



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa Biociências e Biotecnologias aplicadas à Farmácia

Nathália Ferreira Fregonezi

**Fatores de virulência do fungo *Histoplasma capsulatum*
envolvidos na formação de biofilmes**



Araraquara – SP

2020

Nathália Ferreira Fregonezi

Fatores de virulência do fungo *Histoplasma capsulatum* envolvidos na formação de biofilmes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em “Biociências e Biotecnologias aplicadas à Farmácia”

Orientadora: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida

Coorientador: Dr. Haroldo Cesar de Oliveira

Araraquara - SP

2020

F859f Fregonezi, Nathália Ferreira.
Fatores de virulência do fungo *Histoplasma capsulatum* envolvidos na formação de biofilmes / Nathália Ferreira Fregonezi. – Araraquara: [S.n.], 2020.
92 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Ana Marisa Fusco Almeida.

Coorientador: Haroldo Cesar de Oliveira.

1. Biofilmes. 2. *Histoplasma capsulatum*. 3. Fatores de virulência. 4. *Galleria mellonella*. I. Almeida, Ana Marisa Fusco, orient. II. Oliveira, Haroldo Cesar de, coorient. III. Título.

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

CAPES: 33004030081P7

Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Fatores de virulência do fungo *Histoplasma capsulatum* envolvidos na formação de biofilmes e na relação patógeno-hospedeiro

AUTORA: NATHÁLIA FERREIRA FREGONEZI

ORIENTADORA: ANA MARISA FUSCO ALMEIDA

COORIENTADOR: HAROLDO CESAR DE OLIVEIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ANA MARISA FUSCO ALMEIDA

Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. ALLAN JEFFERSON GUIMARÃES

Microbiologia e Parasitologia / Universidade Federal Fluminense

Dra. MARIA LUCIA TAYLOR DA CUNHA E MELLO

Department of Microbiology and Parasitology - School of Medicine / UNIVERSIDADE AUTÔNOMA DO MÉXICO-UNAM

Araraquara, 22 de setembro de 2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela capacidade que me tem dado para realizar tudo aquilo que Ele tem colocado de oportunidades em meu caminho e por sua graça em minha vida.

Agradeço aos meus pais, Rosângela e Edson, pela minha criação, com todo amor, paciência e dedicação, pelos ensinamentos e conselhos que foram fundamentais, e pelo exemplo que são para mim. Vocês tornam minha vida mais leve e fácil de ser vivida. Eu amo muito vocês.

Ao meu esposo, Marcel, pela paciência e conselhos, por sempre me apoiar, me ajudar a enxergar com clareza frente às decisões difíceis, por acreditar em mim quando eu mesma não fui capaz, e principalmente, pelo amor e cumplicidade de sempre. Que sorte a minha ter você.

Agradeço a toda minha família, e a família do meu esposo pelo apoio e incentivo.

Aos amigos do laboratório de Micologia Clínica e Núcleo de Proteômica: Ana Carolina, Angélica, Bianca, Carol (Faga), Carol Vaso, Carol Barcelos, Carol (Panta), Cláudia, Fran, Junya, Kayla, Lariane, Laranja (Patrícia), Larissa, Kelvin, Marina, Marcos, Niura, Paulo, Priscila, Rosângela e Samanta. Agradeço por cada cooperação nas dúvidas e nos experimentos, por todos os momentos compartilhados, e pelas confraternizações.

Agradeço à minha orientadora Ana Marisa, por todo apoio e paciência ao longo da realização desse trabalho, bem como pelas contribuições científicas, oportunidades, orientação e ensinamentos. Agradeço também à professora Maria José pela colaboração, apoio e disponibilidade em me ajudar sempre que necessário.

Agradeço à banca, representada pelo Prof Dr Allan Jefferson Guimarães e Profa Dra Maria Lucia Taylor da Cunha e Mello pela atenção na leitura do trabalho e também pelas contribuições.

Ao meu companheiro de caminhada acadêmica, que esteve comigo desde a graduação, passando por todos os “perrengues” de um quarto ano de biomedicina, que só quem passou, sabe, e esteve comigo também durante essa etapa de pós-graduação, ficando ao meu lado quando ninguém mais esteve e me incentivando a continuar. É cada lembrança boa ao seu lado, vai dar saudade, mas eu sei que ainda vamos construir muitas outras. Meu grande amigo confiante pessoal e profissional, Kelvin.

Agradeço a minha companheira e grande amiga, que tive o privilégio de conhecer durante o mestrado, Lariane. Foram muitos momentos juntas, incontáveis as risadas, e também as brigas. Gênio forte, nós duas, mas a amizade também. Que felicidade em dividir tantas memórias com você. Obrigada por todas as contribuições, sejam pessoais ou acadêmicas.

Jú (Junya), nem sei como agradecer por tanto. Obrigada pela paciência em me ensinar, e me explicar novamente até que eu conseguisse entender. Obrigada pelos momentos e lembranças

ótimas que você deixou desse período. Tenho profunda admiração pela sua seriedade e dedicação ao trabalho.

Agradeço também ao meu coorientador Haroldo, que na verdade foi muito mais que um coorientador, soube me ouvir em quantas situações pessoais e profissionais foram necessárias, assumiu junto comigo várias das minhas preocupações, me deu inúmeros conselhos, brigou comigo, me corrigiu, me direcionou, e foi fundamental para o êxito deste trabalho.

Agradeço a minha companheira de fofocas (brincadeira), de momentos de descontração mesmo em dias corridos a gente sempre deu um jeitinho para uma pausa para o café, obrigada por tantas trocas, pessoais e profissionais, Cláudia.

Agradeço também as meninas dos monoclonais, Fran, Má (Marina), Carol (Faga) e Bianca, adorei cada momento com vocês, nosso grupo junto era sempre motivo de festa e comemoração, que saudade que vai deixar. Vocês estão entre as melhores lembranças deixadas durante esse mestrado.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP) pelos serviços prestados. Em especial aos funcionários da sessão de pós-graduação pelo auxílio e paciência nas questões acadêmicas

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e, posteriormente, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - processo nº 2019/04882-4) pela bolsa de mestrado concedida.

A todos aqueles que, embora não citados, estiveram presentes nesses anos, deixo o meu grato muito obrigada.

RESUMO

O fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum* é o agente etiológico da histoplasmose, uma micose respiratória e sistêmica com casos distribuídos por todo o mundo. A patogenia da histoplasmose ocorre como resultado da inalação dos microconídeos da fase micelial, que chegam primariamente aos pulmões, onde se transformam em leveduras, e, em seguida, podem se disseminar para outros órgãos. Diversos mecanismos podem estar envolvidos no processo de patogenia, permitindo o crescimento frente às diversas condições impostas pelo hospedeiro. Dentre estes, destaca-se os mecanismos para sobrevivência intracelular, e mais recentemente descrita, a capacidade de formar biofilmes. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi avaliar o impacto da passagem por biofilmes na adesão e virulência das cepas EH-315 e G186A do fungo *H. capsulatum*, além de avaliar o papel de diversas proteínas no estabelecimento desses biofilmes e na interação com o hospedeiro utilizando modelos *in vitro* e *in vivo* de infecção. Para a avaliação do perfil de virulência dos biofilmes durante a infecção, foram utilizadas as linhagens celulares A549 (epitelial pulmonar humano), J774 e RAW 264.7 (macrófagos murinos) e o modelo animal alternativo *Galleria mellonella*. Além disso, os biofilmes foram avaliados com relação a biomassa total, produção de matriz e atividade metabólica após o bloqueio das proteínas Enolase, 14-3-3, PL02996 e GAPDH, descritas como adesinas e importantes fatores de virulência para o gênero *Paracoccidioides* spp., e da proteína Hsp60, molécula de ligação de *H. capsulatum* aos macrófagos do hospedeiro, utilizando anticorpos específicos. O bloqueio das proteínas com seus respectivos anticorpos também foi utilizado como estratégia para avaliar a influência das proteínas na interação com o modelo *G. mellonella*. De acordo com os resultados obtidos, a cepa EH-315 demonstrou maior capacidade de interação com as células epiteliais pulmonares (A549) do que a cepa G186A, tanto após o cultivo planctônico ($p < 0,0001$) quanto após a passagem por biofilme ($p < 0,05$). Além disso, a passagem por biofilme aumentou a capacidade de interação em 32,26% para a cepa G186A, e 20,89% para a cepa EH-315. A interação com macrófagos também foi influenciada após a passagem por biofilme, tanto na interação com as células RAW 264.7, com aumento de 12,75% para a cepa G186A e 13,94% para a cepa EH-315, quanto na capacidade de proliferação intracelular em células J774, com aumento de 76,77% na proliferação após a passagem por biofilme na cepa EH-315. Apesar de ser capaz de estabelecer a infecção e reduzir a sobrevivência no modelo *G. mellonella*, não houve diferença significativa entre as curvas de sobrevivência das infecções com o fungo em cultivo planctônico e recuperado do biofilme. Entretanto, a passagem por biofilme induziu morte de forma mais precoce, e redução significativa ($p < 0,05$) do número de hemócitos quando comparada com as larvas infectadas com o cultivo planctônico na cepa EH-315. Com relação à influência das proteínas nos biofilmes, o bloqueio das proteínas Enolase, 14-3-3, PL02996, Hsp60 e GAPDH ocasionou redução significativa da biomassa, conteúdo polissacarídico e atividade metabólica, demonstrando que são importantes para o processo de consolidação dos biofilmes. Com exceção da proteína 14-3-3 para a cepa EH-315, essas proteínas também parecem desempenhar papel importante para o estabelecimento da infecção no modelo alternativo *G. mellonella*, uma vez que o bloqueio levou ao aumento da sobrevivência das larvas ($p < 0,05$). Mais estudos ainda precisam ser feitos para comprovar o papel dessas proteínas como novos fatores de virulência de *H. capsulatum*, porém, as proteínas estudadas demonstraram ser importantes na adesão ao substrato e formação dos biofilmes de *H. capsulatum*, e também para interação com o hospedeiro. Considerando a importância dos biofilmes do ponto de vista clínico, e a importância dos diferentes ligantes presentes no fungo interagindo com seus receptores no hospedeiro para o destino intracelular de *H. capsulatum*, o conhecimento do repertório de moléculas de superfície envolvidas com o processo de

formação de biofilmes, bem como nas interações com as células do hospedeiro pode contribuir para uma melhor compreensão da biologia celular e virulência de *H. capsulatum*, além de providenciar novos alvos para serem explorados com abordagens antifúngicas. Além disso, os resultados encontrados demonstram evidências genéticas de similaridade em sequência, que sugerem a mesma atividade entre os fatores de virulência de *Paracoccidioides* spp. e *H. capsulatum*. Evidenciamos também a utilização do modelo *G. mellonella* para um posterior aprofundamento na avaliação da patogênese e perfil de resposta imunológica desencadeada por esse fungo.

Palavras-chave: Biofilmes, *Histoplasma capsulatum*, fatores de virulência, *Galleria mellonella*

ABSTRACT

The dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum* is the etiological agent of histoplasmosis, a respiratory and systemic mycosis with worldwide distribution. The pathogenesis of histoplasmosis occurs as a result of microconidia inhalation, which primarily affects the lungs, where they turn into the yeast phase and can spread to other organs. Several mechanisms could be involved in the pathogenesis process, allowing growth in the face of host defense. Among these, the mechanisms for intracellular survival stand out, and, more recently described, the ability to form biofilms could contribute to virulence. Thus, this study aimed to evaluate the impact of the biofilms on the adhesion and virulence of the *H. capsulatum* EH-315 and G186A strains. Also, we evaluate the role of several proteins in the establishment of these biofilms and in the interaction with the host using in vitro and in vivo models of infection. To assess the virulence profile of biofilms during infection, cell lines A549 (human alveolar basal epithelial cells), J774 and RAW 264.7 (murine macrophages), and the alternative animal model *Galleria mellonella* were used. In addition, biofilms were evaluated for total biomass, matrix production, and metabolic activity after blocking the proteins Enolase, 14-3-3, PL02996, and GAPDH, described as adhesins and virulence factors for *Paracoccidioides* spp., and the protein Hsp60, an important binding molecule of *H. capsulatum* to host macrophages, using specific antibodies. The blockage of proteins with their respective antibodies was also used as a strategy to evaluate the influence of these proteins on the interaction with the *G. mellonella* model. According to the results, the EH-315 strain demonstrated a higher ability to interact with pulmonary epithelial cells (A549) than the G186A strain, in both planktonic ($p < 0.0001$) and biofilm ($p < 0.05$) cultures. Besides, the passage through biofilm increased the interaction capacity by 32.26% for the G186A strain, and 20.89% for the EH-315 strain. The interaction with macrophages was also influenced after passing through the biofilm, with an increase of 12.75% for the G186A strain and 13.94% for the EH-315 strain in RAW 264.7 cells, as well as in the intracellular proliferation capacity in J774 cells, with a 76.77% increase in proliferation after passage through biofilm in the EH-315 strain. Despite being able to establish the infection and reduce survival in the *G. mellonella* model, there was no significant difference between the survival curves of the infections with the fungus in planktonic and recovered from the biofilm. However, the passage through biofilm induced earlier death, in addition to inducing a significant reduction ($p < 0.05$) in the number of hemocytes when compared to larvae infected with planktonic cultivation in the EH-315 strain. Regarding the influence of proteins on biofilms, blocking Enolase, 14-3-3, PL02996, Hsp60 and GAPDH caused a significant reduction in biomass, polysaccharide content, and metabolic activity, demonstrating that they are important for the process of consolidation of biofilms. Except for the 14-3-3 protein for the EH-315 strain, these proteins also appear to play an important role in establishing infection in the alternative model *G. mellonella*, since the blockade led to increased larval survival ($p < 0.05$). Further studies still need to be done to prove the role of these proteins as new virulence factors for *H. capsulatum*. However, the studied proteins proved to be important in the adhesion to the substrate and formation of *H. capsulatum* biofilms, and also for interaction with the host. Considering the clinical aspects of the biofilms, and the importance of the different ligands and their receptors in the host for the intracellular fate of *H. capsulatum*, the knowledge of the repertoire of surface molecules involved in the biofilm formation, as well as interacting with host cells, can contribute to a better understanding of the cell biology and virulence of *H. capsulatum*, in addition to providing new targets to be explored with antifungal approaches. Also, the results demonstrate the correlation that may exist between the virulence factors of *Paracoccidioides* spp. and *H. capsulatum*. We also highlight the use of the *G.*

mellonella model for further study of the pathogenesis and profile of the immune response triggered by this fungus.

Keywords: Biofilms, *Histoplasma capsulatum*, virulence factors, *Galleria mellonella*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Distribuição geográfica dos casos de histoplasmose no Brasil entre 1939-2018.	19
Figura 2 Cinética de formação dos biofilmes das cepas EH-315 e G186A estabelecida pela quantificação da atividade metabólica pela redução do XTT.....	36
Figura 3 Microscopia óptica dos biofilmes das cepas EH-315 e G186A de <i>H. capsulatum</i> nos tempos de 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas.	36
Figura 4 Biofilme maduro (144 horas) das cepas EH-315 (A) e G186A (B) e a presença de hifas (C) no biofilme da cepa EH-315.....	37
Figura 5 Porcentagem de interação das cepas EH-315 e G186A de <i>H. capsulatum</i> em células epiteliais pulmonares (A549) em sua forma planctônica e recuperada do biofilme.	38
Figura 6 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) após 1 hora de interação das cepas EH-315 (A) e G186A (B) de <i>H. capsulatum</i> com células epiteliais pulmonares A549.....	39
Figura 7 Porcentagem de interação das cepas EH-315 e G186A de <i>H. capsulatum</i> com macrófagos murinos (RAW 264.7) em sua forma planctônica e recuperada do biofilme.	40
Figura 8 Multiplicação intracelular da cepa EH-315 em sua forma planctônica e recuperada do biofilme.....	41
Figura 9 Curva de sobrevivência das larvas de <i>G. mellonella</i> após infecção com as cepas EH-315 (A) e G186A (B) de <i>H. capsulatum</i>	44
Figura 10 Densidade de hemócitos das larvas de <i>G. mellonella</i> após 3h de infecção com as cepas EH-315 (A) e G186A (B) nas formas: planctônica e leveduras recuperadas do biofilme	45
Figura 11 Melanização das larvas de <i>G. mellonella</i> após 3 h de infecção com as cepas G186A (B, C, D) e EH-315 (E, F, G).....	46
Figura 12 Melanização das larvas de <i>G. mellonella</i> após 3h de infecção com as cepas G186A (B, C) e EH-315 (D, E) na forma planctônica e recuperada do biofilme em comparação como controle PBS (A).	47
Figura 13 Eletroforese das proteínas totais da cepa G186A (A) e EH315 (B) de <i>H. capsulatum</i> em gel de poliacrilamida 12%	48
Figura 14 Reconhecimento de proteínas em extratos proteicos de G186A e EH-315 de <i>H. capsulatum</i> utilizando os anticorpos anti-Enolase (1), anti-14-3-3 (2), anti-PL02996 (3) e anti-MLT (4).	49
Figura 15 Alinhamento da sequência da proteína PL02996 em <i>Paracoccidioides</i> e <i>H. capsulatum</i> . Análise do alinhamento das sequências homólogas de <i>P. lutzii</i> (PADG_02996), <i>P. brasiliensis</i> Pb18 (PADG_02867), <i>P. americana</i> Pb03 (PABG_00455) e as cepas G186AR	

(HCBG_03622), G217B (AGR95_064810), NAm1 (HCAG_01820) e H88 (HCEG_02581) de *H. capsulatum* utilizando ClustalW com a imagem de alinhamento gerada no Jalview..... 51

Figura 16 Microscopia Confocal da proteína PL02996 nas cepas G186A e EH-315 de *H. capsulatum*..... 53

Figura 17 Alinhamento da sequência da proteína Enolase da cepa Pb18 de *P. brasiliensis* (PADG_04059) com a proteína homóloga encontrada na cepa G186A de *H. capsulatum* (HCBG_00056). Análise do alinhamento das sequências homólogas utilizando *ClustalW* com a imagem de alinhamento gerada no *Jalview*. 55

Figura 18 Alinhamento da sequência da proteína 14-3-3 da cepa Pb18 de *P. brasiliensis* (PADG_04440) com a proteína homóloga encontrada na cepa G186A de *H. capsulatum* (HCBG_00457). Análise do alinhamento das sequências homólogas utilizando *ClustalW* com a imagem de alinhamento gerada no *Jalview*. 56

Figura 19 Microscopia confocal das proteínas 14-3-3 e Enolase nas cepas EH-315 (A) e G186A (B) de *H. capsulatum* 57

Figura 20 Quantificação da biomassa total (cristal violeta), polissacarídeos (safranina) e atividade metabólica (XTT) dos biofilmes de 144h das cepas EH-315 (branco) e G186A (cinza) após tratamento com os anticorpos anti-Enolase, anti-14-3-3, anti-PL02996, anti-Hsp60 e anti-GAPDH..... 59

Figura 21 Quantificação da biomassa total (cristal violeta), polissacarídeos (safranina) e atividade metabólica (XTT) dos biofilmes de 144h das cepas EH-315 (branco) e G186A (cinza) após tratamento com o anticorpo controle (IgG) e com soro de coelho não imune (SNI). 60

Figura 22 Microscopia Confocal dos biofilmes da cepa EH-315 de *H. capsulatum*. Controle (A); tratados com anticorpos: anti-enolase (B), anti-14-3-3 (C), anti-PL02996 (D), anti-Hsp60 (E) e anti-GAPDH (F). 62

Figura 23 Microscopia Confocal dos biofilmes da cepa G186A de *H. capsulatum*. Controle (A); tratados com anticorpos: anti-enolase (B), anti-14-3-3 (C), anti-PL02996 (D), anti-Hsp60 (E) e anti-GAPDH (F). 63

Figura 24 Microscopia Eletrônica de Varredura dos biofilmes da cepa EH-315 de *H. capsulatum*. Controle (A); tratados com anticorpos: anti-Enolase (B), anti-14-3-3 (C), anti-PL02996 (D), anti-Hsp60 (E) e anti-GAPDH (F). Setas amarelas indicam a presença de matriz. 64

Figura 25 Microscopia Eletrônica de Varredura dos biofilmes da cepa G186A de *H. capsulatum*. Controle (A); tratados com anticorpos: anti-Enolase (B), anti-14-3-3 (C), anti-PL02996 (D), anti-Hsp60 (E) e anti-GAPDH (F). Setas amarelas indicam a presença de matriz. 65

Figura 26 Curva de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* após infecção com as cepas EH-315 (A) e G186A (B) de *H. capsulatum*, previamente tratadas com os anticorpos anti-Enolase, anti-14-3-3, anti-PL02996, anti-Hsp60..... 70

Figura 27 Curva de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* após infecção com as cepas EH-315 (A) e G186A (B) de *H. capsulatum*, previamente tratadas com o IgG controle e soro de coelho não imune (SNI)..... 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Predição funcional dos homólogos da proteína PL02996 em diversas cepas de <i>H. capsulatum</i>	52
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Histoplasmoses: aspectos básicos e epidemiológicos	15
1.2. <i>Histoplasma capsulatum</i> : histórico, biologia geral e os fatores de virulência associados	20
1.3. Modelos de estudo	24
2. OBJETIVO	26
2.1. Objetivos específicos	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1. Microrganismos e condições de cultivo.....	27
3.2. Culturas planctônicas e formação de biofilmes	27
3.3. Influência da passagem por biofilmes na virulência do fungo <i>H. capsulatum</i>	28
3.3.1. Infecção <i>in vitro</i>	28
3.3.2. Infecção <i>in vivo</i> utilizando o modelo <i>G. mellonella</i>	29
3.4. Busca por novos fatores de virulência	30
3.4.1. Análises <i>in silico</i>	30
3.4.2. Extração de proteínas totais	30
3.4.3. <i>Western blot</i>	31
3.4.4. Imunofluorescência	31
3.5. Influência das proteínas Enolase, 14-3-3, PL02996, Hsp60 e GAPDH na formação dos biofilmes de <i>H. capsulatum</i>	32
3.5.1. Quantificação da biomassa por Cristal Violeta	32
3.5.2. Quantificação de polissacarídeos por Safranina.....	33
3.5.3. Determinação da atividade metabólica dos biofilmes através do ensaio de redução do XTT	33
3.5.4. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	33
3.5.5. Microscopia Confocal.....	34
3.6. Influência das proteínas Enolase, 14-3-3, PL02996 e Hsp60 na virulência de <i>H. capsulatum</i> utilizando o modelo <i>G. mellonella</i>	34
3.7. Análise estatística	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1. Análise do perfil de virulência dos biofilmes do fungo <i>H. capsulatum</i>	35
4.1.1. Estabelecimento da cinética de formação dos biofilmes	35

4.1.2.	Ensaio de interação com células epiteliais pulmonares e macrófagos	37
4.1.3.	Virulência <i>in vivo</i> dos biofilmes de <i>H. capsulatum</i>	43
4.2.	Busca por novos fatores de virulência em <i>H. capsulatum</i>	48
4.3.	Influência na formação de biofilmes do fungo <i>H. capsulatum</i>	57
4.4.	Influência na interação patógeno-hospedeiro utilizando o modelo alternativo <i>G. mellonella</i>	69
5.	CONCLUSÕES	74
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histoplasmose: aspectos básicos e epidemiológicos

A histoplasmose é uma doença pulmonar e sistêmica causada pelo fungo termodimórfico *Histoplasma capsulatum*. Na natureza, à temperatura ambiente (25-28 °C), o fungo se encontra em sua fase miceliar infectante (Morfotipo M), caracterizado microscopicamente pela presença de hifas septadas e hialinas e estruturas de reprodução, os macros e microconídeos. A exposição da fase miceliar a 37 °C induz mudanças fisiológicas, morfológicas e modificações na expressão de diversos genes (GILMORE *et al.*, 2015), que culminam na transição para a fase leveduriforme (Morfotipo L) (DEEPE, 2004; GARFOOT; RAPPLEYE, 2016; KAUFFMAN, 2007).

O contato do fungo com o hospedeiro ocorre pela via inalatória. Pouco tempo depois da inalação dos macros e microconídeos ou fragmentos de hifas presentes no ambiente, inicia-se a transição micélio-levedura, que pode ocorrer dentro ou fora de macrófagos (DEEPE *et al.*, 2008; MITTAL *et al.*, 2018; NEWMAN *et al.*, 1990). SUAREZ-ALVAREZ *et al.* (2019) destacaram também a importância da mucosa nasal como um sítio de infecção inicial da doença, demonstrando a presença das leveduras de *H. capsulatum* nos linfonodos cervicais cerca de 2 horas após a infecção intranasal, em morcegos e camundongos. Além da temperatura, a transição é mediada por cisteína e compostos sulfidrílicos (SACCO *et al.*, 1983) e é um processo essencial para a progressão da doença (MEDOFF *et al.*, 1986). A regulação da transição para a fase de levedura requer a expressão de fatores reguladores, incluindo o gene *Drk1* (quinase reguladora do dimorfismo) (NEMECEK *et al.*, 2006), os homólogos *Wor1* e *Ryp1* (NGUYEN; SIL, 2008); e os reguladores *Ryp2* e *Ryp3* (WEBSTER; SIL, 2008). *Drk1* é homólogo ao híbrido histidina quinase *Sln1*, descritos para *S. cerevisiae*, que é ativado sob estresse osmótico e mudanças ambientais (POSAS *et al.*, 1996), o que levanta a hipótese de que além da temperatura, a pressão osmótica, estado oxidativo, potencial redox, estresse térmico e privação de nutrientes também poderiam desencadear a ativação de *DRK1* em *H. capsulatum*, e, conseqüentemente, o processo de dimorfismo (NEMECEK *et al.*, 2006).

O desenvolvimento da doença depende das interações dinâmicas que ocorrem entre os fatores de virulência do fungo e as respostas inata e adquirida do hospedeiro. Durante as primeiras fases da infecção, as células dos hospedeiros, principalmente macrófagos alveolares, reconhecem o fungo através da família CD18 de glicoproteínas promotoras de adesão, CR3 (CD11b/CD18), CR4 (CD11c/CD18) e LFA-1 (CD11a/CD18) (BULLOCK; WRIGHT, 1987; GOMEZ *et al.*, 2008; LONG *et al.*, 2003). Em seguida, as leveduras já dentro dos

macrófagos, apresentam diversos fatores de virulência que permitem sua multiplicação e disseminação para outros órgãos (GARFOOT; RAPPLEYE, 2016). Inicialmente ocorre uma fungemia assintomática. Geralmente após duas semanas os indivíduos podem desenvolver as manifestações clínicas (KAUFFMAN, 2007).

Os macrófagos são peças-chave no desenvolvimento da doença (BARBIER *et al.*, 2016; BRECHTING; RAPPLEYE, 2019; RAY; RAPPLEYE, 2019). Mesmo sendo células de defesa, as leveduras de *H. capsulatum* possuem diversas estratégias para modulação do ambiente inóspito dos macrófagos a seu favor, tornando-os verdadeiros “cavalos de Troia” (BRECHTING; RAPPLEYE, 2019; GUIMARAES *et al.*, 2019; HOLBROOK *et al.*, 2013; RAY; RAPPLEYE, 2019; YOUSEFF *et al.*, 2012).

Apesar de notório o envolvimento dos macrófagos, outras células do sistema imune também participam da resposta à infecção por *H. capsulatum*, tais como neutrófilos e células dendríticas. Embora também expresse o complexo CD18 de glicoproteínas, a ligação de *H. capsulatum* com as células dendríticas ocorre através do receptor VLA-5 (GILDEA *et al.*, 2001), que interage com a proteína ciclofilina A (CypA), uma chaperona de baixa massa molecular e conservada entre fungos, responsável por catalisar modificações na conformação de cadeias peptídicas em regiões de resíduos de prolina e que também está presente na superfície do fungo (GOMEZ *et al.*, 2008). Diferente dos macrófagos, as células dendríticas são menos favoráveis à proliferação intracelular de *H. capsulatum*, uma vez que a entrada via VLA-5 permite ativação das células e indução da morte das leveduras após 2 horas de internalização, apresentando os antígenos resultantes da degradação fúngica aos linfócitos T e induzindo proliferação das células T e produção de resposta protetiva Th1 (GILDEA *et al.*, 2001). Já os neutrófilos, demonstram atividade reduzida, apenas com ação fungistática (BRUMMER *et al.*, 1991; NEWMAN *et al.*, 2000). Entretanto, recentemente foi descrita a atividade fungicida de neutrófilos em *H. capsulatum* através da liberação das armadilhas extracelulares dos neutrófilos (do inglês *neutrophil extracellular traps* – NETs) (THOMPSON-SOUZA *et al.*, 2020). As NETs são estruturas liberadas no ambiente extracelular e são constituídas de componentes intracelulares dos neutrófilos, como DNA, histona, proteases e grânulos azurófilos, que são liberados por meio de um mecanismo de morte chamado NETose, que pode ser lítico ou não lítico (YIPP *et al.*, 2012). No caso de *H. capsulatum*, foi demonstrado a ocorrência de NETose lítica, e que a ação de elastases pode estar contribuindo para a ação fungicida (THOMPSON-SOUZA *et al.*, 2020).

Em geral, infecções causadas por *H. capsulatum* são assintomáticas ou subclínicas, devido à presença da resposta imune inata, que permite conter a infecção. Ainda assim, uma

parcela dos indivíduos infectados (<10%) pode apresentar manifestações clínicas que variam de histoplasmose pulmonar aguda (HPA) a histoplasmose disseminada (HD) (FERGUSON-PAUL *et al.*, 2018; WHEAT *et al.*, 2016), podendo apresentar quadros de histoplasmose pulmonar cavitária crônica (HPC) e mediastinite granulomatosa (PRENETA *et al.*, 2018; THOMPSON-SOUZA *et al.*, 2020). Formas progressivas e disseminadas da histoplasmose, assim como a gravidade das manifestações clínicas, geralmente decorrem da associação de fatores, tais como deficiências na imunidade celular ou nos mecanismos de fagocitose e lise realizados pelos macrófagos, (FERREIRA; BORGES, 2009; MIHU; NOSANCHUK, 2012) e reativação fúngica a partir de focos latentes, uma vez que, devido à presença de mecanismos de escape, o fungo *H. capsulatum* pode permanecer viável em áreas cicatrizadas por vários anos (LUCEY *et al.*, 2018; TSENG *et al.*, 2005).

A HPA geralmente ocorre em indivíduos que realizam atividades em locais endêmicos, como grutas ou cavernas habitadas por morcegos, galinheiros, ou durante atividades de limpeza de locais abandonados (ROCHA-SILVA *et al.*, 2014), uma vez que esses locais contêm grande quantidade de excretas acumuladas, ricas em compostos nitrogenados, que, aliadas a umidade e temperatura, constituem importantes nichos para o desenvolvimento do fungo (KAUFFMAN, 2007; NORKAEW *et al.*, 2013). Esta forma clínica é autolimitada, e os pacientes apresentam sintomas gerais inespecíficos como febre e cefaleia, e sintomas de infecção respiratória aguda (WHEAT *et al.*, 2016). Já a HPC está relacionada principalmente com a presença de fatores agravantes, como doença pulmonar obstrutiva crônica ou ainda presença de defeito anatômico pulmonar, que prolongam os sintomas da doença. Os sintomas característicos são semelhantes aos da tuberculose pulmonar, como tosse, perda de peso, febre baixa, e escarros hemoptóicos (BAKER *et al.*, 2020; KENNEDY; LIMPER, 2007).

