UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Campus de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

Angélica Romão Carvalho

Análise do potencial antifúngico e antibiofilme de peptídeos antimicrobianos frente ao *Histoplasma capsulatum* e análise toxicológica de um derivado de mastoparano

Araraquara, SP
2023

Angélica Romão Carvalho

Análise do potencial antifúngico e antibiofilme de peptídeos antimicrobianos frente ao *Histoplasma capsulatum* e análise toxicológica de um derivado de mastoparano

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre, área de pesquisa em Biotecnologia.

Orientadora: Profª. Drª. Ana Marisa Fusco-Almeida
Coorientador: Dr. Paulo César Gomes

Araraquara, SP
2023

Carvalho, Angélica Romão.
C332a Análise do potencial antifúngico e antibiofilme de peptídeos antimicrobianos frente ao *Histoplasma capsulatum* e análise toxicológica de um derivado de mastoparano / Angélica Romão Carvalho. – Araraquara: [S.n.], 2023.
72 f. : il.

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

Orientadora: Ana Marisa Fusco-Almeida.
Coorientador: Paulo César Gomes.

1. *Histoplasma*. 2. Peptídeo. 3. Biofilme. I. Fusco-Almeida, Ana Marisa, orient. II. Gomes, Paulo César, coorient. III. Título.

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

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Análise do potencial antifúngico e antibiofilme de peptídeos antimicrobianos frente ao *Histoplasma capsulatum* e análise toxicológica de um derivado de mastoparano

AUTORA: ANGÉLICA ROMÃO CARVALHO
ORIENTADORA: ANA MARISA FUSCO ALMEIDA
COORIENTADOR: PAULO CESAR GOMES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ANA MARISA FUSCO ALMEIDA (Participaçao Virtual)
Departamento de Analises Clinicas / Faculdade de Ciencias Farmaceuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Dra. JUNYA DE LACORTE SINGULANI (Participaçao Virtual)
Departamento de Microbiologia / Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. MARIO SERGIO PALMA (Participaçao Virtual)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro da Unesp

Araraquara, 27 de junho de 2023

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Estela, que sempre me aconselhou e apoiou por toda a vida. Que me ensinou a amar, respeitar e conviver. Que me ensinou o que significa ser forte perante os obstáculos.

Ao meu companheiro, Diego, sempre paciente e carinhoso.

Aos meus colegas de laboratório, em especial Ana Carol e Carolzita Vaso, por compartilharem o seu conhecimento durante a pesquisa e sua força durante o desespero.

Aos técnicos, Paulo e Claudinha, pelos treinamentos, ensinamentos e desabafos. Em especial ao Paulo pela ótima coorientação.

À minha orientadora, Profa. Dra. Ana Marisa, que me acolheu no Núcleo de Proteômica.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 (Número de processo: 88887.600545/2021-00)

RESUMO

A histoplasmose é uma doença que afeta gravemente populações imunossuprimidas, cujo tratamento apresenta opções farmacológicas limitadas com efeitos adversos consideráveis. O seu agente etiológico, *Histoplasma capsulatum*, distribui-se globalmente e de forma endêmica pelo território brasileiro. Ademais este fungo possui a habilidade de formar biofilmes, estruturas que intensificam a gravidade das infecções causadas por ele. No presente trabalho, cinco peptídeos antimicrobianos foram testados frente ao fungo. Três derivados de mastoparano e dois derivados de moricin C3 foram testados contra as formas planctônica e de biofilme das cepas G186A e EH-315 de *H. capsulatum*. O peptídeo MK58911, apresentou a melhor performance, causando a inibição da biomassa dos biofilmes em ambas as cepas de *H. capsulatum*. Observou-se 33,8% de inibição com 31,2 µg/mL para a cepa G186A e 32,9% com 125 µg/mL para a cepa EH-315. Quanto a viabilidade metabólica nenhum dos peptídeos testados, incluindo o MK58911, foi capaz de afetá-la em nenhuma das formas fúngicas. A análise da atividade sinérgica entre o MK58911 e o itraconazol frente ao biofilme revelou a existência de atividade aditiva entre as moléculas, com valores de ICIF de 0,53 para a cepa G186A e 0,62 para a cepa EH-315. A toxicidade do MK58911 foi analisada em diversos modelos. Para a linhagem celular A549, foram determinados os valores de IC50 de 292 µg/mL para a monocamada e 500 µg/mL para os esferóides. Em modelo alternativo *Tenebrio molitor* não foi observada toxicidade em nenhuma das doses analisadas (10, 50 e 100 mg/Kg). No entanto, o mesmo peptídeo mostrou-se embriotóxico e teratogênico em modelo *Danio rerio,* para o qual encontrou-se um valor de LC50 de 6,9 µg/mL. Ademais observou-se diminuição na movimentação espontânea (em 15,6 e 7,8 µg/mL) e na frequência cardíaca (em 15,6; 7,8 e 3,9 µg/mL) dos embriões. Finalmente, realizou-se a cromatografia de afinidade com extrato proteico total de *H. capsulatum* em coluna acoplada com o peptídeo MK58911. Nas alíquotas eluidas analisadas por SDS-PAGE, observou-se duas bandas diferenciais possivelmente relacionadas a interação entre proteínas do extrato e o peptídeo MK58911, podendo ser estas, indicativos para a explicação dos mecanismos exercidos por este peptídeo.

PALAVRAS-CHAVE: *Histoplasma,* peptídeo, biofilme.

ABSTRACT

Histoplasmosis is a disease that severely affects immunosuppressed populations, whose treatment has limited pharmacological options with considerable adverse effects. Its etiological agent, *Histoplasma capsulatum*, is distributed globally and endemically throughout the Brazilian territory. Furthermore, this fungus can form biofilms, structures that intensify the severity of infections caused by it. In the present work, five antimicrobial peptides were tested against this fungus. Three mastoparan-derived and two moricin C3-derived peptides were tested against the planktonic and biofilm forms of G186A and EH-315 *H. capsulatum*`s strains. The MK58911 peptide presented the best performance, causing biofilm biomass inhibition in both strains of *H. capsulatum*. A 33.8% inhibition was observed with 31.2 µg/mL for the G186A strain and 32.9% with 125 µg/mL for the EH-315 strain. As for cellular metabolic viability, none of the tested peptides, including MK58911, was able to affect it in any of the fungal forms. The synergistic activity analysis between MK58911 and itraconazole against biofilm revealed additive effect, with ICIF values of 0,53 for G186A strain and 0,62 for EH-315 strain. The toxicity of MK58911 was analyzed in multiple models. For the A549 cell line, IC50 values determined were 292 µg/mL for monolayer and 500 µg/mL for spheroids. In the alternative model *Tenebrio molitor*, no toxicity was observed at any of the analyzed dosages (10, 50 and 100 mg/Kg). However, the same peptide was shown to be embryotoxic and teratogenic in *Danio rerio* model, where the LC50 value found was 6.9 µg/mL. Additionally, there was a decrease in spontaneous movement (in 15.6 and 7.8 µg/mL) and in heart rate (in 15.6; 7. 8 and 3.9 µg/mL) of the embryos. Finally, affinity chromatography was performed with total protein extract of *H. capsulatum* in a column coupled with the MK58911 peptide. The sample aliquots collected from the run were separated by SDS-PAGE, in which two differential bands possibly related to the interaction between extract proteins and the MK58911 peptide were observed, which may be indicative for the explanation of the mechanisms exerted by this peptide.

