

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PRISCILA COSTA ALBUQUERQUE

**VESÍCULAS DE TRANSPORTE DE PROTEÍNAS E LIPÍDEOS EM *HISTOPLASMA*
CAPSULATUM E OUTROS ASCOMICETOS**

Rio de Janeiro

2008

**VESÍCULAS DE TRANSPORTE DE PROTEÍNAS E LIPÍDEOS EM *HISTOPLASMA*
CAPSULATUM E OUTROS ASCOMICETOS**

PRISCILA COSTA ALBUQUERQUE

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Ciências na área de concentração em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientadores: Prof. Dr. Rosely Maria Zancopé Oliveira
Prof. Dr. Márcio Lourenço Rodrigues

Rio de Janeiro

2008

Albuquerque, Priscila Costa.

Vesículas de transporte de proteínas e lipídeos em
Histoplasma capsulatum e outros ascomicetos – Priscila Costa
Albuquerque. – Rio de Janeiro, 2008.

Dissertação de Mestrado – Instituto de Pesquisa Clínica
Evandro Chagas, Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas,
2008.

Bibliografia: f.112

1. Transporte vesicular. 2. *Histoplasma capsulatum*. 3.
Candida albicans. 4. *Candida parapsilosis*. 5. *Sporothrix*
schenckii. 6. *Saccharomyces cerevisiae*

PRISCILA COSTA ALBUQUERQUE

**VESÍCULAS DE TRANSPORTE DE PROTEÍNAS E LIPÍDEOS EM *HISTOPLASMA*
CAPSULATUM E OUTROS ASCOMICETOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientadores: Prof. Dr. Rosely Maria Zancopé-Oliveira

Prof. Dr. Márcio Lourenço Rodrigues

Aprovada em 31 de março de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cynthia Horn (Presidente)
Doutor em Biologia Parasitária
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Fiocruz

Prof. Dr. Leonardo Nimrichter
Doutor em Ciências (Microbiologia)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda
Doutor em Microbiologia e Imunologia
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Maria José de Andrade Serpa (Revisora e suplente)
Doutor Ciências Biológicas (Biofísica) UFRJ
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Fiocruz

À Deus, pelo Dom da vida.
Aos meus pais por todo amor.
Aos amigos pelo carinho.

É impossível para um homem aprender aquilo que ele acha que já sabe.

(Epíteto)

Agradecimentos

À Prof^ª. Dr^ª. Rosely Maria Zancopé Oliveira, pela orientação dedicada a mim neste trabalho e nesses 10 anos de micologia. Muito obrigado por todas as oportunidades de aprendizado e crescimento profissional, e também pelas lições de vida e amizade.

Ao Prof^º. Dr. Marcio Lourenço Rodrigues, pela amizade, pelos ensinamentos e permitir e apoiar a realização deste trabalho.

Ao Dr. Joshua D. Nosanchuk, pelo acolhimento em seu laboratório, pelo apoio financeiro durante minha estada no Albert Einstein College of Medicine, Yeshiva University e pela importantíssima ajuda na interpretação de dados e delineamento de experimentos. Thank you so much, Boss.

Ao Dr. Ernesto S. Nakayasu e ao Dr. Igor C. Almeida do Department of Biological Sciences, The Border Biomedical Research Center, University of Texas at El Paso, El Paso, TX, USA, pela realização da espectrometria de massas e interpretação dos resultados e análise dos resultados de proteômica e lipídeos.

A minha família do Laboratório de Micologia, Setor de Imunodiagnóstico: Mauro, Claudia, Patrícia, Karla, Monique, Manoel, Marcos e André, e a todos aqueles que já passaram pelo nosso laboratório pelos agradáveis momentos de convívio e amizade, amo vocês.

Aos amigos do Laboratório de Micologia, Setor de Diagnóstico Micológico: Dr. Paulo, Rodrigo, Rosani, Maria Helena, Fábio e Mônica, “vizinhos da porta ao lado” e muitas vezes uma extensão do nosso laboratório, pelos agradáveis momentos de convívio.

Aos amigos do Laboratório de Micologia, Setor Ambiental: Em especial ao Dr Bodo Wanke e a Dra Márcia Lazéra. Uma lembrança especial a secretária do serviço Zélia, por todos os momentos de descontração e carinho.

A Profa. Dra. Maria José de Andrade Serpa, pela revisão e valiosas sugestões no texto desta dissertação.

Ao Fogarty International Center, pelo apoio financeiro fornecido pelo Interhemispheric Research Training Grant in Infectious Diseases.

Ao Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, pelo curso de pós graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas e aos seus professores e as minhas lindas amigas de curso e a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram com este trabalho.

Albuquerque, P C. **Vesículas de transporte de proteínas e lipídeos em *Histoplasma capsulatum* e outros ascomicetos.** Rio de Janeiro, 2008.112 f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

RESUMO

Secreção vesicular de macromoléculas foi demonstrada recentemente em *Cryptococcus neoformans* levantando a hipótese da possibilidade desse mecanismo de transporte vesicular ocorrer também em ascomicetos. Neste trabalho, analisamos se o fungo *Histoplasma capsulatum* e outros ascomicetos com importância clínica produzem vesículas e utilizam essas estruturas na secreção de macromoléculas. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) evidenciou secreção trans-celular de vesículas na fase leveduriforme. Análises proteômicas e de lipídeos revelaram uma gama de macromoléculas envolvidas em diversos processos celulares, como por exemplo: metabolismo, sinalização e virulência. Os resultados demonstraram que *H. capsulatum* utiliza-se de um transporte secretório celular vesicular trans-membrana para promover virulência. MET de sobrenadantes de cultura de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Sporothrix schenckii*, e *Saccharomyces cerevisiae* evidenciaram a presença de vesículas, confirmando a hipótese de que os ascomicetos similarmente produzem vesículas. Anticorpos presentes em *pool* de soros de pacientes com histoplasmose, reagiram com moléculas presentes nas vesículas isoladas, ressaltando a possível associação dos produtos vesiculares no processo de patogênese. Nossos resultados corroboram a proposta de que a secreção vesicular é um mecanismo comum em fungos para o transporte de macromoléculas relacionadas à virulência, sendo este um promissor alvo em novas linhas terapêuticas.

Palavras-chave: 1. Transporte vesicular. 2. *Histoplasma capsulatum*. 3. *Candida albicans*. 4. *Candida parapsilosis*. 5. *Sporothrix schenckii*. 6. *Saccharomyces cerevisiae*.

Albuquerque, P C. **Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes.** Rio de Janeiro, 2008. 112 f. Master [Science Dissertation in Clinic Research in Infectious Diseases] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

ABSTRACT

Vesicular secretion of macromolecules has recently been described in the basidiomycetes *Cryptococcus neoformans* raising the question as to whether ascomycetes similarly utilize vesicles for transport. In the present study, we examined whether the clinically important ascomycetes *Histoplasma capsulatum* produced vesicles and utilized these structures to secrete macromolecules. Transmission electron microscopy (TEM) showed transcellular secretion of vesicles by yeast cells. Proteomic and lipidomic analyses of vesicles isolated from culture supernatants revealed a rich collection of macromolecules involved in diverse processes including metabolism, cell recycling, signaling, and virulence. The results demonstrated that *H. capsulatum* utilizes a sophisticated trans-cell wall vesicular transport secretory mechanism to promote virulence. Additionally, TEM of supernatants collected from *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Sporothrix schenckii*, and *Saccharomyces cerevisiae* documented that vesicles are similarly produced by additional ascomycetes. The vesicles from the pathogenic fungi reacted with immune serum from patients providing an association of the vesicular products with pathogenesis. The findings support the proposal that vesicular secretion is a general mechanism in fungi for the transport of macromolecules related to virulence and that this process can be a target for novel therapeutics.

Keywords: 1. Vesicular transport. 2. *Histoplasma capsulatum*. 3. *Candida albicans*. 4. *Candida parapsilosis*. 5. *Sporothrix schenckii*. 6. *Saccharomyces cerevisiae*.

SUMÁRIO

Revisão de Literatura	11
I. Histoplasmosose	11
Histórico	11
Epidemiologia	12
Patogenia e formas clínicas	12
Resposta imune na histoplasmosose	13
Diagnóstico	15
II. <i>Histoplasma capsulatum</i>	17
Aspectos gerais	17
Taxonomia	17
Habitat	18
Morfologia e fisiologia	19
Fatores de virulência	21
Dimorfismo	21
Defesas oxidativas	22
Melanina	23
Produtos secretados	24
III. Outros ascomicetos de interesse médico	25
<i>Candida albicans</i> e <i>C. parapsilosis</i>	25
<i>Sporothrix schenckii</i>	28
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
Objetivo geral	33
Objetivos específicos	33
Artigo	34
Figure 1	60
Figure 2	61
Figure 3	62
Figure 4	63
Figure 5	64
Figure 6	65
Figure 7	66
Table 1	67
Discussão	68
Conclusões	72
Referências bibliográficas	74
Anexo e Material Suplementar	88
Table 2	89
Legend for supplemental material	90

REVISÃO DE LITERATURA

I. HISTOPLASMOSE

HISTÓRICO

Histoplasma capsulatum foi descrito pela primeira vez pelo patologista Calazar em necropsia de trabalhadores com hepatoesplenomegalia, na região do Canal do Panamá. Durante esta pesquisa, foi observada presença de histiócitos parasitados por um suposto protozoário encapsulado até então desconhecido na época e que foi denominado *Histoplasma capsulatum* (Darling, 1906). Somente 6 anos depois, Henrique da Rocha Lima, um pesquisador brasileiro, classificou o *H. capsulatum* como um fungo leveduriforme (Rocha Lima, 1912).

Dodd & Tompkins (1934), relataram o primeiro caso de histoplasmose em lactente de seis meses de idade. O primeiro cultivo bem sucedido do fungo coube a DeMonbreun (1934), fato que possibilitou a demonstração do seu caráter dimórfico através do estudo morfológico em parasitismo e saprofitismo. A denominação *H. capsulatum* permaneceu em uso, mesmo após Ribí & Salvin (1956) terem verificado, através da utilização de microscopia eletrônica, a ausência de cápsula.

A primeira demonstração referente ao habitat ecológico de *H. capsulatum* ocorreu em 1949, quando o fungo foi isolado pela primeira vez do solo (Emmons, 1949). Em 1951 foram descritos os fatores que propiciam seu crescimento neste ambiente, tal como a presença de altos teores de matéria orgânica em solos enriquecidos com fezes de aves e morcegos (Ajello & Zeidberg, 1951).

Até 1945, a histoplasmose era considerada uma doença rara e quase sempre fatal (Parsons & Zarafonitis 1945). Estes conceitos foram modificados pelas observações de áreas rurais onde a mortalidade por tuberculose, e a incidência de calcificações pulmonares não eram concordantes. Nessas áreas, um grande número de indivíduos apresentava calcificações pulmonares com testes negativos de PPD. Esses indivíduos, em geral, apresentavam positividade para o teste intradérmico com histoplasmina.

Em 1952, Vanbreuseghen descreveu uma nova espécie patogênica, denominada *Histoplasma duboisii*. A forma miceliana da espécie proposta era indistinguível da apresentada pelo *H. capsulatum*, porém as grandes células leveduriformes encontradas em tecido eram morfológicamente distintas das pequenas células do *H. capsulatum*, hoje as

duas espécies são classificadas como *H. capsulatum*, porém como variedades diferentes. Posteriormente, Kwon-Chung (1972) elucidou o ciclo da reprodução sexuada do *H. capsulatum* e denominou a forma teleomórfica de *Emmonsiiella capsulata*. Em 1979, *E. capsulata* foi transferida para o gênero *Ajellomyces* (McGinnis & Katz 1979).

EPIDEMIOLOGIA

A histoplasose é uma das micoses de maior importância no continente americano devido ao seu grau expressivo de endemicidade. A região central dos Estados Unidos da América é uma das áreas mais endêmicas, apresentando a maior concentração de indivíduos infectados naquele país (Cano & Hajjeh, 2001). No Brasil, poucos estudos abordam a distribuição de *H. capsulatum* no meio ambiente e as características do seu nicho ecológico. O número de publicações referentes ao isolamento deste fungo do solo é limitado (Araújo, 1970; Fava Netto e cols., 1967; Fernandes e cols., 1989; Moraes & Almeida, 1976; Severo e cols., 1986; Wanke, 1985; Zancopé-Oliveira & Wanke, 1987; Kauffman, 2007) apesar de diversos inquéritos com o teste cutâneo usando histoplasmina revelarem uma prevalência bastante significativa da histoplasose-infecção no nosso país (Fava & Fava Netto 1998, Zancopé-Oliveira e cols., 2005). Surtos epidêmicos têm ocorrido em diferentes regiões brasileiras, conforme descrito por nosso grupo do Laboratório de Micologia do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas-Fiocruz (Zancopé-Oliveira e cols., 2005). Com base na experiência adquirida em nossas análises, consideramos que o Estado do Rio de Janeiro apresenta áreas com altos índices de infecção, sendo consideradas como endêmicas ou hiperendêmicas (Capone e cols, 1999).

PATOGENIA E FORMAS CLÍNICAS

O estabelecimento da infecção por *H. capsulatum* depende de um contexto complexo envolvendo a interação do fungo com seu hospedeiro. A manutenção da infecção assintomática ou desenvolvimento do quadro sintomático na histoplasose é diretamente dependente de três fatores: o estado de competência imunológica do hospedeiro, a virulência da cepa infectante e/ou da carga parasitária adquirida (Klein & Tebbets 2007).

A infecção por *H. capsulatum* se inicia após a inalação das partículas infectantes, os microconídios, e sua deposição dentro dos alvéolos. Este evento é seguido pela diferenciação dos microconídios em leveduras (Maresca & Kobayashi, 2000). A partir dos

alvéolos, as leveduras atingem o parênquima pulmonar através da migração de macrófagos alveolares e polimorfonucleares, possibilitando assim o estabelecimento de pneumonia intersticial. Este processo de transição de micélio para levedura pode ser iniciado dentro de um período de horas a dias após a exposição do hospedeiro às partículas infecciosas. Durante a infecção primária, as células leveduriformes são fagocitadas, levando à ativação do sistema fagocítico mononuclear e liberação de mediadores químicos participantes do mecanismo oxidativo (Gildea e cols., 2005). Fagócitos repletos de *H. capsulatum* migram então para os linfonodos adjacentes, onde novo foco inflamatório é formado, constituindo complexo primário pulmonar (Newman, 1999). Posteriormente há ocorrência de subsequente disseminação hematogênica para outros órgãos como fígado, baço e medula óssea entre outros. Cerca de 10 a 18 dias após o início da infecção primária a imunidade celular é ativada, detendo o processo tanto nos focos primários como nos secundários. Esta reação granulomatosa é seguida de necrose de caseificação, encapsulamento fibroso e freqüente depósito de sais de cálcio nas lesões residuais. O controle da infecção parece estar associado com a ativação da imunidade celular, e a resolução da infecção é coincidente com a ativação e proliferação de linfócitos T. Alterações na resposta imune podem levar a progressão da doença (Newman, 1999).

Após a infecção primária *H. capsulatum* pode persistir viável no interior dos granulomas durante anos. Assim, eventos relacionados à reativação endógena podem explicar casos de histoplasmose disseminada em indivíduos imunocomprometidos residentes em áreas de baixa endemicidade, mas que anteriormente viveram em áreas endêmicas.

A evolução da histoplasmose vai depender diretamente do estado imune do hospedeiro infectado com o *H. capsulatum*. A doença é potencialmente mais severa em indivíduos imunocomprometidos, particularmente em pacientes com síndrome da imunodeficiência humana adquirida (AIDS), crianças com idade inferior a dois anos e idosos. A histoplasmose pode se apresentar como infecção assintomática ou benigna até quadros agudos fulminantes, ou ainda apresentar-se como infecção pulmonar crônica de longa duração (Leimann e cols., 2005).

RESPOSTA IMUNE NA HISTOPLASMOSE

O principal mecanismo de defesa na histoplasmose é do tipo celular, mediada primariamente por células “natural killer”, endoteliais e macrófagos. A resolução da infecção

coincide com a ativação e proliferação de linfócitos T e liberação de citocinas (Deepe e cols., 2005). A imunidade celular nas infecções primárias por *H. capsulatum* se desenvolve 10 dias após exposição ao patógeno, com proliferação celular ocorrendo inicialmente nos pulmões e linfonodos mediastínicos seguida pela estimulação de células do sistema fagocítico mononuclear (Deepe, 2000).

A resposta celular contra *H. capsulatum* é um processo totalmente dependente da produção de citocinas. Nos primeiros dias após a infecção, os níveis de Interleucina-12 (IL-12) aumentam rapidamente, seguido pelo aumento de Interferon- γ (IFN- γ) (Cain & Deepe, 1998). Fator de necrose tumoral- α (TNF- α) também é crucial no controle da histoplasmose (Allendorfer e cols, 2000). Vários antígenos do *H. capsulatum* podem promover o desencadeamento da resposta imune celular. Entre estes, a Hsp60, uma proteína de choque térmico e um dos componentes da histoplasmina, foi avaliada como mediador da resposta imune e potencial molécula-alvo para desenvolvimento de vacinas. Hsp60 (proteína de choque térmico de 60 Kda) tem atividade protetora em camundongos e requer células T CD4⁺, produção de IL-12, IL-10 e IFN- γ durante a fase indutiva de vacinação para proteção (Deepe & Gibbons, 2002).

As células fagocíticas apresentam um papel complexo na histoplasmose. As primeiras células efetoras na resistência ao *H. capsulatum* são os macrófagos. Entretanto, o ambiente intracelular dos macrófagos representa um nicho de sobrevivência para o fungo, que é internalizado via receptores CR3 num processo seguido de ativação celular e liberação de mediadores químicos participantes do mecanismo oxidativo, incluindo H₂O₂ e NO⁻, mecanismos de escape já conhecidos, garantindo sua replicação intracelular (Woods, 2003).

Como já comentado anteriormente, a imunidade mediada por células parece ser o mecanismo mais importante na proteção do hospedeiro contra patógenos intracelulares. Em contraste, o papel da imunidade humoral na proteção contra *H. capsulatum* ainda permanece obscuro. Em seres humanos, infecção com *H. capsulatum* induz o aparecimento de anticorpos IgM, duas semanas após infecção, seguidos por elevação de títulos de IgA e IgG constituindo as últimas os anticorpos fixadores de complemento e as precipitinas. Apesar da presença de anticorpos circulantes em pacientes com histoplasmose, a disseminação do fungo ainda pode ocorrer e o paciente pode sucumbir à infecção. Estes achados indicam que a presença de anticorpos não necessariamente previne a infecção, embora não se possa excluir a possibilidade de atividade de protetora (H2b).

DIAGNÓSTICO

O diagnóstico clínico da histoplasmose geralmente é baseado em dados epidemiológicos, como história de exposição a ambientes contaminados com o fungo, existência de DPOC (doença pulmonar obstrutiva crônica) pré-existente e/ou evidência de lesões radiológicas. O diagnóstico definitivo deve ser obtido através de testes laboratoriais utilizando técnicas micológicas, histopatológicas e imunológicas (Guimarães e cols., 2006).

O diagnóstico laboratorial da histoplasmose é baseado no isolamento e identificação de *H. capsulatum* a partir de materiais biológicos. Para isso, devem ser empregados, concomitantemente, o exame microscópico direto, onde o espécime clínico tratado com hidróxido de potássio (KOH) a 10% é analisado microscopicamente para a observação de células leveduriformes de *H. capsulatum*, e o cultivo. O exame direto, técnica amplamente empregada na evidenciação de agentes de outras micoses, apresenta baixa sensibilidade no diagnóstico da histoplasmose. Métodos de coloração, como o Giemsa ou Wright, também são de baixo rendimento e difícil interpretação, porque *H. capsulatum* em sua forma parasitária, além de reduzido tamanho, apresenta micromorfologia compatível com a de outros fungos patogênicos, sendo essencial o isolamento em meios de cultivo para sua identificação definitiva. Melhores resultados são obtidos com esfregaços submetidos à impregnação pela prata, embora persistam as dificuldades de interpretação (Rippon 1988).

No cultivo, método obrigatório no diagnóstico da histoplasmose, utiliza-se meios para isolamento, tais como Ágar Sabouraud e Mycosel e são incubados a 25° C durante 6 a 12 semanas. Nestas condições, o *H. capsulatum* inicialmente aparece como colônias glabras, que com o tempo tornam-se filamentosas, aéreas, algodoadas e de coloração branca, compostas microscopicamente por uma trama miceliana, com hifas hialinas septadas e micro e macroconídios em vários estágios evolutivos. A evidência da presença destes conídios sugere que o fungo seja *H. capsulatum*, mas é necessária a conversão para a forma leveduriforme, visto que fungos saprófitas do gênero *Chrysosporium* podem apresentar estruturas de propagação semelhantes às produzidas pelo agente da histoplasmose (Gaur & Lichtwardt, 1980). Entretanto, o *H. capsulatum* dentre os fungos dimórficos, é um dos de mais difícil conversão, sendo dependente não só de meios de cultivo, temperatura e metodologia especial, como também das características fisiológicas da cepa (Eissenberg & Goldman, 1991).

Para obtenção da fase leveduriforme deste fungo, deve-se fazer repiques da fase filamentosa da colônia suspeita em meios enriquecidos, tais como Agar sangue, Agar infusão cérebro-coração (BHI), ambos acrescidos de cisteína, e incubados a 35-37°C. Quando convertidos, observam-se colônias glabras, lisas, branco-amareladas, apresentando, à microscopia, leveduras ovais, unibrotantes, de morfologia uniforme (Lacaz 2002).

A histoplasmose é uma doença granulomatosa e seu diagnóstico pode ser feito também por técnicas rotineiramente usadas na histopatologia, como a Hematoxilina-Eosina (H-E), onde as leveduras aparecerão como um corpúsculo levemente basofílico, esférico, rodeado por um halo claro delimitado por uma parede celular muito fina e hialina. Em técnicas especiais, tais como os métodos de Gomori ou Grocott, ou através do Ácido Periódico de Schiff (PAS), a parede celular de *H. capsulatum* é fortemente corada, sendo visualizado como leveduras unibrotantes pequenas, ovais ou arredondadas (Rippon, 1988).