A HD tem como característica o acometimento de órgãos extrapulmonares e/ou extralinfonodais (MANSOOR *et al.*, 2013). Casos de HD aguda geralmente são observados em indivíduos com disfunção imunológica grave, como portadores de doenças neoplásicas hematológicas (leucose, linfoma), usuários de drogas imunossupressoras, e portadores de imunodeficiências celulares primárias (KAUFFMAN, 2007; WHEAT *et al.*, 2016). As formas subaguda ou crônica da HD também podem ocorrer, e em geral, acometem indivíduos nos extremos de idade, alcoolistas crônicos, tabagistas e portadores de comorbidades crônicas (DEEPE, 2005).

As manifestações clínicas apresentadas nas diversas formas de histoplasmose muitas vezes se misturam com aquelas apresentadas durante quadros de tuberculose ou leishmaniose,

dificultando o diagnóstico, e consequentemente, o tratamento (ANTINORI, 2014; UNIS; SEVERO, 2005).

As microepidemias de HPA eram as mais frequentemente observadas no mundo, até o surgimento da Síndrome da Imunodeficiência Aguda (SIDA), quando a forma disseminada passou a predominar (CDC, 2014). No Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, da Fundação Oswaldo Cruz (INI/FIOCRUZ), no Brasil, no período de 1987-2003, 74 casos de histoplasmose foram diagnosticados. As formas mais encontradas foram: disseminada (46/74), pulmonar crônica (9/74), pulmonar aguda (10/74) e mediastinite (5/74). Coinfecção com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) foi identificada em 38 pacientes, sendo que todos apresentaram a forma disseminada (LEIMANN *et al.*, 2005). Lesões cutâneas são observadas, principalmente, em pacientes oriundos de países da América Latina, especialmente no Brasil (BADDLEY *et al.*, 2008; KARIMI *et al.*, 2002).

Formas isoladas como endocardite, infecção endovascular e meningite também já foram descritas, e acometem principalmente indivíduos que apresentam algum dispositivo associado, como próteses e cateteres (LEDTKE *et al.*, 2012; VEERAVAGU *et al.*, 2013). Esse relato é especialmente importante do ponto de vista de reinfecções, pois podem servir como reservatórios, além de suporte para a formação de biofilmes, estruturas de resistência apresentada por diversos microrganismos (BROWN *et al.*, 2018; MATTOS *et al.*, 2009; MUZYKA, 2005; WALLNER *et al.*, 2013).

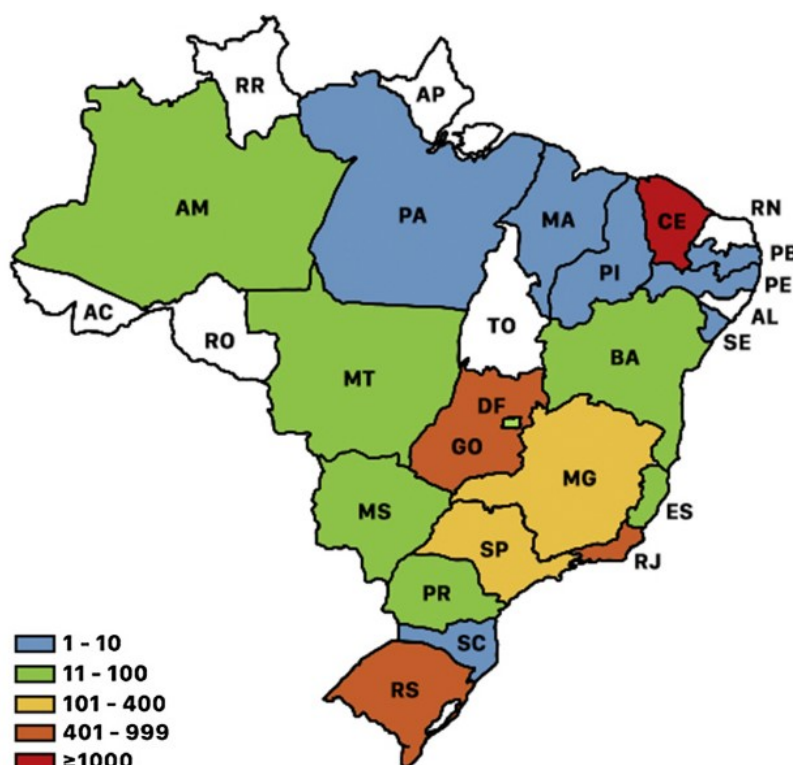
Geograficamente, o gênero *Histoplasma* possui a maior distribuição entre os fungos dimórficos, sendo globalmente encontrado (ANTINORI, 2014; ARMSTRONG *et al.*, 2018; GOMEZ *et al.*, 2019; MAIGA *et al.*, 2018; VALERO *et al.*, 2018). Casos de histoplasmose humana e em outros mamíferos já foram relatados em todos os continentes, com exceção da Antártida. E, nos últimos anos, tem aumentado a aparição de casos de histoplasmose em áreas consideradas não endêmicas (PAN *et al.*, 2013; PATEL *et al.*, 2018).

Entretanto, o predomínio da doença ocorre nos continentes Americano e Africano (FERREIRA; BORGES, 2009). Nas Américas, a histoplasmose já foi descrita desde o oeste do Canadá (ANDERSON *et al.*, 2006) até a Patagônia na Argentina (CALANNI *et al.*, 2013). Além de ser descrita em animais domésticos e selvagens (BRANDAO *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 1994). Atualmente, a histoplasmose é uma das micoses pulmonares mais comuns nos Estados Unidos, sendo altamente prevalente nas regiões centrais e sul do país. Principalmente nos vales dos rios Mississipi e Ohio (ARMSTRONG *et al.*, 2018; KAUFFMAN, 2007). Além disso, é uma das doenças infecciosas de maior prevalência entre portadores de HIV na América Latina, sendo uma das doenças definidoras da SIDA, e apresenta taxa de mortalidade

variando de 20 a 40% entre esses pacientes (ALMEIDA *et al.*, 2019). Esses valores podem ser muito maiores, considerando que a histoplasmose não é uma doença de notificação compulsória na América Latina.

No Brasil, há diversos relatos de casos clínicos isolados ou pequenos surtos, aparecendo em 19 dos 26 estados brasileiros, bem como no Distrito Federal (ALMEIDA *et al.*, 2019) (**Figura 1**).

Figura 1 Distribuição geográfica dos casos de histoplasmose no Brasil entre 1939-2018.



Fonte: Almeida *et al.*, 2019

Entretanto, a real incidência de histoplasmose no país é pouco conhecida. Desde 1958, foram reportadas 26 microepidemias, que ocorreram tanto em áreas endêmicas quanto não-endêmicas, onde os fatores predisponentes mais comuns foram visitas em grutas colonizadas por morcegos, minas abandonadas, galinheiros, pombais ou casas desabitadas (AIDE, 2009; DE OLIVEIRA *et al.*, 2006; UNIS *et al.*, 2004).

Com relação ao diagnóstico, o isolamento de *H. capsulatum* em culturas de tecidos ou fluidos corporais representa o padrão ouro. Entretanto, trata-se de um método demorado, já que o crescimento do fungo na fase de micélio pode levar até seis semanas. Além disso, faz-se necessário a realização do teste de transição micélio-levedura, para demonstrar o dimorfismo fúngico, que pode ocorrer entre duas a quatro semanas (GUIMARÃES *et al.*, 2006; WHEAT

et al., 2016). A histopatologia de biópsias teciduais utilizando as colorações metanamina prata de Gomori-Grocott, PAS e hematoxilina-eosina também são muito utilizadas e permitem a observação de leveduras de paredes celulares fortemente coradas, unibrotantes, pequenas e ovaladas, em sua maioria dentro de macrófagos (HAGE *et al.*, 2011; SCHEEL; GOMEZ, 2014; WHEAT *et al.*, 2016).

Um diagnóstico mais rápido pode ser feito através da pesquisa de antígenos e anticorpos. A pesquisa de antígenos é feita com anticorpos contra galactomanana em amostras de soro ou urina (SWARTZENTRUBER *et al.*, 2009). Entretanto, reações cruzadas são frequentes em pacientes com blastomicose, paracoccidioidomicose, peniciliose e aspergilose (HAGE *et al.*, 2011; WHEAT *et al.*, 1997; WHEAT *et al.*, 2016; WHEAT *et al.*, 2007). Já a pesquisa de anticorpos utilizando as técnicas de imunodifusão, fixação de complemento e ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), busca identificar anticorpos contra os antígenos H e M de *H. capsulatum*. Algumas limitações podem ser observadas em relação a esses testes, como a dificuldade de diferenciar doença ativa da exposição ou contato prévio com o fungo (HAGE *et al.*, 2011).

1.2. *Histoplasma capsulatum*: histórico, biologia geral e os fatores de virulência associados

Como mencionado anteriormente, o fungo termodimórfico *H. capsulatum* é o agente causador da histoplasmose. Macroscopicamente, o Morfotipo M pode apresentar dois tipos de colônias: as do tipo A, de coloração branca e aspecto cotonoso, e as colônias do tipo B, de coloração acastanhada, geralmente de aspecto pulverulenta. Microscopicamente é caracterizado pela presença de hifas septadas e hialinas, além da presença de macros e microconídeos (BERLINER, 1968). O Morfotipo L, é constituído de leveduras pequenas (3 a 5µm de diâmetro), ovaladas e frequentemente apresentam gemulação única. No hospedeiro, é encontrado principalmente dentro de macrófagos (GARFOOT; RAPPLEYE, 2016; GASS; ZIMMERMAN, 1978; LEIMANN *et al.*, 2005).

O fungo *H. capsulatum* foi descoberto em 1905 durante a realização de uma necropsia pelo patologista americano Samuel Taylor Darling, no Ancon Hospital, durante a construção do Canal do Panamá (DARLING, 1909). Darling verificou a presença de numerosos corpos pequenos intracelulares com “cápsulas”, no interior dos alvéolos pulmonares e de macrófagos do baço, fígado, linfonodos e medula óssea, semelhantes a protozoários do gênero *Leishmania* sp. porém sem cinetoplasto. Em razão desse fato, pensava tratar-se de um novo protozoário intracelular encapsulado, o qual denominou de *Histoplasma capsulatum*. Em 1912, o

patologista e microbiologista brasileiro Henrique da Rocha Lima, comparou o material examinado por Darling com material de necropsia de um paciente com leishmaniose visceral e concluiu que *H. capsulatum* estava mais intimamente relacionado com fungos do que com protozoários (DA ROCHA-LIMA, 1912).

Posteriormente, Dodd e Tompkins (1934) reportaram o encontro de estruturas ovais dentro de células mononucleares em esfregaços de sangue periférico, e o cultivo do sangue desse paciente a 37 °C levou ao crescimento de leveduras ovais, enquanto que o cultivo à temperatura ambiente propiciou o desenvolvimento de hifas e conídios. O fungo foi então descrito como o *H. capsulatum* de Darling, além de ter sua característica de termodimorfismo comprovada (DEMONBREUN, 1934).

Classicamente são descritas três variedades biológicas patogênicas, determinadas com base na distribuição geográfica, morfologia e aspectos clínicos: *H. capsulatum* var. *capsulatum*, de distribuição universal, acometendo principalmente os pulmões e sistema fagocítico; *H. capsulatum* var. *duboisii*, responsável pela histoplasmose africana, sendo restrita a esse continente e causando lesões cutâneas, subcutâneas e ósseas; e *H. capsulatum* var. *farcinosum*, causador da linfangite epizoótica dos equinos (KAUFFMAN, 2007; LEIMANN *et al.*, 2005).

Kasuga *et al.* (2003) realizaram uma análise filogenética de 137 isolados de *H. capsulatum* de diferentes fontes, e os dividiu em oito clados: dois clados predominantes na América Latina (LAm A e LAm B), dois clados restritos à América do Norte (NAm 1 e NAm 2), um clado restrito à Austrália, um clado encontrado entre as regiões da Holanda e Indonésia, um clado identificado entre as regiões da Europa e Ásia (Eurasiano), e um clado restrito à África. Com exceção do clado Eurasiano, os outros sete são considerados espécies filogenéticas. Aumentando o número amostral (n = 234) e usando diferentes métodos filogenéticos e métodos de genética populacional, Teixeira *et al.* (2016) demonstraram que os isolados da América Latina são os que apresentam maior diversidade genética e pelo menos 5 espécies filogenéticas adicionais foram propostas: LAm A e LAm B: LAm A1, LAm A2, LAm B1, LAm B2, RJ e BAC-1. A espécie filogenética RJ compreende isolados coletados no Rio de Janeiro e São Paulo, indicando isolamento geográfico, enquanto que a espécie filogenética BAC-1 (*bat-associated species-specific clade*) compreende apenas isolados de morcegos, incluindo a cepa EH-315, utilizada no desenvolvimento do presente estudo, isolada a partir de um morcego contaminado em Guerrero (México) (REYES-MONTES *et al.*, 1999).

Recentemente estudos para reorganização taxonômica do gênero *Histoplasma* foram reportados a partir de análises filogenéticas de genomas completos bem como de genes de

virulência de 30 isolados. Baseado nas diferenças entre os agrupamentos genéticos, os dados mostraram que o gênero é composto por pelo menos quatro espécies e propôs-se restringir a variedade *capsulatum* de *H. capsulatum* var. *capsulatum* para apenas a espécie *H. capsulatum* e três espécies adicionais foram propostas: *Histoplasma mississippiense* sp. nov., *Histoplasma ohiense* sp. nov. e *Histoplasma suramericanum* sp. nov. (SEPULVEDA *et al.*, 2017).

Além dessas classificações, o morfotipo L pode ainda ser dividido em quimiotipos I e II (REISS, 1977; REISS *et al.*, 1977). O quimiotipo I, correspondente ao grupo NAm2 e é representado mundialmente pela cepa G217B, tendo como característica principal a ausência do polissacarídeo α -(1,3)-glucana na parede celular, além de maior quantidade de quitina com relação ao quimiotipo II (DOMER, 1971). O quimiotipo II engloba todos os outros grupos (DOMER, 1971; EDWARDS *et al.*, 2011a; LARA-LEMUS *et al.*, 2014) e é representado pela cepa panamenha G186A, também utilizada no presente trabalho.

Assim como outros patógenos, o fungo *H. capsulatum* apresenta determinados mecanismos que contribuem para invasão, proliferação intracelular e sobrevivência diante das condições hostis impostas pelo hospedeiro.

Um dos exemplos ocorre já durante a transição para a fase leveduriforme, com modificações na biossíntese de glucanas, principalmente aumento da síntese de α -(1,3)-glucana no quimiotipo II (SHEN; RAPPLEYE, 2017). Além disso, a camada de α -(1,3)-glucana produzida é depositada na parte mais externa da parede celular, mascarando as β -(1,3)-glucanas (RAPPLEYE *et al.*, 2007). Esse recobrimento é estratégico e contribui para o estabelecimento da infecção, evitando que o sistema imunológico do hospedeiro seja alertado, uma vez que as β -glucanas são polissacarídeos que atuam como Padrão Molecular Associado ao Patógeno (PAMP), reconhecidas pelo receptor Dectina-1, e participando do recrutamento de leucócitos e regulação de mediadores inflamatórios, tais como leucotrienos e citocinas proinflamatórias (KLEIN; TEBBETS, 2007).

A presença da camada de α -(1,3)-glucana é essencial para a virulência do quimiotipo II (EDWARDS *et al.*, 2011a; RAPPLEYE *et al.*, 2004), uma vez que tanto a produção de variantes espontâneas com ausência de α -(1,3)-glucana (HOGAN; KLEIN, 1994; KLIMPEL; GOLDMAN, 1988), quanto a depleção da expressão de Ags1, responsável pela síntese desse polissacarídeo, resultam em atenuação da virulência em modelo animal (KLIMPEL; GOLDMAN, 1988; RAPPLEYE *et al.*, 2007). Entretanto, mesmo com a ausência de α -(1,3)-glucana, o quimiotipo I permanece virulento (RAPPLEYE *et al.*, 2007; RAPPLEYE *et al.*, 2004). EDWARDS *et al.* (2011a) demonstraram que no quimiotipo I, as β -(1,3)-glucanas não estão totalmente expostas, além de sua expressão estar relacionada com a fase de crescimento,

com maior exposição durante o crescimento exponencial e, portanto, permitindo alguma interação com o receptor Dectina-1, e menor exposição na fase estacionária, deixando as leveduras praticamente indetectáveis, sugerindo assim um mecanismo distinto para “esconder” as β -(1,3)-glucanas nesse quimiotipo.

Ainda durante a transição morfológica, devido à elevação da temperatura, há o aumento na produção das proteínas de choque térmico (*Heat-shock proteins* - Hsps) (CLEARE *et al.*, 2017). As Hsps são chaperonas conservadas entre diversos microrganismos, e são agrupadas de acordo com a massa molecular e grau de homologia entre os aminoácidos. Neste contexto, a proteína de choque térmico de 60 kDa (Hsp60) é uma molécula de superfície que tem como função mediar a ligação do fungo com os macrófagos através do receptor CR3 (CD11B/CD18). A interação Hsp60/CR3 resulta em fagocitose sem ativação do fagócito (LIN *et al.*, 2010; MIHU; NOSANCHUK, 2012; WOLF *et al.*, 1987), uma vez que a fagocitose mediada por CR3 na ausência de outras ativações geralmente não é inflamatória (EHLERS, 2000).

A utilização de anticorpos monoclonais anti-Hsp60 levam a uma resposta protetiva através da modulação da resposta imunológica induzindo aumento na produção de interleucina 2 (IL-2), interleucina 12 (IL-12) e Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α), associadas ao padrão Th1 de Linfócito T (GUIMARAES *et al.*, 2009), principal tipo de resposta envolvida no controle da histoplasmose (CAIN; DEEPE, 1998).

Uma vez dentro dos macrófagos, *H. capsulatum* é encontrado principalmente dentro de vacúolos fagocíticos (LONG *et al.*, 2003). Para permanecer vivo, o fungo possui mecanismos para evadir as respostas protetivas, incluindo inativação das espécies de oxigênio através da produção de superóxido dismutase (Sod3) e catalase (CatB) extracelulares (HOLBROOK *et al.*, 2013; YOUSEFF *et al.*, 2012), prevenção da acidificação dos vacúolos fagocíticos (EISSENBERG *et al.*, 1993; STRASSER *et al.*, 1999) e mecanismos para captação de ferro, tais como a produção de sideróforos que sequestram os íons ferro presentes na transferrina (HOWARD *et al.*, 2000).

Na fase leveduriforme, o fungo *H. capsulatum* secreta uma proteína específica chamada Yps3, que é diferencialmente expressa entre as cepas (BOHSE; WOODS, 2005; 2007; KEATH *et al.*, 1989). Ao ser secretada, a Yps3 é capaz de se ligar a quitina presente na parede celular, inclusive de cepas que não expressam naturalmente a proteína (BOHSE; WOODS, 2005). Apesar de crescer normalmente na forma leveduriforme, o silenciamento de *YPS3* resulta em cepas menos virulentas, com redução da colonização pulmonar e redução da carga fúngica no fígado e baço (BOHSE; WOODS, 2007).

Outro fator de virulência importante da fase leveduriforme, é a proteína ligante de cálcio, denominada CBP (*Calcium binding protein*), que permite o crescimento do fungo nas condições limitadas desse mineral. Na ausência de CBP, o fungo torna-se incapaz de destruir macrófagos *in vitro* e de colonizar o pulmão de camundongos (SEBGHATI *et al.*, 2000).

Como já mencionado, a expressão e atuação desses fatores de virulência pode variar entre as cepas de *H. capsulatum*. Como por exemplo, a ausência de α -(1,3)-glucana na cepa americana G217B (NA_m 2 – Quimiotipo I) e ausência da expressão do gene Yps3 na cepa panamenha G186A (Quimiotipo II). A presença das proteínas Hsp60, assim como a secreção da proteína ligante de cálcio (CBP) ocorre em todos os grupos filogenéticos (HOLBROOK *et al.*, 2013; KEATH *et al.*, 1989).

Além desses mecanismos que corroboram para a patogenicidade do fungo *H. capsulatum*, publicações de nosso grupo propuseram a formação de biofilmes como um novo mecanismo que pode estar associado à virulência (PITANGUI *et al.*, 2012), além de demonstrar que esses biofilmes podem diferenciar quanto à biomassa total, produção de matriz e atividade metabólica entre diferentes cepas e quando expostos a diferentes fatores nutricionais e de fornecimento de oxigênio (GONÇALVES *et al.*, 2020).

Biofilmes são comunidades bem estruturadas de microrganismos ligados uns aos outros e associados a uma superfície, protegidos no interior de uma matriz extracelular polimérica autoproduzida. A presença de matriz nos biofilmes é importante para a manutenção dos mesmos, pois reduz a penetração de fármacos e atuação do sistema imunológico, e pode estar relacionados com a ocorrência de recidivas da doença após a retirada da medicação (FERREIRA; BORGES, 2009). Além disso, Benaducci *et al.* (2016) demonstraram que os fungos *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* nas formas de biofilme foram mais virulentos que as células planctônicas no modelo alternativo *Galleria mellonella*, sugerindo que as condições do biofilme podem contribuir para o perfil de virulência.

1.3. Modelos de estudo

Tradicionalmente, o modelo murino é o mais utilizado para o estudo da virulência e patogênese de *H. capsulatum* (SAHAZA *et al.*, 2014). Entretanto, sabe-se que esse fungo também é capaz de infectar o modelo alternativo *Galleria mellonella* (THOMAZ *et al.*, 2013), possibilitando sua utilização como uma importante ferramenta no entendimento das interações com o hospedeiro.

Apesar da utilização de modelos alternativos ser bem difundida na Europa, no Brasil o destaque para esses modelos iniciou-se em 2008 com a Lei Arouca, que evidencia princípios de ética na utilização de animais na pesquisa e ensino, e preconiza o desenvolvimento de métodos alternativos. Além disso, o Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTIC) criou a Rede Nacional de Métodos Alternativos ao uso de animais (RENAMA) em 2012, com o objetivo de complementar ou substituir, os tradicionais testes com mamíferos, promovendo cursos de capacitação de pessoas. Além de ensaios *in vitro* com células e *in silico*, eles incluem o uso de animais inferiores (HARTUNG, 2011). Neste contexto, diversos modelos experimentais, tais como *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Galleria mellonella* e zebrafish (*Danio rerio*) vêm sendo aplicados no estudo de interação patógeno-hospedeiro, desenvolvimento de novos fármacos, avaliação de respostas imunológicas, entre outros (DAVIS *et al.*, 2016; JOHNSON *et al.*, 2009; PANAYIDOU *et al.*, 2014; TREVIJANO-CONTADOR; ZARAGOZA, 2014). *Galleria mellonella*, modelo experimental utilizado no presente trabalho, é um inseto encontrado no ambiente, se alimentando de mel, pólen e cera de abelha. Apresenta vantagens importantes como modelo de estudo para relação entre fungo-hospedeiro, tais como a incubação em temperaturas entre 25 e 37 °C, permitindo simular as condições de infecção em mamíferos; presença de seis tipos de células fagocíticas importantes no sistema de defesa denominadas hemócitos; além de manutenção fácil e de baixo custo (DESALERMOS *et al.*, 2012; FUCHS; MYLONAKIS, 2006).

Esse modelo de estudo também serviu como uma plataforma útil para estudos funcionais de proteínas envolvidas na virulência e respostas relacionadas aos mecanismos de patogenicidade de *Paracoccidioides* spp., *Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*, incluindo estudos associados aos biofilmes de *C. neoformans* e *C. gattii* (BENADUCCI *et al.*, 2016; SCORZONI *et al.*, 2015; SINGULANI *et al.*, 2018).

Neste contexto, o presente trabalho pretendeu verificar a influência da passagem por biofilmes na virulência do fungo *H. capsulatum*, utilizando experimentos de adesão em células epiteliais pulmonares (A549), interação e multiplicação intracelular em macrófagos murinos (RAW 264.7 e J774) e sobrevivência das larvas *G. mellonella*. Além disso, considerando a adesão como um fator importante para o estabelecimento de biofilmes, avaliou-se também o papel de três importantes adesinas, descritas para o gênero *Paracoccidioides* spp.: Enolase, 14-3-3 (DA SILVA *et al.*, 2013; MARCOS *et al.*, 2012) e PI02996 (DE OLIVEIRA, submetido); bem como da proteína Hsp60, importante molécula de adesão e interação de *H. capsulatum* com macrófagos e da proteína GAPDH, revelada diferencialmente expressa no biofilme da cepa ambiental EH-315. Essas proteínas também

foram avaliadas quanto a influência na infecção *in vivo* utilizando o modelo *G. mellonella*, sugerindo assim novos fatores de virulência para *H. capsulatum*, além de correlacionar fatores de virulência entre espécies.

2. OBJETIVO

Comparar a virulência de células planctônicas e recuperadas de biofilme de *H. capsulatum* na interação com células epiteliais e macrófagos e com as larvas de *Galleria mellonella*, e a influência das proteínas Enolase, 14-3-3, PL02996, Hsp60 e GAPDH na formação dos biofilmes e interação patógeno-hospedeiro.

2.1. Objetivos específicos

- a) Avaliar a influência da passagem por biofilme na interação *in vitro* de *H. capsulatum* com as células A549 (célula epitelial pulmonar humana), RAW 264.7 e J774 (macrófagos murinos);
- b) Avaliar *in vivo*, a influência da passagem por biofilme no perfil de virulência de *H. capsulatum* utilizando o modelo animal alternativo *G. mellonella*.
- c) Identificar novas adesinas, selecionando-as a partir da análise *in silico* e da utilização de anticorpos produzidos contra proteínas dos fungos *P. lutzii* e *P. brasiliensis* que sejam reconhecidos entre as proteínas do fungo *H. capsulatum* por *Western Blotting*.
- d) Avaliar a influência das proteínas Enolase, 14-3-3, PL02996, GAPDH e Hsp60 na formação de biofilmes das cepas EH-315 e G186A de *H. capsulatum*;
- e) Avaliar a influência das proteínas Enolase, 14-3-3, PL02996, Hsp60 no perfil de sobrevivência das larvas de *G. mellonella*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Microrganismos e condições de cultivo

Foram utilizadas as cepas EH-315 e G186A (ATCC 26029) de *H. capsulatum*. A cepa EH-315 foi isolada do intestino de um morcego infectado no estado de Guerrero (México) e foi determinada como pertencente ao clado BAC1 (*bat-associated species-specific clade*) (TEIXEIRA *et al.*, 2016). Essa cepa foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Maria Lúcia Taylor (Laboratório de Imunologia de Fungos, Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Faculdade de Medicina da Universidade Nacional Autônoma do México [UNAM]) e está registrada no banco de dados da Federação Mundial para Coleção de Culturas (LIH-UNAM WDCM817), caracterizada como isolado de alta virulência. A cepa G186A é uma cepa do Panamá, classificada como linhagem humana H81 (KASUGA *et al.*, 2003), e foi cedida pela Profa. Dra. Roseli Zancopé (Fundação Oswaldo Cruz [Fiocruz], Rio de Janeiro). Ambas as cepas estão atualmente depositadas na coleção de cepas do Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (Brasil), e são mantidas a 37 °C em ágar Infusão Cérebro e Coração (BHI) suplementado com 1% de glicose e 0,1% de L-cisteína. Para a realização dos experimentos, a fase leveduriforme foi cultivada em meio HAM-F12 (Sigma), suplementado com glicose (18,2 g/L), ácido glutâmico (1g/L), HEPES (6 g/L), e L-cisteína (8,4 mg/L) a 37 °C e 150 rpm durante 48 horas.

3.2. Culturas planctônicas e formação de biofilmes

Os biofilmes foram formados como descrito por GONÇALVES *et al.* (2020). Inicialmente, as leveduras foram suspensas em tampão fosfato-salino (PBS) e a suspensão foi ajustada para 5×10^6 leveduras/mL em meio HAM-F12, através de contagem em Câmara de Neubauer. Os biofilmes foram formados em placas de 96 poços para os ensaios colorimétricos, e 24 poços para Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Confocal. Foi adicionado 200 µL de inóculo/poço preparado em meio HAM-F12 para a placa de 96 poços e 1 mL de inóculo/poço para a placa de 24 poços. As placas foram incubadas a 37 °C por 12 horas para a pré-adesão. Após esse período, o sobrenadante foi removido e meio HAM-F12 foi adicionado (200 µL/poço para a placa 96 poços e 2 mL/poço para a placa de 24 poços). As placas foram incubadas por um tempo total de 144 horas para formação do biofilme maduro. O crescimento planctônico das leveduras de *H. capsulatum* foi realizado em tubo falcon de 50 mL sob as mesmas condições de temperatura, nutrientes e período de incubação. Em todos os experimentos, HAM-F12, isento de crescimento, foi incluído como branco.

3.3. Influência da passagem por biofilmes na virulência do fungo *H. capsulatum*

3.3.1. Infecção *in vitro*

3.3.1.1. Cultivo celular

Para os ensaios de infecção foram utilizadas as linhagens A549 (epitelial pulmonar), RAW 264.7 e J774 (macrófagos murinos), obtidas da coleção de células do Núcleo de Proteômica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara. As células foram cultivadas em garrafas de cultivo de 25 cm², em meio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM, Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco), e mantidas a 37 °C e 5% de CO₂.

3.3.1.2. Ensaios de interação com células epiteliais (A549) e macrófagos (RAW 264.7)

Os ensaios de interação foram realizados em placas de 96 poços. Após a confluência, as células foram recolhidas das garrafas de cultivo utilizando 1 mL de tripsina-EDTA 0,25% (Gibco) para A549 e raspador de células para RAW 264.7, centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos e contadas em câmara de Neubauer, utilizando o método de exclusão pelo azul de trypan 0,004%, que cora células inviáveis, ajustando, em seguida, a concentração para 1,5x10⁴ células/poço em meio DMEM suplementado com 10% SFB. Foram adicionados 100 µL/poço da suspensão celular e as placas foram incubadas a 37 °C e 5% CO₂ por 12 horas. Após a formação da monocamada de células, o meio foi removido e 100 µL do inóculo fúngico foi adicionado. Para a preparação dos inóculos fúngicos, as suspensões das leveduras planctônicas e leveduras recuperadas do biofilme maduro (144 horas) foram incubadas por 1 hora a 37 °C com 0,5mg/mL de FITC. Em seguida, foram lavadas três vezes com PBS e, novamente, após centrifugação, o inóculo foi ressuscitado em DMEM suplementado com 10% de SFB em uma densidade de 5 leveduras para 1 células epitelial/macrófago (MOI 5:1).

