

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **Dissertação** será disponibilizado somente a partir de 22/09/2021.



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 miceliar, 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 histoplasmosse 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).

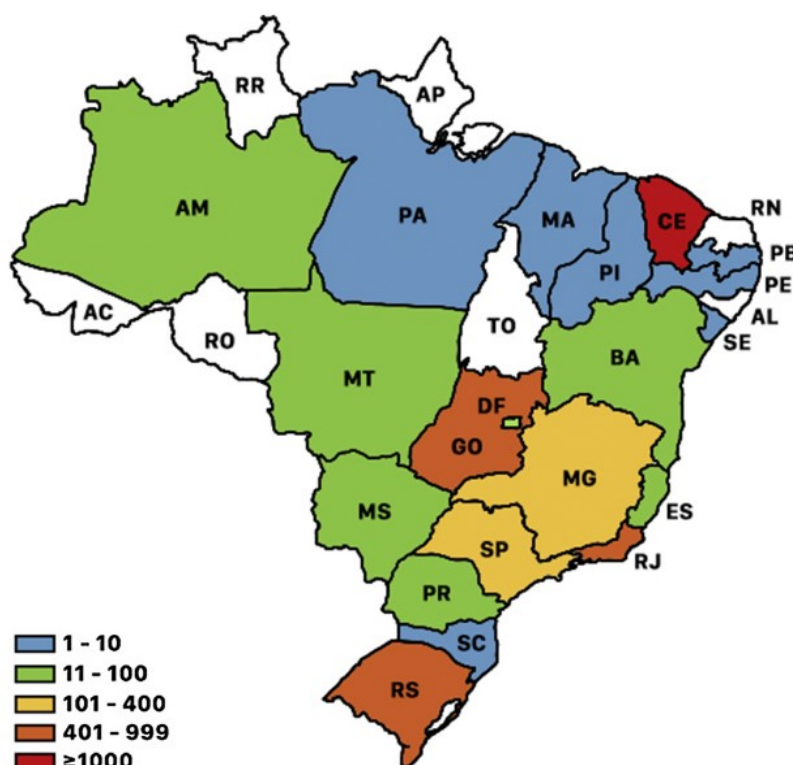
Geograficamente, o gênero *Histoplasma* possui a maior distribuição entre os fungos dimórficos, sendo globalmente encontrado (ANTINORI, 2014; ARMSTRONG *et al.*, 2018; GOMEZ *et al.*, 2019; MAIGA *et al.*, 2018; VALERO *et al.*, 2018). Casos de histoplasmose humana e em outros mamíferos já foram relatados 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*.

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.; RENAUP-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.