KEYWORDS: *Histoplasma*, peptide, biofilm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Valores médios de absorbância relativos à quantificação de biomassa para as cepas G186A (A) e EH-315 (B) expostos aos peptídeos MK58911 e MK4589. * p < 0,05 comparado ao grupo controle.....38

Figura 2. Valores médios de absorbância relativos à toxicidade nos modelos celulares monocamada (**A**) e esferóide (**B**) expostos ao peptídeo MK58911. * p < 0,05 comparado ao grupo controle. ** p < 0,01 comparado ao grupo controle.....44

Figura 3. Curvas de sobrevivência das larvas de *T. molitor* expostas ao peptídeo MK58911.....46

Figura 4. Fotografia das larvas de *T. molitor* expostas ao peptídeo MK58911 em 0 horas (**A**) e 120 horas (**B**) após exposição.....47

Figura 5. Porcentagem de formação de pupas em 120 horas após exposição ao peptídeo MK58911. * p < 0,05 comparado ao grupo controle.....47

Figura 6. Curvas de sobrevivência dos embriões de *Danio rerio* expostos ao peptídeo MK58911.....48

Figura 7. Frequência de movimentos espontâneos dos embriões expostos ao peptídeo MK58911 em 24 hpf.....50

Figura 8. Médias de batimentos cardíacos nos embriões expostos ao peptídeo MK58911 em 48 hpf. * p < 0,05, ** p < 0,01.....51

Figura 9. Médias das dosagens espectrofotométricas do peptídeo MK58911 durante acoplamento à resina. Absorbância em UV a 280nm.....52

Figura 10. Cromatograma das frações P0 e P1.....52

Figura 11. Médias das dosagens espectrofotométricas da corrida cromatográfica. *ctr: coluna controle, *teste: coluna com peptídeo acoplado.....53

Figura 12. Géis de SDS-PAGE contendo as alíquotas da corrida cromatográfica. Coloração por coomasie (**A**) e prata (**B**).....54

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1. Peptídeos analisados no ensaio de determinação da sensibilidade fúngica e suas estruturas.....27

Tabela 2. Resumo das porcentagens de inibição de biomassa estatisticamente significantes para as cepas G186A e EH-315.....38

Tabela 3. Valores de CIM dos fármacos anfotericina B e itraconazol para ambas as cepas de *H. capsulatum*.....39

Tabela 4. Valores de CIM, CIM combinada e ICIF para as cepas G186A e EH-315.....42

Tabela 5. Valores de inibição da viabilidade metabólica e IC50 para a linhagem A549 nos modelos monocamada e esferóide após tratamento com o peptídeo MK58911.....45

Tabela 6. Parâmetros de análise e seus resultados em embriões e larvas jovens de *Danio rerio*.....49

Tabela 7. Tabela de contingência contendo as frequências (**n**) e porcentagens (**%**) de movimentos espontâneos observados em 20s para o grupo controle e grupos expostos ao MK58911.....50

Quadro 1. Esquema das microplacas montadas para o ensaio de atividade sinérgica. Valores de concentração final dos compostos em µg/mL. Valores em itálico: MK58911, Valores em negrito: itraconazol. CE: controle de esterilidade, CC: controle de crescimento.....30

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN: acetonitrila

AIDS: *acquired immunodeficiency syndrome* (síndrome da imunodeficiência adquirida)

AMPs: *antimicrobial peptides* (peptídeos antimicrobianos)

CIF: concentração inibitória fracionada

CIM: concentração inibitória mínima

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

HAM-F12: Ham´s F12 Nutrient Mixture

HIV: *human immunodeficiency virus* (vírus da imunodeficiência humana)

IC50: concentração inibitória média

ICIF: índice de concentração inibitória fracionada

IFN-γ: interferon-gama

IL-12: interleucina 12

LAAC: leupeptina, aprotinina, antipaina, quimiostatina

LC50: concentração letal média

MS-222: tricaína metassulfonada

MKs: peptídeos análogos de mastoparanos

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBS: *phosphate buffered saline* (tampão fosfato-salino)

PMSF: fenil metil sufonil fluoreto

RPMI-1640: Roswell Park Memorial Institute 1640

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida

TEMED: N, N, N', N'- tetrametiletilenodiamida

TFA: ácido trifluoroacético

TNF-α: fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO **13**
1.1. *Histoplasma capsulatum* E A HISTOPLASMOSE 13
1.2. BIOFILMES 19
1.3. PEPTIDEOS ANTIMICROBIANOS (AMPs) 22
1.4. MODELOS CELULARES 24
1.5. MODELO ALTERNATIVO *Danio rerio* 25
1.6. MODELO ALTERNATIVO *Tenebrio molitor* 26
2. OBJETIVOS **27**
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 28
3. MATERIAL E MÉTODOS **28**
3.1. MICRORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO 28
3.2. PEPTÍDEOS 29
3.3. DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE FÚNGICA AOS PEPTÍDEOS 30
3.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SINÉRGICA 31
3.5. TOXICIDADE EM MODELOS CELULARES 33
3.6. TOXICIDADE EM EMBRIÕES DE DANIO RERIO 33
3.7. TOXICIDADE EM LARVAS DE TENEBRIO MOLITOR 35
3.8. EXTRAÇÃO PROTEICA TOTAL 35
3.9. CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE 36
3.10. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) 37
3.11. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) 37
3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA 38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO **39**
4.1. DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE FÚNGICA AOS PEPTÍDEOS 39
4.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SINÉRGICA 44
4.3. TOXICIDADE EM MODELOS CELULARES 46
4.4. TOXICIDADE EM LARVAS DE *Tenebrio molitor* 48
4.5. EMBRIOTOXICIDADE EM *Danio rerio* 50
4.6. CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE 55
5. CONCLUSÃO **58**
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **60**

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Histoplasma capsulatum* E A HISTOPLASMOSE

As infecções fúngicas invasivas adquiriram crescente importância no contexto da saúde pública na última década. São doenças de difícil diagnóstico e tratamento e, muitas vezes, possuem altos níveis de morbidade e mortalidade (BENEDICT et al., 2017; KAINZ et al., 2020). O aumento na incidência destas doenças se deve a diversos fatores. Em especial, ao crescimento de populações imunossuprimidas, sendo de grande importância aquela acometida pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). A histoplasmose, causada pelo fungo do gênero *Histoplasma*, pertence a este grupo de doenças (TIRADO-SÁNCHEZ et al., 2020).