A confirmação do diagnóstico se dá pelo isolamento e identificação de *H. capsulatum* através de procedimentos microbiológicos. Entretanto, na ausência ou negatividade dos mesmos, a sorologia apresenta-se como um instrumento importante para o diagnóstico presuntivo da histoplasmose, pois avalia indiretamente a existência do patógeno no hospedeiro, através da detecção de anticorpos e/ou antígenos. As técnicas imunológicas mais utilizadas no imunodiagnóstico da histoplasmose são os testes de imunodifusão dupla (ID) e reação de fixação de complemento (RFC), para detecção de anticorpos e o radioensaio (RIA) para detecção de antígeno polissacáride de *H. capsulatum*. Mais recentemente ensaios imunoenzimáticos, tais como “western blot” e ELISA se apresentaram como bons métodos alternativos para a detecção de anticorpos na histoplasmose, particularmente nas formas agudas e disseminadas da doença (Zancopé-Oliveira e cols., 1994; Pizzini e cols., 1999; Guimarães e cols., 2004).

O principal complexo antigênico utilizado para fins diagnósticos é a histoplasmina, um filtrado de cultura de *H. capsulatum* na forma filamentosa, crescida em meio sintético. Os principais constituintes antigênicos são o antígeno C, que é um carboidrato (galactomanana, responsável pela reatividade cruzada com outros gêneros fúngicos) e os antígenos espécie-específicos H e M. Estes são potentes desencadeadores da resposta imune celular e humoral, sendo considerados imunodominantes porque são expressos durante toda a infecção e são capazes de induzir a formação de precipitinas (Heinner, 1958) e anticorpos fixadores do sistema complemento, sendo considerados marcadores

específicos para a doença em atividade em pacientes com normalidade na sua resposta imunológica.

II - HISTOPLASMA CAPSULATUM

ASPECTOS GERAIS

A histoplasmose humana pode ser dividida em duas categorias distintas, a histoplasmose clássica também conhecida como Doença de Darling, causada por *H. capsulatum* var. *capsulatum* e a histoplasmose africana que tem como agente etiológico *H. capsulatum* var. *duboisii*. O agente etiológico de interesse neste estudo é *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* pelo fato de ser encontrado mundialmente estando presente em nosso país, acometendo tanto indivíduos imunocompetentes, bem como aqueles com depressão imunológica (Londero & Wanke, 1988).

TAXONOMIA

H. capsulatum, inicialmente, foi classificado como pertencente ao filo *Deuteromycota*, classe *Hyphomycetes*, também conhecidos como *Fungi Imperfecti*, devido a se conhecer somente sua fase anamórfica (assexuada) (Chandler e cols., 1980). Atualmente esta classificação se apresenta mais completa, por ter-se reconhecido sua fase teleomórfica (sexuada). Este estágio foi primeiramente referido por Ajello & Cheng (1967), sendo denominado de *Gymnoascus demonbreunii*, mas posteriormente suspeitou-se ser esta forma um contaminante queratinofílico de solo. Coube a Kwon-Chung (1972) a demonstração da fase sexuada do *H. capsulatum*, a qual denominou de *Emmonsiiella capsulata*, pertencente ao filo *Ascomycota*, classe *Plectomycetes* e família *Gymnoascaceae*. McGinnis & Katz (1979), re-estudando esta forma sexuada, concluíram que *E. capsulata* deveria ser transferida para o gênero *Ajellomyces*, com denominação atual de *Ajellomyces capsulatus*, pertencente à família *Onygenaceae* (Kwon-Chung, 1979). Constatou-se, ainda, que o agente da histoplasmose africana, *Histoplasma duboisii*, apresenta a mesma forma de reprodução sexuada do *H. capsulatum*, com o qual faz cruzamento genético (Kwon-Chung, 1975), pertencendo ambos a uma única espécie, a qual admiti-se possuir duas variedades anamórficas: *H. capsulatum* var. *capsulatum*, agente da histoplasmose capsulata ou clássica, e *H. capsulatum* var. *duboisii*, agente da histoplasmose africana (Chandler e cols., 1980).

HABITAT

H. capsulatum tem como seu habitat natural o solo, onde é encontrado em microambientes na sua fase filamentosa. Dois parâmetros de extrema importância, a temperatura e a umidade têm sido associados ao crescimento deste fungo tanto em condições experimentais quanto na natureza.

Alguns fatores físico-químicos determinam a distribuição geográfica do *H. capsulatum* na natureza. Estes nichos geralmente apresentam condições de temperatura, umidade e pH do solo ideais à sobrevivência deste fungo (Emmons, 1949; Goodman & Larsh, 1967; McDonough e cols., 1976; Zeidberg e cols., 1955). Portanto, é freqüente a associação do isolamento do *H. capsulatum* de microambientes abrigados como cavernas, construções abandonadas, galinheiros, árvores ou quaisquer outros locais onde o solo possa estar enriquecido com fezes de morcegos, galinhas e outras aves gregárias (Cano & Hajjeh, 2001). Esta relação é devida a presença de alto teor de ácido úrico encontrado nas fezes destes animais, sendo este componente utilizado por *H. capsulatum* como nutriente e fonte de nitrogênio, imprescindível ao seu crescimento e proliferação.

A dispersão eólica é de grande importância na disseminação de *H. capsulatum* a novos microambientes. Já foi claramente estabelecido que as infecções geralmente ocorrem após o revolvimento do solo pelo homem, provocando contato com propágulos fúngicos infectantes (Chick e cols., 1981). Entretanto, pássaros e morcegos podem contribuir na disseminação de conídios viáveis. Alguns investigadores (Klite & Diercks, 1965) mostraram que morcegos podem contaminar microambientes com organismos presentes no seu conteúdo intestinal. Surtos epidêmicos ocorrem mais comumente em regiões de maior endemicidade, embora já tenham sido descritos em áreas onde a freqüência de histoplasmose é baixa (Sacks e cols., 1986). Em geral, ocorrem como microepidemias que surgem quando um pequeno número de indivíduos se expõe, simultaneamente, a um grande número de microconídios presente na corrente aérea, numa pequena área com solo contaminado. Deste modo, a histoplasmose foi primeiramente associada a ocupações rurais, porém esta infecção não pode ser descartada em residentes de regiões urbanas. Infecções de caráter ocupacional podem acometer trabalhadores com atividades em galinheiros e em cavernas ocupadas por morcegos devido à exposição ao *H. capsulatum*. Microfocos de *H. capsulatum* têm sido detectados em parques e jardins e próximo a edifícios antigos (DiSalvo & Johnson, 1979). Outro exemplo de uma epidemia

urbana de histoplasmose ocorreu em Indianápolis entre 1978 e 1979 (Wheat e cols., 1981). Algumas epidemias de histoplasmose foram detectadas após demolições, limpezas de prédios e reconstruções de pontes como a ocorrida em 2001 em Illinois (Huhn e cols., 2005) as quais, também estão associadas ao revolvimento de fezes de aves e morcegos durante a limpeza, bem como adição de material orgânico na adubação de canteiros e jardins como descrito em um surto envolvendo turistas americanos em um hotel em Acapulco, México (Taylor e cols, 2005).

MORFOLOGIA E FISIOLOGIA

H. capsulatum var. *capsulatum* se caracteriza, tanto em parasitismo como em cultivo a 37°C, como pequenos elementos leveduriformes, medindo aproximadamente 2 µm, unibrotantes. As colônias produzidas durante esta fase são semelhantes a colônias formadas por outras leveduras, com aspecto úmido, liso e de coloração branco-amarelada.

Quando presentes no solo, ou quando cultivados abaixo de 35°C, apresentam-se inicialmente como colônias filamentosas brancas, com aspecto algodado, representados microscopicamente como uma trama de hifas hialinas, septadas e ramificadas, além de estruturas de propagação, os conídios, que estão presente tanto lateralmente como nas extremidades terminais das hifas. Estes propágulos apresentam-se em forma de macroconídios, estruturas que possuem de 8 a 16 µm de diâmetro, de parede lisa, que com o envelhecimento da colônia, desenvolvem numerosas projeções, semelhantes a tubérculos, em toda a sua superfície, sendo denominado como macroconídios tuberculados (Pine, 1960); e microconídios, estruturas ovaladas de 2 a 5 µm de diâmetro, com paredes lisas, nascidos na extremidade de curtos conidióforos em ângulo reto com a hifa vegetativa. Estas estruturas de propagação apresentam grande resistência aos fatores adversos do meio ambiente, são facilmente carregados por correntes aéreas, com isso dispersando-se a grandes distâncias (Chick e cols, 1981). Os microconídios são os elementos infectantes mais freqüentes, pois possuem tamanhos reduzidos e penetram mais facilmente nos alvéolos pulmonares, assim como também por se destacarem das hifas com mais facilidade (Larsh, 1975). Dessa forma, o fungo é bem adaptado a parasitar macrófagos, onde pode sobreviver e multiplicar dentro de um compartimento fagolisossomal modulando a acidificação, tornando o próximo do pH neutro, facilitando sua sobrevivência intracelular em células do hospedeiro (Woods, 2002).

Quanto à morfologia de colônia, *H. capsulatum* na sua forma miceliana pode ser dividido em 2 tipos: tipo A ("albino"), cujas colônias se apresentam como micélio aéreo algodinoso, branco, com pouca produção de estruturas de propagação, e o tipo B ("marron"), que possui hifas finas, pouco filamentosas e grande número de macro e microconídios. Já na sua forma leveduriforme são reconhecidas colônias rugosas ("wild-type colony") e lisas (variante espontânea) (Eissenberg & Goldman, 1991).

H. capsulatum possui dois "mating types" (+ e -) (Kwon-Chung e cols, 1974), os quais aparecem em igual frequência entre cepas isoladas de solo. Entretanto, entre as cepas isoladas de casos clínicos, o "mating type -" é muito mais comum (Kwon-Chung e cols., 1974).

Como a parede celular de *Blastomyces dermatitides* e *Paracoccidioides brasiliensis*, a parede celular da fase leveduriforme de *H. capsulatum* contém α -glucana, e a da fase miceliana contém β -glucana. A parede celular da levedura é uma estrutura laminar que tem aproximadamente 100 nm em espessura, mas a parede da hifa é de aproximadamente 30 nm de espessura. Com base em estudos de microscopia eletrônica, tem-se proposto um modelo estrutural de parede celular da forma leveduriforme de *H. capsulatum* onde galactomananas formam uma camada externa (Reiss, 1986), α -1,3 glucanas se apresentam como fibrilas curtas embebidas em proteínas, formando a camada intermediária, e a camada interna é composta por rede fibrilar de quitina. A principal hexose nas formas filamentosas se apresenta como polímeros β -1,3 glucana, diferenciando a composição da parede celular nas duas formas evolutivas deste fungo.

A classificação de *H. capsulatum* em quimiotipos e sorotipos também foi baseada na composição da parede celular deste fungo. O quimiotipo 1 apresenta elevado conteúdo de quitina, níveis raramente detectáveis de α -1,3 glucana e alta concentração de proteínas quando comparados ao quimiotipo 2 que apresenta reduzida taxa de quitina e alta concentração de glicose como polímero α -1,3 glucana (Domer e cols., 1967; Domer, 1971). Quatro fatores e cinco sorotipos (1,2; 1,4; 1,2,3; 1,2,4; 1,2,3,4) foram demonstrados através de reações de imunofluorescência e adsorção. Os fatores 1 e 4 são compartilhados com *B. dermatitidis* e provavelmente estão associados a galactomanana, enquanto que os outros são específicos para *H. capsulatum* (Kaufman & Kaplan, 1961; Kaufman & Blumer, 1966).

FATORES DE VIRULÊNCIA

Seres humanos estão constantemente expostos a diferentes microorganismos, entre eles os fungos, mas somente um número limitado entre os últimos pode causar doença. Vários fatores de virulência responsáveis pela sobrevivência destes microorganismos em parasitismo têm sido descritos na literatura especializada, sendo alguns bem determinados como parede celular e estruturas complementares responsáveis pela adesão aos tecidos dos hospedeiros, a produção de fosfolipases, proteases e elastases capazes de causar dano tecidual e quebrar as defesas do hospedeiro, a produção de catalases, enzimas que decompõem H_2O_2 em H_2O e O_2 , atuando contra os mecanismos oxidativos, tornando a fagocitose, por células efectoras dos hospedeiros, mais eficiente (Brummer & Stevens, 1984), a capacidade de fazer “switch” a várias vias metabólicas, requerimentos fundamentais para a sobrevivência intracelular, a termotolerância (capacidade de crescer a $37^\circ C$), a qual é pré-requisito para disseminação hematogênica. Fungos dimórficos, entre eles o *H. capsulatum*, fazem morfogênese conforme o ambiente em que se encontram (Ignatov & Keath, 2002).

DIMORFISMO

O dimorfismo é um aspecto importante na patogênese, pois a forma filamentosa é infecciosa, mas é a forma leveduriforme que sobrevive intracelularmente e causa doença (Nemecek e cols., 2006). A mudança de temperatura de $25^\circ C$ para $37^\circ C$ é estímulo suficiente para o dimorfismo, mas outras condições ambientais como presença de cisteína e cAMP podem influenciar na morfogênese de *H. capsulatum*. Este dimorfismo é essencial para a virulência, como evidenciado em culturas mantidas a $25^\circ C$ tratadas quimicamente, incapazes de fazerem a conversão para a fase leveduriforme que se tornam avirulentas (Medoff e cols., 1986).

O dimorfismo é um dos sistemas mais bem estudados na regulação gênica de *H. capsulatum* e sua patogênese. Alguns fatores parecem ser de extrema importância para o parasitismo intracelular de *H. capsulatum* incluindo entre os quais vários genes expressos predominantemente na fase leveduriforme tais como o gene *yPS-3* (Keath e cols., 1989; Keath & Abidi, 1994), gene *cdc-2* (Di Lallo e cols., 1994), gene *Ole1* (Gargano e cols., 1995), genes atuantes no metabolismo do enxofre (Hwang e cols., 2003). Outras moléculas

importantes são C-15 hidrolase (Hwang e cols., 2003), α -1,3 glucana, polissacáride específico da parede celular da fase leveduriforme (Kanetsuna e cols., 1974) e uma proteína ligante de cálcio (CBP) (Batanghari & Goldman, 1997) e seu gene codificante *CBP1* (Patel e cols., 1998). Recentemente foi demonstrado através de experimentos de interrupção gênica que a proteína CBP favorece a sobrevivência do fungo no interior de células fagocíticas (Sebghati e cols., 2000), e que a inativação da α -1,3 glucana atenua a capacidade de células leveduriformes de *H. capsulatum* destruírem macrófagos (Rappleye e cols., 2004), sendo ambos provados serem fatores de virulência do *H. capsulatum*.

Genes específicos da fase filamentosa também têm sido identificados tais como gene *TUB1* e *TUB2* (Harris e cols., 1989), gene *MS8* (Tian & Shearer, 2001; Tian & Shearer, 2002) e os genes *CAT A* e *CAT B* (Johnson e cols., 2002). Entretanto seu papel funcional ainda não foi caracterizado.

DEFESAS OXIDATIVAS

Catalases, enzimas que decompõem H_2O_2 em H_2O e O_2 são encontradas em todos os organismos aeróbicos e seu papel de proteção contra os mecanismos oxidativos é bem conhecido. Com isso, estas enzimas poderiam atuar como fator de virulência para diversos microrganismos. (Maresca & Kobayashi 2000)

Um dos mais importantes fatores de virulência em fungos patogênicos é a capacidade de resistir a reativos oxigenados (ROS) e a reativos de nitrogênio (RNS). Catalases são importantes na proteção contra peróxidos. *H. capsulatum* possui três genes que codificam catalases: *CATA*, *CATB*, e *CATP*. Sendo as duas primeiras constitutivas. *CATA* está presente na fase filamentosa ou quando exposta a H_2O_2 (Johnson e cols, 2002). Este papel tem sido demonstrado em diversos fungos como, por exemplo, em *Aspergillus fumigatus* (Paris e cols, 2003). O envolvimento de mecanismos oxidativos na patogênese de fungos tem sido demonstrado em ensaios *in vitro*, bem como o papel da catalase na inibição da fagocitose por células efectoras dos hospedeiros contra alguns fungos (Brummer & Stevens, 1995). Estes achados sugerem que catalases produzidas endogenamente podem proteger os fungos durante a fagocitose. O antígeno M de *H. capsulatum* é uma glicoproteína, com atividade de catalase (Hamilton e cols., 1990; Zancopé e cols; 1999; Johnson e cols., 2002), que poderia participar diretamente na conversão dos reativos intermediários do oxigênio (principalmente H_2O_2 e radical superóxido) em compostos inertes, inócuos para a célula.

H. capsulatum, quando fagocitado pelos macrófagos, poderia secretar catalases no interior dos fagolisossomos e assim impedir a oxidação das estruturas fúngicas celulares, sendo assim um mecanismo de escape eficiente. Recentes estudos realizados por Maldonado e cols. (comunicação pessoal) demonstraram que o antígeno M tem papel funcional como catalase, mas não evidenciaram uma direta correlação desta função na patogênese da histoplasmose. Com isso, o estabelecimento do real papel da catalase como fator de virulência durante o mecanismo de conversão de *H. capsulatum* de sua forma filamentosa para a leveduriforme, bem como durante o estabelecimento da infecção através de mecanismos de escape ainda permanece obscuro.

Mecanismos de defesas de *H. capsulatum* a RNS são identificados como uma oxidase alternativa e a enzima óxido nítrico redutase. Oxidases alternativas, as quais são resistentes ao óxido nítrico, podem contribuir para a resistência a RNS. O gene AOX1 de *H. capsulatum* codifica uma oxidase alternativa como evidenciado por experimentos de expressão heteróloga em *Saccharomyces cerevisiae* (Johnson e cols., 2003). A expressão de AOX1 em *H. capsulatum* aumenta a resposta ao RNS assim como ao stress por H₂O₂ (Nittler e cols., 2005). *H. capsulatum* também codifica o gene NOR1 (óxido nítrico redutase P450) o qual é induzida em leveduras expostas a RNS (Nittler e cols., 2005)

MELANINA

Diversos fungos produzem melanina, inclusive os fungos dimórficos, contribuindo assim para a virulência desses fungos patogênicos. As melaninas são polímeros hidrofóbicos que conferem proteção ao fungo contra condições extremas como fagócitos e radiações ionizantes, e ainda, pode proteger o patógeno contra a ação de agentes antifúngicos (Gomez & Nosanchuk, 2003; Ikeda R e cols 2003). A produção de melanina é uma característica amplamente utilizada para a identificação de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* em laboratório. Este pigmento é revelado pela cor escura (marrom a preto) das colônias, quando o fungo cresce em meios que contêm compostos fenólicos ou difenólicos na sua composição, como ágar semente de girassol (*Helianthus annuus*), ágar alpiste (*Guizotia abyssinica*), ágar batata e cenoura, e meios quimicamente definidos, como ágar L-dopa e ágar ácido caféico. A enzima fenol-oxidase ou lacase presente na levedura atua sobre esses substratos, gerando quinonas como produtos, que sofrem um processo de autopolimerização, transformando-se em melanina. Esta fica retida

na parede celular do fungo, sendo responsável pela expressão do pigmento escuro mostrado pelas colônias (Casadevall e cols 2000).

Entre os fungos que tem a capacidade de produzir melanina durante a infecção estão os dimórficos *H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, *P. brasiliensis*, e *Sporothrix schenckii* (Nosanchuk e cols, 2002; Gomez e cols., 2001; Morris-Jones e cols., 2003; Nosanchuk e cols., 2004). Melanização de leveduras de *P. brasiliensis* reduz a fagocitose por macrófagos em cultivo (da Silva e cols., 2006).

No *Histoplasma capsulatum*, quando crescido em meio quimicamente definido ocorre a produção de conídios e leveduras escuras. Na presença de -3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) ou (-)-epinefrina produz células melanizadas, sendo ainda reconhecida em ensaios utilizando monoclonais e soros policlonais, indicando que a melanina pode ter um papel muito importante na patogenia da histoplasmose (Nosanchuk e cols 2002).

PRODUTOS SECRETADOS

Fungos secretam produtos que podem alterar características do meio, adquirir nutrientes e atuarem como fatores de virulência. Entre este, podemos citar *P. brasiliensis* em sua forma leveduriforme, secretor da glicoproteína gp70 e gp43, a qual é detectada por soros de pacientes com paracoccidioidomicose (da Silva e cols., 2004). *H. capsulatum* também secreta vários componentes antigênicos, quando crescido na fase miceliana em meio quimicamente definido.

Com o propósito de elucidar os mecanismos de virulência e patogênese deste fungo, tem se investigado o papel dos antígenos secretados e utilizados no diagnóstico da histoplasmose. Inicialmente, com o objetivo de tornar o diagnóstico da histoplasmose mais específico, aplicaram-se métodos de otimização à utilização deste complexo antigênico. Purificação por métodos cromatográficos e tratamento com finalidade de retirar a porção glicosídica destes antígenos foram propostos (Zancopé-Oliveira e cols., 1993; Zancopé-Oliveira e cols., 1994). Os antígenos H e M, em sua forma nativa, são glicoproteínas com peso molecular de 120 e 94 kDa respectivamente, contendo epítomos protéicos específicos e glicosídicos ligados à porção N-terminal. Deglicosilações enzimáticas ou químicas pelo metaperiodato de sódio (NaIO₄) provaram aumentar a especificidade em métodos imunoenzimáticos, reduzindo a reatividade cruzada com outros fungos (Zancopé-Oliveira e cols., 1994a; Pizzini e cols., 1999).

O antígeno M tem massa molecular estimada em torno de 94 kDa (Zancopé-Oliveira e cols., 1994), uma primeira evidência de ser uma possível catalase (Hamilton e cols., 1990), uma vez que as catalases fúngicas são moléculas grandes e suas massas variam entre 80 a 97 kDa sendo distintas das outras catalases produzidas por outros organismos eucarióticos. Com isso, o gene codificador do antígeno M foi caracterizado por clonagem e seqüenciamento. Comparação da seqüência total de aminoácidos com catalases fúngicas conhecidas de *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *Eimericella nidulans* e *Saccharomyces cerevisiae* demonstraram respectivamente 61.2, 53.2, 60.4 e 21.7% de similaridade ao nível de aminoácidos sugerindo que sua natureza biológica seria uma catalase (Zancopé-Oliveira e cols., 1999). Mais recentemente, a modelagem computacional desta proteína, bem como a avaliação da atividade de catalase do antígeno M em diversas frações celulares provenientes de *H. capsulatum* parece confirmar esta hipótese (Guimarães 2006).