As placas foram incubadas a 37 °C, 5% CO₂ por 1 hora e, após o período de incubação, os poços foram lavados três vezes com PBS para retirar as leveduras que não estivessem aderidas e, em seguida a monocamada foi recolhida utilizando PBS gelado. Para a análise por citometria (A549 e RAW), o conteúdo retirado do poço foi fixado com paraformaldeído 4% por 1 hora e analisado no equipamento FACSCantoTM (Becton & Dickinson, San Diego, CA, EUA) de maneira a analisar os parâmetros relacionados ao tamanho (*size forward scatter* - FSC), granulosidade (*granularity side scatter* - SSC) e fluorescência de 10.000 eventos. Os dados obtidos foram representados pela porcentagem de

interação entre as células com as leveduras marcadas com FITC, a partir dos dados analisados utilizando o software FACSDivaTM versão 6.1.3. Para análise das unidades formadoras de colônia (UFCs) (A549), o conteúdo dos poços foi plaqueado em BHI suplementado com 0,1% de cisteína e 1% de glicose e incubado a 37 °C por 10 dias.

3.3.1.3. Avaliação da multiplicação intracelular

Os ensaios de multiplicação intracelular foram realizados como descrito por Guimaraes *et al.* (2011) em placas de 24 poços. Após a confluência, as células J774 foram recolhidas das garrafas de cultivo utilizando raspador de células (*cell scraper*), centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos e contadas em câmara de Neubauer, ajustando, em seguida, a concentração para 1×10^5 células/poço em meio DMEM suplementado com 10% SFB. Foi adicionado 1 mL/poço da suspensão celular e as placas foram incubadas a 37 °C e 5% CO₂ por 12 horas. Após a formação da monocamada de células, o meio foi removido e 1 mL do inóculo fúngico foi adicionado. Para a preparação dos inóculos fúngicos, as suspensões das leveduras planctônicas e leveduras recuperadas do biofilme maduro (144 horas) foram preparadas em DMEM suplementado com 10% de SFB em um MOI 2:1. As placas foram incubadas por 24 horas para verificar a influência da passagem por biofilme na multiplicação intracelular. Após esse período, a monocamada foi lavada três vezes com PBS e os macrófagos foram lisados com água gelada. Aliquotas foram plaqueadas em BHI suplementado com 1% glicose e 0,1% de cisteína e incubadas a 37°C por 10 dias. A porcentagem de crescimento foi determinada através da comparação do número de UFC de *H. capsulatum* incubados em meio de cultura com o número de UFC de *H. capsulatum* incubados em meio de cultura na presença de macrófagos.

3.3.2. Infecção *in vivo* utilizando o modelo *G. mellonella*

Os experimentos foram realizados de acordo com Thomaz *et al.* (2013). As larvas de *G. mellonella* foram produzidas no laboratório de Animais Alternativos do Núcleo de Proteômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP. Grupos de 10 a 12 larvas com peso entre 0,15 e 0,20 g foram colocados em placas de Petri e incubados a 37 °C no escuro, na noite anterior aos experimentos. Larvas com alterações de cor (manchas escuras ou com melanização aparente) foram excluídas. Antes da infecção, foi realizada a assepsia das pró-patas com etanol 70%. O inóculo fúngico foi preparado em PBS em uma densidade de 1×10^8 leveduras/mL e, com auxílio de seringas Hamilton, 10 µL das suspensões fúngicas foram injetadas na pró-pata de cada larva, atingindo um inóculo de 1×10^6 leveduras por larva.

Para a avaliação da virulência dos biofilmes de *H. capsulatum*, foi feita uma análise comparativa entre o crescimento planctônico e as leveduras recuperadas do biofilme. As larvas foram incubadas a 37 °C por 15 dias. Para contagem de hemócitos, três larvas foram retiradas de cada grupo após 3 horas de inoculação (BROWNE *et al.*, 2013) e, com auxílio de um bisturi, foram feitos cortes transversais e 10 µL da hemolinfa foi retirado. Os hemócitos foram contados em câmara de Neubauer.

3.4. Busca por novos fatores de virulência

3.4.1. Análises *in silico*

A análise da homologia e similaridade entre as proteínas Enolase, 14-3-3 de *P. brasiliensis* e PL02996 de *P. lutzii* com as encontradas em *H. capsulatum* pela ferramenta BLAST foi feita online a partir do Banco de Dados FungiDB (<http://www.fungidb.org>) (BASENKO *et al.*, 2018; STAJICH *et al.*, 2012). Para a proteína PL02996, recentemente descrita através da análise do transcriptoma de infecção de *P. lutzii*, o software FaaPred (Fungal Adhesins and Adhesin-like proteins predictions - <http://bioinfo.icgeb.res.in/faap/>) (RAMANA; GUPTA, 2010) foi utilizado para predição de potenciais adesinas utilizando as sequências homólogas encontradas. FaaPred utiliza o método baseado em SVM (Support Vector Machine) para identificar adesinas com base na presença de carboidratos com N-terminal ou domínios de ligação de peptídeos, domínio glicosilados ricos em Ser- e Thr- e regiões C-terminal que medeiam ligações covalentes à parede celular através de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI). Sequências identificadas como adesinas foram submetidas à identificação de peptídeo sinal usando o software SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (PETERSEN *et al.*, 2011) e à identificação de regiões transmembrana usando o software TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) (KROGH *et al.*, 2001). A localização subcelular foi feita utilizando o servidor TargetP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) (NIELSEN *et al.*, 1997).

3.4.2. Extração de proteínas totais

As leveduras planctônicas foram cultivadas por 48 horas em meio HAM-F12 a 37 °C e 150 rpm. O crescimento total foi centrifugado a 1000 xg por 5 minutos a 4 °C e lavado três vezes com água destilada gelada. Após a última lavagem o precipitado foi suspenso em Tris HCl (10mM) pH 8,8 suplementado com 10 µL/mL do inibidor de protease fenil-metil-sulfonil-fluoreto (PMSF 1µg/mL) e acrescido de pérolas de vidro. Em seguida, as amostras

foram submetidas a ciclos de congelamento em nitrogênio seguido de agitação em vórtex durante 1 minuto, por 20 vezes. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 5000 xg por 45 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi distribuído em microtubos, armazenado a -80 °C e dosados pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

3.4.3. Western blot

As proteínas obtidas foram separadas por eletroforese utilizando gel de poliacrilamida 12%, com 15 µg de cada extrato proteico, e transferidas para uma membrana de nitrocelulose a 400 mA por 6 horas. A membrana de nitrocelulose foi corada com *Ponceau* para verificar a transferência e então, após lavagem com água destilada, as tiras de nitrocelulose bloqueadas com solução de bloqueio (5% leite desnatado e 1% *Bovine serum albumin* – BSA em PBS) por 4 horas. Posteriormente, a solução de bloqueio foi retirada e adicionou-se os anticorpos anti-PL02996 (1:1000), anti-14-3-3 (1:250), anti-Enolase (1:250) e anti-Malato Sintase (1:250) preparados em solução de bloqueio, incubando por 12 horas a temperatura ambiente. Em seguida as tiras foram lavadas com PBS e incubadas com anti-Rabbit IgG conjugado com peroxidase preparado em solução de bloqueio (1:5000), por 2 horas. Após três lavagens, adicionou-se o substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB) a 0,2% e peróxido de hidrogênio (100 µL). Quando as bandas foram visualizadas, a reação foi interrompida com água destilada.

Os anticorpos policlonais anti-Enolase (DONOFRIO *et al.*, 2009), anti-14-3-3 (DA SILVA *et al.*, 2013) e anti-PL02996 (DE OLIVEIRA, submetido), foram adquiridos a partir de trabalhos anteriores do grupo envolvendo *Paracoccidioides* spp.

3.4.4. Imunofluorescência

Para a marcação das proteínas Enolase, 14-3-3 e PL02996 foi utilizada a técnica de imunofluorescência. O fungo foi cultivado em sua forma planctônica como descrito no item 3.3. Em seguida, 10⁶ leveduras foram fixadas com paraformaldeído 4% por 12 horas a 4 °C. Após a fixação as leveduras foram lavadas três vezes com PBS e, após a última lavagem, foram suspensas em solução de bloqueio (5% leite desnatado e 1% *Bovine serum albumin* – BSA em PBS) e incubadas a 37 °C por 1 hora. Em seguida foram feitas mais três lavagens com PBS-tween 0,05%, seguido da adição dos anticorpos primários anti-PL02996, anti-Enolase e anti-14-3-3 (título 1:250) e incubação por 1 hora (37 °C). Após a marcação com o anticorpo primário, foram feitas mais três lavagens com PBS-tween, seguida da incubação com o anticorpo secundário anti-Rabbit IgG conjugado com Alexa 594 (Thermo Fisher Scientific, título 1:1000) por 1 hora a 37 °C. Novamente, três lavagens foram feitas com PBS-

Tween e foi adicionado Isotiocianato de fluoresceína (FITC - Sigma) a 0,5 mg/mL por 1 hora a 37 °C. Após a incubação foram feitas lavagens com PBS e a marcação foi analisada no Microscópio de Fluorescência Confocal (Carl Zeiss LSM 800) na Faculdade de Odontologia da UNESP - Araraquara.

3.5. Influência das proteínas Enolase, 14-3-3, PL02996, Hsp60 e GAPDH na formação dos biofilmes de *H. capsulatum*.

Após a preparação do inóculo de 5×10^6 leveduras/mL em PBS, os mesmos foram incubados com os anticorpos anti-Enolase, anti-14-3-3 e anti-PL02996, soro de coelho não imune (SNI) (título 1:100), anti-Hsp60, anti-GAPDH e anti-IgG controle (10µg/mL) por 1 hora a 37 °C. Após esse período, os tubos foram centrifugados e o sobrenadante descartado. O pellet foi suspenso em meio HAM-F12 e utilizado para formar biofilme como descrito no item 3.3, em placas de 96 poços. Após a maturação, o sobrenadante foi retirado e os biofilmes foram comparados quanto à biomassa total, polissacarídeos totais e atividade metabólica. Além disso, foram feitas análises de imagem por MEV e microscopia confocal. O anticorpo monoclonal anti-GAPDH (MA5-15738) foi adquirido comercialmente e o anticorpo monoclonal anti-Hsp60 (7B6) (GUIMARAES *et al.*, 2009) foi gentilmente cedido pelo Dr. Joshua D. Nosanchuk, do Departamento de Doenças Infecciosas e de Microbiologia e Imunologia do *Albert Einstein College of Medicine*, Bronx, NY, Estados Unidos.

3.5.1. Quantificação da biomassa por Cristal Violeta

A quantificação da biomassa por coloração Cristal Violeta foi realizada conforme descrito por Costa-Orlandi *et al.* (2014). A quantificação foi realizada no tempo de 144 horas em placa de 96 poços. Após remoção do meio, foi adicionado 200 µL de metanol para fixação, por 15 minutos. Após esse tempo o metanol foi retirado e os poços foram deixados secar por aproximadamente 30 minutos. Em seguida, foi adicionada a solução de cristal violeta 0,1%, durante 20 minutos. Posteriormente, a solução foi retirada e os poços foram lavados com água destilada estéril até a remoção do excesso de corante. Os biofilmes foram então descorados pela adição de 200 µL/poço de ácido acético 33%. Por fim, o conteúdo dos poços foi transferido para nova placa e a absorbância foi avaliada a 570 nm em leitor de placas Epoch 2 (BioTek).

3.5.2. Quantificação de polissacarídeos por Safranina

A matriz extracelular produzida pelo biofilme foi quantificada pela coloração com safranina como descrito por Costa-Orlandi *et al.* (2014) com modificações. A quantificação foi realizada no tempo de 144 horas em placas de 96 poços. Após a remoção do meio e lavagem com PBS, o conteúdo polissacarídico foi marcado com a adição de 50 µL de solução de safranina 1%, por cinco minutos. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS. O conteúdo dos poços foi transferido para nova placa e a absorbância foi avaliada a 492 nm em leitor de placas Epoch 2 (BioTek).

3.5.3. Determinação da atividade metabólica dos biofilmes através do ensaio de redução do XTT

Uma medida semiquantitativa da formação dos biofilmes de *H. capsulatum* foi obtida a partir do ensaio de redução do 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[carbonilo (fenilamino)]-2H-tetrazólio-hidróxido (XTT) (MARTINEZ; CASADEVALL, 2007). Após a formação do biofilme em placas de 96 poços, o sobrenadante foi retirado e então 50 µL de solução XTT (1 mg/mL em PBS) e 4 µL de solução de menadiona (1 mM em Acetona) foram adicionados aos poços. As placas foram incubadas a 37 °C por 3 horas. A atividade das desidrogenases fúngica leva redução do sal de tetrazólio a sais de formazana, resultando em alteração colorimétrica que se correlaciona com a atividade metabólica. A mudança colorimétrica foi medida utilizando leitor de placas BioTek Epoch 2 a 490 nm.

3.5.4. Microscopia Eletrônica de Varredura

Para análise topográfica da formação do biofilme foi feita a microscopia eletrônica de varredura (MEV). O biofilme foi formado em placas de 24 poços como descrito no item 3.2, com tratamento prévio dos inóculos com os anticorpos anti-Enolase, anti-14-3-3, anti-PL02996, anti-GAPDH e anti-Hsp60 como descrito no item 3.5. Após a formação do biofilme, as amostras foram processadas como descrito por Morris *et al.* (1997) e Ells e Hansen (2006). Após a remoção do sobrenadante, as placas foram lavadas com PBS e fixadas com glutaraldeído 2,5% por 24 horas a 4 °C. Em seguida foi feita a etapa de desidratação, adicionando concentrações crescentes de álcool (20%, 30%, 50%, 70%, 90% e álcool absoluto). A seguir as amostras foram secas em dessecador e os poços foram recortados das placas com auxílio de um bisturi. Por fim, as amostras foram revestidas com ouro e analisadas com o microscópio eletrônico de varredura JSM-6610LV (JEOL), na Faculdade de Odontologia da UNESP - Araraquara.

3.5.5. Microscopia Confocal

Os biofilmes também foram analisados quanto a sua densidade e viabilidade por microscopia confocal. O biofilme foi formado em placas de 24 poços como descrito no item 3.2, com tratamento prévio dos inóculos com os anticorpos anti-Enolase, anti-14-3-3, anti-PL02996, anti-GAPDH e anti-Hsp60 como descrito no item 3.5. Após a formação do biofilme, o sobrenadante foi retirado e os biofilmes foram marcados com o kit LIVE/DEAD™ FungaLight™ (Thermo Fisher Scientific) por 30 min a 37 °C, seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, os biofilmes foram lavados com PBS, fixados com paraformaldeído 4% por 12 horas, e analisados no Microscópio de Fluorescência Confocal (Carl Zeiss LSM 800) na Faculdade de Odontologia da UNESP - Araraquara.

3.6. Influência das proteínas Enolase, 14-3-3, PL02996 e Hsp60 na virulência de *H. capsulatum* utilizando o modelo *G. mellonella*

Os experimentos foram realizados como descrito no item 3.3.2. Após o preparo do inóculo fúngico em uma densidade de 1×10^8 leveduras/mL, o inóculo foi incubado com os diferentes anticorpos policlonais (1:100) e com os anticorpo monoclonal anti-Hsp60 (10 µg/mL) por 1 hora a 37 °C. Em seguida, foram feita duas lavagens com PBS e, com auxílio de seringas Hamilton, 10 µL das suspensões fúngicas foram injetadas na pró-pata de cada larva, atingindo um inóculo de 1×10^6 leveduras por larva. As larvas foram incubadas a 37 °C por 10 dias. Como controle, foram utilizadas larvas inoculadas apenas com PBS. A sobrevivência das larvas foi avaliada através de inspeção diária.

3.7. Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada no programa GraphPad Prisma 5 (La Jolla CA, EUA). Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey. As curvas de sobrevivência foram plotadas pelo método Kaplan-Meyer e analisadas por Log-rank (Mantel-Cox). O valor $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise do perfil de virulência dos biofilmes do fungo *H. capsulatum*

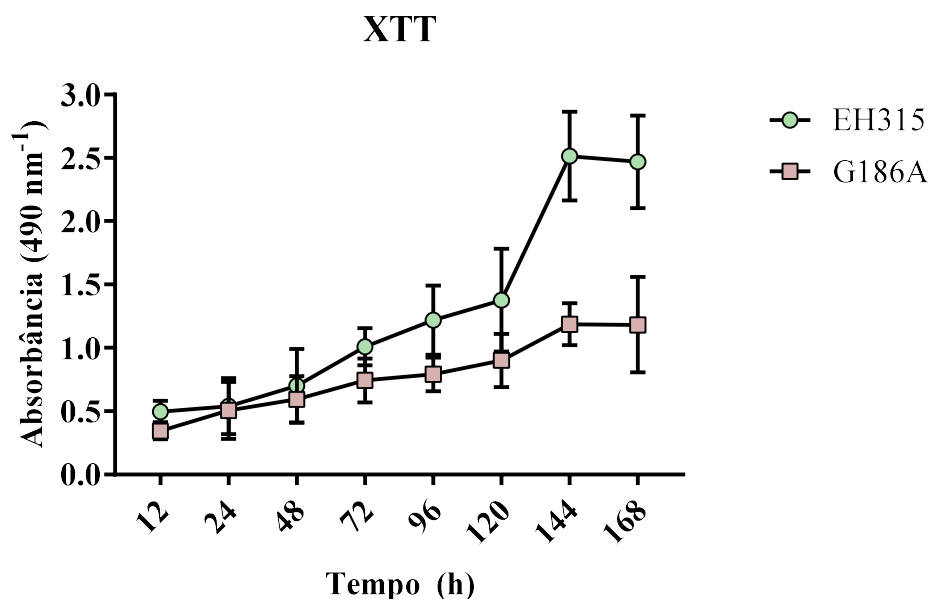
4.1.1. Estabelecimento da cinética de formação dos biofilmes

Previamente aos experimentos, foi feita a cinética de formação de biofilmes para determinar o tempo de maturação. De acordo com a cinética de atividade metabólica pela redução do XTT (**Figura 2**), de 12 a 120 horas observa-se um aumento contínuo e constante da atividade metabólica, que fica mais evidente entre 120 e 144 horas, compreendendo assim o período de desenvolvimento do biofilme. De 144 a 168 horas observa-se a tendência de estabilização da curva, para ambas as cepas, indicando a maturação do biofilme. A cinética de atividade metabólica foi similar nos estágios iniciais, mas a partir de 96 horas houve diferença estatística ($p < 0,001$), sendo que a cepa EH-315 apresentou maior atividade metabólica, corroborando com os resultados descritos por Gonçalves *et al.* (2020).

Em comparação com outros biofilmes fúngicos, como os de *Candida* spp (CHANDRA *et al.*, 2001; CHANDRA; MUKHERJEE, 2015; SÁNCHEZ-VARGAS *et al.*, 2013) e *Cryptococcus neoformans* (MARTINEZ; CASADEVALL, 2007), que possuem tempo de maturação de 24 e 48 horas, respectivamente, os biofilmes de *H. capsulatum* apresentam crescimento mais lento. Porém, possuem tempo de maturação similar ao encontrado nos biofilmes de outros fungos dimórficos, tais como *P. brasiliensis* (SARDI *et al.*, 2015) e fungos do complexo *Sporothrix schenckii* (BRILHANTE *et al.*, 2018; SANCHEZ-HERRERA *et al.*, 2020), que também atingiram sua maturação em 144 horas.

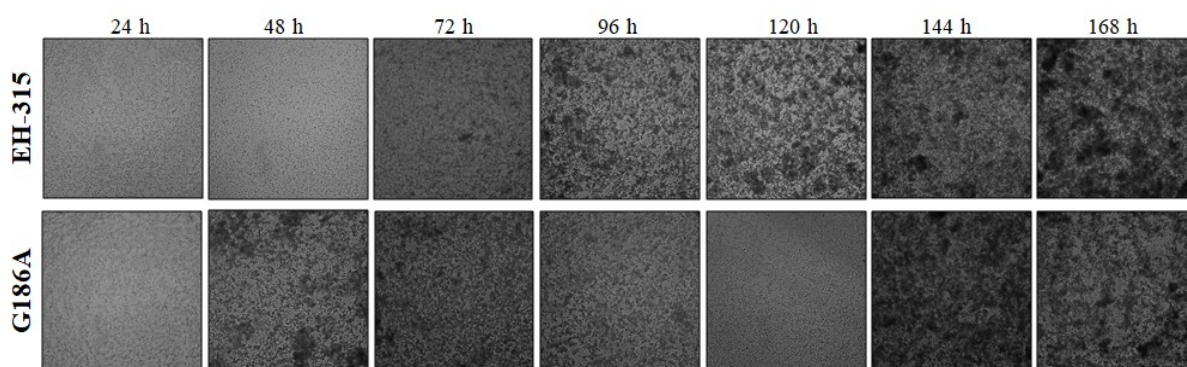
A cinética de formação dos biofilmes também foi avaliada por meio de microscopia óptica (magnificação de 10X), utilizando o equipamento *In Cell Analyzer 2000* (GE healthcare), e as imagens mostram a formação de uma biomassa intensa e consolidada a partir de 144 horas para ambas as cepas (**Figura 3**).

Figura 2 Cinética de formação dos biofilmes das cepas EH-315 e G186A estabelecida pela quantificação da atividade metabólica pela redução do XTT



Valores representados como a média de quatro experimentos independentes $\pm$ desvio padrão. Diferença estatística entre as cepas nos tempos de 96, 120, 144 e 168 horas ($p < 0,0001$).

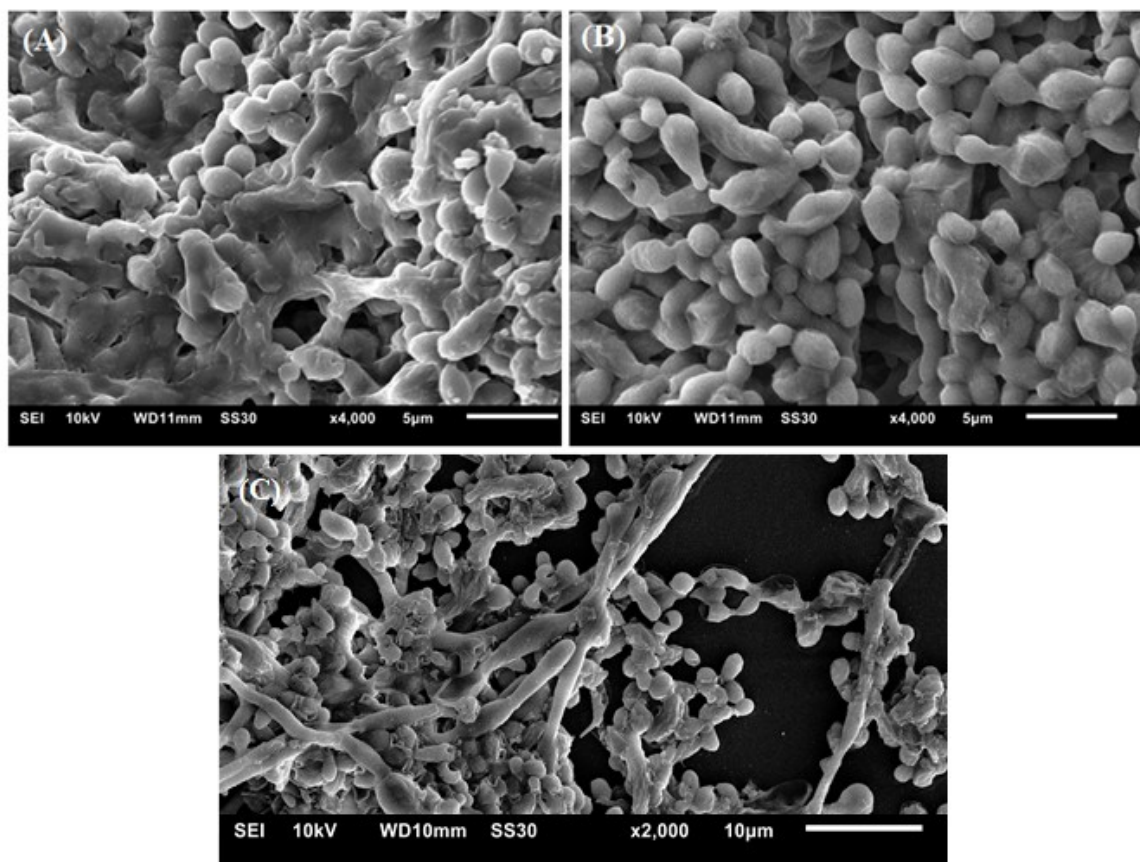
Figura 3 Microscopia óptica dos biofilmes das cepas EH-315 e G186A de *H. capsulatum* nos tempos de 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas.



Uma vez estabelecido o tempo de maturação do biofilme como 144 horas para as cepas EH-315 e G186A, os biofilmes maduros foram utilizados nos ensaios subsequentes.

Dessa maneira, foi feita a análise topográfica dos biofilmes maduros por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV). A MEV (**Figura 4**) evidencia a presença de matriz, células leveduriformes, algumas células mais alongadas e também a presença de hifas (**Figura 4C**).

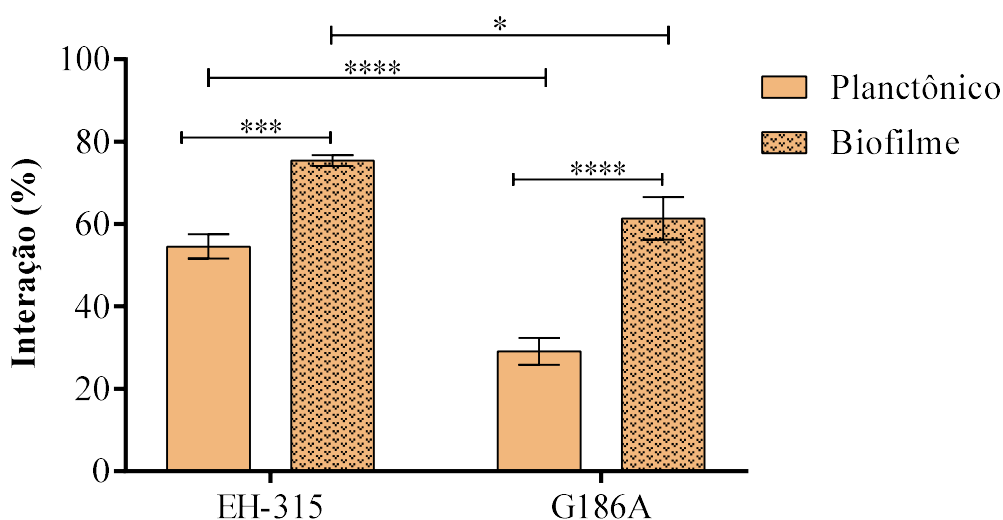
Figura 4 Biofilme maduro (144 horas) das cepas EH-315 (A) e G186A (B) e a presença de hifas (C) no biofilme da cepa EH-315.



4.1.2. Ensaio de interação com células epiteliais pulmonares e macrófagos

Após a determinação do tempo de maturação, foi avaliado o impacto da passagem por biofilme no perfil de interação com células do hospedeiro. De acordo com os resultados obtidos, em comparação com a cepa G186A, a cepa EH-315 demonstrou maior capacidade de interação com a linhagem de células epiteliais pulmonares (A549), com valores de 29,12 e 54,57% para a forma planctônica, e 61,38 e 75,46% para o biofilme, respectivamente. Na cepa G186A, as leveduras recuperadas do biofilme aumentaram em 32,26 % a capacidade de interação em relação às leveduras planctônicas. Já a cepa EH-315 apresentou aumento de 20,89% na interação (**Figura 5**).

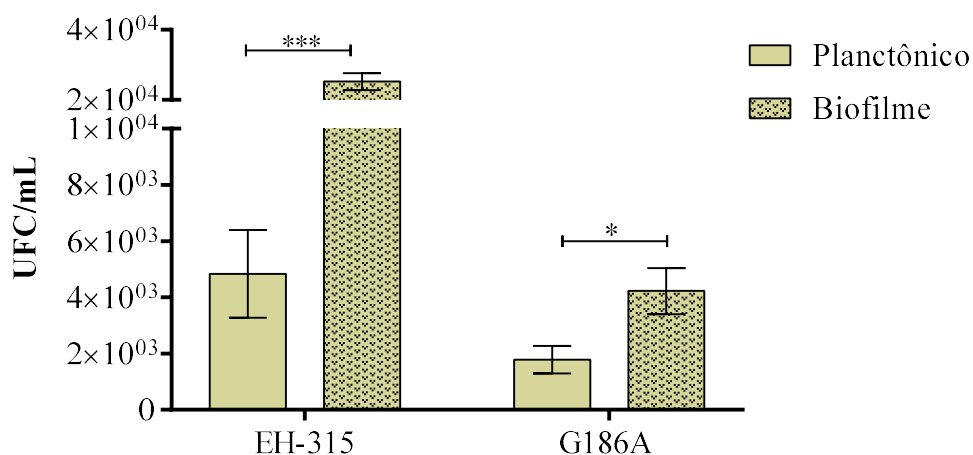
Figura 5 Porcentagem de interação das cepas EH-315 e G186A de *H. capsulatum* em células epiteliais pulmonares (A549) em sua forma planctônica e recuperada do biofilme.



Valores demonstrados referentes a três experimentos independentes $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

Além da análise da porcentagem de interação por citometria, foi feito o plaqueamento das células após uma hora de interação com as células A549 em meio BHI suplementado para contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) (**Figura 6**). Assim como observado nos resultados obtidos por citometria, houve um aumento significativo na quantidade de colônias a partir da interação com o biofilme para a cepa EH-315 ($p < 0,001$) e G186A ($p < 0,05$), representando maior interação quando ocorre a passagem por biofilme previamente à infecção.

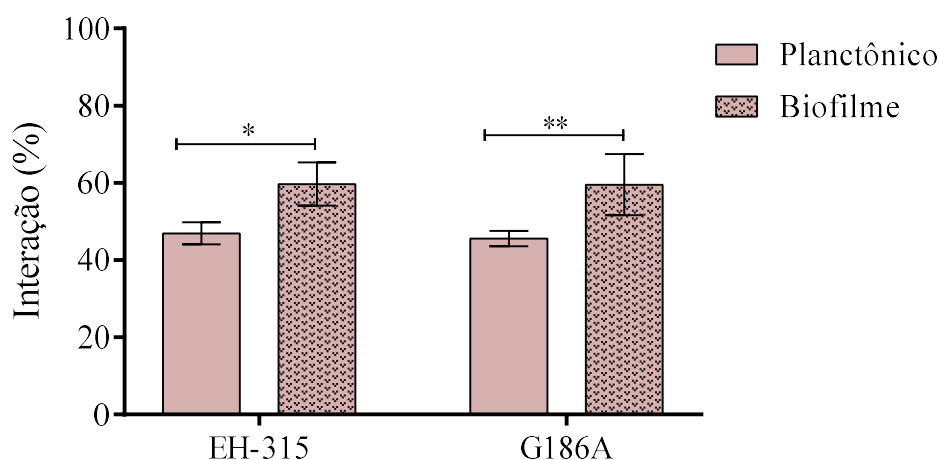
Figura 6 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) após 1 hora de interação das cepas EH-315 (A) e G186A (B) de *H. capsulatum* com células epiteliais pulmonares A549.



