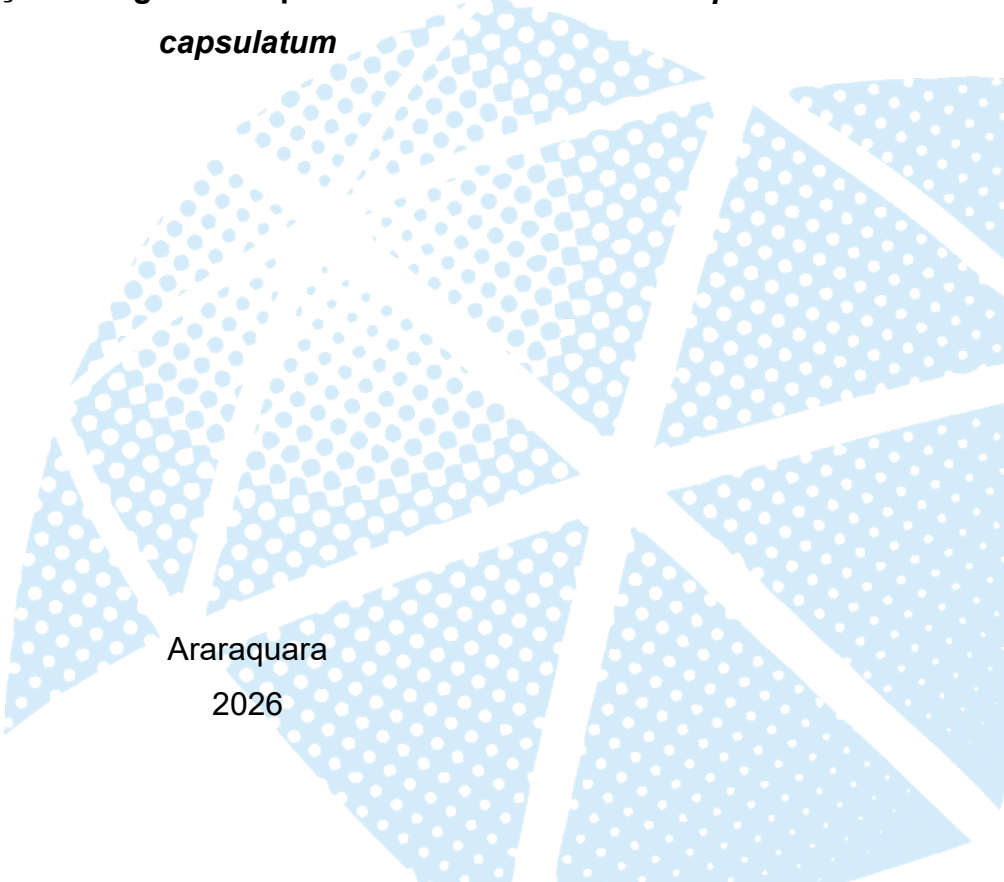


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

JÚLIA DEZOTTI

**Desenvolvimento e Validação de Modelo de Tecido Pulmonar Humano (3D)
para Estudo da Interação Patógeno-Hospedeiro de Biofilme de *Histoplasma*
*capsulatum***

Araraquara
2026



JÚLIA DEZOTTI

**Desenvolvimento e Validação de Modelo de Tecido Pulmonar Humano (3D)
para Estudo da Interação Patógeno-Hospedeiro de Biofilme de *Histoplasma
capsulatum***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentada à Universidade Estadual
Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências
Farmacêuticas, Araraquara, para obtenção
do título de Bacharela em Farmácia.

Orientadora: Prof. Dra. Ana Marisa Fusco
Almeida

Coorientadora: Dra. Samanta de Matos
Silva

Araraquara

2026

D532d Dezotti, Julia

Desenvolvimento e Validação de Modelo de Tecido Pulmonar Humano (3D) para Estudo da Interação Patógeno-Hospedeiro de Biofilme de *Histoplasma capsulatum* / Julia Dezotti. -- Araraquara, 2026

48 p.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Farmácia-Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara

Orientadora: Ana Marisa Fusco Almeida

Coorientadora: Samanta de Matos Silva

1. *Histoplasma capsulatum*. 2. Interação patógeno-hospedeiro. 3. Biofilmes. 4. Modelo tridimensional humano. I. Título.

Júlia Dezotti

**Desenvolvimento e Validação de Modelo de Tecido Pulmonar Humano (3D)
para Estudo da Interação Patógeno-Hospedeiro de Biofilme de *Histoplasma
capsulatum***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, para obtenção do título de Bacharela em Farmácia.

Data da defesa: 25/05/2026

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ana Marisa Fusco Almeida
UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Profa. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro
UNESP - FCF – Araraquara

Dra. Samanta de Matos Silva
UNESP - FCF – Araraquara

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus avós, Maria Celeste Consolin e José Dejalma Dezotti, que desde muito cedo me ensinaram que o conhecimento e a ciência transformam. Que me tornaram unespiana muito antes de qualquer vestibular. Que me deram asas para voar, mas sempre mantiveram as portas abertas para que eu pudesse retornar. E que me ensinaram, acima de tudo, que a maior riqueza da vida é a nossa família.

Ao meu namorado, Murilo Martins, agradeço por caminhar comigo há tantos anos e sempre se fazer presente. Obrigada pelo apoio incondicional, por acreditar em mim e nos meus sonhos e, principalmente, por dividir a vida comigo em todas as suas fases, com paciência, leveza e amor.

À República Breja-Flor, que me acolheu como lar e tornou essa jornada mais leve e especial, compartilhando sorrisos, aprendizados e apoio. Em especial, agradeço às minhas amigas Isabel Peleje e Camila Betti, por viverem intensamente essa graduação ao meu lado. Entre salas de aula, bibliotecas e anotações, dividimos sonhos, desafios, conquistas, e sobretudo, a vida e a construção de uma amizade que seguirá para além da universidade.

Ao meu querido amigo e parceiro de laboratório, Marco Antonio Rodrigues, por caminhar ao meu lado em todas as etapas deste projeto. Sua parceria, apoio constante e companheirismo diário fizeram toda a diferença durante essa jornada acadêmica e pessoal.

A toda a equipe do Núcleo de Proteômica, especialmente Kelvin, Rafaela, Willian, Gabriel, Cláudia e Ana Karla, agradeço pela ajuda, disponibilidade e colaboração, sempre em prol da ciência e produção coletiva de conhecimento.

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Ana Marisa Fusco Almeida, agradeço pela orientação, confiança e pela oportunidade de desenvolver este trabalho, além dos conselhos fundamentais para minha formação acadêmica e científica.

À minha coorientadora, Dra. Samanta de Matos Silva, minha mais sincera e profunda gratidão. Mais do que minha referência, foi uma grande amiga ao longo de toda essa jornada. Agradeço pela orientação, pelo suporte e incentivo contínuo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil. Processo nº 2023/08216-4.

RESUMO

A histoplasmose, uma Infecção Fúngica Invasiva (IFI), é ocasionada pelo fungo termodimórfico *Histoplasma capsulatum* que possui ampla distribuição mundial. Trata-se da quarta IFI com maior número de casos anuais, atingindo mais de 600 mil pessoas todos os anos. Nas duas últimas décadas as IFIs têm aumentado no mundo inteiro e o número de pacientes em risco tem crescido drasticamente. Recentemente, foi estabelecida uma correlação entre o modo de infecção de *H. capsulatum* e a formação de biofilmes, caracterizados por serem aglomerados celulares complexos, onde há produção de uma matriz extracelular que por si só confere proteção ao ambiente externo, que induzem, entre outros, a resistência antifúngica. A interação patógeno-hospedeiro de biofilmes de *H. capsulatum* é essencial para o estabelecimento da doença e necessita de estudos com modelos *in vitro* fidedignos ao observado em humanos. Dessa maneira, esse projeto de pesquisa tem como objetivo desenvolver e validar um modelo tridimensional de tecido pulmonar humano para estudo da interação patógeno-hospedeiro de biofilme de *H. capsulatum*, para futuramente caracterizar os mecanismos de virulência envolvidos na infecção. Para isso, desenvolveu-se um tecido pulmonar humano funcional composto pelo tri-cultivo de células Calu-3 (epiteliais de traqueia de pulmão humano) diferenciadas por *Air-Liquid Interface* (IAL), células MRC-5 (fibroblastos de pulmão humano) e THP-1 (monócitos humanos) diferenciados em macrófago-*like* para a construção de tecido estratificado *in vitro*. A validação do modelo tridimensional foi realizada por Microscopia Multiparamétrica Multifóton (MMM) para visualização da expansão celular ao longo do tempo de desenvolvimento do modelo, Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e a análise da diferenciação das células Calu-3 por RT-qPCR de genes característicos de cada subtipo celular (KRT5, TP63, MUC5AC, SCGB1A1, FOXJ1). Além disso, foi realizada a padronização da infecção do modelo por biofilmes de *H. capsulatum* através da quantificação da expressão de genes diferencialmente expressos já caracterizados pelo nosso grupo tanto do fungo (Hsp60, CatB, DDR48, GAPDH e CBP1) quanto das células hospedeiras (C3AR1, GNB2, PDCL, ITHB2, FERMT3, ACTB e NCKAP1L).

Palavras-chave: *Histoplasma capsulatum*; interação patógeno-hospedeiro; biofilmes; modelo tridimensional humano.

ABSTRACT

Histoplasmosis, an invasive fungal infection (IFI), is caused by the thermally dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*, which has a wide global distribution. It is the fourth most prevalent IFI in terms of annual cases, affecting more than 600,000 individuals worldwide each year. Over the past two decades, the incidence of IFIs has increased globally, accompanied by a drastic rise in the number of individuals at risk. Recently, a correlation has been established between the mode of *H. capsulatum* infection and biofilm formation. Biofilms are characterized as complex cellular aggregates in which the production of an extracellular matrix provides protection against the external environment and contributes, among other factors, to antifungal resistance. The pathogen–host interaction mediated by *H. capsulatum* biofilms is essential for disease establishment and requires studies using *in vitro* models that faithfully reproduce human conditions. Therefore, this research project aimed to develop and validate a three-dimensional human lung tissue model to investigate the pathogen–host interaction of *H. capsulatum* biofilms, with the future goal of characterizing the virulence mechanisms involved in infection. To this end, a functional human lung tissue was developed, consisting of a tri-culture of Calu-3 cells (human tracheal epithelial cells) differentiated under Air–Liquid Interface (ALI) conditions, MRC-5 cells (human lung fibroblasts), and THP-1 cells (human monocytes) differentiated into macrophage-like cells, enabling the construction of a stratified *in vitro* tissue. The validation of the three-dimensional model was performed using multiparametric multiphoton microscopy (MMM) to visualize cellular expansion throughout model development, transmission electron microscopy (TEM), and RT-qPCR analysis to assess the differentiation of Calu-3 cells through the expression of genes characteristic of each epithelial cell subtype (KRT5, TP63, MUC5AC, SCGB1A1, and FOXJ1). In addition, infection of the model with *H. capsulatum* biofilms was standardized by quantifying the expression of differentially expressed genes previously characterized by our group, including fungal genes (Hsp60, CatB, DDR48, GAPDH, and CBP1) as well as host cell genes (C3AR1, GNB2, PDCL, ITHB2, FERMT3, ACTB, and NCKAP1L).

Keywords: *Histoplasma capsulatum*; pathogen–host interaction; biofilms; human three-dimensional model.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hidrogel de colágeno tipo I em ampliação de 25.000X.	26
Figura 2. Hidrogel de colágeno tipo I com MRC-5 no primeiro dia de formação do modelo pulmonar 3D. Ampliação de 7.500X.	26
Figura 3. Modelo pulmonar tridimensional humano observado usando Microscopia Multiparamétrica Multifóton (MMM) ao longo de 21 dias. Ampliação de 40X.	27
Figura 4. Quantificação da ocupação celular do modelo pulmonar tridimensional humano nos dias 7, 14 e 21.	31
Figura 5. Gel de agarose sob luz UV revelando a padronização dos genes de células epiteliais.	32
Figura 6. Gel de agarose sob luz UV revelando a padronização dos genes humanos.	33
Figura 7. Gel de agarose sob luz UV revelando a padronização dos genes de <i>H. capsulatum</i>	33
Figura 8. Gel de agarose sob luz UV revelando a padronização dos genes de <i>H. capsulatum</i>	34
Figura 9. Expressão do gene KRT5 do modelo pulmonar tridimensional humano após 11, 14 e 21 dias de formação.	35
Figura 10. Expressão do gene TP63 do modelo pulmonar tridimensional humano após 11, 14 e 21 dias de formação.	35
Figura 11. Expressão do gene MUC5AC do modelo pulmonar tridimensional humano após 11, 14 e 21 dias de formação.	36
Figura 12. Expressão do gene SCGB1A1 do modelo pulmonar tridimensional humano após 11, 14 e 21 dias de formação.	36
Figura 13. Controle de leveduras de <i>H. capsulatum</i> antes da infecção corado com Calco Fluor White Stain (CFW).	38
Figura 14. Leveduras de <i>H. capsulatum</i> com múltiplos brotamentos.	39
Figura 15. Modelo pulmonar tridimensional humano infectado com <i>H. capsulatum</i> na forma de levedura durante 24 horas.	40
Figura 16. Expressão de genes de leveduras planctônicas de <i>H. capsulatum</i> bloqueadas com anticorpo anti-Hsp60 durante a infecção do modelo pulmonar tridimensional humano.	41

Figura 17. Expressão de genes de leveduras derivadas de biofilme de <i>H. capsulatum</i> sem bloqueio com anticorpo anti-Hsp60 durante a infecção do modelo pulmonar tridimensional humano.	42
Figura 18. Expressão de genes de leveduras derivadas de biofilme de <i>H. capsulatum</i> bloqueadas com anticorpo anti-Hsp60 durante a infecção do modelo pulmonar tridimensional humano.	42
Figura 19. Expressão de genes humanos durante a infecção com leveduras de <i>H. capsulatum</i> planctônicas bloqueadas com mAb 7B6.	44
Figura 20. Expressão de genes humanos durante a infecção com leveduras de <i>H. capsulatum</i> derivadas de biofilme sem bloqueio.	45
Figura 21. Expressão de genes humanos durante a infecção com leveduras de <i>H. capsulatum</i> derivadas de biofilme bloqueadas com mAb 7B6.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos primers de genes de células epiteliais pulmonares.	21
Tabela 2. Sequência dos primers de genes humanos.	21
Tabela 3. Sequência dos primers de genes de <i>H. capsulatum</i>	22
Tabela 4. Número de células no dia 7 de desenvolvimento do modelo.	28
Tabela 5. Número de células no dia 14 de desenvolvimento do modelo.	29
Tabela 6. Número de células no dia 21 de desenvolvimento do modelo.	29

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	METODOLOGIA.....	18
2.1	CULTURA DE CÉLULAS.....	18
2.2	DESENVOLVIMENTO DO MODELO DE TECIDO PULMONAR 3D.....	18
2.3	CULTIVO DE CEPAS DE <i>H. capsulatum</i> E FORMAÇÃO DE BIOFILME..	19
2.4	MICROSCOPIA MULIPARAMÉTRICA MULTIFÓTON (MMM)	20
2.5	PADRONIZAÇÃO DOS PRIMERS	21
2.6	QUANTIFICAÇÃO DE GENES POR RT-qPCR.....	22
2.6.1	Extração de RNA do modelo tridimensional	22
2.6.2	PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR).....	23
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
3.1	DESENVOLVIMENTO DO MODELO TRIDIMENSIONAL PULMONAR HUMANO	24
3.2	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	25
3.3	MICROSCOPIA MULTIPARAMÉTRICA MULTIFÓTON (MMM)	27
3.4	PADRONIZAÇÃO DOS PRIMERS PARA RT-qPCR.....	31
3.5	CARACTERIZAÇÃO DO TECIDO PULMONAR HUMANO POR RT- qPCR.	34
3.6	CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO DO TECIDO PULMONAR HUMANO COM <i>H. capsulatum</i> PLANCTÔNICO E BIOFILME POR MMM.....	38
3.7	CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO POR RT-qPCR DO TECIDO PULMONAR HUMANO INFECTADO.....	40
4	CONCLUSÃO.....	48
	REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

As Infecções Fúngicas Invasivas (IFIs) têm recebido atenção crescente da comunidade científica, especialmente nas últimas décadas, em função do aumento expressivo de indivíduos imunocomprometidos e da ampliação do uso de terapias imunossupressoras (Bongomin, 2017; Mihu; Nosanchuk, 2012). Nesse cenário, a histoplasmose se destaca como uma das IFIs de maior relevância epidemiológica (WHO, 2022). Essa infecção é causada pelo fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum*, amplamente distribuído no ambiente e cuja principal via de infecção ocorre pela inalação de propágulos fúngicos (Ridell; Wheat, 2019).

