



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS –
CÂMPUS DE ARARAQUARA



**PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À
FARMÁCIA**

Ana Carolina Moreira da Silva Pires

**Avaliação da influência dos micronutrientes metálicos Ferro e Zinco na formação do
biofilme e na virulência de *Histoplasma capsulatum***

Araraquara, SP

2023

ANA CAROLINA MOREIRA DA SILVA PIRES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, como um dos pré-requisitos para a obtenção do título de Doutora.

Orientadora: Profa Dra Ana Marisa Fusco Almeida

Coorientadora: Dra. Junya de Lacorte Singulani

Araraquara, SP

2023

P669a

Pires, Ana Carolina Moreira da Silva.

Avaliação da influência dos micronutrientes metálicos Ferro e Zinco na formação do biofilme e na virulência de *Histoplasma capsulatum* / Ana Carolina Moreira da Silva Pires. – Araraquara: [S.n.], 2023.
104 f. : il.

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

Orientadora: Ana Marisa Fusco Almeida.

Coorientadora: Junya de Lacorte Singulani.

1. *Histoplasma capsulatum*. 2. Biofilme. 3. Zinco. 4. Ferro. I. Fusco Almeida, Ana Marisa, orient. II. Singulani, Junya de Lacorte III. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Avaliação da influência dos micronutrientes metálicos Ferro e Zinco na formação do biofilme e na virulência de *Histoplasma capsulatum*

AUTORA: ANA CAROLINA MOREIRA DA SILVA PIRES

ORIENTADORA: ANA MARISA FUSCO ALMEIDA

COORDINADORA: JUNYA DE LACORTE SINGULANI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ANA MARISA FUSCO ALMEIDA (Participação Virtual)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Prof. Dr. ALLAN JEFFERSON GUIMARÃES (Participação Virtual)
Departamento de Microbiologia e Parasitologia / Universidade Federal Fluminense (UFF)

Profa. Dra. LILIANA SCORZONI (Participação Virtual)
Universidade de Guarulhos (UnG)

Prof. Dr. CRISTIANO GALLINA MOREIRA (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 01 de março de 2023

Agradecimentos

Em agradecimento, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fomento para a realização do trabalho científico para obtenção do título de Doutor (a) com o projeto de número 870026/2002-0 sob o processo de número 142110/2019-1 com vigência de 01 de junho de 2019 a 31 de maio de 2022.

Agradeço as professoras, Ana Marisa Fusco Almeida e Maria José Soares Giannini por me receberem e permitirem a realização do trabalho no Núcleo de Proteômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, campus Araraquara, SP. Em ênfase, a Professora Doutora, Ana Marisa Fusco Almeida por me orientar e contribuir para o meu aprendizado.

Agradeço aos colegas de trabalho e laboratório, Carolina Vaso, Angélica Romão, Caroline Marcos, Junya de Lacorte Singulani entre outros, por contribuírem imensamente para com a realização do meu trabalho e dividirem comigo seus conhecimentos. Em especial, a Junya, minha coorientadora do trabalho, que foi uma grande amiga, uma grande inspiração como profissional acadêmica.

Agradeço, principalmente, aos meus pais, Sandra R. M. da Silva e Alexandre José Pires por me instruírem sempre a ser uma boa profissional, exercer meu trabalho com estima, profissionalismo e acima de tudo, honestidade. Dedico o meu trabalho a eles.

RESUMO

Histoplasmosse é uma doença fúngica ocasionada pela inalação de microconídios do fungo *Histoplasma capsulatum* presentes em solos contaminados. Após a inalação, para que o fungo se instale dentro dos macrófagos do hospedeiro são necessários mecanismos de virulência e adesão. Estudos mostram alguns mecanismos utilizados pelo fungo como a formação de biofilme e a utilização de adesinas. Mais recentemente, estudos têm mostrados a habilidade do fungo capturar íons metálicos essenciais que auxiliam na sua multiplicação no interior da célula. Dentre os íons requisitados, o ferro e o zinco são metais que influenciam em diversas atividades celulares de organismos eucarióticos. A partir disso, o objetivo do trabalho foi avaliar a influência dos íons metálicos ferro e zinco em células planctônicas, bem como na formação e nos mecanismos de virulência do biofilme de *H. capsulatum*. As cepas utilizadas para o trabalho foram a Panamense G186A (ATCC 26029) e a oriunda de morcego EH-315 (BAC₁). Os quelantes TPEN e DTPA foram selecionados para mimetizar ambientes com escassez de íons, e as soluções de sulfato ferroso e sulfato de zinco para adição de mais íons ao meio HAM-F12. Os resultados mostraram que na presença dos quelantes tanto as células planctônicas quanto a formação do biofilme foram prejudicadas. Na presença do zinco, a cepa G186A teve um aumento na sua atividade metabólica e densidade celular no crescimento planctônico, ao contrário da EH-315 que não teve esses parâmetros alterados em relação ao crescimento controle. Na presença do ferro ambas as cepas apresentaram aumento de atividade metabólica e densidade celular. Em relação a formação do biofilme, na presença do zinco só a cepa G186A mostrou maior atividade metabólica, enquanto na presença do ferro ambas as cepas tiveram esse parâmetro aumentado. Não houve influência na formação de biomassa e da matriz extracelular para as duas cepas na presença dos íons ou dos quelantes. As microscopias eletrônicas de varredura e confocal mostraram que na presença dos íons foram formados biofilmes mais densos e robustos após 144 horas para ambas as cepas, sendo que com o ferro foram formados biofilmes predominantemente de hifas. O quelante TPEN, principalmente, inibiu a formação de aglomerados celulares tanto em 24 quanto em 144 horas de cultivo. Os ensaios com o corante congo red mostraram que na presença dos quelantes houve maior susceptibilidade das cepas ao corante, principalmente a cepa EH-315, indicando possíveis alterações na parede celular fúngica. Para análise da virulência, o modelo animal alternativo *Galleria mellonella* foi utilizado. Não houve maior sobrevivência das larvas infectadas após crescimento em meios com quelantes em comparação com as larvas infectadas com leveduras da condição controle. Entretanto, as larvas infectadas com as leveduras oriundas dos biofilmes inicial e maduro cultivados em meio com zinco e ferro da cepa G186A apresentaram menor sobrevivência. A cepa EH-315 não apresentou diferenças estatísticas na sobrevivência das larvas infectadas com leveduras oriundas dos meios com os íons. De maneira geral, os resultados trazem informações inéditas em relação a morfologia e a influência de íons em biofilmes do fungo *Histoplasma spp*. A adição dos íons metálicos influenciou na atividade metabólica e na viabilidade celular das cepas, principalmente para a cepa G186A. Os biofilmes mostraram maior robustez na presença de mais íons metálicos além de mudanças morfológicas em ambas as cepas. Além disso, a cepa G186A mostrou-se mais virulenta na presença dos íons indicando que os íons contribuem para seus mecanismos de virulência. O uso de quelantes podem contribuir para novas opções terapêuticas anti- *H. capsulatum*, visto que podem diminuir a viabilidade e a formação dos biofilmes do fungo.

Palavras-chave: *Histoplasma capsulatum*, biofilme, zinco, ferro.

ABSTRACT

Histoplasmosis is a fungal disease caused by the inhalation of microconidia of the fungus *Histoplasma capsulatum* present in contaminated soils. After inhalation, virulence and adhesion mechanisms are required for the fungus to install itself within the host's macrophages. Studies show some mechanisms used by the fungus, such as biofilm formation and the use of adhesins. More recently, studies have shown the ability of the fungus to capture essential metal ions that help in its multiplication inside the cell. Among the required ions, iron and zinc are metals that influence various cellular activities of eukaryotic organisms. From this, the objective of this work was to evaluate the influence of iron and zinc in planktonic cells, as well as in the formation and mechanisms of virulence of the biofilm of *H. capsulatum*. The strains used for the work were the Panamanian G186A (ATCC 26029) and the bat strain EH-315 (BAC₁). The TPEN and DTPA chelators were selected to mimic environments with ion scarcity, and the ferrous sulfate and zinc sulfate solutions to add more ions to the HAM-F12 medium. The results showed that in the presence of chelators, both planktonic cells and biofilm formation were impaired. In the presence of zinc, the G186A strain had an increase in its metabolic activity and cell density in planktonic growth, unlike EH-315, which did not have these parameters altered in relation to the control growth. In the presence of iron, both strains showed an increase in metabolic activity and cell density. Regarding biofilm formation, in the presence of zinc, only the G186A strain showed greater metabolic activity, while in the presence of iron, both strains had this parameter increased. There was no influence on the formation of biomass and extracellular matrix for both strains in the presence of ions or chelators. Scanning and confocal electron microscopy showed that in the presence of ions denser and more robust biofilms were formed after 144 hours for both strains, and with iron predominantly hyphal biofilms were formed. The chelator TPEN, mainly, inhibited the formation of cell clusters both in 24 and 144 hours of culture. Assays with the congo red dye showed that in the presence of chelators there was greater susceptibility of the strains to the dye, mainly the EH-315 strain, indicating possible alterations in the fungal cell wall. For virulence analysis, the alternative animal model *Galleria mellonella* was used. There was no greater survival of infected larvae after growth in chelating media compared to larvae infected with yeast in the control condition. However, larvae infected with yeasts from the initial and mature biofilms grown in a medium with zinc and iron of the G186A strain showed lower survival. The EH-315 strain did not show statistical differences in the survival of larvae infected with yeasts from the media with ions. In general, the results bring unprecedented information regarding the morphology and influence of ions in biofilms of the fungus *Histoplasma* spp. The addition of metal ions influenced the metabolic activity and cell viability of the strains, mainly for the G186A strain. Biofilms showed greater robustness in the presence of more metal ions in addition to morphological changes in both strains. Furthermore, the G186A strain was more virulent in the presence of ions, indicating that ions contribute to its virulence mechanisms. The use of binders can contribute to new anti-*H. capsulatum* therapeutic options, as they can decrease the fungus's viability and biofilm formation.

Keywords: *Histoplasma capsulatum*, biofilm, zinc, iron.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa de regiões com prevalência de Histoplasmose. Adaptação de figura de Ashraf et al, 2020.

Figura 2: Efeitos das concentrações dos íons metálicos zinco e ferro e dos quelantes TPEN e DTPA no crescimento das cepas G186A e EH-315 de *H. capsulatum* apresentados em porcentagem de células viáveis utilizando ensaio de resazurina.

Figura 3: Gráficos da atividade metabólica, viabilidade celular e densidade celular da cepa G186A do fungo *H. capsulatum* no crescimento planctônico cultivada e HAM-F12 com zinco, HAM-F12 com TPEN (A, B, C), HAM-F12 com ferro e HAM-F12 DTPA (D, E, F) comparadas com a condição Controle, cultivada apenas em HAM-F12.

Figura 4: Gráficos da atividade metabólica, viabilidade celular e densidade celular da cepa EH-315 do fungo *H. capsulatum* no crescimento planctônico cultivada e HAM-F12 com zinco, HAM-F12 com TPEN (A, B, C), HAM-F12 com ferro e HAM-F12 DTPA (D, E, F) comparadas com a condição Controle, cultivada apenas em HAM-F12.

Figura 5: Gráficos da atividade metabólica, quantificação da biomassa e da matriz extracelular da cepa G186A do fungo *H. capsulatum* no crescimento em forma de biofilme cultivada em meio HAM-F12 com zinco, HAM-F12 com TPEN (A, B, C), HAM-F12 com Ferro e HAM-F12 com DTPA (D, E, F) comparadas com a condição Controle, cultivada em HAM-F12.

Figura 6: Gráficos da atividade metabólica, quantificação da biomassa e da matriz extracelular da cepa EH-315 do fungo *H. capsulatum* no crescimento em forma de biofilme cultivada em meio HAM-F12 com zinco, HAM-F12 com TPEN (A, B, C), HAM-F12 com Ferro e HAM-F12 com DTPA (D, E, F) comparadas com a condição Controle, cultivada em HAM-F12.

Figura 7: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos biofilmes iniciais (24 h) e biofilmes maduros (144 h) nas condições HAM-F12 (controle), HAM-F12 adicionado de zinco e HAM-F12 com TPEN da cepa G186A de *H. capsulatum*.

Figura 8: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos biofilmes iniciais (24 h) e biofilmes maduros (144 h) nas condições HAM-F12 (controle), HAM-F12 adicionado de ferro e HAM-F12 com DTPA da cepa G186A de *H. capsulatum*.

Figura 9: Imagens obtidas por microscopia Confocal em vista do corte ortogonal (A, B, C) e distribuição tridimensional (D, E, F) dos biofilmes iniciais (24 h) da cepa G186A de *H. capsulatum* no meio HAM-F12 com zinco (B, E) e HAM-F12 com TPEN (C, F) comparadas com o crescimento apenas em meio HAM-F12 (Controle, A, D).

Figura 10: Imagens obtidas por microscopia Confocal em vista do corte ortogonal (A, B, C) e distribuição tridimensional (D, E, F) dos biofilmes iniciais (24 h) da cepa G186A de *H. capsulatum* no meio HAM-F12 com ferro (B, E) e HAM-F12 com DTPA (C, F) comparadas com o crescimento apenas em meio HAM-F12 (Controle, A, D).

Figura 11: Imagens obtidas por microscopia Confocal em vista do corte ortogonal (A, B, C) e distribuição tridimensional (D, E, F) dos biofilmes maduros (144 h) da cepa G186A de *H. capsulatum* no meio HAM-F12 com zinco (B, E) e HAM-F12 com TPEN (C, F) comparadas com o crescimento apenas em meio HAM-F12 (Controle, A, D).

Figura 12: Imagens obtidas por microscopia Confocal em vista do corte ortogonal (A, B, C) e distribuição tridimensional (D, E, F) dos biofilmes maduros (144 h) da cepa G186A de *H.*

capsulatum no meio HAM-F12 com ferro (B, E) e HAM-F12 com DTPA (C, F) comparadas com o crescimento apenas em meio HAM-F12 (Controle, A, D).

Figura 13: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos biofilmes iniciais (24 h) e biofilmes maduros (144 h) nas condições HAM-F12 (controle), HAM-F12 adicionado de zinco e HAM-F12 com TPEN da cepa EH-315 de *H. capsulatum*.

Figura 14: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos biofilmes iniciais (24 h) e biofilmes maduros (144 h) nas condições HAM-F12 (controle), HAM-F12 adicionado de ferro e HAM-F12 com DTPA da cepa EH-315 de *H. capsulatum*.

Figura 15: Imagens obtidas por microscopia Confocal em vista do corte ortogonal (A, B, C) e distribuição tridimensional (D, E, F) dos biofilmes iniciais (24 h) da cepa EH-315 de *H. capsulatum* no meio HAM-F12 com zinco (B, E) e HAM-F12 com TPEN (C, F) comparadas com o crescimento apenas em meio HAM-F12 (Controle, A, D).

Figura 16: Imagens obtidas por microscopia Confocal em vista do corte ortogonal (A, B, C) e distribuição tridimensional (D, E, F) dos biofilmes iniciais (24 h) da cepa EH-315 de *H. capsulatum* no meio HAM-F12 com ferro (B, E) e HAM-F12 com DTPA (C, F) comparadas com o crescimento apenas em meio HAM-F12 (Controle, A, D).

Figura 17: Imagens obtidas por microscopia Confocal em vista do corte ortogonal (A, B, C) e distribuição tridimensional (D, E, F) dos biofilmes maduros (144 h) da cepa EH-315 de *H. capsulatum* no meio HAM-F12 com zinco (B, E) e HAM-F12 com TPEN (C, F) comparadas com o crescimento apenas em meio HAM-F12 (Controle, A, D).

Figura 18: Imagens obtidas por microscopia Confocal em vista do corte ortogonal (A, B, C) e distribuição tridimensional (D, E, F) dos biofilmes maduros (144 h) da cepa EH-315 de *H. capsulatum* no meio HAM-F12 com ferro (B, E) e HAM-F12 com DTPA (C, F) comparadas com o crescimento apenas em meio HAM-F12 (Controle, A, D).

Figura 19: Susceptibilidade às concentrações de 100 μ M e 150 μ M ao corante Congo Red da cepa G186A em crescimento planctônico de 24 e 144 h cultivada em HAM-F12, HAM-F12 com zinco, HAM-F12 com ferro, HAM-F12 com DTPA e HAM-F12 com TPEN.

Figura 20: Susceptibilidade às concentrações de 100 μ M e 150 μ M ao corante Congo Red da cepa G186A em crescimento em forma de biofilme inicial (24 h) e biofilme maduro (144 h) cultivada em HAM-F12, HAM-F12 com zinco, HAM-F12 com ferro, HAM-F12 com DTPA e HAM-F12 com TPEN.

Figura 21: Susceptibilidade as concentrações de 100 μ M e 150 μ M ao corante Congo Red da cepa EH-315 em crescimento planctônico de 24 e 144 h cultivada em HAM-F12, HAM-F12 com zinco, HAM-F12 com ferro, HAM-F12 com DTPA e HAM-F12 com TPEN.

Figura 22: Susceptibilidade as concentrações de 100 μ M e 150 μ M ao corante Congo Red da cepa EH-315 em crescimento em forma de biofilme inicial (24 h) e biofilme maduro (144 h) cultivada em HAM-F12, HAM-F12 com zinco, HAM-F12 com ferro, HAM-F12 com DTPA e HAM-F12 com TPEN.

Figura 23: Gráficos da sobrevivência das larvas de *Galleria mellonella* infectadas com as leveduras da cepa G186A de *Histoplasma* cultivada em meio HAM-F12, HAM-F12 + 20 μ M Zinco, HAM-F12 + 10 μ M TPEN, HAM-F12 + 20 μ M Ferro e HAM-F12 + 20 μ M DTPA, da cepa G186A nos tempos de 24 e 144 h em crescimento planctônico e após formação de biofilme.

Figura 24: Gráficos da sobrevivência das larvas de *Galleria mellonella* infectadas com as leveduras da cepa EH-315 de *Histoplasma* cultivada em meio HAM-F12, HAM-F12 + 20 μ M Zinco, HAM-F12 + 10 μ M TPEN, HAM-F12 + 20 μ M Ferro e HAM-F12 + 20 μ M DTPA, da cepa G186A nos tempos de 24 e 144 h em crescimento planctônico e após formação de biofilme.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Porcentagem da sobrevivência das larvas de *Galleria mellonella* infectadas com leveduras da cepa G186A de *Histoplasma* após cultivo em HAM-F12 (Controle), HAM-F12 + 20 μ M Zinco, HAM-F12+ 20 μ M Ferro, HAM-F12 + 10 μ M TPEN e HAM-F12 + 20 μ M DTPA nos tempos de 24 e 144 h na forma de crescimento planctônico e após formação de biofilme. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Tabela 2: Porcentagem da sobrevivência das larvas de *Galleria mellonella* infectadas com leveduras da cepa EH-315 de *Histoplasma* após cultivo em HAM-F12 (Controle), HAM-F12 + 20 μ M Zinco, HAM-F12+ 20 μ M Ferro, HAM-F12 + 10 μ M TPEN e HAM-F12 + 20 μ M DTPA nos tempos de 24 e 144 h na forma de crescimento planctônico e após formação de biofilme. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

LISTA DE SIGLAS

BHI – Brain and Heart Infusion

CLSM – Confocal laser scanning microscopy

CR – Congo Red

DTPA - Diethylenetriamine pentaacetic acid – ácido pentaacético Dietilenotriamina

h – horas

HAM-F12 – Ham's Nutrient Mixture

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

TPEN - (N, N, N, N – tetrakis – 2 – pyridylmethylethane – 1,2 diamine) - (N, N, N, N – tetraquis – 2 – piridilmetiletano – 1,2 diamina

Sumário

1. Introdução	14
1.1. Histoplasmose.....	14
1.2. <i>Histoplasma capsulatum</i>	15
1.3. Epidemiologia da doença.....	16
1.4. Patogenia	20
1.5. Influência dos íons metálicos nos fatores de virulência	21
1.6. Animais alternativos como modelo para infecção fúngica.....	28
2. Objetivos.....	32
2.1. Objetivo geral	32
2.2. Objetivos secundários.....	32
3. Materiais e Métodos.....	33
3.1. Cepas	33
3.2. Pré análises para avaliação dos quelantes.....	33
Concentração mínima inibitória dos quelantes e dos íons metálicos.....	33
3.3. Condições de cultivo	34
3.4. Culturas planctônicas e formação de biofilmes	35
3.5. Análise do crescimento planctônico de <i>Histoplasma capsulatum</i>	36
Viabilidade celular	36
Densidade celular.....	36
Determinação da atividade metabólica mitocondrial.....	36
3.6. Análise da formação do biofilme de <i>Histoplasma capsulatum</i>	37
Determinação da atividade metabólica mitocondrial pelo ensaio de XTT	37
Quantificação da biomassa do biofilme pela coloração com Cristal Violeta.....	37
Quantificação da matriz extracelular pela coloração com Safranina.....	38
Microscopia eletrônica de varredura do biofilme (MEV).....	38
Microscopia de Fluorescência Confocal	39
3.7. Susceptibilidade ao Congo Red (CR) para identificação de alteração na parede celular fúngica	39
3.8. Infecção <i>in vivo</i> utilizando o modelo <i>Galleria mellonella</i>	40
3.9. Análises estatísticas	41
4. Resultados e Discussão	42
4.1. Avaliação dos quelantes e íons metálicos sobre o crescimento do fungo <i>H. capsulatum</i>	42
4.2. Cinética do crescimento planctônico de <i>Histoplasma capsulatum</i>	46

4.3. Cinética da formação do biofilme de <i>Histoplasma capsulatum</i>	50
4.3.1. Microscopia Confocal (CLSM) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) ...	57
4.3.2. Susceptibilidade ao corante Congo Red (CR) para determinar influência dos quelantes na parede celular fúngica	78
4.4. Influência dos micronutrientes na virulência do fungo <i>H. capsulatum</i> em modelo <i>Galleria mellonella</i> de infecção	86
5. Conclusões	94
6. Referências.....	96

1. Introdução

1.1.Histoplasmose

A Histoplasmose é uma infecção causada pelo fungo termodimórfico, o *Histoplasma capsulatum*. Sua descoberta ocorreu primeiramente em 1905 por Samuel Taylor Darling, quando o patologista americano encontrou o fungo numa autopsia realizada em um carpinteiro de 27 anos de Martinica que trabalhava no Canal do Panamá. O microrganismo, que até então ainda não havia sido classificado como um fungo, apresentava corpos ovais e arredondados e parecia possuir uma cápsula, sendo encontrado no interior dos macrófagos alveolares, o que o classificou inicialmente como um protozoário encapsulado (DARLING, 1906). Entretanto, em 1912, em Berlim, o patologista brasileiro Henrique Rocha Lima chegou à conclusão de que o processo da doença encontrada por Darling em 1905 era micótico demonstrando que o microrganismo era um fungo. E só em 1934, o *H. capsulatum* foi corretamente identificado como um fungo dimórfico por De Monbreum que produziu infecções experimentais em laboratório (MITTAL, et al, 2018).

No Brasil, o fungo foi identificado primeiramente entre 1939 e 1940 em material de escarro de um paciente (ALMEIDA; LACAZ, 1941). Para o país, a histoplasmose era uma doença rara e pouco estudada, porém ao longo dos anos com outros estudos sobre a doença, identificaram que a histoplasmose ocorria por via inalatória e acometia principalmente indivíduos que haviam visitado grutas colonizadas por morcegos, minas abandonadas e galinheiros (OLIVEIRA; UNIS; SEVERO, 2006). Com o surgimento dos pacientes imunocomprometidos acometidos pela Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids) na década de 80, novos casos surgiram e a doença tornou-se um importante problema de saúde pública desde 1987 (RAKISLOVA, et al, 2021).

1.2. *Histoplasma capsulatum*

H. capsulatum é um membro do filo *Ascomycota* (MITTAL, et al, 2018). É um fungo dimórfico, sapróbio-infectivo, capaz de permanecer no ambiente por períodos prolongados (AIDÉ, et al, 2009; SUAREZ-ALVAREZ, et al, 2010). Seu dimorfismo permite que apresente duas formas, a micelial e a leveduriforme. A forma micelial é encontrada na natureza, à temperatura ambiente (25 - 28 °C) em solos enriquecidos com nitrogênio, geralmente esses solos corresponde àqueles contaminados com guano de pássaros e morcegos (LAPITZ, et al, 2008). Esta forma micelial (Morfotipo M) é responsável pela instalação da infecção do fungo no hospedeiro, caracterizada microscopicamente pela presença de hifas septadas e hialinas e estruturas de reprodução que produzem os microconídios (GILMORE, et al, 2015). A morfologia de levedura do fungo é a forma predominante nos tecidos do hospedeiro. O fungo apresenta forma ovoide medindo de 2 a 5 µm de diâmetro e cresce por brotamento a partir de uma célula mãe. A temperatura de 37°C no corpo de hospedeiros humanos ou animais, provoca a expressão de genes que permite a troca de fisiologia e morfologia do fungo, portanto essa forma é considerada a forma patogênica (GAFOOT; RAPPLEYE, 2016; MITTAL, et al, 2018).

H. capsulatum foi primeiramente dividido em três variedades biológicas patogênicas com base na distribuição geográfica e nas manifestações clínicas. *H. capsulatum* var *capsulatum*, distribuído principalmente no continente americano, var *duboisii* encontrado nas regiões da África e Ilha de Madagascar e, var *farciminosum* conhecido como a espécie infectante de cavalo, encontrado nas regiões da Europa, Ásia e África (KASUGA; TAYLOR; WHITE, 1999)

Em 2003, Kasuga e colaboradores realizaram uma análise filogenética de 137 isolados de *H. capsulatum* de diferentes locais e registraram sete espécies do fungo. As espécies foram classificadas em: classe 1 norte-americana (Nam 1), classe norte-americana 2 (Nam 2), grupo-latino americano A (LAm A), grupo-latino americano B (LAm B), e os clados australiano, africano e holandês. Ao total foram registrados 7 clados do fungo, desconsiderando um oitavo

clado Euroasino devido à incerteza da classificação. Além desses clados, Damasceno e colaboradores (2019) sugeriram a existência de mais dois clados pertencentes da região do nordeste do Brasil, mais precisamente no estado do Ceará. Esses clados foram nomeados de NBR 1 e NBR 2.

Seguindo a ordem dos últimos estudos taxonômicos para *Histoplasma*, Teixeira e colaboradores (2016) classificaram em 11 o número de espécies filogenéticas distribuídas mundialmente, sendo elas: Australiana, Africana, Holandesa, LAm A1, LAm A2, LAm B1, LAm B2, NAm 1, Nam 2, Rio de Janeiro (RJ) e um clado espécie-específico associado a morcegos denominado de BAC1. Também em 2020, em um estudo feito por Rodrigues e colaboradores, os autores descreveram uma nova espécie filogenética denominada de LAm C, encontrada no estado do Ceará no Brasil. Essa cepa, e mais as duas cepas encontradas por Damasceno e colaboradores (2016) formaram os grupos: LAm C, LAm D e LAm E.

Recentemente, em uma revisão de estudos taxonômicos feita por Taylor e colaboradores (2022), os autores assumiram que há pelo menos 14 grupos filogenéticos e quatro linhagens isoladas que classificam a alta diversidade do gênero *Histoplasma spp.* em todo o mundo. Portanto, a última classificação do fungo abrange os seguintes grupos filogenéticos: Nam 1, Nam 2, Nam 3 (BAC1), LAm A (A1), LAm (A2) LAm B (B1), LAm B (B2), RJ, LAm C, LAm D, LAm E, e por fim, linhagens isoladas.

1.3.Epidemiologia da doença

Dados coletados dos últimos anos mostraram que a histoplasmose é uma das principais infecções sistêmicas do mundo, com incidência variando de 0,1 a 1 caso por 100.000 habitantes por ano em climas temperados, de 10 a 100 casos por 100.000 nos trópicos úmidos e mais de 100 casos por 100.000 em grupos de alto risco e durante surtos (ADENIS, et al, 2018; RODRIGUES, et al, 2020). Estima-se que apenas 1% das infecções esporádicas sejam

sintomáticas, o que muitas vezes dificulta a identificação da doença e o diagnóstico. A maioria das infecções sintomáticas envolve uma doença pulmonar primária, dificultando a caracterização e identificação da doença (ARMSTRONG, et al, 2018).