Também tem sido descrito que este antígeno é secretado e poderia estar atuando como fator de virulência de *H. capsulatum*. Este fungo, quando fagocitado pelos macrófagos, poderia secretar esta proteína no interior dos fagolisossomos e assim impedir a oxidação das estruturas fúngicas celulares, sendo assim um mecanismo de escape eficiente. Ainda sabe-se pouco sobre a real atividade biológica do antígeno M e sobre sua provável participação nos eventos relacionados à patogênese. Estudos iniciais foram desenvolvidos com o intuito de avaliar o papel do antígeno M na patogênese da histoplasmose, usando análise por imunoblot de um extrato de parede celular e membrana (CW/M) obtido de fase leveduriforme. Nesta etapa, foi provado que os anticorpos monoclonais gerados contra o antígeno M recombinante reconheceram este antígeno no extrato utilizado (Guimarães, 2006). Além disso, estudos de imunolocalização por imunofluorescência também revelaram que os monoclonais reconheciam proteínas na superfície da levedura (dados não publicados).

III – OUTROS ASCOMICETOS DE INTERESSE MÉDICO

Candida albicans* e *C. parapsilosis

Candida spp. é o agente etiológico da candidíase e em condições predisponentes torna-se um patógeno potencial, causando doença infecciosa no hospedeiro suscetível (Latouche e cols., 1997, Merlino e cols., 1998). Dessa forma, manifesta-se como um agente oportunista em diferentes sítios (Pfaller e cols, 1994).

Candida albicans é a espécie mais conhecida do gênero e considerada de maior interesse clínico por ainda corresponder ao principal agente de infecções fúngicas em humanos. Porém, as espécies não-*albicans* são emergentes em várias partes do mundo e o aumento desses agentes associados a infecções pode estar associado a maior expressão dos fatores de virulência (Cheng e cols., 2005).

Candida parapsilosis tem se tornado um patógeno de grande interesse médico, sendo hoje a segunda maior espécie de *Candida* isoladas de pacientes com fungemia nos Estados Unidos da América, Canadá, América Latina e alguns hospitais na Europa (Fridkin e cols., 2006; Krcmery & Kocacicova, 2000; Pagano e cols., 1999; Pfaller e cols., 2001). Esta espécie é um comensal da pele o que propicia a transmissão pelas mãos dos profissionais de saúde. Com isso, a sua disseminação através da corrente sanguínea é amplamente relacionada a procedimentos invasivos, com a quebra das barreiras naturais do corpo, tais como a utilização de cateteres intravasculares e nutrição parenteral (Cheng e cols., 2005). Dados encontrados na literatura especializada demonstram que *C. parapsilosis* é a segunda espécie de *Candida* responsável por candidemia (Forrest e cols., 2008). Em uma recente revisão de *Candida* spp isoladas de hemoculturas, obtidas por mais de 10 anos de diversas unidades terciárias de saúde no Kuwait, *C. parapsilosis* foi identificada em 31% das infecções e foi a segunda espécie mais freqüente nesta população, sendo a maioria (70%) isolada de neonatos. (Asadzadeh, e cols, 2007).

Candidíase é uma das mais importantes infecções fúngicas oportunistas em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Shen e cols., 2007). A incidência de candidíase orofaríngea varia entre 0-62% em indivíduos soropositivos para HIV; entre 43-78% em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida classificados no grupo de pacientes com complexo relacionada a AIDS; e entre 54-93% nos pacientes com AIDS (Diz Dios e cols, 1999). Esofagites por *Candida* spp. é uma das mais comuns infecções oportunistas fúngicas associada a AIDS (Manfredi e cols., 2007). A candidíase vulvovaginal é um problema emergente em mulheres infectadas pelo HIV. Além disso, têm-se relatado que aproximadamente 75% das mulheres HIV positivas ou não, desenvolverão um episódio de candidíase vulvovaginal durante sua vida (Fidel e cols., 1996).

O aumento das infecções fúngicas nosocomiais comprometendo múltiplos sítios, como a corrente sanguínea, ferimentos cirúrgicos, trato respiratório baixo e trato urinário têm sido documentados mundialmente. Durante a década de 80 foi registrado um aumento no percentual de aproximadamente 500% no número de fungemias nosocomiais (Colombo

e cols, 1999). Entre 1990 e 1996 várias espécies do gênero *Candida* emergiram quando associadas como agentes de infecções nosocomiais. Durante este período, o órgão responsável pela vigilância e controle de patógenos nos EUA (SCOPE- Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic Importance) classificou *Candida* spp. como o 4º. patógeno causador de infecções da corrente sanguínea, representando 8% de todas as infecções nosocomiais naquele país (Pfaller e cols., 2000). Na literatura, verificam-se dados que comprovam a diferença na distribuição dessas espécies, sendo observada uma variação entre continentes, países (Pfaller e cols., 2000), estados e instituições (Pfaller e cols., 1998), estando também associada à doença de base (Colombo e cols 1995), ao uso de antifúngicos (Abi-Said e cols., 1997) e a cateterização (Pfaller e cols., 2000).

O aparecimento e o aumento das infecções fúngicas causadas por *Candida* spp. e por outras leveduras podem ser atribuídos a muitos fatores predisponentes que provavelmente ajudam a alterar o perfil epidemiológico das candidíases. Esses fatores incluem alterações nos mecanismos da imunidade inata e adquirida (Espinel-Ingroff e cols., 1995), os regimes terapêuticos imunossupressivos, a neutropenia (Isenberg e cols., 1989; Bart-Delabesse e cols., 1995), a cateterização por longos períodos, o uso de antibióticos de amplo espectro (D'Antonio e cols., 1998), o aumento no uso de antifúngicos (Fidel e cols., 1999) e a prolongada sobrevivência dos indivíduos imunologicamente comprometidos (Colombo e cols., 1995).

Poucos são os estudos relacionados à virulência e patogenicidade de *C. parapsilosis* quando comparados com os realizados em *C. albicans* e *Candida tropicalis*. Recentemente, Jayatilake e cols. (2006) demonstraram diferenças evidentes na capacidade de invasão em células epiteliais orais reconstituídas provenientes de seres humanos. Em outro estudo *in vitro* utilizando tecidos reconstituídos infectados com *C. parapsilosis* foram examinados um inibidor de lipase, Ebelactone B e um inibidor de protease, Pesptaina A, com efeito protetor aos tecidos. Ambos reduziram a destruição do epitélio e da epiderme reconstruída, sendo este um excelente modelo para estudos em interação parasita-hospedeiro e estudos de virulência (Gacser e cols, 2007)

O diagnóstico presuntivo da candidíase pode ser feito através do exame direto do espécime clínico. Em esfregaços de exsudatos, *Candida* spp. é visualizada como uma levedura, oval, com brotamento, medindo 2µm a 3µm x 4µm a 6µm. Em espécimes clínicos (biópsia, urina, sangue, secreções mucosas) podem ser observados os blastoconídios que consistem em células-filhas que às vezes permanecem ligadas à célula-mãe formando cadeias ou pseudo-hifas, cujo conjunto é o pseudomicélio, também podem

ser observadas hifas verdadeiras com blastoconídios justasseptais. Já o diagnóstico definitivo de uma espécie somente é dado após o isolamento de leveduras em cultivo e classificação com base em suas características fenotípicas, como fisiologia e morfologia, entre outros (Rippon 1988).

As diferentes espécies do gênero *Candida* têm sido classificadas com base nas suas características morfológicas, fisiológicas e perfil bioquímico. Os caracteres fisiológicos estão associados com uma variedade de açúcares, os quais podem ser utilizados como fonte de carbono, ou com a assimilação de compostos nitrogenados. Estes açúcares são a base para a produção de numerosos conjuntos *kits* diagnósticos, como API 20 C e Vitek cuja função é auxiliar na identificação exata das leveduras que são isoladas de materiais clínicos (Fenn JP e cols 1994).

Sporothrix schenckii

A esporotricose é uma das micoses mais comumente encontradas entre o grupo das micoses subcutâneas, com distribuição mundial (Al-Tawfiq & Wools, 1998) ocorrendo principalmente em países de clima tropical e subtropical, tendo no presente maior número de casos relatados na América do Norte (Kwon-Chung & Bennett, 1992), em seguida a América Latina com relato na maior parte dos países (Diaz, 1989), no sul da África, França, Japão (Rippon, 1988), China (Jin e cols, 1990).

Sporothrix schenckii é o agente etiológico da esporotricose, cujo habitat natural, pode ser vegetação, madeira em decomposição ou não, excreções de animais e solo, é encontrado em vida saprofítica nestes substratos (Morris-Jones, 2002). Supõe-se que *S. schenckii* esteja, nesta condição, na fase filamentosa, já que à temperatura ambiente, *in vitro*, se apresenta sob esta forma. Por esse motivo, pensava-se ser esta a forma infectante do fungo. Entretanto, trabalhos experimentais comprovam que a forma leveduriforme também é capaz de causar lesão (Tachibana e cols., 1999).

S. schenckii é um fungo dimórfico. Em vida saprofítica ou em cultivo a 25°C se apresenta na forma filamentosa, como hifas hialinas, septadas, com conídios unicelulares de dois tipos: hialinos a marrom, pequenos, ovóides surgindo de denticulos distintos na porção apical de conidióforos, e conídios demáceos grandes, ovóides, de parede grossa sendo observados ao longo da hifa, o que o distingue de outras espécies não patogênicas (St-Germain & Summumbell, 1996). Em parasitismo ou a 37°C o *S. schenckii* se apresenta como levedura unicelular ovalada, globosa e em forma de charuto, podendo ter um ou mais

brotamentos (Chandler e cols, 1980). O estágio sexual ainda não foi observado, mas acredita-se que pertença ao gênero *Ophiostoma* (O'Reilly & Altman, 2006)

Geralmente a infecção por *S. schenckii* segue-se após inoculação do fungo na pele, por ocasião de um trauma com espinhos, farpas, arranhadura, mordedura ou ainda através da contaminação de solução de continuidade cutânea pré-existente (Marques e cols, 1993; Jin e cols, 1990), alcançando os tecidos cutâneo e subcutâneo, limitando-se aquém dos linfonodos regionais. Indivíduos que trabalham com solo ou plantas, tais como, lavradores, jardineiros, agricultores, entre outros, são mais suscetíveis ao contato com este agente infectante, desenvolvendo essa micose com maior frequência. Habitualmente, os sítios de infecção são os membros inferiores e superiores (Rippon, 1988). De forma mais rara, *S. schenckii* também pode ser adquirido por inalação de conídios causando manifestações clínicas similares a de outros fungos patogênicos dimórficos, agentes de micoses sistêmicas. As similaridades entre as manifestações sistêmicas da esporotricose com as apresentadas por outras micoses sistêmicas foram enfatizadas por Lynch (1970), que também reconheceu a importância de *S. schenckii* como um fungo oportunista.

O aspecto clínico da esporotricose é muito variado. O primeiro sinal da doença é o aparecimento de um nódulo subcutâneo pequeno, duro, móvel, não aderido; podendo evoluir para lesões linfocutâneas, nas quais se desenvolvem múltiplos nódulos subcutâneos ao longo dos canais linfáticos locais, que podem supurar, ulcerar e drenar pus. A forma cutânea fixa se difere desta, não alcançando o canal linfático local, permanecendo como uma lesão única. A forma mucocutânea onde há o acometimento da mucosa sem outras lesões, é relativamente rara. A forma pulmonar primária é muito rara e ocorre após inalação de conídios. Clinicamente é muito parecida com a tuberculose, onde a área apical do pulmão parece ser o sítio de infecção mais frequente (Rippon, 1988). Já foram descritos casos de disseminação hematogênica desta micose, atingindo ossos, articulações, pele, olhos, sistema nervoso central, ou trato genito-urinário (Kwon-Chung & Bennett, 1992). A forma disseminada não decorre exclusivamente da forma pulmonar primária, mas também pode evoluir de uma lesão cutânea ou por ingestão de conídios. Geralmente resulta em lesões cutâneas difusas com comprometimento de um ou mais órgãos ou sistemas. A forma disseminada ocorre mais frequentemente em indivíduos imunocomprometidos, tais como, alcoólatras, diabéticos, com DPOC, leucemia, transplantado de órgão ou medula óssea ou qualquer indivíduo sob corticoterapia e pacientes infectados pelo HIV (Al-Tawfiq & Wools, 1998; Rocha e cols., 2001).

Em relação aos fatores de virulência de *S. schenckii*, existem poucos estudos, sendo que nenhum deles está relacionado com isolados de pacientes portadores de HIV. Alguns candidatos à fatores de virulência têm emergido de recentes investigações como a termotolerância. De fato, isolados com capacidade de crescimento a 35°C, mas não a 37°C não são capazes de causar a esporotricose na sua forma linfangítica nodular, limitando-se a infecções cutâneas fixas. Já os isolados de lesões linfangíticas, disseminadas e extracutâneas apresentam tolerância e crescimento a temperatura de 37°C (Kwon-Chung & Bennet, 1992). Recentemente, foi demonstrado que isolados de *S. schenckii* provenientes da Colômbia, onde a forma clínica predominante da esporotricose é a cutânea fixa, apresentam alta taxa de inibição do crescimento a 35 e a 37°C, ao contrário de cepas do México e da Guatemala, onde predominam as formas linfangíticas (Mesa-Arango e cols., 2002).

S. schenckii também apresenta a capacidade de sintetizar melanina. Este composto está altamente relacionado à virulência de diversos fungos (Jacobson, 2000). A produção de melanina nos conídios de *S. schenckii* ocorre através da via do 1,8 – dihidroxinaftaleno penta acetato (Romero-Martinez e cols., 2000). Embora macroscopicamente somente a forma filamentosa do fungo pareça ser melanizada, recentemente foi demonstrada a produção de melanina por *S. schenckii* também nas formas leveduriformes, tanto *in vitro* como durante a infecção. As hifas, porém, não são capazes de sintetizar melanina, somente os conídios (Morris-Jones e cols., 2003). Foi demonstrado que a melanização dos conídios torna-os mais resistentes à fagocitose por macrófagos, o que favoreceria a instalação da infecção, já que estas são as partículas infectantes do fungo (Romero-Martinez e cols., 2000).

O papel de diferentes proteínas na virulência de diversos fungos já está bem caracterizado. Entretanto, o papel das diferentes proteínas e, sobretudo de enzimas, de *S. schenckii* na virulência deste fungo, permanece obscuro. Acredita-se que fosfatases ácidas atuem na interação fungo-macrófago, embora até o presente não existam evidências confirmatórias desta suposição (Hogan e cols., 1996). Casadevall, em recente revisão (2006) cita proteases, lipases e urease como enzimas relacionadas à virulência microbiana, mas nada a respeito se sabe em *S. schenckii*.

O diagnóstico laboratorial da esporotricose só é realizado após o isolamento e identificação de seu agente em cultura. As leveduras presentes no material clínico são pequenas, escassas e de difícil observação no exame direto, excetuando nos gatos domésticos onde há uma abundante carga parasitária, o que possibilita a visualização de células leveduriformes características de *S. schenckii*. Confeccionar um esfregaço do pus ou imprint da biópsia para corar, viabiliza a observação desta levedura. A coloração mais

usada para esfregaços é o Giemsa. Para cortes histológicos costuma-se usar impregnação pela prata, PAS e HE, porém a menos que o material esteja muito rico, não é fácil a observação de leveduras. Geralmente as leveduras de *S. schenckii* têm aspecto variando do globoso a ovalado com brotamentos claveiformes, no interior de macrófagos, e algumas vezes, nota-se presença de corpo asteróide, substância eosinofílica de forma radiada constituída de complexo antígeno-anticorpo, que se deposita na parede de alguns fungos (Chandler e cols, 1980).

O isolamento de *S. schenckii* é facilmente obtido semeando o material clínico sem um tratamento prévio, em meio de Sabouraud-ágar com cloranfenicol para evitar contaminação bacteriana, adicionando ou não de ciclohexamida, droga que reduz a contaminação por alguns fungos saprobas. Após 5 a 7 dias já se pode observar o crescimento de colônias filamentosas, hialinas com aspecto úmido que lentamente começam a apresentar uma coloração escura no centro da colônia e vai aumentando centrifugamente ou permanece hialina. Observando o crescimento de uma colônia com esse aspecto faz-se o teste de termo-conversão da colônia em meio de BHI (Brain Heart Infusion) ágar com extrato de levedura, distribuindo um pequeno inóculo por toda a superfície do meio de cultura e incubando a 37°C por 5 dias. A colônia após a conversão do fungo à levedura assumirá um aspecto cremoso de cor bege amarelado. Na fase filamentosa deve-se montar uma cultura em lâmina a fim de fazer um estudo mais detalhado da microscopia das estruturas fúngicas. A presença de dois tipos de conídios: hialinos a marrom, de parede fina, em conidióforo do tipo simpodial e conídios escuros de paredes espessas, dispostos ao longo da hifa, bem como a sua conversão à fase leveduriforme, identifica a amostra como *S. schenckii*. Na fase leveduriforme, para montar a lâmina basta tocar a colônia com a alça de platina para que não haja uma quantidade muito grande de levedura e dificulte a sua observação. *S. schenckii* em cultura à 37°C apresenta leveduras hialinas, pequenas, globosas com um ou mais brotamentos claveiformes. A confecção das lâminas na fase filamentosa e leveduriforme é feita com lactofenol-azul de algodão e são observadas em aumento de 100 e 400X (Rippon, 1988).

Saccharomyces cerevisiae

Saccharomyces cerevisiae é um dos microorganismos mais bem estudados na ciência básica e é também amplamente utilizado na indústria alimentícia para a produção de bebidas alcoólicas e panificação. A levedura *S. cerevisiae* apresenta forma oval ou

cilíndrica, se reproduz assexuadamente por brotamento, porém pode haver mudanças na morfologia das células, com a formação de pseudohifas. Na forma sexuada esse fenômeno é conhecido como filamentação, sendo considerada uma forma de adaptação às condições de estresse no meio (Ceccato-Antonini 2008).

Desde de 1876, quando Pasteur demonstrou a participação essencial de leveduras vivas nos processos de fermentação, muitas pesquisas foram feitas para descobrir todas as reações bioquímicas relacionadas a este processo. Com o advento da biologia molecular, o fungo *S. cerevisiae* tornou se alvo de inúmeras pesquisas, por ser um excelente modelo eucarioto, uma vez que há muitas evidências que apontam semelhanças em diversos mecanismos de leveduras e eucariotos complexos. *S. cerevisiae* é um dos eucariotos mais investigados e muitos detalhes moleculares de células complexas foram desvendados através da análise bioquímica e genética em diferentes áreas da biologia celular e molecular usando esta levedura como modelo. Em 1996 *S. cerevisiae* teve todo o seu genoma seqüenciado (Fernandes, 2005).

S. cerevisiae é considerada uma levedura não patogênica em indivíduos imunocompetentes, adultos, porém relatos esporádicos de fungemia causadas por *S. cerevisiae* são cada vez mais freqüentes. Indivíduos expostos podem conter essas leveduras na microbota normal ou transiente do trato gastrointestinal. Porém o potencial patôgenico dessas espécies, em pacientes imunocomprometidos, foi demonstrado em vários relatos de casos bem descritos na literatura especializada. Infecções de corrente sanguínea, orofaringe e mucosa de estomago foram descritas. Na Europa, *S. cerevisiae* foi descrito como agente de infecções pulmonares em padeiros. Em várias partes do mundo são descritos quadros de vulvovaginite por cepas resistentes aos antifúngicos. No tecido do hospedeiro, *Saccharomyces sp* é semelhante a *Candida sp*. A identificação de gênero e espécie segue a orientação descrita para leveduras, apoiando-se em aspectos micromorfológicos e características fisiológicas. A formação de ascosporos é típica do gênero *Saccharomyces* e constitui requisito para sua classificação (Davey e cols., 2002).

OBJETIVO GERAL

Considerando o cenário ainda obscuro quanto aos mecanismos de virulência e patogênese de *H. capsulatum*, este trabalho tem como objetivo estudar um possível mecanismo de transporte de macromoléculas que possam participar da patogênese da histoplasmose através da identificação, purificação e caracterização de vesículas produzidas por *H. capsulatum*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtenção e purificação de vesículas no sobrenadante de culturas de *H. capsulatum* e de outros ascomicetos (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *S. schenckii* e *S. cerevisiae*).
- Identificação de vesículas de *H. capsulatum* e caracterização das macromoléculas presentes em seu interior.

ARTIGO

Mecanismo de transporte de proteínas e lipídeos em *HISTOPLASMA CAPSULATUM* e outros ascomicetos.

O artigo foi aceito pela revista “Cellular Microbiology” em abril de 2008, e está sendo apresentado nesta dissertação no formato requerido pelo periódico científico.

Neste estudo, demonstramos que *H. capsulatum* produz vesículas que transportam diversas moléculas envolvidas em processos de virulência, sinalização e patogênese sendo secretadas extracelularmente. *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *S. schenckii* e *S. cerevisiae*, também produzem vesículas, suportando a proposta de que este processo de transporte possivelmente é comum aos ascomicetos.

26 **Summary**

27 Vesicular secretion of macromolecules has recently been described in the
28 basidiomycetes *Cryptococcus neoformans* raising the question as to whether
29 ascomycetes similarly utilize vesicles for transport. In the present study, we examined
30 whether the clinically important ascomycetes *Histoplasma capsulatum* produced
31 vesicles and utilized these structures to secrete macromolecules. Transmission
32 electron microscopy (TEM) showed transcellular secretion of vesicles by yeast cells.
33 Proteomic and lipidomic analyses of vesicles isolated from culture supernatants
34 revealed a rich collection of macromolecules involved in diverse processes including
35 metabolism, cell recycling, signaling, and virulence. The results demonstrated that *H.*
36 *capsulatum* utilizes a sophisticated trans-cell wall vesicular transport secretory
37 mechanism to promote virulence. Additionally, TEM of supernatants collected from
38 *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Sporothrix schenckii*, and
39 *Saccharomyces cerevisiae* documented that vesicles are similarly produced by
40 additional ascomycetes. The vesicles from *H. capsulatum* reacted with immune
41 serum from patients with histoplasmosis providing an association of the vesicular
42 products with pathogenesis. The findings support the proposal that vesicular
43 secretion is a general mechanism in fungi for the transport of macromolecules related
44 to virulence and that this process can be a target for novel therapeutics.