A histoplasmose é distribuída mundialmente, no entanto, o continente americano se destaca pela prevalência da doença. Nos Estados Unidos, a histoplasmose é mais comum nas regiões central e leste do país em especial nos vales dos rios Mississippi e Ohio, onde a micose é endêmica (BENEDICT et al., 2021). As maiores taxas de histoplasmose na América do Sul são relatadas nas regiões central e leste do continente, incluindo Brasil. No geral, a carga de histoplasmose na nestas regiões provavelmente é subestimada devido à subnotificação e capacidade de diagnóstico limitada (GÓMEZ, 2011; ALMEIDA et al., 2019). Recentemente a OMS (Organização Mundial da Saúde), a partir do método de análise de decisão multicritério (MDCA), desenvolveu uma lista atualizada de 19 patógenos fúngicos de maior importância na saúde pública global. O *Histoplasma capsulatum* figura no grupo de alta prioridade demonstrando a importância deste patógeno na saúde humana (WHO, 2022).

O Brasil é considerado endêmico para a histoplasmose, em especial nas regiões nordeste, centro-oeste, sudeste e sul. A doença no país tem importante relação com indivíduos acometidos pela síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (ALMEIDA et al., 2019; FALCI et al., 2019). No estudo coorte de Falci e colaboradores (2019) envolvendo onze hospitais terciários brasileiros, observou-se que 21,6% dos pacientes com HIV/AIDS foram diagnosticados com histoplasmose. Ainda, para fins de vigilância epidemiológica da AIDS, o Ministério da Saúde considera a histoplasmose disseminada como uma das doenças indicativas da síndrome, o que denota a importância desta coinfecção. Entretanto a precisa determinação da incidência desta micose no país ainda é falha (ALMEIDA et al.,

2019). Não há notificação compulsória para a histoplasmose em território nacional, exceto em dois Estados: Goiás e Rio de Janeiro. Em Goiás a exigência data de 2013 e no Rio de Janeiro, de 2021. No segundo os casos são notificados semanalmente e em ambos o registro é realizado através do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) (GOIÁS, 2013; RIO DE JANEIRO, 2021).

O diagnóstico da doença é desafiador o que dificulta ainda mais a obtenção de informações epidemiológicas, além de aumentar a mortalidade relacionada a doença por seu caráter tardio (RAMOS et al., 2018; ALMEIDA et al., 2019). A confirmação do diagnóstico da histoplasmose ocorre através do isolamento e identificação do fungo em cultura a partir de amostras do paciente. No entanto, esta confirmação leva de 6 a 12 semanas, visto que o *H*. *capsulatum* é um fungo de crescimento lento. Este método ainda pode apresentar resultados falso-negativos em especial nas formas aguda e crônica da doença (AZAR et al., 2020; BRASIL, 2022). Conjuntamente podem ser realizadas análises histopatológicas e sorológicas. A histopatologia a partir de amostras biológicas contempla a identificação de células leveduriformes do fungo presentes em macrófagos parasitados por elas. Contudo esta metodologia apresenta baixa sensibilidade (10% para a forma pulmonar aguda, 40% para a pulmonar crônica e em torno de 25% para a forma disseminada) além de resultados falso-positivos pela similaridade dos achados com outros fungos (WHEAT et al., 2016; BRASIL, 2022). A sorologia, por sua vez, apresenta-se como uma alternativa de detecção indireta da doença, todavia também possui deficiências. Os testes de detecção de anticorpos não apresentam sensibilidade suficiente em pacientes imunocomprometidos (em torno de 50%), por esse motivo os testes de detecção de antígenos tendem a ser mais eficazes. Em ambos, no entanto podem ocorrer reações cruzadas com outros fungos ou doenças (BRASIL, 2022). Alguns exames inespecíficos ainda podem auxiliar no diagnóstico indireto, como hemograma completo com contagem de plaquetas, velocidade de hemossedimentação, proteinograma, provas bioquímicas hepáticas, avaliação renal e avaliação radiológica do tórax (WHEAT et al., 2016; BRASIL, 2022).

H. capsulatum é o agente causador da histoplasmose no continente americano. Trata-se de um fungo saprófito dimórfico que, quando em fase miceliar, pode ser encontrado no solo rico em nitrogênio e na presença de excretas de morcegos e pássaros. Quando presente em um organismo hospedeiro, a fase leveduriforme se manifesta (DEEPE, 2018; VALDEZ et al., 2022). A classificação

clássica divide a espécie em três variedades *H. capsulatum* var. *capsulatum,* distribuída globalmente; *H. capsulatum var. duboisii, encontrada* na África e *H. capsulatum var. farciminosum*, responsável pela infecção em cavalos (TAYLOR et al, 2022). Estudos recentes demonstraram haver diferenças genéticas significativas entre grupos pertencentes à variedade *capsulatum*, culminando na proposição de ao menos 14 novos grupos filogenéticos e quatro linhagens solitárias (TAYLOR et al, 2022).

A fase leveduriforme do fungo se apresenta como células de levedura pequenas, de 2 a 4 micrômetros de diâmetro, redondas a ovais. Quando em tecidos infectados podem ser encontradas comumente dentro de macrófagos, mas também podem se localizar fora destes. Além disso podem apresentar um halo cristalino no seu entorno semelhante a uma cápsula, embora não sejam encapsulados. Macroscopicamente, as colônias desta fase são amareladas, brilhantes e rugosas. (KAUFFMAN, 2007; AZAR; HAGE, 2017).

A fase filamentosa por sua vez é composta por hifas septadas hialinas com microconídios pequenos (2 a 4 micrômetros de diâmetro), redondos e lisos e macroconídios redondos (8 a 15 micrômetros de diâmetro) com paredes grossas e protuberâncias semelhantes a espinhos. As colônias possuem aspecto algodonoso e coloração branca (KAUFFMAN, 2007; AZAR; HAGE, 2017).

A histoplasmose resulta da inalação dos microconídios e fragmentos de hifas produzidos durante a fase miceliar (GARFOOT et al., 2016; RAY; RAPPLEYE, 2019). O diminuto tamanho destas partículas permite seu acesso ao trato respiratório inferior no qual a elevação de temperatura induz a conversão do fungo para a fase leveduriforme bem como a expressão de fatores de virulência. As leveduras são capazes de infectar fagócitos, incluindo células dendríticas, linfócitos polimorfonucleares e principalmente macrófagos alveolares (GARFOOT et al., 2016; RAY; RAPPLEYE, 2019; VALDEZ et al., 2022). Células dendríticas, neutrófilos e células natural killer são capazes de exterminá-las, macrófagos, no entanto são colonizados por elas. Após a indução da fagocitose, o fungo sobrevive em seu vacúolo fagocítico impedindo a acidificação e fusão lisossomal, além de neutralizar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (VALDEZ et al., 2022). Os macrófagos entram em apoptose e com isso o sistema imunológico adaptativo é ativado: a resposta defensiva do tipo Th1 produzirá IL-12, IFN-γ e TNF-α levando ao extermínio do fungo (VALDEZ et al., 2022). A formação de granulomas é bastante comum na

histoplasmose o que pode levar a reativação da doença caso ocorra enfraquecimento do sistema imunológico (MITTAL et al., 2018; VALDEZ et al., 2022). Em indivíduos imunodeprimidos, esta falha na ativação do sistema imunológico adaptativo leva a disseminação hematogênica da doença. (GARFOOT et al., 2016; MCKINSEY, 2021).