Valores demonstrados referentes a três experimentos independentes $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

As porcentagens de interação das cepas EH-315 e G186A com macrófagos murinos (RAW 264.7) em crescimento planctônico e recuperado do biofilme estão demonstradas na **figura 7**. De acordo com os resultados obtidos, as células infectadas com as leveduras planctônicas da cepa EH-315 apresentaram uma taxa de interação de 46,95%, que subiu para 59,7% quando as células são infectadas com as leveduras recuperadas do biofilme, representando assim um aumento de 12,75% na interação. Para a cepa G186A, a interação da forma planctônica foi de 45,62%, e de 59,56% para o biofilme, aumentando em 13,94% a taxa de interação com os macrófagos RAW após a passagem por biofilme, em comparação com o cultivo planctônico.

Figura 7 Porcentagem de interação das cepas EH-315 e G186A de *H. capsulatum* com macrófagos murinos (RAW 264.7) em sua forma planctônica e recuperada do biofilme.



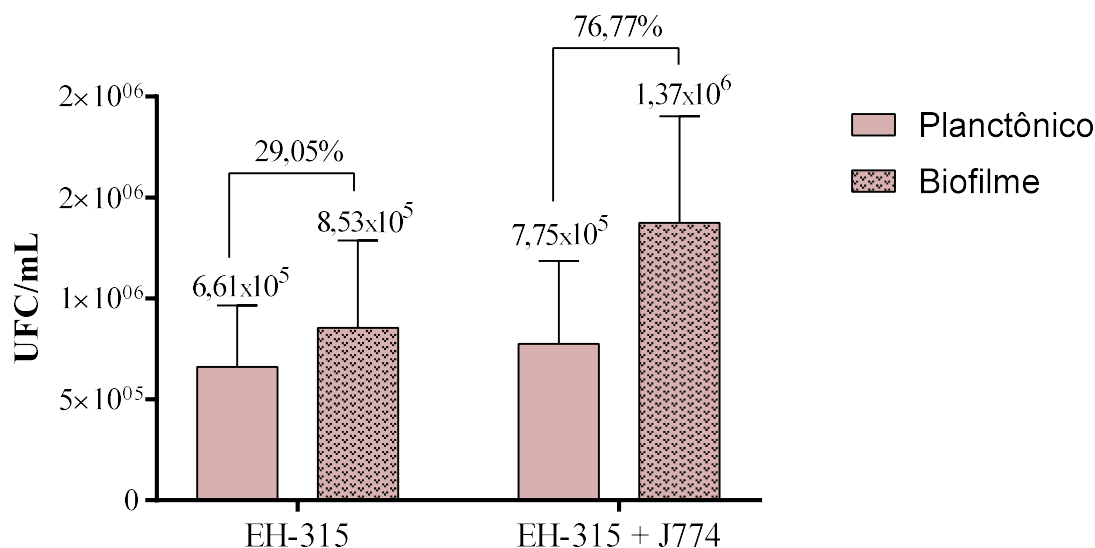
Valores demonstrados referentes a dois experimentos independentes $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Nesse sentido, surgiu o questionamento se esse aumento na interação com macrófagos poderia ocasionar maior morte celular devido à fagocitose, ou se o processo seria benéfico para o fungo. Buscou-se então avaliar o perfil de multiplicação intracelular das cepas após 24 horas de interação com macrófagos, de forma comparativa entre planctônico e biofilme. Entretanto, devido à perda da célula RAW 264.7 em nosso banco de células os ensaios subsequentes foram realizados com o macrófago murino J774, célula amplamente utilizada no estudo da patogênese de *H. capsulatum* (BRECHTING; RAPPLEYE, 2019; EDWARDS *et al.*, 2011b; GUIMARAES *et al.*, 2019). Os resultados obtidos estão demonstrados na **Figura 8**.

Houve dificuldade na recuperação da cepa G186A em meio sólido após a interação com os macrófagos. Dessa maneira, os resultados estão demonstrados apenas para a cepa EH-315. Após a passagem por biofilme foi observado um aumento de 29,05% no crescimento das leveduras em comparação com o crescimento planctônico na ausência dos macrófagos, demonstrando que o biofilme interfere na taxa de proliferação do fungo.

Na presença dos macrófagos, esse aumento foi ainda maior, sendo que o crescimento das leveduras planctônicas apresentou uma média de $7,75 \times 10^5$ UFC/mL e o crescimento das leveduras recuperadas do biofilme apresentou uma média $1,37 \times 10^6$ UFC/mL, representando assim um aumento de 76,77% na proliferação intracelular quando cultivada em forma de biofilme previamente a infecção.

Figura 8 Multiplicação intracelular da cepa EH-315 em sua forma planctônica e recuperada do biofilme



Valores demonstrados referentes a dois experimentos independentes $\pm$ desvio padrão.

A maioria dos estudos envolvendo *H. capsulatum* é focada na fagocitose ou resposta imunológica em geral, com diversos estudos demonstrando vias de interação com macrófagos e outras células de defesa (GARFOOT; RAPPLEYE, 2016; LARA-LEMUS *et al.*, 2014) bem como a modulação nos perfis de citocinas que são liberadas tanto em macrófagos quanto em células epiteliais pulmonares (MAZA; SUZUKI, 2016; YOUSEFF *et al.*, 2012).

Entretanto, a demonstração de que as leveduras de *H. capsulatum* podem formar biofilmes *in vitro* (GONÇALVES *et al.*, 2020; PITANGUI *et al.*, 2012) e que também são capazes de aderir à pneumócitos (PITANGUI *et al.*, 2012), órgãos de morcego criopreservados (SUAREZ-ALVAREZ *et al.*, 2010), endotélio humano (LEDTKE *et al.*, 2012), válvulas prostéticas cardíacas (ALEXANDER *et al.*, 1979; LORCHIRACHONKUL *et al.*, 2013) e enxertos aortofemorais (PATEL; BRONZE, 2014), chamam atenção para a avaliação da importância da adesão e dos biofilmes para a colonização e disseminação de *H. capsulatum*. Além disso, como posteriormente no presente trabalho será demonstrada a correlação de fatores e mecanismos de virulência de *H. capsulatum* com o gênero *Paracoccidioides* spp., vale ressaltar que, para o fungo *P. brasiliensis*, a formação de biofilmes *in vivo* em prótese vascular já foi relatada (CATTANA *et al.*, 2017).

A formação de biofilmes pode ser considerada um importante mecanismo de virulência, pois, em comparação com as células planctônicas, o biofilme possui diferenças

estruturais e metabólicas, que proporcionam proteção contra o meio ambiente, resistência ao estresse físico e químico, além de modulação das respostas ao estresse (REICHHARDT *et al.*, 2016). Além disso, os biofilmes fúngicos são um importante problema clínico, associado ao aumento significativo da resistência aos fármacos, persistência da doença e aumento das taxas de mortalidade (KOLLEF *et al.*, 2012; KOWALSKI *et al.*, 2019; UPPULURI *et al.*, 2010). Em biofilmes de *H. capsulatum* foi relatada maior resistência a Anfotericina B e Itraconazol, principais fármacos utilizado no tratamento da histoplasmose (BRILHANTE *et al.*, 2015).

Dessa maneira, é importante verificar se a passagem por biofilmes, além de implicar no tratamento, como já demonstrado por BRILHANTE *et al.* (2015), ocasiona diferenças que podem impactar na capacidade de infecção e disseminação do fungo para outros órgãos. Posteriormente é necessário ainda entender quais mecanismos estão envolvidos nesses processos.

De acordo com os resultados obtidos, a passagem por biofilmes aumentou a interação com células epiteliais pulmonares. A interação com células epiteliais pode ser dividida em três estágios: adesão, invasão e dano tecidual (NAGLIK *et al.*, 2011); que podem ser mediados por interações não específicas, tais como hidrofobicidade da superfície e interações eletrostáticas (DABIRI *et al.*, 2018; KUMARI *et al.*, 2018), ou por proteínas, como exemplo a família de adesinas Als em *Candida* spp. (WACHTLER *et al.*, 2011). Nesse sentido, durante a formação de biofilmes sabe-se que ocorre aumento na expressão de diversas proteínas que atuam como adesinas (HOYER *et al.*, 2008; SARDI *et al.*, 2015) e que poderiam estar relacionadas com os resultados encontrados, enaltecendo então a busca por essas moléculas no fungo *H. capsulatum*.

A passagem por biofilmes também afetou a taxa de interação com macrófagos, e, para a cepa EH-315, as leveduras recuperadas do biofilme também demonstraram aumento na multiplicação intracelular, evidenciando a falta de atividade dos mecanismos microbicidas dos macrófagos. Para determinar o mecanismo exato, são necessários mais experimentos. Entretanto, para *Candida* spp., já foi demonstrado que a formação de biofilmes influencia diretamente na resposta imune celular, incluindo os processos de migração, fagocitose e produção de citocinas (ALONSO *et al.*, 2017; ARCE MIRANDA *et al.*, 2019). Durante a formação inicial dos biofilmes, macrófagos são capazes de fagocitar *C. albicans* (ARCE MIRANDA *et al.*, 2019). Porém, após a maturação do biofilme, há redução da atividade dos macrófagos, assim como demonstrado no presente trabalho. Além disso, o co-cultivo com macrófagos induz aumento na formação dos biofilmes (ARCE MIRANDA *et al.*, 2019). Entretanto, mesmo em *Candida* spp, que possui biofilmes já bem descritos, a explicação sobre

o aumento da multiplicação e atividade de biofilmes na presença de células de defesa ainda não é conhecida.

O conhecimento de que a passagem por biofilmes aumenta a interação com macrófagos e células epiteliais pulmonares e influencia na multiplicação intracelular é um passo inicial para busca de mais informações envolvendo biofilmes de *H. capsulatum*, uma vez que esses acontecimentos podem impactar diretamente no desenvolvimento da doença.

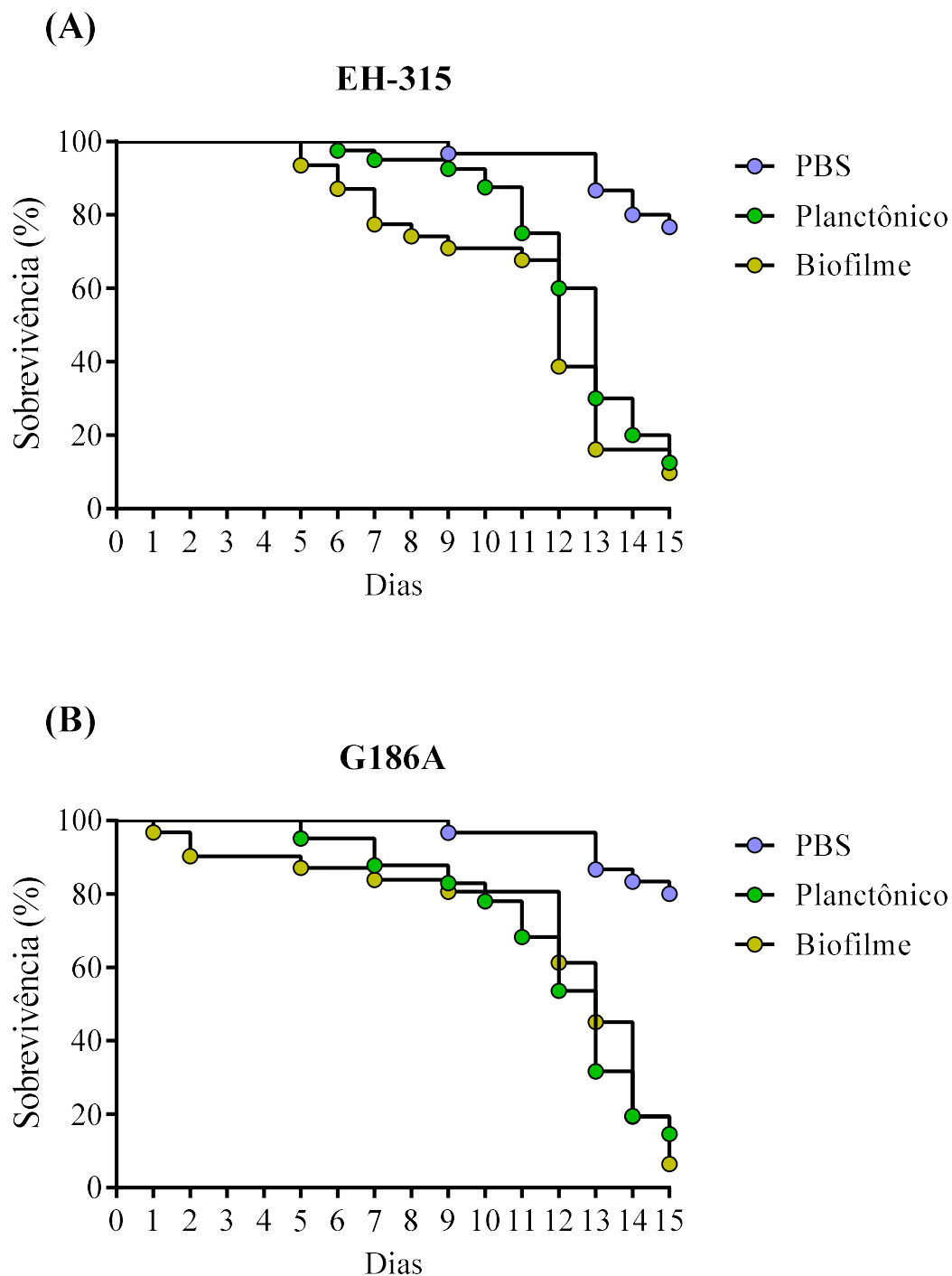
4.1.3. Virulência *in vivo* dos biofilmes de *H. capsulatum*

Os biofilmes de *H. capsulatum* também foram avaliados quanto ao perfil de virulência no modelo animal alternativo *G. mellonella*, através da análise da curva de sobrevivência e da contagem de hemócitos.

Para a cepa EH-315 (**figura 9A**), a análise comparativa da curva de sobrevivência entre as condições de crescimento planctônico e biofilme demonstrou que, até o décimo segundo dia de experimento, houve diferença estatística ($p<0,05$), com taxa de sobrevivência de 38,7% para as larvas infectadas com o biofilme e 60% para as larvas infectadas com a forma planctônica. Entretanto, ao final de 15 dias de experimento não houve diferença entre as curvas. Para a cepa G186A a infecção com o biofilme induziu a morte das larvas a partir do segundo dia de experimento, enquanto que para o grupo infectado com o planctônico, até o quinto dia de experimento ainda não havia morte das larvas (**figura 9B**).

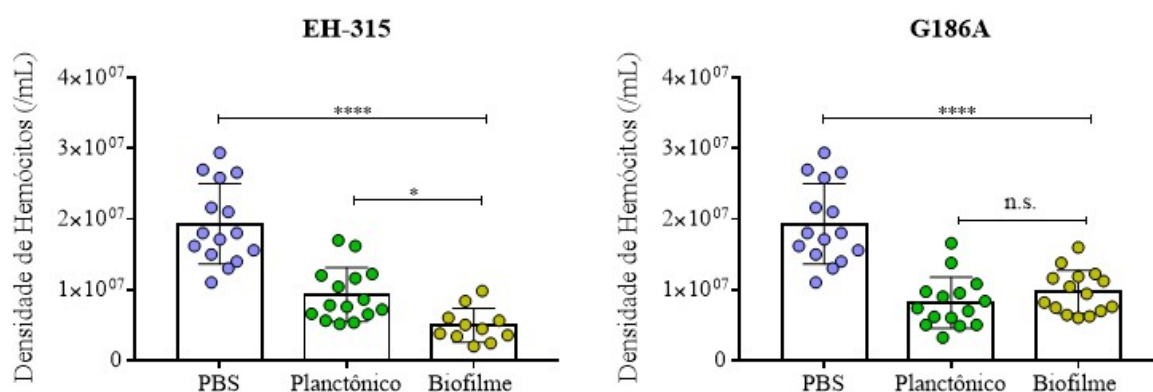
Cerca de três horas após a inoculação das larvas com as cepas G186A e EH-315 provenientes das culturas planctônicas e das leveduras recuperadas do biofilme, foi realizada a contagem de hemócitos. De acordo com os resultados (**figura 10**), no tempo analisado houve redução significativa da densidade de hemócitos em todas as situações, para ambas as cepas, quando comparadas ao controle PBS ($p<0,05$). Entretanto, a redução significativa entre a infecção com leveduras planctônicas e leveduras recuperadas do biofilme só foi observada para a cepa EH-315 ($p<0,05$).

Figura 9 Curva de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* após infecção com as cepas EH-315 (A) e G186A (B) de *H. capsulatum*.



Valores representados referentes a três experimentos independentes. Diferença estatística entre grupo planctônico e biofilme em comparação com o grupo PBS para ambas as cepas ($p < 0,05$).

Figura 10 Densidade de hemócitos das larvas de *G. mellonella* após 3h de infecção com as cepas EH-315 (A) e G186A (B) nas formas: planctônica e leveduras recuperadas do biofilme



Valores demonstrados referentes a cinco experimentos independentes em triplicata $\pm$ desvio padrão. Círculos coloridos indicam a distribuição dos eventos (n). * $p < 0,05$; n.s. não significante

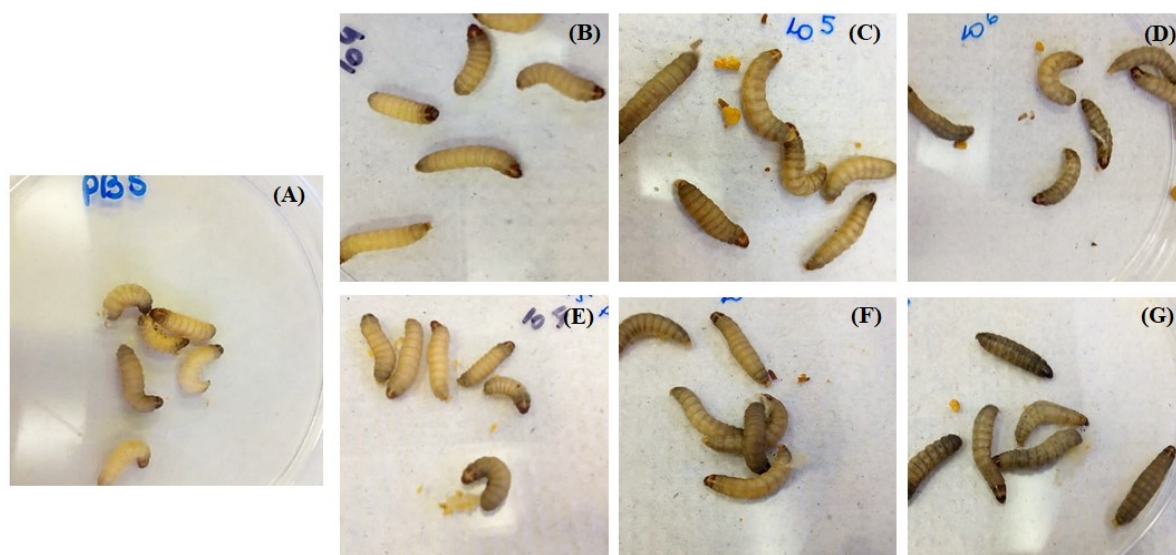
Desde a primeira publicação acerca do controle no uso de animais, com a implementação dos 3R's (*Replacement, Reduction & Refinement*), a busca por alternativas tem sido constante (Russell & Burch, 1959). Nesse contexto, a utilização de insetos para avaliar a virulência de patógenos fúngicos e também a eficácia de tratamentos tem sido cada vez mais aplicada (PERINI *et al.*, 2019; SCORZONI *et al.*, 2015; THOMAZ *et al.*, 2013)

Diversas características estão relacionadas com essa ascensão, como por exemplo, baixo custo e facilidade de manutenção, além da presença de resposta imune, que apresenta estruturas e funções similares com a resposta imunológica inata dos mamíferos (FUCHS; MYLONAKIS, 2006). A resposta imune dos insetos pode ser dividida em celular e humoral, na qual a resposta celular é mediada por hemócitos, envolvendo principalmente fagocitose, nodulação e encapsulação, e a resposta humoral, pela produção de moléculas solúveis, tais como melanina e peptídeos antimicrobianos. Os hemócitos circulam livremente na hemolinfa, mas podem ser encontrados aderidos em alguns órgãos, como os corpos gordurosos. A densidade dos hemócitos pode variar durante a vida do inseto e também em resposta a infecções (BROWNE *et al.*, 2013).

A redução da contagem de hemócitos pode variar dependendo do patógeno utilizado na infecção. Para *P. brasiliensis*, da mesma forma que *H. capsulatum*, há diminuição no número de hemócitos (SCORZONI *et al.*, 2015), enquanto que para outros patógenos, como *Cryptococcus* spp., a diminuição não é observada (SCORZONI *et al.*, 2013). Essa redução do número de hemócitos pode estar associada ao processo de nodulação, no qual os hemócitos se unem ao redor dos patógenos que estão na hemolinfa, retirando-os de circulação. Essa é uma

das principais defesas celulares apresentada pelos insetos em resposta a infecções, e permite que um amplo número de microrganismos seja retirado da hemolinfa. O processo de nodulação termina com a ativação de profenoloxidase e melanização (BROWNE *et al.*, 2013). Além da redução significativa do número de hemócitos, no presente trabalho, também foi observada a melanização das larvas de uma maneira dose-dependente (**figura 11**), como descrito por THOMAZ *et al.* (2013), bem como durante a infecção com as leveduras em crescimento planctônico e recuperado do biofilme (**Figura 12**), corroborando para a hipótese de que o evento de nodulação ocorre durante a infecção das larvas com *H. capsulatum*.

Figura 11 Melanização das larvas de *G. mellonella* após 3 h de infecção com as cepas G186A (B, C, D) e EH-315 (E, F, G).



B, E: 1×10^4 leveduras/larva; C, F: 1×10^5 leveduras/larva; D, G: 1×10^6 leveduras/larva.

Figura 12 Melanização das larvas de *G. mellonella* após 3h de infecção com as cepas G186A (B, C) e EH-315 (D, E) na forma planctônica e recuperada do biofilme em comparação como controle PBS (A).

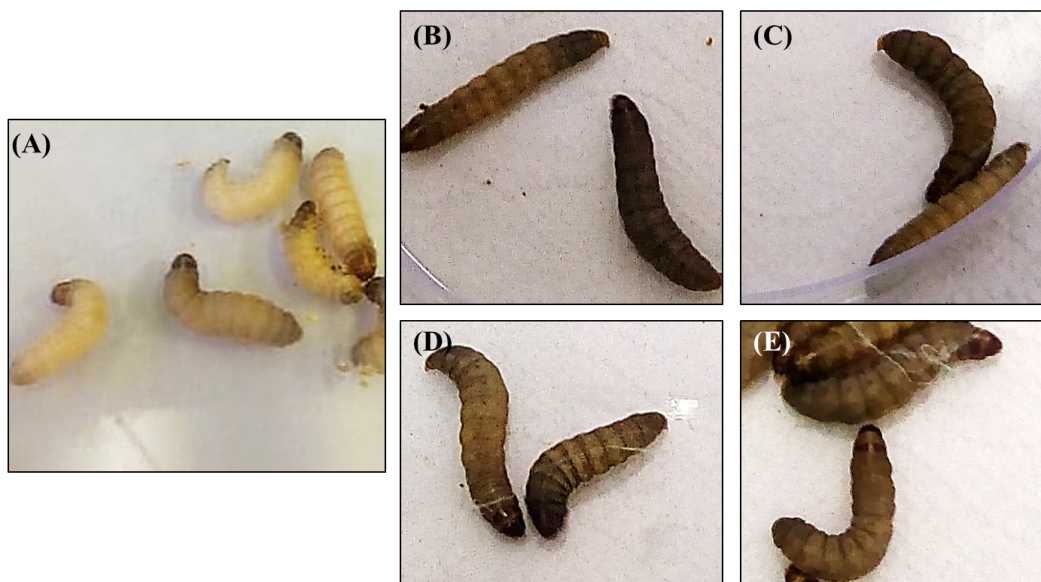


Imagem representa o grupo controle de PBS (A); larvas infectadas com a cepa G186A, planctônica (B) e recuperada do biofilme (C); e larvas infectadas com a cepa EH315 planctônica (D) e recuperada do biofilme (E) utilizando inóculo de 10^6 leveduras/larva.

Além da nodulação, outro processo que pode estar envolvido com a redução da densidade de hemócitos é a indução de apoptose (ARTEAGA BLANCO *et al.*, 2017), que está diretamente relacionada com a virulência da cepa estudada, sendo que quanto mais virulenta a cepa, maior a habilidade de evadir o sistema imune causando a morte das células de defesa, e consequentemente, diminuir a sobrevivência (ARTEAGA BLANCO *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2015). A apoptose de células de defesa já é um evento descrito na patogênese do fungo *H. capsulatum*, uma vez que já foi demonstrado a indução de apoptose *in vitro* em macrófagos alveolares após 2 horas de infecção (PITANGUI *et al.*, 2015).

Apesar de diversos estudos envolvendo outros microrganismos, como *Acinetobacter baumannii* (WAND *et al.*, 2012), *C. albicans* (CIRASOLA *et al.*, 2013), *C. neoformans* e *C. gatii* (BENADUCCI *et al.*, 2016), já terem demonstrado o aumento na taxa de mortalidade das larvas de *G. mellonella* após a infecção com células provenientes de biofilmes em comparação com o planctônico, no presente estudo não houve diferença significativa entre as infecções com os grupos de leveduras planctônicas e com os grupos de leveduras recuperadas dos biofilmes, para ambas as cepas. Entretanto, os resultados obtidos demonstram uma morte precoce das larvas quando infectadas com o biofilme, além da diminuição significativa da

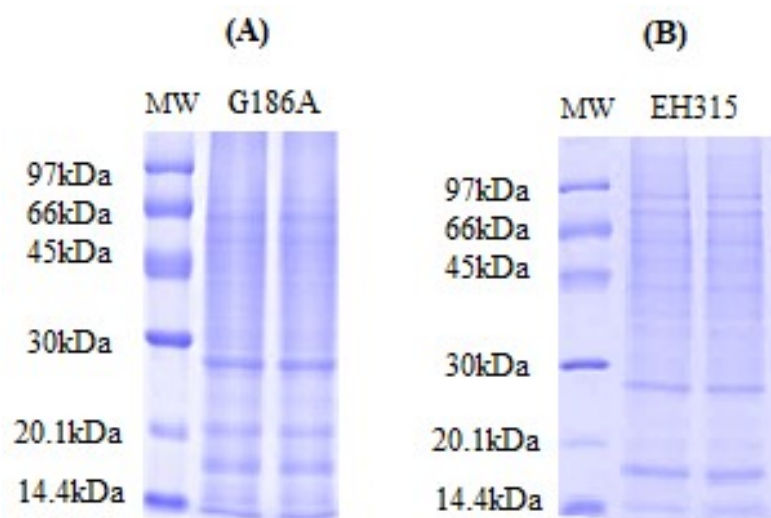
densidade de hemócitos na cepa EH-315 quando comparado com o planctônico, indicando que talvez a passagem por biofilme possa induzir fatores que desencadeiam uma resposta de maior virulência inicial.

4.2. Busca por novos fatores de virulência em *H. capsulatum*

Como poucos fatores de virulência estão descrito para *H. capsulatum*, e praticamente nenhum com função de adesina, optamos pela estratégia de buscá-los a partir daqueles já descritos para outros fungos dimórficos, tais como *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. As proteínas Enolase, 14-3-3, Malato Sintase e PL02996 são proteínas envolvidas na virulência e na adesão de *Paracoccidioides* spp. aos componentes da matriz extracelular. (ANDREOTTI *et al.*, 2005; DA SILVA *et al.*, 2009; DA SILVA *et al.*, 2013; MARCOS *et al.*, 2016; MARCOS *et al.*, 2019). Para determinar a presença dessas proteínas em *H. capsulatum*, utilizou-se como estratégias a utilização de anticorpos policlonais contra as proteínas de *Paracoccidioides* spp. em extratos proteicos de *H. capsulatum* pela técnica de *Western Blott*, para avaliar a reatividade dos mesmos; análises *in silico*, para avaliar a homologia das proteínas entre os gêneros; além da Microscopia Confocal para avaliar a localização das proteínas marcadas através de imunofluorescência.

Após a extração de proteínas totais das cepas EH-315 e G186A, foi feita a eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (**figura 13**), onde foi possível observar o padrão de bandas semelhante entre as cepas.

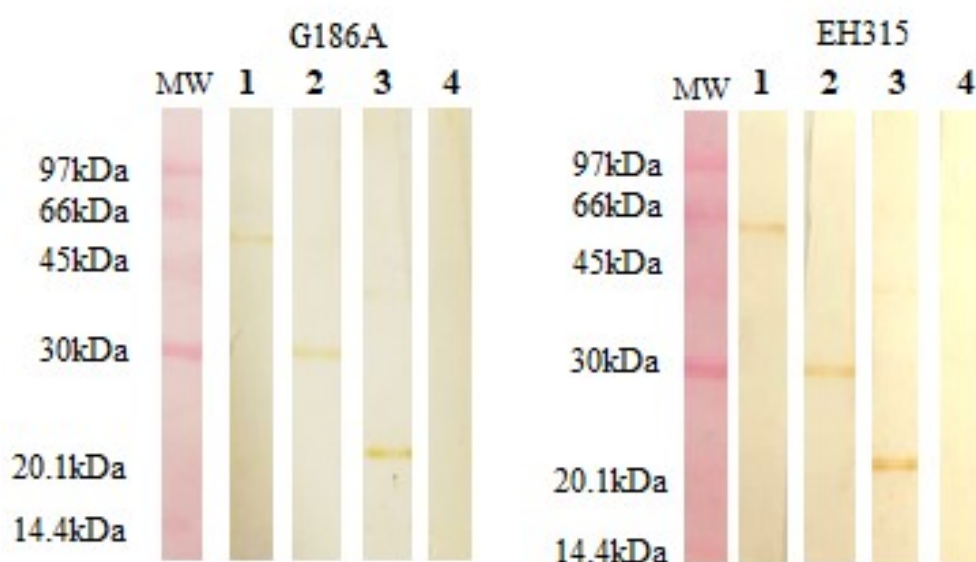
Figura 13 Eletroforese das proteínas totais da cepa G186A (A) e EH315 (B) de *H. capsulatum* em gel de poliacrilamida 12%



Valores demonstrados como duas corridas referentes a duplicata experimental

As proteínas isoladas a partir da eletroforese em gel de poliacrilamida 12% foram transferidas para a membrana de nitrocelulose e em seguida submetidas à técnica de *Western blott* (**figura 14**). Como mencionado, foram avaliados quatro anticorpos: anti-Enolase, anti-14-3-3 e anti-MLT (Malato sintase) produzidos contra as proteínas de *P. brasiliensis* e anti-PL02996 produzido contra a proteína do fungo *P. lutzii*. Dos quatro anticorpos testados, apenas três, sendo eles anti-Enolase, anti-14-3-3 e anti-PL02996, reagiram com proteínas do fungo *H. capsulatum* para ambas as cepas, sendo que as bandas apresentaram reação na mesma região que as bandas encontradas em *Paracoccidioides* spp (Enolase – 54 kDa; 14-3-3 – 30 kDa; PL02996 – 24 kDa). O anticorpo anti-MLT não demonstrou reatividade no título utilizado. O anticorpo anti-MLT foi escolhido, pois a proteína Malato sintase (MLT) também já teve sua função como adesina em *P. brasiliensis* descrita por Da Silva *et al.* (2009), que demonstraram sua localização na superfície desse fungo e ação de ligante de fibronectina e colágenos tipo I e IV, contribuindo mais uma vez para a adesão do fungo. Porém, mesmo com alta identidade entre a proteína dos dois fungos (~92%), o anticorpo não foi reativo para as cepas de *H. capsulatum*.