45 **Author Summary**

46 The phylum Ascomycota is a highly diverse group of fungi that includes the human
47 pathogen *Histoplasma capsulatum*. In this work we studied whether vesicular
48 transport of secreted macromolecules, first described in the basidiomycete fungus
49 *Cryptococcus neoformans*, is utilized by *H. capsulatum*. Although from different
50 phyla, we found that *H. capsulatum* utilizes similar sophisticated processes to
51 transport or release molecules via trans-cell wall vesicular transport secretory
52 mechanism as we found with *C. neoformans*. The fungi employ this complex
53 process for secretion of important molecules of defense and survival. We also studied
54 other ascomycetes, including *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Sporothrix*
55 *schenckii*, and *Saccharomyces cerevisiae*, and found that these fungi also use
56 vesicular secretion for transport or release of important macromolecules. Finally, we
57 showed that the products of *H. capsulatum* vesicles were immunoreactive with sera
58 from patients with histoplasmosis, which supports our hypothesis that the vesicles are
59 involved in the pathogenesis of disease. Hence, we propose that fungal extracellular
60 vesicle secretion is an important mechanism in fungal biology that may also play key
61 roles in other eukaryotic pathogens.

62

62 Introduction

63 The dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum* is a major human pathogen with a
64 worldwide distribution (Kauffman 2007). The fungus usually causes a mild, often
65 asymptomatic respiratory illness, but infection may progress to life-threatening
66 systemic disease, particularly in immunocompromised individuals, infants, or the
67 elderly. *H. capsulatum* grows as a saprophytic mould in the environment but
68 undergoes phase transition to a yeast form at mammalian physiological temperatures.
69 Within macrophages, *H. capsulatum* modifies its microenvironment over a broad pH
70 range, survives nutrient-starvation, resists reactive oxygen and nitrogen species, and
71 survives exposure to degradative enzymes (Woods 2002). In the yeast form, several
72 important exoantigens have been described, including the H and M antigens,
73 pluripotent glycoproteins that elicit both humoral and T-cell-mediated immune
74 responses (Zancope-Oliveira et al. 1999; Fisher and Woods 2000; Deepe and
75 Gibbons 2001a), and a virulence-related, phase specific protein (YPS3p), that is
76 found at the cell wall (Bohse and 80 Woods 2005, 2007). Yeast cells secrete a
77 calcium-binding protein (CBP) that 81 enables the fungus to grow in calcium-limiting
78 conditions (Sebghati et al. 2000). Heat shock proteins are also produced at a high
79 level, which is consistent with the thermally dimorphic nature of the organism (Burnie
80 et al. 2006).

81

82 In contrast to prokaryotic organisms, secretory pathways in eukaryotic cells involve
83 vesicular traffic of molecules to the plasma membrane (Ponnambalam and Baldwin
84 2003; van Meer and Sprong 2004). Fungal cells have complex cell walls and are
85 therefore expected to require additional mechanisms to transfer periplasmic
86 components from the plasma membrane to the extracellular space. The mechanisms
87 by which macromolecules reach the extracellular environment and how they are
88 transported through the cell wall, however, have not been rigorously explored in fungi.
89 It has been recently described that the yeast-like pathogen *Cryptococcus*
90 *neoformans* produces secretory vesicles that transport its major capsular
91 polysaccharide to the extracellular space (Yoneda and Doering 2006; Rodrigues et al.
92 2007; Rodrigues et al. 2008). The polysaccharide is synthesized intracellularly

93 (Feldmesser et al. 2001; Garcia-Rivera et al. 2004) and packaged into lipid vesicles,
94 which cross the cell wall and the capsule network by still unknown mechanisms to
95 reach the extracellular environment. At the extracellular space, the polysaccharide is
96 released and presumably used for capsule assembly (Rodrigues et al. 2007).
97 Furthermore, bioactive fungal lipids, including glucosylceramides and sterols, are
98 secreted by *C. neoformans* vesicles (Rodrigues et al. 2007). It remains unknown
99 whether other pathogenic fungal species use the same mechanism to secrete
100 extracellular molecules.

101

102 In the present study, we demonstrate that the parasitic yeast stage of *H. capsulatum*
103 produces heterogeneous vesicles that are secreted extracellularly. A considerable
104 variety of molecules, including phospholipids and proteins associated to stress
105 responses, pathogenesis, cell wall architecture and virulence comprise the *H.*
106 *capsulatum* vesicles. Furthermore, we analyzed whether additional ascomycetes,
107 including *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Sporothrix schenckii* and
108 *Saccharomyces cerevisiae*, produced vesicles. Finally, proteins extracted from *H.*
109 *capsulatum* vesicles reacted with immune sera from patients with histoplasmosis
110 suggesting that the vesicles are involved in host-pathogen interactions. These results
111 show that vesicular secretion is a common mechanism of extracellular delivery in
112 fungi.

113

114 **Results**

115

116 ***H. capsulatum* produces extracellular vesicles**

117

118 TEM of the material recovered by ultracentrifugation of supernatants from *H.*
119 *capsulatum* revealed the presence of bilayered, spherical vesicles (Fig. 1). Five
120 hundred and eight vesicles were analyzed and were found to range in size from 10 to
121 350 nm (Fig. 2). The electron density of the vesicles varied considerably, suggesting
122 distinct contents (Fig. 1). The protocol used for the isolation of *H. capsulatum*
123 extracellular vesicles was based on that used for *C. neoformans* (Rodrigues et al.

124 2007), in which organelles from dead cells were not found. Similarly, organelles were
125 not found in culture supernatants using heat-killed *H. capsulatum* yeast cells (data
126 not shown). Notably, we identified vesicular structures in internal and outer regions of
127 the cell wall, as well as in the extracellular environment (Fig. 3), which is in
128 accordance with the proposal that vesicle secretion is an active mechanism in living
129 *H. capsulatum* cells.

130

131 **Membrane phospholipids are present in vesicular lipid extracts**

132

133 Lipids were fractioned and analyzed by ESI-MS, in negative or positive-ion mode. The
134 regions of the spectra in which molecular masses corresponding to phospholipids
135 were expected are presented in Figure 4. The major peaks observed in both spectra
136 were subjected to MS/MS analysis (Supplemental Figure 1), resulting in the
137 identification of 17 different phospholipids (Table 1). In the negative-ion mode
138 analysis, only phosphatidylethanolamine (PE) species were detected as major
139 phospholipid species (Fig 4, Table 1). As shown in the Supplemental Figure 1A-E,
140 diagnostic ions for PE were found at m/z 140.1 and 196.1, corresponding to
141 ethanolamine phosphate (EtNP) and dehydrated glycer ethanolamine phosphate
142 (GroEtNP-H₂O), respectively. Fragment ions corresponding to the carboxylate ions of
143 the acyl chains were also detected. On the other hand, the positive-ion mode analysis
144 revealed mainly PE, phosphatidylserine (PS), and phosphatidylcholine (PC) as the
145 major phospholipid species (Table 1, Supplemental Figure 1F-P). MS/MS spectra of
146 PE species revealed diagnostic ions corresponding to the presence of cyclic
147 ethanolamine phosphate (EtNP_c) plus 2 Li⁺ adducts (m/z 152.0), and the neutral
148 losses of ethanolamine (EtN) and ethanolamine phosphate (EtNP). MS/MS spectra of
149 PC species were characterized by the presence of the diagnostic ion choline (Cho) at
150 m/z 86.0, and neutral losses of trimethylamine (Me₃N) and phosphocholine (ChoP).
151 Finally, MS/MS spectra of PS species were characterized by the presence of
152 dehydrated serine phosphate (SerP - H₂O) and serine phosphate (SerP) ion species at
153 m/z 168.0 and 186.0, respectively. The neutral loss of carboxyl group from Ser was
154 also detected in most PS species (Supplemental Figure 1). For all phospholipid

155 species analyzed in the positive-ion mode, the composition of acyl chains was
156 determined by the neutral loss of these structures. In sum, PE and PC, followed by
157 PS, were the most abundant phospholipids found in the MS analyses, consistent with
158 the typical lipid distribution in pathogenic yeasts (Ratray et al. 1975).

159

160 **Proteomic analysis of the *H. capsulatum* extracellular vesicles**

161

162 After vesicle purification, proteins were enzymatically digested and resulting peptides
163 were fractionated by cation exchange chromatography and analyzed by liquid
164 chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). All generated MS/MS
165 spectra were searched against a database assembled with *H. capsulatum* predicted
166 sequences and randomly generated sequences. After estimating the false-positive
167 rate (FPR), 283 proteins were validated and 206 identified by sequence analysis.
168 Table 2 summarizes the identified proteins with associated biological function(s). A
169 comprehensive list of all identified proteins and detailed parameters of the LC-MS/MS
170 analysis are provided in Supplemental Table 1. Some of these proteins, such as
171 chaperones (Hsp70, Hsp30, and Hsp60 precursors), superoxide dismutase, and
172 catalase B, are involved in *H. capsulatum* pathogenesis and host immune
173 responses. Others (e.g., Rab GDP-dissociation inhibitor, Rab1a, GTP-binding nuclear
174 protein GSP1/Ran) are involved in signal transduction pathways and vesicle
175 formation. We also identified several proteins implicated in cell wall architecture, cell
176 growth, sugar, lipid, and amino acid metabolism, as well as cytoskeleton-related
177 proteins. Several peroxisomal, nuclear, proteasomal, and ribosomal proteins and
178 proteins with additional localization/function were also identified. Many of these
179 proteins were recently described in the proteome of vesicles from *C. neoformans*
180 (Rodrigues et al. 2008) and well as previously in mammalian vesicles (Poticchio et
181 al. 2005; Aoki et al. 2007). Figure 5 shows the distribution of the identified *H.*
182 *capsulatum* vesicle proteins according to their functions.

183

184

185

186

187

188 TEM of *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *S. schenckii*, and *S. cerevisiae* vesicles.

189

190 TEM of the material recovered by ultracentrifugation from culture supernatants of *C.*
191 *albicans*, *C. parapsilosis*, *S. schenckii* and *S. cerevisiae* revealed that other
192 ascomycetes similarly produce extracellular vesicles (Fig. 6). The structures identified
193 were similar to vesicles produced by *C. neoformans* (Rodrigues et al. 2007;
194 Rodrigues et al. 2008) and *H. capsulatum*, consisting of bilayered membranes and
195 largely spherical morphologies. Although significant differences in size were found for
196 the ascomycetes studied, they all predominantly produced vesicles ≤ 50 nm in
197 diameter. Only 4% of *S. cerevisiae* vesicles were larger than 50 nm though none
198 were more than 100 nm in diameter. For *S. schenckii*, 11% were between 51-100
199 nm, but none were larger. For *C. albicans* and *C. parapsilosis*, 13% and 36% of
200 vesicles were 50-100 nm, respectively. Vesicles larger than 100 nm comprised 1%
201 and 18% of total vesicles for *C. albicans* and *C. parapsilosis*, respectively.

202

203 **Sera of patients recognized proteins from the vesicles**

204

205 Pooled sera from patients with histoplasmosis were used in immunoblots against
206 protein extracts of *H. capsulatum* (Fig. 7). Extracts of *H. capsulatum* vesicles
207 reacted with serum from patients with histoplasmosis. Immunogenic proteins with
208 diverse molecular masses were observed (Figure 7 B). To confirm the identification of
209 certain proteins identified in the proteomic analysis for which reagents for *H.*
210 *capsulatum* are available, immunoblots were performed with mAbs to histone 2B
211 and heat shock protein 60 (Figure 7 D and E, respectively). The identified bands
212 corresponded to bands recognized by the pooled histoplasmosis sera. These proteins
213 were identified in the proteomic analysis described above. Non-immune sera did not
214 react with proteins from the vesicles (Figure 7 C).

215

216 **Discussion**

217

218 We recently showed that secretory vesicles are involved in the extracellular release of
219 virulence determinants in the fungal pathogen *C. neoformans* (Rodrigues et al.
220 2007; Rodrigues et al. 2008). We now describe that *H. capsulatum*, *C. albicans*, *C.*
221 *parapsilosis*, *S. schenckii* and *S. cerevisiae* also produce extracellular vesicles.
222 Furthermore, we show that *H. capsulatum* produces vesicles containing key
223 molecules related to virulence, stress response and fungal physiology. By
224 microscopic and mass spectrometric approaches, *H. capsulatum* vesicles were
225 identified as lipid bodies with bilayered membrane containing proteins of diverse
226 functions and a number of phospholipids. The findings of this study, combined with
227 the recent reports on *C. neoformans* (Feldmesser et al. 2001; Garcia-Rivera et al.
228 2004; Yoneda and Doering 2006; Rodrigues et al. 2007; Rodrigues et al. 2008),
229 indicate that vesicular secretion is a key mechanism for fungi to delivery intracellular
230 molecules to the extracellular space.

231

232 For *H. capsulatum*, vesicular bodies were observed in association with the cell wall
233 and in the extracellular environment, suggesting the active use of vesicular transport
234 for secretory processes. Microscopic analysis of the samples obtained after
235 differential centrifugation of culture supernatants revealed intact vesicles ranging in
236 size from approximately 10 to 350 nm (Fig 2). Despite this heterogeneity, the vesicles
237 had a common ovoid appearance and all displayed a lipid bilayered membrane.
238 Differences in electron density were observed, suggesting heterogeneity in vesicular
239 contents (Fig. 1).

240

241 *C. albicans* continues to be the leading opportunistic pathogen involved in oral,
242 vaginal, and systemic infections resulting in high mortality, and *Candida spp.* are the
243 fourth most common cause of bloodstream infection in the United States
244 (Wisplinghoff et al. 2004). *C. parapsilosis* is currently the second most common
245 cause of invasive candidiasis worldwide (Fridkin et al. 2006) and is particularly
246 associated with disease in premature infants, immunocompromised adults, and
247 patients in intensive care units (Clerihew et al. 2007). The dimorphic fungus *S.*

248 *schenckii* has a worldwide distribution and causes disease primarily after traumatic
249 inoculation of colonized materials and less commonly by inhalation of spores through
250 the respiratory tract (Almeida-Paes et al. 2007a). Rarely pathogenic, *S. cerevisiae* is
251 a well-established model organism for understanding fundamental cellular processes
252 relevant to higher eukaryotic organisms (Botstein and Fink 1988). Microscopic
253 analysis of the additional fungal species studied revealed intact vesicles of varied
254 morphology, yet the vesicles shared a common ovoid appearance and all displayed
255 lipid bilayered membranes. Future studies are required to assess the contents of the
256 vesicles produced by these ascomycetes, and it will be imperative to assess whether
257 vesicles of different sizes transport specific compounds. For instance, it will be
258 important to determine whether virulence associated products (ie. heat shock
259 proteins, catalases, superoxide dismutases, etc) are transported in the larger vesicles
260 previously described in *C. neoformans* (Rodrigues et al. 2008) and herein identified
261 for *Candida spp.* and *H. capsulatum* but are lacking in the smaller vesicles of less
262 pathogenic fungi such as *S. cerevisiae*.

263

264 In our analyses of *H. capsulatum* vesicles, phospholipids were characterized as lipid
265 components of vesicle membranes. The major phospholipids found were PC, PE and
266 PS, which are building blocks for cellular membranes (lipid bilayers). These lipids also
267 perform a diverse number of other functions, from compartmentalization of cytoplasm
268 to the housing of proteins involved in cell signaling, intercellular adhesion, and
269 cytoskeletal support (16). Previous studies have shown that cell communication might
270 not be limited to soluble agonists, but that various types of vesicles also participate in
271 the process (Denzer et al. 2000). It is notable that mammalian exosome membranes
272 display a similar content of phospholipids and are also formed as lipid bilayers with a
273 random distribution analogous to *H. capsulatum* vesicle phospholipids (Laulagnier et
274 al. 2004). Hence, this similarity to mammalian exosomes supports the
275 supposition that the vesicles from *H. capsulatum* are exosome-like structures.
276 Exosomes are part of the family of bioactive vesicles and appear to be involved in
277 distal communications between cells. They transport bioactive lipids and lipolytic
278 enzymes and their biogenesis requires specific lipids and membrane reorganization

279 (Subra et al. 2007). Bioactive vesicles are receiving increasing interest since they are
280 important in enhancing biodiversity and are the only type of bioactive vesicles
281 originating from intracellular compartments, namely multi-vesicular bodies (MVBs, or
282 late endosomes) (Fevrier and Raposo 2004). MVBs participate in the eradication of
283 obsolete proteins, but they can also be released into extracellular space where they
284 potentially role in intercellular communication (van Niel et al. 2006).

285

286 We used a proteomics approach to analyze the protein contents of vesicles.
287 *H.capsulatum* survives and replicates within host macrophages (Allendoerfer and
288 Deepe 1997), denoting the necessity of fungal mechanisms to escape the
289 antimicrobial armory of phagocytes. The secretion of virulence factors is a
290 mechanism used by different pathogens to cause damage to host cells. In this
291 context, the presence of anti-oxidant proteins in secreted vesicles, such as catalase B
292 (M antigen) (Zancope-Oliveira et al. 1999), superoxide dismutase precursors
293 (Brummer and Stevens 1995), and a thiol-specific antioxidant protein (Demasi et al.
294 2006), could represent an effective mechanism of fungal defense. The proteomic
295 analysis of the *H. capsulatum* vesicles identified proteins involved in vesicular
296 transport and fusion, especially proteins from the Rab family. In mammals, Rabs
297 define a family of almost 70 proteins that play critical roles in the trafficking of vesicles
298 that mediate transport between compartments of the exocytic and endocytic
299 pathways (Pfeffer 2001; Pfeffer 2005). Several of the identified *H. capsulatum* Rab
300 proteins have been characterized to have similar functions, such as *H. capsulatum*
301 Rab GDP-dissociation inhibitor that plays a key role in the recycling of Rabs (Ma et al.
302 2006)and *H. capsulatum* Rab1a that regulates antegrade transport between the ER
303 and the Golgi apparatus (Sannerud et al. 2006). The presence of *H. capsulatum*
304 endochitinase and glucanases in the vesicles is also consistent, since these
305 molecules are membrane proteins and the vesicles may originate from membrane
306 invagination, similar to exosome formation (Sannerud et al. 2006). The mechanisms
307 by which fungal vesicles traverse the cell wall are still unknown. In this context, the
308 existence of vesicular enzymes with the ability to hydrolyze cell wall components is

309 particularly interesting, since these molecules have the potential to promote cell wall
310 reassembly for vesicle passage.

311

312 The extracellular *H. capsulatum* vesicles also contained chaperone and nucleus-
313 associated proteins. Several heat-shock proteins were present in the vesicles. *H.*
314 *capsulatum* Hsp60 is particularly noteworthy since this immunodominant molecule is
315 key to the engagement of the yeast with CD18 receptors on host macrophage (Long
316 et al. 2003) and vaccination with this protein is protective (Gomez et al. 1995). *H.*
317 *capsulatum* Hsp70 is also immunogenic, though it induces non-protective cellular
318 responses (Allendoerfer et al. 1996). *H. capsulatum* nuclear proteins, such as H2B,
319 can be displayed on the fungal cell surface where they can be targeted by antifungal
320 antibodies (Nosanchuk et al. 2003). An *H. capsulatum* glyceraldehyde-3-phosphate
321 dehydrogenase was also identified and a homologous protein is present in the cell
322 wall of the fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*, where it mediates the
323 adhesion of yeast cells to host cells and extracellular matrixes (Barbosa et al. 2006).
324 These examples of single proteins with multiple activities are consistent with the
325 emerging understanding that many proteins have 'moonlighting' functions enabling
326 cells to efficiently perform diverse tasks despite limited genomes (Jeffery 1999,
327 2003a, 2003b). Moonlighting proteins described from *S. cerevisiae* to humans have
328 included enzymes, chaperones, ribosomal protein, receptors, and transmembrane
329 channels.

330

331 In order to assess whether vesicles have a biological effect on the host, we tested the
332 immunoreactivity of extracted vesicular proteins with patients' sera. The recognition of
333 diverse proteins by pooled hyperimmune patient sera indicates that these vesicularly
334 transported proteins could be important in the pathogenesis of these mycoses. For
335 example heat shock protein 60 from *H. capsulatum* has been associated with
336 virulence (Gomez et al. 1995; Allendoerfer et al. 1996; Deepe and Gibbons 2001b;
337 Deepe and Gibbons 2002; Scheckelhoff and Deepe 2002). The findings are
338 consistent with vesicular transport playing a significant role in host-pathogen
339 interactions.

340

341 In summary, we report the trans-cell wall vesicular transport of several important
342 components of virulence, signaling and recycling in *H. capsulatum*. The vesicles
343 appear to be similar to mammalian exosomes. We also show that other ascomycetes
344 produce vesicles that can function in the transport of macromolecules. The products
345 of the vesicles are immunoreactive with serum from patients, which supports our
346 hypothesis that the vesicles are involved in fungal pathogenesis. Hence, we propose
347 that fungal extracellular vesicle secretion is an important mechanism in fungal biology
348 that may also play key roles in other eukaryotic pathogens.

349

350 **Materials and Methods**

351

352 **Fungal strains and growth conditions**

353

354 *H. capsulatum* strain G217B (ATCC 26032) was obtained from the American Type
355 Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland, USA). G217B yeast cells were grown
356 in 500 mL Ham's F-12 medium with rotary shaking (150 rpm) at 37 °C for 3 days in
357 Erlenmeyer flasks as described previously (Nosanchuk et al. 2003). Thimerosal- and
358 heat-killed *H. capsulatum* yeast cells were used as a negative control. *Candida*
359 *albicans* SC5314 (ATCC MYA-2876 (Gillum et al. 1984), *Candida parapsilosis*
360 strain GA1 (a clinical isolate (Gacser et al. 2005)) and *S. schenckii* strain 23508 (a
361 clinical isolate (Almeida-Paes et al. 2007b)) were grown in Sabouraud dextrose broth
362 (Difco Laboratories, Detroit, MI) with rotary shaking (150 rpm) at 30°C for 48 hours for
363 *Candida spp.* or at 37°C for 3 days in the case of *S. schenckii*. *S. cerevisiae* strain
364 KFY 471 (BY4741; ATTC 201388 (Winzeler et al. 1999)) was provided by Dr. Michael
365 Keogh (Albert Einstein, New York), and was grown in YPD broth (Difco Laboratories,
366 Detroit, MI) in the same conditions used for *Candida* strains.

367

368 **Isolation of vesicles**

369

370 Vesicle isolation was performed according to our previously described protocol
371 (Rodrigues et al. 2007). Briefly, the fungal cells were separated from culture
372 supernatants by centrifugation at 4,000 g for 15 min at 4°C. Supernatants were
373 collected and again centrifuged at 15,000 g (4°C) to remove smaller debris. The
374 pellets were discarded, and the resulting supernatant was concentrated
375 approximately 20-fold using an Amicon ultrafiltration system (cutoff, 100 kDa). To
376 ensure the removal of cells and cellular debris, the concentrated culture fluid was
377 again centrifuged as described above and the resulting supernatant was then
378 centrifuged at 100,000 g for 1 h at 4°C. The supernatants were discarded and the
379 pellets suspended in 3 mL of 0.1 M Phosphate-buffered saline (PBS) and centrifuged
380 at 100,000 g for 1 h at 4°C. The supernatant was again removed from the pellets and
381 a fixative solution (as described below), was added for electron microscopy analysis.
382 Additionally, pellets from *H. capsulatum* were used for proteomic analysis or
383 extracted with a chloroform-methanol mixture for lipidomic analysis as described
384 below.