Além do dimorfismo, o *H. capsulatum* possui outros fatores de virulência que o auxiliam na execução e manutenção da infecção no hospedeiro. A α-(1,3)-glucana é um exemplo presente em algumas cepas do fungo. O polissacarídeo normalmente encontrado em paredes celulares fúngicas é a β-(1,3)-glucana. Estas moléculas são reconhecidas prontamente por fagócitos através do receptor Dectina-1. Este reconhecimento leva a fagocitose e a produção de citocinas inflamatórias como o TNFα. A α-(1,3)-glucana é um polissacarídeo que quando produzido encontra-se na parte mais superficial da parede das células na fase leveduriforme. Estas moléculas impedem o reconhecimento da β-(1,3)-glucana pelos receptores Dectina-1. Devido ao posicionamento mais externo na parede, α-(1,3)-glucana encobre a β-(1,3)-glucana. o que evita a detecção do fungo pelos fagócitos (RAPPLEYE et al., 2007; BEYHAN; SIL, 2019; VALDEZ et al., 2022).

As proteínas de choque térmico (*heat shock proteins* – HSPs) são comuns em diversos organismos, além de evolutivamente conservadas. Nas células fúngicas são responsáveis pela manutenção de diversas funções celulares, como a promoção do dobramento de proteínas, transporte e degradação destas, entre outros. A HSP60 é um exemplo desta classe presente no *H. capsulatum*. Neste fungo, além de suas funções intracelulares a HSP60 desempenha importante papel na infecção. Expressa na parede celular do *H. capsulatum*, esta molécula promove a fagocitose interagindo com o receptor CR3 (CD11b/CD18) de macrófagos sem a sua completa ativação, o que impede a produção de espécies reativas de oxigênio. Essa interação permite que o fungo sobreviva e se multiplique dentro dos fagócitos (GUIMARÃES et al., 2011; FREGONEZI et al., 2021).

A micose possui diferentes apresentações clínicas dependentes de fatores como as condições do sistema imunológico do hospedeiro, carga fúngica inalada, faixa etária e virulência da cepa (MITTAL et al., 2018; BATISTA et al., 2021). A doença pulmonar isolada surge nas formas aguda ou crônica, as quais podem ser erroneamente diagnosticadas como pneumonia ou tuberculose devido à sintomatologia comum e exames radiológicos inespecíficos (AZAR et al., 2021). Na

forma aguda, são comuns sintomas como tosse, mal-estar, febre e calafrios, prolongando-se por até duas semanas (TOBÓN; GOMEZ, 2021). Diferentemente, a forma crônica progride durante meses ou anos, afetando fumantes crônicos e pacientes com alterações pulmonares prévias como enfisema. O paciente apresenta constante declínio na capacidade respiratória, acompanhado de tosse produtiva, febre, perda de peso e suores noturnos (AZAR et al., 2017; TOBÓN; GOMEZ, 2021). A disseminação da doença ocorre pela via hematogênica do paciente o qual apresenta sintomas como febre, fadiga e perda de peso. Inúmeros tecidos podem ser atingidos especialmente fígado, baço, trato gastrointestinal e medula óssea (AZAR et al., 2021).

O arsenal antifúngico para o tratamento da histoplasmose é restrito, composto apenas por anfotericina B e azóis. Largamente utilizada no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas, a administração de anfotericina B exige acompanhamento rigoroso, pois a alta toxicidade do medicamento torna o tratamento arriscado (ARRUDA et al., 2016; CAVASSIN et al., 2021). Seu mecanismo de ação consiste na formação de poros na membrana plasmática de fungos por ligação ao ergosterol. Em células mamíferas a anfotericina B interage, ainda que em menor escala, com o colesterol de membrana. Esta interação por si mesma é responsável pela toxicidade apresentada em tecidos como o renal, cardíaco e em células sanguíneas. Ademais o fármaco induz a vasoconstrição direta de arteríolas aferentes renais, o que aumenta a nefrotoxicidade, e produz desequilíbrio eletrolítico (CAVASSIN et al., 2021; STEWART; PATERSON, 2021). Ainda podem ser observados efeitos adversos agudos relacionados à infusão como calafrios, vômitos e febre, em especial para a formulação com desoxicolato. Estes efeitos devem ser prevenidos com tratamento pré-medicação envolvendo anti-histamínicos, analgésicos e corticosteroides (CAVASSIN et al., 2021).

A formulação mais antiga e com maior toxicidade é a composta por desoxicolato de sódio. Versões mais recentes do medicamento, compostas por carreadores lipídicos, apresentam menor toxicidade, no entanto maior valor. Falci e Pasqualotto (2015) relataram a grande disparidade no custo de aquisição destas formulações no Brasil em 2015: 50mg de anfotericina desoxicolato custariam aproximadamente R$ 15, enquanto para a mesma quantidade de medicamento em formulações lipídicas os valores se encontrariam entre R$ 1.000 e R$ 1.500.

Relatos de resistência fúngica a anfotericina B são raros comparados a outros antifúngicos. De modo geral, os mecanismos de resistência estão relacionados a alterações na quantidade de ergosterol na membrana ou produção de compostos semelhantes a ele, o que diminui a taxa de ligação do fármaco a membrana fúngica. *Candida* spp. é o fungo de maior importância com relação a presença de resistência em isolados (ELLIS, 2002; LIMA et al., 2019). Destaca-se a cepa emergente *C. auris*, cuja resistência a antifúngicos estende-se a anfotericina B de forma moderada (CHEN et al., 2020). Por ora, não há relatos de resistência a este fármaco para o *H. capsulatum* (WHEAT et al., 2009). No entanto, Duin e colaboradores (2002) observaram que a melanina produzida pelo fungo durante a infecção é capaz de diminuir sua sensibilidade a anfotericina B. Ademais, parte dos tratamentos para a doença disseminada falham devido a administração inadequada ou demora no tratamento, levando pacientes a morte (WHEAT et al., 2009).

O itraconazol é o medicamento de escolha para casos leves e moderados da doença, também para a fase de manutenção em casos graves (AIDÉ, 2009). Embora possua menor nível de toxicidade associado a seu uso, é capaz de provocar danos a longo prazo como hepatotoxicidade, pancreatite, alterações em níveis hormonais, miosite e neuropatias periféricas (BENITEZ; CARVER, 2019; ADIS MEDICAL WRITERS, 2019).