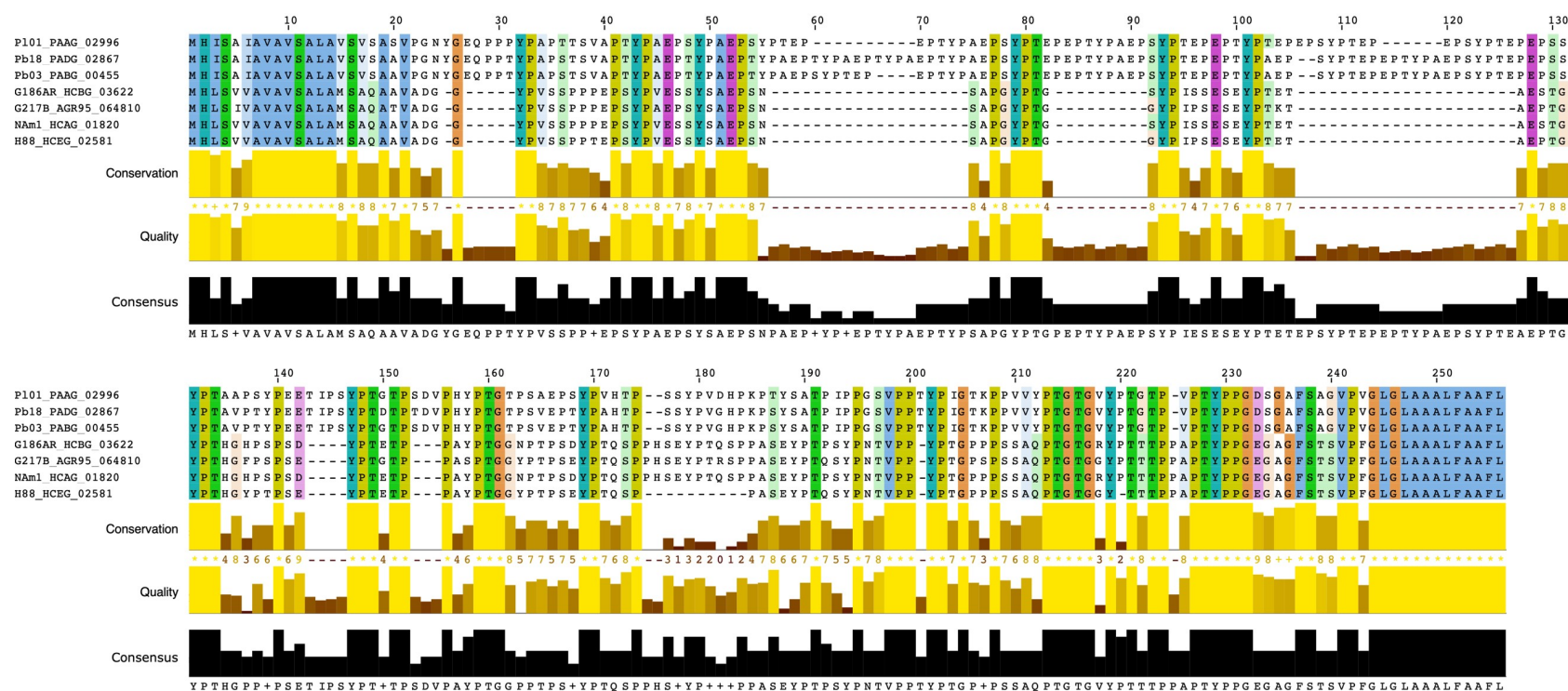
Figura 14 Reconhecimento de proteínas em extratos proteicos de G186A e EH-315 de *H. capsulatum* utilizando os anticorpos anti-Enolase (1), anti-14-3-3 (2), anti-PL02996 (3) e anti-MLT (4).



A proteína PL02996 (FungiDB: PAAG_02996) foi uma proteína de superfície identificada por nosso grupo a partir de estudos de transcriptoma da interação de *P. lutzii* com

os componentes da matriz extracelular laminina e fibronectina. É uma proteína de 24 kDa importante para a interação de *Paracoccidioides* spp. com o hospedeiro, sendo que o bloqueio desta proteína ocasiona atenuação da virulência em modelo animal alternativo *G. mellonella* (DE OLIVEIRA, submetido). A busca por homólogos da PL02996 utilizando o banco de dados FungiDB (BASENKO *et al.*, 2018; STAJICH *et al.*, 2012) demonstrou um resultado interessante, revelando que, entre os fungos dimórficos e de importância médica, apenas no genoma das cepas de *H. capsulatum* já depositadas (G186AR [HCBG_03622], G217B [AGR95_064810], NAm1 [HCAG_01820] e H88 [HCEG_02581]) foi encontrado homologia, sendo que o alinhamento das sequências da PL02996 de *P. lutzii* demonstrou alta similaridade com as sequências de *H. capsulatum* (78% para G186AR, 79% para G217B, 79% para NAm1 e 78% para H88), revelando que a proteína é conservada entre os gêneros *Paracoccidioides* e *Histoplasma* (**Figura 15**).

Figura 15 Alinhamento da sequência da proteína PL02996 em *Paracoccidioides* e *H. capsulatum*. Análise do alinhamento das sequências homólogas de *P. lutzii* (PADG_02996), *P. brasiliensis* Pb18 (PADG_02867), *P. americana* Pb03 (PABG_00455) e as cepas G186AR (HCBG_03622), G217B (AGR95_064810), Nam1 (HCAG_01820) e H88 (HCEG_02581) de *H. capsulatum* utilizando ClustalW com a imagem de alinhamento gerada no Jalview.



Conservation: Índice numérico que reflete a conservação das propriedades físico-químicas para cada sequência (*: máximo de conservação entre as sequencias; Números (0-10): mutações entre as sequencias; -: gaps). **Quality:** medida *ad-hoc* do grau de parentesco das mutações observadas (quando houver) em uma determinada coluna do alinhamento. **Consensus:** reflete a porcentagem dos diferentes resíduos por coluna.

Além da alta similaridade, foi feita a predição *in silico* da função da sequência homóloga, e, assim como em *Paracoccidioides* spp., todas as sequências encontradas em *H. capsulatum* compartilham características que permitem a predição da proteína PL02996 como adesina (**Tabela 1**).

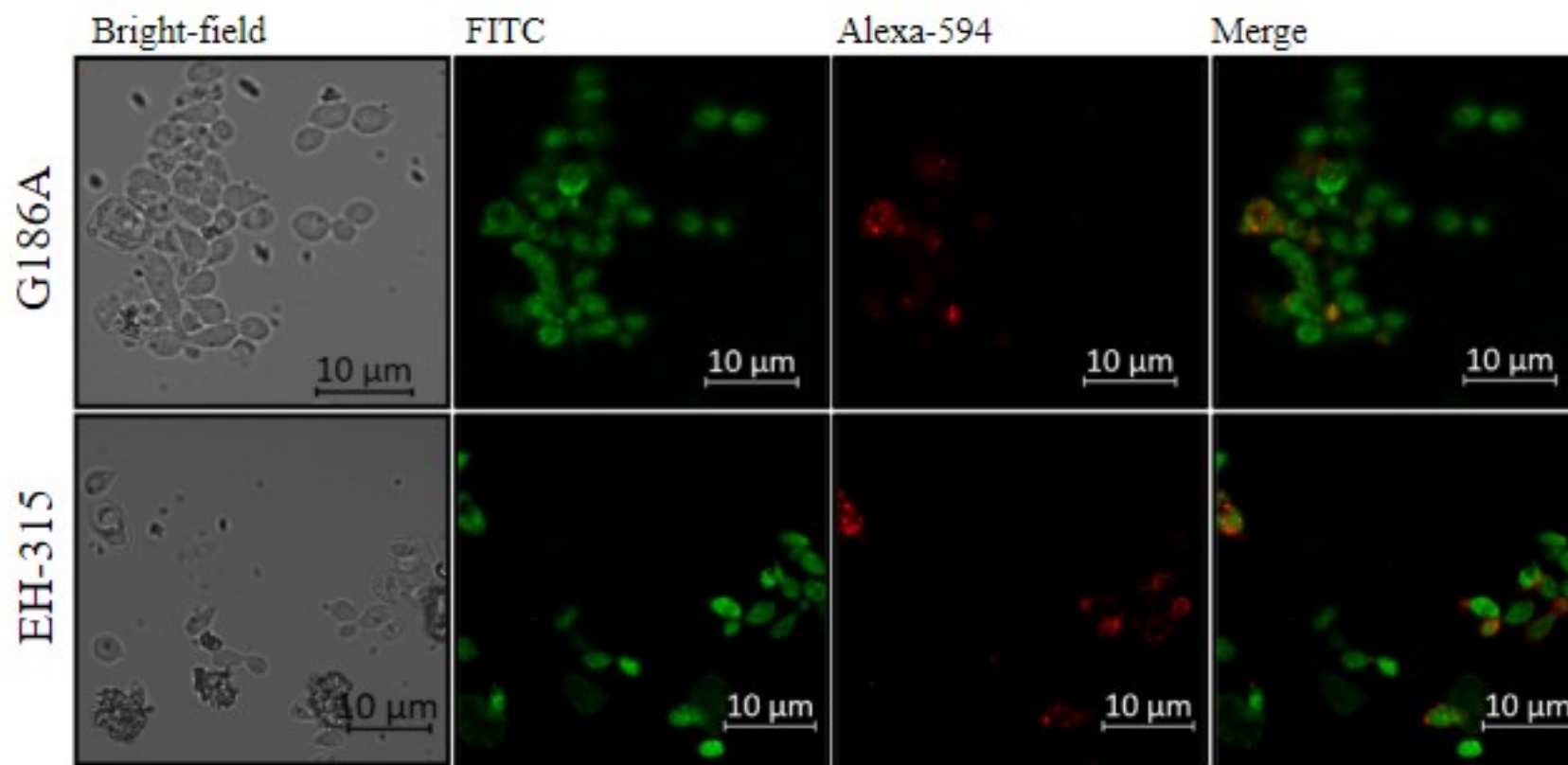
Tabela 1 Predição funcional dos homólogos da proteína PL02996 em diversas cepas de *H. capsulatum*.

Proteína	Cepa	Número de acesso ^{\$}	Predição	SVW Score	Peptídeo Sinal	Domínio THMM	Localização [#]
Hipotética	G186AR	HCBG_03622	Adesina	1.6342	Sim	Não	SP
Inespecífica	G217B	AGR95_064810	Adesina	1.6107	Sim	Não	SP
Predita	NAm1	HCAG_01820	Adesina	1.6342	Sim	Não	SP
Hipotética	H88	HCEG_02581	Adesina	1.3864	Sim	Não	SP

\$ Número de acesso no FungiDB. # SP: *secretory pathway*.

A distribuição celular da proteína PL02996 em *H. capsulatum* foi analisada por microscopia confocal a laser após a marcação da proteína pela técnica de imunofluorescência (**figura 16**), revelando predomínio da proteína na superfície celular.

Figura 16 Microscopia Confocal da proteína PL02996 nas cepas G186A e EH-315 de *H. capsulatum*

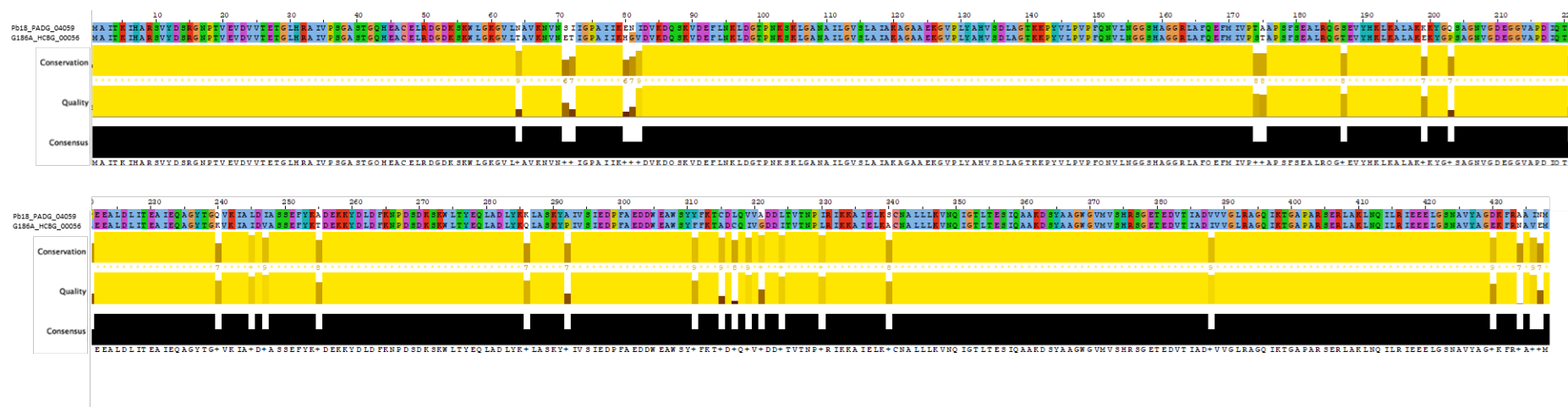


Cepas EH-315 e G186A de *H. capsulatum* marcadas com FITC (verde) e proteína PL02996 marcada com anticorpo específico conjugado com Alexa 594 (vermelho).
Aumento de 63x

A análise da homologia entre a proteína Enolase de *P. brasiliensis* (FungiDB PADG_04059) com a sequência homóloga encontrada na cepa G186A de *H. capsulatum* (FungiDB HCBG_00056) demonstrou valor de identidade de 93% (**Figura 17**). Donofrio *et al.* (2009) descreveram a proteína Enolase como uma adesina de *P. brasiliensis*, capaz de se ligar a fibronectina, importante componente da matriz extracelular (MEC). Mais tarde, foi evidenciada sua alta expressão na parede celular, contribuindo para adesão do patógeno ao hospedeiro (MARCOS *et al.*, 2012).

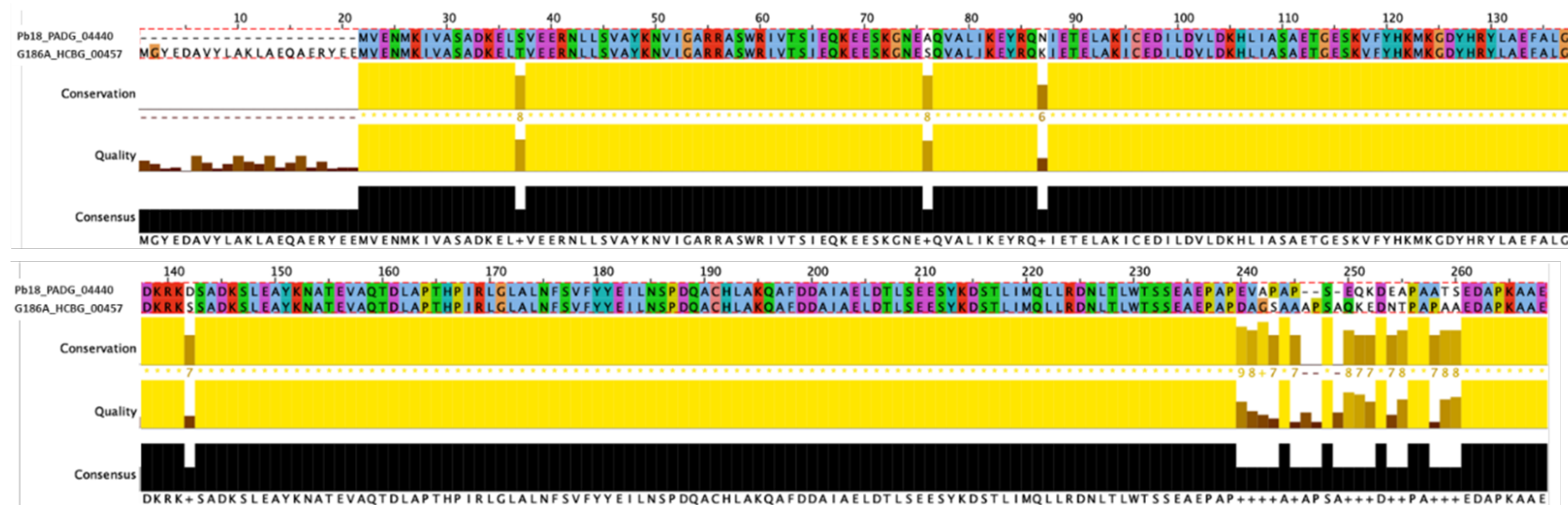
Assim como a Enolase, a proteína 14-3-3 (Pb18 – FungiDB PADG_04440) também demonstrou alta homologia com a sequência encontrada na cepa G186A de *H. capsulatum* (HCBG_00457), com 94% de identidade (**Figura 18**). A proteína 14-3-3 também é encontrada na parede celular de *Paracoccidioides* (DA SILVA *et al.*, 2013) e está envolvida na morfologia (MARCOS *et al.*, 2016), adesão do fungo aos componentes da MEC (ANDREOTTI *et al.*, 2005) e na virulência em modelo murino (DA SILVA *et al.*, 2013; DE OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Figura 17 Alinhamento da sequência da proteína Enolase da cepa Pb18 de *P. brasiliensis* (PADG_04059) com a proteína homóloga encontrada na cepa G186A de *H. capsulatum* (HCBG_00056). Análise do alinhamento das sequências homólogas utilizando *ClustalW* com a imagem de alinhamento gerada no *Jalview*.



Conservation: Índice numérico que reflete a conservação das propriedades físico-químicas para cada sequência (*: máximo de conservação entre as sequências; Números (0-10): mutações entre as sequências; -: gaps). *Quality*: medida *ad-hoc* do grau de parentesco das mutações observadas (quando houver) em uma determinada coluna do alinhamento. *Consensus*: reflete a porcentagem dos diferentes resíduos por coluna.

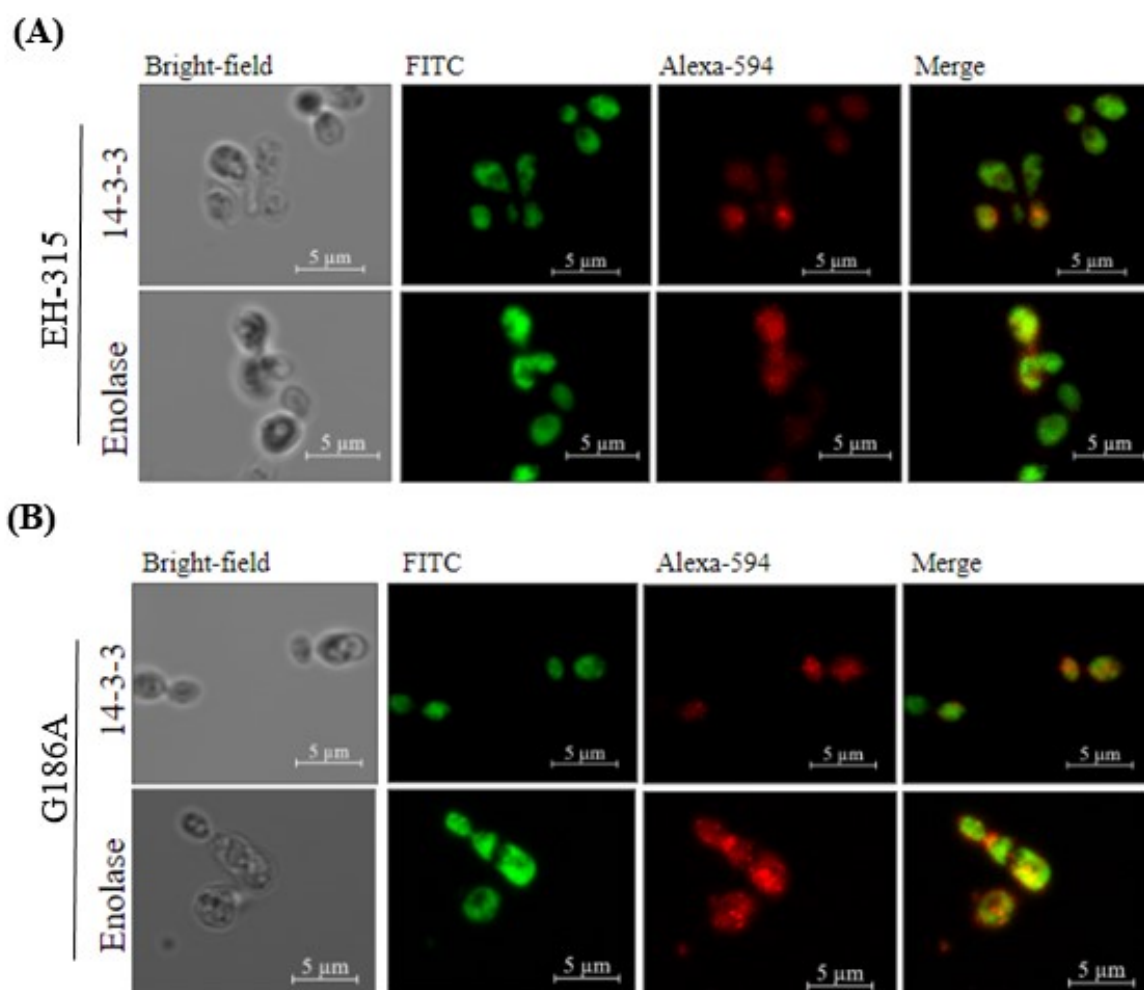
Figura 18 Alinhamento da sequência da proteína 14-3-3 da cepa Pb18 de *P. brasiliensis* (PADG_04440) com a proteína homóloga encontrada na cepa G186A de *H. capsulatum* (HCBG_00457). Análise do alinhamento das sequências homólogas utilizando *ClustalW* com a imagem de alinhamento gerada no *Jalview*.



Conservation: Índice numérico que reflete a conservação das propriedades físico-químicas para cada sequência (*: máximo de conservação entre as sequencias; Números (0-10): mutações entre as sequencias; -: gaps). *Quality*: medida *ad-hoc* do grau de parentesco das mutações observadas (quando houver) em uma determinada coluna do alinhamento. *Consensus*: reflete a porcentagem dos diferentes resíduos por coluna.

A análise da localização por microscopia confocal revelou que as proteínas Enolase e 14-3-3 nas cepas EH-315 (**Figura 19A**) e G186A (**Figura 19B**) aparecem em ampla distribuição, tanto no interior quanto na superfície celular. Esse resultado já era esperado, dado o caráter “*moonlight*” dessas proteínas.

Figura 19 Microscopia confocal das proteínas 14-3-3 e Enolase nas cepas EH-315 (A) e G186A (B) de *H. capsulatum*



Cepas EH-315 e G186A de *H. capsulatum* marcadas com FITC (verde) e proteínas 14-3-3 e Enolase marcadas com anticorpos específicos conjugados com Alexa 594 (vermelho). Aumento de 63x.

4.3. Influência na formação de biofilmes do fungo *H. capsulatum*

Em seguida, foi avaliada a influência das proteínas Hsp60, GAPDH, Enolase, 14-3-3 e PL02996 na formação dos biofilmes, de maneira a analisar a biomassa total (cristal

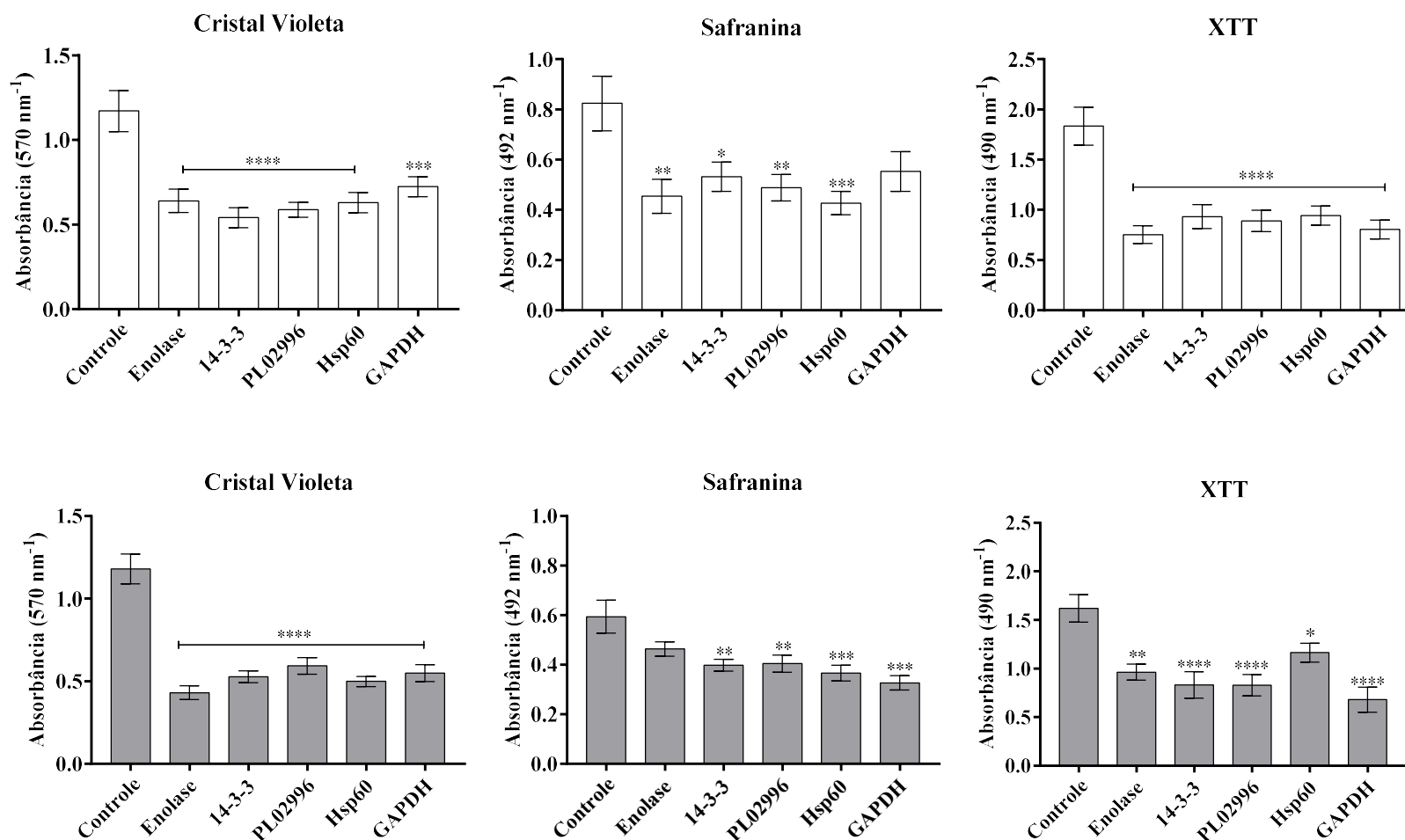
violeta), produção de matriz extracelular (safranina) e atividade metabólica (XTT). Os resultados estão apresentados na **figura 20**.

Para a cepa EH-315, houve redução significativa da biomassa total após o tratamento com todos os anticorpos (Enolase, 14-3-3, PL02996, Hsp60 [$p<0,0001$] e GAPDH [$p<0,001$]), assim como para a cepa G186A ($p<0,0001$). Com relação à Safranina, para a cepa EH-315, com exceção do tratamento com anti-GAPDH, todos os outros reduziram significativamente a produção de polissacarídeos (Hsp60 [$p<0,001$], Enolase, 14-3-3 [$p<0,01$], PL02996 [$p<0,05$]). Já para a cepa G186A houve redução significativa da quantidade de polissacarídeos nos biofilmes formados com o fungo tratado com anti-14-3-3, anti-PL02996 ($p<0,01$), anti-Hsp60 e anti-GAPDH ($p<0,001$).

A redução da atividade metabólica foi observada em todas as condições, tanto para a cepa EH-315 ($p<0,0001$) quanto para a cepa G186A (Enolase [$p<0,01$], 14-4-4, PL02996, GAPDH [$p<0,001$] e Hsp60 [$p<0,05$]).

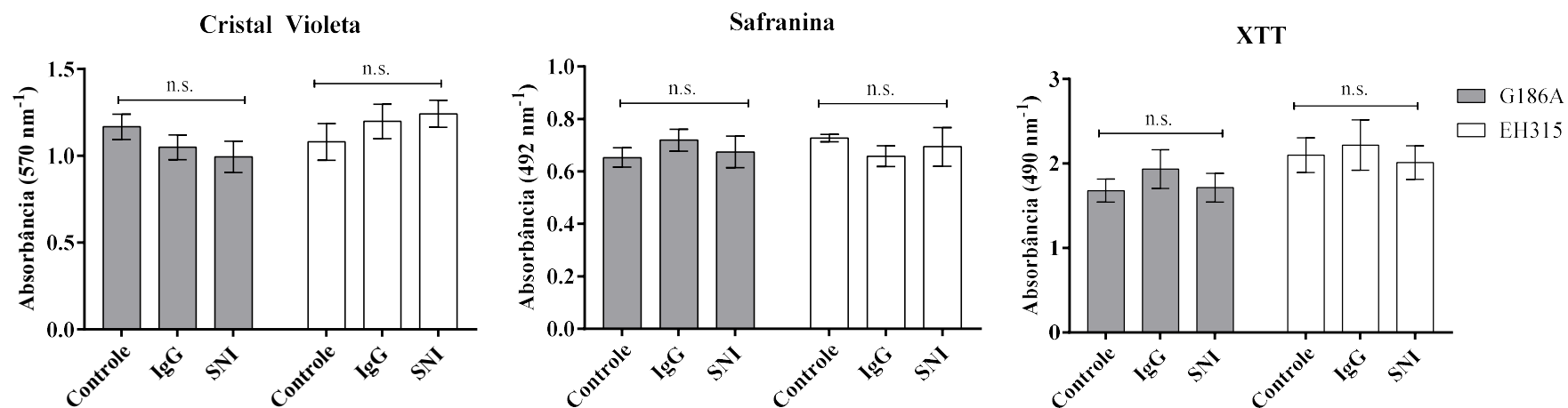
Não foi observada redução da biomassa total, conteúdo de polissacarídeo e atividade metabólica nos biofilmes formados após o tratamento das cepas EH-315 e G186A com anti-IgG controle e com soro de coelho não imune (SNI) (**Figura 21**).

Figura 20 Quantificação da biomassa total (cristal violeta), polissacarídeos (safranina) e atividade metabólica (XTT) dos biofilmes de 144h das cepas EH-315 (branco) e G186A (cinza) após tratamento com os anticorpos anti-Enolase, anti-14-3-3, anti-PL02996, anti-Hsp60 e anti-GAPDH.