385

386 **Transmission electron microscopy (TEM)**

387

388 TEM was used to visualize vesicles in intact *H. capsulatum* yeast cells and vesicles
389 isolated from culture supernatants of *H. capsulatum* and the other fungi by
390 ultracentrifugation. Samples were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate
391 buffer at room temperature for 2 h and then incubated overnight in 4%
392 paraformaldehyde, 1% glutaraldehyde, and 0.1% phosphate-buffered saline (PBS).
393 The samples were incubated for 90 min in 2% osmium tetroxide, serially dehydrated
394 in ethanol, and embedded in Spurr's epoxy resin. Thin sections were obtained on a
395 Reichert Ultracut and stained with 0.5% uranyl acetate and 0.5% lead citrate.
396 Samples were observed in a JEOL 1200EX transmission electron microscope
397 operating at 80 kV.

398

399 **Mass spectrometry analysis of phospholipids**

400

401 The *H. capsulatum* vesicle fraction was suspended in 100 μ L of ultrapure water and
402 extracted 3x by addition of 1.5 ml chloroform:methanol (2:1, v/v) solution followed by
403 vigorous vortexing and then centrifugation for 10 min at 1000 g. After drying under
404 nitrogen stream, the sample was dissolved in 500 μ L chloroform and loaded onto a
405 silica gel 60 column, equilibrated with pure chloroform. The silica column was
406 manufactured in a Pasteur pipette, using a very fine glass wool and about 500 mg of
407 silica gel 60 resin (pore size 60 Å, 200-400 μ m mesh) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).
408 After washing the column with chloroform, followed by acetone, the phospholipids
409 were eluted with methanol and dried under nitrogen stream. The phospholipid fraction
410 was dissolved in chloroform:methanol (1:1, v/v) and diluted either in
411 chloroform:methanol (1:1,v/v) containing 10 mM LiOH (for positive-ion mode analysis)
412 or chloroform:methanol (1:1, v/v) containing 0.1% formic acid (FA) and 0.1% NH₄OH
413 (for negative-ion mode analysis), and analyzed in an electrospray ionization time-of-
414 flight mass spectrometer (ESI-Q-TOF-MS) (Qtof-1, Waters). The spectra were
415 collected in a range from 400 to 1500 m/z and each ion with intensity higher than 10
416 counts was automatically submitted to collision-induced dissociation (CID) (22-60 eV,
417 50-1500 m/z range). MS/MS spectra were analyzed manually for the identification of
418 phospholipid species.

419

420 **Protein identification by liquid chromatography tandem mass spectrometry**

421

422 Protein digestion was performed as described previously (Stone and Williams 1996).
423 Purified vesicles were suspended in 40 μ l 400 mM NH₄HCO₃ containing 8 M urea and
424 the protein disulfide bounds were reduced by the addition of 10 μ l 50 mM dithiothreitol
425 for 15 min at 50°C. Cysteine residues were alkylated by the addition of 10 μ l 100 mM
426 iodoacetamide and incubation for an additional 15 min at room temperature protected
427 from light. The reaction was diluted with HPLC-grade water (Sigma-Aldrich) to obtain
428 a final concentration of 1 M urea, and the digestion was performed overnight at 37°C
429 with 4 μ g sequencing-grade trypsin (Promega). Each sample was desalted in a
430 reverse phase ziptip (POROS R2 50, Applied Biosystems) as described by Jurado et
431 al. (Jurado et al. 2007), and peptides were fractionated in a strong cation-exchange

432 (SCX) ziptip, manufactured in a 200- μ l micropipette tip with glass fiber filter and
433 POROS HS 50 resin (Applied Biosystems). After equilibrating the SCX ziptip with
434 25% acetonitrile (ACN)/0.5% FA, peptides were loaded and eluted with increasing
435 NaCl concentration (0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, and 500 mM NaCl in 25%
436 ACN/0.5% FA). Each SCX fraction was dried in a vacuum centrifuge (Eppendorf),
437 purified in POROS R2 50 ziptip and redissolved in 30 μ l 0.05% trifluoroacetic acid
438 (TFA). Eight μ l of fractionated peptides were loaded onto a C18 trap column (1 μ L
439 C18, OPTI-PAK) and washed for 10 min with 2% ACN/0.1% FA. The separation was
440 performed in a capillary reverse-phase column (Acclaim, 3 μ m C18, 75 μ m x 25 cm,
441 LC Packings) connected to a nanoHPLC system (nanoLC 1D plus, Eksigent).
442 Peptides were eluted in a 0-40% gradient of solvent B (solvent A: 2%ACN/0.1%FA,
443 solvent B: 80%ACN/0.1% FA) during 100 min and directly analyzed in an electrospray
444 ionization-linear ion trap-mass spectrometer (ESI-LIT-MS) equipped with a nanospray
445 source (LTQ XL, Thermo Fisher Scientific, San Jose CA). MS spectra were collected
446 in centroid mode in a range from 400 to 1700 m/z and the five most abundant ions
447 were submitted twice to CID (35% normalized collision energy), before they were
448 dynamically excluded for 120 sec.

449

450 All MS/MS spectra were obtained from peptides with 600-3500 Da and at least 15
451 fragments were converted into DTA files using Bioworks v.3.3.1 (Thermo Fisher
452 Scientific). The DTA files were subjected to a database search using TurboSequest
453 (Eng et al., 1994) (available in Bioworks software) against a database assembled with
454 *H. capsulatum* (protein database, version of 05/11/2006, available at
455 [http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/histoplasma_capsulatum/Down](http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/histoplasma_capsulatum/Downloads.html?jsessionid=A347F284A23BE3CC423191220E09A48D)
456 [loads.html?jsessionid=A347F284A23BE3CC423191220E09A48D](http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/histoplasma_capsulatum/Downloads.html?jsessionid=A347F284A23BE3CC423191220E09A48D)), common
457 contaminant sequences (retrieved from GenBank - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> and
458 International Protein Index - <http://www.ebi.ac.uk/IPI>) and 100,000 randomly
459 generated sequences. The database search parameters were: trypsin cleavage in
460 both peptide termini with allowance for one missed cleavage site,
461 carbamidomethylation of cysteine residues as a fixed modification, oxidation of
462 methionine residues as a variable modification, and 2.0 Da and 1.0 Da for peptide

463 and fragment mass tolerance, respectively. To ensure the quality of our
464 identifications, we estimated the false-positive rate (FPR) from the TurboSequest
465 output. This estimation was done using the following formula:

$$466 \quad \text{FPR} = \frac{\text{Number of proteins matching random sequences}}{\text{Total number of proteins}}$$

467

468 A FPR was obtained after applying the following filters in Bioworks: distinct peptides,
469 consensus score ≥ 10.1 , DCn ≥ 0.1 , protein probability $\leq 1 \times 10^{-3}$, and Xcorr ≥ 1.5 , 2.2,
470 and 2.7 for singly-, doubly-, and triply-charged peptides, respectively. Using these
471 parameters, the FPR was estimated as 3.7%.

472

473 **Western Blot Analysis**

474

475 *H. capsulatum* vesicles pellets were subjected to acetone precipitation. The
476 precipitate was separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel
477 electrophoresis (SDS-PAGE) using 10% gels. Separated proteins were transferred to
478 nitrocellulose membranes and blocked (1% BSA in 0.1M PBS) for 1 h at 37°C. The
479 membranes were then incubated in the presence of pooled sera from patients with
480 culture proven histoplasmosis (Fiocruz- IPEC). Positive reactions were observed after
481 incubation of blotted proteins with alkaline phosphatase-conjugated goat anti-human
482 antibodies in blocking buffer for 1 h at 37°C followed by development with NBT-BCIP.
483 Alternatively, the membranes were blocked and then incubated with monoclonal
484 antibody to H2B (Nosanchuk et al. 2003) or heat shock protein 60 (Guimarães et al.
485 2006), washed in TBST, and incubated with goat anti-mouse Ig conjugated to horse
486 raddish peroxidase. The samples were developed with ECL substrate (SuperSignal;
487 Pierce Chemical Co.) and exposed on X-Omat AR film (Eastman Kodak Co.,
488 Rochester, New York, USA).

489

490

491

492 **Acknowledgements:**

493 PCA was supported in part by an Interhemispheric Research Training Grant in
494 Infectious Diseases, Fogarty International Center (NIH D43-TW007129). JDN is
495 supported by NIH AI52733 and AI056070-01A2, and the Einstein MMC Center for
496 AIDS Research [NIH NIAID AI51519]. MLR is supported by grants from the Brazilian
497 agencies FAPERJ, CNPq and CAPES. R.M.Z.-O. is in part supported by CNPq
498 306288/2006-0 and by a grant from FAPERJ 306288/2006-0. AC is supported by NIH
499 grants AI033142, AI033774, AI052733, and HL059842. ICA is supported by NIH grant
500 5G12RR008124 to the Border Biomedical Research Center (BBRC)/University of
501 Texas at El Paso (UTEP). We are thankful to the Biomolecule Analysis Core
502 Facility/BBRC/UTEP, supported by NIH/NCRR grant 5G12RR008124, for the use of
503 the LC-MS instruments. The authors thank Dr. Fabio Gozzo (Laboratório Nacional de
504 Luz Sincrontron, Campinas, Brazil) for kindly providing the 100,000 randomly
505 generated sequences and Dr. Michael Keogh for providing the *S. cerevisiae* strain.

506

507 **Conflict of interest:**

508 The authors do not have any conflicts of interest.

509 **Figure Legends**

510

511 **Fig.1.** TEM of extracellular vesicles obtained by ultracentrifugation of culture
512 supernatants from *Histoplasma capsulatum* showing bilayered membranes and
513 different profiles of electron density. Bars, 100 nm (B, C and E) and 200 nm (A, D and
514 F).

515

516 **Fig.2.** Size analysis of vesicles from *H. capsulatum*. Five hundred and eight vesicles
517 were analyzed and the size ranged from 10 to 350 nm.

518

519 **Fig.3.** Vesicles structures were observed in association with the cell wall (A, C and D)
520 and the extracellular environment (B).

521

522 **Fig.4.** Lipid analysis by mass spectrometry of *H. capsulatum* vesicular
523 components. Total phospholipids were fractionated by silica gel 60 chromatography
524 and analyzed by ESI-MS, in negative- (A) or positive-ion (B) mode. The ion species
525 corresponding to major phospholipids are indicated. These ions were subjected to
526 MS-MS analysis, allowing the identification of 18 phospholipids (Table 1;
527 Supplemental Figure 1). *m/z*, mass to charge ratio.

528

529 **Fig. 5.** Graph of the protein diversity within *H. capsulatum* vesicles.

530

531 **Fig. 6.** TEM of extracellular vesicles from *S. cerevisiae* (A, B), *C. parapsilosis* (C, D),
532 *S. schenckii* (E, F) and *C. albicans* (G, H). The structures identified were similar to
533 vesicles produced by *C. neoformans* and *H. capsulatum*. Bars 100nm.

534

535 **Fig. 7.** *H. capsulatum* vesicles contain immunoreactive proteins. Pooled sera from
536 patients with histoplasmosis labels proteins from extracellular *H. capsulatum*
537 vesicles. Lane A shows the molecular weight marker. Lane B shows *H. capsulatum*
538 pooled hyperimmune sera reacting with *H. capsulatum* vesicles whereas the non-
539 immune serum in lane C does not label the extracted proteins. Lanes D and E

540 demonstrate the binding of monoclonal antibodies to histone 2B (17 kDa;
541 corresponding to *, lane B) and heat shock protein 60 (62 kDa; corresponding to ♦,
542 land B), respectively.

543

544

545

546

547 **References:**

548

549 Allendoerfer R, Deepe GS, Jr. (1997) Intrapulmonary response to *Histoplasma*
550 *capsulatum* in gamma interferon knockout mice. *Infect Immun* 65(7): 2564-
551 2569.

552 Allendoerfer R, Maresca B, Deepe GS, Jr. (1996) Cellular immune responses to
553 recombinant heat shock protein 70 from *Histoplasma capsulatum*. *Infect*
554 *Immun* 64(10): 4123-4128.

555 Almeida-Paes R, Pimenta MA, Monteiro PC, Nosanchuk JD, Zancoppe-Oliveira RM
556 (2007a) Immunoglobulins G, M and A against *Sporothrix schenckii* exoantigens
557 in patients with sporotrichosis before and during treatment with itraconazole. *Clin*
558 *Vaccine Immunol* 14(9): 1149-1157.

559 Almeida-Paes R, Pimenta MA, Pizzini CV, Monteiro PC, Peralta JM et al. 2007b). Use
560 of mycelial-phase *Sporothrix schenckii* exoantigens in an enzyme-linked
561 immunosorbent assay for diagnosis of sporotrichosis by antibody detection. *Clin*
562 *Vaccine Immunol* 14(3): 244-249.

563 Aoki N, Jin-no S, Nakagawa Y, Asai N, Arakawa E et al. (2007) Identification and
564 characterization of microvesicles secreted by 3T3-L1 adipocytes: redox-and
565 hormone-dependent induction of milk fat globule-epidermal growth factor 8-
566 associated microvesicles. *Endocrinology* 148(8): 3850-3862.

567 Barbosa MS, Bao SN, Andreotti PF, de Faria FP, Felipe MS et al. (2006).
568 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis*
569 is a cell surface protein involved in fungal adhesion to 30 extracellular matrix
570 proteins and interaction with cells. *Infect Immun* 74(1): 382-389.

571 Bohse ML, Woods JP (2005) Surface localization of the Yps3p protein of *Histoplasma*
572 *capsulatum*. *Eukaryot Cell* 4(4): 685-693.

573 Bohse ML, Woods JP (2007) RNA interference-mediated silencing of the YPS3 gene
574 of *Histoplasma capsulatum* reveals virulence defects. *Infect Immun* 75(6):
575 2811-2817.

576 Botstein D, Fink GR (1988) Yeast: an experimental organism for modern biology.
577 *Science* 240(4858): 1439-1443.

578 Brummer E, Stevens DA (1995) Antifungal mechanisms of activated murine
579 bronchoalveolar or peritoneal macrophages for *Histoplasma capsulatum*. Clin
580 Exp Immunol 102(1): 65-70.

581 Burnie JP, Carter TL, Hodgetts SJ, Matthews RC (2006) Fungal heat-shock proteins
582 in human disease. FEMS Microbiol Rev 30(1): 53-88.

583 Clerihew L, Lamagni TL, Brocklehurst P, McGuire W (2007) *Candida parapsilosis*
584 infection in very low birthweight infants. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 92(2):
585 F127-129.

586 Deepe GS, Jr., Gibbons R (2001a) Protective efficacy of H antigen from *Histoplasma*
587 *capsulatum* in a murine model of pulmonary histoplasmosis. Infect Immun
588 69(5): 3128-3134.

589 Deepe GS, Jr., Gibbons R (2001b) V beta 6+ T cells are obligatory for vaccine-
590 induced immunity to *Histoplasma capsulatum*. J Immunol 167(4): 2219-2226.
591 600

592 Deepe GS, Jr., Gibbons RS (2002) Cellular and molecular regulation of vaccination
593 with heat shock protein 60 from *Histoplasma capsulatum*. Infect Immun 70(7):
594 3759-3767.

595 Demasi AP, Pereira GA, Netto LE (2006) Yeast oxidative stress response. Influences
596 of cytosolic thioredoxin peroxidase I and of the mitochondrial functional state.
597 Febs J 273(4): 805-816.

598 Denzer K, Kleijmeer MJ, Heijnen HF, Stoorvogel W, Geuze HJ (2000) Exosome: from
599 internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. J Cell
600 Sci 113 Pt 19: 3365-3374.

601 Feldmesser M, Kress Y, Casadevall A (2001) Dynamic changes in the morphology of
602 *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. Microbiology
603 147(Pt 8): 2355-2365.

604 Fevrier B, Raposo G (2004) Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping
605 extracellular messages. Curr Opin Cell Biol 16(4): 415-421.

606 Fisher KL, Woods JP (2000) Determination of beta-glucosidase enzymatic function of
607 the *Histoplasma capsulatum* H antigen using a native expression system.
608 Gene 247(1-2): 191-197.

609 Fridkin SK, Kaufman D, Edwards JR, Shetty S, Horan T (2006) Changing incidence of
610 *Candida* bloodstream infections among NICU patients in the United States:
611 1995-2004. *Pediatrics* 117(5): 1680-1687.

612 Gacser A, Salomon S, Schafer W (2005) Direct transformation of a clinical isolate of
613 *Candida parapsilosis* using a dominant selection marker. *FEMS Microbiol Lett*
614 245(1): 117-121.

615 Garcia-Rivera J, Chang YC, Kwon-Chung KJ, Casadevall A (2004) *Cryptococcus*
616 *neoformans* CAP59 (or Cap59p) is involved in the extracellular trafficking of
617 capsular glucuronoxylomannan. *Eukaryot Cell* 3(2): 385-392.

618 Gillum AM, Tsay EY, Kirsch DR (1984) Isolation of the *Candida albicans* gene for
619 orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3*
620 and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet* 198(1): 179-182.

621 Gomez FJ, Allendoerfer R, Deepe GS, Jr. (1995) Vaccination with recombinant heat
622 shock protein 60 from *Histoplasma capsulatum* protects mice against
623 pulmonary histoplasmosis. *Infect Immun* 63(7): 2587-2595.

624 Guimarães AJ, Williams DA, Zancope-Oliveira RM, Nosanchuk JD. Protective
625 antibodies to *Histoplasma capsulatum* cell surface antigens: heat shock
626 protein 60 and M antigen (Abstract B35); 2006 March 13-17, 2006; Denver, CO.
627 ASM. pp. 42.

628 Jeffery CJ (1999) Moonlighting proteins. *Trends Biochem Sci* 24(1): 8-11.

629 Jeffery CJ (2003a) Moonlighting proteins: old proteins learning new tricks. *Trends*
630 *Genet* 19(8): 415-417.

631 Jeffery CJ (2003b) Multifunctional proteins: examples of gene sharing. *Ann Med*
632 35(1): 28-35.

633 Jurado JD, Rael ED, Lieb CS, Nakayasu E, Hayes WK et al. (2007) Complement
634 inactivating proteins and intraspecies venom variation in *Crotalus oreganus*
635 *helleri*. *Toxicon* 49(3): 339-350.

636 Kauffman CA (2007) Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. *Clin Microbiol*
637 *Rev* 20(1): 115-132.

638 Laulagnier K, Motta C, Hamdi S, Roy S, Fauvelle F et al. (2004) Mast cell- and
639 dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an
640 unusual membrane organization. *Biochem J* 380(Pt 1): 161-171.

641 Long KH, Gomez FJ, Morris RE, Newman SL (2003) Identification of heat shock
642 protein 60 as the ligand on *Histoplasma capsulatum* that mediates binding to
643 CD18 receptors on human macrophages. *J Immunol* 170(1): 487-494.

644 Ma Y, Kuno T, Kita A, Nabata T, Uno S et al. (2006) Genetic evidence for
645 phospholipid-mediated regulation of the Rab GDP-dissociation inhibitor in fission
646 yeast. *Genetics* 174(3): 1259-1271.

647 Nosanchuk JD, Steenbergen JN, Shi L, Deepe GS, Jr., Casadevall A (2003)
648 Antibodies to a cell surface histone-like protein protect against *Histoplasma*
649 *capsulatum*. *J Clin Invest* 112(8): 1164-1175.

650 Pfeffer S (2005) A model for Rab GTPase localization. *Biochem Soc Trans* 33(Pt 4):
651 627-630.

652 Pfeffer SR (2001) Rab GTPases: specifying and deciphering organelle identity and
653 function. *Trends Cell Biol* 11(12): 487-491.

654 Ponnambalam S, Baldwin SA (2003) Constitutive protein secretion from the trans-
655 Golgi network to the plasma membrane. *Mol Membr Biol* 20(2): 129-139.

656 Potolicchio I, Carven GJ, Xu X, Stipp C, Riese RJ et al. (2005) Proteomic analysis of
657 microglia-derived exosomes: metabolic role of the aminopeptidase CD13 in
658 neuropeptide catabolism. *J Immunol* 175(4): 2237-2243.

659 Rattray JB, Schibeci A, Kidby DK (1975) Lipids of yeasts. *Bacteriol Rev* 39(3): 197-
660 231.

661 Rodrigues ML, Nakayasu ES, Oliveira DL, Nimrichter L, Nosanchuk JD et al. (2008)
662 Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein
663 components associated with virulence. *Eukaryot Cell* 7(1): 58-67.

664 Rodrigues ML, Nimrichter L, Oliveira DL, Frases S, Miranda K et al. (2007) Vesicular
665 polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to
666 the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryot Cell* 6(1): 48-59.

667 Sannerud R, Marie M, Nizak C, Dale HA, Pernet-Gallay K et al. (2006) Rab1 defines
668 a novel pathway connecting the pre-Golgi intermediate compartment with the
669 cell periphery. *Mol Biol Cell* 17(4): 1514-1526.

670 Scheckelhoff M, Deepe GS, Jr. (2002) The protective immune response to heat shock
671 protein 60 of *Histoplasma capsulatum* is mediated by a subset of V beta
672 8.1/8.2+ T cells. *J Immunol* 169(10): 5818-5826.

673 Sebghati TS, Engle JT, Goldman WE (2000) Intracellular parasitism by *Histoplasma*
674 *capsulatum*: fungal virulence and calcium dependence. *Science* 290(5495):
675 1368-1372.

676 Stone KL, Williams KR (1996) Enzymatic digestion of proteins in solution and in SDS
677 polyacrylamide gels. *The Protein Protocols Handbook*. Totowa, NJ: Humana
678 Press.

679 Subra C, Laulagnier K, Perret B, Record M (2007) Exosome lipidomics unravels lipid
680 sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie* 89(2): 205-212.

681 van Meer G, Sprong H (2004) Membrane lipids and vesicular traffic. *Curr Opin Cell*
682 *Biol* 16(4): 373-378.

683 van Niel G, Porto-Carreiro I, Simoes S, Raposo G (2006) Exosomes: a common
684 pathway for a specialized function. *J Biochem* 140(1): 13-21.