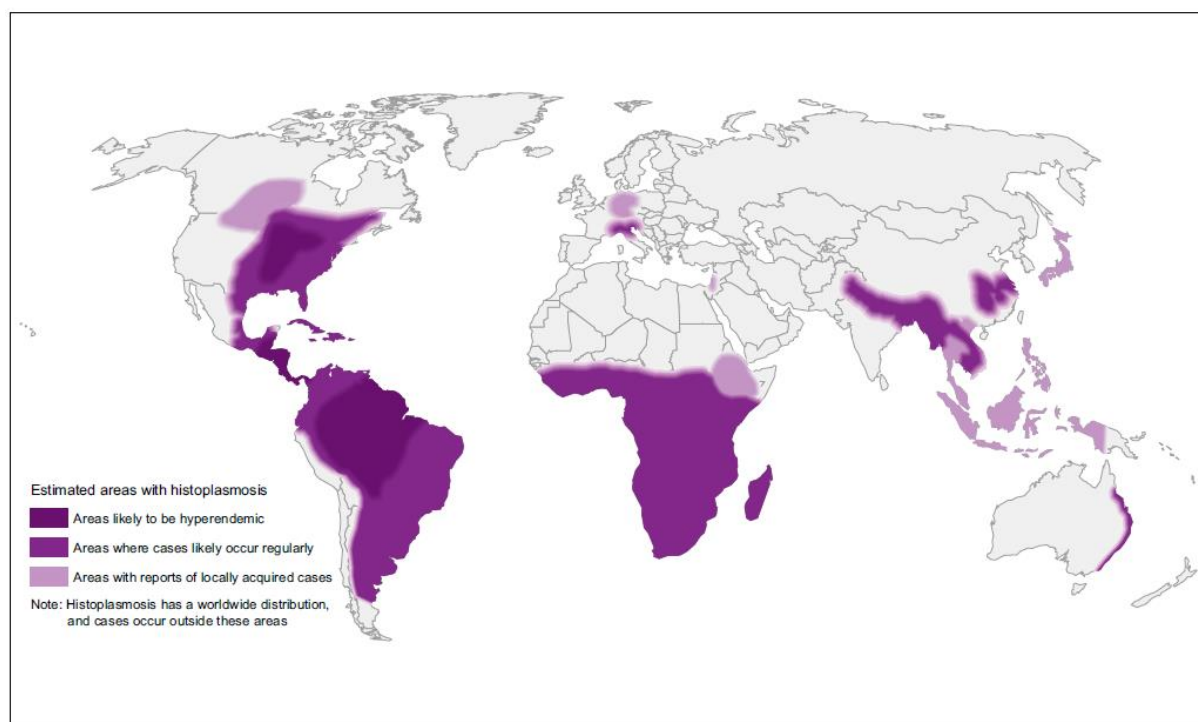
A histoplasmose inicialmente foi descrita como uma micose endêmica mais comum da região da América do Norte. Nas décadas de 1950 e 1960, as regiões mais conhecidas com casos de Histoplasmose eram as áreas ao redor dos vales dos rios Ohio e Mississipi, nos Estados Unidos. Com o passar dos anos, foi observado uma extensão geográfica da doença atingindo diversas regiões do país e localizações ao redor do mundo (ARMSTRONG, ET AL, 2018). Doze dos 50 estados dos EUA tem relatos esporádicos de histoplasmose, sendo que a doença é responsável por 500.000 infecções anualmente nos EUA, fazendo com que o *H. capsulatum* seja o fungo mais prevalente em doenças pulmonares no país. As áreas com os altos estágios de infecção ainda estão nos Vales dos Rios de Ohio e Mississipi nos EUA em que quase 90% dos indivíduos já adquiriram o fungo (NOSANCHUK, et al, 2020).

Globalmente, a histoplasmose é prevalente em zonas tropicais e temperadas (Figura 1). É também frequente na América Central atingindo países como o México, Honduras, Guatemala, Panamá, em várias ilhas do Caribe e em diversos países Sul-Americanos, principalmente Venezuela, Colômbia, Peru, Brasil, Argentina e Uruguai. Poucos são os casos na Europa, porém já houve relatos na Itália. Há também relatos de casos de histoplasmose no Oriente médio e uma alta prevalência na África, principalmente associada aos pacientes imunodeprimidos e portadores do vírus HIV (KAUFFMAN, 2007; FERREIRA & BORGES, 2009), sendo uma infecção fúngica no topo da lista de doenças relacionadas com as mortes destes pacientes (NACHER et al, 2019).

Majoritariamente, a histoplasmose causa baixa morbidade e mortalidade em pacientes imunocompetentes. Porém entre os pacientes imunocomprometidos, na presença de uma

deficiência de imunidade celular congênita ou adquirida, a histoplasmose é responsável por uma importante morbimortalidade podendo atingir taxas de letalidade variando em 10% a 53% em regiões onde a doença é conhecida. Conclusivamente, áreas onde há maior prevalência de histoplasmose e alta prevalência de HIV, ocorre um aumento nas taxas de letalidade (ADENIS et al, 2014; 2018; TEXEIRA, et al, 2016). Contudo, em áreas com baixo conhecimento clínico e capacidade de diagnóstico limitado e onde há prevalência de HIV, não é possível estimar as taxas de letalidade por histoplasmose. Nessas áreas os dados sobre a carga de histoplasmose são extremamente escassos e geralmente são localizadas em países da América Latina. (ADENIS et al, 2018; GALLO, et al, 2021).

Figura 1: Mapa de regiões com prevalência de Histoplasmose. Adaptação de figura de Ashraf et al, 2020.



No Brasil, as informações sobre mortalidade por infecções fúngicas obtidas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) são limitadas. A fonte de dados brasileira provavelmente tem um valor subestimado da ocorrência de infecções fúngicas que ocorrem no país (FERGUSON-PAUL et

al, 2018, DANTAS et al, 2021). Na maioria das vezes, as doenças fúngicas são descritas em casos clínicos isolados ou em ocorrência de surtos o que impede de estimar-se os valores totais das ocorrências (BRILHANTE et al, 2015; MYINT et al, 2014). Há relatos de que mais de 3,8 milhões de indivíduos no Brasil podem estar sofrendo por algum tipo de infecção fúngica grave, principalmente pacientes que tem o sistema imunológico seja suprimido, seja por algum tipo de tratamento contra câncer, tuberculose, transplantes, problemas respiratórios e / ou infecção por HIV. Geralmente, as infecções fúngicas afetam as populações mais vulneráveis e muitas vezes esses indivíduos não têm acesso a cuidados médicos (GIACOMAZZI, et al, 2016).

No trabalho realizado por Dantas e colaboradores (2021) foi feito um levantamento da ocorrência de doenças fúngicas através de trabalhos publicados em 85 anos que traziam informações sobre 158,404 autópsias hospitalares realizadas no Hospital Universitário de São Paulo, Brasil no período de 1930 a 2015. A proporção de doenças fúngicas que apareceram nessas autópsias variou de 0,1 a 5,1% ao longo dos 85 anos e foram encontrados 1.096 casos de infecção fúngica. A histoplasmose apareceu a partir de 1946, e de todo o levantamento representou 3,8% (42 casos), ficando atrás de doenças como paracoccidioidomicose (24%), candidíase (18%), criptococose (11,2%) e aspergilose (11,2%). Ainda nesse trabalho, relataram que a maior prevalência de pessoas acometidas por doenças fúngicas eram indivíduos do sexo masculino e indivíduos que possuíam algum tipo de comorbidade, sendo AIDS a comorbidade mais frequente observada. Nosanchuk e colaboradores (2020) também observaram que as mortes por histoplasmose em pacientes infectados com HIV, excede os casos de tuberculose, principalmente em regiões específicas, como o sudeste do Brasil, onde a ocorrência dos casos chega a 93%.

1.4.Patogenia

A patogênese do *H. capsulatum* começa com a inalação dos microconídios ou fragmentos de hifas pelo hospedeiro. Após a entrada no hospedeiro, a mudança da temperatura ambiente para a temperatura corporal dos mamíferos ocorre a indução da morfogênese à forma de levedura (MITTAL et al, 2018). A fase leveduriforme é responsável pela patogênese e pela imunopatologia dos indivíduos, após os microconídios serem inalados, eles se depositam nos brônquios terminais e nos alvéolos pulmonares e então o fungo muda sua forma. A partir dos pulmões o fungo atinge os linfonodos e a circulação sistêmica podendo alcançar vários órgãos como o baço, fígado e a medula óssea (BOHSE & WOODS, 2007; FERREIRA & BORGES, 2009; NWEMAN & SMULIAN, 2013; GARFOOT & RAPPLEYE, 2016).

Há uma ampla gama de apresentações para a histoplasmose. Os sinais e sintomas da doença são relacionados pelo estado imunológico do hospedeiro, sendo o maior risco de doença grave os pacientes imunodeprimidos. Além do estado imunológico do indivíduo, fatores como a virulência da cepa fúngica e a quantidade de inóculo podem influenciar na gravidade da doença (KNOX & HAGE, 2010). Na maioria das vezes as infecções causadas pelo *Histoplasma spp.* são assintomáticas ou subclínicas. Muitas pessoas com histoplasmose não são diagnosticadas e as vezes os sintomas são confundidos com doenças mais comuns, como gripes. A doença pode ser caracterizada por uma doença pulmonar aguda, doença disseminada e histoplasmose pulmonar crônica (WHEAT et al. 2016). Pacientes com histoplasmose aguda apresentam sintomas como febre, calafrios, cefaleia, mialgias, hiporexia, dor no peito, tosse e fraqueza, geralmente descritos como uma gripe. Quando a histoplasmose tem caráter crônico, clinicamente observa-se a presença de febre vespertina baixa, sudorese noturna, perda de peso, dor torácica e tosse com expectoração hemoptoica. Em paciente imunodeprimidos, como no caso de portadores de HIV e pacientes com contagem de CD4 abaixo de 150 cél./mm³, a doença é caracterizada como histoplasmose disseminada, ou histoplasmose grave, e frequentemente

leva o paciente a óbito. Os pacientes com AIDS apresentam uma progressão rápida da doença, com sintomas como febre elevada, anorexia intensa, mal-estar, perda de peso, linfadenopatia generalizada, lesões cutâneas e mucosas localizadas ou disseminada. É comum que haja o envolvimento da medula óssea na infecção e a manifestação é através de pancitopenia periférica (KAUFFMAN, 2007; FERREIRA & BORGES, 2009).

Em casos de instalação da doença, o processo ocorre quando as células do *Histoplasma* encontram inicialmente os macrófagos alveolares, mas as respostas imunes do hospedeiro são insuficientes no controle de fungo. Em vez disso, os macrófagos que normalmente são fungicidas, fornecem um ambiente intracelular permissivo para a replicação da levedura do fungo (BRECHTING & RAPPLEYE, 2019).

O hospedeiro apresenta mecanismos de defesa que estão relacionados tanto com a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) dos macrófagos quanto com o processo denominado de “imunidade nutricional”. Esse processo consiste na limitação de elementos essenciais e micronutrientes pelo sistema imune do hospedeiro durante a invasão por microrganismos patogênicos. Para que o fungo sobreviva nos fagócitos, há diversos fatores de virulência envolvidos que protegem as células leveduriformes destas defesas do hospedeiro. Dentro dos fagossomos, as leveduras de *Histoplasma* disputam com macrófagos a captação de nutrientes metálicos, enquanto os macrófagos restringem-nos de seus ocupantes intracelulares. O fungo utiliza de seus fatores de virulência para adquiri-los, pois são incapazes de sintetizá-los (VIGNESH, et al, 2013; BRECHTING & RAPPLEYE, 2019).

1.5. Influência dos íons metálicos nos fatores de virulência

O *H. capsulatum* possui diversos fatores de virulência que contribuem para sua adesão, colonização, disseminação e tolerância para sobreviver a condições adversas do sistema imune do hospedeiro (SIQUEIRA, 2016). Dentre os fatores de virulência deste fungo que são mais

estudados e apresentados na literatura encontra-se o dimorfismo térmico, a expressão de proteínas de superfície e, mais recentemente descoberto, a sua capacidade de formar biofilmes (GUIMARÃES, et al, 2011; PITANGUI, et al, 2012; 2016; COSTA-ORLANDI, et al., 2017).

O dimorfismo térmico está relacionado justamente com a capacidade do fungo de mudar sua forma micelial para levedura quando invade o hospedeiro. Na natureza ele é encontrado na forma micelial, e quando os microconídios são inalados eles se depositam nos brônquios pulmonares e se transformam em leveduras (BOHSE & WOODS, 2007; FERREIRA & BORGES, 2009; NWEAN & SMULIAN, 2013; GARFOOT & RAPPLEYE, 2016). Neste processo de mudança de forma do fungo, estão envolvidas as proteínas de superfície das leveduras que são cruciais para a replicação fúngica conferindo a sua capacidade de resistir e crescer em temperaturas elevadas como a de 37°C. As proteínas mais conhecidas são a HSP60 (Heat Shock Protein) e a YPS3 (Yeast Specific Phage). A HSP60 é uma molécula altamente imunogênica e atua orquestrando o dobramento e desdobramento de proteínas relacionadas ao dimorfismo do fungo, além de estar envolvida com o processo de fagocitose da levedura feito pela ligação ao receptor de superfície CR3 (CD11b/ CD18) do macrófago (GUIMARÃES, et al, 2011). Já a proteína YPS3 é uma constituinte da parede celular com características importantes para a patogenicidade do fungo (BOHSE & WOODS, 2005). Esta proteína é secretada exclusivamente pela fase leveduriforme e está relacionada com a disseminação da levedura no sítio de infecção pulmonar (RAPPLEYE, ENGLE, GOLDMAN, 2004).

Em relação a capacidade do fungo de formar biofilmes, pesquisas do nosso grupo demonstraram que o *Histoplasma spp.* é capaz de formar biofilmes em superfícies abióticas e desenvolver aglomerados leveduriformes semelhantes a biofilmes em células epiteliais de pulmão e macrófagos alveolares apresentando estruturas arquitetônicas únicas no interior de macrófagos (PITANGUI, et al, 2012; COSTA-ORLANDI, et al, 2017; GONÇALVES, et al, 2020). Segundo Costerton e colaboradores (1995) os biofilmes são agregados microbianos

sésseis fixados em uma matriz extracelular de polissacarídeos aderentes entre si e/ou em superfícies bióticas ou abióticas.

Os biofilmes podem ser formados por diversos tipos de microrganismos isolados (monoespécie) ou por uma combinação de dois ou mais microrganismos (multiespécies) da mesma e/ou de diferentes espécies e linhagens. Apesar dessa alta variabilidade, verificou-se que processos e mecanismos comuns de desenvolvimento de biofilme são compartilhados entre as espécies. Assim, embora a morfologia e a fisiologia do biofilme variem de acordo com o microrganismo inicial envolvido, o microambiente e as interações que ocorrem entre o microrganismo e uma superfície, as séries de eventos que ocorrem durante o desenvolvimento do biofilme geralmente são agrupadas de forma aberta para permitir uma melhor compreensão. A formação do biofilme ocorre em uma sequência de processos que irão ocorrer e potencialmente se sobrepõem durante seu desenvolvimento. Apesar do uso de estágios de formação e desenvolvimento de biofilme sequenciados e rotulados, os processos reais que ocorrem em condições nativas são muito mais complexos, dinâmicos e diversos. Os principais estágios da formação do biofilme tanto bacteriano quanto de leveduras são: 1 – adsorção, 2 – adesão, 3 – formação de microcolônias, 4 – maturação e 5 – dispersão (GUZMÁN-SOTO, et al 2021).

Muitos autores têm relatado que os íons metálicos têm influência nos fatores de virulência de diversos fungos (JUNG, 2015; GERWIN, et al, 2018; LI et al, 2018; BRECHTING, RAPPLEYE, 2019; SHAFEEQ, et al, 2019). Por exemplo, pesquisas com espécies de *Candida spp.* relacionaram os íons metálicos com a expressão de genes reguladores na formação do biofilme. Shafeeq e colaboradores (2019) testaram o impacto de íons metálicos na formação de biofilme e observaram que os íons metálicos diminuíram a formação de *C. parasilosis* em isolados clínicos independentes da temperatura. Harrison e colaboradores (2006 e 2007) também observaram a influência de íons metálicos na formação de biofilmes de *C. albicans* e

C. tropicalis e descrevam que íons metálicos podem alterar a estrutura do biofilme, além de bloquear ou aumentar a transição entre a forma de levedura para células tipo hifas, aumentando a invasividade e alterando a virulência drasticamente.

Os íons metálicos são micronutrientes que podem apresentar diversos papéis celulares fundamentais tanto para a defesa do hospedeiro quanto para os ataques dos microrganismos patogênicos (LI, et al, 2018). Esses micronutrientes desempenham um papel central nos processos de infecção, pois são usados como cofatores em diversas enzimas, incluindo influências direta e indiretas na virulência, como por exemplo em superóxidos dismutases, metaloproteases ou lacases produtoras de melanina (GERWIN, et al, 2018). Dois íons metálicos, bem estudados envolvidos em muitos processos de virulência e sobrevivência dos microrganismos nos hospedeiros são o ferro e o zinco (VIGNESH, et al, 2013; BRECHTING, RAPPLEYE, 2019).

Os íons de zinco são indispensáveis para a expressão gênica, atividade enzimática e sinalização celular, além de serem relacionados com a proliferação, síntese de DNA e RNA e apoptose (OLLIG, et al, 2016). O zinco é fundamental para todos os domínios da vida, pois compõe o centro catalítico e estrutural de uma grande variedade de proteínas. As condições de depleção de zinco são conhecidas por reduzirem o crescimento fúngico e evidências mostram que as células hospedeiras sequestram o zinco intracelular para dificultar o acesso a este micronutriente pelos microrganismos patogênicos (CASSAT & SKAAR, 2013). Além do zinco, o ferro também é considerado um oligoelemento essencial para o metabolismo microbiano. Este íon metálico é cofator de muitas enzimas e é essencial durante a síntese de DNA (COMENSOLI, et al, 2017). O ferro participa de diversas vias metabólicas, sendo inclusive usado pelo hospedeiro para catalisar a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) durante o ataque dos macrófagos aos microrganismos. Os fagolisossomos usam a capacidade do ferro para dar início ao ciclo das reações de Fenton e gerar ROS que prejudicam

as membranas dos microrganismos, às proteínas e o DNA (MA, TERWILLIGER, MARESSO, 2015).

Para sobreviver as defesas do hospedeiro e poder colonizá-lo com êxito, cada tipo de microrganismo utiliza de estratégias específicas que dependerá do nicho do hospedeiro e o estilo de vida que o microrganismo adota, podendo ser intracelular ou extracelular (CASSAT & SKAAR, 2013). Alguns trabalhos já descreveram mecanismos relacionados a estratégias adotadas por fungos para sobreviverem em meios adversos criados pelas células hospedeiras. O fungo *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, foi o primeiro que teve sua homeostase de zinco detalhadamente descrita. Primeiro foi descrito o gene *Zrc1* que era um transportador de zinco que codificava uma proteína localizada na membrana vacuolar e era responsável pelo transporte vacuolar de zinco em *S. cerevisiae*. O *Zrc1* auxilia na desintoxicação do zinco intracelular no citoplasma. Além deste gene, foram identificados *Zrt1*, *Zrt2* e *Zrt3* que pertencem a família de proteínas ZIP. O *Zrt3* demonstrou mobilizar o zinco armazenado da organela para o citoplasma quando as células foram esgotadas de zinco. Já o *Zrt1* e o *Zrt2* medeiam a captação de zinco na membrana plasmática da levedura. O *Zrt1* é um transportador de alta afinidade que é superexpresso quando a levedura está em um meio com privação de zinco, já o *Zrt2*, é um transportador de baixa afinidade responsável pela absorção de zinco em condições repletas de zinco (JUNG, 2015). Em um trabalho realizado por De Oliveira Schneider e colaboradores (2012) foram mostradas evidências de que o patógeno fúngico *Cryptococcus gatti* obtém zinco a partir do ambiente do hospedeiro e para completar o processo de sua virulência o fungo possui uma proteína denominada *Zap1* que é ortólogos aos principais genes reguladores de zinco encontrado em *Aspergillus fumigatus* (*ZafA*) e em *S. cerevisiae* (*Zap1*). A função do gene *Zap1* para *C. gatti* foi notada ao perceber que era altamente expresso quando o fungo se encontrava em ambiente com privação de zinco e os nocautes da *Zap1* demonstraram crescimento prejudicado em condições limitadas de zinco.

Para *H. capsulatum* os estudos ainda são recentes, mas já existem alguns relatos sobre descobertas de mecanismos relacionados à adaptação do fungo nas células hospedeiras para colonizá-las. Hilty e colaboradores (2011) realizaram um estudo utilizando a técnica de RT-PCR em isolados nos quais fizeram o silenciamento da expressão do gene SID1 que codifica a L-ornitina N-5 monooxigenase das linhagens de *H. capsulatum* e observaram que este gene estava relacionado com a produção de sideróforos evidenciando que a expressão de SID1 desempenha um papel importante na sobrevivência em macrófagos.

Dade e colaboradores (2016) testaram a presença de genes que expressam reguladores de zinco em *H. capsulatum* e observaram a presença de HcZRT1, regulador semelhante aos reguladores encontrados em *Saccharomyces cerevisiae*, o ZRT1 (Zinc regulator transporter) e ZRT2 em resposta ao zinco do meio. Estes genes codificam transportadores de membrana de alta ou baixa afinidade e são superexpressos em condições de depleção de zinco (ZHAO & EIDE, 1996a, 1996b). Outro estudo realizado por Vignesh et al, 2013 demonstrou que o *H. capsulatum* necessita do zinco como cofator da enzima SOD (superóxido dismutases) para que ele elimine os radicais superóxidos (ROS) produzidos pelos macrófagos como linha de defesa.

A necessidade do ferro como requisito nutricional também já foi documentada para muitos patógenos, mostrando que a limitação deste íon metálico é um fator fundamental para restringir o crescimento de invasores microbianos (BRECHTING & RAPPLEYE, 2019). Muitos microrganismos utilizam sideróforos para a captura de íons de ferro. Os sideróforos são agentes quelantes secretados por células que se ligam firmemente ao ferro, mantendo assim o metal em forma solúvel e disponível (EIDE, 2000; ALMEIDA, et al, 2009). O fungo filamentoso *A. fumigatus* produz dois sideróforos capazes de remover o ferro da transferrina do hospedeiro, e esses mecanismos têm demonstrado importância para a sobrevivência do fungo durante a invasão no hospedeiro (ALMEIDA & WILSON, 2009). Estudos apontaram que *C. albicans* possui sideróforos que são utilizados para captar ferro para a formação de biofilme. *C. albicans*

também apresenta transportadores de ferro, dois genes, o CaFRT1 e CaFRT2. Esses genes foram identificados como homólogos ao gene da permease de ferro FRT1 de *S. cerevisiae*. O CaFRT1 foi detectado em maior quantidade de transcrição em condições limitrofes de ferro enquanto o CaFRT2 foi detectado em condições de reposição de ferro. Cepas de *C. albicans* nos quais o gene CaFRT1 foi excluído foram essencialmente avirulentas (HOWARD, 2004).

Além dos sideróforos, alguns fungos também possuem enzimas redutases férricas. Essas enzimas são capazes de reduzir o Ferro férrico (Fe^{+3}) em Ferro ferroso (Fe^{+2}). O papel da redução de ferro férrico na captação de ferro foi inicialmente proposto em *S. cerevisiae* que acumulava o ferro fornecido como Fe^{+2} bem mais rápido do que quando fornecido em Fe^{+3} , e que a atividade da redutase de Fe^{+3} era maior quando o microrganismo era exposto a um meio deficiente de zinco (EIDE, 2000). Em *S. cerevisiae* os genes da ferriredutase FRE 1 e o transportador FTR 1 são controlados por um regulador transcricional AFT1 e o sistema é expresso em baixas concentrações de ferro. O fungo *Cryptococcus neoformans* expressa uma cápsula de polissacarídeos em ambientes de baixo teor de ferro. Como em *S. cerevisiae*, *C. neoformans* reduz o Fe^{+3} com uma redutase férrica que pode ser comparada às enzimas caracterizadas na levedura (HOWARD, 2004). Evidências atuais indicam que o *Histoplasma spp.* adquire ferro através da produção de sideróforos de hidroxamato e da produção de redutases férricas, além disso, sua replicação intracelular nos macrófagos é regulada de acordo com a disponibilidade de ferro (NEWMAN & SMULIAN, 2013). O *H. capsulatum* obtém nutrientes necessários para o seu crescimento a partir do ambiente intracelular dos fagócitos mononucleares do hospedeiro infectado. Sob condições limitadoras de ferro, a atividade da redutase férrica foi expressa em frações moleculares altas e baixas do fungo. A atividade da redutase de baixa massa molecular foi completamente caracterizada, mas é um redutor férrico não proteico que se assemelha a atividade de *C. neoformans*. Além disso, o *Histoplasma spp.* produz sideróforos de hidroxamato, tanto o ácido dímero quanto o ácido rodotorulico atuam

como substratos para a redutase férrica, sendo ainda que o ácido rodotorulico pode remover o ferro da transferrina. Esses dispositivos de coleta de ferro foram co-expressos em condições de depleção de ferro (HOWARD, 2004).

1.6. Animais alternativos como modelo para infecção fúngica

O uso de modelos animais é fundamental para a investigação de doenças infecciosas e a resposta imunológica do hospedeiro contra microrganismos patogênicos. A partir de modelos de animais é possível examinar os mecanismos de interação entre o hospedeiro e o patógeno e ainda avaliar o uso de fármacos ou compostos que tenham ações antimicrobianas (TREVIANO-CONTADOR & ZARAGOZA, 2018). Preferencialmente os modelos murinos são usados em diversos experimentos *in vivo*, porém diante da regulamentação fundamental internacional para a substituição do uso destes animais (3Rs – substituição, redução e refinamento), modelos alternativos não mamíferos ganharam espaço e mostraram-se eficientes para obtenção de respostas sobre a interação patógeno – hospedeiro (DURIEUX, et al, 2021).

Para muitos patógenos fúngicos, os insetos são usados como uma abordagem alternativa ao clássico sistema de modelo murino. Os insetos são econômicos, simples de manter e viáveis em uma ampla variação de temperatura, podendo assim, realizar diversos tipos de experimentos (WUENSCH, et al, 2018). Em insetos, o sistema imunológico inato é eficaz e pode proteger contra uma série de patógenos, inclusive os fungos. Estudos de virulência para diferentes fungos como *Paracoccidioides spp*, *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium spp*, *Candida* e *Trichosporon spp* tem sido realizado com sucesso em modelos de infecção de *Galleria mellonella* (SINGULANI, et al, 2018).

Estudos utilizando o modelo alternativo de *G. mellonella* para avaliar a virulência de fungos dimórficos tem mostrado que é possível obter resultados satisfatórios. Um estudo realizado por Thomaz e colaboradores (2013) foi feito com diferentes concentrações de inóculos de

Paracoccidioides lutzii e *Histoplasma capsulatum*. Esses autores demonstraram que esses patógenos fúngicos foram capazes de causar doença significativa em *G. mellonella* provando que a larva era possível de ser usada para testar a virulência de patógenos fúngicos. Um estudo mais recente conduzido por Fregonezi e colaboradores (2021) demonstrou a capacidade de utilizar o modelo alternativo “*in vivo*” *Galleria mellonella* para infecções também com o fungo *H. capsulatum*. Os autores buscaram respostas para a importância da proteína Hsp60 do fungo na formação de biofilmes e na virulência do fungo para utilizar como alternativa terapêutica antifúngica. A partir dos resultados, foi possível observar a influência da proteína na sobrevivência das larvas. Com o bloqueio da proteína Hsp60, houve uma sobrevivência de 60% das larvas, ao contrário da infecção controle que obteve apenas 10% de sobrevivência das larvas em 10 dias em condições de temperatura controladas a 37°C.

Galleria mellonella é conhecida como a mariposa da cera (*Lepidoptera Pyralidae*). Seu ciclo de vida completo dura de 8 a 12 semanas quando em condições favoráveis de temperatura e umidade. Os ovos eclodem em larvas que passam por 7 mudas (instares) antes de puparem e sofrerem metamorfose em adultos. Geralmente, as larvas do 6º instar com a coloração creme são utilizadas como modelo alternativo para doenças fúngicas e análise de virulência (ELLIS, et al, 2013; TSAI, et al, 2016). Devido ao seu baixo custo, fácil manuseio, ciclos reprodutivos curtos e habitação simples, esse modelo alternativo tem se tornado cada vez mais popular para ensaios de infecção, trazendo novas informações sobre infecções fúngicas. Mais de 1000 artigos já foram publicados utilizando *G. mellonella* trazendo diversos tipos de informação sobre seu sistema imune (BINDER, et al, 2015; TSAI, et al, 2016)

Recentemente, o genoma da *Galleria mellonella* foi sequenciado com a tecnologia PacBio para evidenciar o uso das larvas como um organismo substituto para vertebrados nas pesquisas biomédicas (LANGE, et al, 2018). As larvas são naturalmente expostas a patógenos e desenvolveram sistemas imunes e sistemas de defesa com muitas semelhanças ao sistema

imunológico dos vertebrados. O sistema imunológico de *G. mellonella* é um sistema a circulatório aberto do qual a hemolinfa é o elemento chave. Esse sistema imunológico inato compreende de uma barreira física e uma barreira celular associada a um sistema imunológico humoral (DURIEUX, et al, 2021). A barreira física é caracterizada pela cutícula da larva, semelhante à pele dos vertebrados, e é composta de quitina e muitas proteínas com propriedades antimicrobianas. A cutícula representa a primeira linha de proteção que atua como uma barreira física para prevenir a entrada de patógenos. A hemolinfa, caracterizada pela barreira celular, consiste de vários tipos de células, chamadas de hemócitos, que circulam a hemolinfa com o objetivo de realizar a fagocitose, encapsulamento de patógenos e atividades de coagulação nas larvas (WUENSCH, et al, 2018;). O método mais comumente usados para estudar a interação entre fungos e *G. mellonella* é a injeção de inóculo na larval por punção da cutícula com uma agulha na última pró-pata. A principal vantagem deste método é a melhor entrega de um inóculo usando uma agulha de insulina ou uma seringa de Hamilton. A seringa de Hamilton é amplamente utilizada pois é mais precisa para pequenos volumes e a injeção é quase sem cicatrizes para a larva (BINDER, et al, 2015).

Para avaliar a virulência do *H. capsulatum* o modelo traz uma importante vantagem: as larvas podem ser incubadas em temperaturas 25°C e 37°C possibilitando o habitat e condições de infecção em mamíferos (SINGULANI, et al, 2018). Para o atual trabalho desenvolvido, as larvas foram imprescindíveis. Estes animais foram escolhidos como modelo alternativo de teste *in vivo* para avaliar a infecção pelo fungo *Histoplasma spp.* cultivado em crescimento planctônico ou em crescimento em forma de biofilme sob condições de excesso ou de escassez de íons metálicos ferro e zinco.

As interações dos íons metálicos com os fatores de virulência do fungo *H. capsulatum* estão sendo amplamente pesquisadas e há muito ainda a ser descoberto. O trabalho levanta como hipótese que os íons metálicos ferro e zinco podem influenciar em fatores de virulência do

fungo durante a sua instalação no hospedeiro. Além disso, no contexto geral, o trabalho apresenta informações de que esses íons são importantes para funções de sobrevivência de diversos fungos, inclusive para o *Histoplasma spp.*, assim como se observa em outras leveduras como *C. albicans* e *S. cerevisiae* e o fungo *C. gatti*. Portanto, o objetivo do trabalho foi avaliar a influência dos íons metálicos no comportamento e na virulência do *H. capsulatum*, tanto em sua forma de crescimento planctônico quanto na forma de crescimento em biofilme a partir do uso de quelantes no meio de crescimento para o fungo. Além disso, o trabalho traz o uso de modelos de animais alternativos e métodos *in vitro* para estudar a virulência do fungo nas condições de excesso e escassez dos íons metálicos em estudo. Estudos utilizando modelos *in vivo* contribuem para entender melhor a patobiologia das infecções fúngicas e como decifrar diferenças no potencial de virulência, surgimento da doença, adaptação ao meio do hospedeiro de vários patógenos fúngicos humanos (BINDER et al, 2015).