Assim como para a anfotericina B, não há relatos de resistência ao itraconazol para o *H. capsulatum* (WHEAT et al., 2009). No entanto, a biodisponibilidade do fármaco apresenta alta variação tanto entre pacientes quanto entre formulações. O itraconazol é melhor absorvido em pH ácido, essa condição impacta diretamente na concentração sérica do fármaco e consequentemente no tratamento (DE BEULE; VAN GESTEL, 2001; WHEAT et al., 2009). As apresentações em cápsulas e em solução oral não são intercambiáveis, pois a solução apresenta maior biodisponibilidade. Além disso, a forma de administração também se altera: embora ambas sejam de uso oral, as cápsulas devem ser administradas após as refeições e a solução em jejum (ASHP, 2023). Outro ponto de alteração da biodisponibilidade são as interações medicamentosas. Fármacos que aumentam o pH estomacal como antiácidos e inibidores de bomba de prótons, devem ser evitados pois diminuem sua absorção. O itraconazol inibe significativamente a isoenzima fúngica CYP3A, e com menor afinidade sua equivalente humana. Deste modo, fármacos metabolizados por esta rota tem seu perfil farmacocinético alterado (DE BEULE; VAN GESTEL, 2001;

WHEAT et al., 2009). Um grupo de fármacos especialmente importante afetado pelo itraconazol são os antirretrovirais. Diversos fármacos utilizados no tratamento da infecção pelo vírus HIV sofrem alterações quando administrados em conjunto com o itraconazol como maraviroc, atazanavir, efavirenz, entre outros. O que leva a um impasse no tratamento de pacientes coinfectados por estas duas doenças (DE BEULE; VAN GESTEL, 2001; ASHP, 2023).

O fluconazol é utilizado como alternativa ao itraconazol apenas quando o paciente possui sensibilidade ao itraconazol. Este fármaco apresenta menor eficácia contra a histoplasmose, com alta taxa de recidivas, além do surgimento de resistência (WHEAT et al., 2009; MCKINSEY, 2021).

O desenvolvimento de novos antifúngicos é vital para contornar questões envolvendo toxicidade, resistência, interações e dificuldades de administração e absorção. No entanto é também problemático, uma vez que como eucariotos os fungos compartilham estruturas alvo semelhantes aos mamíferos, aumentando a dificuldade em obter fármacos de baixo risco e com efeito terapêutico adequado (CAMPOY; ADRIO, 2017; STEWART; PATERSON, 2021).

1.2. BIOFILMES

Biofilmes são comunidades altamente organizadas de microrganismos, aderidos uns aos outros e a uma superfície, envoltos por uma matriz extracelular polissacarídica de formação própria. Estima-se que 95% dos microrganismos na natureza estejam associados a biofilmes. Sabe-se que o *H. capsulatum* também possui a capacidade de formar estas estruturas (PITANGUI et al., 2012, 2016; COSTA-ORLANDI et al., 2017; SARDI et al., 2014).

Os biofilmes fúngicos estabelecem-se de modo similar aos biofilmes bacterianos. Inicialmente ocorre a adsorção do propágulo à uma superfície, seguindo-se à sua adesão e formação de micro colônias e matriz extracelular. Completando o ciclo ocorre a maturação da estrutura e a dispersão de fragmentos do biofilme para que se inicie a colonização de um novo sítio (COSTA-ORLANDI et al., 2017; RAMOS et al., 2018).

Este sistema de organização entre células é vantajoso pois lhes confere maior resistência a fatores ambientais externos, químicos e físicos (MITTAL et al., 2018; COSTA-ORLANDI et al., 2017). A sua matriz extracelular mantém as células coesas,

oferece proteção física contra o sistema imunológico do hospedeiro e contra fármacos antifúngicos. Ademais, possui a capacidade de reter água e nutrientes tornando as infecções persistentes e dificultando o seu tratamento, bem como a ação do sistema imunológico do hospedeiro (MITTAL et al., 2018; COSTA-ORLANDI et al., 2017).

Biofilmes de *H. capsulatum* apresentam melhor desenvolvimento quando cultivados em meio de cultura HAM-F12 e alocados em ambiente de microaerofilia. O meio deve ser suplementado com glicose, ácido glutâmico e cisteína, importantes fatores de crescimento para o fungo. Além disso, micronutrientes como zinco e cobre, importantes na interação fungo-hospedeiro, também estão presentes neste meio. Estes biofilmes são capazes de se desenvolver em aerobiose, no entanto, é na condição de microaerofilia que apresentam maior atividade metabólica e quantidade de biomassa. Durante a infecção no hospedeiro, o *H. capsulatum* é capaz de sobreviver e se multiplicar dentro de macrófagos, além de sobreviver dentro granulomas. O que indica que o fungo é capaz de adaptar-se aos diferentes níveis de oxigênio que lhe são apresentados durante o processo infeccioso (GONÇALVES et al., 2020; DUBOIS, et al, 2015).

A adesão de células planctônicas às superfícies e à outras células é uma etapa essencial da formação de biofilmes. Pitangui e colaboradores (2012) demonstraram a capacidade de duas cepas de *H. capsulatum* (EH-315 e 60I) aderirem a superfície de pneumócitos A549, bem como comprovaram sua capacidade de formar biofilmes em superfícies abióticas. A proteína HSP60 tem papel determinante na formação de biofilmes de *H. capsulatum*. Fregonezi e colaboradores (2021) observaram que o bloqueio da HSP60 com anticorpo monoclonal produziu biofilmes com atividade metabólica e biomassa reduzidas. A leitura através de microscopia confocal de varredura apresentou biofilmes tratados mais delgados e com menor quantidade de matriz extracelular. O que indica que a HSP60 pode agir na adesão com o substrato ou entre células, operando como uma adesina e colaborando com a formação de biofilmes.

Polissacarídeos são componentes abundantes de matriz extracelular em biofilmes. A cepa EH-315 de *H. capsulatum* produz matriz rica em exopolissacarídeos insolúveis e polissacarídeos intracelulares (PITANGUI et al., 2021). Em biofilmes de *Candida albicans,* a presença de diversas glucanas e mananas é considerada importante fator de resistência a fármacos. Essas moléculas

sequestram xenobióticos, possivelmente através de interações não-covalentes, o que impede sua penetração no biofilme e consequente ação sobre as leveduras (NET; ANDES, 2020).