685 Winzeler EA, Shoemaker DD, Astromoff A, Liang H, Anderson K et al. (1999)
686 Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and
687 parallel analysis. *Science* 285(5429): 901-906.

688 Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP et al. (2004) Nosocomial
689 bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a
690 prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 39(3): 309-317.

691 Woods JP (2002) *Histoplasma capsulatum* molecular genetics, pathogenesis, and
692 responsiveness to its environment. *Fungal Genet Biol* 35(2): 81-97.

693 Yoneda A, Doering TL (2006) An eukaryotic capsular polysaccharide is synthesized
694 intracellularly and secreted via exocytosis. *Mol Biol Cell* 17(12): 5131-5140.

695 Zancope-Oliveira RM, Reiss E, Lott TJ, Mayer LW, Deepe GS, Jr. (1999). Molecular
696 cloning, characterization, and expression of the M antigen of *Histoplasma*
697 *capsulatum*. *Infect Immun* 67(4): 1947-195.

Figure 1

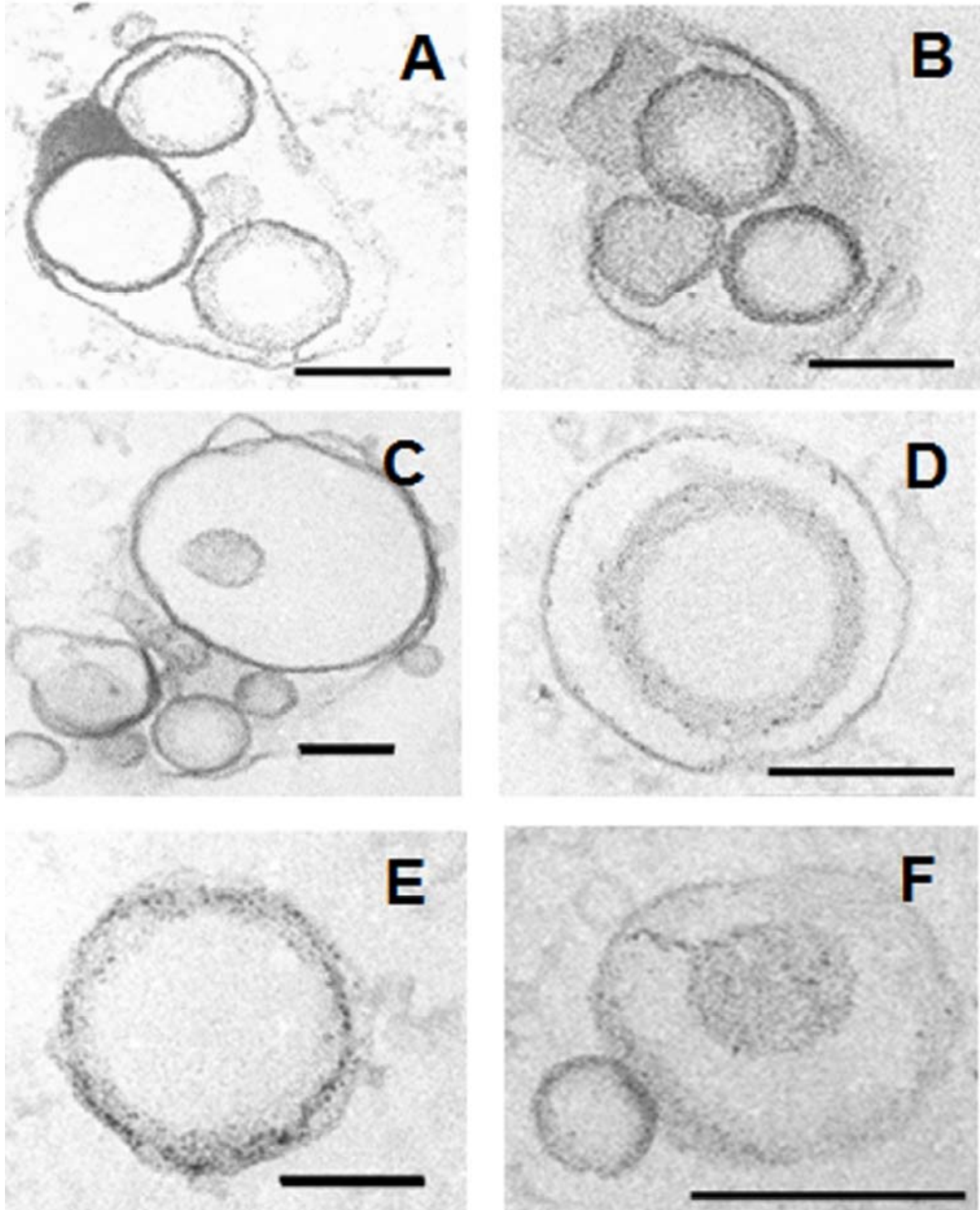


Figure 2

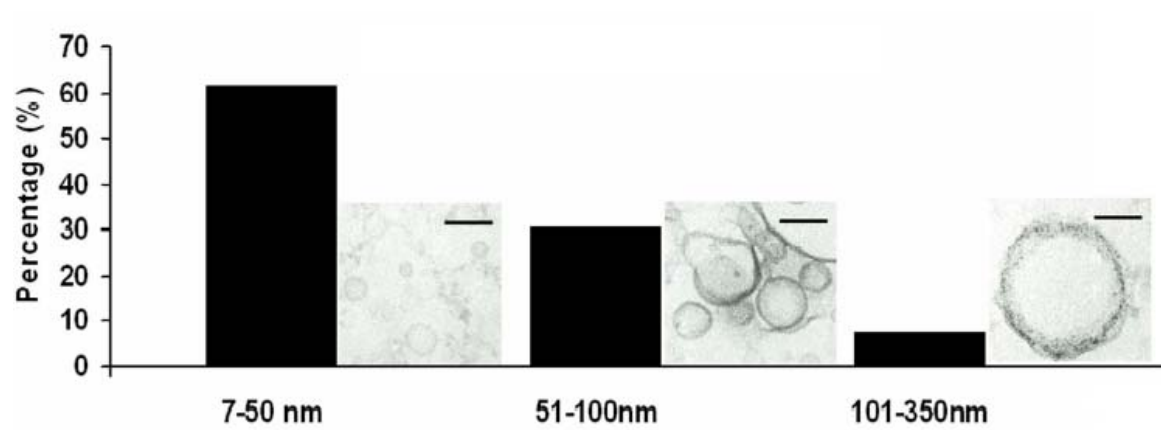


Figure 3

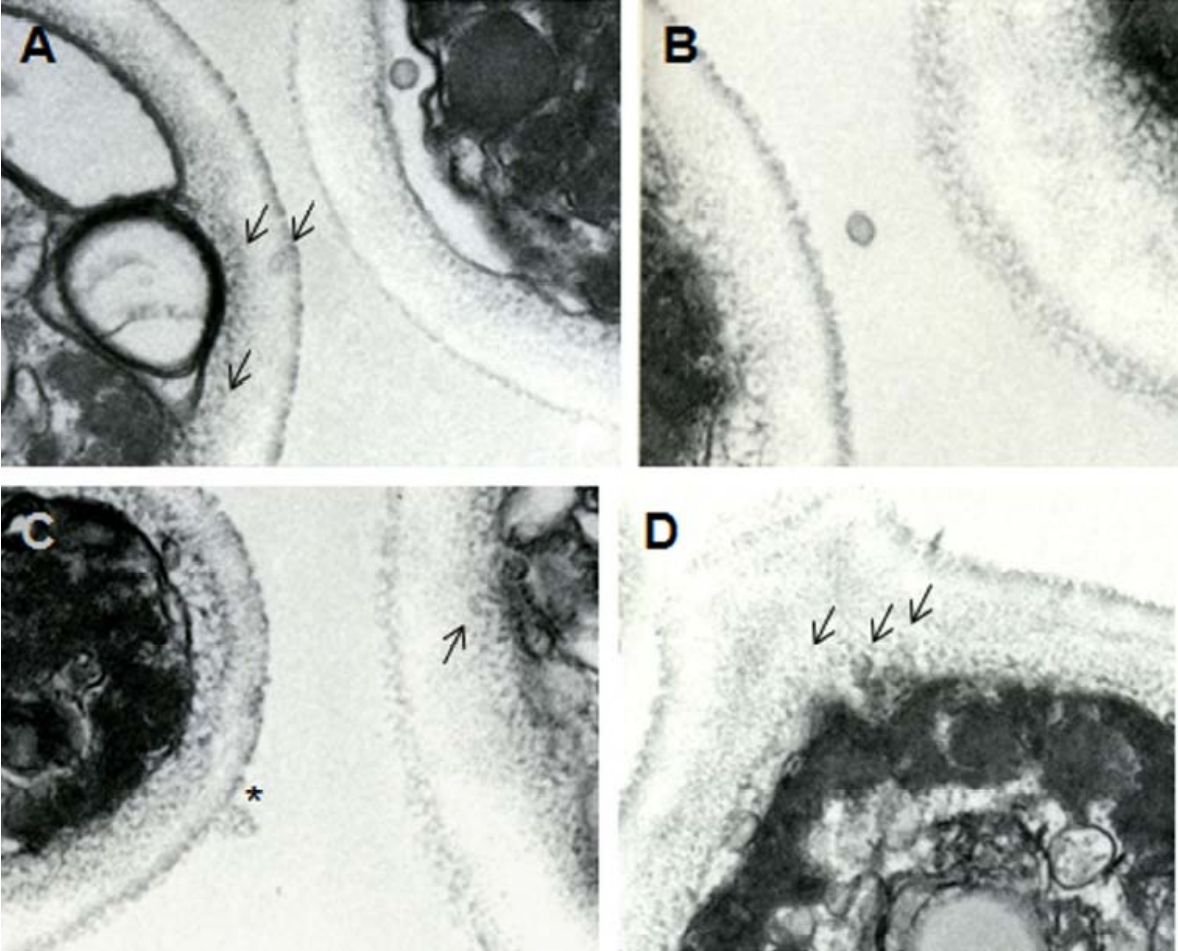


Figure 4

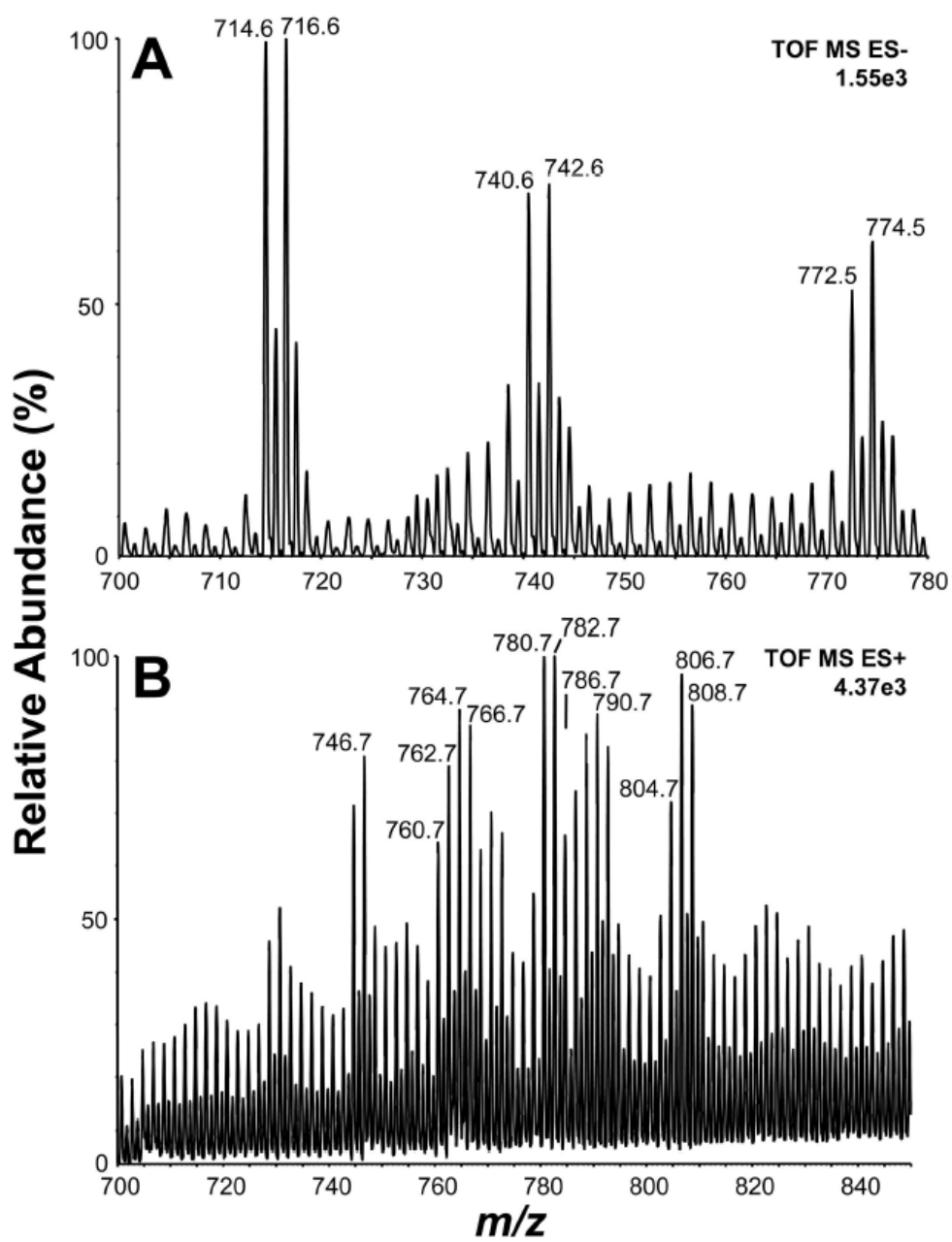


Figure 5

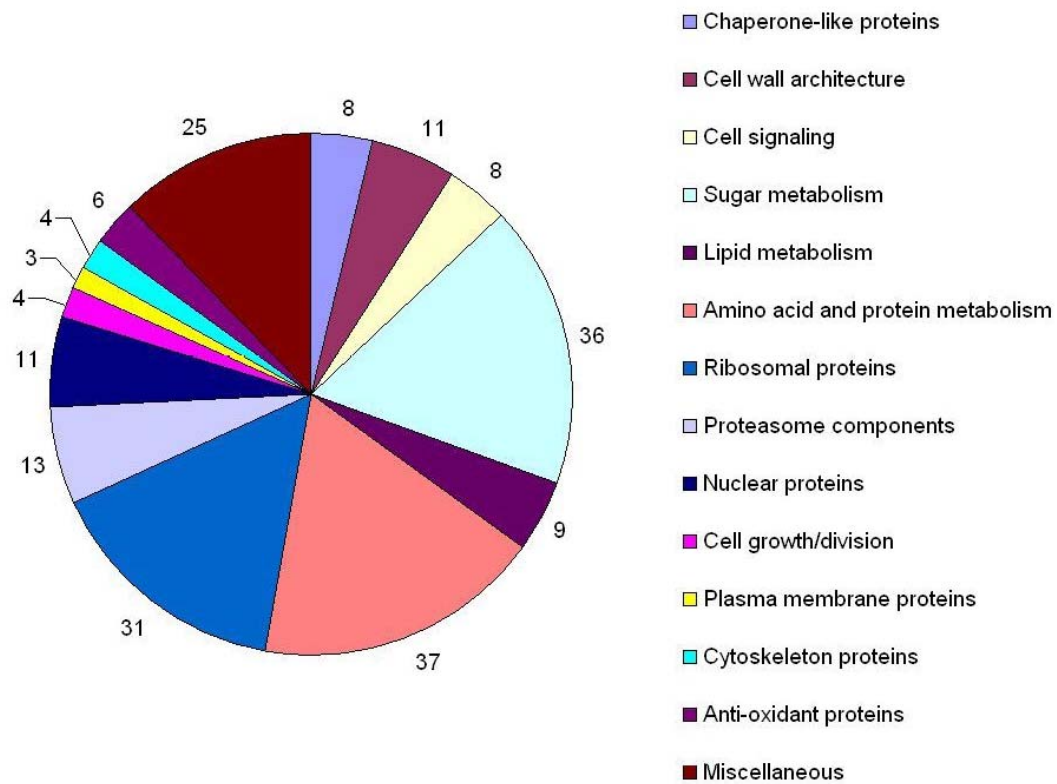


Figure 6

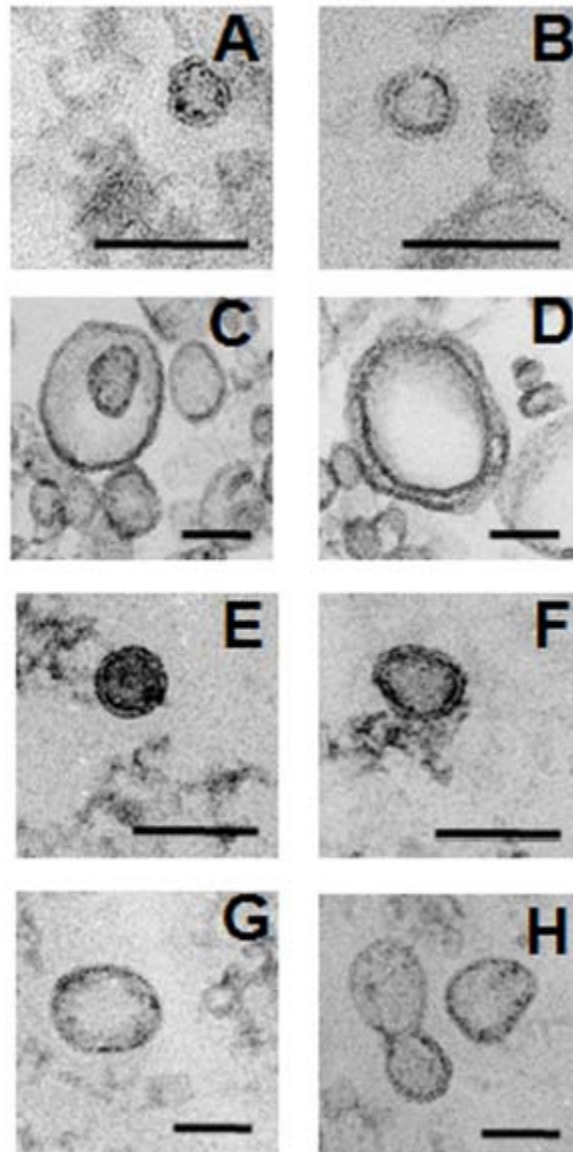


Figure 7

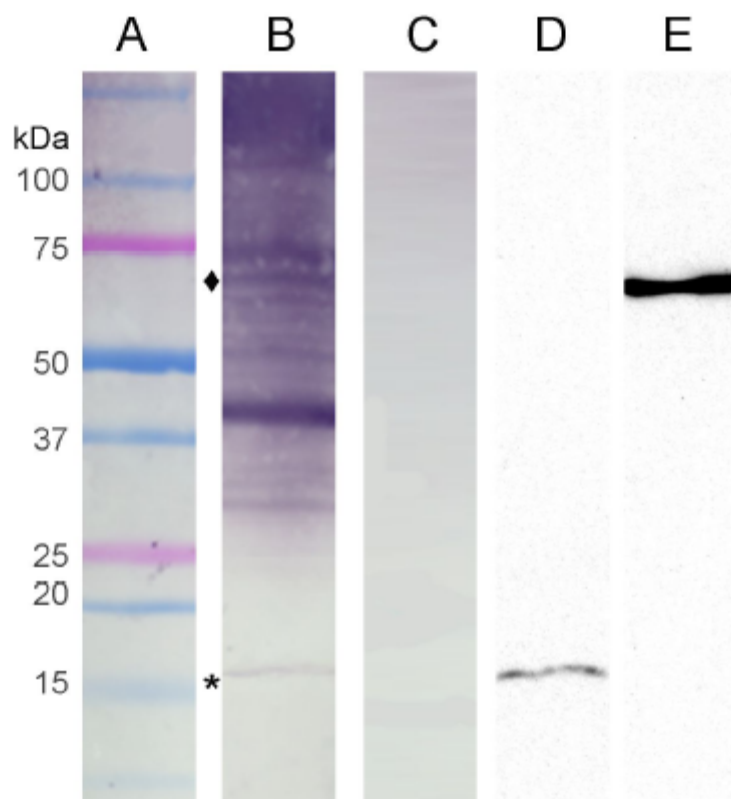


Table 1. Lipid analysis and composition of the major phospholipids from *H. capsulatum* vesicles.

MS Ion-Mode	Observed <i>m/z</i> , [ion species]	Proposed Phospholipid Composition ^a	Predicted Mass (Da)	Observed Mass (Da)
Negative	714.6, [M - H] ⁻	C16:0/C18:2-PE	715.5	715.6
Negative	716.6, [M - H] ⁻	C16:0/C18:1-PE	717.5	717.6
Negative	740.6, [M - H] ⁻	C18:2/C18:1-PE	741.5	741.6
Negative	742.6, [M - H] ⁻	C18:1/C18:1-PE	743.6	743.6
Negative	772.5, [M - H + Na ⁺ + Cl] ⁻	C16:0/C18:2-PE	715.5	715.5
Negative	774.5, [M - H + Na ⁺ + Cl] ⁻	C16:0/C18:1-PE	717.5	717.5
Positive	746.7, [M ⁺ - H + Li] ⁺	C16:0/C20:4-PE	739.5	739.7
Positive	760.7, [M + H] ⁺	C16:0/C18:2-PS	759.5	759.7
Positive	762.7, [M + H] ⁺	C16:0/C18:1-PS	761.5	761.7
Positive	764.7, [M ⁺ - H + Li] ⁺	C16:0/C18:2-PC	758.6	758.7
Positive	766.7, [M ⁺ - H + Li] ⁺	C16:0/C18:1-PC	760.6	760.7
Positive	780.7, [M ⁺ - H + Na ⁺] ⁺	C16:0/C18:2-PC	758.6	758.7
Positive	782.7, [M ⁺ - H + Na ⁺] ⁺	C16:0/C18:1-PC	760.6	760.7
Positive	786.7, [M + H] ⁺	C18:1/C18:2-PS	785.5	785.7
Positive	790.7, [M ⁺ - H + Li] ⁺	C18:1/C18:2-PC	784.6	784.7
Positive	804.7, [M ⁺ - H + Na ⁺] ⁺	C16:0/C20:4-PC	782.6	782.7
Positive	806.7, [M ⁺ - H + Na ⁺] ⁺	C18:1/C18:2-PC	784.6	784.7
Positive	808.7, [M ⁺ - H + Na ⁺] ⁺	C18:1/C18:1-PC	786.6	786.7

^a Deduced from the MS/MS spectrum (see Supplemental Figure 1).