O trabalho atual traz informações importantes relacionadas à diferentes necessidades nutricionais de duas cepas do fungo *H. capsulatum*. Com os resultados e o conhecimento adquirido informações sobre o metabolismo e o dimorfismo fúngico, a formação de biofilme e a virulência das cepas foram obtidos. Esses resultados podem contribuir para novos estudos com ênfase na caracterização de mecanismos de sobrevivência, patogenicidade e virulência do fungo. Além do mais, é possível a partir dessas descobertas elaborar novos alvos terapêuticos e novas propostas de agentes antifúngicos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar a influência dos íons metálicos ferro e zinco em células planctônicas, bem como na formação e nos mecanismos de virulência do biofilme de *Histoplasma capsulatum*.

2.2. Objetivos secundários

- Determinar a concentração adequada dos micronutrientes ferro e zinco, e dos quelantes TPEN e DTPA no crescimento *H. capsulatum*;
- Verificar a influência do excesso e escassez dos micronutrientes ferro e zinco na atividade metabólica de *H. capsulatum* da forma planctônica;
- Verificar a influência do excesso e escassez dos micronutrientes ferro e zinco na atividade metabólica, biomassa e morfologia celular nas fases de biofilme inicial e biofilme maduro de *H. capsulatum*;
- Avaliar a influência dos íons metálicos e quelantes na parede celular após crescimento planctônico 24 e 144 h e formação de biofilme inicial (24 h) e maduro (144 h) de *H. capsulatum*;
- Avaliar a influência da escassez e do excesso dos micronutrientes ferro e zinco na infecção de *H. capsulatum* no modelo animal alternativo *Galleria mellonella*.

3. Materiais e Métodos

3.1. Cepas

Duas cepas de *H. capsulatum* (ATCC 26029 (G186 A) e EH-315 / BAC₁) foram utilizadas para os ensaios laboratoriais. A cepa G186A, original do Panamá, é uma cepa clínica, doada pela professora Dra Roseli Zancopé Oliveira da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, enquanto que a cepa EH-315 / BAC₁ é uma cepa selvagem reconstituída do intestino de um morcego infectado da espécie *Mormoops* capturado em uma caverna do estado de Guerrero, México. Esta cepa estava no banco de dados da World Federation for Culture Collection sob o número LIH-UNAM WDCM817 e foi cedida pela Profa Dra Maria Lúcia Taylor da Universidade Nacional Autônoma do México (UNAM). As cepas de *H. capsulatum* foram mantidas por 96 h a 37°C em ágar Brain and Heart Infusion (BHI) (BD Difco™, Wokingham, Berkshire, Reino Unido) suplementado com 0,1% de L-cisteína (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil) e glicose a 1% (Synth, Diadema, São Paulo) (Baltazar et al., 2018).

3.2. Pré análises para avaliação dos quelantes

Concentração mínima inibitória dos quelantes e dos íons metálicos

Para a realização do teste de sensibilidade do *H. capsulatum* aos íons metálicos e quelantes foi utilizado o documento M27-A2 disponibilizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI - 2008) com algumas modificações. As soluções para o teste foram feitas no meio de cultivo HAM-F12 (Ham's Nutrient Mixture) (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Foram feitas soluções de sulfato de ferro (FeSO₄) (Synth, Diadema, SP, Brasil) e de sulfato de zinco (ZnSO₄) (Synth, Diadema, SP, Brasil) em concentrações de 1.250 µM a 5 µM, e para os quelantes DTPA (ácido Dietilenotriamina pentaacético) (DTPA) (Neon, Suzano- SP, Brazil) e TPEN (N, N, N, N – tetraquis – 2 – piridilmetiletano – 1,2 diamina) (Sigma-Aldrich, Milão, Itália) as soluções foram feitas nas concentrações de 80 µM a 0,312 µM. Em seguida, foi feito o teste de microdiluição em placas de 96 poços. O inóculo inicial foi

realizado em tampão fosfato de sódio (PBS) estabelecida a concentração de 5×10^6 céls/mL. A partir deste inóculo foi feita uma diluição de 1:10 no meio HAM-F12. Cada uma das soluções estava 2 x mais concentrada e foram dispensadas nos poços das fileiras de 2 a 10 das placas de microdiluição de 96 poços em um volume de 100 μ L com uma pipeta multicanal e em seguida 100 μ L do inóculo foi colocado em cada poço. A fileira 2 continha a maior concentração de cada solução e a fileira 10 continha a menor concentração da solução testada. As fileiras 1 e 12 foram utilizadas como controle de esterilidade do meio, sendo que 200 μ L do meio HAM-F12 foi colocado em cada poço dessas fileiras, e para o controle do crescimento do fungo foi utilizada 100 μ L do inóculo nos poços da fileira 11 com 100 μ L de HAM-F12. De maneira geral, no final de cada poço foi obtido um volume de 200 μ L e a concentração final das células fúngicas foi de $2,5 \times 10^5$ céls. / mL. As placas de microdiluição foram incubadas em estufa a 37 ° C por 24 horas para determinar a viabilidade celular.

Para determinar a viabilidade de cada cepa de *Histoplasma spp.*, foi utilizado o ensaio de resazurina (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, EUA) com algumas alterações. Nas fileiras de cada concentração dos quelantes e dos íons e sob a condição controle foram colocados 20 μ L de uma solução de resazurina a 0,02% em cada poço da placa, e esperavam-se 24 horas para registrar a fluorescência usando comprimento de onda de 570 nm / 600 nm (MARTIN, et al, 2011). A partir dos testes de viabilidade e da análise estatística do crescimento de cada cepa nas concentrações dos íons e dos quelantes comparadas com o crescimento controle, foram escolhidas as concentrações dos micronutrientes e dos quelantes a serem utilizados nas análises posteriores. Para obtenção dos resultados foram realizados 3 experimentos independentes com quadruplicatas dos testes de resazurina.

3.3. Condições de cultivo

As cepas G186A e EH 315 foram removidas dos tubos contendo meio BHI suplementado com 1% de glicose e 0,1% de cisteína inclinado repicadas com o auxílio de uma alça

microbiológica estéril em meio HAM-F12 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) suplementado com 1,8% glicose (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil), 0,1% de ácido glutâmico, tampão HEPES (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil), 0,6% de tampão HEPES (Sigma-Aldrich Milão, Itália) e 0,008% de L-cisteína (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil). Para a elaboração das diferentes condições em meio HAM-F12 foram feitas soluções estoque no próprio meio HAM-F12 nas concentrações de 2.500 μM com Sulfato de Ferro, Sulfato de Zinco, e do quelante TPEN. Para o quelante DTPA a solução estoque foi de 5.000 μM . A partir dessas soluções foram feitas o meio de cultivo de trabalho em meio HAM-F12, tendo como objetivo as concentrações finais de uso de: 20 μM para HAM-F12 com zinco, HAM-F12 com ferro, e HAM-F12 com DTPA e 10 μM para HAM-F12 com TPEN. O meio HAM-F12 sem nenhum composto adicionado foi utilizando como condição Controle.

3.4. Culturas planctônicas e formação de biofilmes

As cepas foram colocadas nos diferentes tipos de meios HAM-F12 (HAM-F12 (controle), HAM-F12 + 20 μM Zinco, HAM-F12 + μM Ferro, HAM-F12 + 20 μM DTPA, e HAM-F12 + 10 μM TPEN) e mantidas em shaker a 150 rpm a 37°C por 96 horas. Após esse período, cada crescimento foi centrifugado a 5000 rpm, 30°C por 10 min. O sobrenadante contendo o meio de cultura era removido e a massa fúngica era ressuspensa com tampão salino fosfato estéril (PBS) para lavagem e contagem das células na câmara de Neubauer (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil) usando o azul de Trypan (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) na proporção de 1:1. Com pelo menos 90% das células viáveis nos diferentes crescimentos, as células eram ressuspensas nos diferentes tipos de HAM-F12 na concentração de 5×10^6 céls/mL. A formação do biofilme foi seguindo os trabalhos de Pitangui e colaboradores (2012) com algumas modificações. Foram colocados 200 μL de inóculo de cada meio de cultivo denominados de HAM-F12 (controle), HAM-F12 + 20 μM Zinco, HAM-F12 + μM Ferro, HAM-F12 + 20 μM DTPA, e HAM-F12 + 10 μM TPEN em cada poço da

placa de 96 poços (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil) que foram incubadas em uma condição de aerobiose a 37°C em estufa B.O.D sem agitação para formação do biofilme e com agitação em shaker a 150 rpm em temperatura de 37°C para cultivos na forma planctônica. O período total de incubação foi de 144 h. Foram realizados três experimentos independentes com as cinco condições de crescimento para cada cepa, em ambas as formas de crescimento.

3.5. Análise do crescimento planctônico de *Histoplasma capsulatum*

Viabilidade celular

Para avaliar a viabilidade celular das cepas em crescimento planctônico foi feita a contagem das células viáveis de cada cepa de *Histoplasma capsulatum* de três poços com crescimento da placa de 96 poços utilizando o corante de Trypan e a câmara de Neubauer. Foram realizados três experimentos independentes com as cinco condições de crescimento para cada cepa em triplicata, resultando em um “n” de 9 amostras (Vaso, et al, 2022)

Densidade celular

A segunda forma foi realizar a medição da densidade óptica de três poços com crescimento em um comprimento de onda de 520 nm utilizando o espectrofotômetro (Biotek – Epoch 2™) (Pitangui et al, 2012; Gonçalves, et al, 2020). O intervalo para avaliar a densidade de células foi nos tempos de 6h, 12h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144h. Foram realizados três experimentos independentes com as cinco condições de crescimento para cada cepa em triplicata, resultando em um “n” de 9.

Determinação da atividade metabólica mitocondrial

A atividade mitocondrial do biofilme e do crescimento planctônico do fungo foi medida em todos os tipos de meio HAM-F12 pelo ensaio de redução de XTT [2,3-bis- (2-metoxi-4-nitro-5-sulfenil) -5- (fenilamina carbonil)]- 2H – hidróxido tetrazólio]. Foram avaliados os tempos de 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144h de incubação do crescimento planctônico. Em cada poço

da placa de 96 poços foram adicionado 50 μ L de uma solução de XTT (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) (1 mg de sal/1 mL de PBS) e 4 μ L de menadiona (Sigma-Aldrich, Saint, Louis, USA) a 1 mM (178 mg / 100 mL de acetona (Dinamica, Indaiatuba, SP, Brasil)) preparados separadamente. Após 3 horas de incubação a 37°C, a densidade óptica dos poços foi lida em um espectrofotômetro (Biotek Epoch 2™) em um comprimento de onda de 490 nm (e Casadevall, 2006; Pitangui et al, 2012). Foram realizados três experimentos independentes com as cinco condições de crescimento para cada cepa em triplicata, resultando em um “n” de 9.

3.6. Análise da formação do biofilme de *Histoplasma capsulatum*

Determinação da atividade metabólica mitocondrial pelo ensaio de XTT

A atividade metabólica mitocondrial foi medida conforme o item 3.4.3. Para a condição de biofilme, o sobrenadante foi removido e os poços foram lavados com PBS. As mesmas quantidades dos reagentes foram adicionadas e os tempos avaliados foram de 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 h.

Quantificação da biomassa do biofilme pela coloração com Cristal Violeta

Seguindo os mesmos tempos de avaliação da atividade metabólica, foi avaliado a quantidade de biomassa produzida pelos biofilmes nas condições de cultivo em HAM-F12 já citadas. Em cada período de incubação eram removidos os sobrenadantes dos poços e acrescentado 200 μ L de metanol (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil) por 15 min. O sobrenadante de metanol foi aspirado e as placas foram secadas em temperatura ambiente no fluxo laminar. Então 200 μ L de uma solução de cristal violeta (Dinamica, Indaiatuba, SP, Brasil) a 0,1% foi adicionada para cada poço por 20 minutos. Depois deste período, o corante foi removido e descartados e os poços foram lavados com água destilada estéril para remover o excesso da coloração e os biofilmes foram descorados com a adição de 200 μ L de ácido acético a 33%. Em seguida, as placas foram lidas em espectrofotômetro Biotek Epoch 2™ em um comprimento de onda de 570 nm (Marcos-Zambrano et al, 2014). Foram realizados três

experimentos independentes com as cinco condições de crescimento para cada cepa em triplicata, resultando em um “n” de 9.

Quantificação da matriz extracelular pela coloração com Safranina

A matriz extracelular dos biofilmes foi quantificada pela coloração com Safranina (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). Os sobrenadantes dos poços foram descartados e foram adicionados 50 µL de solução de safranina a 1% nos poços por 5 minutos. O corante foi removido e as placas foram lavadas com água destilada estéril até completa remoção do excesso do corante. Foram colocados 200 µL de PBS estéril a 0,85% para fazer a leitura em espectrofotômetro Biotek Epoch 2™ em um comprimento de onda de 492 nm (Costa-Orlandi et al, 2014). Foram realizados três experimentos independentes com as cinco condições de crescimento para cada cepa em triplicata, resultando em um “n” de 9.

Microscopia eletrônica de varredura do biofilme (MEV)

Para a microscopia eletrônica de varredura (MEV), os biofilmes foram formados em placas de 24 poços (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil) nas condições de crescimento determinadas anteriormente. Foram avaliados os biofilmes formados em 24 horas (inicial) e os biofilmes formados em 144 horas (maduro) em todas as condições. As amostras foram processadas como descrito por Morris e colaboradores (1997) com algumas modificações para adaptação das condições. Portanto, para a análise, o sobrenadante foi removido de cada poço da placa, estes foram lavados com PBS três vezes para a remoção das células não aderente. As concentrações foram fixadas com 250 mL de solução de glutaraldeído 2,5% (Sigma – Aldrich, Saint Louis, USA) e 250 ml de solução de paraformaldeído a 4% (Sigma – Aldrich, Saint Louis, USA) por 24 h a 4°C. Após a fixação, foi feita novamente três lavagens nos poços utilizando água salina estéril a 0,85%. Em seguida foi feita a etapa de desidratação, adicionando concentrações crescentes de álcool (Vetec) (20% a 100%) e secas em temperaturas ambiente. Os fundos dos poços foram cortados das placas com o auxílio de um bisturi e foram montados

em cilindros de alumínio de prata e colocados em metalizadores em vácuo para revestimento com ouro (20 Au) (Denton Vacuum, modelo Desk V). As amostras foram analisadas com o Microscópio eletrônico de varredura JEOL modelo JSM-6610LV do laboratório de Microscopia eletrônica de varredura da Faculdade de Odontologia, FOAR, Araraquara, SP. Foram realizados dois experimentos independentes com uma imagem de cada condição de crescimento para cada cepa.

Microscopia de Fluorescência Confocal

Os biofilmes também foram analisados quanto a sua densidade e viabilidade por microscopia de fluorescência Confocal. Os biofilmes foram formados em placas de 24 poços seguindo as mesmas condições relatadas anteriormente e nos mesmos tempos utilizados para a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), 24 horas (biofilme inicial) e 144 horas (biofilme maduro). Após a formação do biofilme, o sobrenadante foi retirado e os biofilmes foram fixados com paraformaldeído a 4% por 24 horas em temperatura de 4°C. Após esse período, o paraformaldeído foi removido e os poços foram lavados com PBS e adicionado de 250 µL do reagente Calcofluor (Sigma Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) na concentração de 50 µg/mL por 40 minutos. Após o tempo de coloração, os poços foram lavados com PBS e as amostras foram analisadas no Microscópio de Fluorescência Confocal (Carl Zeiss LSM 800) da Faculdade de Odontologia da UNESP, Araraquara, SP. Foram realizados dois experimentos independentes para obtenção de uma imagem das cepas em cada condição de crescimento.

3.7. Susceptibilidade ao Congo Red (CR) para identificação de alteração na parede celular fúngica

Os experimentos foram realizados de acordo com Ram e Klis (2006) com pequenas alterações. Foi realizado o teste de sensibilidade utilizando o corante Congo Red (CR) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) em concentrações que variavam de 100 a 2.500 µM. Após a determinação de quais concentrações o fungo apresentou sensibilidade, o corante foi adicionado

junto ao BHI suplementado em concentrações de 34,8 mg / L (100 μ M) e de 52,25 mg / L (150 μ M) e foi plaqueado em placas de petri. Para realizar os spots, as cepas foram cultivadas em seus respectivos meios HAM-F12 em crescimento planctônico e em biofilme nos tempos de 24 e 144 h. Após esses períodos os cultivos de cada cepa foram centrifugados e ressuspensos em concentrações de 5×10^5 cél / mL e 5×10^6 cél / mL. Ambas as concentrações das células foram plaqueadas em BHI e nos BHI com as concentrações de CR em forma de spots de 5 μ L.

3.8. Infecção *in vivo* utilizando o modelo *Galleria mellonella*

Os experimentos foram realizados de acordo com Thomaz et al (2013). As larvas de *Galleria mellonella* foram produzidas no laboratório de Animais Alternativos do Núcleo de Proteômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, no campus de Araraquara. Grupos de 9 a 12 larvas com peso entre 0,150 e 0,200 g foram colocados em placas de petri e incubados a 37 °C no escuro por 24 horas antes dos experimentos. As larvas com alterações de cor (manchas escuras ou com melanização aparente) foram excluídas. Antes da infecção, foi realizada a assepsia das pró-patas com etanol 70%. O fungo foi cultivado conforme descrito nas condições acima: HAM-F12, HAM-F12 + 20 μ M Zinco, HAM-F12 + 20 μ M Ferro, HAM-F12 + 20 μ M DTPA e HAM-F12 + 10 μ M TPEN, nos tempos de 24 horas e 144 horas, em crescimento planctônico e biofilme. Após recolher os pellets de cada um desses crescimentos, cada inóculo fúngico foi preparado em PBS em uma densidade de 1×10^8 leveduras/mL. Com o auxílio de seringas de Hamilton 10 μ L, as suspensões fúngicas de cada condição feitas em PBS foram injetadas na última pró-pata de cada larva atingindo um inóculo de 1×10^6 leveduras por larva. Os grupos foram divididos conforme a origem do meio de cultivo, sendo divididos em: PBS, HAM-F12 (Controle) , HAM-F12 + 20 μ M Zinco, HAM-F12 + 20 μ M Ferro, HAM-F12 + 20 μ M DTPA e HAM-F12 + 10 μ M TPEN. Após a inoculação as larvas foram mantidas em estufa B.O.D a 37°C por 10 dias, sendo acompanhadas diariamente para contagem da sobrevivência.

3.9. Análises estatísticas

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

4. Resultados e Discussão

4.1. Avaliação dos quelantes e íons metálicos sobre o crescimento do fungo *H. capsulatum*

Estudos que envolvem a adaptação ambiental de microrganismos têm sido um grande desafio. A capacidade dos organismos de se adaptarem às mudanças em seu ambiente nutricional é claramente um dos motivos de suas evoluções (PETTI, et al, 2011). Portanto, o uso de quelantes tem por objetivo mimetizar um ambiente hostil, com baixa concentração de ferro e zinco, assim como ambientes intracelulares de hospedeiros mamíferos. Já é sabido que para a infecção ser bem-sucedida e o patógeno conseguir colonizar o hospedeiro, é necessário que o micróbio adquira nutrientes neste meio intracelular. As fontes metabólicas incluem, não só, mas principalmente, os íons metálicos ferro e zinco. A limitação de nutrientes nos fagossomos representa um desafio particular do ambiente intracelular e caracteriza uma resposta imune do hospedeiro conhecida como “imunidade nutricional” (SHEN, et al, 2018)

A privação de nutrientes limitantes do crescimento oferece a oportunidade de estudar a coordenação da detecção de nutrientes, metabolismo, crescimento e divisão celular. A coordenação adequada resulta na sobrevivência prolongada, na parada do ciclo celular, e depende fortemente do nutriente específico que está sendo esgotado (PETTI, et al, 2011).

Agentes quelantes são comumente usados em estudos com experimentos que tem por objetivo quelar íons essenciais como método de depleção, pois tem um impacto direto nas concentrações intra e extracelular dos metais afetando o metabolismo celular do microrganismo. A capacidade de um quelante se ligar a um íon é medida pela sua constante de afinidade. Essa constante de afinidade (K) é medida pela capacidade na qual o quelante tem de se ligar ao metal em análise (SOHNLE et al, 2001; STAATS, et al, 2013).

Os quelantes utilizados no trabalho foram o TPEN e o DTPA e ambos são capazes de se ligar a íons metálicos como o ferro e zinco e provocarem a apoptose celular. O agente quelante

TPEN tem uma constante de afinidade maior para metais pesados como o zinco. O TPEN apresenta uma K alta para zinco (K: TPEN/ zinco = 18,7; K TPEN / ferro = 14,6; TPEN / cálcio = 4,4; TPEN / magnésio = 1,7) e baixa afinidade para cálcio e magnésio. Além disso, o quelante tem a capacidade de permear a membrana celular, fazendo com que atinja o interior da célula fúngica provocando uma depleção do zinco transitório intracelular mais profunda que o outro quelante em estudo (SOHNLE, et al, 2001; HASHEMI et al, 2007; ASSUNÇÃO et al, 2020). O efeito citotóxico do TPEN pode ser devido a quelação intracelular do zinco, que interfere com o funcionamento de metaloproteínas essenciais (HYNT, et al., 2001).

Já o quelante DTPA é um quelante que não permeia a membrana celular, porém é frequentemente utilizado como quelante de vários metais, principalmente para trabalhos que querem avaliar o ferro, visto que sua constante de afinidade para o metal é alta (K: DTPA/ ferro = 28,6; DTPA / zinco = 18,7) (SOHNLE et al, 2001, WINTERS, et al, 2010). Apesar das altas afinidades dos quelantes para os íons estudados vale ressaltar que nenhum quelante sempre se liga a um metal específico, o que torna difícil atribuir o fato de diminuir o crescimento das células apenas por ter quelado o íon de maior afinidade (OLLIG et al, 2016).

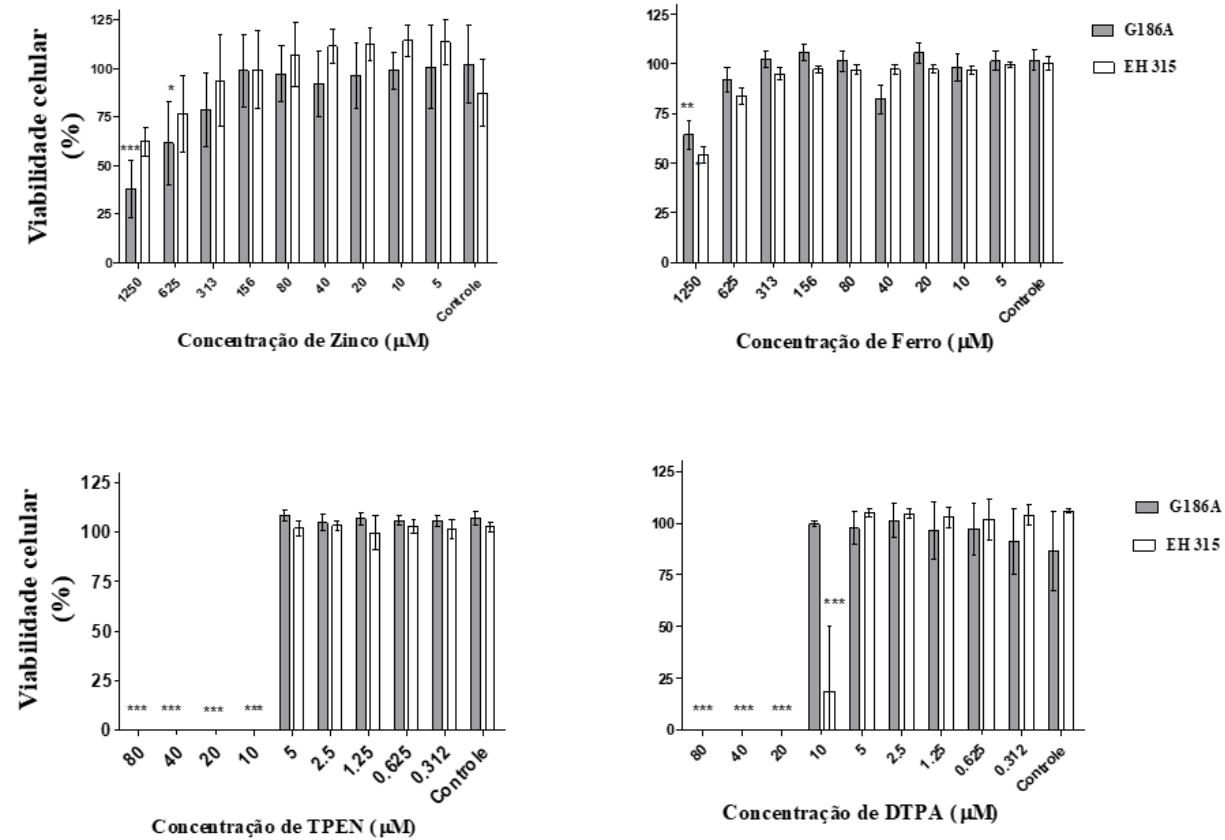
Diante do exposto, inicialmente, algumas concentrações dos quelantes foram testadas a fim de se determinar aquela que inibisse o crescimento fúngico, para a realização dos testes posteriores. Os resultados e a análise estatística do efeito das diferentes concentrações dos quelantes TPEN e DTPA para as cepas de *H. capsulatum* foram apresentados na figura 2. Tanto a cepa G186A quanto a cepa EH 315 apresentaram cerca de 100% de crescimento celular nas concentrações $\leq 5 \mu\text{M}$ para o TPEN. Na concentração de $10 \mu\text{M}$ do TPEN, ambas as cepas apresentaram uma diminuição significativa do crescimento comparado com o controle ($p < 0,001$). Já na concentração de $\geq 20 \mu\text{M}$ de TPEN as cepas tiveram seu crescimento totalmente inibido. Em relação ao DTPA, a cepa G 186A e a cepa EH315 não apresentaram alteração no crescimento em relação ao controle em concentrações ≤ 5 e $10 \mu\text{M}$,

respectivamente. As concentrações $\geq 20 \mu\text{M}$ de DTPA reduziram significativamente o crescimento de ambas as cepas quando comparado ao controle ($p < 0,001$). A partir dos resultados, as concentrações inibitórias mínimas determinadas e escolhidas para os testes posteriores foram $20 \mu\text{M}$ para DTPA e $10 \mu\text{M}$ para TPEN.

As concentrações utilizadas para o TPEN em outros estudos com o fungo *H. capsulatum* e com células cancerígenas variaram de $0,1$ a $10 \mu\text{M}$ (WINTER et al, 2010; DADE et al, 2016). Para o DTPA, as concentrações utilizadas para inibir o crescimento do fungo foram maiores que a utilizada no trabalho presente, entre $50 \mu\text{M}$ e $1000 \mu\text{M}$ (SIQUEIRA, 2016; WINTERS et al, 2010; ASSUNÇÃO et al 2020), mas nós optamos por utilizar a menor concentração que inibisse o crescimento fúngico ($20 \mu\text{M}$).

As concentrações de íons metálicos também foram estabelecidas para determinar qual concentração poderia beneficiar o crescimento do fungo. A concentração escolhida para realizar a avaliação do excesso de íons Fe ou Zn no crescimento do fungo foi de $20 \mu\text{M}$, pois não alterou o crescimento do fungo em comparação com o controle. Além disso, tal concentração é relatada na literatura para o fungo *Histoplasma* (SIQUEIRA, 2016).

Figura 2: Efeitos das concentrações dos íons metálicos zinco e ferro e dos quelantes TPEN e DTPA na viabilidade celular das cepas G186A e EH-315 de *H. capsulatum* apresentados em porcentagem de células viáveis utilizando ensaio de resazurina.



Dados representados como média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.2. Cinética do crescimento planctônico de *Histoplasma capsulatum*

Após a identificação das concentrações dos íons metálicos, ferro e zinco, e das concentrações dos quelantes DTPA e TPEN a serem utilizados, foi dado início a caracterização do crescimento planctônico e do crescimento na forma de biofilme das cepas G186A e EH 315 de *H. capsulatum*. Para descrever a atividade metabólica das cepas, foi realizado o ensaio colorimétrico com XTT, a viabilidade celular foi conferida através da contagem de células viáveis na câmara de Neubauer com trypan e a densidade celular foi medida por absorbância a 520 nm.

