M.; ESPENSHADE, P. J. Sterol Regulatory Element Binding Proteins in Fungi: Hypoxic Transcription Factors Linked to Pathogenesis. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 3, p. 352–359, mar. 2010.

BLATZER, M. et al. SREBP Coordinates Iron and Ergosterol Homeostasis to Mediate Triazole Drug and Hypoxia Responses in the Human Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus*. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 12, p. e1002374, 1 dez. 2011.

BOCCA, A. L. et al. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. **Future Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 1177–1191, set. 2013.

BOK, J. W.; KELLER, N. P.; TSITSIGIANNIS, D. I. Real-Time and Semiquantitative RT-PCR Methods to Analyze Gene Expression Patterns During *Aspergillus*-Host Interactions. In: **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. [s.l.] Humana Press, 2009. v. 470p. 151–167.

BONIFAZ, A.; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, D.; PERUSQUÍA-ORTIZ, A. M. Endemic systemic mycoses: coccidioidomycosis, histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and blastomycosis. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 9, n. 9, p. 705–715, set. 2011.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.

BRUMMER, E. et al. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 8, p. 2289–2294, ago. 1989.

BURGAIN, A. et al. Metabolic Reprogramming in the Opportunistic Yeast *Candida albicans* in Response to Hypoxia. **mSphere**, v. 5, n. 1, 26 fev. 2020.

CALICH, V. L. G. et al. Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 53, n. 1, p. 1–7, jun. 2008.

CAMACHO, E. et al. Expression of *Paracoccidioides brasiliensis* AMY1 in a *Histoplasma capsulatum* amy1 Mutant, Relates an  $\alpha$ -(1,4)-Amylase to Cell Wall  $\alpha$ -(1,3)-Glucan Synthesis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e50201, 20 nov. 2012.

CAMACHO, E.; NIÑO-VEGA, G. A. *Paracoccidioides* Spp.: Virulence Factors and Immune-Evasion Strategies. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, p. 1–19, 2017.

CAO, C. et al. Global regulatory roles of the cAMP/PKA pathway revealed by phenotypic, transcriptomic and phosphoproteomic analyses in a null mutant of the PKA

catalytic subunit in *Candida albicans*. **Molecular microbiology**, v. 105, n. 1, p. 46–64, 24 jul. 2017.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage–response framework. **Journal of Water and Health**, v. 7, n. S1, p. S2–S18, 1 ago. 2009.

CASTILHO, D. G. et al. Recovery of the *Paracoccidioides brasiliensis* virulence after animal passage promotes changes in the antioxidant repertoire of the fungus. **FEMS yeast research**, v. 18, n. 2, p. 1–9, 2018.

CHAN, J.; FLYNN, J. A. The immunological aspects of latency in tuberculosis. **Clinical Immunology**, v. 110, n. 1, p. 2–12, 2004.

CHANG, Y. C. et al. Sre1p, a regulator of oxygen sensing and sterol homeostasis, is required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 614–629, 2007a.

CHANG, Y. C. et al. Sre1p, a regulator of oxygen sensing and sterol homeostasis, is required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 614–629, maio 2007b.

CHAVES, A. F. A. et al. A conserved dimorphism-regulating histidine kinase controls the dimorphic switching in *Paracoccidioides brasiliensis*. **FEMS Yeast Research**, v. 16, n. 5, p. 1–10, 2016.

CHAVES, A. F. A. et al. Phosphosite-specific regulation of the oxidative-stress response of *Paracoccidioides brasiliensis*: a shotgun phosphoproteomic analysis. **Microbes and Infection**, v. 19, n. 1, p. 34–46, 1 jan. 2017.

CHAVES, A. F. A. et al. Updates in *Paracoccidioides* Biology and Genetic Advances in Fungus Manipulation. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 116, 4 fev. 2021.

CHAVES, E. G. A. et al. Proteomic Analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* During Infection of Alveolar Macrophages Primed or Not by Interferon-Gamma. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 5 fev. 2019.