O *quorum sensing* é um importante mecanismo de comunicação entre microrganismos, dependente da densidade celular, que controla aspectos como a produção de fatores de virulência e a formação de biofilmes através da produção de compostos chamados auto-indutores. Presume-se que este mecanismo tenha grande importância na fisiologia e resistência dos biofilmes devido à alta densidade celular nos mesmos (SARDI et al., 2014). O tirosol, molécula de *quorum sensing* derivada da tirosina, possui importante papel em biofilmes de *Candida* spp., agindo como estimulante na produção de biofilmes de *C. albicans* e *C. auris*. Outra molécula de *quorum sensing*, farnesol, parece trabalhar em conjunto com o tirosol em biofilmes de *C. albicans*, sendo mais presente em biofilmes maduros onde possivelmente auxilia a liberação de leveduras para dispersão destes biofilmes (RODRIGUES; CERNAKOVA, 2020). Para o *H. capsulatum*, não há estudos específicos sobre o *quorum sensing* em biofilmes da espécie. No entanto, sabe-se que na forma planctônica a quantidade de polissacarídeos α-(1,3)-glucana na parede do fungo é diretamente proporcional à densidade celular no meio (KÜGLER et al., 2000). A modulação da produção da α-(1,3)-glucana dependente da densidade celular assemelha-se ao mecanismo de *quorum sensing* observado em bactérias. Kügler e colaboradores observaram que quando as leveduras advindas de uma cultura numerosa foram diluídas em novo meio de cultura, apenas cerca de 30% destas apresentavam α-(1,3)-glucana detectável após 24 h. A porcentagem permaneceu baixa até a chegada da fase estacionária, quando a α-(1,3)-glucana tornou-se detectável em praticamente todas as células.

Durante o processo infeccioso, a interação patógeno-hospedeiro é capaz de regular não apenas o comportamento das células fúngicas, mas também o das células infectadas. Quando há formação de biofilmes, as respostas celulares podem diferir daquelas causadas por patógenos planctônicos (PITANGUI et al., 2021). Pitangui e colaboradores (2021) observaram que a infecção causada por biofilmes de *H. capsulatum* promove uma expressão distinta de microRNAs quando comparada a infecção por células planctônicas. No estudo ocorreram alterações na expressão em linhagem monocítica THP-1 quando infectada pelo biofilme da cepa EH-315. As vias de sinalização Wnt e p53 mostraram-se alteradas o que promoveria

a sobrevivência intracelular do fungo, bem como alteraria a resposta celular a diferentes tipos de estresse.

Outro importante fator de resistência em biofilmes são as células persisters, trata-se de um grupo de células metabolicamente dormentes inseridas na camada basal mais profunda do biofilme (KAUR; NOBILE, 2023). Em biofilmes de *C. albicans*, estas células exibem alta resistência a fármacos independente de bombas de efluxo ou composição estrutural de membrana plasmática e parede celular. Pacientes com quadros de infecção crônicos apresentaram maior quantidade de células persisters do que aqueles com quadros de candidíase intermitentes, demonstrando a importância destas células no processo infeccioso (KAUR; NOBILE, 2023).

1.3. PEPTIDEOS ANTIMICROBIANOS (AMPs)

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) são moléculas componentes da imunidade inata de diversos organismos. A partir da década de 60, ganharam a atenção da comunidade científica por se apresentarem como alternativa às moléculas antimicrobianas disponíveis em um contexto de aumento da incidência de patógenos resistentes a estas (DI SOMMA et al., 2020). Atualmente há estudos demonstrando a atividade antimicrobiana destes peptídeos contra diversos organismos e até mesmo atividade contra células tumorais (DI SOMMA et al., 2020; WANG et al., 2018).

Recentemente, as propriedades antibiofilme destes peptídeos também passaram a ser investigadas, demonstrando que algumas destas moléculas possuem mecanismos de ação variados e podem alterar aspectos específicos da formação de biofilmes, como interferência nos processos de adesão, formação de matriz extracelular, *quorum sensing*, entre outros (BATONI et al., 2016; DI SOMMA et al., 2020).

Peptídeos antimicrobianos catiônicos interagem com as membranas celulares através de diversos mecanismos, os principais já descritos incluem os tipos “carpete”, “barril” e “toroidal” (LEI et al., 2019; MATSUZAKI, 2019; GALEANE et al., 2019). No primeiro tipo, os peptídeos interagem com a área externa da bicamada lipídica de forma paralela, o acúmulo de peptídeos na região de interação eventualmente leva a permeação destes pela bicamada com consequente colapso

desta (LEI et al., 2019; MATSUZAKI, 2019). No mecanismo do tipo “barril”, a região hidrofóbica da cadeia interage com a região central da bicamada lipídica, provocando a inserção dos peptídeos através da bicamada, formando um poro (LEI et al., 2019; MATSUZAKI, 2019). Finalmente, no tipo “toroidal”, os peptídeos, interagindo com a área externa da membrana, causam desestabilização da estrutura levando a curvatura desta membrana, e a formação do poro (LEI et al., 2019; MATSUZAKI, 2019). A formação de poros e desestruturação da membrana levam a citólise em todos os casos (DE SOUZA et al., 2015; GALEANE et al., 2019).

Os peptídeos da classe dos mastoparanos são especialmente numerosos no veneno de vespas como *Polybia paulista*, *Apoica pallens*, entre outras. Trata-se de moléculas policatiônicas, de cadeia curta, com a presença de resíduos de lisina em diferentes posições. Estes resíduos parecem exercer influência nos mecanismos sugeridos de interação com membranas celulares (GALEANE et al., 2019; SINGULANI et al., 2019).

Os mastoparanos utilizados no presente trabalho (MK5789, MK58911 e MK4589) foram desenvolvidos pelo grupo do Prof. Dr. Mário Sérgio Palma, no Instituto de Biociências de Rio Claro (UNESP). São derivados de um mastoparano natural encontrado no veneno da vespa *Apoica pallens*.

O design racional dos peptídeos foi baseado no posicionamento de lisinas em mastoparanos naturais. Normalmente, estes peptídeos possuem resíduos de lisina nas posições 4/5 e/ou 11/12 da cadeia. Sabe-se ainda que a presença de cargas positivas nas posições 4/5 e/ou 11 a 13 aumentam sua atividade antimicrobiana. Resíduos de lisina nestas posições aumentariam a sua eficiência lítica por serem capazes de manter a estrutura helical no segmento, o que promoveria a anfipacidade do peptídeo com uma superfície hidrofóbica mais homogênea. Portanto modificações no posicionamento de resíduos de lisina foram realizadas com o objetivo de melhorar sua atividade antimicrobiana, assim como reduzir a atividade hemolítica e reduzir/manter a degranulação de mastócitos (DE SOUZA et al., 2015).

Estes peptídeos apresentaram atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus pneumoniae, Staphylococcus mutans, Bacillus cereus, Bacillus thuringiensis, Enterococcus faucium, Enterococcus hirae, Rhodococcus equi e Micrococcus luteus*) e bactérias gram-negativas *(Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella choleraesuis e Salmonella typhimurium*) (DE SOUZA et al., 2015).

O grupo de pesquisa da Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida e da Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini do Núcleo de Proteômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP) tem buscado peptídeos como abordagem alternativa antifúngica e antibiofilme para utilização no desenvolvimento de novas moléculas ou para o auxílio em combinações futuras com outros antifúngicos padrões na terapia. Deste modo, em parceria com o grupo do Prof. Dr. Mário, a atividade antifúngica destes peptídeos MKs foi avaliada em trabalhos anteriores, apresentando-se positiva contra *Cryptococcus neoformans, Cryptococcus gattii, Paracocciodioides brasiliensis e Paracocciodioides lutzii* para o MK58911; e *Candida albicans* para os três MKs citados acima (GALEANE et al., 2019, SINGULANI et al., 2019).