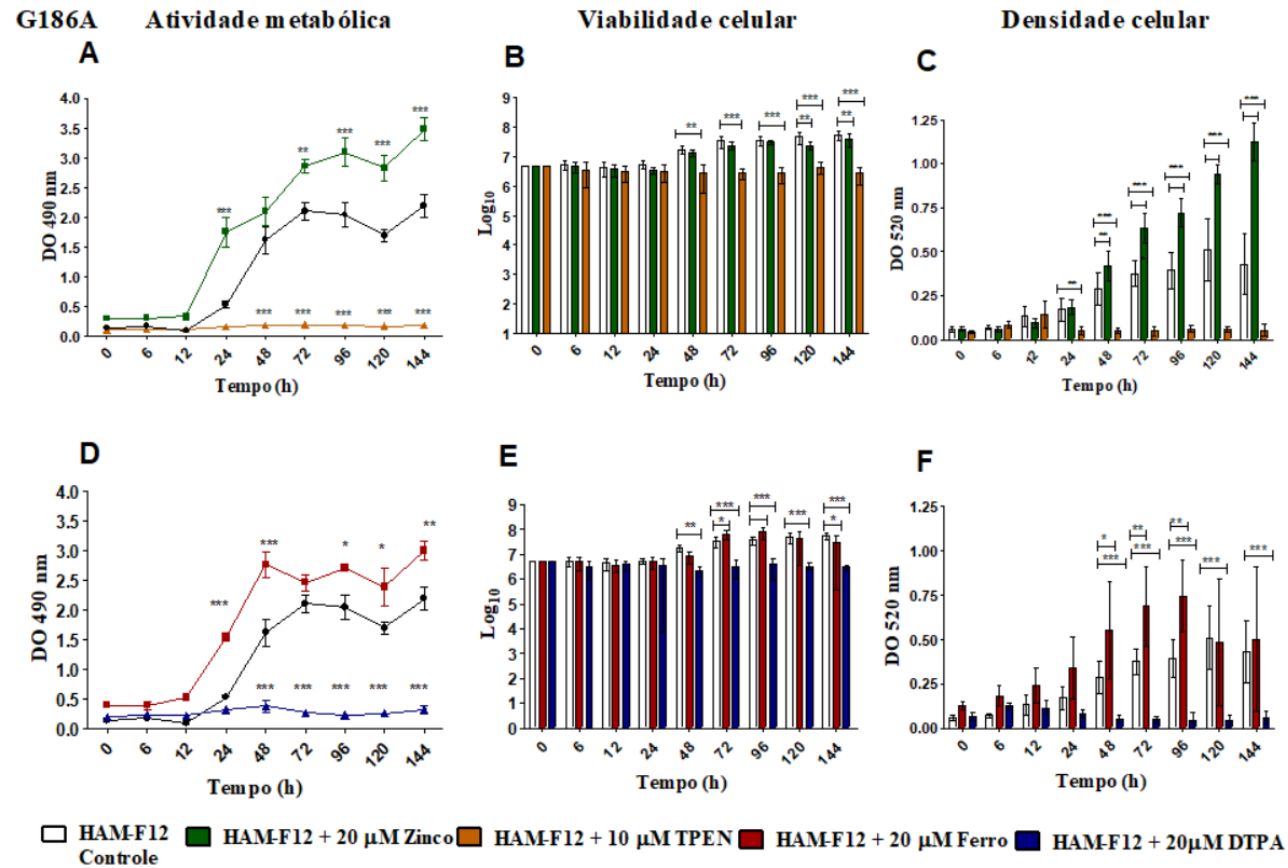
Na figura 3 e 4 são apresentados os resultados da atividade metabólica, viabilidade celular e densidade celular de ambas as cepas, G186A e EH-315 respectivamente, sendo apresentados as condições HAM-F12 (Controle), HAM-F12 + 20 μ M de zinco (adição de zinco) HAM-F12 + 10 μ M TPEN (escassez de zinco), HAM-F12 + 20 μ M de Ferro (adição de ferro) e HAM-F12 + 20 μ M DTPA (escassez de ferro).

Ao analisar os gráficos de atividade metabólica, na presença de zinco, a cepa G186A (Fig. 3A) apresentou o mesmo comportamento de crescimento no controle e na condição com zinco, entretanto, na presença do íon, a cepa apresentou valores maiores estatisticamente nos tempos, 24 ($p<0,001$), 72 ($p<0,01$), 96, 120 e 144 h ($p<0,001$). Na presença do ferro (Fig. 3D), essa cepa também apresentou maior atividade metabólica em relação ao controle, com valores estatisticamente maiores nos tempos de 24, 48 ($p<0,001$), 96, 120 ($p<0,05$) e 144 h ($p<0,01$). Já a cepa EH315 (Fig. 4A), demonstrou que a presença do zinco não aumentou esse parâmetro em relação ao controle. Entretanto, com o ferro (Fig.4D), a atividade da cepa foi maior que o controle, com valores estatisticamente maiores nos tempos de 72, 96 ($p<0,001$), 120 ($p<0,05$) e 144 h ($p<0,001$). Na presença dos quelantes, de maneira geral para ambas as cepas houve uma diminuição da atividade metabólica. Tanto com o TPEN (Fig.3A) quanto com o DTPA (Fig.3D), a cepa G186A permaneceu com baixa atividade metabólica (menor que 0,5 nm) com diferença

estatística do controle a partir do tempo de 48 até 144 h ($p<0,001$). Para a cepa EH315, com a adição do TPEN (Fig.4A) no meio houve diminuição da atividade metabólica com diferença estatística em relação ao controle nos tempos de 24 ($p<0,05$), 48 ($p<0,01$), 120 e 144 h ($p<0,001$), e com o DTPA (Fig.4D), apenas nos tempos de 120 e 144 h ($p<0,001$).

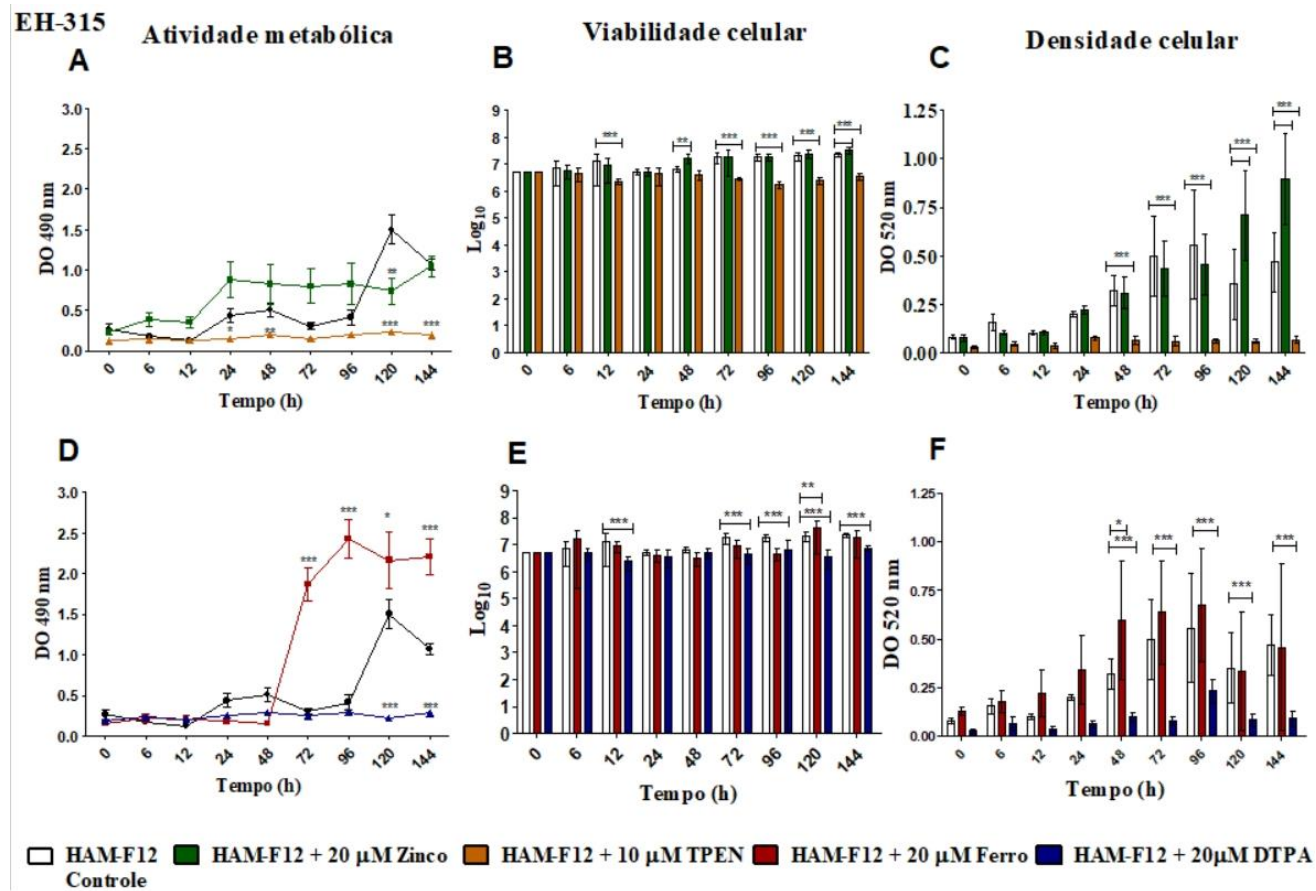
Em relação a viabilidade celular, na presença dos quelantes, ambos provocaram uma diminuição do número de células viáveis em relação ao controle tanto para a cepa G186A quanto para a cepa EH-315. Com o TPEN e DTPA (Fig. 3B; 3E), a cepa G186A mostrou uma diminuição estatística nos números de células viáveis a partir do tempo de 48 ($p<0,01$) até 144 h ($p<0,001$). Já a cepa EH-315, com o TPEN (Fig.4B), apresentou diminuição do número de células a partir do tempo de 72 até 144 h ($p<0,001$). Com o DTPA (Fig.4E) essa cepa também apresentou uma diminuição estatística no tempo de 12 h ($p<0,001$). Na presença dos íons metálicos, com o zinco, a G186A (Fig. 3B) teve um aumento estatístico no número de células viáveis nos tempos de 120 e 144 h ($p<0,01$) em relação ao controle, com o ferro (Fig. 4E), apresentou maior número de células viáveis nos tempos de 72 ($p<0,05$), 96 ($p<0,001$) e 144 h ($p<0,05$). A cepa EH-315 com zinco (Fig. 4B), teve maior número de células viáveis em relação ao controle nos tempos de 48 ($p<0,01$) e 144 h ($p<0,01$), e com o ferro (Fig. 4E) apresentou apenas no tempo de 120 h ($p<0,01$).

Figura 3: Gráficos da atividade metabólica, viabilidade celular e densidade celular da cepa G186A do fungo *H. capsulatum* no crescimento planctônico cultivada e HAM-F12 com zinco, HAM-F12 com TPEN (A, B, C), HAM-F12 com ferro e HAM-F12 com DTPA (D, E, F) comparadas com a condição Controle, cultivada apenas em HAM-F12.



Dados representativos com média $\pm$ desvio padrão (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Figura 4: Gráficos da atividade metabólica, viabilidade celular e densidade celular da cepa EH-315 do fungo *H. capsulatum* no crescimento planctônico cultivada e HAM-F12 com zinco, HAM-F12 com TPEN (A, B, C), HAM-F12 com ferro e HAM-F12 com DTPA (D, E, F) comparadas com a condição Controle, cultivada apenas em HAM-F12.



Dados representativos com média $\pm$ desvio padrão (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$)

Seguindo para o último parâmetro analisado, a densidade celular demonstrou que na presença de ambos os quelantes, as cepas G186A e EH-315 tiveram valores bem inferiores ao ser comparado com a condição controle (HAM-F12). A cepa G186A (Fig. 3C; 3F) apresentou valores menores na densidade celular em relação ao controle com o TPEN (Fig.3C) a partir do tempo de 24 ($p<0,001$) e com o DTPA (Fig.3F) a partir do tempo de 48, ambos permanecendo até o tempo final de 144 h ($p<0,001$). Para a cepa EH-315 os quelantes (Fig. 4C; 4F) provocaram uma diminuição na densidade celular a partir do tempo de 48 ($p<0,001$) permanecendo até 144 h ($p<0,01$). Na presença do zinco e do ferro, a cepa G186A apresentou um aumento gradativo na densidade celular. Com o zinco, a cepa G186A (Fig. 3C) apresentou um aumento crescente no número de células com diferenças estatísticas em relação ao controle a partir do tempo de 48 ($p<0,01$) permanecendo até 144 h ($p<0,001$). Com o ferro (Fig. 3F), a cepa apresentou aumento na densidade celular significativo em relação ao controle, nos tempos 48 ($p<0,05$), 72 e 96 h ($p<0,01$). A cepa EH-315, na presença do zinco (Fig. 4C) demonstrou um aumento na densidade celular, porém apenas nos tempos de 120 e 144 h ($p<0,001$) e com o ferro adicionado ao meio (Fig. 4F) a cepa teve um aumento na densidade celular, mas com diferença estatística em relação ao controle apenas no tempo de 48 h ($p<0,05$).

4.3. Cinética da formação do biofilme de *Histoplasma capsulatum*

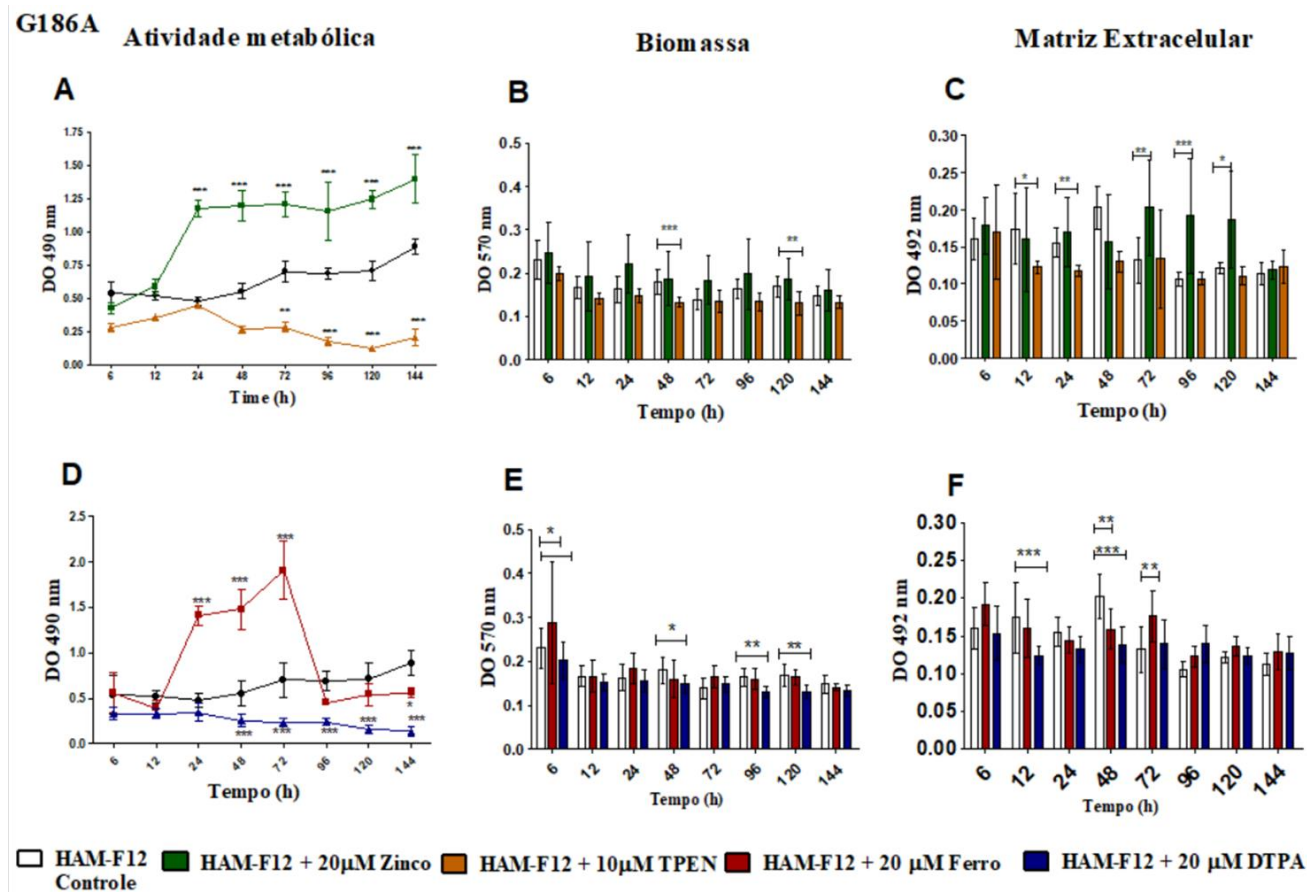
Para caracterizar a cinética da formação do biofilme das cepas G186A e da EH 315 de *H. capsulatum* também foi realizado o ensaio colorimétrico com XTT para avaliar a atividade metabólica. Além disso, foi feito o uso do corante cristal violeta para quantificar a biomassa e o corante safranina para quantificar a formação de matriz extracelular do biofilme de cada cepa dentre o período de 6 a 144 h. Os resultados são apresentados em gráficos nas figuras 5 e 6 para as cepas G186A e EH-315, respectivamente, apresentando as condições HAM-F12 (Controle), HAM-F12 + 20 μ M de zinco (excesso de zinco) HAM-F12 + 10 μ M TPEN (escassez de zinco), HAM-F12 + 20 μ M de Ferro (excesso de ferro) e HAM-F12 + 20 μ M DTPA (escassez de ferro).

Com adição do zinco, a cepa G186A mostrou uma curva semelhante ao controle, porém com valores de atividade maiores a partir do tempo de 24 h até o tempo final de 144 h ($p<0,001$). Com o ferro (Fig. 5D), na forma de biofilme, a mesma cepa apresentou picos de maior atividade metabólica quando comparada ao controle. Os picos ocorreram nos tempos 24, 48 e 72 h ($p<0,001$) com diferenças estatísticas em relação ao controle. Já a cepa EH-315, o zinco não influenciou na atividade metabólica da cepa (Fig. 6A), apresentando valores semelhantes ao da curva controle e um declínio da atividade no tempo de 144 h ($p<0,05$). Na presença de ferro (Fig. 6D), esta cepa também apresentou picos de atividade metabólica, sendo eles nos tempos de 48 e 72 h ($p<0,001$) e um declínio no tempo de 144 h ($p<0,05$).

De modo geral, ambas as cepas de *Histoplasma* não apresentaram aumento da produção de biomassa na presença dos íons metálicos. Com a adição dos quelantes ao meio, a cepa G186A (Fig. 5B; 5E) apresentou uma menor produção de biomassa. Com o TPEN (Fig. 5B) os tempos de menor produção de biomassa foram 48 ($p<0,05$), 96 e 120 h ($p<0,01$) e com o DTPA (Fig. 5E) os menores valores apareceram nos tempos de 48 e 120 h ($p<0,001$). A cepa EH-315 apresentou menor produção da biomassa com o TPEN (Fig. 6B) nos tempos iniciais, 6 e 12 h ($p<0,01$), mas com a adição do DTPA não houve alteração (Fig. 6E).

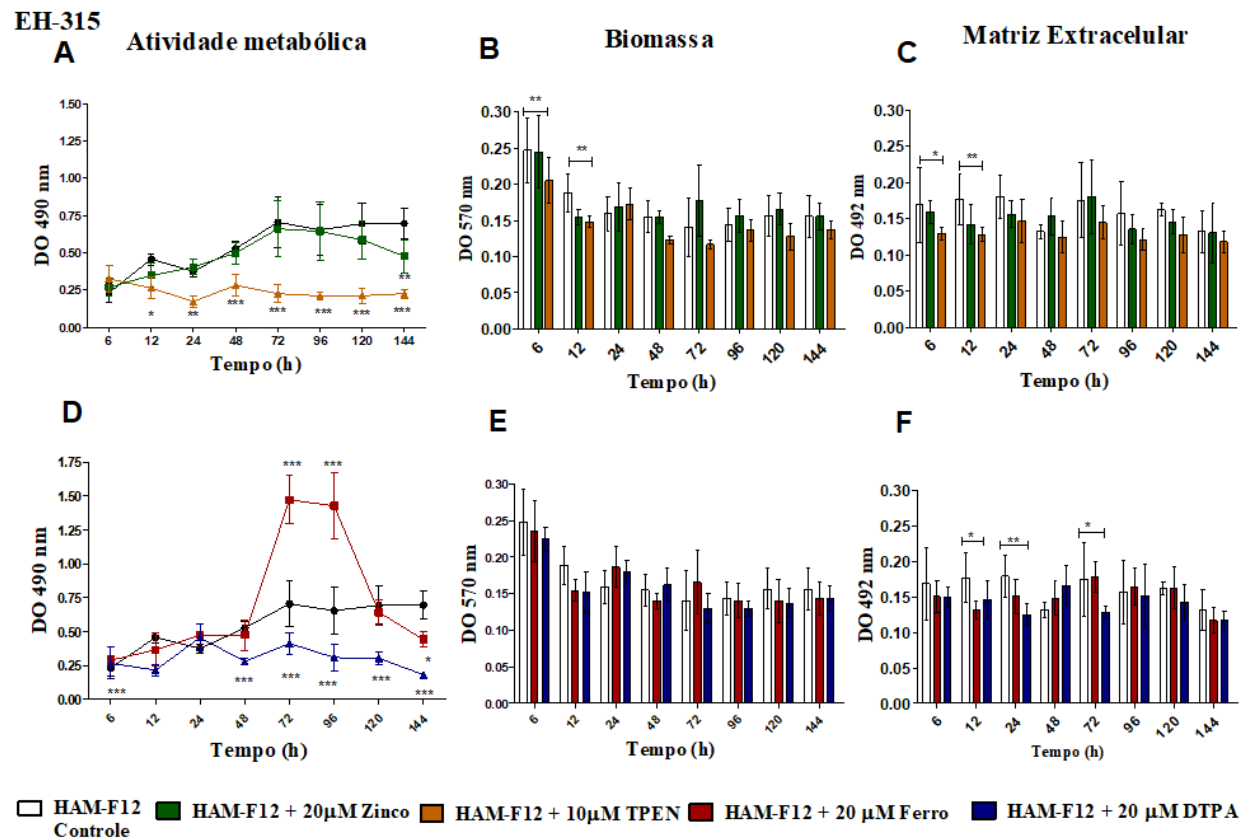
Para finalizar a caracterização dos biofilmes das cepas de *Histoplasma*, foi realizado a quantificação da produção de matriz extracelular (MEC). Para a cepa G186A (Fig. 3C; 3F), com a adição de zinco houve maior produção de MEC nos tempos de 72 ($p<0,01$), 96 ($p<0,001$) e 120 h ($p<0,05$), já com a adição do ferro apenas no tempo de 72 h ($p<0,01$) houve um aumento na produção. Com a adição do TPEN, a cepa mostrou resultados menores de produção de MEC nos tempos de 12 ($p<0,05$) e 24 h ($p<0,01$) e com o DTPA nos tempos de 12 ($p<0,001$) e 48 h ($p<0,001$).

Figura 5: Gráficos da atividade metabólica, quantificação da biomassa e da matriz extracelular da cepa G186A do fungo *H. capsulatum* no crescimento em forma de biofilme cultivada em meio HAM-F12 com zinco, HAM-F12 com TPEN (A, B, C), HAM-F12 com Ferro e HAM-F12 com DTPA (D, E, F) comparadas com a condição Controle, cultivada em HAM-F12.



Dados representativos com média $\pm$ desvio padrão (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Figura 6: Gráficos da atividade metabólica, quantificação da biomassa e da matriz extracelular da cepa EH-315 do fungo *H. capsulatum* no crescimento em forma de biofilme cultivada em meio HAM-F12 com zinco, HAM-F12 com TPEN (A, B, C), HAM-F12 com Ferro e HAM-F12 com DTPA (D, E, F) comparadas com a condição Controle, cultivada em HAM-F12.



Dados representativos com média $\pm$ desvio padrão (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

A composição do biofilme, a função e as vias metabólicas na formação do biofilme ainda são pouco compreendidas para a maioria dos microrganismos. O estudo do biofilme como fator de virulência e os mecanismos de formação do biofilme bem como os estudos das vias metabólicas e proteínas envolvidas na geração dessas estruturas são necessárias para entender como os fungos geram adesão/invasão em tecidos humanos e resistência a antifúngicos (CALVILLO-MEDINA, et al, 2019).

As informações atuais demonstram que o *Histoplasma* necessita do zinco para a infecção. Recentes análises *in silico* revelaram a presença de 8 genes envolvidos na homeostase de zinco no fungo *Histoplasma*. Esses genes incluem fatores de transcrição membros da família de transportadores de zinco denominada ZIP. Os níveis transcricionais dos transportadores de zinco (ZRT1, ZRT2 e ZAP1) foram induzidos em ambientes com a depleção de zinco (ASSUNÇÃO, et al, 2020).

Neste trabalho, foram utilizados os dois quelantes DTPA e TPEN para mimetizar ambientes com limitação de micronutrientes, principalmente ferro e zinco, ou então foram adicionados em concentrações benéficas ao fungo para mimetizar ambientes com mais disponibilidade desses mesmos íons. Em síntese, tanto a análise em crescimento planctônico quanto a análise da formação do biofilme mostraram que a atividade metabólica e a viabilidade das cepas são menores na presença dos quelantes, demonstrando que a ausência de íons metálicos interfere no metabolismo e na viabilidade celular do fungo.

Em um estudo conduzido por Winters e colaboradores (2010) utilizando estes mesmos quelantes e avaliando a infecção de macrófagos pelo *Histoplasma*, os autores mostraram que na presença de DTPA e TPEN houve uma diminuição da contagem de células do fungo caracterizando uma diminuição do seu crescimento na ausência de íons metálicos.

Biofilmes representam nichos microbianos envolvidos por uma matriz extracelular que os protegem de muitos agentes antimicrobianos e do ambiente externo (Costerton, et al, 1995, Chandra, et al, 2008). O desenvolvimento do biofilme pode ser influenciado pelas condições ambientais de nutrientes, podendo afetar ou não a arquitetura do biofilme e também a expressão de vários genes envolvidos na sua formação. Estudos do nosso grupo relataram a capacidade do fungo *Histoplasma* de formar biofilme em superfícies abióticas (PITANGUI, et al, 2012) e mostraram que o meio de cultura HAM-F12 permitia melhor crescimento para o fungo devido a composição de vitaminais e sais minerais (GONÇALVES, et al, 2020).

Seguindo as especificações do meio de cultura utilizado, estima-se que os quelantes influenciaram na disponibilidade dos sais inorgânicos presentes no meio de cultura, HAM-F12, principalmente na forma planctônica, o qual as células se encontram dispersas no meio de cultura. Além disso, é possível supor que os quelantes utilizados se ligaram aos íons livres presentes no meio e dificultaram o acesso do fungo a esses micronutrientes. Dentre os compostos presentes no HAM-F12, encontra-se o sulfato férrico, sulfato de zinco, cloridrato de cálcio, magnésio e potássio. A capacidade de formar biofilmes até mesmo em condições adversas pode conferir a espécies de fungos uma vantagem ecológica, auxiliando na sobrevivência como patógenos em humanos e permitindo que escapem de mecanismos imunológicos durante a invasão no hospedeiro. Dentro do hospedeiro, a formação do biofilme permitirá que estes microrganismos resistam a tratamentos fúngicos e colonizem uma área maior no indivíduo (SILVA et al, 2009).

Das abordagens utilizadas para examinar as propriedades de crescimento das cepas e da formação de biofilme, pode-se concluir que o aumento da biomassa não se deve exclusivamente ao número de células viáveis na condição de crescimento avaliada. Calvillo-Medina e colaboradores (2019) afirmam que os três primeiros estágios (adsorção, adesão e formação de microcolônias) são necessários para a formação do biofilme enquanto os últimos estágios

(maturação e dispersão) ocorrem quando os nutrientes da superfície e no meio circundante se esgotam. Estruturas de biofilmes são capazes de se formar sob diferentes condições de concentrações de nutriente, variando de altas até quase não detectáveis. Em ambientes com mais nutrientes, os biofilmes formam-se em grandes quantidades e geralmente são mais espessos. Essas altas concentrações de nutrientes realmente promovem a transição das células microbianas da forma planctônica para o estado de biofilme, ao passo que baixas concentrações ou a exaustão desses nutrientes pode causar o desprendimento das células de superfícies do biofilme (FLEMMING, 2020).

Utilizando desses dados de revisão e dos dados obtidos no trabalho, é possível observar que as condições de adição de ferro e zinco possuíam mais íons, ou seja, mais micronutrientes disponíveis, o que fez com que o biofilme permanecesse dentro das 144 horas por mais tempo nos estágios iniciais, tendo uma estrutura final com mais células fúngicas. Entretanto, as condições com quelantes proporcionaram ambientes com menor quantidade de íons metálicos disponíveis, dificultando os três primeiros estágios da formação do biofilme e permitindo que apenas uma quantidade menor de células aderisse e formasse um aglomerado celular na superfície abiótica.

Uma das características mais importantes dos biofilmes tanto bacterianos quanto fúngicos é a presença da matriz extracelular. É de consenso comum entre diversos trabalhos que a matriz do biofilme atua como uma barreira à difusão de agentes antimicrobianos, limitando assim o acesso dos antimicrobianos aos organismos na base do biofilme (SILVA, et al, 2009). Pensando em nível molecular, a composição do biofilme é variavelmente dependente do organismo que o envolve, o estágio de maturação, as condições do microambiente. A maioria dos biofilmes são constituídos de aproximadamente 50% a 90% de matriz extracelular (EPS), a qual é composta principalmente de água, sendo em torno de 97% e elementos moleculares que conferem as propriedades estruturais e funcionais da EPS sendo 3% (GUZMÁN-SOTO, et

al, 2021). As propriedades físicas dos exopolissacarídeos são grandemente influenciadas pelo conteúdo iônico da fase aquosa em torno das células e pelas moléculas de água. A maioria dos EPS em solução sofre mudança de ordem para desordem com o aquecimento ou com a remoção de íons. Essas mudanças podem ser refletidas pelo aumento da solubilidade e eventualmente a dissolução ou a descamação do biofilme. Em biofilmes maduros, diferenças na disponibilidade de nutrientes e no gradiente iônico são prováveis de ocorrer, o que afetará a solubilidade da EPS. Além disso, metabólitos secundários como agentes quelantes, enzimas produzidas que são produzidos pelas células resistentes, também afetam as propriedades físicas da matriz extracelular do biofilme (FLEMMING, 2020). Os resultados do trabalho mostraram que na presença dos quelantes, as cepas apresentaram uma leve diminuição da produção de matriz extracelular e na presença dos íons, só a cepa G186A apresentou maior produção de MEC em alguns períodos da cinética do biofilme. De fato, o conteúdo iônico alterou a produção de matriz extracelular, mas de maneira geral as alterações não foram persistentes. Esses resultados podem ser explicados pela presença de outros compostos iônicos e não iônicos no meio que impediram que a alteração pelos íons ou pelos quelantes fossem maiores.