CHEN, D. et al. The cAMP pathway is important for controlling the morphological

switch to the pathogenic yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Molecular Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 761–779, 2007.

CHILDERS, D. S. et al. Epitope Shaving Promotes Fungal Immune Evasion. **mBio**, v. 11, n. 4, p. 1–13, 7 jul. 2020.

CHUNG, D. et al. ChIP-seq and In Vivo Transcriptome Analyses of the *Aspergillus fumigatus* SREBP SrbA Reveals a New Regulator of the Fungal Hypoxia Response and Virulence. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 11, p. e1004487, 1 nov. 2014.

COLOMBO, A. L. et al. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. **Medical Mycology**, v. 49, n. 8, p. 1–14, 4 maio 2011.

COLTRI, K. C. et al. Paracoccin, a GlcNAc-binding lectin from *Paracoccidioides brasiliensis*, binds to laminin and induces TNF- $\alpha$  production by macrophages. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 3, p. 704–713, mar. 2006.

COONEY, N. M.; KLEIN, B. S. Fungal adaptation to the mammalian host: it is a new world, after all. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 511–516, 2008.

DA SILVA, J. DE F. et al. Advances and challenges in paracoccidioidomycosis serology caused by *Paracoccidioides* species complex: an update. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 84, n. 1, p. 87–94, 1 jan. 2016.

DE CAMARGO, Z. P. Serology of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4–5, p. 289–302, 24 abr. 2008.

DE CAMARGO, Z. P.; DE FRANCO, M. F. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Revista iberoamericana de micologia**, v. 17, n. 2, p. 41–8, jun. 2000.

DE CURCIO, J. S. et al. Cell wall synthesis, development of hyphae and metabolic pathways are processes potentially regulated by MicroRNAs produced between the morphological stages of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. DEC, 2018.

DE OLIVEIRA, H. C. et al. Importance of adhesins in virulence of *Paracoccidioides* spp. **Frontiers in microbiology**, v. 6, n. MAR, p. 303, 10 abr. 2015.

DE QUAGLIA E SILVA, J. C. et al. Involvement of the Dectin-1 Receptor upon the Effector Mechanisms of Human Phagocytic Cells against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Immunology Research**, v. 2019, p. 1–11, 6 fev. 2019.

DE SOUSA, L. O. et al. The dual role of SrbA from *Paracoccidioides lutzii*: a hypoxic regulator. **Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, 19 jun. 2021.

DEGANI, G.; POPOLO, L. The Glucan-Remodeling Enzyme Phr1p and the Chitin Synthase Chs1p Cooperate to Maintain Proper Nuclear Segregation and Cell Integrity in *Candida albicans*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 400, 22 nov. 2019.

DO CARMO SILVA, L. et al. Overview of Antifungal Drugs against Paracoccidioidomycosis: How Do We Start, Where Are We, and Where Are We Going? **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 300, 19 nov. 2020.

DONLIN, M. J. et al. Cross Talk between the Cell Wall Integrity and Cyclic AMP/Protein Kinase A Pathways in *Cryptococcus neoformans*. **mBio**, v. 5, n. 4, 29 ago. 2014.

DOS SANTOS, R. P.; MAIA, A. L.; GOLDANI, L. Z. Paracoccidioidomycosis in a Woman with Idiopathic Hirsutism. **Mycopathologia**, v. 158, n. 1, p. 57–59, jul. 2004.

DÜNKLER, A.; WENDLAND, J. *Candida albicans* Rho-Type GTPase-Encoding Genes Required for Polarized Cell Growth and Cell Separation. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 5, p. 844–854, maio 2007.

EGEN, J. G. et al. Macrophage and T Cell Dynamics during the Development and Disintegration of *Mycobacterial* Granulomas. **Immunity**, v. 28, n. 2, p. 271–284, fev. 2008.

ELIEH ALI KOMI, D.; SHARMA, L.; DELA CRUZ, C. S. Chitin and Its Effects on Inflammatory and Immune Responses. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 54, n. 2, p. 213–223, 1 abr. 2018.