Estima-se que a histoplasmose seja responsável por mais de 600 mil novos casos ao ano, estando entre as quatro IFIs mais incidentes globalmente (Bongomin, 2017; Mihu; Nosanchuk, 2012). A doença apresenta um espectro clínico bastante variável, podendo manifestar-se de forma assintomática ou evoluir para quadros disseminados graves, especialmente em indivíduos com sistema imunológico comprometido (Ridell; Wheat, 2019). Paralelamente, observa-se um aumento consistente da incidência das IFIs ao longo das últimas duas décadas, o que reforça a necessidade de aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na patogenicidade desses fungos (WHO, 2022).

Nos últimos anos, evidências têm demonstrado que a infecção por *H. capsulatum* não se restringe à forma planctônica do fungo. Estudos indicam que a capacidade de formar biofilmes desempenha um papel relevante no estabelecimento e persistência da infecção no hospedeiro (Fregonezi et al., 2020; Pitangui et al., 2012; Pitangui et al., 2021). Os biofilmes são estruturas complexas, organizadas em comunidades celulares envoltas por uma matriz extracelular, a qual confere proteção contra fatores ambientais adversos e contribui para o aumento da resistência aos antifúngicos (Karygianni et al., 2020). Além disso, a formação de biofilmes está associada à modulação da resposta imune do hospedeiro, favorecendo a sobrevivência do fungo (Pitangui et al., 2021; Cohen et al., 2021).

Dessa forma, nosso grupo de pesquisa acredita que a interação patógeno-hospedeiro mediada por biofilmes de *H. capsulatum* constitui um aspecto central para a compreensão de infecções causadas por este fungo. Para isso, desenvolver novos modelos de estudos *in vitro* que permitam estudos em larga escala e reprodutibilidade são necessários. Atualmente, grande parte dos estudos

disponíveis ainda utiliza modelos animais *in vivo*, os quais apresentam limitações importantes, como diferenças fisiológicas em relação ao tecido humano, além de questões éticas e dificuldades de padronização experimental (Kletting, 2018; Kabadi et al., 2019).

Nesse contexto, modelos tridimensionais (3D) de tecido pulmonar humano *in vitro* têm emergido como alternativas promissoras para o estudo de infecções respiratórias, uma vez que permitem uma reconstrução mais próxima da arquitetura tecidual humana quando comparados aos modelos em monocamada bidimensionais (2D), além de possibilitarem a análise das interações celulares em um ambiente mais controlado e reprodutível (Derakhshani et al., 2019; Kabadi et al., 2019). Entre esses sistemas, os modelos baseados em cultura em Interface Ar-Líquido (IAL) têm se destacado por favorecerem a diferenciação funcional das células epiteliais pulmonares, permitindo a formação de células basais, produtoras de muco e ciliadas, o que se aproxima das condições fisiológicas observadas *in vivo* (Jonsdottir; Dijkman, 2016; Bukowy-Bieryłło et al., 2022). Essa abordagem torna-se particularmente relevante ao se considerar a complexidade das respostas celulares desencadeadas no tecido pulmonar durante a infecção por *H. capsulatum*. O epitélio respiratório atua não apenas como uma barreira física, mas também como um componente ativo da resposta imune inata, participando da sinalização inflamatória e da comunicação com células imunológicas, como macrófagos e fibroblastos (Jonsdottir; Dijkman, 2016). Nesse sentido, modelos tridimensionais que preservam a organização espacial dessas diferentes populações celulares permitem uma análise mais fiel dos eventos iniciais da infecção, incluindo processos de adesão, invasão e modulação da resposta do hospedeiro. A possibilidade de avaliar essas interações em um ambiente controlado é especialmente relevante para fungos dimórficos como *H. capsulatum*, cujas alterações morfológicas e metabólicas estão diretamente associadas à adaptação ao hospedeiro humano e ao estabelecimento da infecção (Edwards et al., 2013).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um modelo tridimensional de tecido pulmonar humano, composto pelo tri-cultivo de células Calu-3 (células epiteliais de traqueia de pulmão humano) diferenciadas por IAL, células MRC-5 (fibroblastos de pulmão humano) e células THP-1 (monócitos humanos) diferenciadas em macrófagos-*like* utilizando PMA, visando à construção de

um tecido estratificado *in vitro* para avaliar a infecção por células planctônicas e biofilmes de *H. capsulatum*.

A validação do modelo proposto foi conduzida a partir da avaliação de parâmetros estruturais e funcionais do tecido desenvolvido, como a análise da interação entre as células e o hidrogel de colágeno através de Microscopia de Transmissão Eletrônica (MET), caracterização da expansão celular no modelo e infecção através de Microscopia Multiparamétrica Multifóton (MMM), quantificação da expressão gênica das células Calu-3 diferenciada por IAL através de RT-qPCR e caracterização da infecção do modelo com biofilmes e formas plactônicas de *H. capsulatum* através de RT-qPCR de genes referentes ao fungo e que estão diferencialmente expressos em biofilmes, e de genes das células hospedeiras.

Essa abordagem permite uma validação robusta e reprodutível do sistema proposto, oferecendo um modelo experimental mais próximo da fisiologia humana para o estudo da histoplasmose.

2 METODOLOGIA

2.1 CULTURA DE CÉLULAS

A linhagem MRC-5 é composta por fibroblastos humanos derivados de tecido pulmonar normal de feto masculino com 14 semanas de gestação. Essas células foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, conforme protocolos padrão de cultivo celular.

As células THP-1 consistem em uma linhagem de monócitos humanos obtidos a partir de sangue periférico de paciente com leucemia monocítica aguda. Para cultivo, foram utilizadas condições em meio RPMI, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e 1% de GlutaMAX. A diferenciação dos monócitos em macrófagos-like foi induzida pelo tratamento com florbol-12-miristato-13-acetato (PMA; Sigma-Aldrich) na concentração de 30 nM, durante 24 h, conforme descrito previamente (Uberti et al., 2021).

As células Calu-3 correspondem a uma linhagem epitelial de traqueia humana, originalmente derivada de um adenocarcinoma pulmonar de um indivíduo adulto. Para manutenção, essas células foram cultivadas em meio DMEM High Glucose, suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino. A diferenciação epitelial foi realizada por meio da cultura em Interface Ar-Líquido (IAL), utilizando o meio PneumaCult™ ALI-S (StemCell Technologies, 5050), suplementado com heparina (StemCell Technologies, 7980) e hidrocortisona (StemCell Technologies, 7925), de acordo com as recomendações do fabricante.

Todas as linhagens celulares foram mantidas em incubadora a 37 °C, sob atmosfera controlada contendo 5% de CO₂.

2.2 DESENVOLVIMENTO DO MODELO DE TECIDO PULMONAR 3D

O modelo pulmonar tridimensional humano foi desenvolvido com base em protocolos previamente descritos na literatura (Kletting et al., 2018; Kabadi et al., 2019; Derakhshani et al., 2019; Uberti et al., 2023), com adaptações, utilizando a proporção celular de 3:3:1 (MRC-5: Calu-3: THP-1). Inicialmente, as células MRC-5 e THP-1 foram ressuspensas em 100 µL de solução de colágeno de fibroblastos humanos (Sigma-Aldrich) e distribuídas em camadas sucessivas em insertos ThinCert™

contendo poros de 0,4 μm (Greiner Bio-One), totalizando sete camadas. Cada camada foi incubada por 40 min em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO_2 , a fim de permitir a polimerização do colágeno. Após a completa polimerização do scaffold, as células Calu-3 foram adicionadas ao sistema e mantidas sob as mesmas condições de incubação. Em seguida, meio de cultura composto por DMEM (apropriado para cultivo das células MRC-5), PneumaCult ALI-S com hidrocortisona 96 $\mu\text{g/mL}$ e heparina 2mg/mL (apropriado para cultivo das células Calu-3) e RPMI (apropriado para cultivo das células THP-1), na proporção de 3:3:1, foi adicionado ao compartimento interno e externo dos insertos. O modelo permaneceu em condição de cultura submersa até que as células Calu-3 alcançassem aproximadamente 80% de confluência, entre dois e três dias. Posteriormente, o meio do compartimento interno foi removido e as células Calu-3 foram submetidas à diferenciação em cultura *Air-Liquid Interface* (ALI) por um período de 11 a 28 dias (Jonsdottir; Dijkman, 2016; Uberti et al., 2023).

2.3 CULTIVO DE CEPAS DE *H. capsulatum* E FORMAÇÃO DE BIOFILME

As linhagens de *H. capsulatum* utilizadas neste estudo corresponderam às cepas EH-315 e Hc 1980. A cepa EH-315 foi originalmente isolada do trato intestinal de um morcego da espécie *Mormoops megalophylla*, capturado em uma caverna localizada no estado de Guerrero, México, sendo caracterizada como um isolado de elevada virulência. Essa linhagem foi gentilmente cedida pela Prof.^a Dra. Maria Lúcia Taylor, responsável pelo Laboratório de Imunologia de Fungos do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Faculdade de Medicina da Universidade Nacional Autônoma do México (UNAM). A cepa Hc 1980 foi obtida a partir de hemocultura de um paciente colombiano portador de HIV e histoplasmose disseminada, tendo sido cedida pelo Prof. Dr. Ángel González, da Universidade de Antioquia (UdeA, Colômbia).

Ambas as cepas foram mantidas inicialmente em meio ágar Brain Heart Infusion (BHI), suplementado com L-cisteína e glicose, incubadas a 37°C por um período de 96 horas. Posteriormente, as leveduras foram cultivadas em meio HAM's F-12 Nutrient Mixture (HAM F-12; Gibco), suplementado com glicose (18,2 g/L), ácido glutâmico (1 g/L), HEPES (6 g/L) e L-cisteína (8,4 mg/L), sendo mantidas sob agitação constante de 150 rpm a 37 °C por 72 h, conforme descrito previamente (Baltazar et al., 2018).

A formação dos biofilmes foi conduzida de acordo com o protocolo descrito por Gonçalves et al. (2020). Inicialmente, as leveduras foram cultivadas por 72 h em meio HAM-F12, sob agitação de 150 rpm a 37 °C. Em seguida, as células fúngicas foram adicionadas em tampão fosfato-salino (PBS), e a concentração da suspensão foi ajustada para 5×10^6 leveduras/mL em HAM-F12, por meio de contagem em Câmara de Neubauer. Para a indução da formação do biofilme, 200 µL do inóculo preparado foram adicionados a cada poço de placas de 96 poços, enquanto 500 µL por poço foram utilizados em placas de 24 poços. As placas foram incubadas a 37 °C por 12 h, permitindo a pré-adesão das células fúngicas. Após esse período, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e substituído por meio RPMI 1640, sendo adicionados 200 µL/poço nas placas de 96 poços e 500 µL/ poço nas placas de 24 poços. As culturas foram então incubadas por um período total de 144 h para a formação do biofilme maduro. O crescimento planctônico das leveduras de *H. capsulatum* foi realizado paralelamente em frascos Erlenmeyer estéreis de vidro com volume de 50 mL, sob as mesmas condições de temperatura, suplementação nutricional e tempo de incubação.

2.4 MICROSCOPIA MULIPARAMÉTRICA MULTIFÓTON (MMM)

Para as análises de Microscopia Multiparamétrica Multifóton (MMM), leveduras de *H. capsulatum* planctônico e derivadas de biofilme foram submetidas a um procedimento de coloração utilizando Calco Fluor White Stain (CFW) (Sigma-Aldrich), seguindo as orientações do fabricante.

O modelo tridimensional de tri-cultivo celular foi corado com Alexa 647 conjugado com Faloidina (Thermo Fisher®, A22287), seguindo as orientações do fabricante.

Para a realização do ensaio de infecção, o modelo de tecido epitelial pulmonar foi infectado com leveduras de *H. capsulatum* previamente coradas com Calcofluor White (CFW), utilizando uma multiplicidade de infecção (MOI) de 1:10. Após 24 h de incubação em estufa a 37 °C, o modelo foi fixado por meio de uma solução contendo 4% de paraformaldeído e 0,125% de glutaraldeído em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4). Em seguida, as amostras foram submetidas a sucessivas lavagens com D-PBS e permeabilizadas com Triton X-100 por 30 min. em RT, seguidas de novas lavagens com D-PBS. Posteriormente, as células do modelo foram

coradas com Faloidina conjugada com Alexa 647 (Thermo Fisher Scientific®), sendo incubadas por um período de 1 h. As amostras foram lavadas 5 vezes com D-PBS para aquisição das imagens.

As análises de imagem foram realizadas utilizando o Microscópio Multifóton ZEISS LSM 780, localizado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP). Para o processamento das imagens, foram empregados os softwares Zen Blue versão 3.2 e FIJI.