4.3.1. Microscopia Confocal (CLSM) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A habilidade de *H. capsulatum* formar biofilmes *in vitro* foi avaliada usando a Microscopia Confocal (CLSM) e a Microscopia de Eletrônica de Varredura (MEV). Análises microscópicas permitem visualizar a morfologia do biofilme e a aparência de matriz extracelular durante a formação do biofilme dos microrganismos e apesar dos riscos de degradação das amostras as análises foram úteis para observar a dimensão dos biofilmes formados nas diferentes condições. Os biofilmes das cepas do fungo *Histoplasma* foram formados seguindo as mesmas condições propostas inicialmente, sendo o cultivo do fungo em HAM-F12 considerado como grupo Controle, HAM-F12 + 20 µM Zinco, HAM-F12 + 10 µM TPEN, HAM-F12 + 20 µM Ferro e HAM-F12 + 20 µM DTPA.

Nas figuras 7 e 8 são apresentados os resultados da MEV nos tempos de 24 (biofilme inicial) (A, B, C) e 144 h (biofilme maduro) (D, E, F) da cepa G186A separados na figura 7 em HAM-F12 (Controle), HAM-F12 + 20 μ M Zinco e HAM-F12 + 10 μ M TPEN e na figura 8, HAM-F12, HAM-F12 + 20 μ M Ferro e HAM-F12 + 20 μ M DTPA. Nas figuras 9, 10, 11 e 12 são apresentadas as imagens de microscopia Confocal em vista do corte ortogonal e distribuição tridimensional dos biofilmes da cepa G186A. Nas figuras 9 e 10 são mostrados os biofilmes iniciais (24 h) enquanto que nas figuras 11 e 12 são mostrados os biofilmes maduros (144 h) ambos nas condições já descritas anteriormente.

Observando as imagens de MEV para a cepa G186A, notamos que nas condições Controle (Fig. 7A), HAM-F12 com zinco (Fig. 7B) e HAM-F12 com ferro (Fig. 8B), a cepa apresentou células aparentemente viáveis e com a morfologia de levedura enquanto no meio adicionado de TPEN (Fig. 7C) a imagem demonstrou apenas uma estrutura celular não definida e no meio com DTPA (Fig. 8C) há células ovais em menor quantidade e menores. Após as 144 h, foram formados biofilmes maduros nas condições de Controle (Fig. 7D), HAM-F12 com zinco (Fig. 7E) e HAM-F12 com ferro (Fig. 8E), sendo que o biofilme com ferro houve a presença de hifas. Na presença do TPEN (Fig. 7F), houve aumento das células, mas não houve formação de biofilmes, sendo que as células se apresentaram dispersas, pequenas e ovaladas. Com o DTPA (Fig. 8F), observamos a formação do aglomerado celular de células pequenas e ovaladas.

As imagens de CLSM para a cepa G186A, corroboram com as imagens de MEV, mostrando menor quantidade de células dentro de 24 horas para as condições com os quelantes (Fig 9C, 9E, 10C, 10E) enquanto que nas condições Controle (Fig. 9A, 9D, 10A e 10D), meio com zinco e meio (Fig. 9B, 9E) com ferro (Fig. 10B, 10E) já são visualizadas pequenas quantidades de células fúngicas aglomeradas. Vale ressaltar que dentro de 24 horas, no meio com TPEN, com DTPA e com ferro há a presença de hifas. Depois das 144 h, observamos um denso biofilme com espessura de 200 μ M formado nas condições Controle (Fig. 11A, 11D, 12A, 12D) meio

com zinco (Fig. 11B, 11E) e meio com ferro (Fig. 12B, 12E), sendo que as hifas aparecem apenas no biofilme com ferro. Com o TPEN (Fig. 11C, 11F) não houve um aumento de células e ainda permaneceu hifas nessas condições, enquanto que o DTPA (Fig. 12C, 12F) houve o aumento das células, mas não houve mais a formação de hifas.

Figura 7: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos biofilmes iniciais (24 h) e biofilmes maduros (144 h) nas condições HAM-F12 (controle), HAM-F12 adicionado de zinco e HAM-F12 com TPEN da cepa G186A de *H. capsulatum*.

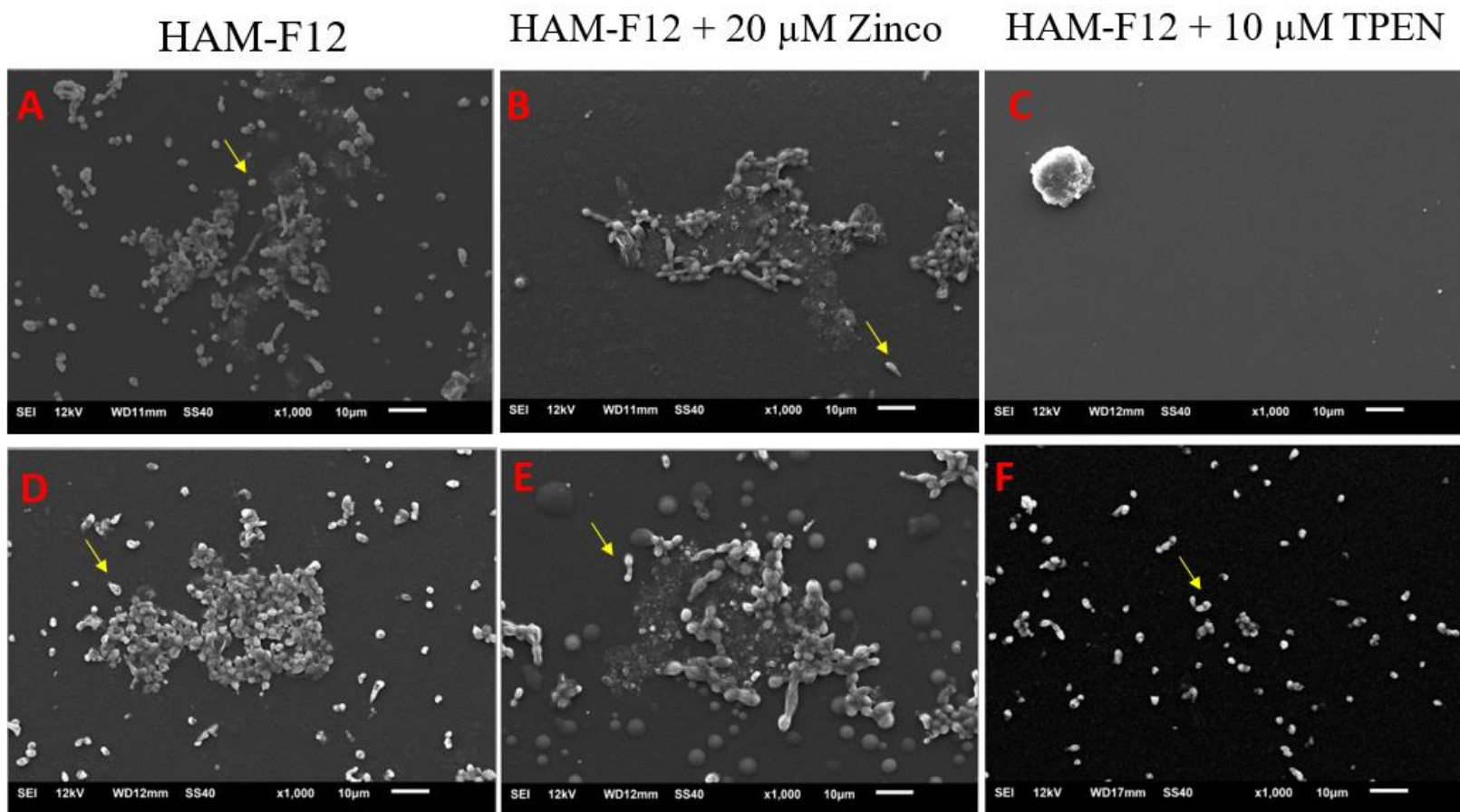


Figura 8: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos biofilmes iniciais (24 h) e biofilmes maduros (144 h) nas condições HAM-F12 (controle), HAM-F12 adicionado de ferro e HAM-F12 com DTPA da cepa G186A de *H. capsulatum*.

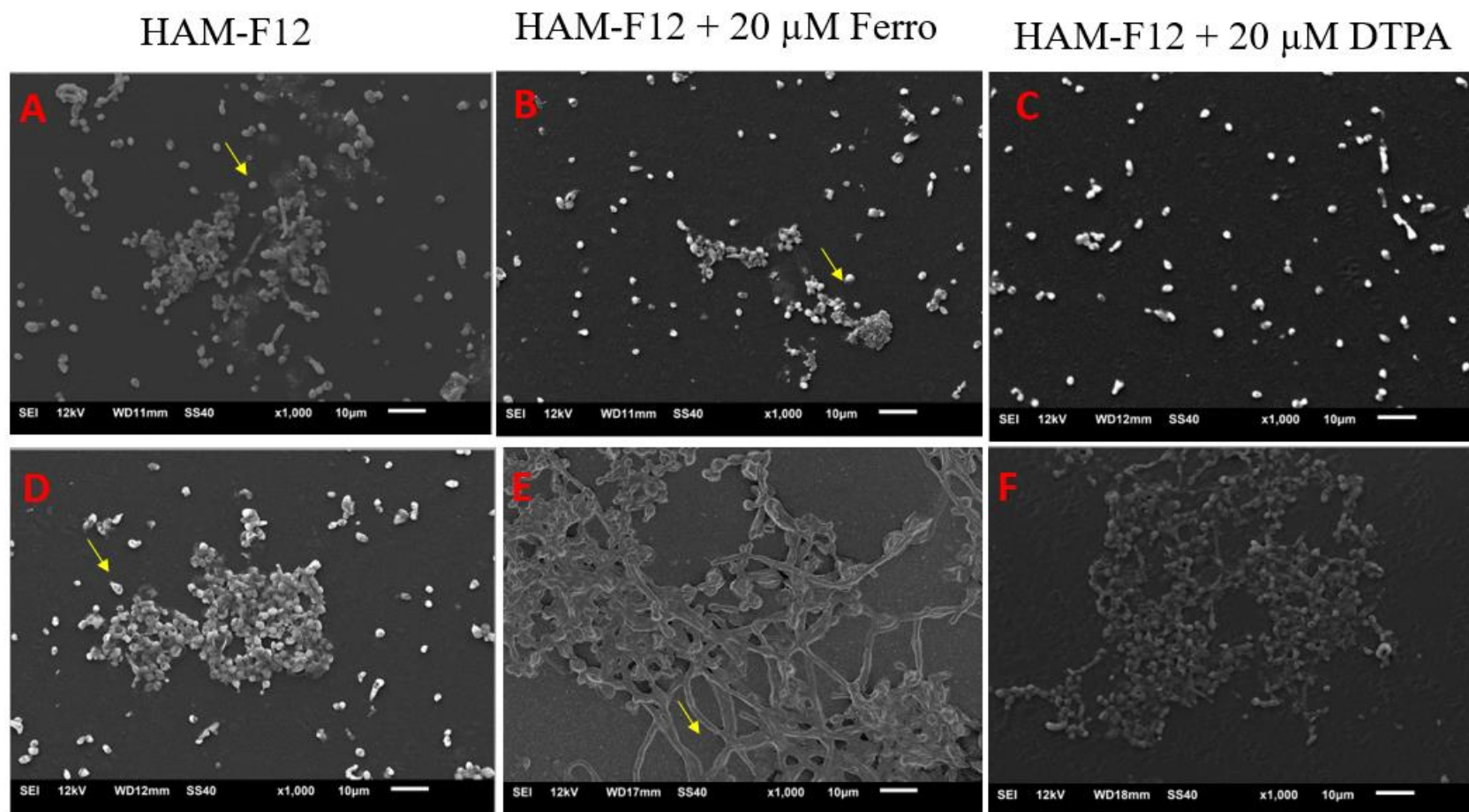


Figura 9: Imagens obtidas por microscopia Confocal em vista do corte ortogonal (A, B, C) e distribuição tridimensional (D, E, F) dos biofilmes iniciais (24 h) da cepa G186A de *H. capsulatum* no meio HAM-F12 com zinco (B, E) e HAM-F12 com TPEN (C, F) comparadas com o crescimento apenas em meio HAM-F12 (Controle, A, D).

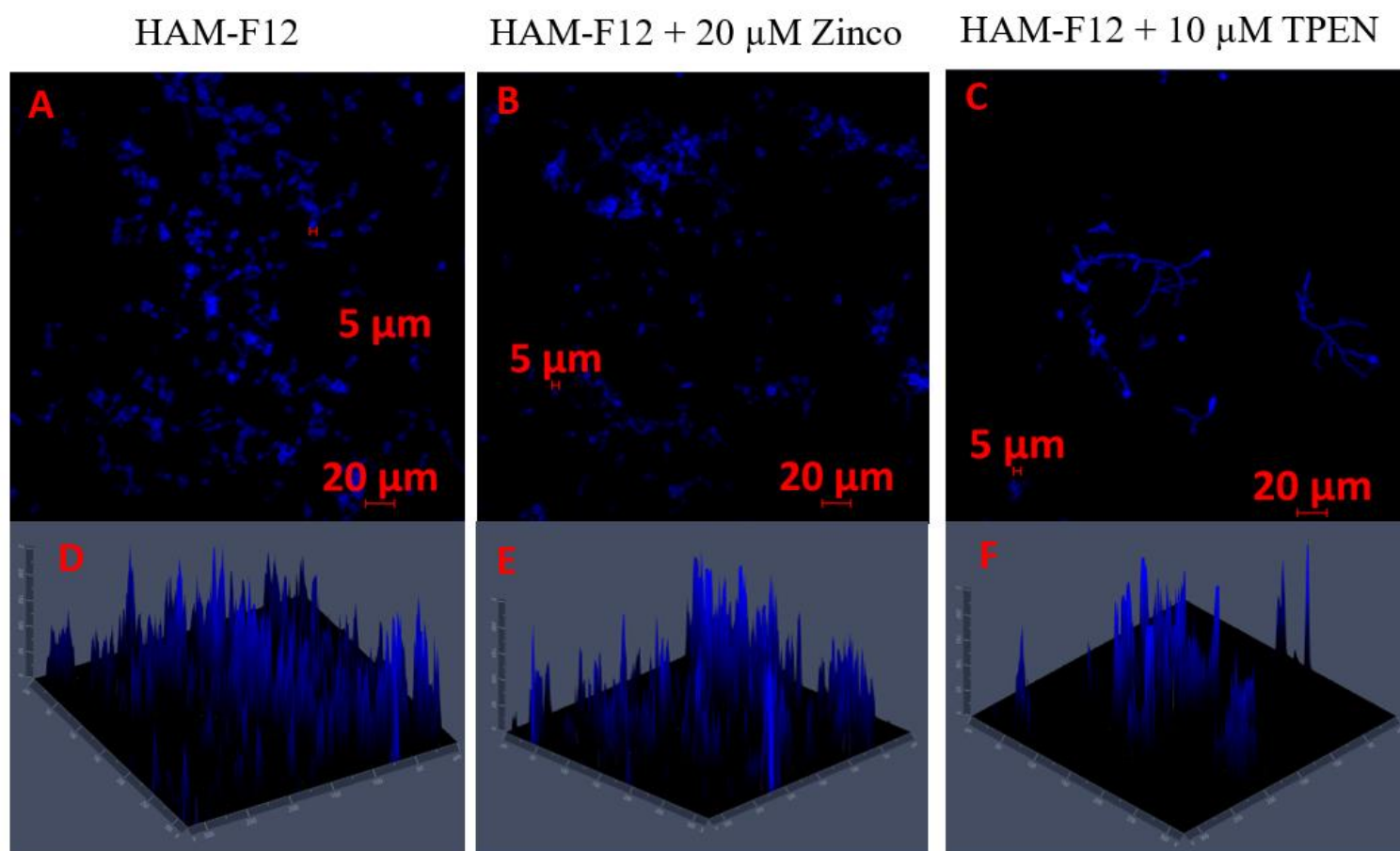


Figura 10: Imagens obtidas por microscopia Confocal em vista do corte ortogonal (A, B, C) e distribuição tridimensional (D, E, F) dos biofilmes iniciais (24 h) da cepa G186A de *H. capsulatum* no meio HAM-F12 com ferro (B, E) e HAM-F12 com DTPA (C, F) comparadas com o crescimento apenas em meio HAM-F12 (Controle, A, D).

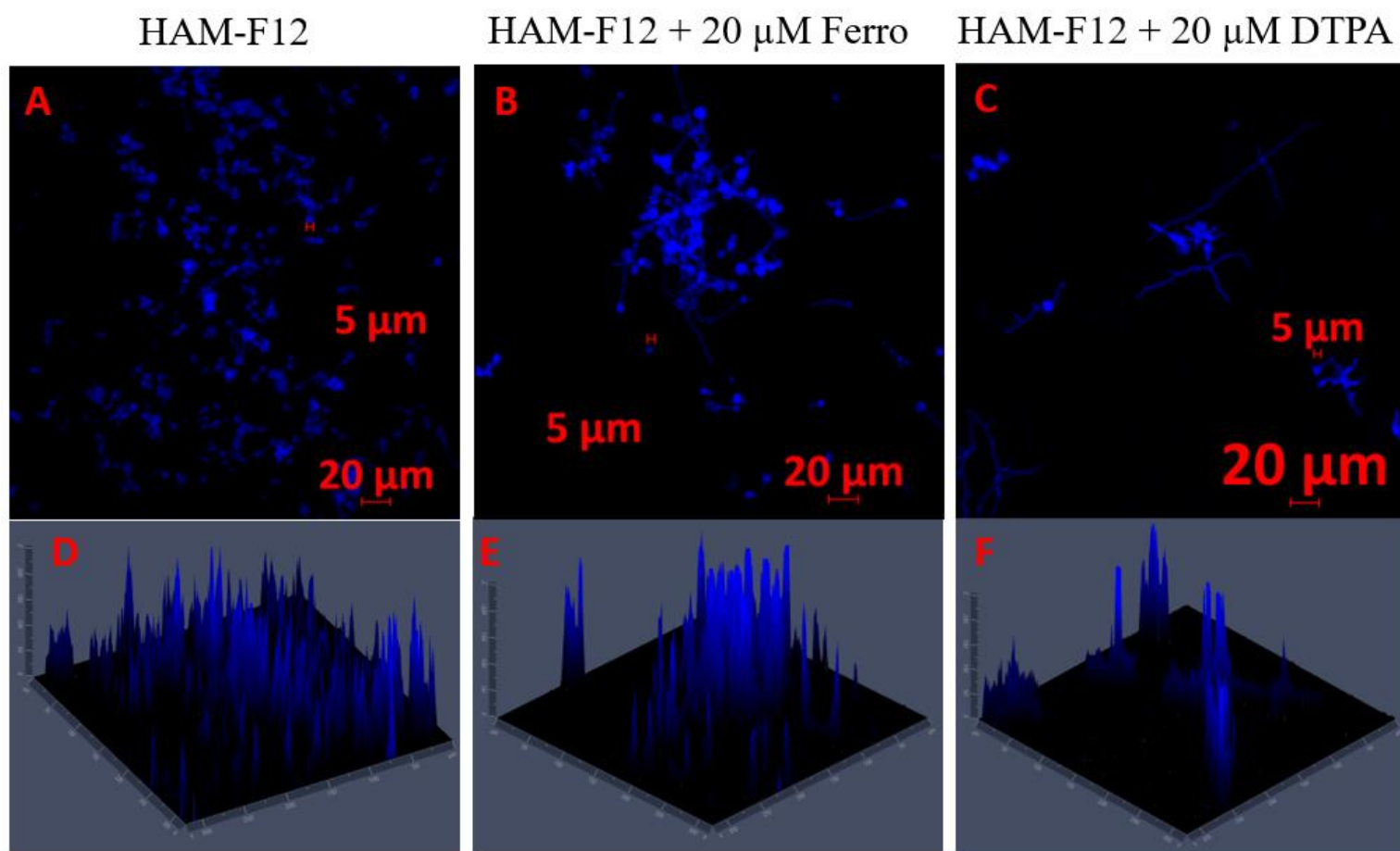


Figura 11: Imagens obtidas por microscopia Confocal em vista do corte ortogonal (A, B, C) e distribuição tridimensional (D, E, F) dos biofilmes maduros (144 h) da cepa G186A de *H. capsulatum* no meio HAM-F12 com zinco (B, E) e HAM-F12 com TPEN (C, F) comparadas com o crescimento apenas em meio HAM-F12 (Controle, A, D).

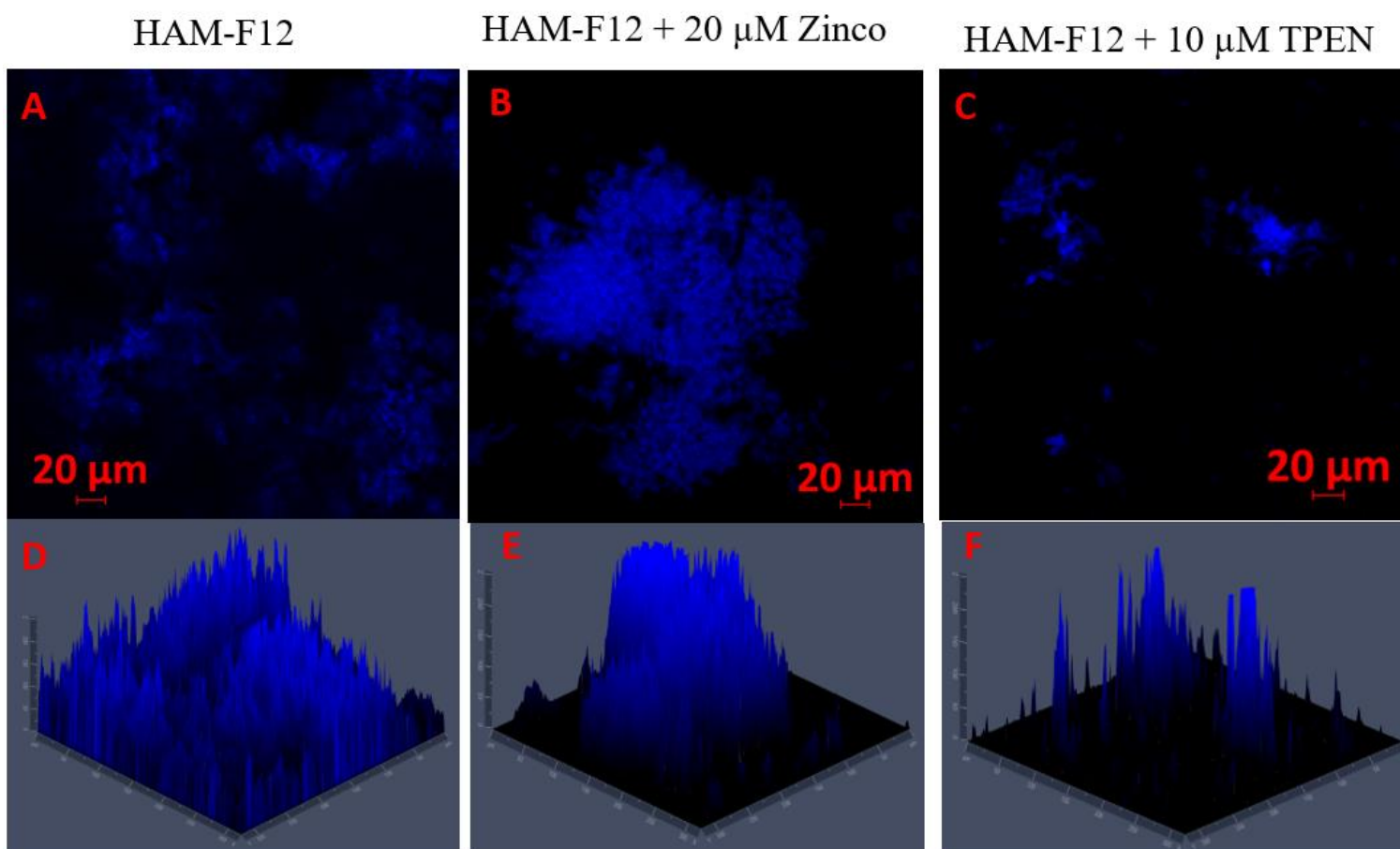
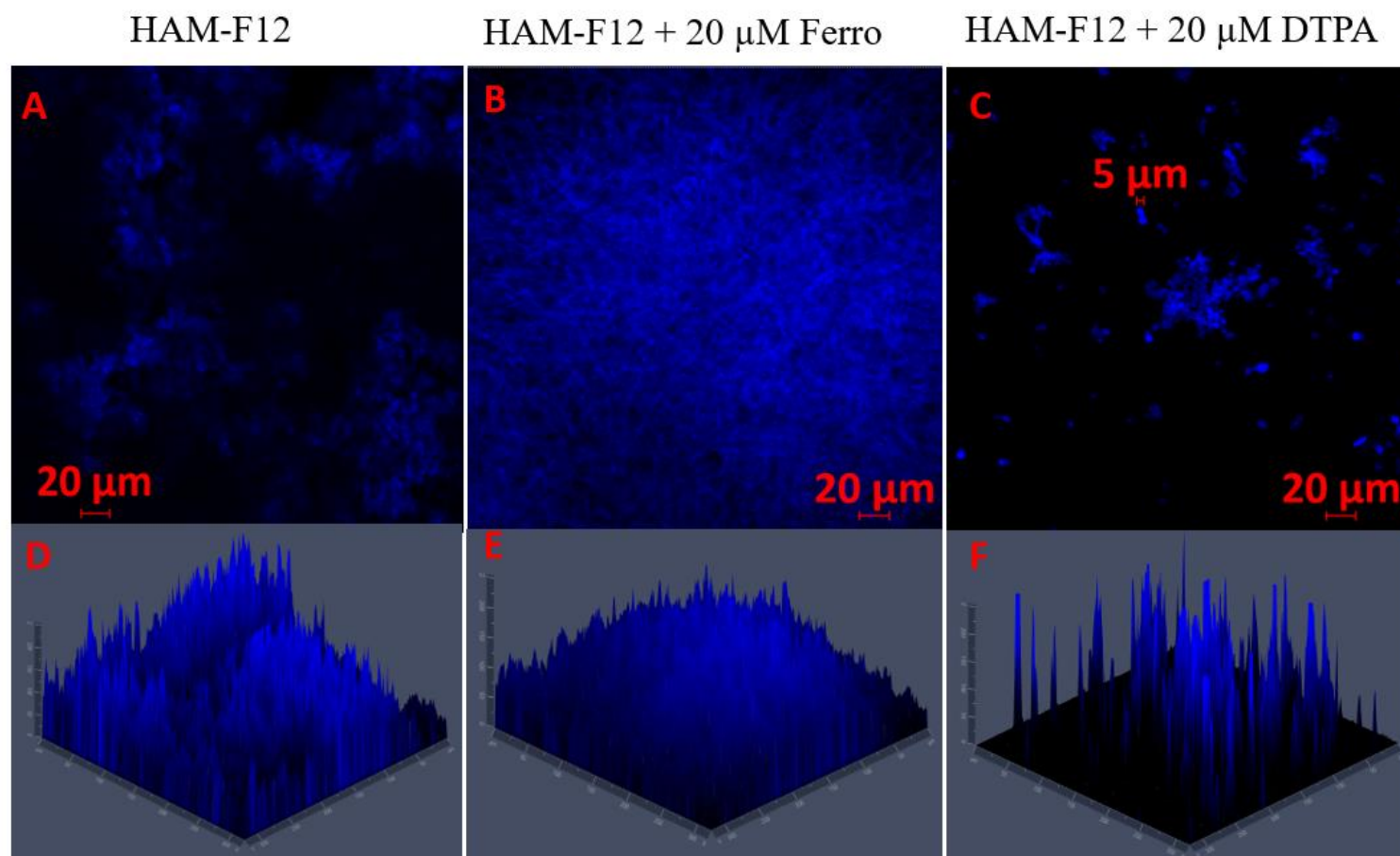


Figura 12: Imagens obtidas por microscopia Confocal em vista do corte ortogonal (A, B, C) e distribuição tridimensional (D, E, F) dos biofilmes maduros (144 h) da cepa G186A de *H. capsulatum* no meio HAM-F12 com ferro (B, E) e HAM-F12 com DTPA (C, F) comparadas com o crescimento apenas em meio HAM-F12 (Controle, A, D).



Nas figuras 13 e 14 são apresentados os resultados da MEV dos biofilmes iniciais (24h) (A, B, C) e biofilmes maduros (144 h) (D, E, F) da cepa EH-315, respectivamente. Na figura 13 são mostradas as condições HAM-F12 (Controle), HAM-F12 + 20 μ M Zinco e HAM-F12 + 10 μ M TPEN e na figura 14, HAM-F12, HAM-F12 + 20 μ M Ferro e HAM-F12 + 20 μ M DTPA.

No tempo de 24 h, observamos a formação de aglomerados celulares nas condições Controle (Fig. 13A), HAM-F12 com zinco (Fig. 13B), HAM-F12 com ferro (Fig. 14B) e HAM-F12 com DTPA (Fig. 14C), sendo que na presença do zinco houve a formação de um aglomerado só de hifas e na presença do ferro as células apresentam uma morfologia mais comprida e menos leveduriforme. Nas demais condições, os aglomerados são compostos de células ovaladas. Com o TPEN (Fig. 13C), as células apresentam-se ovaladas, mas em pequena quantidade. Após 144 h, observamos um biofilme maior na condição controle (Fig. 13D), em HAM-F12 com ferro (Fig. 14E), e em HAM-F12 com DTPA (Fig. 14F). Nas condições Controle e com DTPA, os biofilmes são compostos de células leveduriformes e hifas, enquanto que com o ferro o biofilme é composto totalmente de hifas. Com o TPEN (Fig. 13F), observamos células com uma morfologia comprometida e com o zinco (Fig. 13E) observamos um pequeno aglomerado celular com células leveduriformes.