ENE, I. V. et al. Cell Wall Remodeling Enzymes Modulate Fungal Cell Wall Elasticity and Osmotic Stress Resistance. **mBio**, v. 6, n. 4, 28 set. 2015.

ERWIG, L. P.; GOW, N. A. R. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 163–176, 2016.

ESPENSHADE, P. J.; HUGHES, A. L. Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. **Annual review of genetics**, v. 41, n. 1, p. 401–27, dez. 2007.

FANNING, S. et al. Functional control of the *Candida albicans* cell wall by catalytic protein kinase A subunit Tpk1. **Molecular Microbiology**, v. 86, n. 2, p. 284–302, out. 2012.

FÉLIX-CONTRERAS, C. et al. Proteomic analysis of *Sporothrix schenckii* cell wall reveals proteins involved in oxidative stress response induced by menadione. **Microbial Pathogenesis**, v. 141, p. 103987, 1 abr. 2020.

FENG, W. et al. ERG11 mutations and upregulation in clinical itraconazole-resistant isolates of *Candida krusei*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 62, n. 11, p. 938–943, 15 jun. 2016.

FENG, W. et al. Mutations and/or Overexpressions of ERG4 and ERG11 Genes in Clinical Azoles-Resistant Isolates of *Candida albicans*. **Microbial Drug Resistance**, v. 23, n. 5, p. 563–570, 1 jul. 2017.

FERIOTTI, C. et al. Expression of dectin-1 and enhanced activation of NALP3 inflammasome are associated with resistance to paracoccidioidomycosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. SEP, 3 set. 2015.

FERNANDES, F. F. et al. Impact of Paracoccin Gene Silencing on *Paracoccidioides brasiliensis* Virulence. **mBio**, v. 8, n. 4, p. e00537-17, set. 2017.

FERNANDES, L. et al. Transcriptional profile of ras1 and ras2 and the potential role of farnesylation in the dimorphism of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 2, p. 300–310, 2008.

FERREIRA, A. et al. Labial lesion in a Portuguese man returned from Brazil - The role of molecular diagnosis. **Travel medicine and infectious disease**, v. 22, p. 80–81, 1 mar. 2018.

FRANCO, M. et al. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from

soil. **Medical mycology**, v. 38, n. 3, p. 185–91, jun. 2000.

GARCÍA-RODRIGUEZ, L. . et al. Characterization of the chitin biosynthesis process as a compensatory mechanism in the fks1 mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 478, n. 1–2, p. 84–88, 28 jul. 2000.

GAUTHIER, G.; KLEIN, B. S. Insights into Fungal Morphogenesis and Immune Evasion: Fungal conidia, when situated in mammalian lungs, may switch from mold to pathogenic yeasts or spore-forming spherules. **Microbe (Washington, D.C.)**, v. 3, n. 9, p. 416–423, 1 set. 2008.

GIUSIANO, G. The Trojan Horse Model in *Paracoccidioides*: A Fantastic Pathway to Survive Infecting Human Cells. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, p. 605679, 11 fev. 2020.

GONÇALES, R. A. et al. Paracoccin Overexpression in *Paracoccidioides brasiliensis* Enhances Fungal Virulence by Remodeling Chitin Properties of the Cell Wall. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 224, n. 1, p. 164–174, 2 jul. 2021.

GOODRIDGE, H. S.; WOLF, A. J.; UNDERHILL, D. M.  $\beta$ -glucan recognition by the innate immune system. **Immunological Reviews**, v. 230, n. 1, p. 38–50, jul. 2009.

GOYAL, S. et al. The Interaction of Human Pathogenic Fungi With C-Type Lectin Receptors. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. JUN, 4 jun. 2018.

GRAHL, N. et al. Hypoxia and fungal pathogenesis: To air or not to air? **Eukaryotic Cell**, v. 11, n. 5, p. 560–570, 2012.

HAN, Q. et al. Blocking  $\beta$ -1,6-glucan synthesis by deleting KRE6 and SKN1 attenuates the virulence of *Candida albicans*. **Molecular Microbiology**, v. 111, n. 3, p. 604–620, 1 mar. 2019.