2.5 PADRONIZAÇÃO DOS PRIMERS

Os primers utilizados nas reações de RT-qPCR para amplificação dos genes KRT5 e TP63 (células basais), MUC5AC e SCGB1A1 (células produtoras de muco), FOXJ1 (células ciliadas) (Tabela 1), C3AR1, GNB2, PDCL, ITHB2, FERMT3, ACTB e NCKAP1L (genes humanos) (Tabela 2) e Hsp60, CatB, DDR48, GAPDH e CBP1 (genes do fungo) (Tabela 3) foram padronizados por PCR convencional, avaliando-se diferentes concentrações (0,2µM e 0,5µM). Para genes humanos, a amostra de DNA utilizada foi extraída de células MRC-5, e para genes do fungo, a amostra de DNA utilizada foi extraída de *H. capsulatum* planctônico.

Tabela 1. Sequência dos primers de genes de células epiteliais pulmonares.

Gene	Primer Forward	Primer Reverse
KRT5	ACCAGGAGCTCATGAACACC	ACTGAGTCTGCATTCCTCGC
TP63	GTACAGGCAACAGCAACAGC	TTTGTTTCAGAGGTGGGGAGC
MUC5AC	CGCTTGTCGTGAGCTCCACG	CAGCACTGGACCCTGATCTG
SCGB1A1	CCTCCAGTTATGAGGCTGCC	TTTCTCTGGGCTTTTGGGGG
FOXJ1	TGTCGGCCATCTACAAGTGG	TTCAGAGACAGGTTGTGGCG

Fonte: Autoria própria (2024).

Tabela 2. Sequência dos primers de genes humanos.

Gene	Primer Forward	Primer Reverse
C3AR1	CCATTAGCCTGGATCGCTGT	ATCACAAAAGCCACCACCCA
GNB2	CTGGACACAGTGGGGATGTG	GGTCTGTCGGCACATGGAA
PDCL	GCAGGTCCCATCTGGATGAA	TGGCAAACCTCCTTCAGAGTCA
ITHB2	CCCTCAACGAGATCACCGAG	GGCTGGCACTCTTTCTCCTT

FERMT3	TGAGCAAGGTTGTCTTGGCT	CTGTCCGAGAAGTGAGCTGG
ACTB	CCTGAAGTACCCCATCGAGC	TGTAGAAGGTGTGGTGCCAG
NCKAP1L	GCCTGGGTATAGCTGTTGCT	AGCGCAGAAAAGGGCTAAGT

Fonte: Aatoria própria (2024).

Tabela 3. Sequência dos primers de genes de *H. capsulatum*.

Gene	Primer Forward	Primer Reverse
Hsp60	GTTTGCACAACACTCGGTCC	AACAGTGACACCGTCCTTGG
CatB	CGGTGCTGGACAAATGTT	AGACCGTGAGTGAGTTGTA
DDR48	GACAATACTACCACCTATGGGTCTAA	CTTATCAGCGATGGTTTCCTTCTG
GAPDH	AACGACCCCTTCATTGAC	TCCACGACATACTCAGCAC
CBP1	CTCCAAGGTTATCGCTCC	GCAGTAGCAGCGCAAGCG

Fonte: Aatoria própria (2024).

Os primers foram ressuspendidos em água DPEC numa proporção 1:20. Para cada um dos primers e suas concentrações, adicionamos ao PCR Mix: dNTP (1 µL), Buffer (5 µL), Taq (0,25 µL), amostra de DNA (0,60µL), Primer Reverse (1µL), Primer Forward (1µL) e água DPEC para completar 50µL. Como controle negativo, utilizamos o PCR Mix sem adição dos primers, e como controle positivo, amostra de DNA e água.

Os microtubos foram alocados no termociclador, ajustando a temperatura de melting (Tm) conforme previamente padronizada pelo fornecedor. A corrida durou cerca de 2 horas e 15 min.

Para visualização, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose 2,5%, a 100V por 60 min. O gel de agarose foi mergulhado em brometo de etídio com intercalante de DNA por 40 min., e posteriormente, os resultados foram revelados através do transiluminador.

2.6 QUANTIFICAÇÃO DE GENES POR RT-QPCR

2.6.1 Extração de RNA do modelo tridimensional

A extração de RNA foi realizada em modelos com 3, 11, 14 e 21 dias de desenvolvimento, infectados e não infectados utilizando o método Tryzol/clorofórmio. Para cada modelo, foi adicionado 1mL de Trizol® (Thermo Scientific) e incubado por

5 min. para completa dissociação. Depois disso, foi adicionado 200 µL de clorofórmio e centrifugado a 12000rpm por 15 min. Isolou-se a fase aquosa (porção superior) e repetiu-se a adição de clorofórmio, centrifugação e separação. Adicionou-se 500 µL de isopropanol à fase aquosa, deixou-se incubado por 10 min. a 4°C e centrifugou-se a 12000 rpm por 10min. O isopropanol da amostra foi descartado e 1mL de etanol foi adicionado. A amostra foi levada ao vórtex brevemente e depois centrifugada por 7 min a 12000rpm. Então, o etanol foi descartado e aguardou-se 10 min. para que o restante de etanol evaporasse. Por fim, o precipitado restante foi ressuspenso em 35 µL de água DPEC.

2.6.2 PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR)

Inicialmente, as amostras de RNA foram tratadas com DNase, utilizando 1 µL de DNase I, 1 µL de Buffer 10x e 8 µL de RNA. Para a reação de RT-qPCR, utilizou-se o kit QuantiNOVA® SYBR Green (QIAGEN) e o termociclador Applied Biosystems 7500 cyclor. Todos os dados foram analisados por $2^{-\Delta\Delta CT}$. O experimento foi realizado em duplicata para cada um dos genes avaliados.

Foram realizadas quantificações por RT-qPCR do modelo infectado por *H. capsulatum* bloqueado com anticorpo anti-HSP60. O anticorpo monoclonal Hsp60 mAb 7B6 foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Allan Jeferson Guimarães da Universidade Federal Fluminense (UFF).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DESENVOLVIMENTO DO MODELO TRIDIMENSIONAL PULMONAR HUMANO

A histoplasmose, cujo principal mecanismo de transmissão ocorre pela inalação de esporos, ocorre inicialmente nas pequenas vias aéreas do pulmão, especialmente nos bronquíolos terminais e alvéolos, onde o fungo *H. capsulatum* interage com o epitélio respiratório e é fagocitado por macrófagos, nos quais sobrevive e se prolifera no interior do fagolisossomo (Marc et al., 2023; Horwath; Fecher; Deepe Jr., 2015). Considerando o mecanismo da patogênese, o desenvolvimento do tecido foi estruturado de forma a incorporar os três principais tipos celulares envolvidos no processo: macrófagos, fibroblastos e células epiteliais. Para representar os macrófagos escolheu-se a linhagem celular THP-1 diferenciada em células macrófago-*like* por meio de tratamento com PMA, para os fibroblastos empregou-se a linhagem celular MRC-5 e para a camada epitelial selecionou-se a linhagem Calu-3 diferenciada através de IAL.

Ao examinar as interações hospedeiro-patógeno no epitélio das vias aéreas, torna-se essencial avaliar as propriedades de permeação desta interface protetora (Bals et al., 2012). Esta avaliação é crucial para uma compreensão abrangente de como patógenos e células hospedeiras interagem dentro do ambiente pulmonar e para elucidar os mecanismos subjacentes às infecções respiratórias e doenças relacionadas (Bals et al., 2012). As células epiteliais pulmonares desempenham um papel fundamental ao servir como a principal barreira física dentro do pulmão. Elas constituem a primeira linha de defesa contra patógenos inalados, partículas e fatores ambientais, protegendo assim o sistema respiratório de possíveis ameaças. Neste contexto, a linha celular Calu-3 demonstrou habilidade em fornecer diferenciação celular quando cultivada em IAL, apresentando resultados positivos que permitem sua utilização em estudos de longo prazo. As células Calu-3 são caracterizadas como células epiteliais pulmonares originadas de adenocarcinoma, tornando-as uma linha celular compatível para o desenvolvimento de modelos tridimensionais e capazes de diferenciar-se em uma IAL com a presença de células com microvilosidades e múltiplas vesículas secretoras de mucina, consistentes com o epitélio pulmonar (Kreft et al., 2015; Sanchez-Guzman et al., 2021).

Na busca pelo desenvolvimento do modelo proposto, ficou evidente que o colágeno Tipo I de origem humana surgiu como o substrato ótimo e mais compatível para a construção desse modelo pulmonar tridimensional humano.

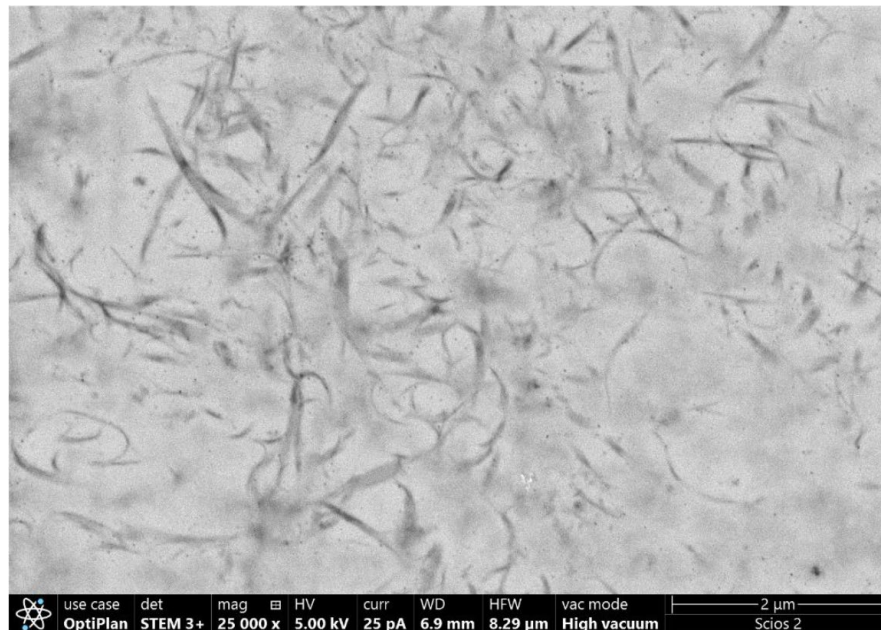
Para estabelecer nosso modelo de tecido epitelial pulmonar 3D, as células MRC-5 e THP-1 foram suspendidas em uma solução de colágeno Tipo I, e posteriormente, colocadas gentilmente inserto, permitindo que cada uma das sete camadas polimerizasse por um período de 40 min. Esta abordagem layer-by-layer foi empregada na construção do nosso modelo pulmonar humano 3D após várias experimentações. Na etapa final do desenvolvimento do nosso modelo, uma suspensão de células Calu-3 foi adicionada sobre o hidrogel de colágeno contendo células MRC-5 e THP-1 semelhantes a macrófagos. Após três dias, o modelo foi transferido para um sistema de cultura IAL e mantido neste estado por um período de 28 a 30 dias.

Após o desenvolvimento, o tecido foi validado utilizando MET, MMM e RT-qPCR.

3.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

A análise por MET foi conduzida em amostras do modelo pulmonar tridimensional humano no primeiro dia de desenvolvimento para possibilitar a visualização do colágeno tipo I antes da proliferação celular, conforme Figuras 1 e 2. A Figura 1 representa o hidrogel de colágeno tipo I ampliado em 25.000 vezes. A imagem revela numerosas fibras de colágeno distribuídas de forma desorganizada pelo campo do microscópio. A presença de pequenos pontos pretos sugere que algumas fibras de colágeno que foram acidentalmente cortadas durante a preparação da amostra.

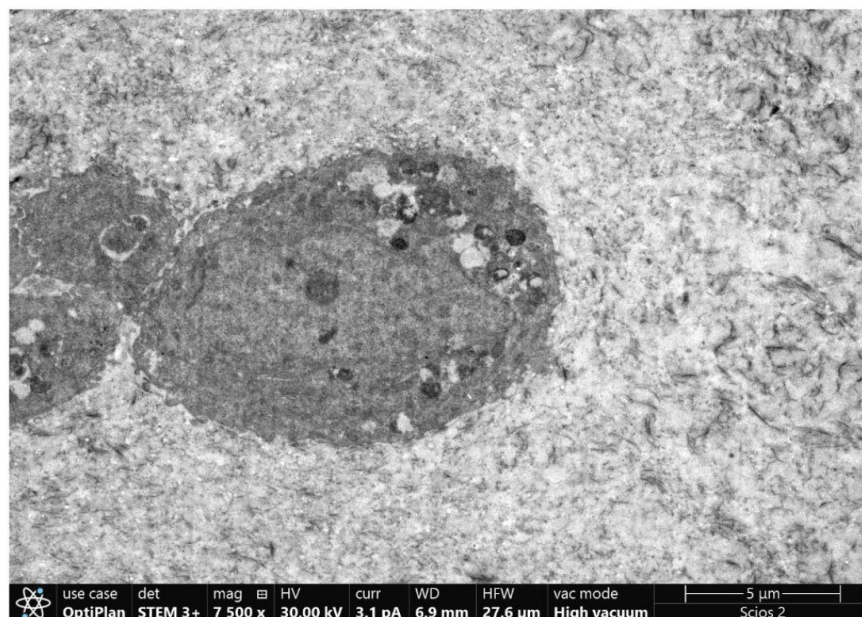
Figura 1. Hidrogel de colágeno tipo I em ampliação de 25.000X.



Fonte: Autoria própria (2024).

Na Figura 2, a interação entre as células MRC-5 e o hidrogel de colágeno tipo I é evidente, com células imersas em uma matriz extracelular abundante onde se destacam as fibras de colágeno desorganizadas, como demonstrado previamente na Figura 1.

Figura 2. Hidrogel de colágeno tipo I com MRC-5 no primeiro dia de formação do modelo pulmonar 3D. Ampliação de 7.500X.



Fonte: Autoria própria (2024).

Apesar da linha celular MRC-5 ser caracterizada como fibroblastos pulmonares humanos com uma morfologia extremamente alongada, observa-se uma morfologia menos alongada e mais arredondada no primeiro dia do desenvolvimento do modelo pulmonar tridimensional humano (Figura 2) em comparação com as células cultivadas em monocamada. Também é possível que essa morfologia represente de forma imprecisa a morfologia geral das células devido ao processamento da amostra antes da imagem, que incluiu cortes verticais no tecido.