DISCUSSÃO

Recentemente foi demonstrado que vesículas secretórias estão envolvidas na secreção extracelular de determinantes de virulência no fungo *C. neoformans* (Rodrigues e cols., 2007; Rodrigues e cols., 2008). Neste trabalho, nosso grupo descreve que *H. capsulatum*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *S. schenckii* e *S. cerevisiae* também produzem vesículas extracelulares. Além disso, também demonstramos, através de nossos resultados, que as vesículas de *H. capsulatum* contém moléculas importantes relacionadas a virulência, a fisiologia do fungo, a mecanismos de escape, entre outros. Através de técnicas de microscopia e espectrometria, vesículas de *H. capsulatum* foram identificadas como corpos lipídicos com dupla membrana contendo proteínas de diversas funções e números de fosfolipídeos. Combinando os resultados deste estudo, aos recentemente relatados em *C. neoformans* (Feldmesser e cols., 2001; Garcia-Rivera e cols, 2004; Yoneda & Doering 2006; Rodrigues e cols, 2007; Rodrigues e cols., 2008), acreditamos que secreção vesicular é um mecanismo chave para fungos direcionar moléculas intracelulares para o espaço extracelular. Entretanto, outros estudos para confirmar nossa hipótese são necessários.

Os corpos vesiculares observados no interior de células leveduriformes de *H. capsulatum* se apresentavam na vizinhança da parede celular e também em ambiente extracelular, onde, através de análises microscópicas foram observadas vesículas intactas variando entre 10 a 350 nm. Embora heterogêneas em tamanho, todas apresentavam forma ovóide e eram compostas por uma membrana lipídica de dupla camada. Entretanto, fato interessante nos chamou atenção, uma vez que algumas vesículas se apresentavam mais eletrodensas que outras, quando observadas através de TEM, sugerindo que seu conteúdo poderia englobar macromoléculas diferentes.

Em nossas análises das vesículas de *H. capsulatum*, fosfolipídeos foram caracterizados como componentes lipídicos das membranas dos corpos vesiculares. Os fosfolipídeos encontrados com maior abundância nas análises foram fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilserina (PS), os quais fazem parte das membranas celulares. Estes lipídios também possuem outras funções tais como compartimentalização do citoplasma servindo como abrigo de proteínas envolvidas no processo de sinalização, entre outros.(Van Meer e cols 2004).

Estudos prévios têm demonstrado que a comunicação celular pode ter a participação de vários tipos de corpos vesiculares (Denzer e cols, 2000). Entre estes, os exossomos, que são vesículas bioativas relacionadas à comunicação entre células, transportam lipídios bioativos e enzimas e sua biogênese requer lipídios específicos e reorganização de membranas (Subra e cols. 2007). Vesículas bioativas são importantes no reforço da biodiversidade e são o único tipo de vesículas originárias de compartimentos intracelular, chamadas de corpos multivesiculares, "multi-vesicular bodies" (MVBs, or late endosomes) (Fevrier & Raposo 2004). MVBs participam da erradicação de proteínas obsoletas, mas também podem secretá-las para o espaço extracelular onde potencialmente podem ser efetivas nos processos de comunicação intercelular (van Niel e cols., 2006). Os exossomos de mamíferos apresentam um padrão similar de fosfolipídeos àqueles encontrados por nós neste estudo, e também são formados por membranas duplas de lipídeos com uma distribuição randômica parecida aos fosfolipídeos das vesículas de *H. capsulatum* (Laulagnier e cols, 2004), o que suporta a suposição de que essas vesículas sejam similares as vesículas dos exossomos.

A análise do conteúdo presente nas vesículas de *H. capsulatum* foi realizada utilizando ferramentas proteômicas. *H. capsulatum* sobrevive e se replica dentro de macrófagos do hospedeiro (Allendoerfer & Deepe, 1997). Para isso o fungo necessita de mecanismos para escapar das defesas fungicidas dos macrófagos. A secreção de fatores de virulência é um mecanismo usado por diferentes patógenos para causar danos às células hospedeiras. Neste contexto a presença de proteínas antioxidantes encontradas nas vesículas secretadas, como a catalase B (antígeno M) (Zancopé-Oliveira e cols., 1999), precursores da superóxido desmutase (Brummer & Stevens, 1995), e proteínas antioxidantes tiol específicas (Demasi e cols, 2006), podem representar um mecanismo efetivo para a defesa do fungo.

Proteínas envolvidas no transporte e fusão vesicular, especialmente proteínas da família das Rabs (Pfeffer, 2001; Pfeffer, 2005) também foram demonstradas. Várias das Rab identificadas em *H. capsulatum* são caracterizadas por ter funções similares, como a "Rab GDP-dissociation inhibitor" de *H. capsulatum* que participa da reciclagem de outras Rabs (Ma e cols., 2006) e Rab1a de *H. capsulatum* que regula o transporte antegrade entre o retículo endoplasmático rugoso (ER) e o complexo de Golgi (Sannerud e cols., 2006).

A presença de endoquinases e glucanases nas vesículas é consistente com os resultados esperados, uma vez que essas moléculas são proteínas de membrana e as vesículas podem se originar da invaginação das membranas; processo similar à formação dos exossomos (Sannerud e cols, 2006). O mecanismo pelo qual as vesículas atravessam a parede celular ainda é desconhecido e neste contexto a presença de enzimas capazes de hidrolisar componentes da parede é particularmente interessante.

Observou-se, também que as vesículas de *H. capsulatum* continham chaperonas e proteínas associadas ao núcleo. Uma destas proteínas, a proteína de choque térmico Hsp60 de *H. capsulatum*, é uma das moléculas imunodominantes, fundamentais na ligação entre a levedura com os receptores CD18 de macrófagos (Long e cols, 2003) e a vacinação com esta proteína parece desencadear uma resposta protetora (Gomez e cols, 1995). Hsp70 de *H. capsulatum*, também é imunogênica (Allendoerfer e cols., 1996). A mesma também foi identificada no interior dos corpúsculos vesiculares. Proteínas nucleares de *H. capsulatum* como a H2B, pode ser encontrada na superfície da célula fúngica onde podem ser alvo para anticorpos monoclonais (Nosanchuk e cols, 2003). Surge com isto o questionamento de como uma proteína nuclear poderia estar localizada na superfície celular de *H. capsulatum*. A demonstração desta proteína no interior das vesículas sugere que esta ocorrência se deva ao mecanismo de transporte vesicular. Novos estudos são necessários para corroborar esta hipótese.

Para verificar se as vesículas podem ter algum efeito biológico no hospedeiro, o extrato vesicular foi testado por imunoenaios frente a pool de soros de pacientes com histoplasmose confirmada micologicamente. A reatividade deste pool contra várias proteínas indica que as mesmas poderiam ser moléculas importantes na patogênese da histoplasmose. Uma das proteínas reconhecidas, a proteína de choque térmico de 60 kDa (Hsp60) de *H. capsulatum* tem sido associada com a virulência (Gomez e cols, 1995; Allendoerfer e cols, 1996; Deepe & Gibbons, 2001; Deepe & Gibbons, 2002; Scheckelhoff & Deepe, 2002). Este fato corrobora com a hipótese da importância dessas vesículas nas interações parasito-hospedeiro.

Microscopia das outras espécies de ascomicetos tais como duas espécies de *Candida*, *C. albicans* e *C. parapsilosis*, *S. schenckii* e *S. cerevisiae* revelou a presença de vesículas intactas com morfologias diferenciadas, porém mantendo o padrão de redondo a

ovóide e todas apresentavam dupla membrana lipídica. Novos estudos serão necessários para demonstrar o conteúdo interno das vesículas produzidas por estes ascomicetos.

CONCLUSÕES

Elementos vesiculares com membrana de dupla camada lipídica associadas à parede celular do fungo e presentes no espaço extracelular foram purificados do sobrenadante de cultura de *Histoplasma capsulatum*.

Diferenças na eletrodensidade e tamanho das vesículas analisadas sugerem populações de vesículas distintas, carreadoras de diferentes moléculas.

Foram identificados 17 diferentes fosfolipídeos no interior dos corpos vesiculares, apresentando perfis de fosfolipídeos similares aos encontrados em exossomos.

Foram identificadas como componente das vesículas 283 proteínas diferentes após análises proteômicas. Entre estas, muitas envolvidas na patogênese de microorganismos, tais como nos processos de sinalização celular, transporte e fusão, enzimas com função de hidrólise, as proteínas de choque térmico, componente importante na aquisição de termo-tolerância e termo-adaptação, chaperonas, proteínas ribossomais entre outras.

Foram encontradas vesículas com morfologia e estrutura similares àquelas produzidas por *H. capsulatum* nos ascomicetos *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *S.schenckii* e *S. cerevisiae*.

A reatividade do extrato vesicular frente a um pool de soros de pacientes com histoplasmose sugere que várias proteínas poderiam ser moléculas importantes na patogênese da histoplasmose.

Entre as proteínas encontradas nas vesículas 36% participam do metabolismo dos açúcares. Uma série de proteínas participantes deste metabolismo (glicídeos) são imunogênicas e os resultados desse trabalho sugerem uma possível explicação do porquê de pacientes com PCM produzam anticorpos contra esse grupo de proteínas, por sua

funcionabilidade biológica, localização citoplasmática ou mitocondrial, um exemplo é a formamidase.

Ao contrário do antígeno M, outro antígeno imunodominante não foi encontrado na análise das vesículas quanto no western blot, o que poderia explicar o fato de poucos pacientes apresentarem preecipitinas contra o antígeno H do *Histoplasma capsulatum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O, Raad I, Pinzcowski H, Vartivarian S 1997. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clin Infect Dis*;24:1122-8.

Allendorfer, R, Brunner, G D, Deepe, G S Jr 2000. Complex requirements for nascent and memory immunity in pulmonary histoplasmosis. *J. Immunol.*162: 7389-96.

Allendoerfer R, Deepe GS, Jr 1997. Intrapulmonary response to *Histoplasma capsulatum* in gamma interferon knockout mice. *Infect Immun.* 65(7): 2564-2569.

Allendoerfer R, Maresca B, Deepe GS, Jr 1996. Cellular immune responses to recombinant heat shock protein 70 from *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun.* 64(10): 4123-4128.

Al-Tawfiq JA, Wools KK1998. Disseminated sporotrichosis and *Sporothrix schenckii* fungemia as the initial presentation of human immunodeficiency virus infection. *Clin Infec Dis.* 26: 1403-1406.

Ajello L, Zeidberg LD 1951. Isolation of *Histoplasma capsulatum* and *Allescheria boydii* from soil. *Science.* 113: 229-263.

Ajello L, Cheng SL 1967. Sexual reproduction in *Histoplasma capsulatum*. *Mycologia* 59: 689-697.

Araujo FG 1970. Primeiro isolamento de *Histoplasma capsulatum* de solo em Minas Gerais. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 12: 185-191.

Asadzadeh M, Al-Sweih NA, Ahmad S. Khan ZU 2007. Antifungal susceptibility of clinical *Candida parapsilosis* isolates in Kuwait. *Mycoses.* 1-5.

Batanghari JW, Goldman WE 1997. Calcium dependence and binding in cultures of *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun.* 65(12):5257-61.

Bart-Delabesse E, Deventer VH, Goessens W, Poirot JL, Lioret N, Belkum AV, Dromer F 1995. Contribution of molecular typing methods and antifungal susceptibility tests to the study of a candidemia cluster in a burn care unit. *J. Clin. Microbiol.* 33: 3278-3283.

Brummer E, Stevens DA. 1984. Activation of murine polymorphonuclear neutrophils for fungicidal activity with supernatants from antigen-stimulated immune spleen cell cultures. *Infect. Immun.* 45: 447-52.

Brummer E, Stevens DA 1995. Antifungal mechanisms of activated murine bronchoalveolar or peritoneal macrophages for *Histoplasma capsulatum*. *Clin. Exp. Immunol.* 102(1): 65-70.

Cain JA and Deepe G S Jr 1998. Evolution of the primary immune response to *Histoplasma capsulatum* in murine lung. *Infect Immun.* 66(4): 1473-81.

Cano MV, Hajjeh RA 2001. The epidemiology of histoplasmosis: a review. *Semin Respir infect.* 16: 109-118.

Capone D, Wanke B, Monteiro PC, Lazera MS, de Noronha Andrade G, do Valle AC, Moreno AM, Londero AT 1999. Chronic pulmonary histoplasmosis in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Mycopathologia*, 145(2):75-9.

Casadevall A, Rosas AL, Nosanchuk JD 2000. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Current Opinion Microbiology* 3: 354-358.

Casadevall A, Pirofski LA 2006. The weapon potential of human pathogenic fungi. *Med Mycol.* 689-96.

Ceccato-Antonini SR 2008. Biotechnology implications of filamentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* 30(7):1151-61.

Chandler FW, Kaplan W, Ajello L 1980. Color atlas and text of the histopathology of mycotic disease, p: 63-66. *Year Book Medical Publishers*, Chicago.

Cheng MF, Yang YL, Yao TJ, Lin CY, Liu JS, Tang RB, Yu KW, Fan YH, Hsieh KS, Ho M, Lo HJ 2005. Risk factors for fatal candidemia caused by *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species. *BMC. Infect. Dis.* 7;5(1):22.

Chick EW, Compton SB, Pass II T, Mackey B, Hernandez C, Austin, JRE, Pitzer FR , Flanigan C 1981. Hitchcock's birds, or the increased rate of exposure to *Histoplasma* from blackbird roost sites. *Chest*, 80: 434-438.

Colombo AL, Nucci M, Salomão R, Branchini ML, Richtmann R, Derossi A, Wey SB 1999. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 34(4):281-6.

Colombo AL, Barchiesi F, McGough DA, Rinaldi MG 1995. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macro and microdilution method for azole antifungal susceptibility testing. *J. Clin. Microbiol.* 33(3):535-540,

Colombo A L; Guimarães T 2007. Candidúria: uma abordagem clínica e terapêutica. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* vol.40 no.3.

Christie A e Peterson J C 1945. Pulmonary calcification and negative reactors to tuberculin. *Am. J. Pub. Health*, 35, 1131-1147.

D'Antonio D, Violante B, Mazzoni A, Bonfini T, Capuani MA, D'Aloia F, Iacone A, Schioppa F, Romano F 1998. A nosocomial cluster of *Candida inconspicua* infections in patients with hematological malignancies. *J. Clin. Microbiol.* 36: 792-795

Darling ST 1906. A protozoan general infection producing pseudotubercles in the lungs and focal necrosis in the liver, spleen and lymphonodes. *J. Am. Med. Asso.* 46: 1283-1285.

da Silva MB, Marques AF, Nosanchuk JD, Casadevall A, Travassos LR, Tabora CP 2006. Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. *Microbes Infect.* 8:197-205

da Silva SH, Grosso DM, Lopes JD, Colombo AL, Blotta MH, e cols. 2004. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* gp70 circulating antigen and follow-up of patients undergoing antimycotic therapy. *J. Clin. Microbiol.* 42:4480-86

Davey S, Metzgar D, Wills C, and Fierer J 2002. Fatal *Saccharomyces cerevisiae* Aortic Graft Infection. *J Clin Microbiol.* 2691-2692

Deepe GS Jr, Wüthrich M, Klein BS 2005. Progress in vaccination for histoplasmosis and blastomycosis: Coping with cellular immunity. *Med. Mycol.*, 43:381-389.

Deepe GS Jr 2000. Immune response to early and late *Histoplasma capsulatum* infectious. *Infect. Curr. Opin. Microbiol.*, 3:359-362.

Deepe GS, Jr., Gibbons R 2001. V beta 6+ T cells are obligatory for vaccine- induced immunity to *Histoplasma capsulatum*. *J Immunol* 167(4): 2219-2226.

Deepe GS, Jr., Gibbons RS 2002. Cellular and molecular regulation of vaccination with heat shock protein 60 from *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun* 70(7): 3759-3767.

Demasi AP, Pereira GA, Netto LE 2006. Yeast oxidative stress response. Influences of cytosolic thioredoxin peroxidase I and of the mitochondrial functional state. *Febs J* 273(4): 805-816.

DeMonbreun WA 1934. The cultivation and cultural characteristics of Darling's *Histoplasma capsulatum*. *Am. J. Trop. Med.*, 14: 93-125.

Denzer K, Kleijmeer MJ, Heijnen HF, Stoorvogel W and Geuze HJ 2000. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *Journal of Cell Science*, 3365-3374.

Díaz IAC 1989. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. *Mycopathologia*, p 113-116.

Di Lallo G, Gargano S, Maresca B 1994. The *Histoplasma capsulatum* cdc2 gene is transcriptionally regulated during the morphologic transition. *Gene*, 11;140(1):51-7.

Disalvo AF, Johnson WM 1979. Histoplasmosis in South America: Support for the microfocus concept. *Am. J. Epidemiol.*, 109: 480-492.

Diz Dios P, Ocampo A, Miralles C, Otero I, Iglesias I, Rayo N 1999. Frequency of oropharyngeal candidiasis in HIV-infected patients on protease inhibitor therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 87(4):437-41.

Dodd K, Tompkins EH 1934. Case of histoplasmosis of Darling in infant. *Am. J. Trop. Med.*, 14: 127-137.

Domer JE 1971. Monosaccharide and chitin content of cell walls of *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. *J. Bacteriol.*, 124: 1489-1501.

Domer LE, Hamilton LG, Harkin JC 1967. Comparative study of cell walls of the yeast-like and mycelial phases of *Histoplasma capsulatum*. *J. Bacteriol.*, 94: 466-474.

Eissenberg LG, Goldman WE 1991. *Histoplasma* variation and adaptative strategies for parasitism : new perspectives on histoplasmosis. *Clin Microbiol Rev* 4: 411-421.

Emmons CW 1949. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil. *Public Health Resp* 64: 892-896.

Espinel-Ingroff A, Rodríguez-Tudela JL, Martínez-Suárez JV 1995. Comparison of two alternative microdilution procedures with the National Committee for Clinical Laboratory Standards reference macrodilution method M27-P for in vitro testing of fluconazole-resistant and -susceptible isolates of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol.* 33(12):3154–3158

Fava SC & Fava Netto C 1998. Epidemiologic surveys of Histoplasmin and Paracoccidioidin sensitivity in Brazil *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* Vol.40 N.3.

Fava Netto C, Silva UA, Chammas F, Lacaz CS 1967. Histoplasmosse epidêmica. Estudo clínico, radiológico, micológico e imunológico de surto ocorrido no Estado de São Paulo, Brasil. *Ver Inst Med Trop São Paulo* 9: 222- 232.

Feldmesser M, Kress Y, Casadevall A. 2001. Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. *Microbiology* 147(Pt 8): 2355-2365.

Fenn JP, Segal H, Barland B, Denton D, Whisenant J, Chun H, Christofferson K, Hamilton L, Carroll K 1994. Comparison of update Vitek yeast biochemical card and API 20C yeast identification system.. *J. Clin. Microbiol.* 32(5):1184-87.

Fernandes F, Costa W, Wanke B, Oliveira RZ 1989. Microepidemia de histoplasmosse capsulata: clínica e epidemiológica do primeiro surto ocorrido no Estado da Paraíba. *Ciência Cult Saú* 11: 189-199.

Fernandes PMB 2005. How does yeast respond to pressure? *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 38: 1239-1245

Fevrier B, Raposo G 2004. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol* 16(4): 415-421.

Fidel PL, Jr, Barousse M, Espinosa T, Camaratti C, Ficarra M, Martin DHA 2004. Live intravaginal *Candida* challenge in humans reveals new hypotheses for the immunopathogenesis of vulvovaginal candidiasis. *Infect. Immun.* 72:2939-2946.

Fidel PL Jr, Vazquez JA, Sobel JD 1999. *Candida glabrata*: Review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev.* 12(1): 80-96

Forrest GN, Weekes E, Johnson JK 2008. Increasing incidence of *Candida parapsilosis* candidemia with caspofungin usage. *J Infect.* 56(2):126-9.

Fridkin SK, MD, Kaufman D, Jonathan MD, Edwards R, Shetty S, Horan T, MPH and the National Nosocomial Infections Surveillance System Hospitals 2006. Changing Incidence of *Candida* Bloodstream Infections Among NICU Patients in the United States: 1995–2004 *Pediatrics* p. 1680-1687.

Garcia-Rivera J, Chang YC, Kwon-Chung KJ, Casadevall A 2004. *Cryptococcus neoformans* CAP59 (or Cap59p) is involved in the extracellular trafficking of capsular glucuronoxylomannan. *Eukaryot Cell* 3(2): 385-392.

Gaur, P. K., Lichtwardt, R.W 1980. Comparative study of a new *Chrysosporium* species with *Histoplasma capsulatum*. *Sabouraudia*. 18: 105-14.

Gácsér A, Schäfer W, Nosanchuk JS, Salomon S, Nosanchuk JD 2007. Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. *Fungal Genet Biol.* 44(12):1336-41.

Gargano S, Di Lallo G, Kobayashi GS, Maresca B 1995. A temperature-sensitive strain of *Histoplasma capsulatum* has an altered delta 9-fatty acid desaturase gene. *Lipids.* 30(10):899-906.

Gildea LA, Ciruolo GM, Morris RE, Newman SL 2005. Human dendritic cell activity against *Histoplasma capsulatum* is mediated via phagolysosomal fusion. *Infect Immun.* 73(10):6803-11.