HARCUS, D. et al. Transcription Profiling of Cyclic AMP Signaling in *Candida albicans*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, n. 10, p. 4490–4499, out. 2004.

HARTMANN, T. et al. Shaping the fungal adaptome - Stress responses of *Aspergillus fumigatus*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, n. 5, p. 408–416, 2011.

HEALEY, K. R. et al. Differential Regulation of Echinocandin Targets Fks1 and Fks2 in *Candida glabrata* by the Post-Transcriptional Regulator Ssd1. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 3, p. 143, 21 ago. 2020.

HENINGER, E. et al. Characterization of the *Histoplasma capsulatum*-Induced Granuloma. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 5, p. 3303–3313, 2006.

HUGHES, A. L.; TODD, B. L.; ESPENSHADE, P. J. SREBP pathway responds to sterols and functions as an oxygen sensor in fission yeast. **Cell**, v. 120, n. 6, p. 831–842, 25 mar. 2005.

JUNG, S.-I. et al. Yeast casein kinase 2 governs morphology, biofilm formation, cell wall integrity, and host cell damage of *Candida albicans*. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0187721, 6 nov. 2017.

KAMEI, M. et al. Deletion and expression analysis of beta-(1,3)-glucanoyltransferase genes in *Neurospora crassa*. **Fungal genetics and biology : FG & B**, v. 52, p. 65–72, mar. 2013.

KETELUT-CARNEIRO, N. et al. Caspase-11-dependent IL-1 $\alpha$  release boosts Th17 immunity against *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLOS Pathogens**, v. 15, n. 8, p. e1007990, 19 ago. 2019.

KLOSTERMAN, S. J. et al. Genetics of morphogenesis and pathogenic development of *Ustilago maydis*. **Advances in genetics**, v. 57, p. 1–47, 2007.

KOWALSKI, C. H. et al. Fungal biofilm architecture produces hypoxic microenvironments that drive antifungal resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 36, p. 22473–22483, 8 set. 2020.

LACAZ, C. S. *Paracoccidioides brasiliensis*: Morphology; Evolutionary Cycle; Maintenance during Saprophytic Life; Biology, Virulence, Taxonomy. In: **Paracoccidioidomycosis**. [s.l.] CRC Press, 1994. p. 13–26.

LACERDA PIGOSSO, L. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* presents metabolic reprogramming and secretes a serine proteinase during murine infection. **Virulence**, v. 8, n. 7, p. 1417–1434, 3 out. 2017.

LIEBMANN, B. et al. cAMP signaling in *Aspergillus fumigatus* is involved in the regulation of the virulence gene pksP and in defense against killing by macrophages. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 269, n. 3, p. 420–435, 1 jun. 2003.

LIMA, P. DE S. et al. Transcriptional and Proteomic Responses to Carbon Starvation in *Paracoccidioides*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 5, p. e2855, 2014.

LIMA, P. DE S. et al. Characterization of the *Paracoccidioides* Hypoxia Response Reveals New Insights into Pathogenesis Mechanisms of This Important Human Pathogenic Fungus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 12, p. 1–25, 2015.

LIU, H. et al. Rgs1 regulates multiple G $\alpha$  subunits in Magnaporthe pathogenesis, asexual growth and thigmotropism. **The EMBO Journal**, v. 26, n. 3, p. 690–700, 7 fev. 2007.

LIU, H. et al. Morphological changes induced by class III chitin synthase gene silencing could enhance penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 8, p. 3363–3372, 25 abr. 2013.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2 $^{-\Delta\Delta CT}$  Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.

LUTZ, A. Uma micose pseudococcídica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das. **Brazil-Medico**, v. 22, n. 13, p. 121–124, 1908.

LUU, V.-T. et al. Development of conditional cell lysis mutants of *Saccharomyces cerevisiae* as production hosts by modulating OCH1 and CHS3 expression. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 5, p. 2277–2293, 31 mar. 2019.

MAITI, P. et al. Anaerobic culture on growth efficient bi-layered culture plate in a modified candle jar using a rapid and slow combustion system. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 173–176, abr. 2013.