Os moricins, por sua vez, são uma classe de AMPs isolados de insetos da ordem Lepidoptera. São peptídeos anfipáticos, que após ativados por fatores de transcrição, se tornam capazes de aumentar a permeabilidade de membranas bacterianas e fúngicas. A traça da cera *Galleria mellonella* é capaz de produzir peptídeos análogos de moricin altamente ativos contra contra fungos leveduriformes e filamentosos (SHEEHAN et al., 2018). Os análogos de Moricin C3, PepM1 e PepM2, foram desenvolvidos pelo Dr. Paulo César Gomes e colaboradores, no Núcleo de Proteômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP) seguindo a estratégia utilizada no desenvolvimento dos MKs, baseada na carga líquida, no número e posicionamento de resíduos de lisina e na região hidrofóbica. Em trabalho do grupo, PepM2 apresentou atividade antifúngica contra *Candida albicans* e PepM1 demonstrou ausência de toxicidade em modelo *Danio rerio* (GALEANE et al., 2019).

No presente trabalho, objetivou-se ampliar o estudo dos peptídeos citados por meio da avaliação da atividade anfúngica e antibiofilme frente ao *H. capsulatum*.

1.4. MODELOS CELULARES

O cultivo celular de células mamíferas em modelo monocamada foi durante muitos anos uma alternativa valiosa a utilização de modelos animais clássicos, permitindo maior controle experimental, com menores restrições éticas e resultados mais homogêneos (GONÇALVES; SOBRAL, 2020). Atualmente ainda são largamente utilizadas como opções *in vitro* na investigação de respostas celulares a

estímulos e compostos xenobióticos. No entanto, recentemente, culturas em monocamada têm sido substituídas por culturas tridimensionais devido a maior similaridade destas com os microambientes naturais encontrados em tecidos vivos (DUVAL et al., 2017; GONÇALVES; SOBRAL, 2020).

A cultura tridimensional é caracterizada por um conjunto de células dispostas em uma estrutura 3D. Este tipo de disposição, permite interações célula-célula e célula-matriz que estimulam a criação de microambientes e variações na proliferação, diferenciação e viabilidade celulares, aproximando o modelo das condições encontradas *in vivo* (GRÄSSER et al., 2017).

Esferóides configuram um tipo de cultura celular tridimensional, no qual as células se agregam, sem a sustentação de um *scaffold*, formando estruturas esféricas (VASO et al., 2022). Al-Husaini e colaboradores (2020) observaram que o modelo esferóide de células de câncer colorretal mostrou-se resistente a apoptose provocada pelo peptídeo NP1 quando comparado ao modelo monocamada. A ambientação dos esferóides permite a expressão de moléculas sinalizadoras pelas células, pois são submetidas a gradientes de oxigênio e nutrientes, tornando a resposta a xenobióticos similar àquela obtida *in vivo* (VASO et al., 2022).

1.5. MODELO ALTERNATIVO *Danio rerio*

O peixe teleósteo *Danio rerio*, conhecido no meio acadêmico como Zebrafish, é um organismo vertebrado complexo. Capaz de apresentar sofisticados mecanismos responsivos a substâncias exógenas, possui ainda alto grau de homologia com o genoma humano. Este vertebrado tem ganhado visibilidade ao longo dos últimos anos como modelo animal alternativo em diversas áreas, como a da toxicologia. A fertilização externa com a produção de embriões transparentes, aliados ao alto grau de conservação evolutiva do processo de embriogênese, fazem do Zebrafish um modelo particularmente interessante para experimentos de toxicidade embrionária (MEYERS, 2018; CONCEA, 2017).

Este teleósteo, pertencente à família dos ciprinídeos, é utilizado como modelo animal desde a década de 30, no entanto, apenas a partir da década de 80, o seu uso como modelo alternativo ganhou notoriedade (MEYERS, 2018). Originário da região que compreende Índia, Bangladesh e Nepal, é próprio de climas tropicais e subtropicais úmidos (LEE, 2020). Dotado de grande fertilidade, o zebrafish inicia o

período reprodutivo tipicamente entre 10 e 12 semanas pós-fertilização, e em cativeiro, o acasalamento e desova transcorrem durante o ano inteiro. A fecundação ocorre externamente gerando entre 100 e 200 embriões por casal. Após 36 horas os embriões apresentam a maior parte dos sistemas formados e entre 48 e 72 horas pós-fertilização eclodem, tornando-se larvas. Os animais permanecem fecundos por 2 a 3 anos (MEYERS, 2018; CASTRANOVA, 2020). Trata-se de um animal bastante resistente, com capacidade para adaptar-se a diversas condições ambientais (LAWRENCE, 2007).

Como modelo alternativo em pesquisa científica, o zebrafish apresenta uma série de vantagens: trata-se de um animal pequeno, de fácil manutenção, com alta capacidade de reprodução, cuja fecundação e desenvolvimento embrionário ocorrem externamente e de forma rápida. (CASSAR, 2020; TEAME, 2019). O desenvolvimento e aperfeiçoamento de tecnologias relacionadas à biologia molecular e à microscopia ampliaram o uso do modelo em diversas áreas (Meyers, 2018; Pereira, 2019). Atualmente o emprego do zebrafish, especialmente em fase embrionária, no campo da toxicologia é bastante amplo. A aplicabilidade do modelo se deve a alta conservação de genes e de mecanismos que determinam a resposta a xenobióticos presentes em vertebrados. Ainda à possibilidade de observação do desenvolvimento embrionário *in vivo* e em tempo real devido à translucidez de embriões e larvas jovens. E finalmente à existência de metodologias oficiais validadas e aceitas internacionalmente (OECD, 2013; CONCEA, 2022; HAHN; SADLER, 2020; CASSAR, 2020).

1.6. MODELO ALTERNATIVO *Tenebrio molitor*

O besouro *Tenebrio molitor* é comumente reconhecido como uma praga agrícola. Encontrado em depósitos de cereais, grãos e farinhas, apresenta preferência por ambientes secos e escuros (OLIVEIRA et al., 2021). Seu ciclo de vida, caracterizado pelo desenvolvimento holometábolo, inicia-se com a eclosão dos ovos originando larvas. Após sucessivos *instars* definidos pelo processo de ecdise, estas tornam-se besouros adultos (SOUZA et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2021). O desenvolvimento completo do inseto leva aproximadamente cinco meses, podendo estender-se por até doze. A duração das fases do ciclo é altamente dependente de

fatores extrínsecos ambientais como temperatura, alimentação, densidade populacional, umidade, entre outros (SOUZA et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2021).

O estágio larval do animal é frequentemente utilizado para a alimentação animal devido ao alto teor proteico. Recentemente, a União Européia aprovou seu uso também na alimentação humana, tornando-o o primeiro inseto aprovado para consumo humano pela Agência Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) (EFSA, 2021; SOUZA et al., 2018).