Gomez BL, Nosanchuk JD 2003. Melanin and fungi. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 16:91

Gomez BL, Nosanchuk JD, Diez S, Youngchim S, Aisen P, et al 2001. Detection of melanin-like pigments in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro and during infection. *Infect. Immun.* 69:5760–67

- Gomez FJ, Allendoerfer R, Deepe GS, Jr 1995. Vaccination with recombinant heat shock protein 60 from *Histoplasma capsulatum* protects mice against pulmonary histoplasmosis. *Infect Immun* 63(7): 2587-2595.
- Goodman NL, Larsh HW 1967. Environmental factors and growth of *Histoplasma capsulatum* in soil. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, 33-145.
- Guimarães AJ 2006. Proteína M recombinante do *Histoplasma capsulatum*: mapeamento de epítomos e aplicações no diagnóstico da histoplasmose. Curso de Biologia Celular e Molecular do Departamento de Ensino do Instituto Oswaldo Cruz. Tese de Mestrado.
- Guimarães AJ, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM 2006. Diagnosis of Histoplasmosis. *Brazilian Journal of Microbiology*. 37:1-13.
- Guimarães AJ, Pizzini CV, De Matos Guedes HL, Albuquerque PC, Peralta JM, Hamilton AJ, Zancopé-Oliveira RM 2004. ELISA for early diagnosis of histoplasmosis. *J. Med. Microbiol.*, 53(pt6), 509-514.
- Grosshans BL, Ortiz D, Novick P 2006. Rabs and their effectors: Achieving specificity in membrane traffic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 8; 103(32): 11821–11827.
- Hamilton AJ, Bartholomew MA, Figueroa J, Fenelon LE, Hay RJ 1990. Evidence that the M antigen of *Histoplasma capsulatum* var *capsulatum* is a catalase, which exhibits cross reaction with other dimorphic fungi. *J. Med Vet. Mycol.* 28:479-485.
- Harris GS, Keath EJ, Medoff J 1989. Characterization of alpha and beta tubulin genes in the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. *J. Gen. Microbiol.*, 135(7):1817-32.
- Heiner DC 1958. Diagnosis of histoplasmosis using precipitin reactions in agar gel. *Pediatrics*. 22: 616-629.
- Hogan LH, Klein BS, Levitz SM 1996. Virulence factors of medically important fungi. *Clin. Microbiol. Rev.* 9(4):469-88.
- Huhn GD, Austin C, Carr M, Heyer D, Boudreau P, Gilbert G, Eimen T, Lindsley MD, Cali S, Conover CS, Dworkin MS 2005. Two outbreaks of occupationally acquired histoplasmosis: more than workers at risk. *Environ Health Perspect. Environ Health Perspect.*;113(5):585-9.
- Hwang L, Hocking-Murray D, Bahrami AK, Andersson M, Rine J, Sil A 2003. Identifying phase-specific genes in the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum* using a genomic shotgun microarray. *Mol. Biol. Cell.*, 14(6):2314-26.
- Ignatov A, Keath EJ 2002. Molecular cell biology and molecular genetics of *Histoplasma capsulatum*. *Int. J. Med. Microbiol.* 292(5-6):349-61.

Ikeda R, Sugita T, Jacobson ES, Shinoda T 2003. Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. *Microbiology and immunology* 47: 271-277.

Isenberg H D, Tucci V, Cintron F, Singer C, Weinstein G S, Tyras D H 1989. Single-source outbreak of *Candida tropicalis* complicating coronary bypass surgery. *J Clin Microbiol.* 27(11): 2426-2428

Jacobson ES 2000. Pathogenic roles of fungal melanins. *Clin. Microbiol. Rev.* 13:708-717.

Jayatilake JAMS, Samaranayake YH, Cheung LK, Samaranayake LP 2006. Quantitative evaluation of tissue invasion by wild type, hyphal and *SAP* mutants of *Candida albicans*, and non-*albicans* *Candida* species in reconstituted human oral epithelium *Journal of Oral Pathology & Medicine* P 484-491.

Jin X, Zhang H, Himura M, Yamamoto I 1990. Mother-and-child cases of sporotrichosis infection. *Mycoses* 33:33-36.

Johnson CH, Klotz MG, York JL, Kruff V, McEwen JE 2002. Redundancy, phylogeny and differential expression of *Histoplasma capsulatum* catalases. *Microbiology* 148: 1129-42.
Johnson CH, Prigge JT, Warren AD, McEwen JE. 2003. Characterization of an alternative oxidase activity of *Histoplasma capsulatum*. *Yeast* 20:381-88

Jordens I, Marsman M, Kuijl C, Neeffjes J 2005. Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion. *Traffic.* 6(12):1070-7.

Kanetsuna IAF, Tanaka Y, Yamamura Y and Carbonell LM 1974. Chemical and immunological properties of galactomannans obtained from *Histoplasma duboisii*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blasomyces dermatitidis*. *Mycopath* 111-125.

Kauffman CA 2007. Histoplasmosis a clinical and laboratory update. *Clin. Microbiol. Rev.* 20:115-32

Kaufman L, Blumer S 1966. Occurrence of serotypes among *Histoplasma capsulatum* strains. *J Bacteriol* 91: 1434-1439.

Kaufman L, Kaplan W 1961. Preparations of a fluorescent antibody specific for the yeast phase of *Histoplasma capsulatum*. *J. Bacteriol.*, 82: 729-735.

Keath EJ, Abidi FE 1994. Molecular cloning and sequence analysis of *yps-3*, a yeast-phase-specific gene in the dimorphic fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Microbiology.* 140 (Pt 4):759-67.

Keath EJ, Painter AA, Kobayashi GS, Medoff G 1989. Variable expression of a yeast-phase-specific gene in *Histoplasma capsulatum* strains differing in thermotolerance and virulence. *Infect Immun.* 57(5):1384-90.

Klein BS, Tebbets B 2007. Dimorphism and virulence in fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* 10:314-319.

Klite PD, Diercks FH 1965. *Histoplasma capsulatum* in fecal contents and organs of bats in the Canal Zone. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 14: 433-439.

Krcmery, V., and G. Kocacicova 2000. Longitudinal 10-year prospective survey of fungaemia in Slovak Republic: trends in etiology in 310 episodes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 36:7-11

Kwon-Chung KJ 1975. Perfect state (*Emmonsia capsulata*) of the fungus causing large-form African histoplasmosis. *Mycologia* 67: 980-990.

Kwon-Chung KJ, Weeks RJ, Larsh HW 1974. Studies on *Emmonsia capsulata* (*Histoplasma capsulatum*). II. Distribution of the two mating types in 13 endemic states of the United States. *J Epidemiol.*, 99: 44-49.

Kwon-Chung KJ 1972. *Emmonsia capsulata*: sexual stage of *Histoplasma capsulata*. *Science* 175: 326.

Kwon-Chung KJ, Bennett JE 1992. Sporotrichosis In: Medical Mycology. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. p 707-729.

LACAZ, C. S., PORTO, E., MARTINS, J.E.C., HEINZ_VACCARI E.M., MELO, N.T. 2002. *Tratado de Micologia Médica Lacaz*. 9a edição, São Paulo, SP: Sarvier.

Larsh HW, Bartels PA 1975. Serology of histoplasmosis. *Mycopathol Mycol Appl.* ; 115-131.

Latouche GN, Daniel HM, Lee OC, Mitchell TG, Sorrell TC, Meyer W 1997. Comparison of use of phenotypic and genotypic characteristics for identification of species of the anamorph genus *Candida* and related teleomorph yeast species. *J. Clin. Microbiol.* 12, 3171-3180.

Laulagnier K, Motta C, Hamdi S, Roy S, Fauvelle F e col 2004. Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *Biochem J* 380(Pt 1): 161-171.

Leimann BC, Pizzini CV, Muniz MM, Albuquerque PC, Monteiro PC, Reis RS, Almeida-Paes R, Lazera MS, Wanke B, Perez MA, Zancoppe-Oliveira RM 2005. Histoplasmosis in a Brazilian center: clinical forms and laboratory tests. *Rev Iberoam Micol.* 22(3):141-6.

Londero AT, Wanke B 1988. Histoplasmosis capsulata. *JBM* 55: 96-109.

Long KH, Gomez FJ, Morris RE, Newman SL 2003 Identification of heat shock protein 60 as the ligand on *Histoplasma capsulatum* that mediates binding to CD18 receptors on human macrophages. *J Immunol* 170(1): 487-494.

- Lundquist EA 2006. Small GTPases. *WormBook*. 17;:1-18.
- Lynch PJ, Voorhees JJ, Harrel R 1970. Systemic sporotrichosis. *Ann Intern Méd.* 73: 23-30.
- Ma Y, Kuno T, Kita A, Nabata T, Uno S e col 2006. Genetic evidence for phospholipid-mediated regulation of the Rab GDP-dissociation inhibitor in fission yeast. *Genetics* 174(3): 1259-1271.
- Manfredi R, Sabbatani S, Calza L. 2007. Recurring *Candida albicans* esophagitis in a HIV-infected patient undergoing long-Term antiretroviral therapy, and with absent-negligible immunodeficiency. *Braz J Infect Dis.* 11(6):605-9.
- Maresca B, Kobayashi GS. 2000. Dimorphism in *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. *Contrib. Microbiol.*;5:201-16.
- Marques SA, Franco SRVS, Camargo RMP, e cols. 1993. Sporotrichosis of the domestic cat (*Felis catus*): human transmission . *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*,p.327-330.
- McDonough ES, Wisniewski TR, Penn LA, Chan DM, McNamara WJ. 1976. Preliminary studies on conidial liberation of *Blastomyces dermatitidis*, and *Histoplasma capsulatum*. *Sabouraudia*. 14: 199-204.
- McGinnis MR, Katz B. 1979. *Ajellomyces* and its synonym *Emmonsiiella*. *Mycotaxon* 8:157-164.
- Medoff G, Sacco M, Maresca B, Schlessinger D, Painter A, Kobayashi GS, Carratu L. 1986. Irreversible block of the mycelial-to-yeast phase transition of *Histoplasma capsulatum*. *Science* 231, 476-479.
- Merlino J, Tambosis E, Veal D. 1998. Chromogenic Tube Test for Presumptive Identification or Confirmation of Isolates as *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1157-1159
- Mesa-Arango AC, Reys-Montes MR, Pérez-Mejía A, Navarro-Barranco H, Souza V, Zúñiga G, Toriello C. 2002. Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of sporotrichosis. *J. Clin. Microbiol.* 40: 3004-11.
- Moraes MAP, Almeida MMR. 1976. Isolamento de *Histoplasma capsulatum* do solo de Humboldt (Estado de Mato Grosso, Brasil). *Acta Amazônica* 6:43-47.
- Morris-Jones R, Youngchim S, Gomez BL, Aisen P, Hay RJ, e cols. 2003. Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. *Infect. Immun.* 71:4026-33
- Morris-Jones R. 2002;. Sporotrichosis. *Clin Exp Dermatol* 27: 427-431.

- Nemecek JC, Wuthrich M, Klein BS. 2006. Global control of dimorphism and virulence in fungi. *Science*. 28; 312(5773):583-8.
- Newman SL. 1999. Macrophages in host defense against *Histoplasma capsulatum*. *Trends Microbiol.* 7(2):67-71.
- Nittler MP, Hocking-Murray D, Foo CK, Sil A. 2005. Identification of *Histoplasma capsulatum* transcripts induced in response to reactive nitrogen species. *Mol. Biol. Cell* 16:4792–813
- Nosanchuk JD, Gomez BL, Youngchim S, Diez S, Aisen P, et al. 2002. *Histoplasma capsulatum* synthesizes melanin-like pigments in vitro and during mammalian infection. *Infect. Immun.* 70:5124–31
- Nosanchuk JD, van Duin D, Mandal P, Aisen P, Legendre AM, Casadevall A. 2004. *Blastomyces dermatitidis* produces melanin in vitro and during infection. *FEMS Microbiol. Lett.* 239:187–93
- Nosanchuk JD, Steenbergen JN, Shi L, Deepe GS, Jr., Casadevall A. 2003. Antibodies to a cell surface histone-like protein protect against *Histoplasma capsulatum*. *J. Clin. Invest.* 112(8): 1164-1175.
- O'Reilly LC, Altman SA. 2006. Macrorestriction analysis of clinical and environmental isolates of *Sporothrix schenckii*. *J. Clin. Microbiol.* 44(7):2547-52
- Pagano L, Antinori A, Ammassari A, Mele L, Nosari A, Melillo L, Martino B, Sanguinetti M, Equitani F, Nobile F, Carotenuto M, Morra E, Morace G, Leone G. 1999. Retrospective study of candidemia in patients with hematological malignancies. clinical features, risk factors and outcome of 76 episodes. *Eur. J. Haematol.* 63(2):77-85.
- Paris S, Wysong D, Debeaupuis JP, Shibuya K, Philippe B, Diamond RD, Latge JP. 2003. Catalases of *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* 71:3551-3562.
- Parsons RJ, Zeraforretis CJD. 1945. Histoplasmosis in man: report of seven cases and review of seventy-one cases. *Arch. Intern Med* 75: 1-23.
- Patel JB, Batanghari JW, Goldman WE. 1998. Probing the yeast phase-specific expression of the CBP1 gene in *Histoplasma capsulatum*. *J. Bacteriol.* 180(7):1786-92.
- Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS., Messer SA, Houston A, Coffman S, Hollis RJ. The SENTRY Participant Group. 2000. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p. 747-751, Vol. 44, No. 3
- Pfaller M A, Vu Q, Lancaster M, Espinel-Ingroff A, Fothergill A, Grant C, McGinnis M R, Pasarell L, Rinaldi M G, Steele-Moore L. 1994. Multisite reproducibility of colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. *J. Clin. Microbiol.* 32(7): 1625–1628

Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Messer SA, Houston A, Coffman S, Hollis RJ, The SENTRY Participant Group. 1998. Bloodstream infections due to *Candida* Species: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in North America and Latin America, 1997-1998 .. J. Clin. Microbiol. p. 1886-1889.

Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Hollis RJ, Messer SA and for The Sentry Participant Group. 2001. International Surveillance of Bloodstream Infections Due to *Candida* Species: Frequency of Occurrence and Antifungal Susceptibilities of Isolates Collected in 1997 in the United States, Canada, and South America for the SENTRY Program

Pfeffer S. 2005. A model for Rab GTPase localization. *Biochem. Soc. Trans.* 33(Pt 4): 627-630.

Pfeffer SR. 2001 Rab GTPases: specifying and deciphering organelle identity and function. *Trends. Cell. Biol.* 11(12): 487-491.

Pine L. 1960. Morphological and physiological characteristic of *Histoplasma capsulatum*. In: Sweany H.D. ed Histoplasmosis, Springfield, Charles C. Thomas p. 40-75.

Pizzini CV, Zancope-Oliveira RM, Reiss E, Hajjeh R, Kaufman L, Peralta JM. 1999. Evaluation of a western blot test in an outbreak of acute pulmonary histoplasmosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 6(1):20-3

Ponnambalam S; Baldwin SA. 2003. Constitutive protein secretion from the trans-Golgi network to the plasma membrane. *Molecular Membrane Biology* 20, pp.129-139.

Rappleye CA, Engle JT, Goldman WE. 2004. RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates a role for alpha-(1,3)-glucan in virulence. *Mol Microbiol.* 53(1):153-65.

Reiss E, Knowles JB, Bragg SL, Kaufman L. 1986. Monoclonal antibodies against the M-protein and carbohydrate antigens of histoplasmin characterized by enzyme-linked immunoelectrotransfer blot method. *Infect. Imm.*, 53: 540-546.

Reiss E. 1986. Molecular Immunology of Mycotic and Actinomycotic Infections. *Elsevier Science Publishing Co*, New York, p. 77-97.

Ribi, Salvin SB. 1956. Antigens from the yeast phase of *Histoplasma capsulatum*: I- Morphology of the cell as revealed by electron microscope. *Exp Cell Res* 10: 394-404.

Rippon JW. 1988. Medical Mycology. W B Saunders Co Philadelphia. 381-423.

Rocha Lima VH 1912. Beiträzzur ganntis der blastomykosen, lymphangitis epizootica und histoplasmosis. *Zentralbl. Bakt.*, 67: 233-249.

- Rocha MM, Dassin T, Lira R, Lima EL, Severo LC, Londero AT. 2001. Sporotrichosis in patient with AIDS: report of a case and review. *Rev Iberoam Micol*, 18: 133-136.
- Rodrigues ML, Nakayasu ES, Oliveira DL, Nimrichter L, Nosanchuk JD e cols. 2008 Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryot Cell* 7(1): 58-67.
- Rodrigues ML, Nimrichter L, Oliveira DL, Frases S, Miranda K e cols. 2007. Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryot Cell* 6(1): 48-59.
- Romero-Martinez R, Wheeler M, Guerrero-Plata A, Rico G, Torres-Guerrero H. 2000. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infect Immun*. 68:3696-3703.
- Sacks JJ, Ajello L, Crockett LK. 1986. An outbreak and review of cava associated histoplasmosis capsulat. *J Med Vet Mycol* 24: 313-327.
- Sannerud R, Marie M, Nizak C, Dale HA, Pernet-Gallay K e col. 2006 Rab1 defines a novel pathway connecting the pre-Golgi intermediate compartment with the cell periphery. *Mol Biol Cell* 17(4): 1514-1526.
- Sebghati TS, Engle JT, Goldman WE. 2000. Intracellular parasitism by *Histoplasma capsulatum*: fungal virulence and calcium dependence. *Science*. 17;290(5495):1368-72.
- Severo LC, Petrillo VF, Camargo JJ, Beyer GR, Porto MS. 1986. Acute pulmonary histoplasmosis and first isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil of Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 28: 51-55.
- Scheckelhoff M, Deepe GS, Jr. 2002. The protective immune response to heat shock protein 60 of *Histoplasma capsulatum* is mediated by a subset of V beta 8.1/8.2+ T cells. *J Immunol* 169(10): 5818-5826.
- Shen YZ, Qi TK, Ma JX, Jiang XY, Wang JR, Xu QN, Huang Q, Liu XN, Sun HQ, Lu HZ. 2007. Invasive fungal infections among inpatients with acquired immune deficiency syndrome at a Chinese university hospital. *Mycoses*. 50(6):475-80.
- Starai VJ, Jun Y, Wickner W. 2007 Excess vacuolar SNAREs drive lysis and Rab bypass fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* ; 104(34): 13551-13558
- St-Germain G, Summerbell R. 1996. Identifying filamentous fungi. In: A clinical laboratory handbook. California: Star Publishing Company.
- Subra C, Laulagnier K, Perret B, Record M. 2007. Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie* 89(2): 205-212.

Tachibana T, Matsuyama T, Mitsuyama M. 1999. Involvement of CD4⁺ T cells and macrophages in acquired protection against infection with *Sporothrix schenckii* in mice. *Medical Mycology* 37 (6)

Taylor ML, Ruiz-Palacios GM, Del Rocio Reyes-Montes M, Rodriguez-Arellanes G, Carreto-Binaghi LE, Duarte-Escalante E, Hernandez-Ramirez A, Perez A, Suarez-Alvarez RO, Roldan-Aragon YA, Romero-Martinez R, Sahaza-Cardona JH, Sifuentes-Osornio J, Soto-Ramirez LE, Pena-Sandoval GR. 2005. Identification of the infectious source of an unusual outbreak of histoplasmosis, in a hotel in Acapulco, state of Guerrero, Mexico. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1;45(3):435-41.

Tian X, Shearer G Jr. 2002. The mold-specific MS8 gene is required for normal hypha formation in the dimorphic pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. *Eukaryot Cell.* 1(2):249-56.

Tian X, Shearer G Jr. 2001. Cloning and analysis of mold-specific genes in the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. *Gene.* 5;275(1):107-14.

Vanbreuseghem R. 1952. L'histoplasmose africaine ou histoplasmose causée par *Histoplasma duboisii*. *Bull. Acad. Royale. Méd.,* 4:543 .

Van Meer, G., and Sprong, H. 2004. Membrane lipids and vesicular traffic, *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 373-378.

Van Niel G, Porto-Carreiro I, Simoes S, Raposo G. 2006. Exosomes: a common pathway for a specialized function. *J. Biochem.* 140(1): 13-21.

Wanke B 1985. Histoplasmose: Estudo epidemiológico, clínico e experimental. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Wheat LJ, Slama TG, Eitzen HE, Kohler RB, French MLV, Biesecker JL. 1981. A large urban outbreak of histoplasmosis: Clinical features. *Ann. Intern. Med.* 94: 331-337.

Woods JP. 2003. Knocking on the right door and making a comfortable home: *Histoplasma capsulatum* intracellular pathogenesis. *Curr opin Microbiol,* 6:327-331.

Woods JP. 2002. *Histoplasma capsulatum* Molecular Genetics, Pathogenesis, and responsiveness to its Environment – Review. *Fungal genetics and Biology* 35, 81-97.

Yoneda A, Doering TL. 2006 A eukaryotic capsular polysaccharide is synthesized intracellularly and secreted via exocytosis. *Mol Biol Cell* 17(12): 5131-5140.

Zancoppe-Oliveira RM, Muniz MM, Tavares PMS. 2005. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains in Brazil. *Fems Immunol. Med. Microbiol.* 45 p 443-449.

Zancopé-Oliveira RM, Reiss E, Lott TJ, Mayer LW, Deepe GSJ. 1999. Molecular cloning, characterization and expression of the M antigen of *Histoplasma capsulatum*. *Infection and Immunity*, 1947-1953

Zancopé-Oliveira RM, Bragg SL, Reiss E, Peralta JM 1994. Immunochemical analysis of the H and M glycoproteins from *Histoplasma capsulatum*. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1(5):563-8.

Zancopé-Oliveira RM, Bragg SL, Reiss E, Wanke B, Peralta JM. 1994. Effects of histoplasmin M antigen chemical and enzymatic deglycosylation on cross-reactivity in the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot method. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1(4):390-3.

Zancopé-Oliveira, R.M., Bragg, S.L., Hurst, S., Peralta, J.M. & Reiss, E. 1993. Evaluation of cation exchange chromatography for the isolation of M glycoprotein from histoplasmin. *J. Med. Vet. Mycol*. 31(1): 29-41.

Zancopé-Oliveira RM, Wanke B. 1987. Distribuição das fontes de infecção do *Histoplasma capsulatum* var *capsulatum* em Rio da Prata –Município do Rio de Janeiro(RJ). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 29: 243-250.

Zeidberg LD, Ajello L and Webster R H. 1955. Physical and chemical factors in relation to *Histoplasma capsulatum* in soil. *Science* 122: 33–34.

ANEXOS E MATERIAL SUPPLEMENTAR

Legend for Supplemental Material

Supplemental Figure 1. Tandem mass spectrometry analysis of the major *H. capsulatum* phospholipid species. (A-E) Negative-ion mode MS/MS spectra of the ion species at m/z 714.6, 716.6, 740.6, 742.6, and 774.5, respectively.

(F-Q) Positive-ion mode MS/MS spectra of the ion species at m/z 746.7, 760.7, 762.7, 764.7, 766.7, 780.7, 782.7, 786.7, 790.7, 804.7, 806.7, and 808.7, respectively. The assignments for the fragment-ion species are indicated. C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, and C20:4, carboxylate ions of palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, and arachidonic acid (or their isomers), respectively; Cho, choline; ChoP, phosphocholine; EtN, ethanolamine; EtNP, ethanolaminephosphate; EtNP_c, cyclic ethanolaminephosphate; EtP ethylenephosphate; GroEtNP glycerol ethanolaminephosphate; Me methyl Me N EtP, GroEtNP, Me, group; Me₃N, trimethylamine; m/z , mass to charge ratio; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; PS, phosphatidylserine; Ser, serine; SerP, serinephosphate.