Valores demonstrados referentes a pelo menos quatro experimentos independentes $\pm$ desvio médio. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$

Figura 21 Quantificação da biomassa total (cristal violeta), polissacarídeos (safranina) e atividade metabólica (XTT) dos biofilmes de 144h das cepas EH-315 (branco) e G186A (cinza) após tratamento com o anticorpo controle (IgG) e com soro de coelho não imune (SNI).



Valores demonstrados referentes a dois experimentos independentes $\pm$ SEM. n.s. não significante

Além dos parâmetros já descritos, os biofilmes também foram analisados através de microscopia confocal (**figuras 22 e 23**) e MEV (**figuras 24 e 25**).

Corroborando com os resultados de cristal violeta, que demonstra a quantificação da biomassa total dos biofilmes, a microscopia confocal indicou redução da espessura do biofilme em todos os tratamentos, indicando que as proteínas avaliadas possuem papel significativo na consolidação dos mesmos. Entretanto, mesmo menos espessos os biofilmes ainda apresentam alta viabilidade, evidenciada pela coloração em verde decorrente da predominância da marcação com Syto9 em relação à marcação em vermelho, com iodeto de propídio, que indica morte celular. As imagens de MEV indicaram maior espaçamento entre os aglomerados característicos do biofilme, bem como redução de matriz (setas amarelas), com relação ao grupo controle.

Figura 22 Microscopia Confocal dos biofilmes da cepa EH-315 de *H. capsulatum*. Controle (A); tratados com anticorpos: anti-enolase (B), anti-14-3-3 (C), anti-PL02996 (D), anti-Hsp60 (E) e anti-GAPDH (F).

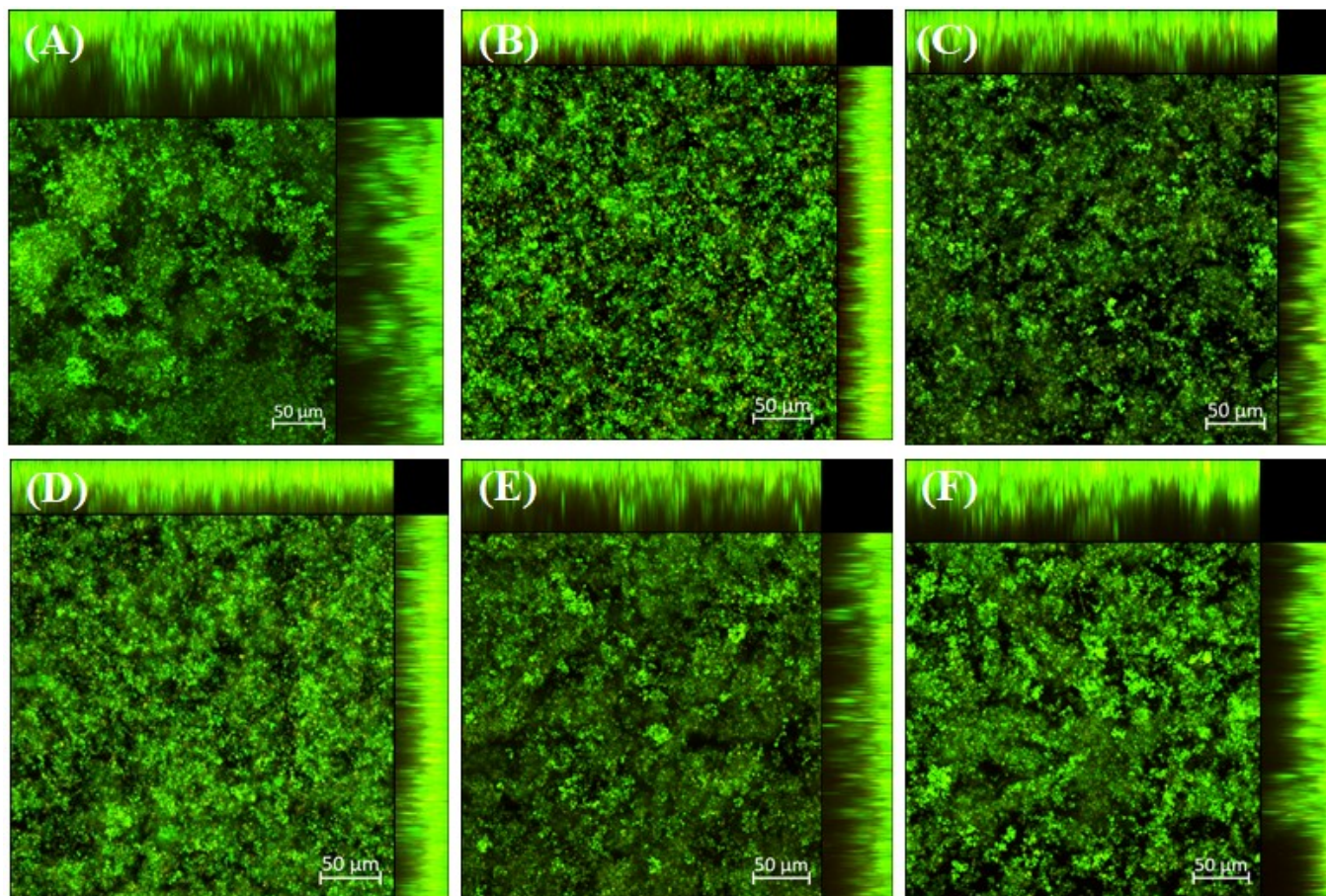


Figura 23 Microscopia Confocal dos biofilmes da cepa G186A de *H. capsulatum*. Controle (A); tratados com anticorpos: anti-enolase (B), anti-14-3-3 (C), anti-PL02996 (D), anti-Hsp60 (E) e anti-GAPDH (F).

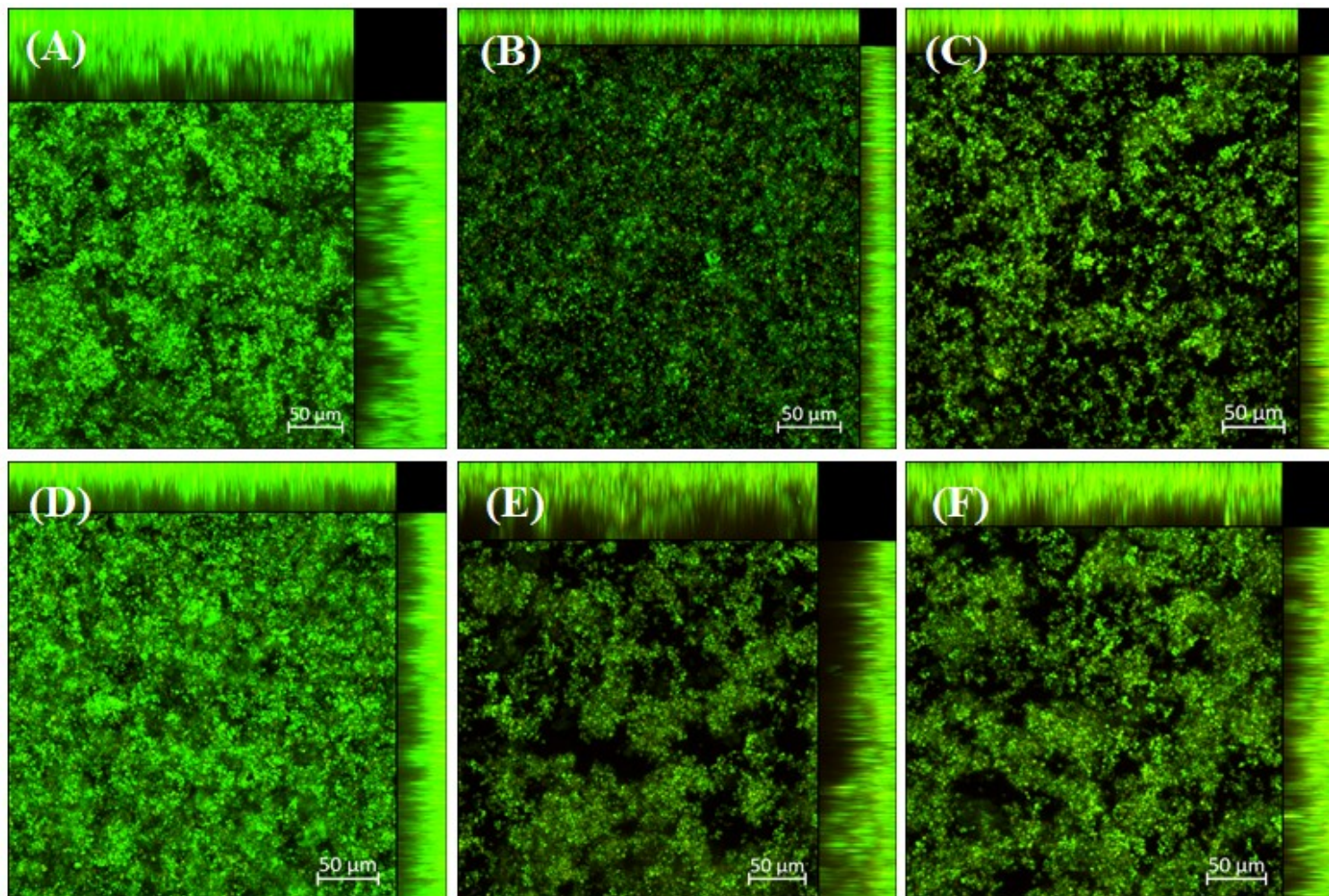


Figura 24 Microscopia Eletrônica de Varredura dos biofilmes da cepa EH-315 de *H. capsulatum*. Controle (A); tratados com anticorpos: anti-Enolase (B), anti-14-3-3 (C), anti-PL02996 (D), anti-Hsp60 (E) e anti-GAPDH (F). Setas amarelas indicam a presença de matriz.

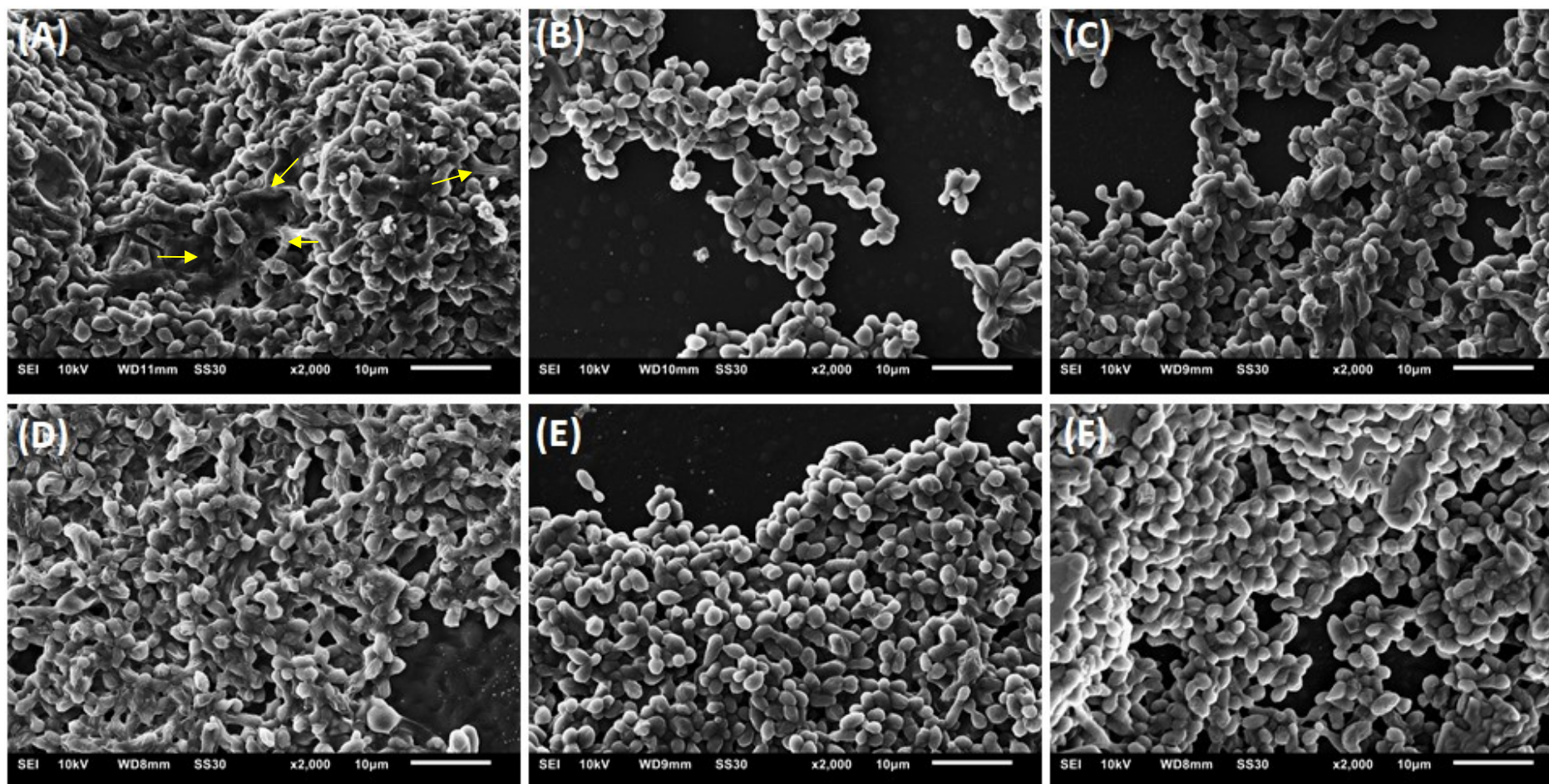
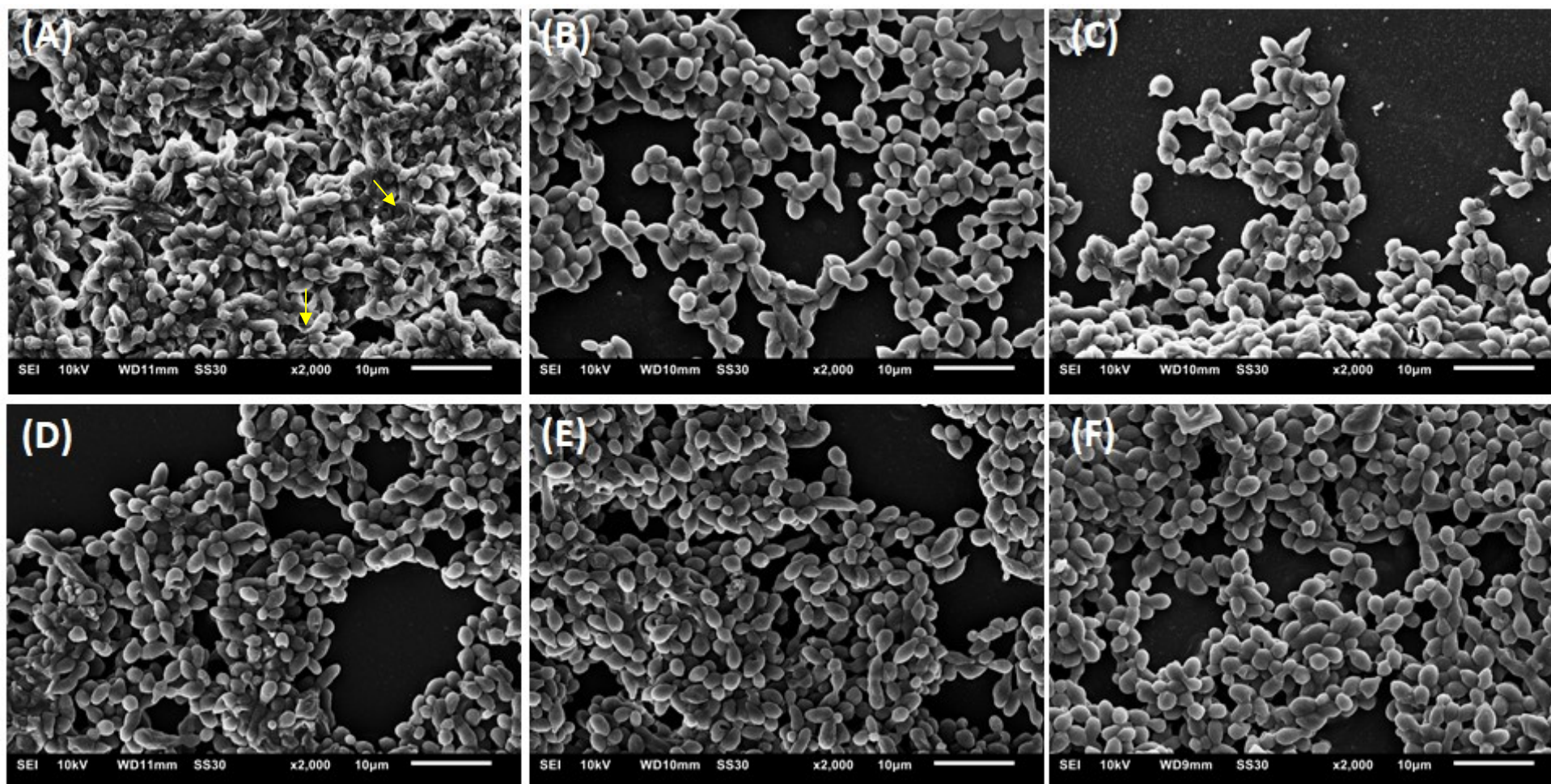


Figura 25 Microscopia Eletrônica de Varredura dos biofilmes da cepa G186A de *H. capsulatum*. Controle (A); tratados com anticorpos: anti-Enolase (B), anti-14-3-3 (C), anti-PL02996 (D), anti-Hsp60 (E) e anti-GAPDH (F). Setas amarelas indicam a presença de matriz.



A alta porcentagem de homologia encontrada entre as proteínas Enolase, 14-3-3 e PL02996 de *Paracoccidioides* spp. com *H. capsulatum*, aliada ao fato da reatividade das mesmas nos extratos proteicos desse fungo utilizando anticorpos produzidos contra *Paracoccidioides* spp., e a localização dessas proteínas na superfície celular, levantam a hipótese da atuação como adesinas também em *H. capsulatum*. Dessa maneira, o estudo do impacto das mesmas para a formação de biofilmes ajuda a entender esse papel, tendo em vista que a adesão ao substrato é o passo inicial para formação dessas estruturas.

As proteínas GAPDH e Hsp60 também foram analisadas quanto à influência na formação dos biofilmes, pois a análise do transcriptoma dos biofilmes entre a cepa ambiental e maior produtora de biofilmes, EH-315 e o isolado clínico 60I pelo nosso grupo evidenciou que o gene codificador da GAPDH teve um aumento na expressão diferencial (Fold Change 482,3) no biofilme da cepa EH-315 em comparação com o biofilme da cepa 60I (PITANGUI, 2017), sugerindo o envolvimento dessa proteína com os biofilmes da EH-315; e a proteína Hsp60 é amplamente descrita na patogênese do fungo *H. capsulatum*, e está intimamente relacionada com a interação e adesão do fungo às células do hospedeiro através do receptor CR3 de macrófagos (GUIMARAES *et al.*, 2009; GUIMARAES *et al.*, 2011; LONG *et al.*, 2003).

Apesar do papel crítico que os biofilmes desempenham no desenvolvimento das doenças e colonização de tecidos do hospedeiro, muitos aspectos básicos do desenvolvimento e organização, tal como os passos iniciais da adesão ao substrato, ainda permanecem inconclusivos. Algumas famílias de genes já foram descritas como importantes para esse processo de adesão, como por exemplo, as famílias ALS, HWP, e IFF/HYR descritas para *C. albicans*, que codificam diversas proteínas que interagem entre si para facilitar a adesão célula-célula e adesão do fungo em substratos (CHANDRA *et al.*, 2001; ENE; BENNETT, 2009; HOYER *et al.*, 2008; KEMPF *et al.*, 2009). A redução da biomassa total dos biofilmes foi demonstrada em cepas mutantes de *C. albicans* para diferentes adesinas, tais como $\Delta hwp2$, $\Delta hyr1$, e $\Delta als1/\Delta als3$ (MCCALL *et al.*, 2019), demonstrando mais uma vez a importância da adesão inicial para o desenvolvimento dos biofilmes.

Embora importantes para os biofilmes de *C. albicans*, como o caso da família de genes ALS (O'CONNOR *et al.*, 2005), há poucos estudos que demonstram a presença ou o impacto das adesinas nos biofilmes de fungos dimórficos. Sardi *et al.* (2015) demonstraram o aumento na expressão de GP43 e GAPDH nos biofilmes de *P. brasiliensis*. Assim como a GAPDH, GP43 é uma importante adesina do gênero *Paracoccidioides* spp., envolvida com a adesão do fungo aos componentes da MEC (VICENTINI *et al.*, 1994).

Genes e proteínas relacionadas com a adesão e subsequente formação de biofilmes nunca foram descritos para o fungo *H. capsulatum*. Dessa maneira, a técnica de bloqueio utilizando anticorpos permite determinar possíveis adesinas, que são importantes para o estabelecimento dos biofilmes e futuramente desenvolver mutantes para validar os resultados encontrados. Entender o processo de adesão e liberação dos biofilmes pode ajudar a identificar proteínas específicas que são cruciais para a manutenção de adesão, de maneira a reduzir a formação de biofilmes durante os processos infecciosos (MCCALL *et al.*, 2019).

Corroborando com o presente trabalho, a proteína Enolase, apesar de ser conhecida como uma enzima presente no citoplasma, participando da via glicolítica, já foi identificada no proteoma de biofilmes de *Candida* spp. (THOMAS *et al.*, 2006), sendo comprovado que sua presença no biofilme não se dá apenas a partir de células que se rompem, mas também pela secreção da proteína tanto por leveduras quanto hifas de *C. albicans* (SILVA *et al.*, 2014).

Além disso, a função da enolase como adesina já foi amplamente caracterizada no gênero *Paracoccidioides*. Donofrio *et al.* (2009) demonstraram sua capacidade em se ligar a fibronectina. Mais tarde, foi evidenciada sua alta expressão na parede celular, contribuindo para adesão do patógeno ao hospedeiro (MARCOS *et al.*, 2012). Além disso, o tratamento de *P. brasiliensis* (Pb18) com anticorpos anti-Enolase reduziu 82% da adesão do fungo em célula epitelial pulmonar humana (A549) (DONOFRIO *et al.*, 2009). A proteína Enolase também demonstrou capacidade de ligação ao plasminogênio, importante componente do sistema proteolítico, que possui papel na degradação de colágeno, fibrina e outros componentes teciduais. O sistema plasminogênio do hospedeiro é amplamente manipulado por vários patógenos a fim de facilitar a invasão tecidual durante a infecção, modificando a ativação do processo através da ligação do plasminogênio na superfície do patógeno (BUSCETTA *et al.*, 2016; CROWE *et al.*, 2003; LAHTENMAKI *et al.*, 2005; LENTINI *et al.*, 2018; STIE *et al.*, 2009). Dessa maneira, a manipulação dessa via pode ser considerada um mecanismo de patogênese.

Com relação à GAPDH, como mencionado anteriormente, a cepa EH-315 de *H. capsulatum* teve o transcriptoma do biofilme analisado pelo grupo, e demonstrou aumento da expressão do gene *GAPDH* em quase 500 vezes em relação ao biofilme do isolado clínico brasileiro 60I (PITANGUI, 2017). A cepa EH-315 é considerada um isolado de alta virulência, além de produzir biofilmes mais robustos do que outras cepas de *H. capsulatum* (GONÇALVES *et al.*, 2020). Dessa forma, o aumento da expressão poderia estar relacionado tanto com fatores metabólicos, tendo em vista as condições de anaerobiose no interior dos biofilmes e da participação ativa da GAPDH nos processos de glicólise anaeróbica

(NICHOLLS *et al.*, 2012), ou ainda poderia estar relacionado ao caráter de adesina que já foi demonstrado em outros patógenos (BARBOSA *et al.*, 2006; GOZALBO *et al.*, 1998). Em *P. brasiliensis*, Barbosa *et al.* (2006) fizeram o tratamento de leveduras com anticorpo policlonal anti-GAPDH e incubaram com pneumócitos, o que promoveu a inibição da adesão e internalização, sugerindo que essa proteína desempenha um papel na adesão, colonização do tecido e estabelecimento da doença. No caso de *C. albicans*, a GAPDH existe em uma forma imunogênica associada à parede celular, que também aparece nos tecidos infectados (GIL-NAVARRO *et al.*, 1997) e, quando associada à parede celular, é capaz de se ligar à fibronectina e laminina (GOZALBO *et al.*, 1998). A adesão aos componentes da MEC da célula hospedeira, bem como a localização da GAPDH na parede celular também foi demonstrada no fungo *P. brasiliensis* (VALLEJO *et al.*, 2012). Além disso, ambas Enolase e GAPDH foram encontradas superexpressas durante a formação de biofilmes do fungo *P. brasiliensis* (SARDI *et al.*, 2015). Considerando esse caráter de adesina, de acordo com os resultados demonstrados no presente trabalho, há a hipótese de que a função de adesina também esteja presente no fungo *H. capsulatum*, uma vez que o bloqueio da GAPDH resultou em um biofilme menos robusto.

A proteína 14-3-3 também é encontrada na parede celular de *Paracoccidioides* spp. (DA SILVA *et al.*, 2013) e está envolvida com a manutenção da morfologia de *P. brasiliensis*, uma vez que a cepa silenciada tem como característica a produção de células menores e mais alongadas em comparação com a cepa selvagem (MARCOS *et al.*, 2016), e na virulência desse fungo em modelo murino (MARCOS *et al.*, 2019). Essa proteína é também uma adesina ligante de laminina, expressa em maior quantidade em isolados com maior capacidade de adesão (ANDREOTTI *et al.*, 2005). Entretanto, não há relatos dessa proteína para o processo de formação e manutenção de biofilmes.

Como mencionado anteriormente, a proteína Hsp60, já foi amplamente descrita no processo de interação do fungo *H. capsulatum* com células do hospedeiro (GUIMARAES *et al.*, 2009; LONG *et al.*, 2003), mas nenhuma correlação foi feita sobre seu papel na formação de biofilmes fúngicos. Porém, já foi demonstrado que ela é um importante constituinte dos biofilmes da bactéria *Histophilus somni*, e a sua inibição utilizando anticorpos anti-Hsp60 reduziu a formação de biofilmes *in vitro* (ZARANKIEWICZ *et al.*, 2012), assim como encontrado no presente trabalho. Assim como em *H. capsulatum*, em *P. brasiliensis* a Hsp60 também está presente na superfície celular, e possui expressão prevalente da fase leveduriforme (FERNANDES *et al.*, 2020) e a utilização prévia de anticorpos anti-Hsp60 de *H. capsulatum* foi protetiva contra infecção por *P. brasiliensis* (THOMAZ *et al.*, 2014), reforçando mais uma vez a correlação entre os fatores de virulência desses gêneros.

Nesse sentido, os resultados encontrados demonstram que o bloqueio das proteínas presentes na superfície celular de *H. capsulatum* impacta diretamente na adesão ao substrato e formação dos biofilmes, e, portanto, todas as proteínas avaliadas são importantes candidatas ao estudo mais aprofundado envolvendo vias metabólicas relacionadas, e papel como alvo terapêutico com o intuito de reduzir a formação tanto dos biofilmes quanto das estruturas aglomeradas intracelulares *like*-biofilme, que já foram descritas para o fungo *H. capsulatum* (PITANGUI *et al.*, 2012; PITANGUI *et al.*, 2015).

4.4. Influência na interação patógeno-hospedeiro utilizando o modelo alternativo *G. mellonella*

Devido aos resultados encontrados que demonstram o papel direto dessas proteínas na formação de biofilmes de *H. capsulatum*, também foi avaliado o impacto do bloqueio das proteínas Enolase, 14-3-3, PL02996 e Hsp60 para a interação do fungo com as larvas de *G. mellonella*.

A inoculação das larvas com as cepas G186A e EH-315 levou a redução significativa da sobrevivência em comparação com o controle ($p < 0,05$; **figura 26**), com porcentagem de sobrevivência de 17,24 e 25% no décimo dia de experimento, respectivamente.

Os tratamentos com anti-Enolase, anti-14-3-3, anti-Hsp60 e anti-PL02996 resultaram em taxas de sobrevivência de 53, 47, 60 e 61%, respectivamente para a cepa EH-315 (**figura 26A**). Com exceção da proteína 14-3-3, o bloqueio das proteínas antes da infecção resultou em aumento significativo ($p < 0,05$; **Figura 26A**) da sobrevivência das larvas para essa cepa.

Já para a cepa G186A as taxas de sobrevivência após 10 dias de experimento para os tratamentos com anti-Enolase, anti-14-3-3, anti-Hsp60 e anti-PL02996 foram 74, 52, 60 e 66%, respectivamente ($p < 0,05$; **Figura 26B**).

O tratamento de ambas as cepas com os controles IgG e SNI não alterou a curva de sobrevivência em comparação com o fungo não tratado (**Figura 27**).

Figura 26 Curva de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* após infecção com as cepas EH-315 (A) e G186A (B) de *H. capsulatum*, previamente tratadas com os anticorpos anti-Enolase, anti-14-3-3, anti-PL02996, anti-Hsp60.