MARION, C. L. et al. An  $\alpha$ -(1,4)-amylase is essential for  $\alpha$ -(1,3)-glucan production and virulence in *Histoplasma capsulatum*. **Molecular Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 970–983, nov. 2006.

MARQUES, S. A. Paracoccidioidomycosis: epidemiological, clinical, diagnostic and treatment up-dating. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 88, n. 5, p. 700–711, out. 2013.

MARTINEZ, R. New Trends in Paracoccidioidomycosis Epidemiology. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p. 1, 3 jan. 2017.

MATUTE, D. R. et al. Evidence for Positive Selection in Putative Virulence Factors within the *Paracoccidioides brasiliensis* Species Complex. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 9, p. e296, 17 set. 2008.

MCCREATH, K. J.; SPECHT, C. A.; ROBBINS, P. W. Molecular cloning and characterization of chitinase genes from *Candida albicans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 7, p. 2544–2548, 28 mar. 1995.

MENDES-GIANNINI, M. J. S. et al. Infection and apparent invasion of vero cells by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medical Mycology**, v. 32, n. 3, p. 189–197, jan. 1994.

MENDES-GIANNINI, M. J. S. et al. Pathogenesis II: Fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. **Medical Mycology**, v. 38, n. s1, p. 113–123, 1 jan. 2000.

MENDES-GIANNINI, M. J. S. et al. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 6, p. 1550–1559, maio 2006.

MF, N. et al. Quantitative Analysis of *Candida* Cell Wall Components by Flow Cytometry with Triple-Fluorescence Staining. **Journal of Microbiology and Modern Techniques**, v. 2, n. 1, p. 101, 31 out. 2017.

MIAO, H. et al. AMPK $\alpha$  Subunit Ssp2 and Glycogen Synthase Kinases Gsk3/Gsk31 are involved in regulation of sterol regulatory element-binding protein (SREBP) activity in fission yeast. **PLoS ONE**, v. 15, n. 2, 1 fev. 2020.

MILLINGTON, M. A. et al. Paracoccidioidomicose: abordagem histórica e perspectivas de implantação da vigilância e controle. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 27, n. esp, p. e0500002, 16 nov. 2018.

MIRAMÓN, P.; KASPER, L.; HUBE, B. Thriving within the host: *Candida* spp. interactions with phagocytic cells. **Medical microbiology and immunology**, v. 202, n. 3, p. 183–95, 25 jun. 2013.

MIRANDA, L. N. et al. *Candida* colonisation as a source for candidaemia. **Journal of Hospital Infection**, v. 72, n. 1, p. 9–16, 2009.

NAVARRO, M. V. et al. Effect of Nitrosative Stress on the S-Nitroso-Proteome of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1184, 4 jun. 2020.

NEMECEK, J. C.; WÜTHRICH, M.; KLEIN, B. S. Global control of dimorphism and virulence in fungi. **Science (New York, N.Y.)**, v. 312, n. 5773, p. 583–8, abr. 2006.

NETT, J. E.; ANDES, D. R. Antifungal Agents. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 51–83, 1 mar. 2016.

NINO-VEGA, G. A. et al. Differential expression of chitin synthase genes during temperature-induced dimorphic transitions in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medical Mycology**, v. 38, n. 1, p. 31–39, 2000.

NIÑO-VEGA, G. A.; CARRERO, L.; SAN-BLAS, G. Isolation of the CHS4 gene of *Paracoccidioides brasiliensis* and its accommodation in a new class of chitin synthases. **Medical Mycology**, v. 42, n. 1, p. 51–57, jan. 2004.

NISHIKAKU, A. S. et al. Osteopontin involvement in granuloma formation and in the severity of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Medical Mycology**, v. 47, n. 5, p. 495–507, jan. 2009a.

NISHIKAKU, A. S. et al. Nitric oxide participation in granulomatous response induced by *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 198, n. 2, p. 123–135, 10 maio 2009b.

NIZET, V.; JOHNSON, R. S. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 9, p. 609–617, set. 2009.