Os resultados da CLSM são apresentados nas figuras 15, 16, 17 e 18. Nas figuras 15 e 16 são apresentados os resultados dos biofilmes formados em 24 h da cepa EH-315 e nas figuras 17 e 18 dos biofilmes maduros (144 h), nas mesmas condições já descritas anteriormente.

Observa-se que em 24 horas, as condições Controle (Fig. 15A, 15D, 16A, 16D), HAM-F12 com zinco (Fig. 15B e 15E) e HAM-F12 com ferro (Fig. 16B, 16E) já contem grande número de células com pequenos aglomerados celulares. Além disso, todas essas condições mostraram a presença de hifas e a presença do ferro mostrou um biofilme já com espessura de 200 μ M

(Fig. 16E). Com os quelantes, ambas as imagens mostram uma quantidade menor de células, mas ambas também estimularam a presença de hifas (Fig. 15C, 15F, 16C, 16F). Após as 144 h, os biofilmes na condição Controle (Fig. 17A, 17D, 18A, 18D), meio com zinco (Fig. 17B, 17E) e meio com ferro (Fig. 18B, 18E) mostraram-se densos e com espessuras acima de 200 μM , sendo que o biofilme maduro no meio com ferro foi composto apenas de hifas, como visto na MEV. Com o TPEN (Fig. 17C, 17F) houve a presença de poucas células, sem formação de biofilme e com pequenas hifas. Na presença do DTPA (Fig. 18C, 18F) houve a formação de um biofilme pequeno formado de hifas.

Figura 13: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos biofilmes iniciais (24 h) e biofilmes maduros (144 h) nas condições HAM-F12 (controle), HAM-F12 adicionado de zinco e HAM-F12 com TPEN da cepa EH-315 de *H. capsulatum*.

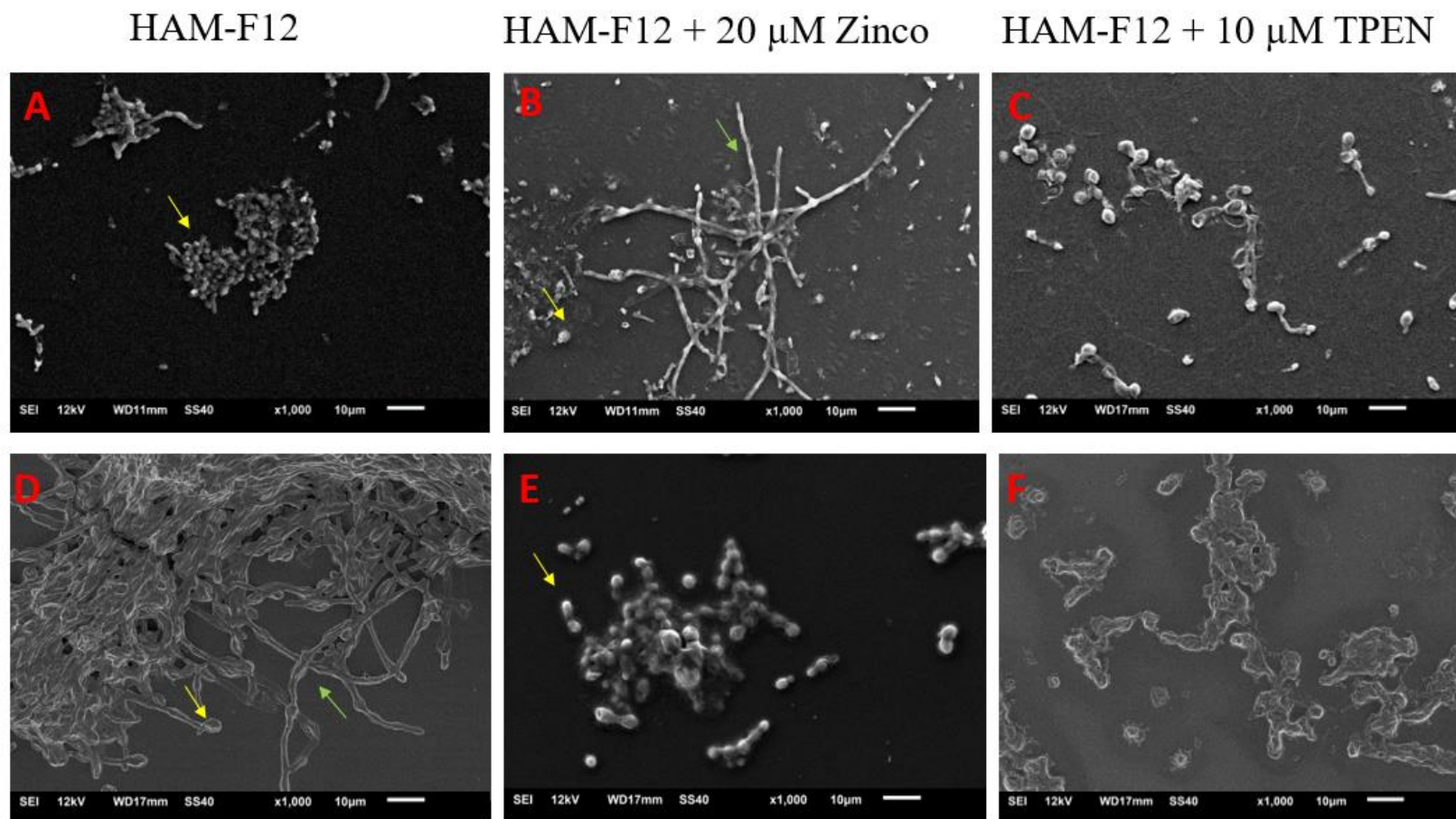


Figura 14: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos biofilmes iniciais (24 h) e biofilmes maduros (144 h) nas condições HAM-F12 (controle), HAM-F12 adicionado de ferro e HAM-F12 com DTPA da cepa EH-315 de *H. capsulatum*.

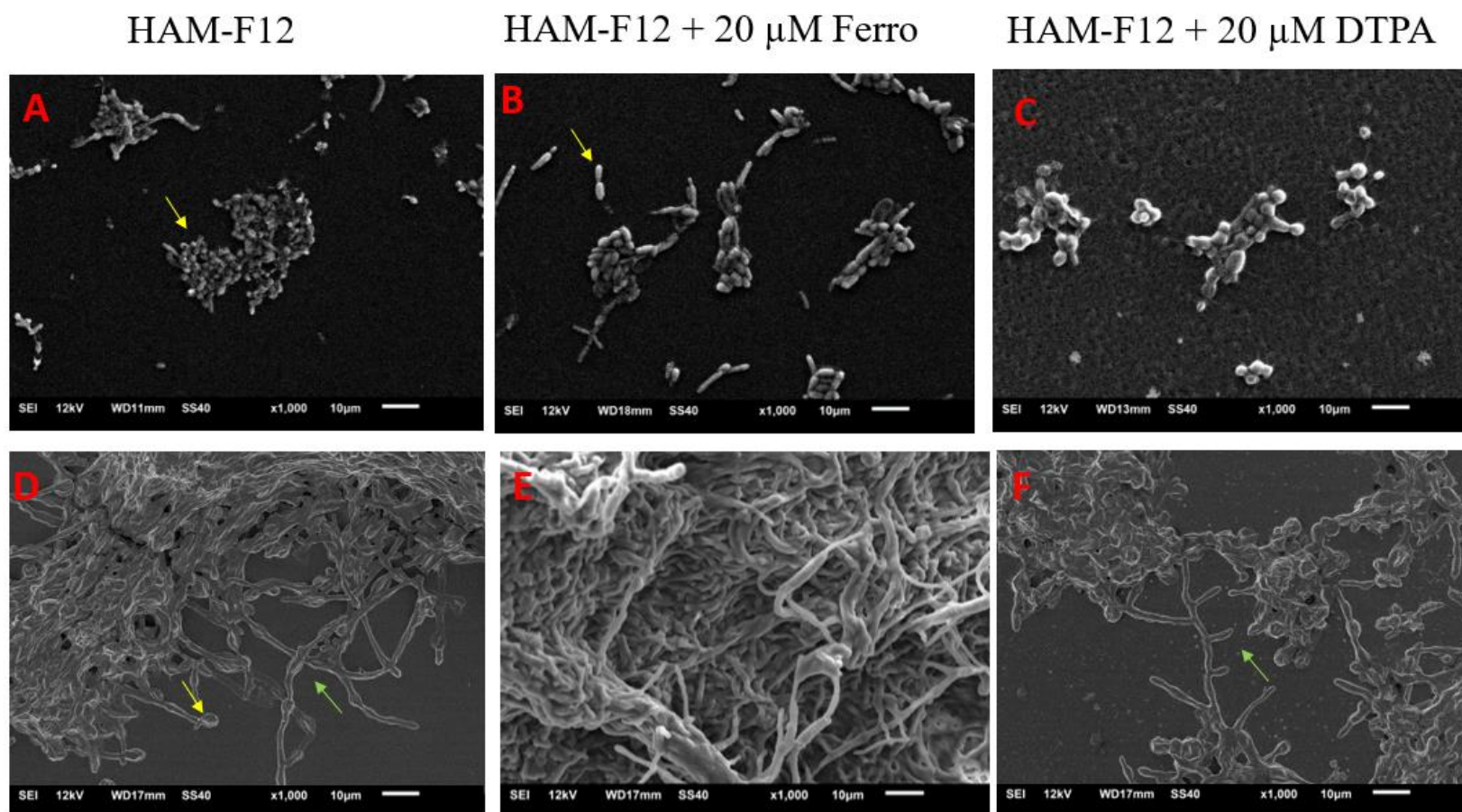


Figura 15: Imagens obtidas por microscopia Confocal em vista do corte ortogonal (A, B, C) e distribuição tridimensional (D, E, F) dos biofilmes iniciais (24 h) da cepa EH-315 de *H. capsulatum* no meio HAM-F12 com zinco (B, E) e HAM-F12 com TPEN (C, F) comparadas com o crescimento apenas em meio HAM-F12 (Controle, A, D).

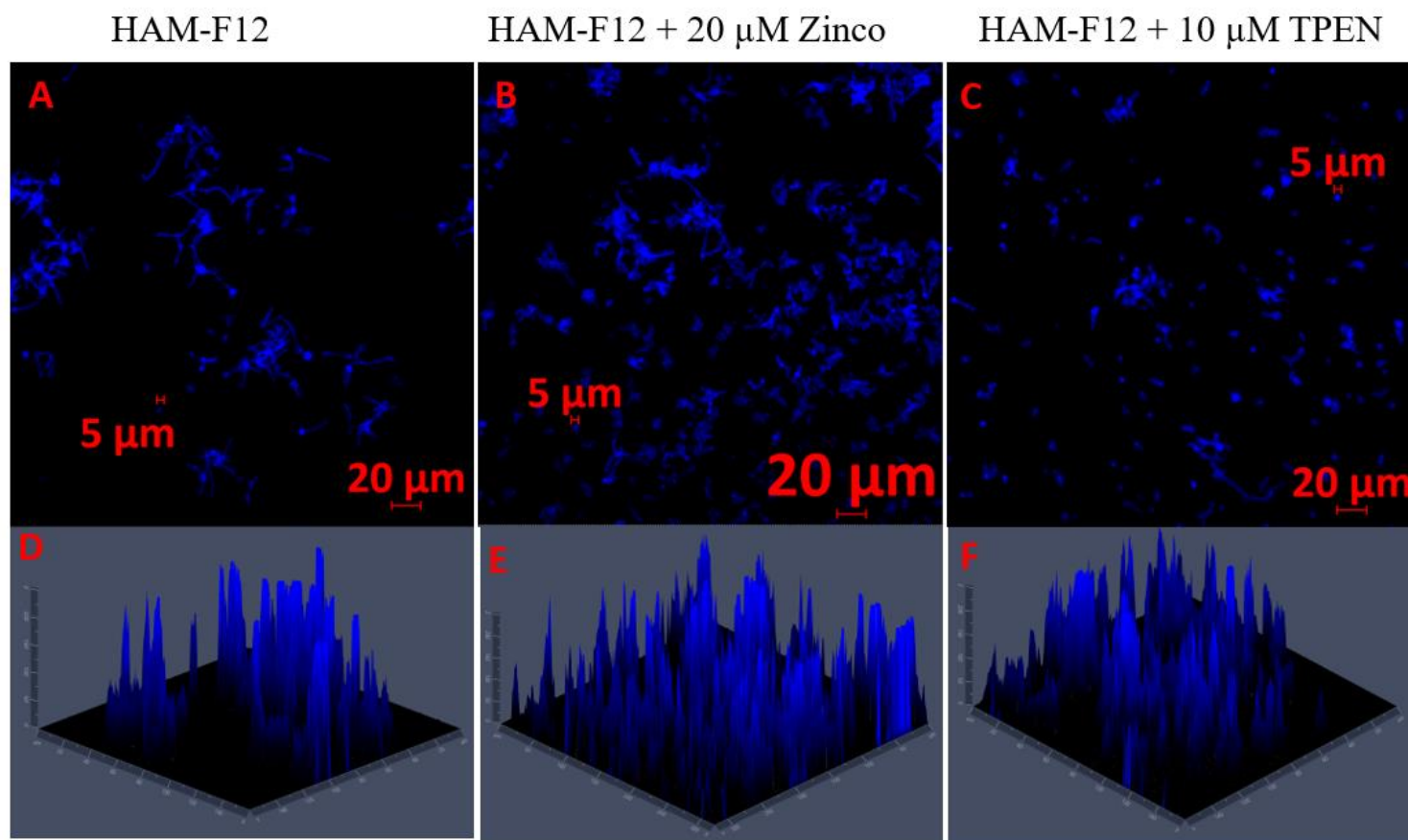


Figura 16: Imagens obtidas por microscopia Confocal em vista do corte ortogonal (A, B, C) e distribuição tridimensional (D, E, F) dos biofilmes iniciais (24 h) da cepa EH-315 de *H. capsulatum* no meio HAM-F12 com ferro (B, E) e HAM-F12 com DTPA (C, F) comparadas com o crescimento apenas em meio HAM-F12 (Controle, A, D).

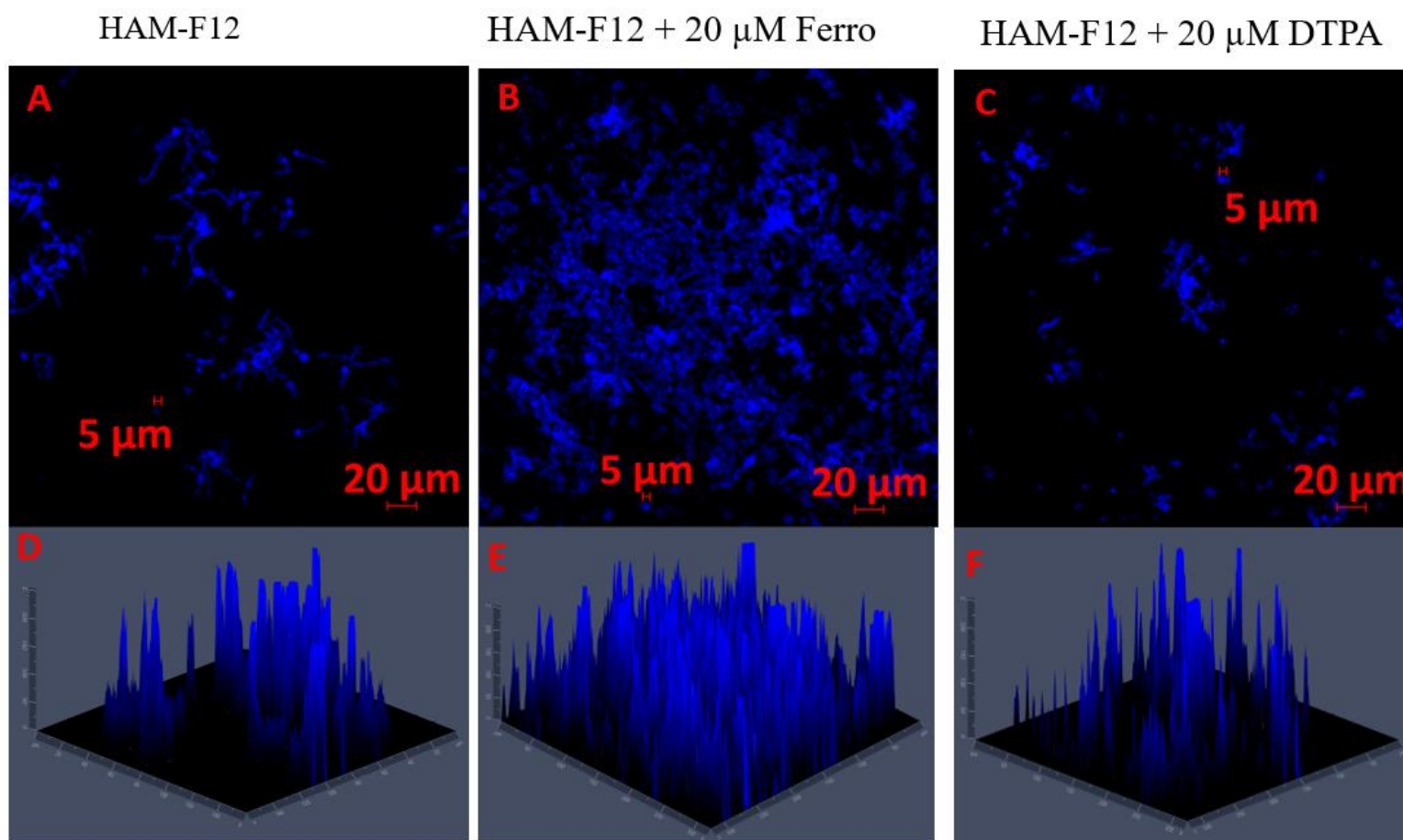


Figura 17: Imagens obtidas por microscopia Confocal em vista do corte ortogonal (A, B, C) e distribuição tridimensional (D, E, F) dos biofilmes maduros (144 h) da cepa EH-315 de *H. capsulatum* no meio HAM-F12 com zinco (B, E) e HAM-F12 com TPEN (C, F) comparadas com o crescimento apenas em meio HAM-F12 (Controle, A, D).

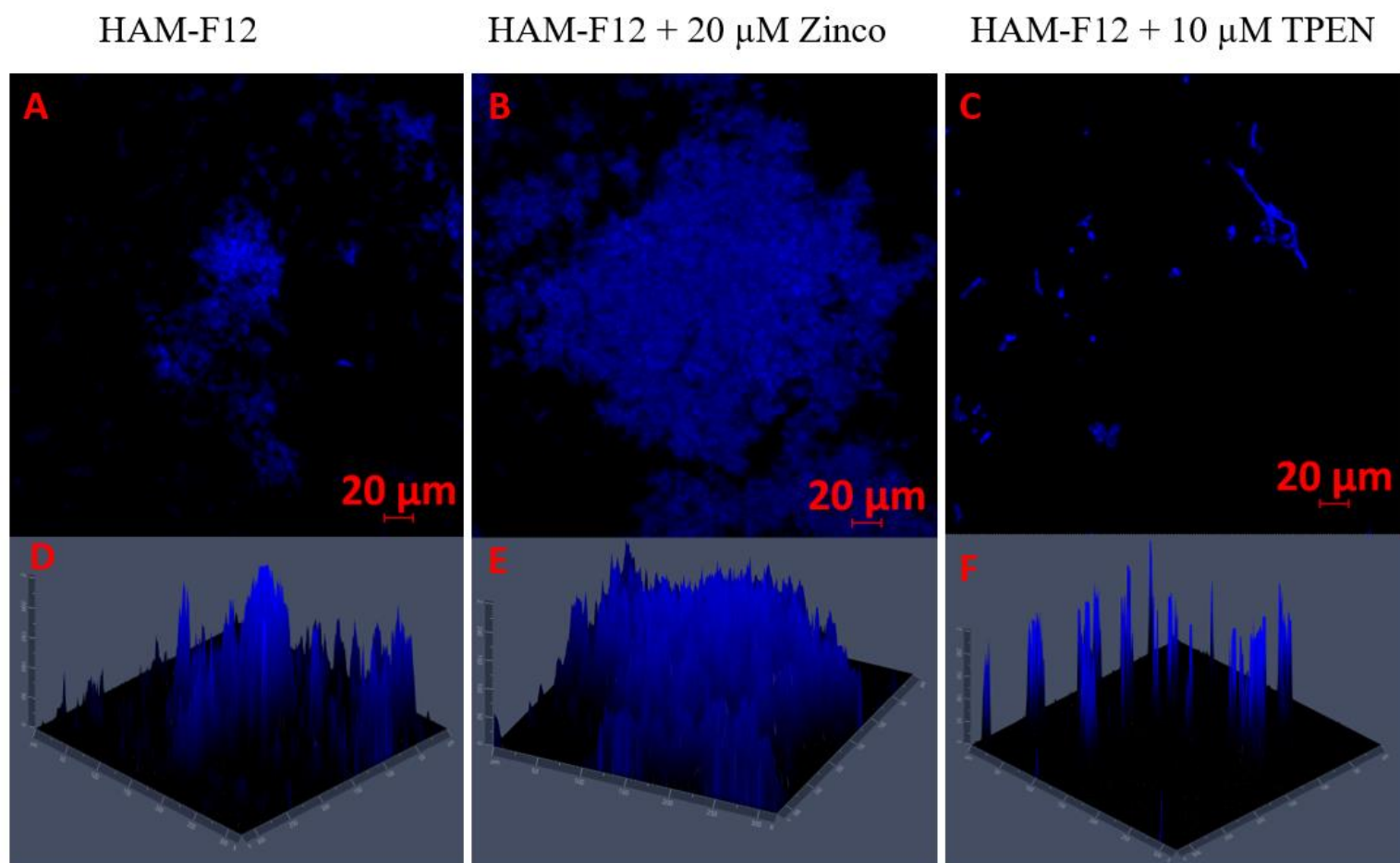
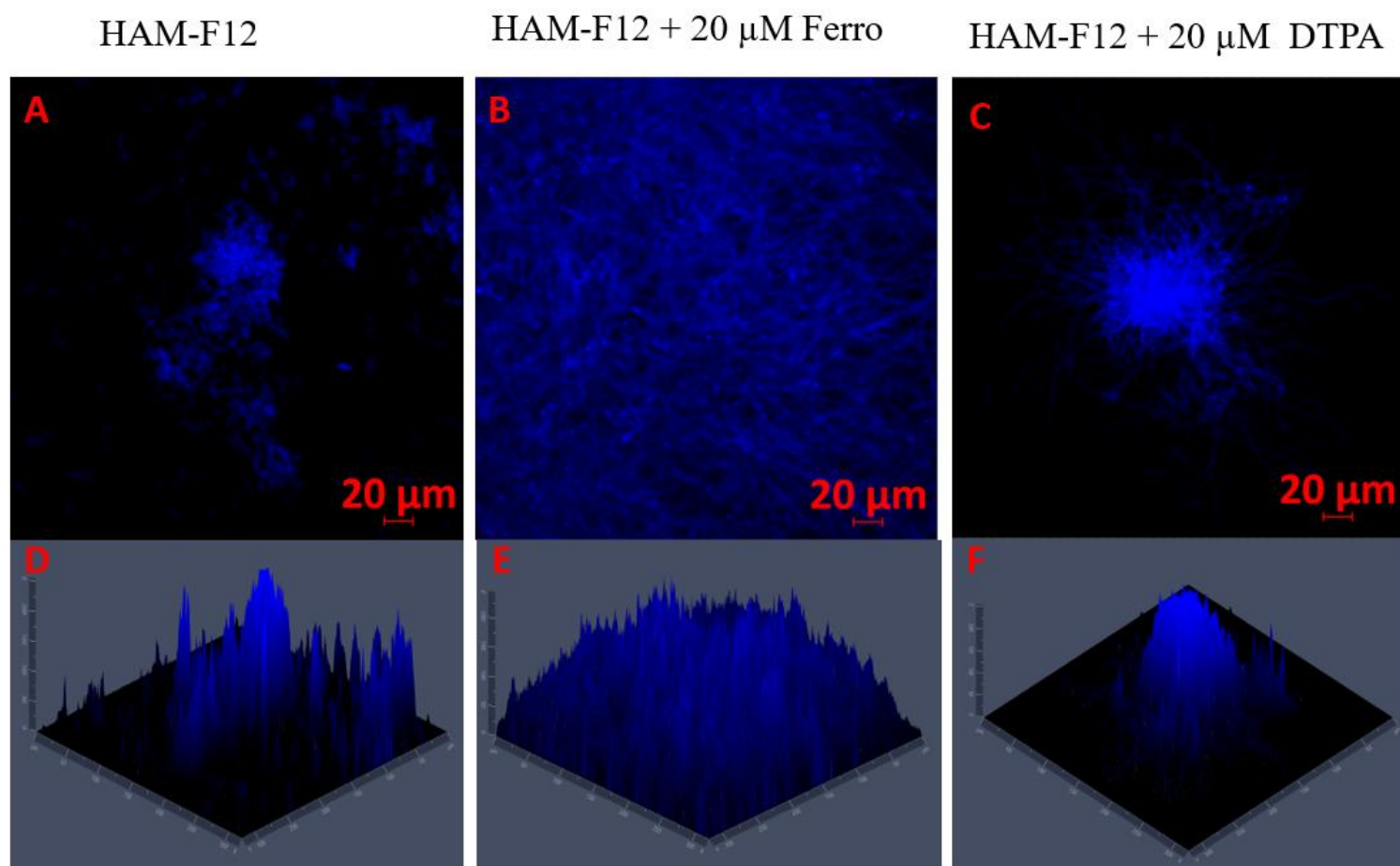


Figura 18: Imagens obtidas por microscopia Confocal em vista do corte ortogonal (A, B, C) e distribuição tridimensional (D, E, F) dos biofilmes maduros (144 h) da cepa EH-315 de *H. capsulatum* no meio HAM-F12 com ferro (B, E) e HAM-F12 com DTPA (C, F) comparadas com o crescimento apenas em meio HAM-F12 (Controle, A, D).



Em síntese, afirmamos que a presença dos íons metálicos influenciou a formação de biofilmes mais densos para ambas as cepas, enquanto a presença dos quelantes não inibiu por completo o crescimento das cepas, mas as impediu de formar biofilmes mais espessos e com maior número de células, principalmente o quelante TPEN. Além disso, observamos a modificação morfológica que ocorreu com o fungo durante a formação dos biofilmes em todas as condições.

Transições morfológicas são o maior aspecto da capacidade do *Histoplasma* para causar doenças. No ambiente o fungo encontra-se em micélios e conídios e só quando adentram no hospedeiro é que sofrem a mudança para levedura devido a alteração da temperatura ambiente para temperatura corporal (37°C) (SHEN e RAPPLEYE, 2017). Esse dimorfismo de *H. capsulatum* representa sua diferenciação funcional, sendo que a forma de hifa é adequada para penetrar e colonizar ambientes como solos, melhorar a absorção de nutrientes e produzir conidióforos para a formação e liberação de conídios, enquanto que a forma de levedura é menor e mais compatível para a habitação dos compartimentos dos fagossomos e apresenta maior quantidade de fatores de virulência (VALDEZ, et al, 2022). A diferenciação em leveduras representa uma programação do fungo para infectar as células do hospedeiro e sobreviver em seus interiores por mais tempo, sendo considerada como um mecanismo alternativo de viver ao contrário de sua forma natural em micélio no meio ambiente (SHEN e RAPPLEYE, 2017).

A forma miceliar é a forma mais comum de encontrar o fungo no ambiente e, portanto, é inevitável que ocorra a transição morfológica da levedura para o micélio já que o fungo não se encontra em uma célula do hospedeiro. Além disso, é comum que laboratorialmente o *Histoplasma*, seja mantido na forma de levedura, mas utilizando meios suplementados com cisteína e glicose em temperaturas controladas de 37°C. As suplementações do meio tem por objetivo a regulação morfológica do fungo, mantendo as vias respiratórias mitocondriais ativadas. As vias de respiração dos micélios operam a 25°C e tem sua atividade diminuída a

partir do primeiro estágio de transição morfológica para leveduras. Uma vez que a temperatura sobe para 37°C, os micélios diminuem sua atividade metabólica e só mudam sua respiração mitocondrial quando são reativados por compostos como a cisteína (MARESCA, et al, 1981).

A relação de íons metálicos e o dimorfismo de *Histoplasma spp.* ainda não foram elucidados. Mas com os resultados obtidos no trabalho, podemos sugerir que a transição morfológica das cepas está relacionada com a captura de nutrientes no meio e sua atividade metabólica mitocondrial. Com a maior disponibilidade de ferro no meio HAM-F12, ambas as cepas apresentaram picos de atividade mitocondrial demonstrados com o ensaio de XTT e ao mesmo tempo apresentaram hifas nas microscopias, indicando uma maior ativação das vias metabólicas dos micélios. Com o zinco, a cepa G186A apresentou maior atividade mitocondrial, mas não alteração morfológica para hifas, enquanto que a cepa EH-315 não teve maior atividade mitocondrial e apresentou hifas em 24 horas na presença de zinco, mas ao longo das 144 horas também não permaneceram, tendo a sua morfologia alterada para levedura. Isso indica que o zinco pode não estar relacionado com a respiração dos micélios, mas sim das leveduras.

Com os quelantes, observa-se a diminuição da atividade mitocondrial das cepas, além de pequenas hifas em 24 horas para a cepa G186A e hifas após 144 horas para a cepa EH-315. Nesse caso, podemos supor que a falta dos íons metálicos inibiu a respiração metabólica da cepa G186A após as 24 horas de cultivo e, portanto, não houve mais a formação de micélios e apenas poucas leveduras. Já para a cepa EH-315, a atividade respiratória miceliar pode ter se iniciado após um cultivo mais longo, após as 144 horas. As diferenças entre as cepas podem acontecer, visto que existem cepas com diferentes sensibilidades à temperatura, além do envolvimento de outros mecanismos genéticos na transição morfológica (BEYHAN e SIL, 2019).