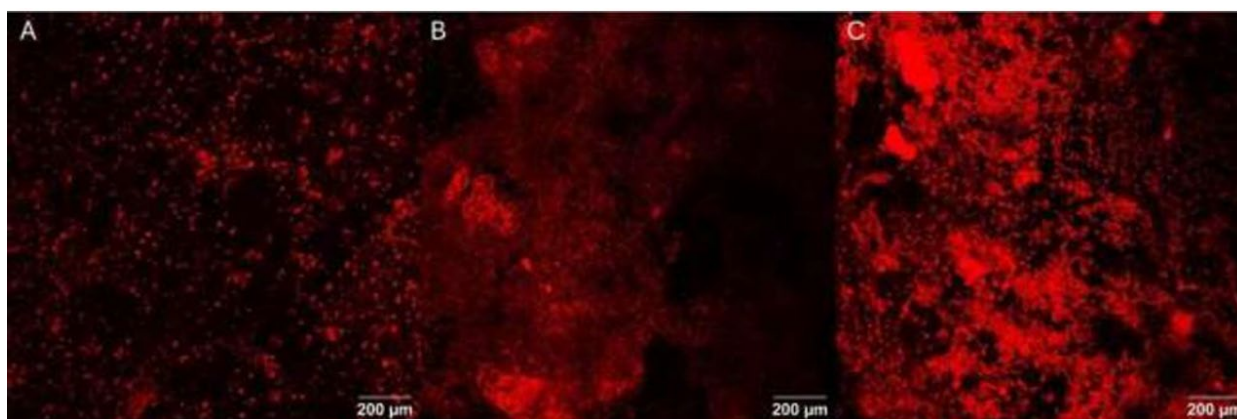
3.3 MICROSCOPIA MULTIPARAMÉTRICA MULTIFÓTON (MMM)

A captura de imagens por MMM foi realizada no 7º, 14º e 21º dias após o desenvolvimento do modelo pulmonar tridimensional humano utilizando tri-cultivo celular (MRC-5, THP-1 e Calu-3), conforme Figura 3.

A Figura 3 mostra as imagens 3D do modelo durante este período. Uma notável expansão celular é evidente no dia 14 em comparação com o dia 7, seguida de uma redução no número de células no dia 21. Embora seja possível visualizar células no modelo de tecido, não foi observada diferenciação celular da linha celular Calu-3 no MMM, sendo necessária a confirmação por RT-qPCR.

Figura 3. Modelo pulmonar tridimensional humano observado usando Microscopia Multiparamétrica Multifóton (MMM) ao longo de 21 dias. Ampliação de 40X.

(A) Modelo com 7 dias de desenvolvimento. **(B)** Modelo com 14 dias de desenvolvimento. **(C)** Modelo com 21 dias de desenvolvimento.



Fonte: Autoria própria (2024).

Com o objetivo de avaliar o desenvolvimento do tecido ao longo dos dias, foi realizada uma análise quantitativa do número de partículas através do software FIJI

para avaliação da proliferação celular ao longo das diferentes camadas do modelo desenvolvido.

Apresentamos a seguir, os dados brutos coletados a partir dos *big data* gerados pela MMM. Nas tabelas 4 (dia 7 do desenvolvimento), 5 (dia 14 do desenvolvimento) e 6 (dia 21 do desenvolvimento) estão representados a proliferação celular ao longo do tempo em cada camada do tecido pulmonar.

Tabela 4. Número de células no dia 7 de desenvolvimento do modelo.

Slice	Count	Total Area	Average size	% Area	Mean
c:1/2 z:1/28 - Image 2 #1	234546	74047154	0.316	2994	255
c:1/2 z:2/28 - Image 2 #1	261667	93804366	0.358	3793	255
c:1/2 z:3/28 - Image 2 #1	302269	117353474	0.388	4746	255
c:1/2 z:4/28 - Image 2 #1	337986	136115967	0.403	5504	255
c:1/2 z:5/28 - Image 2 #1	366969	151906021	0.414	6143	255
c:1/2 z:6/28 - Image 2 #1	393134	166126271	0.423	6718	255
c:1/2 z:7/28 - Image 2 #1	414390	178927168	0.432	7236	255
c:1/2 z:8/28 - Image 2 #1	437100	192770694	0.441	7796	255
c:1/2 z:9/28 - Image 2 #1	450882	204786775	0.454	8281	255
c:1/2 z:10/28 - Image 2 #1	446346	208614343	0.467	8436	255
c:1/2 z:11/28 - Image 2 #1	442080	206922183	0.468	8368	255
c:1/2 z:12/28 - Image 2 #1	439648	201943242	0.459	8166	255
c:1/2 z:13/28 - Image 2 #1	437101	194138692	0.444	7851	255
c:1/2 z:14/28 - Image 2 #1	433722	185917951	0.429	7518	255
c:1/2 z:15/28 - Image 2 #1	430771	176526365	0.410	7139	255
c:1/2 z:16/28 - Image 2 #1	422676	166799241	0.395	6745	255
c:1/2 z:17/28 - Image 2 #1	412271	158311381	0.384	6402	255
c:1/2 z:18/28 - Image 2 #1	401629	150030667	0.374	6067	255
c:1/2 z:19/28 - Image 2 #1	394528	142054471	0.360	5745	255
c:1/2 z:20/28 - Image 2 #1	386609	133828388	0.346	5412	255
c:1/2 z:21/28 - Image 2 #1	376012	124859368	0.332	5049	255
c:1/2 z:22/28 - Image 2 #1	362159	115931363	0.320	4688	255
c:1/2 z:23/28 - Image 2 #1	406426	128503226	0.316	5197	255
c:1/2 z:24/28 - Image 2 #1	398419	120923745	0.304	4890	255

Fonte: Autoria própria (2024).

Tabela 5. Número de células no dia 14 de desenvolvimento do modelo.

Slice	Count	Total Area	Average size	% Area	Mean
c:1/2 z:1/21 - Image 7 #1	641963	214.849.954	0.335	8688	255
c:1/2 z:2/21 - Image 7 #1	600899	224.810.075	0.374	9091	255
c:1/2 z:3/21 - Image 7 #1	458473	199.653.768	0.435	8074	255
c:1/2 z:4/21 - Image 7 #1	345420	195.735.895	0.567	7915	255
c:1/2 z:5/21 - Image 7 #1	314147	242.464.966	0.772	9805	255
c:1/2 z:6/21 - Image 7 #1	304771	296.629.966	0.973	11996	255
c:1/2 z:7/21 - Image 7 #1	315436	355.079.908	1.126	14359	255
c:1/2 z:8/21 - Image 7 #1	347544	408.962.963	1.177	16538	255
c:1/2 z:9/21 - Image 7 #1	391892	458.461.810	1.170	18540	255
c:1/2 z:10/21 - Image 7 #1	435685	494.489.206	1.135	19997	255
c:1/2 z:11/21 - Image 7 #1	486480	529.207.021	1.088	21401	255
c:1/2 z:12/21 - Image 7 #1	513868	547.564.526	1.066	22143	255
c:1/2 z:13/21 - Image 7 #1	529914	556.645.908	1.050	22510	255
c:1/2 z:14/21 - Image 7 #1	541644	554.944.270	1.025	22442	255
c:1/2 z:15/21 - Image 7 #1	561973	539.543.692	0.960	21819	255
c:1/2 z:16/21 - Image 7 #1	581298	517.929.396	0.891	20945	255
c:1/2 z:17/21 - Image 7 #1	604064	503.654.167	0.834	20368	255
c:1/2 z:18/21 - Image 7 #1	625122	480.307.038	0.768	19423	255
c:1/2 z:19/21 - Image 7 #1	649916	451.392.961	0.695	18254	255
c:1/2 z:20/21 - Image 7 #1	672959	430.476.966	0.640	17408	255
c:1/2 z:21/21 - Image 7 #1	698827	411.125.086	0.588	16626	255

Fonte: Autoria própria (2024).

Tabela 6. Número de células no dia 21 de desenvolvimento do modelo.

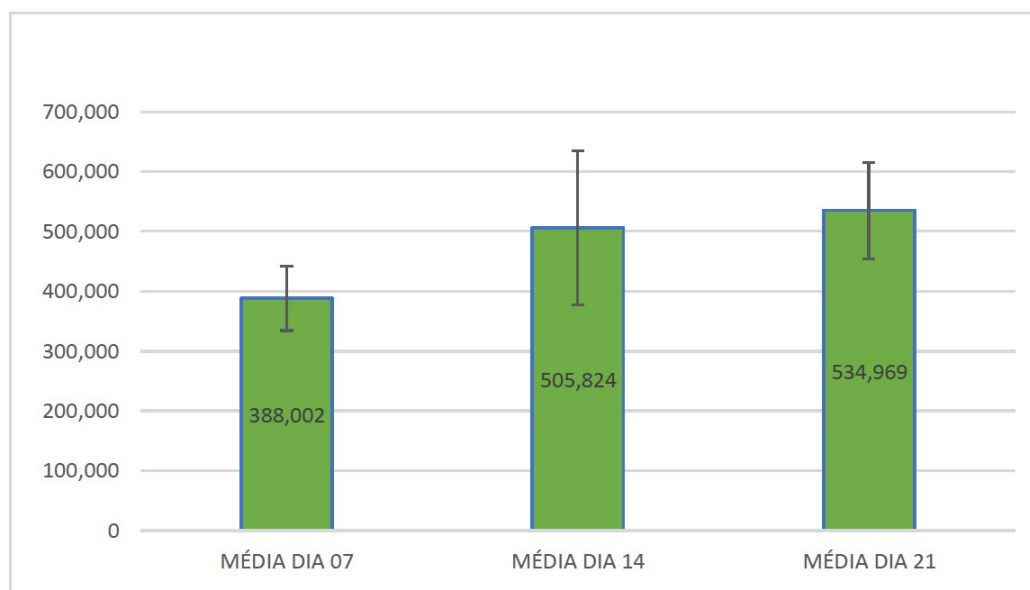
Slice	Count	Total Area	Average size	% Area	Mean
c:1/2 z:1/29 - Image 12 #1	415730	443.880.344	1.068	17950	255
c:1/2 z:2/29 - Image 12 #1	415959	502.963.968	1.209	20340	255
c:1/2 z:3/29 - Image 12 #1	411772	562.358.479	1.366	22741	255
c:1/2 z:4/29 - Image 12 #1	410276	602.215.508	1.468	24353	255
c:1/2 z:5/29 - Image 12 #1	410825	633.721.162	1.543	25627	255
c:1/2 z:6/29 - Image 12 #1	421272	638.708.894	1.516	25829	255
c:1/2 z:7/29 - Image 12 #1	434461	629.189.610	1.448	25444	255
c:1/2 z:8/29 - Image 12 #1	454005	605.770.957	1.334	24497	255
c:1/2 z:9/29 - Image 12 #1	474007	574.644.438	1.212	23238	255

c:1/2 z:10/29 - Image 12 #1	492252	539.395.315	1.096	21813	255
c:1/2 z:11/29 - Image 12 #1	509765	501.658.699	0.984	20287	255
c:1/2 z:12/29 - Image 12 #1	555488	494.482.484	0.890	19997	255
c:1/2 z:13/29 - Image 12 #1	565758	465.518.254	0.823	18825	255
c:1/2 z:14/29 - Image 12 #1	574839	435.182.926	0.757	17599	255
c:1/2 z:15/29 - Image 12 #1	583031	407.125.527	0.698	16464	255
c:1/2 z:16/29 - Image 12 #1	587495	371.389.381	0.632	15019	255
c:1/2 z:17/29 - Image 12 #1	627841	382.521.383	0.609	15469	255
c:1/2 z:18/29 - Image 12 #1	622961	351.657.328	0.564	14221	255
c:1/2 z:19/29 - Image 12 #1	614109	326.782.273	0.532	13215	255
c:1/2 z:20/29 - Image 12 #1	601034	299.248.257	0.498	12101	255
c:1/2 z:21/29 - Image 12 #1	587956	274.700.121	0.467	11109	255
c:1/2 z:22/29 - Image 12 #1	637577	281.031.205	0.441	11365	255
c:1/2 z:23/29 - Image 12 #1	620125	262.925.482	0.424	10633	255
c:1/2 z:24/29 - Image 12 #1	604277	244.463.713	0.405	9886	255
c:1/2 z:25/29 - Image 12 #1	585836	225.787.044	0.385	9131	255
c:1/2 z:26/29 - Image 12 #1	566829	208.811.668	0.368	8444	255
c:1/2 z:27/29 - Image 12 #1	546638	194.432.696	0.356	7863	255
c:1/2 z:28/29 - Image 12 #1	600919	208.730.843	0.347	8441	255
c:1/2 z:29/29 - Image 12 #1	581076	193.373.178	0.333	7820	255

Fonte: Autoria própria (2024).

A Figura 4 apresenta os dados brutos da coluna “Count” compilados para melhor visualização, demonstrando a proliferação celular durante o desenvolvimento do modelo.

Figura 4. Quantificação da ocupação celular do modelo pulmonar tridimensional humano nos dias 7, 14 e 21.



Fonte: Autoria própria (2024).

A análise dos resultados revela um aumento progressivo no número de células no tecido 3D. Observou-se uma média de 388.002 células no sétimo dia, com aumento para 505.824 células no décimo quarto dia e chegando a 534.969 células no vigésimo primeiro dia. Esses dados indicam uma clara proliferação celular no *scaffold* de colágeno tipo I, sugerindo que o ambiente do *scaffold* suporta e promove o crescimento celular ao longo do tempo. A estabilização no crescimento entre o décimo quarto e o vigésimo primeiro dia pode sugerir uma estabilização no número de células ou uma desaceleração na taxa de proliferação à medida que o tecido se organiza.

A análise dos dados revelou um aumento significativo no número de células ao longo dos dias de desenvolvimento do modelo. Esse aumento foi especialmente pronunciado nas camadas mais superficiais do modelo, onde se encontram as células Calu-3, as quais se diferenciaram em células de calciformes, células basais, células de muco e células ciliadas.