NOJOSA OLIVEIRA, L. et al. Characterization of a heme-protein responsive to hypoxia in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 144, n. December 2019, p. 103446, 2020.

NUNES, L. R. et al. Transcriptome Analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* Cells Undergoing Mycelium-to-Yeast Transition. **Eukaryotic cell**, v. 4, n. 12, p. 2115–2128, 2005.

O'REGAN, A.; BERMAN, J. S. Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. **International journal of experimental pathology**, v. 81, n. 6, p. 373–90, 25 dez. 2000.

OLIVEIRA, L. N. et al. iTRAQ-based proteomic analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* in response to hypoxia. **Microbiological Research**, v. 247, p. 126730, 1 jun. 2021.

PAGÁN, A. J.; RAMAKRISHNAN, L. The Formation and Function of Granulomas. **Annual Review of Immunology**, v. 36, n. 1, p. 639–665, 26 abr. 2018.

PAGLIARI, C. et al. Paracoccidioidomycosis: Cells expressing IL17 and Foxp3 in cutaneous and mucosal lesions. **Microbial Pathogenesis**, v. 50, n. 5, p. 263–267, maio 2011.

PARENTE-ROCHA, J. A. et al. In vitro, ex vivo and in vivo models: A comparative analysis of *Paracoccidioides* spp. proteomic studies. **Fungal Biology**, v. 122, n. 6, p. 505–513, 1 jun. 2018.

PARENTE, A. F. A. et al. The response of *Paracoccidioides* spp. to nitrosative stress. **Microbes and Infection**, v. 17, n. 8, p. 575–585, 1 ago. 2015.

PATTERSON, M. J. et al. Ybp1 and Gpx3 signaling in candida albicans govern hydrogen peroxide-induced oxidation of the cap1 transcription factor and macrophage escape. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 19, n. 18, p. 2244–2260, 20 dez. 2013.

PAUL, S. et al. Rapid detection of ERG11 polymorphism associated azole resistance in *Candida tropicalis*. **PLOS ONE**, v. 16, n. 1, p. e0245160, 13 jan. 2021.

PEYSSONAUX, C.; JOHNNSON, R. S. An Unexpected Role for Hypoxic Response: Oxygenation and Inflammation. **Cell Cycle**, v. 3, n. 2, p. 163–166, 28 fev. 2004.

PITANGUI, N. DE S. et al. Paracoccin: Purification and Validation of Its Lectin and

Enzymatic Properties. In: **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. [s.l.] Methods Mol Biol, 2020. v. 2132p. 139–149.

PRADHAN, A. et al. Hypoxia promotes immune evasion by triggering  $\beta$ -glucan masking on the *Candida albicans* cell surface via mitochondrial and cAMP-protein kinase A signaling. **mBio**, v. 9, n. 6, p. 1–18, 2018a.

PREECHASUTH, K. et al. Cell wall protection by the *Candida albicans* class I chitin synthases. **Fungal Genetics and Biology**, v. 82, p. 264–276, 1 set. 2015.

PUCCIA, R. et al. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. **Infection and Immunity**, v. 53, n. 1, p. 199–206, jul. 1986.

PUCCIA, R. et al. The *Paracoccidioides* Cell Wall: Past and Present Layers Toward Understanding Interaction with the Host. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. DEC, 2011.

PUCCIA, R.; VALLEJO, M. C.; LONGO, L. V. G. The Cell Wall-Associated Proteins in the Dimorphic Pathogenic Species of *Paracoccidioides*. **Current Protein & Peptide Science**, v. 18, n. 11, p. 1074–1089, 2016.

QUEIROZ-TELLES, F.; ESCUISSATO, D. Pulmonary Paracoccidioidomycosis. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 32, n. 06, p. 764–774, 13 dez. 2011.

RAM, A. F. J.; KLIS, F. M. Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2253–2256, 14 dez. 2006.

RAMAKRISHNAN, L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 5, p. 352–366, 20 maio 2012.