Alguns trabalhos mostraram a relação de íons metálicos com a transição morfológica de algumas espécies de fungos, como Harrison e colaboradores (2007) que realizaram um estudo com espécies de *Candida* spp, e observaram que a arquitetura multicelular de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* antes e depois da exposição a íons metálicos podia ser alterada. Muitos compostos metálicos testados funcionaram como pistas ambientais com potencial para bloquear ou desencadear uma mudança de células de levedura para hifas. Um desses compostos foi o zinco, o qual observou que para *C. tropicalis* quando exposta a esse íon metálico, desencadeou a transição para o morfotipo celular de hifa, enquanto que para *C. albicans* houve a formação de leveduras, assim como para as cepas do *Histoplasma* testados no trabalho atual.

Em um estudo realizado por Kurakado e colaboradores (2020) o quelante de cátion TPEN inibiu a formação de biofilme e o alongamento de hifas de *Trichosporon asahii*. O zinco desencadeou a elongação das hifas e a formação do biofilme. Neste estudo também foi possível observar a transição morfológica para a fase miceliar em resposta ao quelante TPEN ou ao zinco em células planctônicas. A formação de hifas ou a conidiação é uma forma de sobrevivência encontrada por alguns fungos (CALVILLO-MEDINA, et al, 2019).

Shafeeq e colaboradores (2019) testaram o impacto de diferentes íons metálicos na transição na formação de biofilme de isolados de *C. parapsilosis* com diferentes capacidades de formação de biofilme a 30° e a 37°C e relataram que as cepas com deleção de gene formador de biofilme (BCR1) na presença de 2mM de Mn^{2+} formaram biofilme da mesma forma que as cepas sem nenhum tipo de deleção e foi observado o aumento do desenvolvimento de pseudo-hifas no biofilme de *C. parapsilosis*.

Com o ferro, um estudo conduzido por Chakraborty e colaboradores (2020) mostraram que as principais vias envolvidas na homeostase do ferro em *C. albicans* incluem redutases férricas de superfícies, oxidases multicobre e permeases de ferro de alta afinidade. Um mutante de *C.*

albicans com deleção em FET4 mostrou leve defeito de crescimento sob condições de limitação de ferro e uma redução na formação de hifas, sendo um fenótipo hipovirulento. Este estudo indica que o ferro pode estar envolvido na formação das hifas, assim como o trabalho demonstrou a influência deste íon no crescimento das hifas de *Histoplasma spp.*

Franco e colaboradores (2004) mostraram que a quitina, componente da parede fúngica, tem a capacidade de quelar o ferro, sequestrando este micronutriente do meio. A absorção de ferro pelos fungos é ativa e depende do metabolismo das células viáveis. A capacidade do fungo de adquirir e acumular o ferro em sua biomassa permitirá que sobrevivam em condições limitantes de ferro. Uma das estratégias de destaque é o aumento da solubilização do mineral via acidificação do ambiente próximo à sua rede micelial para incorpora-lo em suas estruturas. (COMENSOLI, et al, 2017). Como observamos, meios com excesso de ferro, o fungo incorporou o mineral na sua estrutura e formou uma rede de micélios densa, principalmente a EH-315. Na ausência do metal com os quelantes, foram formadas hifas na tentativa de incorporar maior quantidade do mineral e sobreviver.

Estudos conduzidos por Polvi e colaboradores (2016) avaliaram se o DTPA afetava as características de virulência de *C. albicans*. Os resultados mostraram que o DTPA induziu a filamentação das células de *C. albicans*, mesmo na temperatura de 30°C, não sendo necessário atingir a temperatura de 37°C para a mudança morfológica, assim como outros fatores de transição precisam. Além disso, o estudo trouxe resultados referentes a remoção e a adição de íons metálicos para saber quais íons estavam envolvidos durante a quelação e na filamentação de *C. albicans*. Observaram que a depleção de zinco induzia a filamentação da cepa enquanto que a adição de excesso de zinco em células tratadas com DTPA inibiu a filamentação. E por fim, o uso de TPEN no trabalho também induziu a filamentação da cepa. Esses resultados coincidem com os resultados demonstrados no trabalho, indicando que os quelantes induziram

a filamentação devido a quelação de ferro e zinco enquanto que a adição de zinco aumentou a formação de biofilmes de leveduras.

4.3.2. Susceptibilidade ao corante Congo Red (CR) para determinar influência dos quelantes na parede celular fúngica

A remodelação da parede celular pode afetar a suscetibilidade dos fungos à agentes antifúngicos. A parede celular é o primeiro sítio de interação e acumulação de íons metálicos além de apresentar uma estrutura dinâmica necessária para manter a viabilidade celular, resistência ao estresse e a morfogênese e virulência de fungos (PROBST, et al, 2022). Drogas ou condições de estresse que alteram a quantidade de nutrientes no meio podem desestabilizar a parede celular (ARANA, et al, 2009). Quelantes são comumente testados em associação a antifúngicos para a potencialização dos efeitos desses fármacos (PRASAD, et al, 2006; TRIPATHI, et al, 2020). Nossos resultados mostraram que além de diminuir a atividade metabólica das cepas os quelantes e íons metálicos provocaram alterações na morfogênese do fungo, portanto os ensaios de congo red foram utilizados para verificar se houve estresse na cadeia de carboidratos que forma a parede celular fúngica.

Ensaio de CR para cepas de *Histoplasma* ainda não foram descritos na literatura, mas sabe-se que o CR é utilizado para investigar aberrações morfológicas em fungos filamentosos e em estudos que trabalham com cepas mutantes (RAM e KLIS, 2006; HILL, et al, 2006). Nas figuras 19, 20, 21 e 22 são apresentadas fotografias das colônias das cepas G186A e EH-315 cultivadas em cada meio HAM-F12 e suas variações na forma de crescimento planctônico 24 e 144 h e no crescimento em forma de biofilme inicial (24 h) e maduro (144 h) e que posteriormente foram submetidas aos ensaios de susceptibilidade em meio BHI com concentrações de CR de 100 e 150 μ M. Ao analisar o ensaio de susceptibilidade ao CR, deve-se observar a morfologia e a viabilidade das colônias formadas a partir dos spots das cepas que foram cultivadas em variações do meio HAM-F12.

Observando o crescimento planctônico da cepa G186A (Fig. 19), em 24 horas a cepa formou colônia no meio BHI após cultivo em todos as variações do meio HAM-F12 e nas duas concentrações celulares. Já nos meios com as concentrações de CR, a cepa só formou colônia de crescimento após cultivo em meio HAM-F12 para a concentração de 5×10^5 cél. / mL e em meio HAM-F12, HAM-F12 com zinco e meio HAM-F12 com ferro na concentração de 5×10^6 cél. / mL. Em crescimento planctônico após 144 horas de cultivo, foram formadas colônias no BHI, CR 100 μ M, CR 150 μ M e nas duas concentrações celulares. Em crescimento na forma de biofilme, as células foram coletadas e resuspendidas nas concentrações indicadas. Após o cultivo de 24 horas na forma de biofilme (Fig. 20), a cepa G186A apresentou formação de colônia em BHI, CR 100 μ M e CR 150 μ M e nas duas concentrações celulares após cresceram em HAM-F12, HAM-F12 com zinco e HAM-F12 com ferro. As células da G186A que foram coletadas dos meios HAM-F12 com TPEN e HAM-F12 com DTPA os crescimentos foram danificados, mostrando pequenas colônias malformadas na concentração de 5×10^5 cél. / mL e sem colônias na concentração de 5×10^6 cél. / mL. As leveduras coletadas após formação de biofilme maduro (144 h) cresceram nas duas concentrações celulares analisadas em todos os meios, BHI CR 100 μ M e CR 150 μ M.

Para a cepa EH-315, em crescimento planctônico após 24 horas em todos os tipos do meio HAM-F12, a cepa só formou colônias intactas em meio BHI nas duas concentrações celulares. Nos meios CR 100 μ M e CR 150 μ M foram formadas colônias apenas pelas células oriundas do meio HAM-F12. Após crescimento planctônico de 144 h, em meio BHI todas as leveduras dos diferentes tipos de HAM-F12 formaram colônia nas concentrações de 5×10^5 e 5×10^6 cél. / mL. Na concentração de 5×10^5 cél. / mL, nos meios CR 100 μ M e CR 150 μ M, as leveduras oriundas do HAM-F12 com TPEN não formaram colônias e as leveduras oriundas do HAM-F12 com DTPA formaram colônias secas. Na concentração de 5×10^6 cél. / mL, em CR 100 μ M e CR 150 μ M as leveduras oriundas de HAM-F12 com TPEN e do HAM-F12 com DTPA não

formaram crescimento. No CR 150 μM , todas as condições demonstraram a formação de colônias pequenas. Para os resultados do crescimento em forma de biofilme da EH-315 (Fig. 21), as leveduras oriundas do HAM-F12 e HAM-F12 com zinco cresceram nas duas concentrações de células e em todos os meios (NHI, CR 100 μM e CR 150 μM). Já as leveduras oriundas do HAM-F12 com ferro e HAM-F12 com DTPA, nas duas concentrações celulares cresceu em BHI, mas não nos meios CR 100 μM e CR 150 μM . E por fim as leveduras oriundas do HAM-F12 com TPEN na concentração de 5×10^5 cél. / mL não cresceu em nenhum meio e na concentração de 5×10^6 cél. / mL só cresceu no meio BHI. Em crescimento após 144 h na forma de biofilme, as leveduras oriundas dos meios HAM-F12, HAM-F12 com zinco, com ferro e com DTPA cresceram nas duas concentrações de células e em todos os meios, BHI CR 100 μM e CR 150 μM . As leveduras do meio HAM-F12 com TPEN cresceram no meio BHI, mas não cresceram no meio CR 100 μM e 150 μM na concentração de 5×10^5 cél. / mL e formou pequenas colônias na concentração de 5×10^6 cél. / mL.

Congo Red é um corante vermelho com alta afinidade de ligação com cadeias de glucana nascentes, inclusive β -1,3-glucanas encontradas na parede fúngica. Quando em concentrações mais elevadas (acima de 0,2 mM), o CR fica fortemente ligado as cadeias de quitina, impedindo as de cristalizar e, portanto, inibe sua agregação lateral para formar microfibrilas, o que causa a inibição do crescimento. Em concentrações adequadas, a ligação do vermelho CR aos componentes da parede celular indica o estado de crescimento da levedura sem ter um efeito fatal (MATSUOKA, et al, 1995). Nossos estudos mostraram que as condições com quelantes, principalmente dentro de 24 horas, tanto planctônico quanto biofilme, as leveduras de ambas as cepas não conseguiram formar colônias em meio com CR, podendo ser um indicativo de que tanto o TPEN quanto o DTPA provocaram perturbações na morfogênese da parede celular.

A parede fúngica é uma estrutura dinâmica que pode se adaptar de acordo com as condições de crescimento e se remodelar durante o processo de morfogenética, como a transição

morfológica. Os componentes das paredes celulares fúngicas, especialmente a quitina e quitosana demonstram quelarem efetivamente íons metálicos divalentes ambientais (PROBST, et al, 2022). Os comportamentos adaptativos da célula ao estresse ambiental resultam em mudanças na composição química e/ou estrutura da parede celular (ORTIZ-RAMIRÉZ et al, 2021). A morfogênese das hifas está intimamente relacionada à síntese e à composição polissacarídica da parede celular. Compostos que inibem ou induzem anormalidades na morfogênese do fungo modificam a arquitetura da parede celular e a composição polissacarídica. O papel primário do polissacarídeo na morfogênese pode ser atribuído aos polímeros microfibrilares. Durante o alongamento apical, a quitina parece ser essencial para a reticulação das β -1,3-glucanas (NODET, CAPPELANO, FÉVRE, 1990). Mais estudos precisam ser realizados para compor toda a caracterização da influência de metais na parede celular das cepas de *Histoplasma*, mas os resultados estabeleceram que a quelação de metais pode ser uma estratégia poderosa para investigar mecanismos de estresse induzidos na morfogênese e na parede celular fúngica.

Estudos relacionados ao uso de quelantes e íons metálicos e o teste de susceptibilidade ao congo red em sua maioria são envolvidos com a utilização de cepas mutantes para algum gene que capta ou absorve esses íons. Em um estudo utilizando cepas de *C. parapsilosis*, essas leveduras foram silenciadas quanto a um gene que produzia redutases férricas. Porém tanto as leveduras selvagens quanto as leveduras silenciadas apresentaram susceptibilidade ao quelante de ferro (BPS) quando adicionado ao meio sólido. Em relação a adição do congo red ao meio, as leveduras mutantes mostraram maior susceptibilidade ao corante do que as leveduras selvagens. Os resultados do trabalho indicaram que a ausência das redutases férricas provocaram estresse na parede fúngica da levedura e a necessidade do metal para esta estrutura (CHAKRABORTY, et al, 2020).

Figura 19: Susceptibilidade às concentrações de 100 μM e 150 μM ao corante Congo Red da cepa G186A em crescimento planctônico de 24 e 144 h cultivada em HAM-F12, HAM-F12 com zinco, HAM-F12 com ferro, HAM-F12 com DTPA e HAM-F12 com TPEN.

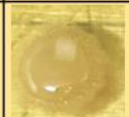
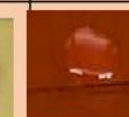
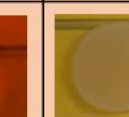
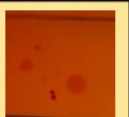
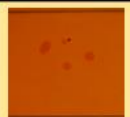
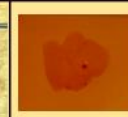
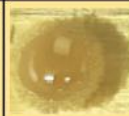
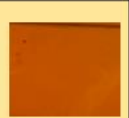
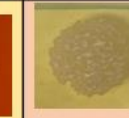
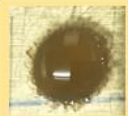
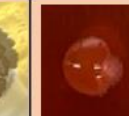
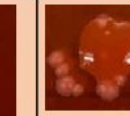
G186A	Planctônico 24 h						Planctônico 144 h					
Concentração cél. / mL	5x10 ⁵			5x10 ⁶			5x10 ⁵			5x10 ⁶		
Meio de cultura	BHI	100 μM	150 μM	BHI	100 μM	150 μM	BHI	100 μM	150 μM	BHI	100 μM	150 μM
HAM-F12												
HAM-F12 + zinco												
HAM-F12 + ferro												
HAM-F12 + DTPA												
HAM-F12 + TPEN												

Figura 20: Susceptibilidade às concentrações de 100 μM e 150 μM ao corante Congo Red da cepa G186A em crescimento em forma de biofilme inicial (24 h) e biofilme maduro (144 h) cultivada em HAM-F12, HAM-F12 com zinco, HAM-F12 com ferro, HAM-F12 com DTPA e HAM-F12 com TPEN.

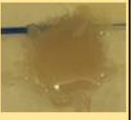
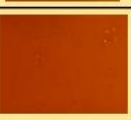
G186A	Biofilme inicial 24 h						Biofilme maduro 144 h					
Concentração cél. / mL	5x10 ⁵			5x10 ⁶			5x10 ⁵			5x10 ⁶		
Meio de cultura	BHI	100 μM	150 μM	BHI	100 μM	150 μM	BHI	100 μM	150 μM	BHI	100 μM	150 μM
HAM-F12												
HAM-F12 + zinco												
HAM-F12 + ferro												
HAM-F12 + DTPA												
HAM-F12 + TPEN												

Figura 21: Susceptibilidade as concentrações de 100 μM e 150 μM ao corante Congo Red da cepa EH-315 em crescimento planctônico de 24 e 144 h cultivada em HAM-F12, HAM-F12 com zinco, HAM-F12 com ferro, HAM-F12 com DTPA e HAM-F12 com TPEN.

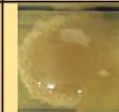
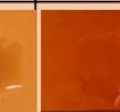
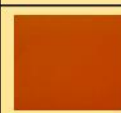
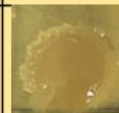
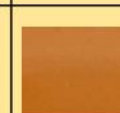
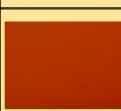
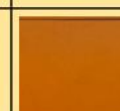
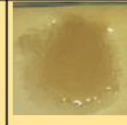
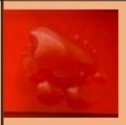
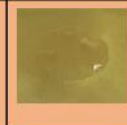
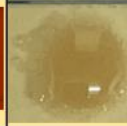
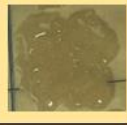
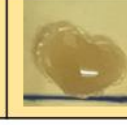
EH-315	Planctônico 24h						Planctônico 144 h					
	Concentração cél. / mL			Concentração cél. / mL			Concentração cél. / mL			Concentração cél. / mL		
Meio de cultura	BHI	100 μM	150 μM	BHI	100 μM	150 μM	BHI	100 μM	150 μM	BHI	100 μM	150 μM
HAM-F12												
HAM-F12 + zinco												
HAM-F12 + ferro												
HAM-F12 + DTPA												
HAM-F12 + TPEN												

Figura 22: Susceptibilidade as concentrações de 100 μM e 150 μM ao corante Congo Red da cepa EH-315 em crescimento em forma de biofilme inicial (24 h) e biofilme maduro (144 h) cultivada em HAM-F12, HAM-F12 com zinco, HAM-F12 com ferro, HAM-F12 com DTPA e HAM-F12 com TPEN.

EH-315	Biofilme inicial 24h						Biofilme maduro 144 h					
	5x10 ⁵			5x10 ⁶			5x10 ⁵			5x10 ⁶		
	Concentração cél. / mL											
Meio de cultura	BHI	100 μM	150 μM	BHI	100 μM	150 μM	BHI	100 μM	150 μM	BHI	100 μM	150 μM
HAM-F12												
HAM-F12 + zinco												
HAM-F12 + ferro												
HAM-F12 + DTPA												
HAM-F12 + TPEN												

4.4. Influência dos micronutrientes na virulência do fungo *H. capsulatum* em modelo *Galleria mellonella* de infecção

Larvas de *G. mellonella* foram utilizadas no trabalho com o intuito de avaliar se as cepas do fungo *H. capsulatum* oriundas de cultivos com excesso ou escassez dos íons metálicos apresentavam virulência diferente. As cepas foram cultivadas em HAM-F12, HAM-F12 + 20 μ M Zinco, HAM-F12 + 10 μ M TPEN, HAM-F12 + 20 μ M Ferro e HAM-F12 + 20 μ M DTPA sob condições de crescimento planctônico e formação de biofilme nos tempos de 24 horas e 144 horas. A sobrevivência das larvas foi observada durante 10 dias após a inoculação das células fúngicas comparando-as com o grupo de controle PBS. Os dados são apresentados nas figuras 23 e 24 e nas tabelas 1 e 2.

Na figura 23 e na tabela 1 são apresentados os dados das infecções nas larvas pela cepa G186A. Ao realizar uma análise de maneira geral, observa-se que em todas as condições de cultivo, as leveduras oriundas do biofilme maduro (144 h) foram as que mais afetaram a sobrevivência das larvas. Além disso, com o zinco adicionado ao HAM-F12, houve um aumento da virulência do fungo quando as células foram oriundas de biofilme, tanto inicial ($p < 0,001$) quanto maduro ($p < 0,05$). Com o ferro adicionado ao meio HAM-F12 observamos que houve redução da sobrevivência das larvas para 16,75% e 22,58% nos biofilmes inicial e maduro, respectivamente, sendo estatisticamente maior a virulência das leveduras coletadas de biofilme inicial ($p < 0,01$). As curvas de sobrevivência das larvas infectadas com os biofilmes formados nos meios com ferro e zinco mostram a ocorrência de mortes das larvas em grande quantidade já nos primeiros dias após a infecção, mostrando que as larvas infectadas com cepas oriundas dos biofilmes de 24 h tiveram uma redução de 50% das larvas para zinco e 70% para ferro. O mesmo acontece para as larvas infectadas com as leveduras oriundas dos biofilmes de 144 h, com ambos os íons, logo nos primeiros dois dias, houve uma diminuição em torno de 50% do número das larvas. Em crescimento planctônico por 24 h não houve diferenças entre a

sobrevivência das larvas oriundas dos diferentes meios de cultivo, entretanto, em 144 h as larvas infectadas com leveduras oriundas do meio HAM-F12 com DTPA mostraram uma sobrevivência maior do que as larvas infectadas com leveduras cultivadas em meio HAM-F12 ($p < **$).

Tabela 1: Porcentagem da sobrevivência das larvas de *Galleria mellonella* infectadas com leveduras da cepa G186A de *Histoplasma* após cultivo em HAM-F12 (Controle), HAM-F12 + 20 μ M Zinco, HAM-F12+ 20 μ M Ferro, HAM-F12 + 10 μ M TPEN e HAM-F12 + 20 μ M DTPA nos tempos de 24 e 144 h na forma de crescimento planctônico e após formação de biofilme. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

G186A	Planctônico	Planctônico	Biofilme	Biofilme
Condições	24 h (%)	144 h (%)	24 h (%)	144 h (%)
PBS	67,74	61,29	86,87	64,51
HAM-F12	37,50	31,25	54,83	19,35
HAM-F12 + 20 μ M Zinco	28,12	35,48	0,00***	0,00*
HAM-F12 + 20 μ M Ferro	31,03	43,75	16,67***	22,58
HAM-F12 + 20 μ M DTPA	46,87	61,29**	63,63	35,48
HAM-F12 + 10 μ M TPEN	15,62	32,25	54,84	12,90

Figura 23: Gráficos da sobrevivência das larvas de *Galleria mellonella* infectadas com as leveduras da cepa G186A de *Histoplasma* cultivada em meio HAM-F12, HAM-F12 + 20 μ M Zinco, HAM-F12 + 10 μ M TPEN, HAM-F12 + 20 μ M Ferro e HAM-F12 + 20 μ M DTPA, da cepa G186A nos tempos de 24 e 144 h em crescimento planctônico e após formação de biofilme.

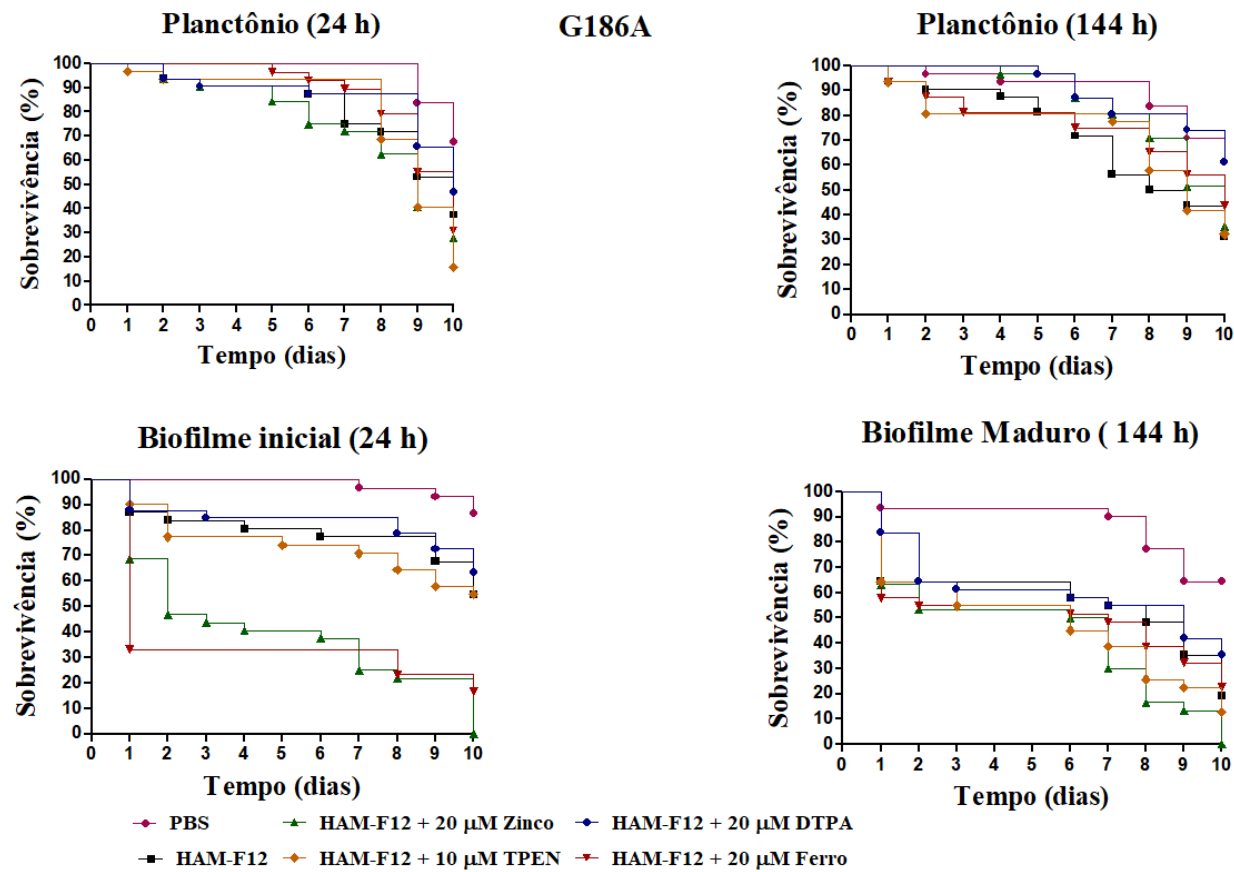


Figura 24: Gráficos da sobrevivência das larvas de *Galleria mellonella* infectadas com as leveduras da cepa EH-315 de *Histoplasma* cultivada em meio HAM-F12, HAM-F12 + 20 μ M Zinco, HAM-F12 + 10 μ M TPEN, HAM-F12 + 20 μ M Ferro e HAM-F12 + 20 μ M DTPA, da cepa G186A nos tempos de 24 e 144 h em crescimento planctônico e após formação de biofilme.

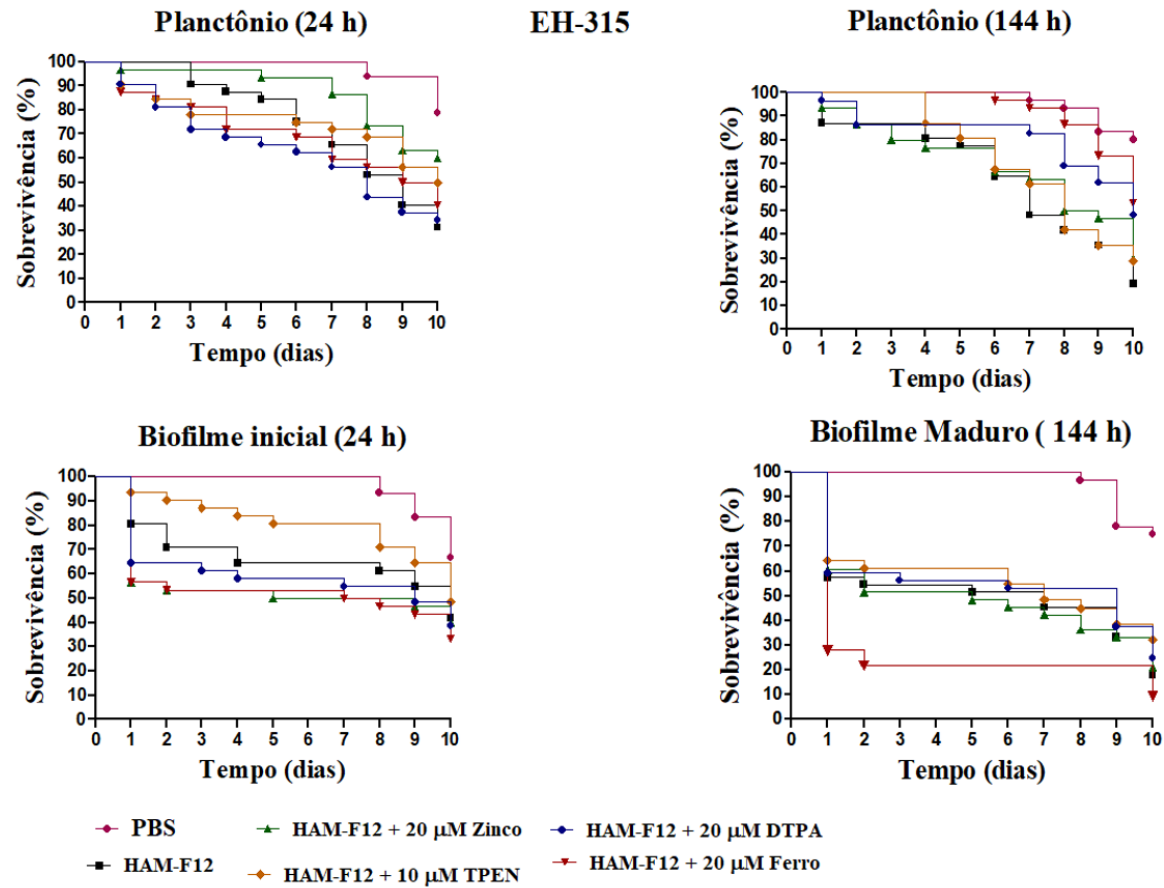


Tabela 2: Porcentagem da sobrevivência das larvas de *Galleria mellonella* infectadas com leveduras da cepa EH-315 de *Histoplasma* após cultivo em HAM-F12 (Controle), HAM-F12 + 20 μ M Zinco, HAM-F12+ 20 μ M Ferro, HAM-F12 + 10 μ M TPEN e HAM-F12 + 20 μ M DTPA nos tempos de 24 e 144 h na forma de crescimento planctônico e após formação de biofilme. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

EH-315	Planctônico	Planctônico	Biofilme	Biofilme
Condições	24 h (%)	144 h (%)	24 h (%)	144 h (%)
PBS	78,78	80,00	66,67	75,00
HAM-F12	31,25	19,35	41,93	18,18
HAM-F12 + 20 μ M Zinco	60,00*	30,00	40,00	21,21
HAM-F12 + 20 μ M Ferro	40,62	53,33**	33,33	9,37
HAM-F12 + 20 μ M DTPA	34,37	48,27	38,71	25,00
HAM-F12 + 10 μ M TPEN	50,00	29,03	48,38	32,25

Na figura 24 e na tabela 2 os resultados apresentados são referentes a sobrevivência das larvas infectadas com as leveduras da cepa EH-315. Nos experimentos realizados com essa cepa, observamos novamente que as larvas infectadas com as células oriundas do biofilme maduro (144 h), independentemente do tipo de meio de cultivo, foram as que menos sobreviveram ao longo dos 10 dias, entretanto, a presença dos íons e dos quelantes não influenciaram no aumento ou na redução da virulência da cepa, respectivamente. Em relação ao crescimento planctônico por 24 h as larvas infectadas com as leveduras oriundas do cultivo em HAM-F12 com zinco apresentaram menor virulência em relação ao controle ($p<0,05$) e em crescimento planctônico em 144 h as cepas oriundas do HAM-F12 com ferro mostraram também essa diminuição na virulência ($p<0,01$).