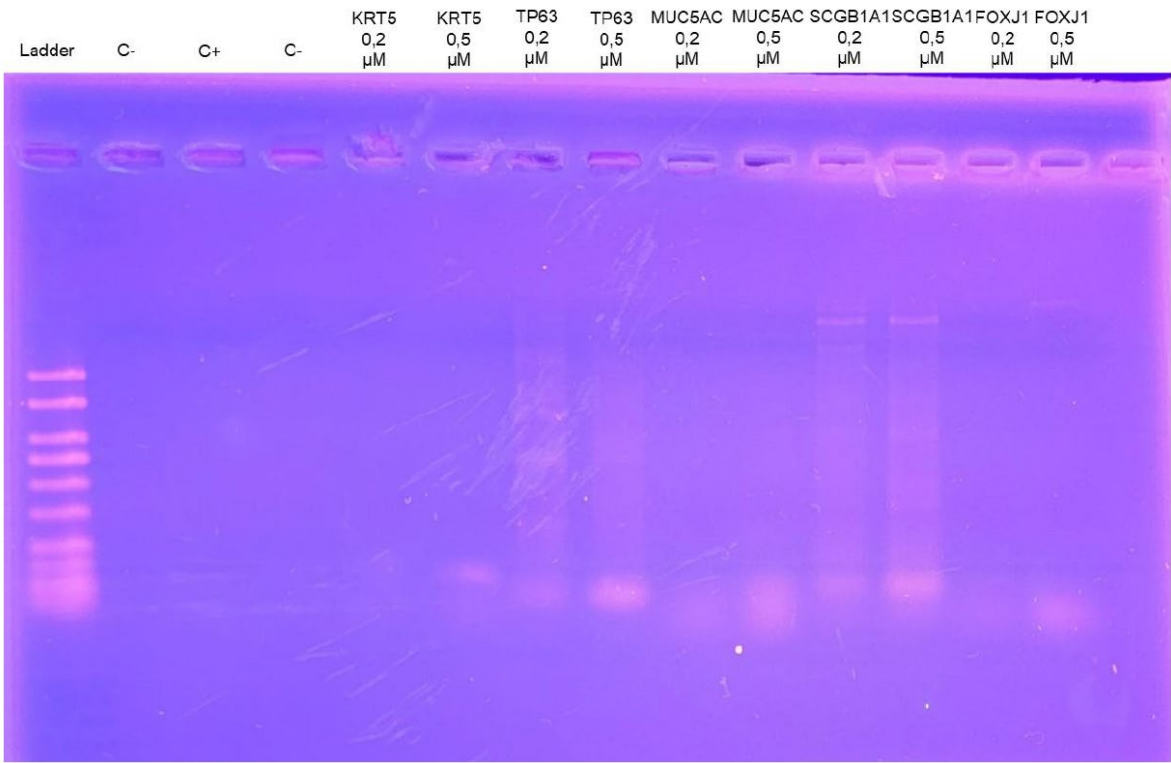
3.4 PADRONIZAÇÃO DOS PRIMERS PARA RT-qPCR

Os primers para desenhados para RT-qPCR utilizados nesse trabalho foram exibidos anteriormente nas tabelas 1, 2 e 3. Os primers apresentados na tabela 1 são

referentes à genes de células epiteliais pulmonares, com a finalidade de confirmar a diferenciação da CALU-3 no modelo de tecido pulmonar humano 3D, sendo eles de células basais (KRT5 e TP63), células produtoras de muco (MUC5AC e SCGB1A1) e células ciliadas (FOXJ1). Já nas tabelas 2 e 3 são apresentados genes a serem quantificados em modelos de tecido pulmonar humano 3D infectados por *H. capsulatum*, sendo eles humanos (C3AR1, GNB2, PDCL, ITHB2, FERMT3, ACTB e NCKAP1L) e do fungo (Hsp60, CatB, DDR48, GAPDH e CBP1).

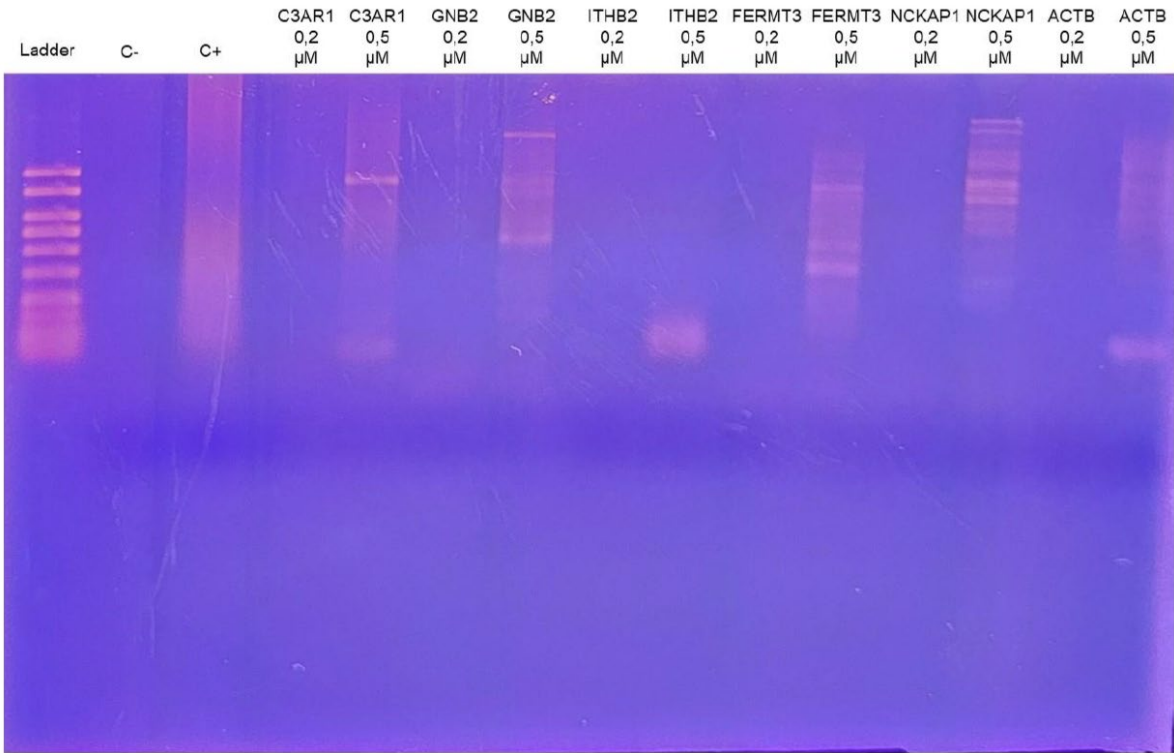
A padronização dos primers foi realizada através de PCR convencional avaliando diferentes concentrações dos primers (0,2µM e 0,5µM). Os resultados foram revelados em gel de agarose 2,5% utilizando brometo de etídio com intercalante de DNA, conforme demonstrado pela Figura 5 (primers de células epiteliais, referente à tabela 1), Figura 6 (primers humanos, referente à tabela 2) e Figura 7 e Figura 8 (primers de *H. capsulatum*, referente à tabela 3).

Figura 5. Gel de agarose sob luz UV revelando a padronização dos genes de células epiteliais.



Fonte: Autoria própria (2024).

Figura 6. Gel de agarose sob luz UV revelando a padronização dos genes humanos.



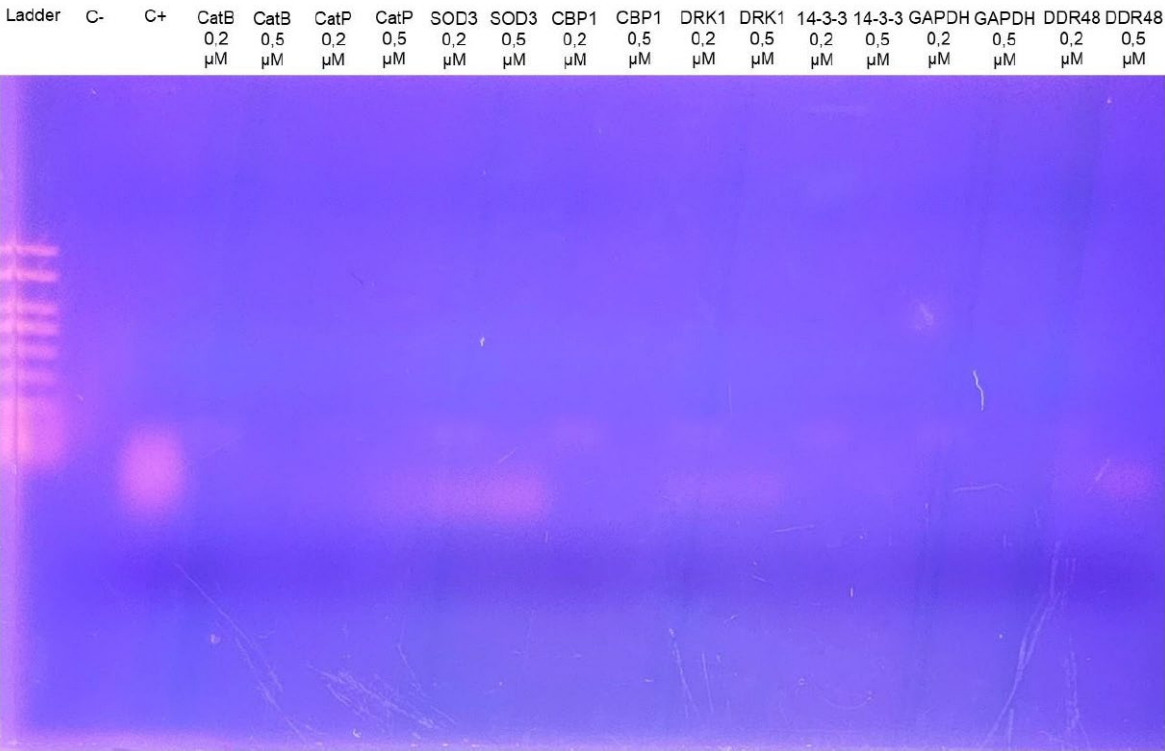
Fonte: Autoria própria (2024).

Figura 7. Gel de agarose sob luz UV revelando a padronização dos genes de *H. capsulatum*.



Fonte: Autoria própria (2024).

Figura 8. Gel de agarose sob luz UV revelando a padronização dos genes de *H. capsulatum*.



Fonte: Autoria própria (2024).

A partir das imagens, foi definido que os primers com concentração de 0,5µM apresentaram melhores resultados, fato observado pela formação de bandas mais intensas no gel de agarose, e por isso, essa concentração foi selecionada na utilização dos primer para as análises de RT-qPCR.

3.5 CARACTERIZAÇÃO DO TECIDO PULMONAR HUMANO POR RT-qPCR.

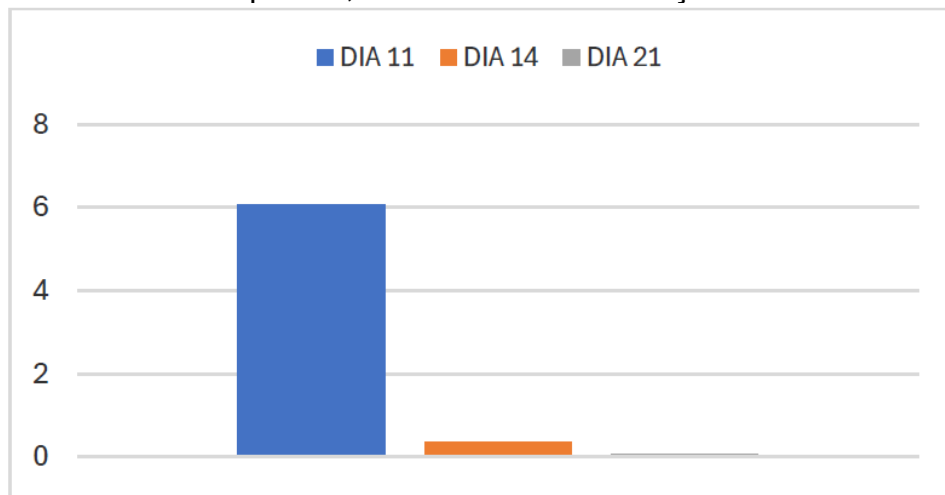
Os primers para RT-qPCR representados anteriormente na Tabela 1 foram desenhados para amplificação dos genes de células epiteliais pulmonares, com a finalidade de confirmar a diferenciação da Calu-3 no modelo de tecido pulmonar humano 3D, sendo eles de células basais (KRT5 e TP63), células produtoras de muco (MUC5AC e SCGB1A1) e células ciliadas (FOXJ1). Desta forma, foi possível verificar a funcionalidade do tecido ao longo do tempo de desenvolvimento.

Após a padronização dos primers, a reação de RT-qPCR para avaliar a diferenciação das células Calu-3 em Interface Ar-Líquido (IAL) foi realizada utilizando

modelos nos dias 3, 11, 14 e 21, conforme mostrado nas Figuras 9 a 12, tendo sido utilizado o dia 3 como threshold.

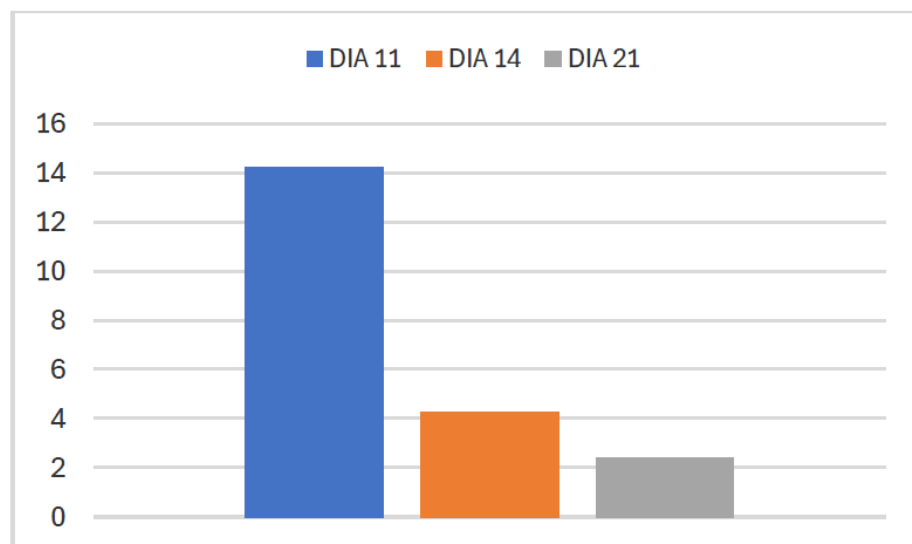
Os genes KRT5 e TP63 são mais expressos na diferenciação de células Calu-3 em células basais. A Figura 9 apresenta a quantificação do gene KRT5 nos três tempos de análise, enquanto a Figura 10 mostra a quantificação do gene TP63.

Figura 9. Expressão do gene KRT5 do modelo pulmonar tridimensional humano após 11, 14 e 21 dias de formação.



Fonte: Autoria própria (2024).

Figura 10. Expressão do gene TP63 do modelo pulmonar tridimensional humano após 11, 14 e 21 dias de formação.