RASTOGI, S. K. et al. Ifu5, a WW domain-containing protein interacts with Efg1 to achieve coordination of normoxic and hypoxic functions to influence pathogenicity traits in *Candida albicans*. **Cellular Microbiology**, v. 22, n. 2, 17 fev. 2020.

RESTREPO, A. et al. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus

*Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infection and Immunity**, v. 46, n. 2, p. 346–353, 1984.

RESTREPO, A. et al. Pulmonary paracoccidioidomycosis. **Seminars in respiratory and critical care medicine**, v. 29, n. 2, p. 182–97, abr. 2008.

ROBBINS, N.; WRIGHT, G. D.; COWEN, L. E. Antifungal Drugs: The Current Armamentarium and Development of New Agents. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 5, 14 out. 2016.

RODRIGUES, A. M. et al. Immunoproteomic analysis reveals novel candidate antigens for the diagnosis of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii*. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 1–36, 1 dez. 2020.

ROSENBAACH, A. et al. Adaptations of *Candida albicans* for growth in the mammalian intestinal tract. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 7, p. 1075–1086, jul. 2010.

ROZPĘDOWSKA, E. et al. *Candida albicans*-a pre-whole genome duplication yeast - is predominantly aerobic and a poor ethanol producer. **FEMS Yeast Research**, v. 11, n. 3, p. 285–291, maio 2011.

SAN-BLAS, G. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medical Mycology**, v. 31, n. 2, p. 99–113, jan. 1993.

SANO, A. et al. Studies on the relationship between the pathogenicity of *Paracoccidioides brasiliensis* in mice and its growth rate under different oxygen atmospheres. **Mycopathologia**, v. 114, n. 2, p. 93–101, maio 1991.

SANTOS, L. A. et al. Virulence factors of *Paracoccidioides brasiliensis* as therapeutic targets: a review. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 113, n. 5, p. 593–604, 4 maio 2020a.

SANTOS, L. A. et al. Medication association and immunomodulation: An approach in fungal diseases and in particular in the treatment of paracoccidioidomycosis. **Acta Tropica**, v. 206, p. 105412, 1 jun. 2020b.

SCHMELZLE, T. et al. Activation of the RAS/Cyclic AMP Pathway Suppresses a TOR Deficiency in Yeast. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 1, p. 338–351, 1 jan. 2004.

SCHROEDER, L.; IKUI, A. E. Tryptophan confers resistance to SDS-associated cell membrane stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLOS ONE**, v. 14, n. 3, p. e0199484, 11 mar. 2019.

SERRATORE, N. D. et al. A novel sterol-signaling pathway governs azole antifungal drug resistance and hypoxic gene repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 208, n. 3, p. 1037–1055, 1 mar. 2018.

SESTARI, S. J. et al. Inhibition of protein kinase A affects *Paracoccidioides lutzii* dimorphism. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 1214–1220, 2018.

SETIADI, E. R. et al. Transcriptional Response of *Candida albicans* to Hypoxia: Linkage of Oxygen Sensing and Efg1p-regulatory Networks. **Journal of Molecular Biology**, v. 361, n. 3, p. 399–411, 2006.

SHANKAR, J. et al. Influence of 17 $\beta$ -estradiol on gene expression of *Paracoccidioides* during mycelia-to-yeast transition. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, 2011.

SHAPIRO, R. S.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Regulatory Circuitry Governing Fungal Development, Drug Resistance, and Disease. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n. 2, p. 213–267, 2011.

SHEPARDSON, K. M. et al. Hypoxia enhances innate immune activation to *Aspergillus fumigatus* through cell wall modulation. **Microbes and Infection**, v. 15, n. 4, p. 259–269, abr. 2013.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 715–740, 12 jul. 2017.

SOUTO, J. T. et al. Interferon- $\gamma$  and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Determine Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in Mice. **The American Journal of Pathology**, v. 156, n. 5, p. 1811–1820, maio 2000.

STICHTERNOOTH, C.; ERNST, J. F. Hypoxic adaptation by Efg1 regulates biofilm formation by *Candida albicans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n.

11, p. 3663–3672, 2009.