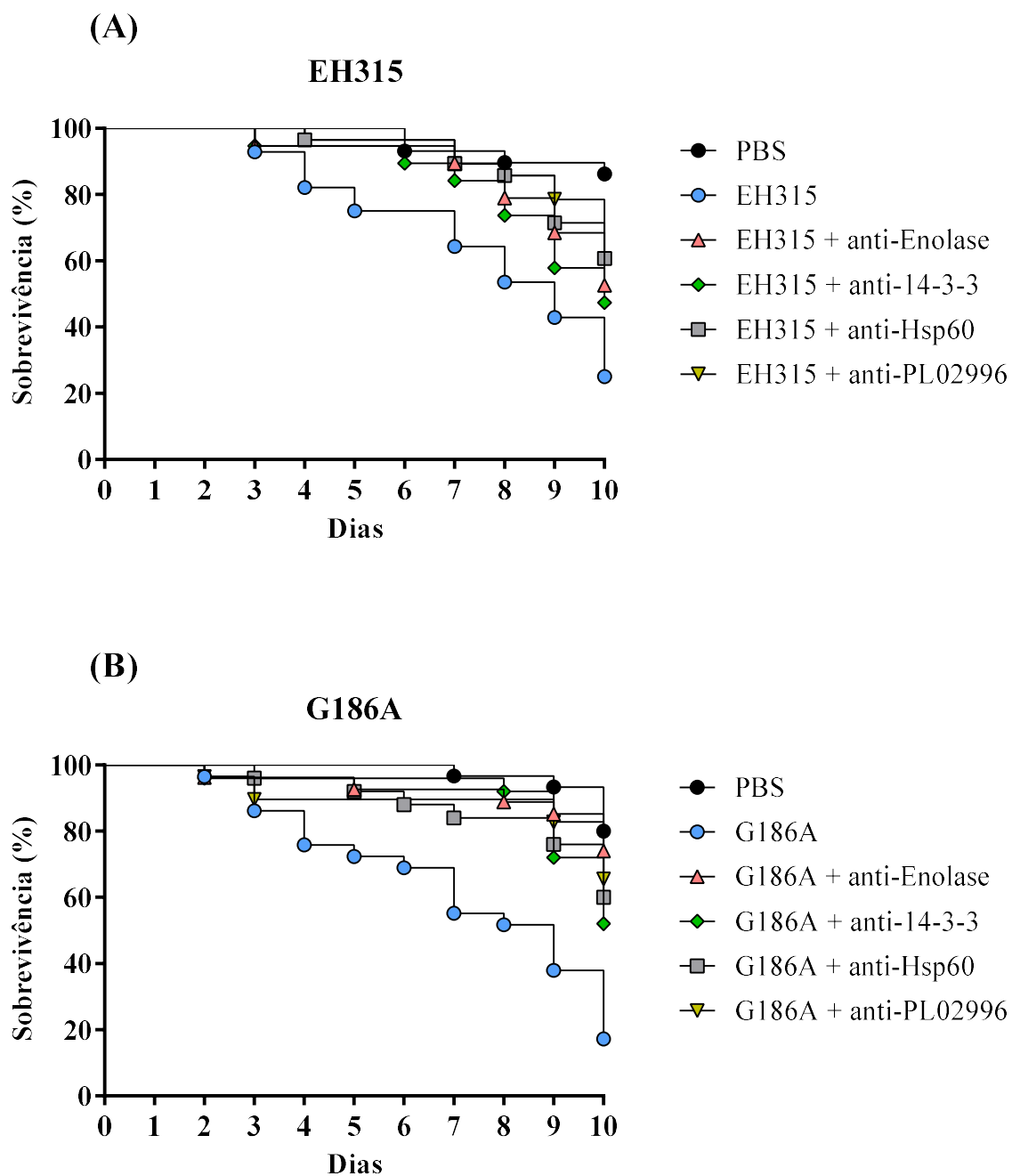
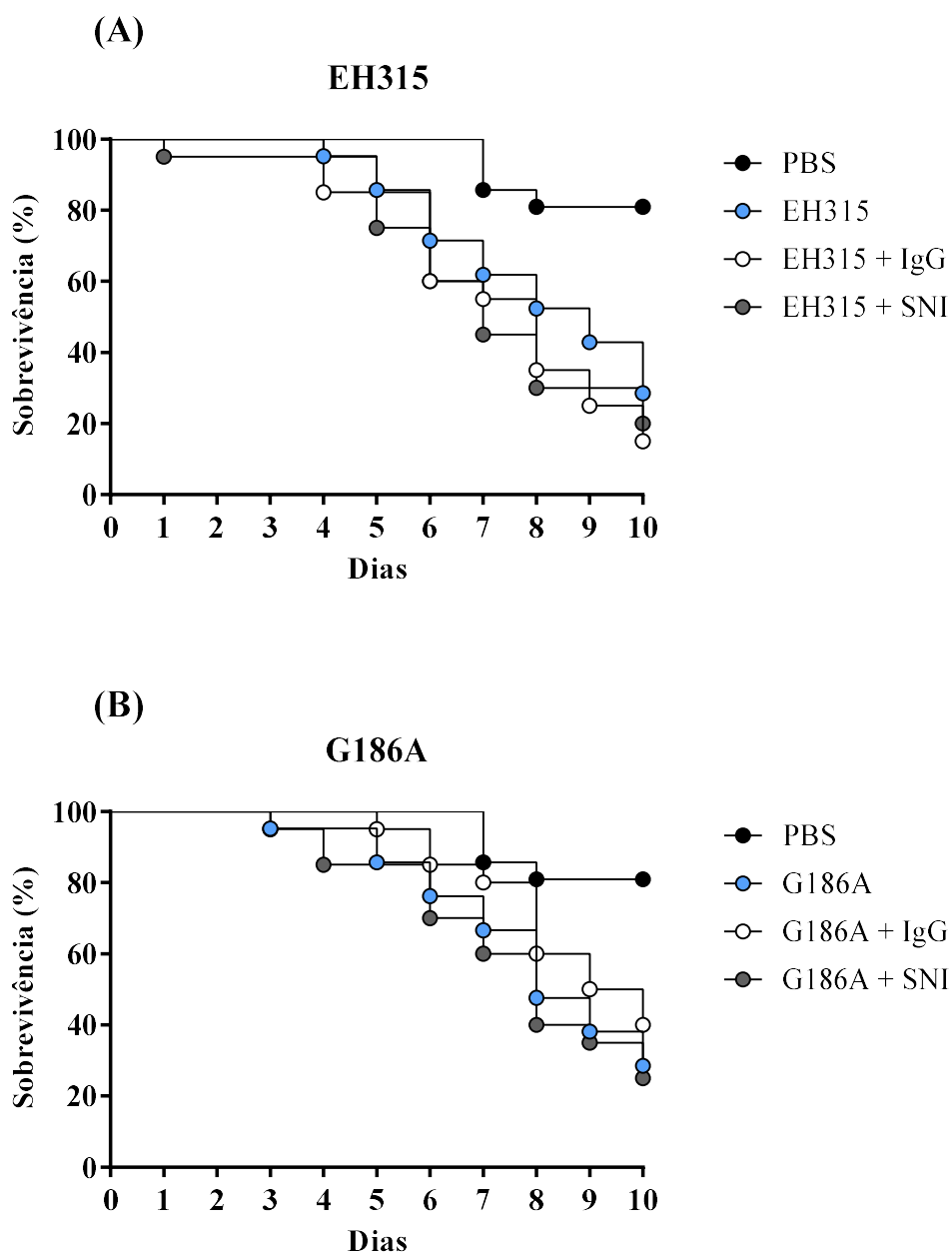


Figura 27 Curva de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* após infecção com as cepas EH-315 (A) e G186A (B) de *H. capsulatum*, previamente tratadas com o IgG controle e soro de coelho não imune (SNI).



A infecção das larvas de *G. mellonella* com *H. capsulatum* foi primeiramente descrita por Thomaz *et al.* (2013), que utilizaram as cepas G184ARAR (ATCC 26027) e G217B (ATCC 26032), comparando a virulência das mesmas utilizando diferentes inóculos e temperaturas de incubação das larvas (25 e 37 °C). Apesar da utilização de cepas diferentes no presente estudo

(G186A e EH-315), o perfil da curva de sobrevivência utilizando 1×10^6 leveduras/larva foi similar ao encontrado, resultando em taxas de sobrevivência em torno de 20 % ao final do décimo dia a 37 °C.

De maneira interessante, quando as proteínas Enolase, 14-3-3, Hsp60 e PL02996 para G186A e Enolase, Hsp60 e PL02996 para EH-315 foram bloqueadas utilizando anticorpos, foi observado um aumento significativo na sobrevivência das larvas.

Os hemócitos de *G. mellonella* não possuem receptor para porção Fc descrito (BROWNE *et al.*, 2013). Dessa maneira, os resultados encontrados refletem apenas o bloqueio da proteína e não a opsonização, reforçando mais uma vez que essas proteínas podem atuar como importantes fatores de virulência para o fungo *H. capsulatum*.

Como já descrito anteriormente, as proteínas Enolase, 14-3-3 e PL02996 participam da interação aos componentes da MEC e estão envolvidas com a virulência de *Paracoccidioides* spp. Além disso, corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho, o bloqueio das proteínas Enolase, 14-3-3 (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015) e PL02996 (DE OLIVEIRA, submetido) utilizando anticorpos também resultou em aumento da sobrevivência das larvas de *G. mellonella*.

Com relação ao anticorpo anti-Hsp60 (7B6), Guimaraes *et al.* (2009) demonstraram que o tratamento de camundongos com diferentes anticorpos anti-Hsp60 seguido de infecção com *H. capsulatum* resultaram em diferentes perfis de resposta. Por exemplo, os anticorpos monoclonais IgG1 (11D1) e IgG2a (12D3) prolongaram significativamente a sobrevivência e reduziram a carga fúngica, apresentando caráter protetivo. Enquanto que o anticorpo 7B6, não demonstrou proteção. Em contrapartida, a utilização desse anticorpo foi protetiva na infecção com *P. brasiliensis* (THOMAZ *et al.*, 2014). O tratamento prévio das leveduras com anticorpos anti-Hsp60, com diferentes regiões de epítipo, promoveram aumento da fagocitose *in vitro*. Entretanto, os anticorpos 7B6 e 6B7 (que compreendem a mesma região de epítipo) não alteraram a fagocitose. O anticorpo 7B6, usado no presente trabalho, possui sua região de interação com o receptor CR3 dos macrófagos entre os aminoácidos 353 e 413. Essa região representa a fenda estrutural da Hsp60 (GUIMARAES *et al.*, 2009; HABICH *et al.*, 2006). A presença da porção Fc nos anticorpos promove opsonização, promovendo a fagocitose. Porém, considerando que o aumento da fagocitose não foi observado para os anticorpos 7B6 e 6B7, além da presença da porção Fc, talvez seja necessário no modelo murino que a região de fenda estrutural da Hsp60 esteja livre para obter os resultados de aumento da fagocitose. Baseado nisso, surgiu a hipótese de que essa região de fenda possa não ser importante para a interação com hemócitos, células de defesa da *G. mellonella*, uma vez que não há receptor Fc descrito

para esse modelo (BROWNE *et al.*, 2013). Assim, a soma dessas características pode promover uma interação diferente entre *Histoplasma*-hemócito e a fagocitose pode ocorrer normalmente e, conseqüentemente, levar à morte do fungo e aumentar a sobrevivência das larvas. No entanto, mais estudos são necessários para apoiar esta hipótese.

5. CONCLUSÕES

- A cepa EH-315 possui maior capacidade de interação com as células epiteliais pulmonares (A549) *in vitro*, do que a cepa G186A, tanto na forma planctônica quanto no ensaio realizado após a passagem por biofilme;
- A passagem por biofilmes aumenta de maneira significativa a capacidade de interação com células epiteliais pulmonares e com macrófagos murinos (RAW 264.7) para as cepas EH-315 e G186A;
- A passagem por biofilmes induz aumento na multiplicação intracelular da cepa EH-315 em macrófagos murinos (J774);
- A infecção com as cepas G186A e EH-315, tanto na forma planctônica quanto biofilme, induz redução da sobrevivência das larvas de *G. mellonella*. Entretanto, não houve diferença no perfil de sobrevivência comparando os grupos planctônico e recuperadas do biofilme;
- A infecção com as cepas G186A e EH-315 induz redução na densidade de hemócitos das larvas de *G. mellonella* após 3 horas de infecção, que, para a cepa EH-315, se tornou ainda mais evidente com a infecção após passagem por biofilme;
- A análise *in silico* revelou alta homologia entre as sequências das proteínas Enolase, 14-3-3 de *P. brasiliensis* e PL02996 de *P. lutzii* com as sequências encontradas na cepa G186A de *H. capsulatum*;
- A utilização dos anticorpos anti-Enolase, anti-14-3-3 produzidos em resposta as proteínas de *P. brasiliensis* e anti-PL02996 produzido em resposta a proteína de *P. lutzii*, permitiu detectá-las em extratos proteicos de *H. capsulatum*;
- A sequência homóloga da proteína PL02996 encontrada em *H. capsulatum* possui característica que permitem sua classificação como adesina;
- As proteínas Enolase e 14-3-3 estão amplamente distribuídas pelas leveduras de *H. capsulatum* enquanto que a proteína PL02996 parece estar mais associada à superfície celular;
- O bloqueio das proteínas Enolase, 14-3-3, PL02996, GAPDH e Hsp60 reduziu a formação dos biofilmes das cepas EH-315 e G186A de *H. capsulatum*;
- Com exceção da proteína 14-3-3 para a cepa EH-315, o bloqueio das proteínas Enolase, PL02996 e Hsp60 aumentou a sobrevivência das lavas de *G. mellonella*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDE, M. A. Chapter 4--histoplasmosis. **J Bras Pneumol**, v. 35, n. 11, p. 1145-1151, Nov 2009.

ALEXANDER, W. J.; MOWRY, R. W.; COBBS, C. G.; DISMUKES, W. E. Prosthetic valve endocarditis caused by *Histoplasma capsulatum*. **JAMA**, v. 242, n. 13, p. 1399-1400, Sep 28 1979.

ALMEIDA, M. A.; ALMEIDA-SILVA, F.; GUIMARAES, A. J.; ALMEIDA-PAES, R.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. The occurrence of histoplasmosis in Brazil: A systematic review. **Int J Infect Dis**, v. 86, p. 147-156, Sep 2019.

ALONSO, M. F.; GOW, N. A. R.; ERWIG, L. P.; BAIN, J. M. Macrophage Migration Is Impaired within *Candida albicans* Biofilms. **J Fungi (Basel)**, v. 3, n. 3, Jun 22 2017.

ANDERSON, H.; HONISH, L.; TAYLOR, G.; JOHNSON, M.; TOVSTIUK, C. *et al.* Histoplasmosis cluster, golf course, Canada. **Emerg Infect Dis**, v. 12, n. 1, p. 163-165, Jan 2006.

ANDREOTTI, P. F.; MONTEIRO DA SILVA, J. L.; BAILÃO, A. M.; SOARES, C. M.; BENARD, G. *et al.* Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect**, v. 7, n. 5-6, p. 875-881, May 2005.

ANTINORI, S. *Histoplasma capsulatum*: more widespread than previously thought. **Am J Trop Med Hyg**, v. 90, n. 6, p. 982-983, Jun 2014.

ARCE MIRANDA, J. E.; BARONETTI, J. L.; SOTOMAYOR, C. E.; PARAJE, M. G. Oxidative and nitrosative stress responses during macrophage-*Candida albicans* biofilm interaction. **Med Mycol**, v. 57, n. 1, p. 101-113, Jan 1 2019.

ARMSTRONG, P. A.; JACKSON, B. R.; HASELOW, D.; FIELDS, V.; IRELAND, M. *et al.* Multistate Epidemiology of Histoplasmosis, United States, 2011-2014. **Emerg Infect Dis**, v. 24, n. 3, p. 425-431, Mar 2018.

ARTEAGA BLANCO, L. A.; CRISPIM, J. S.; FERNANDES, K. M.; DE OLIVEIRA, L. L.; PEREIRA, M. F. *et al.* Differential cellular immune response of *Galleria mellonella* to *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Cell Tissue Res**, v. 370, n. 1, p. 153-168, Oct 2017.

BADDLEY, J. W.; SANKARA, I. R.; RODRIQUEZ, J. M.; PAPPAS, P. G.; MANY, W. J., Jr. Histoplasmosis in HIV-infected patients in a southern regional medical center: poor prognosis in the era of highly active antiretroviral therapy. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 62, n. 2, p. 151-156, Oct 2008.

BAKER, J.; KOSMIDIS, C.; ROZALIYANI, A.; WAHYUNINGSIH, R.; DENNING, D. W. Chronic Pulmonary Histoplasmosis-A Scoping Literature Review. **Open Forum Infect Dis**, v. 7, n. 5, p. ofaa119, May 2020.

BARBIER, J.; CINTRAT, J. C.; GILLET, D. Intracellular pathogens convert macrophages from death traps into hospitable homes. **FEBS J**, v. 283, n. 4, p. 595-597, Feb 2016.

BARBOSA, M. S.; BÁO, S. N.; ANDREOTTI, P. F.; DE FARIA, F. P.; FELIPE, M. S. *et al.* Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. **Infect Immun**, v. 74, n. 1, p. 382-389, Jan 2006.

BASENKO, E. Y.; PULMAN, J. A.; SHANMUGASUNDRAM, A.; HARB, O. S.; CROUCH, K. *et al.* FungiDB: An Integrated Bioinformatic Resource for Fungi and Oomycetes. **J Fungi (Basel)**, v. 4, n. 1, Mar 20 2018.

BENADUCCI, T.; SARDI JDE, C.; LOURENCETTI, N. M.; SCORZONI, L.; GULLO, F. P. *et al.* Virulence of *Cryptococcus* sp. Biofilms In Vitro and In Vivo using *Galleria mellonella* as an Alternative Model. **Front Microbiol**, v. 7, p. 290, 2016.

BERLINER, M. D. Primary subcultures of *Histoplasma capsulatum*. I. Macro and micro-morphology of the mycelial phase. **Sabouraudia**, v. 6, n. 2, p. 111-118, Feb 1968.

BOHSE, M. L.; WOODS, J. P. Surface localization of the Yps3p protein of *Histoplasma capsulatum*. **Eukaryot Cell**, v. 4, n. 4, p. 685-693, Apr 2005.

BOHSE, M. L.; WOODS, J. P. RNA interference-mediated silencing of the YPS3 gene of *Histoplasma capsulatum* reveals virulence defects. **Infect Immun**, v. 75, n. 6, p. 2811-2817, Jun 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, May 7 1976.

BRANDAO, J.; WOODS, S.; FOWLKES, N.; LEISSINGER, M.; BLAIR, R. *et al.* Disseminated histoplasmosis (*Histoplasma capsulatum*) in a pet rabbit: case report and review of the literature. **J Vet Diagn Invest**, v. 26, n. 1, p. 158-162, Jan 2014.

BRECHTING, P. J.; RAPPLEYE, C. A. *Histoplasma* Responses to Nutritional Immunity Imposed by Macrophage Activation. **J Fungi (Basel)**, v. 5, n. 2, Jun 5 2019.

BRILHANTE, R. S. N.; DE AGUIAR, F. R. M.; DA SILVA, M. L. Q.; DE OLIVEIRA, J. S.; DE CAMARGO, Z. P. *et al.* Antifungal susceptibility of *Sporothrix schenckii* complex biofilms. **Med Mycol**, v. 56, n. 3, p. 297-306, Apr 1 2018.

BRILHANTE, R. S. N.; DE LIMA, R. A. C.; MARQUES, F. J. F.; SILVA, N. F.; CAETANO, E. P. *et al.* *Histoplasma capsulatum* in planktonic and biofilm forms: in vitro susceptibility to amphotericin B, itraconazole and farnesol. **J Med Microbiol**, v. 64, n. Pt 4, p. 394-399, Apr 2015.

BROWN, T. S.; PETIS, S. M.; OSMON, D. R.; MABRY, T. M.; BERRY, D. J. *et al.* Periprosthetic Joint Infection With Fungal Pathogens. **J Arthroplasty**, v. 33, n. 8, p. 2605-2612, Aug 2018.

BROWNE, N.; HEELAN, M.; KAVANAGH, K. An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. **Virulence**, v. 4, n. 7, p. 597-603, Oct 1 2013.

BRUMMER, E.; KURITA, N.; YOSIHIDA, S.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. Fungistatic activity of human neutrophils against *Histoplasma capsulatum*: correlation with phagocytosis. **J Infect Dis**, v. 164, n. 1, p. 158-162, Jul 1991.

BULLOCK, W. E.; WRIGHT, S. D. Role of the adherence-promoting receptors, CR3, LFA-1, and p150,95, in binding of *Histoplasma capsulatum* by human macrophages. **J Exp Med**, v. 165, n. 1, p. 195-210, Jan 1 1987.

BUSCETTA, M.; FIRON, A.; PIETROCOLA, G.; BIONDO, C.; MANCUSO, G. *et al.* PbsP, a cell wall-anchored protein that binds plasminogen to promote hematogenous dissemination of group B *Streptococcus*. **Mol Microbiol**, v. 101, n. 1, p. 27-41, Jul 2016.

CAIN, J. A.; DEEPE, G. S., Jr. Evolution of the primary immune response to *Histoplasma capsulatum* in murine lung. **Infect Immun**, v. 66, n. 4, p. 1473-1481, Apr 1998.

CALANNI, L. M.; PEREZ, R. A.; BRASILI, S.; SCHMIDT, N. G.; IOVANNITTI, C. A. *et al.* [Outbreak of histoplasmosis in province of Neuquen, Patagonia Argentina]. **Rev Iberoam Micol**, v. 30, n. 3, p. 193-199, Jul-Sep 2013.

CATTANA, M. E.; TRACOGNA, M. F.; MARQUES, I.; ROJAS, F.; FERNANDEZ, M. *et al.* In Vivo *Paracoccidioides* sp. Biofilm on Vascular Prosthesis. **Mycopathologia**, v. 182, n. 7-8, p. 747-749, Aug 2017.

CHANDRA, J.; KUHN, D. M.; MUKHERJEE, P. K.; HOYER, L. L.; MCCORMICK, T. *et al.* Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **J Bacteriol**, v. 183, n. 18, p. 5385-5394, Sep 2001.

CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K. Candida Biofilms: Development, Architecture, and Resistance. **Microbiol Spectr**, v. 3, n. 4, Aug 2015.

CIRASOLA, D.; SCIOTA, R.; VIZZINI, L.; RICUCCI, V.; MORACE, G. *et al.* Experimental biofilm-related Candida infections. **Future Microbiol**, v. 8, n. 6, p. 799-805, Jun 2013.

CLEARE, L. G.; ZAMITH-MIRANDA, D.; NOSANCHUK, J. D. Heat Shock Proteins in Histoplasma and Paracoccidioides. **Clin Vaccine Immunol**, v. 24, n. 11, Nov 2017.

COSTA-ORLANDI, C. B.; SARDI, J. C.; SANTOS, C. T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. In vitro characterization of Trichophyton rubrum and T. mentagrophytes biofilms. **Biofouling**, v. 30, n. 6, p. 719-727, 2014.

COSTA, E. O.; DINIZ, L. S.; NETTO, C. F.; ARRUDA, C.; DAGLI, M. L. Epidemiological study of sporotrichosis and histoplasmosis in captive Latin American wild mammals, Sao Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, v. 125, n. 1, p. 19-22, Jan 1994.

CROWE, J. D.; SIEVWRIGHT, I. K.; AULD, G. C.; MOORE, N. R.; GOW, N. A. *et al.* Candida albicans binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins. **Mol Microbiol**, v. 47, n. 6, p. 1637-1651, Mar 2003.

DA SILVA, B. R.; DE FÁTIMA DA SILVA, J.; MENDES-GIANNINI, M. J.; LENZI, H. L.; DE ALMEIDA SOARES, C. M. *et al.* The malate synthase of Paracoccidioides brasiliensis is a linked surface protein that behaves as an anchorless adhesin. **BMC Microbiol**, v. 9, p. 272, 2009.

DA SILVA, J. d. F.; DE OLIVEIRA, H. C.; MARCOS, C. M.; MORAES DA SILVA, R. A.; DA COSTA, T. A. *et al.* Paracoccidioides brasiliensis 30 kDa Adhesin: Identification as a 14-3-3 Protein, Cloning and Subcellular Localization in Infection Models. **PLoS One**, v. 8, n. 4, APR 30 2013 2013.

DABIRI, S.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. Comparative analysis of proteinase, phospholipase, hydrophobicity and biofilm forming ability in Candida species isolated from clinical specimens. **J Mycol Med**, v. 28, n. 3, p. 437-442, Sep 2018.

DARLING, S. T. The Morphology of the Parasite (Histoplasma Capsulatum) and the Lesions of Histoplasmosis, a Fatal Disease of Tropical America. **J Exp Med**, v. 11, n. 4, p. 515-531, Jul 17 1909.

DAVIS, J. M.; HUANG, M.; BOTTS, M. R.; HULL, C. M.; HUTTENLOCHER, A. A Zebrafish Model of Cryptococcal Infection Reveals Roles for Macrophages, Endothelial Cells,

and Neutrophils in the Establishment and Control of Sustained Fungemia. **Infect Immun**, v. 84, n. 10, p. 3047-3062, Oct 2016.

DE OLIVEIRA, H. C.; DA SILVA, J. e. F.; SCORZONI, L.; MARCOS, C. M.; ROSSI, S. A. *et al.* Importance of adhesins in virulence of *Paracoccidioides* spp. **Front Microbiol**, v. 6, p. 303, 2015.

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

DEEPE, G. **Principles and practices of infectious diseases**: *Histoplasma capsulatum*. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone 2004.

DEEPE, G. S.; GIBBONS, R. S.; SMULIAN, A. G. *Histoplasma capsulatum* manifests preferential invasion of phagocytic subpopulations in murine lungs. **J Leukoc Biol**, v. 84, n. 3, p. 669-678, Sep 2008.

DEEPE, G. S., Jr. Modulation of infection with *Histoplasma capsulatum* by inhibition of tumor necrosis factor- α activity. **Clin Infect Dis**, v. 41, Suppl 3, p. S204-207, Aug 1 2005.

DEMONBREUN, W. A. The Cultivation and Cultural Characteristics of Darling's *Histoplasma Capsulatum*. *In: American Journal of Tropical Medicine*, v. 14, Suppl. 1, n. 2, p. 93-125, 1934.

DESALERMOS, A.; FUCHS, B. B.; MYLONAKIS, E. Selecting an invertebrate model host for the study of fungal pathogenesis. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 2, p. e1002451, Feb 2012.

DODD, K.; TOMPKINS, E. H. A Case of Histoplasmosis of Darling in an Infant. *In: American Journal of Tropical Medicine*, v. 14, Suppl. 1, n. 2, p. 127-137, 1934.

DOMER, J. E. Monosaccharide and chitin content of cell walls of *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. **J Bacteriol**, v. 107, n. 3, p. 870-877, Sep 1971.

DONOFRIO, F. C.; CALIL, A. C. A.; MIRANDA, E. T.; ALMEIDA, A. M. F.; BENARD, G. *et al.* Enolase from *Paracoccidioides brasiliensis*: isolation and identification as a fibronectin-binding protein. **J Med Microbiol**, v. 58, n. Pt 6, p. 706-713, Jun 2009.

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

EDWARDS, J. A.; ZEMSKA, O.; RAPPEYE, C. A. Discovery of a role for Hsp82 in *Histoplasma* virulence through a quantitative screen for macrophage lethality. **Infect Immun**, v. 79, n. 8, p. 3348-3357, Aug 2011b.

EHLERS, M. R. CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity. **Microbes Infect**, v. 2, n. 3, p. 289-294, Mar 2000.

EISSENBERG, L. G.; GOLDMAN, W. E.; SCHLESINGER, P. H. *Histoplasma capsulatum* modulates the acidification of phagolysosomes. **J Exp Med**, v. 177, n. 6, p. 1605-1611, Jun 1 1993.

ELLS, T. C.; HANSEN, L. Strain and growth temperature influence *Listeria* spp. attachment to intact and cut cabbage. **Int J Food Microbiol**, v. 111, n. 1, p. 34-42, Aug 2006.

ENE, I. V.; BENNETT, R. J. Hwp1 and related adhesins contribute to both mating and biofilm formation in *Candida albicans*. **Eukaryot Cell**, v. 8, n. 12, p. 1909-1913, Dec 2009.

FERGUSON-PAUL, K.; PARK, C.; CHILDRESS, S.; ARNOLD, S.; AULT, B. *et al.* Disseminated histoplasmosis in pediatric kidney transplant recipients-A report of six cases and review of the literature. **Pediatr Transplant**, v. 22, n. 7, p. e13274, Nov 2018.

FERNANDES, F. F.; PITANGUI, N. S.; PERON, G.; VALIM, C. X. R.; MAZUCATO, V. M. *et al.* Expression of Hsp60 and its cell location in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 62, p. e29, 2020.

FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S. [Histoplasmosis]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42, n. 2, p. 192-198, Mar-Apr 2009.

FUCHS, B. B.; MYLONAKIS, E. Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. **Curr Opin Microbiol**, v. 9, n. 4, p. 346-351, Aug 2006.

GARFOOT, A. L.; RAPPEYE, C. A. *Histoplasma capsulatum* surmounts obstacles to intracellular pathogenesis. **FEBS J**, v. 283, n. 4, p. 619-633, Feb 2016.

GASS, J. D.; ZIMMERMAN, L. E. Histopathological demonstration of *Histoplasma capsulatum*. **Am J Ophthalmol**, v. 85, n. 5 Pt 1, p. 725-726, May 1978.

GIL-NAVARRO, I.; GIL, M. L.; CASANOVA, M.; O'CONNOR, J. E.; MARTINEZ, J. P. *et al.* The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is a surface antigen. **J Bacteriol**, v. 179, n. 16, p. 4992-4999, Aug 1997.

GILDEA, L. A.; MORRIS, R. E.; NEWMAN, S. L. Histoplasma capsulatum yeasts are phagocytosed via very late antigen-5, killed, and processed for antigen presentation by human dendritic cells. **J Immunol**, v. 166, n. 2, p. 1049-1056, Jan 15 2001.

GILMORE, S. A.; VOORHIES, M.; GEBHART, D.; SIL, A. Genome-Wide Reprogramming of Transcript Architecture by Temperature Specifies the Developmental States of the Human Pathogen Histoplasma. **PLoS Genet**, v. 11, n. 7, p. e1005395, Jul 2015.

GOMEZ, F. J.; PILCHER-ROBERTS, R.; ALBORZI, A.; NEWMAN, S. L. Histoplasma capsulatum cyclophilin A mediates attachment to dendritic cell VLA-5. **J Immunol**, v. 181, n. 10, p. 7106-7114, Nov 15 2008.

GOMEZ, L. F.; ARANGO, M.; MCEWEN, J. G.; GOMEZ, O. M.; ZULUAGA, A. *et al.* Molecular epidemiology of Colombian Histoplasma capsulatum isolates obtained from human and chicken manure samples. **Heliyon**, v. 5, n. 7, p. e02084, Jul 2019.

GONÇALVES, L. N. C.; COSTA-ORLANDI, C. B.; BILA, N. M.; VASO, C. O.; DA SILVA, R. A. M. *et al.* Biofilm Formation by Histoplasma capsulatum in Different Culture Media and Oxygen Atmospheres. v. 11, n. 1455, 2020-July-10 2020. Original Research.

GOZALBO, D.; GIL-NAVARRO, I.; AZORIN, I.; RENAU-PIQUERAS, J.; MARTINEZ, J. P. *et al.* The cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of Candida albicans is also a fibronectin and laminin binding protein. **Infect Immun**, v. 66, n. 5, p. 2052-2059, May 1998.

GUIMARAES, A. J.; DE CERQUEIRA, M. D.; ZAMITH-MIRANDA, D.; LOPEZ, P. H.; RODRIGUES, M. L. *et al.* Host membrane glycosphingolipids and lipid microdomains facilitate Histoplasma capsulatum internalisation by macrophages. **Cell Microbiol**, v. 21, n. 3, p. e12976, Mar 2019.

GUIMARAES, A. J.; FRASES, S.; GOMEZ, F. J.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; NOSANCHUK, J. D. Monoclonal antibodies to heat shock protein 60 alter the pathogenesis of Histoplasma capsulatum. **Infect Immun**, v. 77, n. 4, p. 1357-1367, Apr 2009.

GUIMARAES, A. J.; FRASES, S.; PONTES, B.; DE CERQUEIRA, M. D.; RODRIGUES, M. L. *et al.* Agglutination of Histoplasma capsulatum by IgG monoclonal antibodies against Hsp60 impacts macrophage effector functions. **Infect Immun**, v. 79, n. 2, p. 918-927, Feb 2011.

GUIMARÃES, A. J.; NOSANCHUK, J. D.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Diagnosis of histoplasmosis %J Brazilian Journal of Microbiology. v. 37, p. 1-13, 2006.

HABICH, C.; KEMPE, K.; GOMEZ, F. J.; LILICRAP, M.; GASTON, H. *et al.* Heat shock protein 60: identification of specific epitopes for binding to primary macrophages. **FEBS Lett**, v. 580, n. 1, p. 115-120, Jan 9 2006.