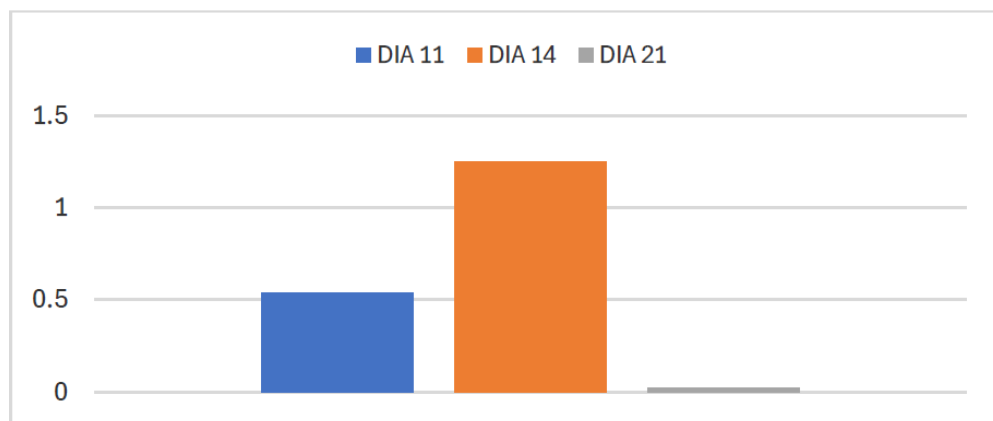
Fonte: Autoria própria (2024).

A partir da análise dos resultados, observou-se que tanto os genes KRT5 quanto TP63, característicos de células basais, apresentaram padrões de expressão similares. A expressão de ambos os genes foi maior no 11º dia, seguida por um

decréscimo nos dias 14 e 21. Para o gene KRT5, os valores de expressão ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) foram 6,072 no 11º dia, 0,348 no 14º dia e 0,059 no 21º dia. Já para o gene TP63, os valores foram 14,222, 4,251 e 2,377, respectivamente, nos mesmos períodos de análise.

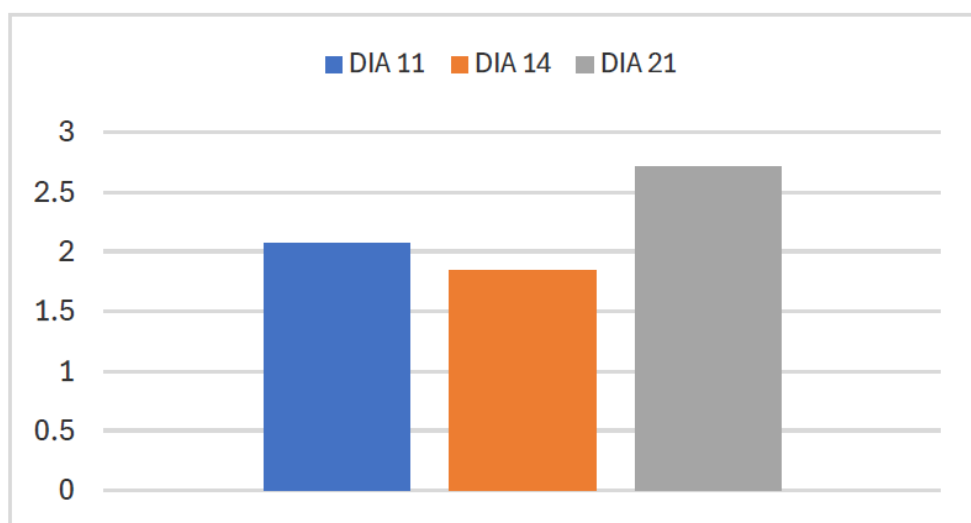
Por outro lado, o mesmo padrão não foi observado entre os genes MUC5AC e SCGB1A1 referentes as células produtoras de muco, conforme Figuras 11 e 12, respectivamente.

Figura 11. Expressão do gene MUC5AC do modelo pulmonar tridimensional humano após 11, 14 e 21 dias de formação.



Fonte: Autoria própria (2024).

Figura 12. Expressão do gene SCGB1A1 do modelo pulmonar tridimensional humano após 11, 14 e 21 dias de formação.



Fonte: Autoria própria (2024).

Conforme resultados apresentados referentes ao gene MUC5AC, sua expressão baseada no cálculo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ demonstrou valores de 7,453 no décimo

primeiro dia, seguido de decréscimo para 6,232 no decimo quarto dia e aumento para 12,054 no 21º dia. Enquanto para o gene SCGB1A1 evidenciamos expressão mais constante de 5,635 no decimo primeiro dia, 5,800 no decimo quarto dia e, finalmente 5,249 no 21º dia.

A quantificação do gene FOXJ1 apresentou problemas durante a padronização com o gene endógeno e, por isso, não está representado neste trabalho.

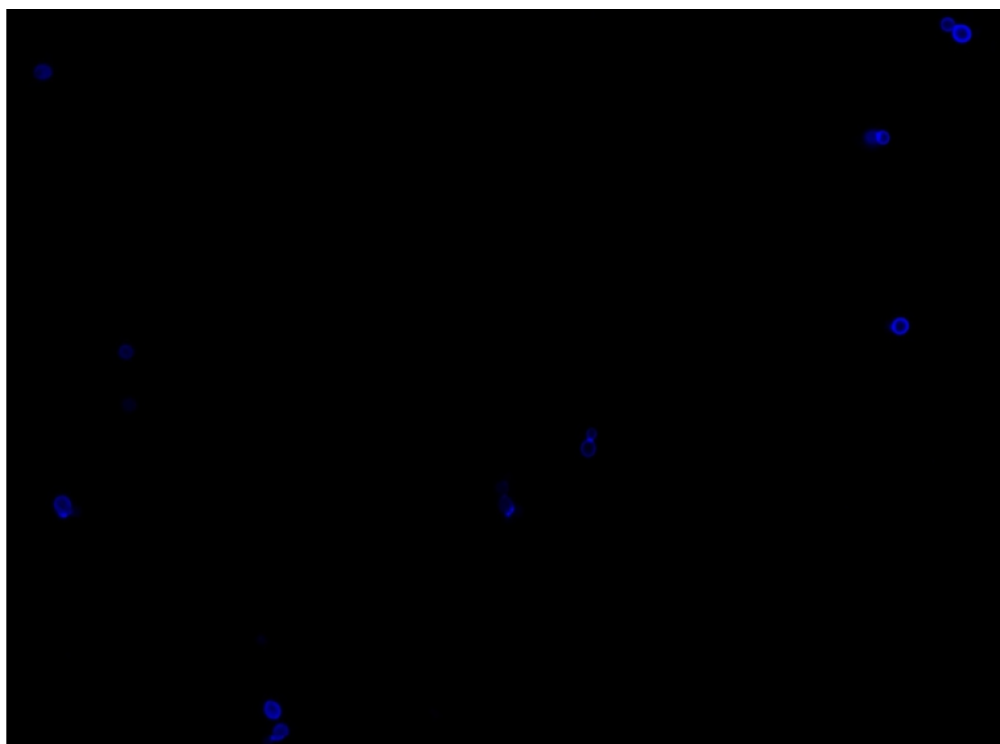
Esses resultados indicam que a linhagem celular Calu-3 utilizada nesta pesquisa demonstrou a capacidade de se diferenciar quando cultivada em um sistema de IAL, como evidenciado pela análise de RT-qPCR dos genes associados a células basais (KRT5 e TP63) e células produtoras de muco (células caliciformes) (MUC5AC e SCGB1A1). Os dados indicaram um aumento na expressão dos genes KRT5 e TP63, marcadores selecionados para a verificação da diferenciação das células epiteliais pulmonares em células basais, no décimo primeiro dia após o desenvolvimento do tecido, seguido por uma diminuição em suas expressões nas análises subsequentes (14 e 21 dias). De forma semelhante, a avaliação dos genes MUC5AC e SCGB1A1 mostrou um aumento de expressão ao longo dos dias analisados. Para o gene MUC5AC, houve um aumento mais expressivo no décimo quarto dia, enquanto para o gene SCGB1A1, o maior aumento na expressão ocorreu no vigésimo primeiro dia. Esses resultados estão em concordância com outros estudos que avaliaram a expressão dos genes KRT5, TP63, MUC5AC e SCGB1A1 para a comprovação da diferenciação de células epiteliais pulmonares em IAL (Bukowy-Bieryłło et al., 2022).

Estudos semelhantes a partir da avaliação da expressão dos genes nos dias 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 da diferenciação das células epiteliais pulmonares demonstraram um perfil semelhante entre todos os genes avaliados na presente pesquisa, com um aumento significativo de expressão entre os dias 3 e 6, seguido por um decréscimo e estabilização da expressão até o vigésimo primeiro dia (Bukowy-Bieryłło et al., 2022). Dessa forma, nossos resultados indicam tanto a capacidade de proliferação celular do tecido pulmonar, composto pelas linhagens celulares MRC-5, THP-1 e Calu-3, quanto sua funcionalidade fisiológica, conforme avaliado por RT-qPCR. Dessa maneira, escolhemos o 14º dia do desenvolvimento para realizar a infecção com leveduras de *H. capsulatum*.

3.6 CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO DO TECIDO PULMONAR HUMANO COM *H. capsulatum* PLANCTÔNICO E BIOFILME POR MMM

Também realizamos captura de imagens por MMM de modelos infectados para avaliar a interação das células e microrganismos dentro do *scaffold* de colágeno tipo I. Para isso, as leveduras de *H. capsulatum* foram coradas com Calco Fluor White Stain (CFW), e as células do modelo tridimensional foram coradas com Alexa 647 conjugado com Faloidina. Na Figura 13, é possível visualizar leveduras de *H. capsulatum* em azul com brotamento único ou células isoladas antes da infecção.

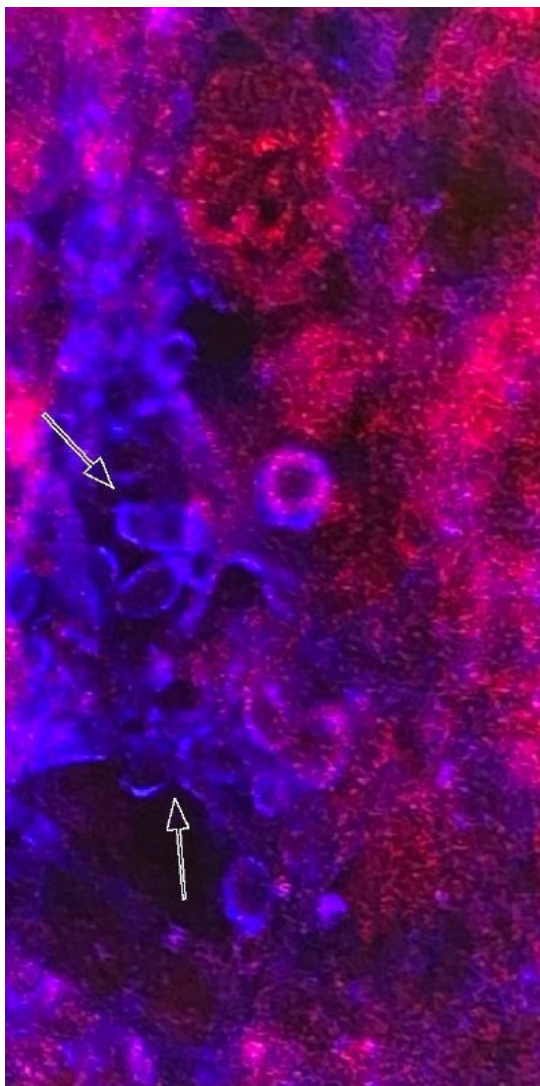
Figura 13. Controle de leveduras de *H. capsulatum* antes da infecção corado com Calco Fluor White Stain (CFW).



Fonte: Autoria própria (2024).

Na Figura 14, a análise MMM retrata a infecção de *H. capsulatum* na forma planctônica com uma MOI de 1:10 no 14º dia do desenvolvimento do modelo. A imagem revela a filimentação inicial da levedura *H. capsulatum*, caracterizada por múltiplos eventos de brotamento indicativos do início da filimentação observada em *H. capsulatum*. Setas brancas indicam leveduras de *H. capsulatum* iniciando filimentação. Além disso, é possível visualizar as células humanas do modelo em vermelho com tamanhos e intensidades de coloração variados.

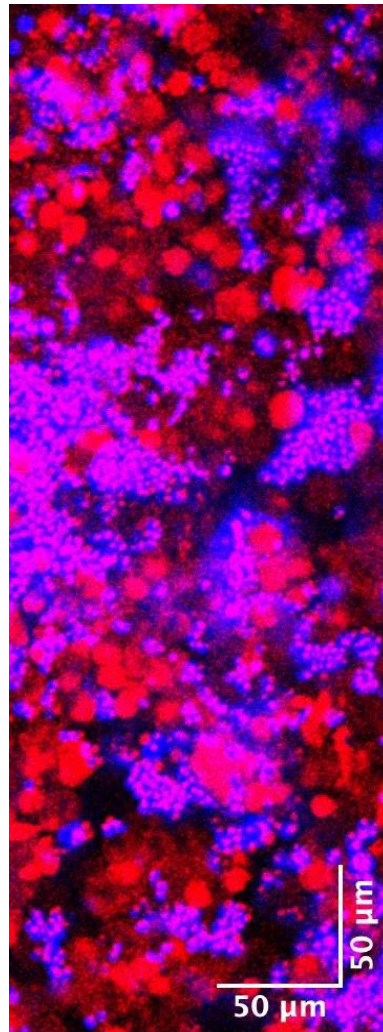
Figura 14. Leveduras de *H. capsulatum* com múltiplos brotamentos.



Fonte: Autoria própria (2024).

Interessantemente, o tecido foi capaz de diferenciar formas aberrantes filamentosas na infecção já relatadas *in vivo* na literatura (Riddel; Wheat, 2019; Schlaen et al., 2015; Suárez-Álvarez et al., 2019; Sutton et al., 1997; Vakili et al., 1983). Devido a estes resultados inesperados obtidos com a cepa de *H. capsulatum* EH-315 foi realizada a infecção nas mesmas condições utilizando uma cepa humana isolada de paciente colombiano portador da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Hc1980), conforme representado na Figura 15.

Figura 15. Modelo pulmonar tridimensional humano infectado com *H. capsulatum* na forma de levedura durante 24 horas.



Fonte: Autoria própria (2024).

A partir da análise dos dados, observa-se a infecção do tecido pulmonar humano com leveduras de *Histoplasma* Hc1980, demonstrando a capacidade do tecido pulmonar de ser infectado pelo patógeno em estudo.