SYNNOTT, J. M. et al. Regulation of the hypoxic response in *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 11, p. 1734–1746, 2010.

TABORDA, C. P.; TRAVASSOS, L. R.; BENARD, G. Paracoccidioidomycosis. In: **Encyclopedia of Mycology**. [s.l.] Elsevier, 2021. v. 1p. 654–675.

TAMAYO, D. et al. *Paracoccidioides* spp. catalases and their role in antioxidant defense against host defense responses. **Fungal genetics and biology : FG & B**, v. 100, p. 22–32, 1 mar. 2017.

THIND, S. K.; TABORDA, C. P.; NOSANCHUK, J. D. Dendritic cell interactions with Histoplasma and *Paracoccidioides*. **Virulence**, v. 6, n. 5, p. 424–32, 4 jul. 2015.

TODD, B. L. et al. Sterol Regulatory Element Binding Protein Is a Principal Regulator of Anaerobic Gene Expression in Fission Yeast. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 7, p. 2817–2831, 1 abr. 2006.

TRISTÃO, F. S. M. et al. Th17-Inducing Cytokines IL-6 and IL-23 Are Crucial for Granuloma Formation during Experimental Paracoccidioidomycosis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. AUG, p. 949, 21 ago. 2017.

TSAI, M. C. et al. Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: Cellular composition and relative tissue oxygen tension. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 218–232, 2006.

TURISSINI, D. A. et al. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. **Fungal genetics and biology : FG & B**, v. 106, p. 9–25, 1 set. 2017.

VAN DAMME, P. A. et al. A case of imported paracoccidioidomycosis: an awkward infection in the Netherlands. **Medical Mycology**, v. 44, n. 1, p. 13–18, jan. 2006.

VIEIRA, G. DE D. et al. Paracoccidioidomycosis in a western Brazilian Amazon State: Clinical-epidemiologic profile and spatial distribution of the disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 1, p. 63–68, jan. 2014.

VILLALOBOS-DUNO, H. et al. Biochemical Characterization of *Paracoccidioides*

*brasiliensis*  $\alpha$ -1,3-Glucanase Agn1p, and Its Functionality by Heterologous Expression in *Schizosaccharomyces pombe*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. e66853, 25 jun. 2013.

WAGENER, J.; STRIEGLER, K.; WAGENER, N.  $\alpha$ - and  $\beta$ -1,3-glucan synthesis and remodeling. In: **Current Topics in Microbiology and Immunology**. [s.l.] Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2020. v. 425p. 53–82.

WAGNER, G. et al. Paracoccidioidomycosis Diagnosed in Europe—A Systematic Literature Review. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 157, 23 fev. 2021.

WALKER, L. A. et al. Stimulation of Chitin Synthesis Rescues *Candida albicans* from Echinocandins. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 4, p. e1000040, 4 abr. 2008.

WANG, Y. et al. Ras and Gpa2 Mediate One Branch of a Redundant Glucose Signaling Pathway in Yeast. **PLoS Biology**, v. 2, n. 5, p. e128, 11 maio 2004.

WILLGER, S. D. et al. Dsc Orthologs Are Required for Hypoxia Adaptation, Triazole Drug Responses, and Fungal Virulence in *Aspergillus fumigatus*. **Eukaryotic Cell**, v. 11, n. 12, p. 1557–1567, dez. 2012.

YADAV, B. et al. Differences in fungal immune recognition by monocytes and macrophages: N-mannan can be a shield or activator of immune recognition. **The Cell Surface**, v. 6, p. 100042, 1 dez. 2020.

YOSHIMI, A.; MIYAZAWA, K.; ABE, K. Function and Biosynthesis of Cell Wall  $\alpha$ -1,3-Glucan in Fungi. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 4, p. 63, 18 nov. 2017.

ZHU, W. et al. The cAMP-PKA Signaling Pathway Regulates Pathogenicity, Hyphal Growth, Appressorial Formation, Conidiation, and Stress Tolerance in *Colletotrichum higginsianum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUL, 25 jul. 2017.