HAGE, C. A.; RIBES, J. A.; WENGENACK, N. L.; BADDOUR, L. M.; ASSI, M. *et al.* A multicenter evaluation of tests for diagnosis of histoplasmosis. **Clin Infect Dis**, v. 53, n. 5, p. 448-454, Sep 2011.

HARTUNG, T. From alternative methods to a new toxicology. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 77, n. 3, p. 338-349, Apr 2011.

HOGAN, L. H.; KLEIN, B. S. Altered expression of surface alpha-1,3-glucan in genetically related strains of *Blastomyces dermatitidis* that differ in virulence. **Infect Immun**, v. 62, n. 8, p. 3543-3546, Aug 1994.

HOLBROOK, E. D.; SMOLNYCKI, K. A.; YOUSEFF, B. H.; RAPPLEYE, C. A. Redundant catalases detoxify phagocyte reactive oxygen and facilitate *Histoplasma capsulatum* pathogenesis. **Infect Immun**, v. 81, n. 7, p. 2334-2346, Jul 2013.

HOWARD, D. H.; RAFIE, R.; TIWARI, A.; FAULL, K. F. Hydroxamate siderophores of *Histoplasma capsulatum*. **Infect Immun**, v. 68, n. 4, p. 2338-2343, Apr 2000.

HOYER, L. L.; GREEN, C. B.; OH, S. H.; ZHAO, X. Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family--a sticky pursuit. **Med Mycol**, v. 46, n. 1, p. 1-15, Feb 2008.

JOHNSON, C. H.; AYYADEVARA, S.; MCEWEN, J. E.; SHMOOKLER REIS, R. J. *Histoplasma capsulatum* and *Caenorhabditis elegans*: a simple nematode model for an innate immune response to fungal infection. **Med Mycol**, v. 47, n. 8, p. 808-813, Dec 2009.

KARIMI, K.; WHEAT, L. J.; CONNOLLY, P.; CLOUD, G.; HAJJEH, R. *et al.* Differences in histoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome in the United States and Brazil. **J Infect Dis**, v. 186, n. 11, p. 1655-1660, Dec 1 2002.

KASUGA, T.; WHITE, T. J.; KOENIG, G.; MCEWEN, J.; RESTREPO, A. *et al.* Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. **Mol Ecol**, v. 12, n. 12, p. 3383-3401, Dec 2003.

KAUFFMAN, C. A. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, n. 1, p. 115-132, Jan 2007.

KEATH, E. J.; PAINTER, A. A.; KOBAYASHI, G. S.; MEDOFF, G. Variable expression of a yeast-phase-specific gene in *Histoplasma capsulatum* strains differing in thermotolerance and virulence. **Infect Immun**, v. 57, n. 5, p. 1384-1390, May 1989.

KEMPF, M.; COTTIN, J.; LICZNAR, P.; LEFRANCOIS, C.; ROBERT, R. *et al.* Disruption of the GPI protein-encoding gene IFF4 of *Candida albicans* results in decreased adherence and virulence. **Mycopathologia**, v. 168, n. 2, p. 73-77, Aug 2009.

KENNEDY, C. C.; LIMPER, A. H. Redefining the clinical spectrum of chronic pulmonary histoplasmosis: a retrospective case series of 46 patients. **Medicine (Baltimore)**, v. 86, n. 4, p. 252-258, Jul 2007.

KLEIN, B. S.; TEBBETS, B. Dimorphism and virulence in fungi. **Curr Opin Microbiol**, v. 10, n. 4, p. 314-319, Aug 2007.

KLIMPEL, K. R.; GOLDMAN, W. E. Cell walls from avirulent variants of *Histoplasma capsulatum* lack alpha-(1,3)-glucan. **Infect Immun**, v. 56, n. 11, p. 2997-3000, Nov 1988.

KOLLEF, M.; MICEK, S.; HAMPTON, N.; DOHERTY, J. A.; KUMAR, A. Septic shock attributed to *Candida* infection: importance of empiric therapy and source control. **Clin Infect Dis**, v. 54, n. 12, p. 1739-1746, Jun 2012.

KOWALSKI, C. H.; KERKAERT, J. D.; LIU, K. W.; BOND, M. C.; HARTMANN, R. *et al.* Fungal biofilm morphology impacts hypoxia fitness and disease progression. **Nat Microbiol**, v. 4, n. 12, p. 2430-2441, Dec 2019.

KROGH, A.; LARSSON, B.; VON HEIJNE, G.; SONNHAMMER, E. L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. **J Mol Biol**, v. 305, n. 3, p. 567-580, Jan 19 2001.

KUMARI, A.; MANKOTIA, S.; CHAUBEY, B.; LUTHRA, M.; SINGH, R. Role of biofilm morphology, matrix content and surface hydrophobicity in the biofilm-forming capacity of various *Candida* species. **J Med Microbiol**, v. 67, n. 6, p. 889-892, Jun 2018.

LAHTEENMAKI, K.; EDELMAN, S.; KORHONEN, T. K. Bacterial metastasis: the host plasminogen system in bacterial invasion. **Trends Microbiol**, v. 13, n. 2, p. 79-85, Feb 2005.

LARA-LEMUS, R.; ALVARADO-VASQUEZ, N.; ZENTENO, E.; GOROCICA, P. Effect of *Histoplasma capsulatum* glucans on host innate immunity. **Rev Iberoam Micol**, v. 31, n. 1, p. 76-80, Jan-Mar 2014.

LEDTKE, C.; REHM, S. J.; FRASER, T. G.; SHRESTHA, N. K.; TAN, C. D. *et al.* Endovascular infections caused by *Histoplasma capsulatum*: a case series and review of the literature. **Arch Pathol Lab Med**, v. 136, n. 6, p. 640-645, Jun 2012.

LEIMANN, B. C.; PIZZINI, C. V.; MUNIZ, M. M.; ALBUQUERQUE, P. C.; MONTEIRO, P. C. *et al.* Histoplasmosis in a Brazilian center: clinical forms and laboratory tests. **Rev Iberoam Micol**, v. 22, n. 3, p. 141-146, Sep 2005.

LENTINI, G.; MIDIRI, A.; FIRON, A.; GALBO, R.; MANCUSO, G. *et al.* The plasminogen binding protein PbsP is required for brain invasion by hypervirulent CC17 Group B streptococci. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 14322, Sep 25 2018.

LIN, J. S.; HUANG, J. H.; HUNG, L. Y.; WU, S. Y.; WU-HSIEH, B. A. Distinct roles of complement receptor 3, Dectin-1, and sialic acids in murine macrophage interaction with *Histoplasma* yeast. **J Leukoc Biol**, v. 88, n. 1, p. 95-106, Jul 2010.

LONG, K. H.; GOMEZ, F. J.; MORRIS, R. E.; NEWMAN, S. L. Identification of heat shock protein 60 as the ligand on *Histoplasma capsulatum* that mediates binding to CD18 receptors on human macrophages. **J Immunol**, v. 170, n. 1, p. 487-494, Jan 1 2003.

LORCHIRACHONKUL, N.; FOONGLADDA, S.; RUANGCHIRA-URAI, R.; CHAYAKULKEEREE, M. Prosthetic valve endocarditis caused by *Histoplasma capsulatum*: the first case report in Thailand. **J Med Assoc Thai**, v. 96 Suppl 2, p. S262-265, Feb 2013.

LUCEY, O.; CARROLL, I.; BJORN, T.; MILLAR, M. Reactivation of latent *Histoplasma* and disseminated cytomegalovirus in a returning traveller with ulcerative colitis. **JMM Case Rep**, v. 5, n. 12, p. e005170, Dec 2018.

MAIGA, A. W.; DEPPEN, S.; SCAFFIDI, B. K.; BADDLEY, J.; ALDRICH, M. C. *et al.* Mapping *Histoplasma capsulatum* Exposure, United States. **Emerg Infect Dis**, v. 24, n. 10, p. 1835-1839, Oct 2018.

MANSOOR, C. A.; BHARGAVAN, P. V.; RAJANISH, R.; NAIR, L. R. Disseminated histoplasmosis. **Indian J Orthop**, v. 47, n. 6, p. 639-642, Nov 2013.

MARCOS, C. M.; DA SILVA, J. F.; DE OLIVEIRA, H. C.; ASSATO, P. A.; SINGULANI, J. L. *et al.* Decreased expression of 14-3-3 in *Paracoccidioides brasiliensis* confirms its involvement in fungal pathogenesis. **Virulence**, v. 7, n. 2, p. 72-84, Feb-Mar, 2016. DOI: 10.1080/21505594.2015.1122166. Epub 2015 Dec 8.

MARCOS, C. M.; DE FÁTIMA DA SILVA, J.; DE OLIVEIRA, H. C.; MORAES DA SILVA, R. A.; MENDES-GIANNINI, M. J. *et al.* Surface-expressed enolase contributes to the adhesion

of *Paracoccidioides brasiliensis* to host cells. **FEMS Yeast Res**, v. 12, n. 5, p. 557-570, Aug 2012.

MARCOS, C. M.; DE OLIVEIRA, H. C.; ASSATO, P. A.; DE ANDRADE, C. R.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. *et al.* *Paracoccidioides brasiliensis* 14-3-3 protein is important for virulence in a murine model. **Med Mycol**, v. 57, n. 7, p. 900-904, Oct 1 2019.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cell susceptibility to heat, cold, and UV light. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 14, p. 4592-4601, Jul 2007.

MATTOS, B. S.; SOUSA, A. A.; MAGALHAES, M. H.; ANDRE, M.; BRITO, E. D. R. *Candida albicans* in patients with oronasal communication and obturator prostheses. **Braz Dent J**, v. 20, n. 4, p. 336-340, 2009.

MAZA, P. K.; SUZUKI, E. *Histoplasma capsulatum*-Induced Cytokine Secretion in Lung Epithelial Cells Is Dependent on Host Integrins, Src-Family Kinase Activation, and Membrane Raft Recruitment. **Front Microbiol**, v. 7, p. 580, 2016.

MCCALL, A. D.; PATHIRANA, R. U.; PRABHAKAR, A.; CULLEN, P. J.; EDGERTON, M. *Candida albicans* biofilm development is governed by cooperative attachment and adhesion maintenance proteins. **NPJ Biofilms Microbiomes**, v. 5, p. 21, 2019.

MEDOFF, G.; SACCO, M.; MARESCA, B.; SCHLESSINGER, D.; PAINTER, A. *et al.* Irreversible block of the mycelial-to-yeast phase transition of *Histoplasma capsulatum*. **Science**, v. 231, n. 4737, p. 476-479, Jan 31 1986.

MIHU, M. R.; NOSANCHUK, J. D. *Histoplasma* virulence and host responses. **Int J Microbiol**, v. 2012, Article ID 268123, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/268123>.

MITTAL, J.; PONCE, M. G.; GENDLINA, I.; NOSANCHUK, J. D. *Histoplasma Capsulatum*: Mechanisms for Pathogenesis. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 422, p. 157-191, Jul, 2018.

MORRIS, C. E.; MONIER, J.; JACQUES, M. Methods for observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable microorganisms. **Appl Environ Microbiol**, v. 63, n. 4, p. 1570-1576, Apr 1997.

MUZYKA, B. C. Oral fungal infections. **Dent Clin North Am**, v. 49, n. 1, p. 49-65, viii, Jan 2005.

NAGLIK, J. R.; MOYES, D. L.; WACHTLER, B.; HUBE, B. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. **Microbes Infect**, v. 13, n. 12-13, p. 963-976, Nov 2011.

NEMECEK, J. C.; WÜTHRICH, M.; KLEIN, B. S. Global control of dimorphism and virulence in fungi. **Science**, v. 312, n. 5773, p. 583-588, Apr 2006.

NEWMAN, S. L.; BUCHER, C.; RHODES, J.; BULLOCK, W. E. Phagocytosis of *Histoplasma capsulatum* yeasts and microconidia by human cultured macrophages and alveolar macrophages. Cellular cytoskeleton requirement for attachment and ingestion. **J Clin Invest**, v. 85, n. 1, p. 223-230, Jan 1990.

NEWMAN, S. L.; GOOTEE, L.; GABAY, J. E.; SELSTED, M. E. Identification of constituents of human neutrophil azurophil granules that mediate fungistasis against *Histoplasma capsulatum*. **Infect Immun**, v. 68, n. 10, p. 5668-5672, Oct 2000.

NGUYEN, V. Q.; SIL, A. Temperature-induced switch to the pathogenic yeast form of *Histoplasma capsulatum* requires Ryp1, a conserved transcriptional regulator. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 12, p. 4880-4885, Mar 2008.

NICHOLLS, C.; LI, H.; LIU, J. P. GAPDH: a common enzyme with uncommon functions. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 39, n. 8, p. 674-679, Aug 2012.

NIELSEN, H.; ENGELBRECHT, J.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G. A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. **Int J Neural Syst**, 8, n. 5-6, p. 581-599, 1997 Oct-Dec 1997.

NORKAEW, T.; OHNO, H.; SRIBUREE, P.; TANABE, K.; THARAVICHITKUL, P. *et al.* Detection of environmental sources of *Histoplasma capsulatum* in Chiang Mai, Thailand, by nested PCR. **Mycopathologia**, v. 176, n. 5-6, p. 395-402, Dec 2013.

O'CONNOR, L.; LAHIFF, S.; CASEY, F.; GLENNON, M.; CORMICAN, M. *et al.* Quantification of ALS1 gene expression in *Candida albicans* biofilms by RT-PCR using hybridisation probes on the LightCycler. **Mol Cell Probes**, v. 19, n. 3, p. 153-162, Jun 2005.

PAN, B.; CHEN, M.; PAN, W.; LIAO, W. Histoplasmosis: a new endemic fungal infection in China? Review and analysis of cases. **Mycoses**, v. 56, n. 3, p. 212-221, May 2013.

PANAYIDOU, S.; IOANNIDOU, E.; APIDIANAKIS, Y. Human pathogenic bacteria, fungi, and viruses in *Drosophila*: disease modeling, lessons, and shortcomings. **Virulence**, v. 5, n. 2, p. 253-269, Feb 15 2014.

PATEL, A. K.; PATEL, K. K.; TOSHNIWAL, H.; GOHEL, S.; CHAKRABARTI, A. Histoplasmosis in non-endemic North-Western part of India. **Indian J Med Microbiol**, v. 36, n. 1, p. 61-64, Jan-Mar 2018.

PATEL, N.; BRONZE, M. S. Histoplasma infection of aortofemoral bypass graft. **Am J Med Sci**, v. 347, n. 5, p. 421-424, May 2014.

PEREIRA, M. F.; ROSSI, C. C.; VIEIRA DE QUEIROZ, M.; MARTINS, G. F.; ISAAC, C. *et al.* *Galleria mellonella* is an effective model to study *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. **Microbiology**, v. 161, n. Pt 2, p. 387-400, Feb 2015.

PERINI, H. F.; MORALES, A. T. P.; ALMEIDA, R. S. C.; PANAGIO, L. A.; JUNIOR, A. O. G. *et al.* Phenotypic switching in *Candida tropicalis* alters host-pathogen interactions in a *Galleria mellonella* infection model. **Sci Rep**, v. 9, n. 1, p. 12555, Aug 29 2019.

PETERSEN, T. N.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nat Methods**, v. 8, n. 10, p. 785-786, Sep 29 2011.

PITANGUI, N. S.; SARDI, J. C.; SILVA, J. F.; BENADUCCI, T.; MORAES DA SILVA, R. A. *et al.* Adhesion of *Histoplasma capsulatum* to pneumocytes and biofilm formation on an abiotic surface. **Biofouling**, v. 28, n. 7, p. 711-718, 2012.

PITANGUI, S.; SARDI, J. C.; VOLTAN, A. R.; DOS SANTOS, C. T.; DA SILVA, J. F. *et al.* An Intracellular Arrangement of *Histoplasma capsulatum* Yeast-Aggregates Generates Nuclear Damage to the Cultured Murine Alveolar Macrophages. **Front Microbiol**, v. 6, p. 1526, 2015.

POSAS, F.; WURGLER-MURPHY, S. M.; MAEDA, T.; WITTEN, E. A.; THAI, T. C. *et al.* Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. **Cell**, v. 86, n. 6, p. 865-875, Sep 1996.

PRENETA, A.; NADA, K. M.; RAJA, A.; KASUBHAI, M. Chronic Pulmonary Histoplasmosis Identified in a Young Patient with Selective Immunoglobulin M Deficiency. **Case Rep Infect Dis**, v. 2018, Article ID 8740204, 2018.

RAMANA, J.; GUPTA, D. FaaPred: a SVM-based prediction method for fungal adhesins and adhesin-like proteins. **PLoS One**, v. 5, n. 3, p. e9695, 2010.

RAPPLEYE, C. A.; EISSENBERG, L. G.; GOLDMAN, W. E. *Histoplasma capsulatum* alpha-(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the beta-glucan receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 4, p. 1366-1370, Jan 2007.

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

RAY, S. C.; RAPPLEYE, C. A. Flying under the radar: *Histoplasma capsulatum* avoidance of innate immune recognition. **Semin Cell Dev Biol**, v. 89, p. 91-98, May 2019.

REICHHARDT, C.; STEVENS, D. A.; CEGELSKI, L. Fungal biofilm composition and opportunities in drug discovery. **Future Med Chem**, v. 8, n. 12, p. 1455-1468, Aug 2016.

REISS, E. Serial enzymatic hydrolysis of cell walls of two serotypes of yeast-form *Histoplasma capsulatum* with alpha(1 leads to 3)-glucanase, beta(1 leads to 3)-glucanase, pronase, and chitinase. **Infect Immun**, v. 16, n. 1, p. 181-188, Apr 1977.

REISS, E.; MILLER, S. E.; KAPLAN, W.; KAUFMAN, L. Antigenic, chemical, and structural properties of cell walls of *Histoplasma capsulatum* yeast-form chemotypes 1 and 2 after serial enzymatic hydrolysis. **Infect Immun**, v. 16, n. 2, p. 690-700, May 1977.

REYES-MONTES, M. R.; BOBADILLA-DEL VALLE, M.; MARTINEZ-RIVERA, M. A.; RODRIGUEZ-ARELLANES, G.; MARAVILLA, E. *et al.* Relatedness analyses of *Histoplasma capsulatum* isolates from Mexican patients with AIDS-associated histoplasmosis by using histoplasmin electrophoretic profiles and randomly amplified polymorphic DNA patterns. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 5, p. 1404-1408, May 1999.

ROCHA-SILVA, F.; FIGUEIREDO, S. M.; SILVEIRA, T. T.; ASSUNCAO, C. B.; CAMPOLINA, S. S. *et al.* Histoplasmosis outbreak in Tamboril cave-Minas Gerais state, Brazil. **Med Mycol Case Rep**, v. 4, p. 1-4, Apr 2014.

SACCO, M.; MEDOFF, G.; LAMBOWITZ, A. M.; KUMAR, B. V.; KOBAYASHI, G. S. *et al.* Sulfhydryl induced respiratory "shunt" pathways and their role in morphogenesis in the fungus, *Histoplasma capsulatum*. **J Biol Chem**, v. 258, n. 13, p. 8223-8230, Jul 10 1983.

SAHAZA, J. H.; PEREZ-TORRES, A.; ZENTENO, E.; TAYLOR, M. L. Usefulness of the murine model to study the immune response against *Histoplasma capsulatum* infection. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 37, n. 3, p. 143-152, May 2014.

SANCHEZ-HERRERA, R.; FLORES-VILLAVICENCIO, L. L.; PICHARDO-MOLINA, J. L.; CASTRUITA-DOMINGUEZ, J. P.; APARICIO-FERNANDEZ, X. *et al.* Analysis of biofilm formation by *Sporothrix schenckii*. **Med Mycol**, Article ID: myaa027, May, 2020. <https://doi.org/10.1093/mmy/myaa027>.

SÁNCHEZ-VARGAS, L. O.; ESTRADA-BARRAZA, D.; POZOS-GUILLEN, A. J.; RIVAS-CACERES, R. Biofilm formation by oral clinical isolates of *Candida* species. **Arch Oral Biol**, v. 58, n. 10, p. 1318-1326, Oct 2013.

SARDI; PITANGUI NDE, S.; VOLTAN, A. R.; BRAZ, J. D.; MACHADO, M. P. *et al.* In vitro *Paracoccidioides brasiliensis* biofilm and gene expression of adhesins and hydrolytic enzymes. **Virulence**, v. 6, n. 6, p. 642-651, 2015.

SCHEEL, C. M.; GOMEZ, B. L. Diagnostic Methods for Histoplasmosis: Focus on Endemic Countries with Variable Infrastructure Levels. **Curr Trop Med Rep**, v. 1, n. 2, p. 129-137, 2014.

SCORZONI, L.; DE LUCAS, M. P.; MESA-ARANGO, A. C.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; LOZANO, E. *et al.* Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e60047, 2013.

SCORZONI, L.; DE PAULA E SILVA, A. C.; SINGULANI JDE, L.; LEITE, F. S.; DE OLIVEIRA, H. C. *et al.* Comparison of virulence between *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* using *Galleria mellonella* as a host model. **Virulence**, v. 6, n. 8, p. 766-776, 2015.

SEBGHATI, T. S.; ENGLE, J. T.; GOLDMAN, W. E. Intracellular parasitism by *Histoplasma capsulatum*: fungal virulence and calcium dependence. **Science**, v. 290, n. 5495, p. 1368-1372, Nov 17 2000.

SEPULVEDA, V. E.; MARQUEZ, R.; TURISSINI, D. A.; GOLDMAN, W. E.; MATUTE, D. R. Genome Sequences Reveal Cryptic Speciation in the Human Pathogen *Histoplasma capsulatum*. **MBio**, v.8, n. 6, Dec 5 2017.

SHEN, Q.; RAPPEYE, C. A. Differentiation of the fungus *Histoplasma capsulatum* into a pathogen of phagocytes. **Curr Opin Microbiol**, v. 40, p. 1-7, Dec 2017.

SILVA, R. C.; PADOVAN, A. C.; PIMENTA, D. C.; FERREIRA, R. C.; DA SILVA, C. V. *et al.* Extracellular enolase of *Candida albicans* is involved in colonization of mammalian intestinal epithelium. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 4, p. 66, 2014.

SINGULANI, J. L.; SCORZONI, L.; DE OLIVEIRA, H. C.; MARCOS, C. M.; ASSATO, P. A. *et al.* Applications of Invertebrate Animal Models to Dimorphic Fungal Infections. **J Fungi (Basel)**, v. 4, n. 4, 10 2018.

STAJICH, J. E.; HARRIS, T.; BRUNK, B. P.; BRESTELLI, J.; FISCHER, S. *et al.* FungiDB: an integrated functional genomics database for fungi. **Nucleic Acids Res**, 40(Database issue):D675-81. DOI: 10.1093/nar/gkr918. Epub 2011 Nov 7. Jan 2012.

STIE, J.; BRUNI, G.; FOX, D. Surface-associated plasminogen binding of *Cryptococcus neoformans* promotes extracellular matrix invasion. **PLoS One**, v. 4, n. 6, p. e5780, 2009.

STRASSER, J. E.; NEWMAN, S. L.; CIRAOLO, G. M.; MORRIS, R. E.; HOWELL, M. L. *et al.* Regulation of the macrophage vacuolar ATPase and phagosome-lysosome fusion by *Histoplasma capsulatum*. **J Immunol**, v. 162, n. 10, p. 6148-6154, May 1999.

SUAREZ-ALVAREZ, R. O.; PEREZ-TORRES, A.; TAYLOR, M. L. Adherence patterns of *Histoplasma capsulatum* yeasts to bat tissue sections. **Mycopathologia**, v. 170, n. 2, p. 79-87, Aug 2010.

SUAREZ-ALVAREZ, R. O.; SAHAZA, J. H.; BERZUNZA-CRUZ, M.; BECKER, I.; CURIEL-QUESADA, E. *et al.* Dimorphism and Dissemination of *Histoplasma capsulatum* in the Upper Respiratory Tract after Intranasal Infection of Bats and Mice with Mycelial Propagules. **Am J Trop Med Hyg**, v. 101, n. 3, p. 716-723, Sep 2019.

SWARTZENTRUBER, S.; RHODES, L.; KURKJIAN, K.; ZAHN, M.; BRANDT, M. E. *et al.* Diagnosis of acute pulmonary histoplasmosis by antigen detection. **Clin Infect Dis**, v. 49, n. 12, p. 1878-1882, Dec 15 2009.

TEIXEIRA, M.; PATANE, J. S.; TAYLOR, M. L.; GOMEZ, B. L.; THEODORO, R. C. *et al.* Worldwide Phylogenetic Distributions and Population Dynamics of the Genus *Histoplasma*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 6, p. e0004732, Jun 2016.

THOMAS, D. P.; BACHMANN, S. P.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Proteomics for the analysis of the *Candida albicans* biofilm lifestyle. **Proteomics**, v. 6, n. 21, p. 5795-5804, Nov 2006.

THOMAZ, L.; GARCIA-RODAS, R.; GUIMARAES, A. J.; TABORDA, C. P.; ZARAGOZA, O. *et al.* *Galleria mellonella* as a model host to study *Paracoccidioides lutzii* and *Histoplasma capsulatum*. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 139-146, Feb 15 2013.

THOMAZ, L.; NOSANCHUK, J. D.; ROSSI, D. C.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Monoclonal antibodies to heat shock protein 60 induce a protective immune response against experimental *Paracoccidioides lutzii*. **Microbes Infect**, v. 16, n. 9, p. 788-795, Sep 2014.

THOMPSON-SOUZA, G. A.; SANTOS, G. M. P.; SILVA, J. C.; MUNIZ, V. S.; BRAGA, Y. A. V. *et al.* *Histoplasma capsulatum*-induced extracellular DNA trap release in human neutrophils. **Cell Microbiol**, v. 22, n. 7, p. e13195, Jul 2020.

TREVIJANO-CONTADOR, N.; ZARAGOZA, O. Expanding the use of alternative models to investigate novel aspects of immunity to microbial pathogens. **Virulence**, v. 5, n. 4, p. 454-456, May 15 2014.

TSENG, T. C.; LIAW, S. J.; HSIAO, C. H.; WANG, C. Y.; LEE, L. N. *et al.* Molecular evidence of recurrent histoplasmosis with 9-year latency in a patient with Addison's disease. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 9, p. 4911-4913, Sep 2005.

UNIS, G.; OLIVEIRA FDE, M.; SEVERO, L. C. [Disseminated histoplasmosis in Rio Grande do Sul]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 37, n. 6, p. 463-468, Nov-Dec 2004.

UNIS, G.; SEVERO, L. C. J. J. B. d. P. Chronic pulmonary histoplasmosis mimicking tuberculosis. v. 31, n. 4, p. 318-324, 2005.

UPPULURI, P.; CHATURVEDI, A. K.; SRINIVASAN, A.; BANERJEE, M.; RAMASUBRAMANIAM, A. K. *et al.* Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 3, p. e1000828, Mar 26 2010.

VALERO, C.; GAGO, S.; MONTEIRO, M. C.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; BUITRAGO, M. J. African histoplasmosis: new clinical and microbiological insights. **Med Mycol**, v. 56, n. 1, p. 51-59, Jan 1 2018.

VALLEJO, M. C.; NAKAYASU, E. S.; MATSUO, A. L.; SOBREIRA, T. J.; LONGO, L. V. *et al.* Vesicle and vesicle-free extracellular proteome of *Paracoccidioides brasiliensis*: comparative analysis with other pathogenic fungi. **J Proteome Res**, v. 11, n. 3, p. 1676-1685, Mar 2012.

VEERAVAGU, A.; LUDWIG, C.; CAMARA-QUINTANA, J. Q.; JIANG, B.; LAD, N. *et al.* Fungal infection of a ventriculoperitoneal shunt: histoplasmosis diagnosis and treatment. **World Neurosurg**, v. 80, n. 1-2, p. 222 e225-213, Jul-Aug 2013.

VICENTINI, A. P.; GESZTESI, J. L.; FRANCO, M. F.; DE SOUZA, W.; DE MORAES, J. Z. *et al.* Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infect Immun**, v. 62, n. 4, p. 1465-1469, Apr 1994.

WACHTLER, B.; WILSON, D.; HAEDICKE, K.; DALLE, F.; HUBE, B. From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e17046, Feb 23 2011.

WALLNER, M.; STEYER, G.; KRAUSE, R.; GSTETTNER, C.; VON LEWINSKI, D. Fungal endocarditis of a bioprosthetic aortic valve. Pharmacological treatment of a *Candida parapsilosis* endocarditis. **Herz**, v. 38, n. 4, p. 431-434, Jun 2013.

WAND, M. E.; BOCK, L. J.; TURTON, J. F.; NUGENT, P. G.; SUTTON, J. M. *Acinetobacter baumannii* virulence is enhanced in *Galleria mellonella* following biofilm adaptation. **J Med Microbiol**, v. 61, n. Pt 4, p. 470-477, Apr 2012.

WEBSTER, R. H.; SIL, A. Conserved factors Ryp2 and Ryp3 control cell morphology and infectious spore formation in the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 38, p. 14573-14578, Sep 23 2008.

WHEAT, J.; WHEAT, H.; CONNOLLY, P.; KLEIMAN, M.; SUPPARATPINYO, K. *et al.* Cross-reactivity in *Histoplasma capsulatum* variety *capsulatum* antigen assays of urine samples from patients with endemic mycoses. **Clin Infect Dis**, v. 24, n. 6, p. 1169-1171, Jun 1997.

WHEAT, L. J.; AZAR, M. M.; BAHR, N. C.; SPEC, A.; RELICH, R. F. *et al.* Histoplasmosis. **Infect Dis Clin North Am**, v. 30, n. 1, p. 207-227, Mar 2016.

WHEAT, L. J.; HACKETT, E.; DURKIN, M.; CONNOLLY, P.; PETRAITIENE, R. *et al.* Histoplasmosis-associated cross-reactivity in the BioRad Platelia *Aspergillus* enzyme immunoassay. **Clin Vaccine Immunol**, v. 14, n. 5, p. 638-640, May 2007.

WOLF, J. E.; KERCHBERGER, V.; KOBAYASHI, G. S.; LITTLE, J. R. Modulation of the macrophage oxidative burst by *Histoplasma capsulatum*. **J Immunol**, v. 138, n. 2, p. 582-586, Jan 15 1987.

YIPP, B. G.; PETRI, B.; SALINA, D.; JENNE, C. N.; SCOTT, B. N. *et al.* Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. **Nat Med**, v. 18, n. 9, p. 1386-1393, Sep 2012.

YOUSEFF, B. H.; HOLBROOK, E. D.; SMOLNYCKI, K. A.; RAPPLEYE, C. A. Extracellular superoxide dismutase protects *Histoplasma* yeast cells from host-derived oxidative stress. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 5, p. e1002713, 2012.

ZARANKIEWICZ, T.; MADEJ, J.; GALLI, J.; BAJZERT, J.; STEFANIAK, T. Inhibition of in vitro *Histophilus somni* biofilm production by recombinant Hsp60 antibodies. **Pol J Vet Sci**, v. 15, n. 2, p. 373-378, 2012.