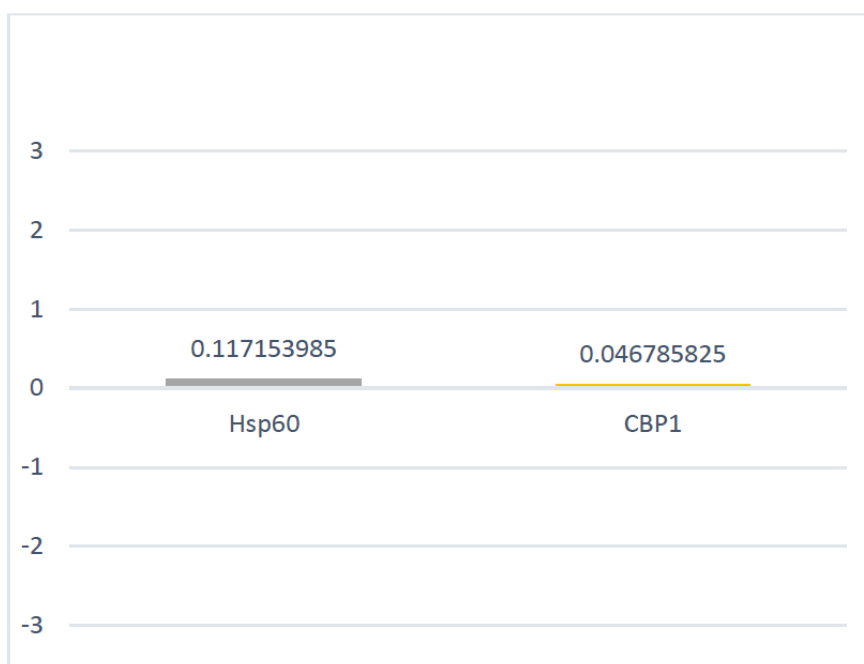
3.7 CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO POR RT-qPCR DO TECIDO PULMONAR HUMANO INFECTADO

Os mecanismos de interação fungo-hospedeiro em modelos de tecido tridimensional foram avaliados a partir da expressão de genes tanto de leveduras de *H. capsulatum* biofilme quanto da resposta das células humanas frente a infecção, com e sem bloqueio da proteína HSP60. Os primers apresentados anteriormente nas

tabelas 2 e 3 foram desenhados para a quantificação de genes em modelos de tecido pulmonar humano 3D infectados por *H. capsulatum*, sendo eles humanos (C3AR1, GNB2, PDCL, ITHB2, FERMT3, ACTB e NCKAP1L) e do fungo (HSP60, CATB, DDR48, GAPDH e CBP1).

Após a padronização dos primers, o modelo foi infectado com leveduras de *H. capsulatum* planctônicas e derivadas de biofilme, com e sem bloqueio da proteína Hsp60 utilizando o mAb 7B6. A Figura 16 representa a quantificação por RT-qPCR dos genes Hsp60 e CBP1 na infecção do modelo por leveduras planctônicas bloqueadas com mAb 7B6. Já as Figuras 17 e 18 representam a quantificação por RT-qPCR dos genes Hsp60 e CBP1 na infecção do modelo por leveduras derivadas de biofilme, sem e com bloqueio da proteína HSP60 utilizando o mAb 7B6, respectivamente.

Figura 16. Expressão de genes de leveduras planctônicas de *H. capsulatum* bloqueadas com anticorpo anti-Hsp60 durante a infecção do modelo pulmonar tridimensional humano.



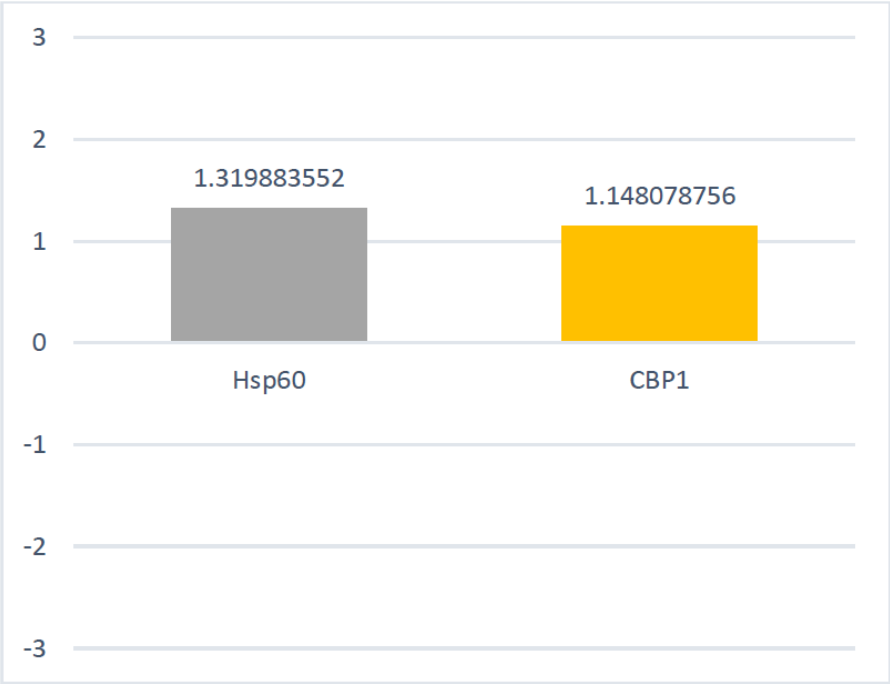
Fonte: Autoria própria (2024).

Figura 17. Expressão de genes de leveduras derivadas de biofilme de *H. capsulatum* sem bloqueio com anticorpo anti-Hsp60 durante a infecção do modelo pulmonar tridimensional humano.



Fonte: Autoria própria (2024).

Figura 18. Expressão de genes de leveduras derivadas de biofilme de *H. capsulatum* bloqueadas com anticorpo anti-Hsp60 durante a infecção do modelo pulmonar tridimensional humano.



Fonte: Autoria própria (2024).

Nossos resultados demonstraram que o bloqueio da proteína Hsp60 com o anticorpo monoclonal 7B6 influenciou a expressão dos genes HSP60 e CBP1 em diferentes condições experimentais. Observa-se na Figura 17 que leveduras planctônicas bloqueadas com anti-Hsp60 apresentaram expressões dos genes HSP60 e CBP1 de 0,117 e 0,046, respectivamente, apontando valores menores quando comparados ao controle sem bloqueio. Já durante a quantificação da expressão dos mesmos transcritos em biofilmes de *H. capsulatum* não bloqueados (Figura 18), há uma expressão aumentada em comparação com o controle, de 1,941 e 2,061 para HSP60 e CBP1, respectivamente. Curiosamente, em biofilmes com bloqueio de HSP60 com mAb 7B6 (Figura 19), constata-se uma diminuição da expressão desses transcritos quando comparados com o controle, demonstrando uma expressão quantitativa de 1,319 e 1,148 para HSP60 e CBP1, respectivamente.

As proteínas HSP60 (Heat Shock Protein 60) e CBP1 (Calcium Binding Protein 1) desempenham papéis fundamentais nos mecanismos de virulência de *Histoplasma capsulatum*, particularmente durante a interação com células do hospedeiro e o estabelecimento da infecção (Fregonezi et al., 2020; De Matos Silva et al., 2024).

A HSP60 é uma proteína localizada na superfície do fungo que atua como uma importante adesina, mediando a ligação do patógeno aos macrófagos do hospedeiro por meio da interação com o receptor CR3 (CD11/CD18), favorecendo a fagocitose do microrganismo (Long et al., 2003; Mihu; Nosanchuk, 2012). Essa interação permite a internalização eficiente do fungo com baixa ativação da resposta imune, contribuindo para mecanismos de evasão imunológica (Mihu; Nosanchuk, 2012). Estudos também demonstram que essa proteína está envolvida na formação de biofilmes, contribuindo para a adesão celular, organização estrutural e persistência do patógeno no hospedeiro (Fregonezi et al., 2020).

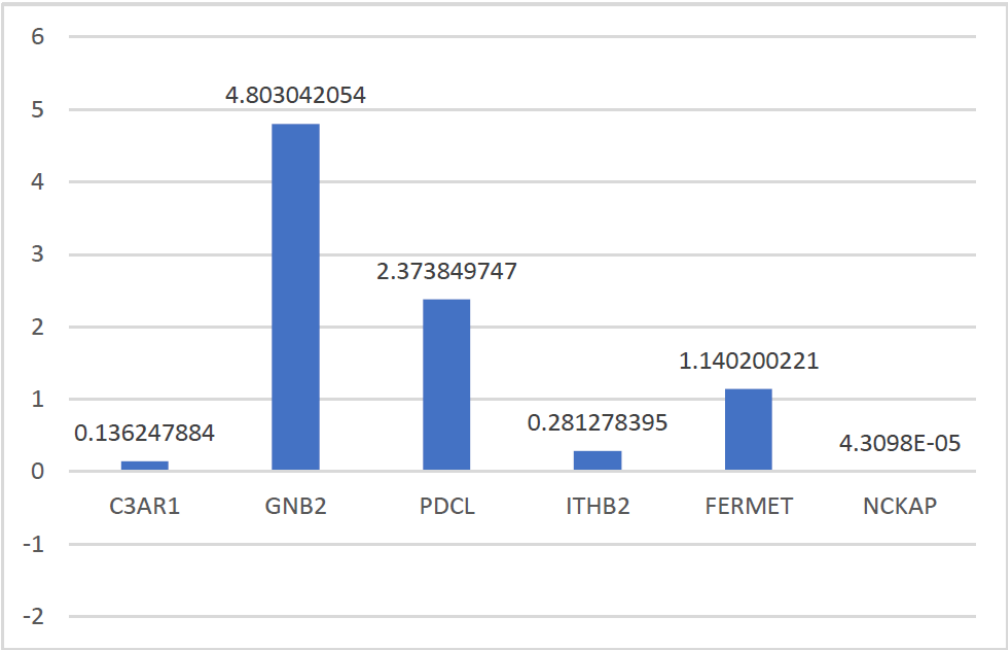
Por sua vez, a CBP1 é um fator de virulência secretado durante a fase de levedura intracelular, exercendo papel crucial na sobrevivência do fungo dentro de macrófagos (Isaac et al., 2015; Azimova et al., 2022). Essa proteína possui capacidade de ligação ao cálcio, elemento essencial para a fisiologia celular do patógeno no ambiente intracelular (Bohse; Woods, 2005). Além disso, a CBP1 está diretamente envolvida na modulação da resposta do hospedeiro, sendo capaz de promover a lise de macrófagos por meio da ativação de vias de estresse celular, facilitando a disseminação do fungo (Azimova et al., 2022). Evidências indicam ainda que a CBP1 pode atuar em conjunto com outras proteínas, como Yps3, formando

complexos efetores que amplificam os mecanismos de virulência durante a infecção (Azimova et al., 2022). Isso sugere que a proteína HSP60 pode ser um marcador da formação de biofilmes associado a CBP1.

Para ter maior compreensão dos eventos celulares causados nas células hospedeiras do modelo pulmonar tridimensional humano durante a infecção, avaliamos adicionalmente as expressões dos genes C3AR1, GNB2 e PDCL (da via de sinalização GPCR), ITHB2 e FERMT3 (da via alternativa da ativação da integrina), e ACTB, NCKAP1L (do citoesqueleto de actina).

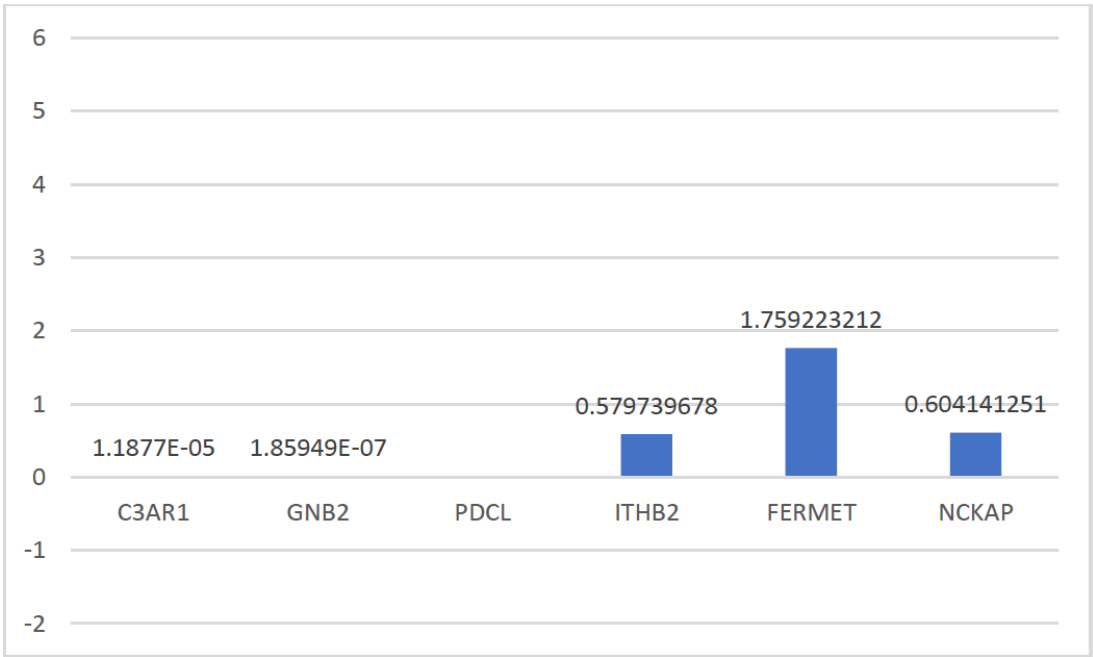
As Figuras 19 a 21 representam, respectivamente, a resposta do modelo infectado com leveduras planctônicas bloqueadas com mAb 7B6, biofilme sem bloqueio e biofilme bloqueado com mAb 7B6.

Figura 19. Expressão de genes humanos durante a infecção com leveduras de *H. capsulatum* planctônicas bloqueadas com mAb 7B6.