A patogênese fúngica é um fenômeno multifatorial, e, portanto, é necessário estudar os mecanismos de virulência e a interação com os componentes de defesa do hospedeiro para o desenvolvimento efetivo de terapias antifúngicas (KUMARI, et al, 2021). O uso de modelos alternativos (não mamíferos) em estudos de virulência supera limitações importantes que vêm com modelos murinos ou com modelos celulares. A *G. mellonella* é um inseto que provou ser útil em vários estudos de patogênese de fungos como *Candida* spp, *Aspergillus* spp, *Fusarium oxysporum*, *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides lutzii* (FIRACATIVE, et al, 2020).

Os resultados mostram que a cepa G186A, uma cepa de infecção em humanos mostrou um aumento da sua virulência na presença do zinco, enquanto que a cepa EH-315, uma cepa selvagem não mostrou alteração na presença dos íons metálicos. Além disso os resultados sugerem que ambas as cepas de *Histoplasma* oriundas de ambientes hostis de micronutrientes, ao ser inoculada na *G. mellonella* continuaram diminuindo a sobrevivência das larvas, mostrando que o fungo conseguiu se adaptar ou manteve alguns mecanismos de infecção mesmo na ausência dos metais. Este fato reforça que mesmo em ambientes não permissíveis, como o interior dos macrófagos no hospedeiro, o fungo tem a capacidade de provocar patogenicidade e virulência. Fungos patogênicos habitam nichos dinâmicos e contrastantes e devem apresentar adaptação rápida e eficaz às mudanças na disponibilidade de nutrientes. Para isso, eles regulam mecanismos específicos de absorção de nutrientes e modulam seu metabolismo, exibindo um grau de flexibilidade metabólica. Essa flexibilidade metabólica pode ser um mecanismo de virulência que garante a sobrevivência durante fases saprofíticas do ciclo de vida do *Histoplasma* e promove a sua capacidade de causar infecções pulmonares e disseminadas (ENE et al, 2014).

Não há trabalhos que avaliam a influência da ausência ou presença de íons metálicos durante a infecção fúngica em *G. mellonella*, porém há trabalhos que realizaram infecções fúngicas em modelos murinos que utilizaram quelantes como um comparativo com fármacos antifúngicos.

Em um trabalho realizado por Laskaris e colaboradores (2016), os autores infectaram camundongos com *Aspergillus fumigatus* para simular Aspergilose pulmonar e realizaram um tratamento utilizando três diferentes quelantes: clioquinol, fenatrolina e TPEN. O clioquinol não apresentou resultados satisfatórios e os ensaios foram cessados, a fenatrolina foi testada em concentrações de 30, 15 e 10 mg, mg/kg/dia e o TPEN foi testado nas concentrações de 10, 7,5 e 5 mg/kg/dia. Os melhores efeitos foram observados para a concentração de 5mg/kg/dia do TPEN e 10 mg/kg/dia para fenatrolina em que as taxas de sobrevivência foram de 60% e 47% respectivamente. Esses resultados indicaram que o quelante TPEN tem apresentado atividade antifúngica à diversos fungos e mostra-se um composto promissor para o desenvolvimento de novos estudos.

Em um outro estudo realizado por Hein e colaboradores (2015) utilizando modelo murino e modelo de porquinho da Índia foi comparado o uso de um antifúngico redS100A7 com o quelante TPEN. Nos modelos de porquinhos da Índia, os animais foram infectados em sua pata esquerda com *Trichophyton mentagrophytes* e tratados com o antifúngico e o quelante, ambos mostraram atividade protetora significativa nas patas infectadas dos porquinhos da Índia. Já os modelos murinos foram infectados com *A. fumigatus*, mostrando que os camundongos tratados com o antifúngico e o quelante TPEN permaneceram vivos durante o período de observação de 7 dias enquanto que o grupo controle não teve nenhum sobrevivente.

O uso de quelantes como comparativo de tratamentos antifúngicos tem por objetivo demonstrar mecanismos de ação dos fármacos, como por exemplo, o uso do TPEN com o redS100A7 que os autores afirmam estar envolvido com a captação de zinco devido a proximidade dos resultados apresentados do composto com o quelante (HEIN, et al, 2015). Apesar dos resultados inéditos apresentados no trabalho, estudos complementares precisam ser realizados para avaliar os diferentes mecanismos que o fungo *Histoplasma* utiliza para manter

sua patogenicidade durante a infecção e o quanto os íons metálicos influenciam nesses mecanismos.

5. Conclusões

- Foi possível determinar as concentrações adequadas dos quelantes a fim de não inibir o crescimento total do fungo. Os quelantes foram utilizados nas concentrações de 20 μM para DTPA e 10 μM para TPEN. Os micronutrientes ferro e zinco foram adicionados na proporção de 20 μM seguindo trabalhos já publicados na literatura;
- Em relação a atividade metabólica das cepas de *Histoplasma*, a ausência dos metais influenciou, reduzindo-a, principalmente na forma de crescimento planctônico e nos tempos finais da formação do biofilme. O excesso dos micronutrientes zinco e ferro também contribuíram para o aumento da atividade metabólica no crescimento na forma planctônica mais do que na forma de crescimento em biofilme. Os íons metálicos não influenciaram a concentração de biomassa e da matriz extracelular nos biofilmes de ambas as cepas;
- Pelas imagens obtidas dos biofilmes iniciais (24 horas) e finais (144 horas) das cepas de *Histoplasma*, notou-se que a presença dos íons ferro e zinco promoveram maior proliferação celular e permitiram a transição morfológica para hifa das cepas. Na presença dos quelantes houve também a transição morfológica para hifas do fungo porém houve baixa quantidade de células viáveis e pouca formação de aglomerados celulares;
- A avaliação da susceptibilidade das cepas G186A e EH-315 utilizando corante congo red mostrou que o TPEN e o DTPA diminuíram a viabilidade da cepa e impediram que ela crescesse em meio com diferentes concentrações do corante, principalmente em crescimento planctônico em 24 h para ambas as cepas e para biofilme formado em 24 h apenas para a cepa EH-315. Visualmente os íons não apresentaram aumento da viabilidade e mudança na morfologia das colônias, mas contribuíram para a manutenção da viabilidade da cepa em meio congo red;

- Em relação a avaliação da virulência das cepas em larvas de *Galleria mellonella* podemos inferir que as células oriundas de biofilme maduro foram mais virulentas. A adição do zinco no meio HAM-F12 provocou maior virulência da cepa G186A fazendo com que todas as larvas morressem dentro dos 10 dias. Já a cepa EH-315 tornou-se mais virulenta para as larvas quando as células eram oriundas do biofilme maduro formado com a adição de ferro no meio HAM-F12.

6. Referências

ADENIS, A.; AZNAR, C.; COUPPIÉ, P. Histoplasmosis in HIV-infected patients: a review of new developments and remaining gaps. **Current Tropical Medicine Reports**. v. 1, n. 2, p. 119-128, 2014.

ADENIS, A.; VALDES, A.; CROPET, C, et al. Burden of HIV-associated histoplasmosis compared with tuberculosis in Latin America: a modelling study. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 18, n. 10, p. 1150-1159, 2018.

AIDÉ, M. A. Chapter -4 Histoplasmosis. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n.1, p. 1145-51, 2009.

ALMEIDA, R. S.; WILSON, D. Hube, B. *Candida albicans* iron acquisition within the host. **Yeast Res**. v. 9, p. 1000-1012, 2009.

ALMEIDA, F.; LACAZ, C. S. Considerações em torno de duas amostras de *Histoplasma* isoladas de dermatite verrucosa e de escarro. An. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. v. 17, p. 561-577, 1941.

ARANA, D. M.; PRIETO, D.; ROMÁN, E., et al. The role of the cell wall in fungus pathogenes. **Microbial Biotechnology**. v. 2, n. 3, p. 308-320, 2009.

ARMSTRONG, P.; JACKSON, B.; HASELOW, D, et al. Multistate epidemiology of histoplasmosis, united states, 2011-2014. **Emerging Infectious Diseases**. v. 24, n. 3, p. 425-431, 2018.

ASHRAF, N.; KUBAT, R.; POPLIN, V, et al. Re-drawing the maps for endemic mycoses, **Mycopathologia**, v. 185, n. 5, p. 843-865, 2020.

ASSUNÇÃO, L.; MORAES, D.; SOARES, L, et al. Insights into *Histoplasma capsulatum* behavior on zinc deprivation. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 10, 2020.

BALTAZAR, L.M. et al. Concentration-dependent protein loading of extracellular vesicles released by *Histoplasma capsulatum* after antibody treatment and its modulatory action upon macrophages **Journal List Sci. Rep.**, 2015.

BEYHAN, S.; SIL, A. Sensing the heat and the host: Virulence determinants of *Histoplasma capsulatum*. **Virulence**. v. 10, n. 1, p. 793-800. 2019.

BINDER, U.; MAURES, E.; LASS-FLORL, C. *Galleria mellonella*: Na invertebrate model to study pathogenicity in correctly defined fungal species. **Fungal Biology**. v. 120, n. 3, p. 288-295. 2016.

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

BOHSE, M. L.; WOODS, J. P. Expression and Interstrain Variability of the YPS3 Gene of *Histoplasma capsulatum*, **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 4, p. 609-615, 2007.

BRECHTING, P.; RAPPLEYE, C. *Histoplasma* responses to nutritional immunity imposed by macrophage activation. **Journal of Fungi**. v. 5, n. 2, 2019.

BRILHANTE, R. N. S. *et al.* *Histoplasma capsulatum* in planktonic and biofilm forms: in vitro susceptibility to amphotericin B, itraconazole and farnesol. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, p. 394–399, 2015.

CALVILLO-MEDINA, R.; REYES-GRAJEDA, J.; BARBA-ESCOTO, L. *et al.* Proteome analysis of biofilm produced by a *Fusarium falciforme* keratitis infectious agent. v. 130, p. 232–241, 2019.

CASSAT, J.; and SKAAR, E. Iron in infection and immunity. **Cell Host and Microbe**. v. 13, n. 5, p. 509–519, 2013.

CLSI (2008). *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*; Approved Standard, M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

CHAKRABORT, T.; TÓTH, Z.; TÓTH, R.; *et al.* Iron Metabolism, pseudohyphae production, and formation through a multicopper oxidase in the human pathogenic fungus *Candida parapsilosis*. v. 5, n. 3, 2020

CHANDRA, J.; PRANAB, K. M.; GHANNOUM, M. A. In vitro growth and analysis of *Candida* biofilms. **Nature Protocols**. v. 3, n. 2, 1909–1924, 2008

COMENSOLI, L.; BINDSCHELDLER, S.; JUNIER P. *et al.* Iron and fungal physiology: a review of biotechnological opportunities. **Advances in Applied Microbiology**. v. 98, p. 31–60, 2017.

COSTA-ORLANDI, C. B.; *et al.* In vitro characterization of *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* biofilms. **Biofouling**, v. 30, n. 6, p. 719–727, 2014

COSTA-ORLANDI, C. B.; *et al.* Fungal Biofilms and Polymicrobial Diseases, **Journal of Fungi**, v. 3, n. 22, p. 24, 2017

COSTERTON, J. W.; *et al.* Microbial Biofilms. **Ann. Rev. Microbiol.** v. 49, p. 711–745, 1995

DADE, J.; DUBOIS, J.; PASULA, R. *et al.* HcZrt2, a zinc responsive gene, is indispensable for the survival of *Histoplasma capsulatum* in vivo. **Medical Mycology**. v. 54, n. 8, p. 865–875, 2016.

DAMASCENO, L.S.; TEIXEIRA, M. M.; BARKER, B. M. *et al.* Novel clinical and dual infection by *Histoplasma capsulatum* genotypes in HIV patients from Northeastern, Brasil. **Scientific Reports**. v. 9, 2019

DANTAS, K.; MAUAD, T.; DE ANDRÉ, C. *et al.* A single-centre, retrospective study of the incidence of invasive fungal infections during 85 years of autopsy service in Brazil. **Scientific Reports**. v. 11, n. 11, 2021.

DARLING, S. A protozoario general infection producing pseudotubercles in the lungs and focal necroses in the liver spleen and lymphndes, 1906.

DE OLIVEIRA SCHNEIDER, R.; DE SOUZA SUFFERT FOGAÇA, N.; KMETZSCH, L. *et al.* Zap1 regulates zinc homeostasis and modulates virulence *Cryptococcus gattii*. **PLoS ONE**. v. 7, n. 8, 2012

DURIEUX, M.; MELLOUL, É.; JEMEL, S. *et al.* *Galleria mellonella* as a screening tool to study virulence factors os *Aspergillus fumigatus*. **Virulence**. v. 12, n. 1, p. 818–834, 2021

- EIDE, D. J. Metal ion transport in eukaryotic microorganisms: insights from *Saccharomyces cerevisiae*. **Adv. Micro. Physiol.** v. 43, 2000
- ELLIS, J.; GRAHAM, J.; MORTENSEN, A. Standard methods for wax moth research. **Journal of Apicultural Research.** v. 52, n. 1, 2013
- ENE, I. V.; BRUNKE, S.; BROWN, A. J. P.; HUBE, B. Metabolism in fungal pathogenesis. **Cold Spring Harb Perspect Medicine.** v. 4, 2014
- FIRACATIVE, C.; KHAN, A.; DUAN, S. et al. Rearing and maintenance of galleria mellonella and its application to study fungal virulence. **Journal of Fungi.** v. 6, n. 3, p. 1 -13, 2020
- FERGUSON-PAUL K.; PARK C.; CHILDRESS S.; ARNOLD S.; AULT B.; BAGGA, B. Disseminated histoplasmosis in pediatric kidney transplant recipients-A report of six cases and review of the literature. **Pediatr Transplant.**, v. 22, n. 7, 2018
- FERREIRA, M. S. & BORGES, A. S. Histoplasmosis. **Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.**, v.2, n. 42, p. 192-198, 2009
- FLEMMING, H. Biofouling and me: My stockholm syndrome with biofilms with biofilms. **Water Research.** v. 173, 2020.
- FRANCO, L. O.; MAIA, R. C.; PORTO, A. L. et al. Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from *Cunninghamella elegans*. **Brazilian Journal of Microbiology.** v. 35, p. 243-247, 2004.
- FREGONEZI, N. F.; OLIVEIRA, L. T.; SINGULANI, J. L. et al. Heat shock protein 60, insights to its importance in *Histoplasma capsulatum*: From biofilm formation to host-interaction. **Frontiers Cellular and Infection Microbiology.** v. 10, 2020
- GALLO, J.; TORRES, I., GOMEZ, O.; et al. New *Histoplasma* diagnostic assays designed via whole genome comparisons. **Journal of Fungi.** v. (7), 7, 2021
- GARFOOT, A.; RAPPLEYE, C. *Histoplasma capsulatum* surmounts obstacle to intracellular pathogenesis. **FEBS Journal.** v. 283 (4), p. 619-633, 2016.
- GERWIEN, F.; SKRAHINA, V.; KASPER, L. et al. Metals in fungal virulence. **FEMS Microbiology Reviews.** v. 42, n. 1, p. 1-21, 2018
- GIACOMAZZI, J.; BAETHGEN, L.; CARNEIRO, L. et al. The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses.** v. 59, n. 3, p. 145-150, 2016.
- GILMORE, S.; VOORHIES, M.; GEBHART D.; et al. Genome-Wide reprogramming or transcript architecture by temperature specifies the developmental states of the human pathogen *Histoplasma*. **PLoS Genetics.** v. 11, n. 7, 2015.
- GONÇALVES, L.; COSTA-ORLANDI, C.; BILA, N. et al. Biofilm formation by *Histoplasma capsulatum* in different culture media and oxygen atmospheres. **Frontiers in Microbiology.** v. 11, 2020.
- GUZMÁN-SOTO, I.; MCTIERNAN, C.; GONZALEZ-GOMEZ, M. et al. Mimicking biofilm formation and development: Recent progress in *in vitro* and in *in vivo* biofilm models, 2021.
- GUIMARÃES, A. J. et al. *Histoplasma capsulatum* heat-shock 60 orchestrates the adaptation of the fungus to temperature stress. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. 1–12, 2011.

- HARRISON, J. J. et al. Metal resistance in *Candida* biofilms. **FEMS Microbiol Ecol.**, v. 49, p. 479–491, 2006
- HARRISON, J. J. *et al.* Metal ions may suppress or enhance cellular differentiation in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* biofilms. **Appl Environ Microbiol.**, v. 73, p. 4940-4949, 2007.
- HASHEMI, M.; GHAVAMI, S.; ESHRAGHI, M. et al. Cytotoxic effects of intra and extracellular zinc chelation on human breast cancer cells. **European Journal of Pharmacology**. v. 557, n. 1, p. 9 -19, 2007
- HEIN, K. Z.; TAKASHI, H.; TSUMORI, T. et al. Disulphide-reduced psoriasin is a human apoptosis-inducing broad-spectrum fungicide. **Immunology and Inflammation**. v. 112, n. 42, p: 13039-13044. 2015
- HILL, T. W. et al. Isolation of cell wall mutants in *Aspergillus nidulans* by screening for hypersensitivity to Calcofluor White. **Mycologia**. v. 98, n. 3, p. 399-409, 2006
- HILTY, J.; SMULIAN, G. A.; NEWMAN, S. *Histoplasma capsulatum* utilizes siderophores for intracellular iron acquisition in macrophages. **Medical Mycology**. v. 49 (6), p. 633-642, 2011.
- HOWARD, D. H. Iron gathering by zoopathogenic fungi. **Immun. Med. Microb.** v. 40, p: 95-100, 2004
- HORTWATH, M. C.; FECHER, R. A.; DEEPE Jr, G. S. *Histoplasma capsulatum*, lung infection and immunity, v. 110, n. 6, p. 967-975, 2015
- HYNT, H.J.; SOHN, J. H.; HA, D. W., et al. Depletion of intracellular zinc and copper with TPEN results in apoptosis of cultured human retinal pigment epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. v. 42, p: 460-465, 2001.
- KAUFFMAN, C. Histoplasmosis: A clinical and laboratory update. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 20, n. 1, p. 115-132, 2007.
- KURAKADO, S.; CHIBA, R.; SATO, C., et al. N,N,N',N' – tetrakis (2-pyridylmethyl) ethylenediamine, a zinc chelators, inhibits biofilm and hyphal formation in *Trichosporon asahii*. **BMC Research Notes**, 13, n. 1, 2020.
- JUNG, W. H. The zinc transport systems and their regulation in pathogenic fungi. **Mycol.** v. 43, n. 3, p. 179-183, 2015.
- KASUGA, T.; TAYLOR, J.W.; WHITE, T. J. Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* Darling. **Journal Clinical Microbiology**. v. 37, p. 653-666, 1999.
- KASUGA, T.; WHITE, T. J.; KOEING, G. et al. Phylogeography of the fungus pathogen *Histoplasma capsulatum*. **Molecular Ecology**. v. 12, p. 3383-3401, 2003
- KNOX K. S.; HAGE C. A. Histoplasmosis. **Proc Am Thorac Soc**. v. 7, n. 3, pp:169-72, 2010
- KUMARI, A.; TRIPATHI, A. H. GAUTAM, P., et al. Adhesins in the virulence of opportunistic fungal pathogens of human. **Mycology**. v. 12, n. 4, p. 296-324, 2021.
- LANGE, A.; BEIER, S.; HUSON, D. H., et al. Genome Sequence of *Galleria mellonella* (Greater Wax Moth). **Genome Announcemr**. v. 6. 2018

LAPITZ A.; GOLDMAN M.; SAROSI G. A. HISTOPLASMOSIS. IN: SCLOSSBERG D, editor. **Clinical Infectious Disease**. New York, NY, USA: Cambridge University Press. p. 1211-1214. 2008

LASKARIS, P.; ATROUNI, A.; CALERA, J. A., et al. Administration of zinc chelators improves survival of mice infected with *Aspergillus fumigatus* both in monotherapy and in combination with caspofungin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 60, p. 5631-5639. 2016

LI, Y., et al. Promising antifungal targets against *Candida albicans* based on ion homeostasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 1-13, 2018

MA, L.; TERWILLIGER, A.; MARESSO, A. W. Iron and Zinc exploitation during bacterial pathogenesis. **Metallom**. v. 7, n. 12, p. 1541-1554, 2015

MARCOS-ZAMBRANO, L. J.; ESCRIBANO, P.; BOUZA, E.; and GUINEA, J. Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida* spp. isolates causing fungemia: comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. **International Journal Medicine Microbiology**. v. 304, p. 1192-1198. 2014

MARESCA, B.; LAMBOWITZ, A. M.; KUMAR, V. B.; GRANT G. A. et al. Role of cysteine in regulating morphogenesis and mitochondrial activity in the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. Proceedings of the National Academy of Sciences. v. 78, n. 7, p. 4596-4600. 1981

MARTIN, A. et al. Multicentre laboratory validation of the colorimetric redox indicator (CRI) assay for the rapid detection of extensively drug-resistant (XDR) *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal Antim. Chemot.** v. 66, p. 827-833, 2011

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 3, p. 1021–1033, 2006.

MATSUOKA, H. et al. Use of Congo red as microscopic fluorescence indicator of hyphal growth. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 43, p. 102-108. 1995

MITTAL J.; PONCE, M.; GENDLINA I. et al. *Histoplasma capsulatum*: Mechanisms for pathogenesis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. v. 422, p. 157-191, 2019.

MYINT, T., et al. Histoplasmosis in patients with human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome (HIV/AIDS): multicenter study of outcomes and factors associated with relapse. **Medicine (Baltimore)**, v. 93, n. 1, p. 11-18, 2014

MORRIS, C.; MONIER, J.; ANGLE, M., et al. Methods for observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable microorganisms downloaded from. **Applied and Environmental Microbiology**. p. 1570-1576, 1997

NACHER, M., et al. The fight against HIV-associated disseminated Histoplasmosis in the Americas: Unfolding the different stories of four centers. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 51, p. 1-6, 2019

NEWMAN, S. and SMULIAN, A. Iron uptake and virulence in *Histoplasma capsulatum*. **Current Opinion in Microbiology**. v. 16, n. 6, p. 700-707, 2013.

NODET, P.; CAPELLANO, A.; FÉVRE, M. Morphogenetic effects of Congo red on hyphal growth and cell wall development of the fungus *Saprolegnia monoica*. *Journal of General Microbiology*. v. 136, p. 303-310. 1990

NOSANCHUK, J.; ZAMITH-MIRANDA D.; GUIMARÃES, A. *Histoplasma*. **Encyclopedia of Mycology**. p. 624-626, 2020.

OLIVEIRA, F. M.; UNIS, G.; SEVERO, L. C. An outbreak of histoplasmosis in the city of Blumenau, Santa Catarina. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. v. 32, n. 4, p. 375-378, 2006

OLLIG, J.; KLOUBERT, V.; WEBELS, I., et al. Parameters influencing zinc in experimental - systems in vivo and in vitro. **Metals**. v. 6, n. 3, 2016

ORTIZ-RAMIRÉZ, J. A.; CUÉLLAR-CRUZ, M.; LÓPEZ-ROMERO, E. Responses of *Sporontrix globosa* to the cell wall perturbing agents red and calcofluor white. *Antonie van Leeuwenhoek*. v. 114, p. 609-624. 2021

PETTI, A.; CRUTCHFIELD, C.; RABINOWITZ, J., et al. Survival of starving yeast is correlated with oxidative stress response and nonrespiratory mitochondrial function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v. 108, n. 45. 2011.

PITANGUI, N.; SARDI, J.; SILVA J., et al. Adhesion of *Histoplasma capsulatum* to pneumocytes and biofilm formation on an abiotic surface. **Biofouling**. v. 28, n. 7, p. 711-718, 2012.

POLVI, E. J.; AVERETTE, A. F.; LEE, S. C.; KIM, T. Metal Chelation as a Powerful strategy to probe cellular circuitry governing fungal drug resistance and morphogenesis. *PLoS Genetics*. v. 12, n. 10. 2016

PRASAD, T.; CHANDRA, A.; MUKHOPADHYAYA, C. K.; PRASAD, R. Unexpected link between iron and drug resistance of *Candida* spp.: Iron depletion enhances membrane fluidity and drug leading to drug-susceptible cells. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 50, n. 11, p. 3597-3606. 2006.

PROBST, C.; GARCIA-SANTAMARINA, S.; BROOKS, J. T., et al. Interactions between copper homeostasis and the fungal cell wall affect copper stress resistance. **PLoS Pathogens**. v. 18, n. 6, 2022.

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

RAKISLOVA, N.; HURTADO, J.; PALHARES, A., et al. High prevalence and mortality due to *Histoplasma capsulatum* in the brazilian amazona: An autopsy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 15, n. 4, 2021.

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

RODRIGUES, A.; BEALE, M.; HAGEN, F., et al. The global epidemiology of emerging *Histoplasma* species in recent years. **Studies in Mycology**. v. 97, 2020.

SHAFEEQ, S., et al. Impact of manganese on biofilm formation and cell morphology of *Candida parapsilosis* clinical isolates with different biofilm forming abilities. **FEMS Yeast Research**, <https://doi.org/10.1093/femsyr/foz057>

SHEN Q.; RAPPLEYE, C. A. Differentiation of the fungus *Histoplasma capsulatum* into a pathogen of phagocytes. **Current Opinion in Microbiology**. v. 40, p 1-7, 2017

SHEN, Q., et al. Macrophage activation by IFN- γ triggers restriction of phagosomal copper from intracellular pathogens. **Plos Pathology**. v. 14, n. 11, 1007444, 2018

SINGULANI, J. L.; SCORZONI, L.; OLIVEIRA, H. C., et al. Applications of invertebrate animal models to dimorphic fungal infections. **Journal of Fungi**. v. 4, n. 4. 2018.

SILVA, S.; HENRIQUES, M.; MARTINS, A, et al. Biofilms of non-Candida albicans Candida species: quantification, structure and matrix composition. **Medical Mycology**. v. 47, p. 681-689, 2009

SIQUEIRA, J. G. **Estudo da homeostase de zinco no fungo patogênico *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*: Abordagens Proteômica e funcional**. Dissertação para título de mestre. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 2016.

SOHNLE, P. G.; HAHN, B. L.; KARMARK, R. Effect of metals on *Candida albicans* growth in the presence of chemical chelators and human abscess fluid. **Journal Laboratory. Clinical Med.** v. 137, n. 4, p. 284-289, 2001

STAATS, C.; KMETZSCH, L.; SCHRANK, A. et al. Fungal zinc metabolism and its connections to virulence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 4. 2013

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

TAYLOR, M. L.; REYES-MONTES, M. R.; ESTRADA-BÁRCENAS, D. A., et al. Considerations about the geographic distribution of *Histoplasma* species. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 88, n. 7, 2022.

TEIXEIRA, M.; PATANÊ, J.; TAYLOR, M., et al. Worldwide Phylogenetic distributions and population dynamics of the genus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 10, n. 6, 2016

THOMAZ, L.; GARCIA-RODAS, R.; GUIMARÃES, A., et al. *Galleria mellonella* as a model host to study *Paracoccidioides Lutzii* and *Histoplasma capsulatum*. **Virulence**. v. 4, n. 2. P. 139-146. 2013

TREVIJANO-CONTADOR, N.; ZARAGOZA, O. Immune response of *Galleria mellonella* against human fungal pathogens. **Journal of Fungi**. v. 5, n. 1, 2019.

TRIPATHI, A.; LIVERANI, E.; TSYGANKOV, A. Y.; PURI, S. Iron alters the cell wall composition and intracellular lactase to affect *Candida albicans* susceptibility to antifungal host immune response. *Journal Biological Chemistry*. v. 295, n. 29, p. 10032-10044, 2020.

TSAI, C.; LOH, J.; PRIFT, T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 214-229, 2016

VALDEZ, A.; MIRANDA, D. Z.; GUIMARÃES, A. J., et al. Pathogenicity & virulence of *Histoplasma capsulatum* – A multifaceted organism adapted to intracellular environments. **Virulence**. V. 13, n. 1, p. 1900-1919, 2022a

VASO, C.; BILA, N.; PANDOLFI, F., et al. Evaluation of the anti-*Histoplasma capsulatum* activity of indole and nitrofurantoin derivatives and their pharmacological safety in three-dimensional cell cultures. **Pharmaceutics**. v. 14, n. 5, p. 1043, 2022

VIGNESH, K. S., et al. Zinc Sequestration: Arming phagocyte defense against fungal attack. **Pathogens**, v. 9, n. 12, p. 5, 2013

WHEAT, L. J., et al. Histoplasmosis. **Infect. Dis. Clin. North Am.** v. 30, n. 1, p. 207-227, 2016.

WINTERS, M. S., et al. Metallomic Analysis of Macrophages infected with *Histoplasma capsulatum* reveals a fundamental role for zinc in host defenses. **Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 7, p. 1136-1145, 2010

WUENSCH, A.; TRUSCH, F.; IBRAHIM, N., et al. *Galleria mellonella* as an experimental in vivo host model for the fish-pathogenic oomycete *Saprolegnia parasitica*. **Fungal Biology**. v. 122, n. 3. p. 182-189. 2018

ZHAO, H.; EIDE, D. The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 6, p. 2454–8, 1996a

ZHAO, H.; EIDE, D. The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 38, p. 23203–23210, 1996b.