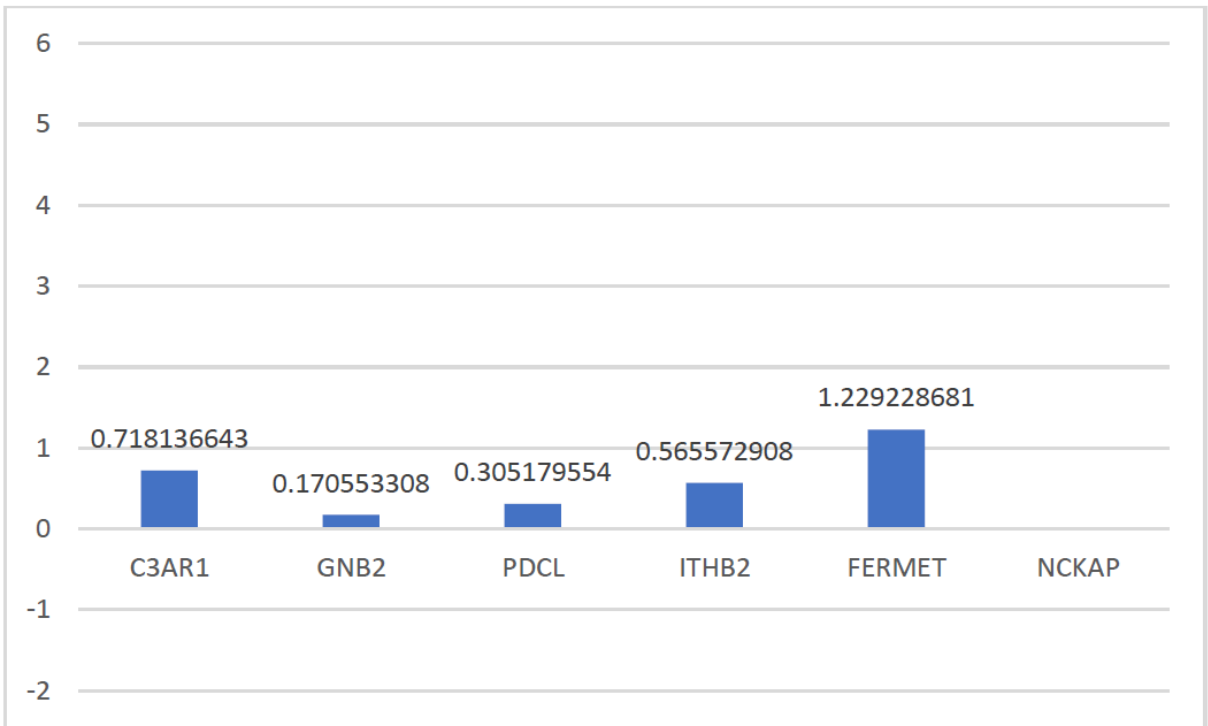
Fonte: Autoria própria (2024).

Figura 20. Expressão de genes humanos durante a infecção com leveduras de *H. capsulatum* derivadas de biofilme sem bloqueio.



Fonte: Autoria própria (2024).

Figura 21. Expressão de genes humanos durante a infecção com leveduras de *H. capsulatum* derivadas de biofilme bloqueadas com mAb 7B6.



Fonte: Autoria própria (2024).

A análise dos resultados permite observar uma resposta diferencial do modelo 3D de tecido das vias aéreas humanas nas três condições avaliadas (sem infecção,

infecção por leveduras planctônicas e infecção por leveduras derivadas de biofilme), confirmando descobertas anteriores do nosso grupo sobre a expressão diferencial de miRNAs que regulam genes relacionados à sinalização do citoesqueleto celular durante a infecção (Pitangui et al., 2021). Durante a infecção com leveduras planctônicas bloqueadas com anti-Hsp60, observou-se um aumento na expressão dos genes GNB2 (4,80) e PDCL (2,37), ambos relacionados à sinalização da proteína G, à qual o ligante de Hsp60, CR3, pertence. Apesar do bloqueio, a sinalização mediada pela proteína G mostrou-se acentuada. Já durante a infecção com leveduras provenientes de biofilme de *H. capsulatum*, notou-se uma maior expressão de FERMT3 (1,759), da via alternativa de ativação da integrina, demonstrando a presença de uma via diferencial para a interação patógeno-hospedeiro do fungo em comparação ao modelo infectado com leveduras planctônicas (FERMT3 1,140). Por outro lado, quando as leveduras de biofilme foram bloqueadas com anticorpo anti-HSP60, ocorreu uma diminuição na expressão de FERMT3 (1,229) e um aumento na expressão de C3AR1 (0,718) apesar do bloqueio da proteína Hsp60.

O receptor CR3 (*Complement Receptor 3*) é um heterodímero de glicoproteínas transmembranares formado por uma subunidade α (CD11b), exclusiva desse receptor, e uma subunidade β (CD18), compartilhada com outros membros da família das integrinas $\beta 2$, como LFA-1 e CR4, que atuam como receptores de leucócitos. O CR3 é expresso principalmente em macrófagos, monócitos, granulócitos e células NK, desempenhando papel central nas interações célula-célula e célula-matriz, mediando a adesão de leucócitos ao endotélio, o movimento através das junções intercelulares endoteliais, a fagocitose e a morte celular mediada pelo *burst* oxidativo, contribuindo para a regulação da homeostase inflamatória e da apoptose de neutrófilos extravasados. A ativação funcional do CR3 é dinamicamente regulada por sinais provenientes de outras moléculas de superfície celular, como selectinas e receptores quimiotáticos e de citocinas, que induzem alterações conformacionais capazes de convertê-lo em uma forma adesiva ativa, iniciando cascatas de sinalização do meio extracelular para o intracelular (Dunkelberger; Song, 2010; Sarma; Ward, 2011).

No contexto da infecção por *Histoplasma* spp., a fagocitose ocorre predominantemente por meio de receptores $\beta 2$ -integrinas, independentemente do reconhecimento por Dectin-1, sendo o CR3 (CD11b/CD18) o principal receptor estudado nesse processo. Outras integrinas, como LFA-1 e CR4, também contribuem para a invasão de macrófagos (Edwards et al., 2013). A ligação do fungo ao CR3 é

mediada pela proteína Hsp60 presente na parede celular, que atua como adesina e tem sua expressão aumentada em temperaturas elevadas, favorecendo o reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro. Esse mecanismo permite uma invasão rápida dos macrófagos com baixa ativação fagocítica, resultando em uma resposta imune pouco eficaz (Bongomin, 2017; Mihu; Nosanchuk, 2012). Embora o bloqueio do CR3 não impeça completamente a fagocitose, indicando a participação de vias alternativas, a subunidade β (CD18) da integrina CR3, codificada pelo gene *ITGN2*, e o gene *FERMT3*, envolvido na ativação das integrinas, são considerados cruciais para o reconhecimento e a sinalização associada à infecção (Cohen et al., 2022).

Com base nesses mecanismos, estudos anteriores do nosso grupo em modelo *in vivo* utilizando *Galleria mellonella* demonstraram que a proteína Hsp60 desempenha papel central na formação de biofilmes de *H. capsulatum* e na virulência (Fregonezi et al., 2020). A partir disso, foi proposta a hipótese de que a interação da Hsp60 fúngica com o receptor CR3 desencadeia a ativação do citoesqueleto de actina, promovendo a fagocitose. Subsequentemente, dentro do fagolisossomo, o macrófago induz a expressão dos genes IL-1 β e IL-18, estimulando a atividade autócrina e, assim, amplificando a ativação dos macrófagos para aumentar a produção de óxido nítrico (NO). Esse processo, mediado pela ativação de CR3, resulta em uma resposta imune atenuada. A produção elevada de NO dentro do fagolisossomo pode inibir a ativação de linfócitos, configurando um mecanismo de evasão imunológica utilizado por esses patógenos. Mecanismo semelhante foi descrito para a ligação da enolase fúngica ao receptor de plasmina, que favorece a adesão e invasão celular, promovendo alterações na expressão gênica ainda não completamente elucidadas (De Matos Silva et al., 2024).

4 CONCLUSÃO

Os dados gerados neste estudo mostram que a utilização de um modelo tridimensional de tecido pulmonar humano pode constituir uma abordagem eficaz para a investigação da interação patógeno-hospedeiro pela infecção de *H. capsulatum*, permitindo análises mais aprofundadas dos eventos celulares e moleculares associados à infecção. A construção e padronização desse tipo de modelo demonstraram, contudo, que o desenvolvimento de tecidos humanos *in vitro* ainda representa um desafio significativo, mesmo diante da literatura existente, uma vez que muitos trabalhos carecem de descrições metodológicas detalhadas que garantam a reprodutibilidade de sistemas tridimensionais complexos.

Nesse contexto, a escolha adequada do biomaterial utilizado como *scaffold* mostrou-se um aspecto decisivo para o sucesso do modelo. Neste trabalho, o colágeno tipo I de fibroblastos humanos provou ser apropriado para a formação e manutenção do tecido pulmonar humano 3D, proporcionando um ambiente favorável para o crescimento e organização celular. Da mesma forma, a linhagem Calu-3 demonstrou elevada compatibilidade para representar o epitélio pulmonar, uma vez que apresentou capacidade de diferenciação em células com microvilosidades e vesículas secretoras de mucina, características compatíveis com a fisiologia do tecido epitelial respiratório.

A validação do modelo desenvolvido foi conduzida por análises de microscopia, incluindo Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Microscopia Multiparamétrica Multifóton (MMM), e ensaios de RT-qPCR, possibilitando tanto a caracterização estrutural do tecido quanto a avaliação da infecção por *H. capsulatum* em suas formas planctônica e derivada de biofilme. As análises microscópicas e topográficas indicaram que o modelo tridimensional desenvolvido neste projeto se mostrou adequado para promover e sustentar a infecção fúngica de maneira organizada, refletindo com maior fidelidade aspectos da interação do fungo com o hospedeiro humano.

REFERÊNCIAS

- AZIMOVA, D. et al. Cbp1, a fungal virulence factor under positive selection, forms an effector complex that drives macrophage lysis. **PLOS Pathogens**, v. 18, n. 6, p. e1010417, 22 jun. 2022.
- BALS, R.; HIBBERT, J.; KRAUSE, S. et al. The human airway epithelium is a key element in host defense. **Clinics in Chest Medicine**, v. 33, n. 2, p. 1–10, 2012.
- BOHSE, M. L.; WOODS, J. P. Surface Localization of the Yps3p Protein of *Histoplasma capsulatum*. **Eukaryotic Cell**, 4, n. 4, p.685-693, 2005.
- BONGOMIN, F. et al. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 4, 57, 2017.
- BUKOWY-BIERYŁŁO, Z. et al. *In vitro* differentiation of ciliated cells in ALI-cultured human airway epithelium – The framework for functional studies on airway differentiation in ciliopathies. **European Journal of Cell Biology**, v. 101, n. 1, p. 151189, jan. 2022.
- COHEN, A. et al. Genome-scale CRISPR screening reveals that C3aR signaling is critical for rapid capture of fungi by macrophages. **PLoS pathogens**, v. 18, n. 9, 1 set. 2022.
- DE MATOS SILVA, S. et al. Common virulence factors between *Histoplasma* and *Paracoccidioides*: Recognition of Hsp60 and Enolase by CR3 and plasmin receptors in host cells. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 7, p. 100246, 2024.
- DERAKHSHANI, S. et al. Measles Virus Infection Fosters Dendritic Cell Motility in a 3D Environment to Enhance Transmission to Target Cells in the Respiratory Epithelium. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 5 jun. 2019.
- DUNKELBERGER, J. R.; SONG, W.-C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell Research**, v. 20, n. 1, p. 34–50, 15 jan. 2010.
- EDWARDS, J. A. et al. *Histoplasma* yeast and mycelial transcriptomes reveal pathogenic-phase and lineage-specific gene expression profiles. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 695, 10 dez. 2013.
- FREGONEZI, N. F. et al. Heat Shock Protein 60, Insights to Its Importance in *Histoplasma capsulatum*: From Biofilm Formation to Host-Interaction. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 1, 22 jan. 2020.
- HORWATH, M. C.; FECHER, R. A.; DEEPE JR., G. S. *Histoplasma capsulatum*, lung infection and immunity. **Future Microbiology**, v. 10, p. 967–975, 2015.
- ISAAC, D. T. et al. Macrophage cell death and transcriptional response are actively triggered by the fungal virulence factor Cbp1 during *H. capsulatum* infection. **Molecular microbiology**, v. 98, n. 5, p. 910–929, 1 dez. 2015.

JONSDOTTIR, H. R.; DIJKMAN, R. Coronaviruses and the human airway: a universal system for virus-host interaction studies. **Virology Journal**, v. 13, n. 1, p. 24, 6 dez. 2016.

KABADI, P. K. et al. A novel human 3D lung microtissue model for nanoparticle-induced cell-matrix alterations. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 16, n. 1, p. 15, 3 dez. 2019.

KARYGIANNI, L. et al. Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. **Trends in Microbiology**, v. 28, n. 8, p. 668-681, ago. 2020.

KLETTING, S. Co-culture of human alveolar epithelial (hAELVi) and macrophage (THP-1) cell lines. **ALTEX**, p. 211–222, 2018.

KREFT, M. E. et al. The characterization of the human cell line Calu-3 under different culture conditions and its use as an optimized in vitro model to investigate bronchial epithelial function. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 69, p. 1–9, 2015.

LONG, K. H. et al. Identification of heat shock protein 60 as the ligand on *Histoplasma capsulatum* that mediates binding to CD18 receptors on human macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 170, n. 1, p. 487–94, 1 jan. 2003.

MARC, M. et al. Pulmonary Histoplasmosis: Clinical and Imagistic Characteristics. In: Infectious Diseases. **IntechOpen**, 14 fev. 2023.

MIHU, M. R.; NOSANCHUK, J. D. *Histoplasma* Virulence and Host Responses. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, 2012.

PITANGUI, N. DE S. et al. Differential miRNA Expression in Human Macrophage-Like Cells Infected with *Histoplasma capsulatum* Yeasts Cultured in Planktonic and Biofilm Forms. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 1, p. 1–23, 2021.

RIDDELL, J.; WHEAT, L. J. Central Nervous System Infection with *Histoplasma capsulatum*. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 3, p. 70, 24 jul. 2019.

SANCHEZ-GUZMAN, D. et al. Long-term evolution of the epithelial cell secretome in preclinical 3D models of the human bronchial epithelium. **Scientific Reports**, v. 11, p. 6621, 2021.

SARMA, J. V.; WARD, P. A. The complement system. **Cell and Tissue Research**, v. 343, n. 1, p. 227–235, 14 jan. 2011.

SCHLAEN, A. et al. Endogenous *Histoplasma capsulatum* Endophthalmitis in An Immunocompetent Patient. **European Journal of Ophthalmology**, v. 25, n. 4, p. e53–e55, 25 jul. 2015.

SUÁREZ-ÁLVAREZ, R. O. et al. Dimorphism and Dissemination of *Histoplasma capsulatum* in the Upper Respiratory Tract after Intranasal Infection of Bats and Mice

with Mycelial Propagules. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 3, p. 716–723, 4 set. 2019.

SUTTON, D. A. et al. An aberrant variant of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 734–735, mar. 1997.

TAN, S.-M. The leucocyte $\beta 2$ (CD18) integrins: the structure, functional regulation and signalling properties. **Bioscience Reports**, v. 32, n. 3, p. 241–269, 1 jun. 2012.

UBERTI, F. et al. A Combination of α -Lipoic Acid (ALA) and Palmitoylethanolamide (PEA) Blocks Endotoxin-Induced Oxidative Stress and Cytokine Storm: A Possible Intervention for COVID-19. **Journal of Dietary Supplements**, v. 20, n. 2, p. 133–155, 4 mar. 2023.

VAKILI, S. T. et al. Cerebral histoplasma. **Journal of Neurosurgery**, v. 59, n. 2, p. 332–336, ago. 1983.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action**. Geneva: World Health Organization, 2022. 48p.