Insetos tem sido cada vez mais utilizados em áreas da pesquisa científica. As larvas de *T. molitor* são capazes de decompor matrizes de lignocelulose (composto abundante em resíduos plásticos), sendo consideradas uma possível solução futura na contenção da poluição ambiental ocasionada por estes resíduos (SANGIORGIO et al., 2021). Nas áreas biológicas, o *T. molitor* tem sido utilizado como modelo alternativo para o estudo de infecções e avaliação toxicológica de compostos (SOUZA et al., 2018). Além da ausência de restrições éticas existentes para modelos vertebrados clássicos, o *T. molitor* possui sistema imunológico similar ao sistema inato presente em vertebrados, capaz de respostas a nível humoral e celular (SOUZA et al., 2018). Além disso, em comparação com modelos similares, como a *Galleria mellonella*, o *T. molitor* exibe vantagens como a facilidade de manutenção da criação e de obtenção de novos animais, além de se mostrar relativamente mais econômico em termos de manutenção (SOUZA et al., 2018). O *T. molitor* assim como a *G. mellonella* pode ser mantido em uma faixa de temperatura de 25 ºC a 37 ºC, o que permite sua utilização em ensaios de infecção que exigem a incubação em temperaturas similares as do hospedeiro. Ainda o protocolo de inoculação através de injeção entre os esternites da larva, permite controle sobre a quantidade de inóculo ou xenobiótico aplicado a cada animal (SOUZA et al., 2015).

2. OBJETIVOS

Avaliar as atividades antifúngica e antibiofilme de três peptídeos análogos de mastoparanos (MK5789, MK58911 e MK4589) e dois peptídeos análogos de Moricin C3 provenientes da larva de *Galleria mellonella* (PepM1, PepM2) frente ao fungo *H. capsulatum*. Avaliar a segurança toxicológica do derivado de mastoparano MK58911.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a sensibilidade fúngica do *H. capsulatum* nas formas planctônica e de biofilme frente aos peptídeos MK5789, MK58911, MK4589, PepM1 e PepM2.
- Quantificar a biomassa de biofilmes de *H. capsulatum* expostos aos peptídeos MK5789, MK58911, MK4589, PepM1 e PepM2.
- Avaliar a citotoxicidade do peptídeo MK58911 na linhagem A549 em modelos monocamada e esferóide.
- Avaliar a embriotoxicidade do peptídeo MK58911 em embriões de *Danio rerio.*
- Avaliar a toxicidade do peptídeo MK58911 em larvas de *Tenebrio molitor.*
- Realizar a cromatografia de afinidade frente ao peptídeo MK58911 com o extrato total do *H. capsulatum* na forma planctônica.
- Avaliar a atividade sinérgica entre o peptídeo MK58911 e o itraconazol frente ao biofilme de *H. capsulatum*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MICRORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

No presente trabalho utilizou-se os seguintes microrganismos: *H. capsulatum* cepa G186A (ATCC 26029) gentilmente disponibilizada pela Drª. Roseli Zancopé Oliveira da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz); *H. capsulatum* cepa EH-315 isolada do intestino de um exemplar de morcego da espécie *Mormoops megalophylla,* capturado no Estado de Guerrero, México. Esta cepa foi cedida gentilmente pela Profª. Drª. Maria Lúcia Taylor da Universidade Nacional do México (UNAM) e está depositada na coleção do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, da Escola de Medicina da UNAM. A coleção está registrada na federação mundial para coleções de cultura sob o código LIH-UNAM WDCM817.

Cultivou-se ambas as cepas nas formas planctônica e de biofilme. Para tanto foram mantidas em meio ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) suplementado com glicose (10 g/L) e L-cisteína (1 g/L). Antecedendo o experimento, realizou-se o seu repique em Ham´*s F12 Nutrient Mixture* (HAM-F12) suplementado com glicose (18,2 g/L), ácido glutâmico (1 g/L), HEPES (6 g/L) e L-cisteína (8,4 mg/L), a 37º C. As culturas

planctônicas foram colocadas sob agitação (150 RPM) e as culturas de biofilme sob microaerofilia em microplacas de 96 poços, ambas por 144h (GONÇALVES et al., 2020; BALTAZAR et al., 2018; FECHER et al., 2016 com modificações).

3.2. PEPTÍDEOS

Os ensaios de determinação da sensibilidade fúngica foram realizados com os peptídeos compilados na Tabela 1. Os peptídeos consistem em três análogos de mastoparanos (MK5789, MK58911 e MK4589) e dois análogos de Moricin C3 da larva *G. mellonella* (PepM1, PepM2), sintetizados por empresa especializada (AminoTech – Pesquisa e Desenvolvimento, SP – Brasil). Os ensaios toxicológicos e a cromatografia de afinidade foram realizados apenas com o peptídeo MK58911. Para a obtenção das soluções estoque os peptídeos foram solubilizados em água ultrapura tipo 1 resultando em soluções de 2 mg/mL a 5,4 mg/mL.

Tabela 1. Estruturas dos peptídeos analisados no ensaio de determinação da sensibilidade fúngica e seus peptídeos originários.

Peptídeos	Estrutura	Estrutura dos peptídeos originais
PepM1	GAIKKGGKIIKKGL-NH2	MKLTGLFLMIMAVLALFVGAGQA DPKVPIGAIKKGGKIIKKGLGVIGA AGTAHEVYSHVKNRK-NH_2
PepM2	IGAIKKGGKIIKKGLGVIGAAGT AHEVYSHVKNRQ-NH_2	
MK5789	INWLKIKKKVAGML-NH_2	INWLKIAKKVAGML-NH_2
MK58911	INWLKIAKKVKGML-NH_2	
MK4589	INWKKIAKKVAGML-NH_2	

Fonte: elaborada pela autora.

3.3. DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE FÚNGICA AOS PEPTÍDEOS

Os testes de sensibilidade foram realizados com base nos artigos de Pitangui et al. (2012) e Gonçalves et al. (2020). O preparo das microplacas de 96 poços para este ensaio foi realizado da seguinte forma: inicialmente adicionou-se os peptídeos em teste solubilizados em meio de cultura (HAM-F12 suplementado). Realizou-se a diluição seriada dos peptídeos nas microplacas resultando em 100 µL de volume por poço com os peptídeos em concentração 2x acima da concentração final requerida, para a obtenção das dez concentrações analisadas.

Os ensaios com células de biofilme iniciaram-se da seguinte forma: após a maturação dos biofilmes (144 h), descartou-se os meios de cultura. Adicionou-se 100 µL de solução estéril tampão fosfato salino (PBS) aos poços e os biofilmes foram removidos destes através de raspagem mecânica. As células foram recolhidas em um tubo estéril. Os ensaios com leveduras planctônicas iniciaram-se com a centrifugação e lavagem (PBS) do pellet. Após duas lavagens o pellet foi ressuspenso em PBS no mesmo tubo. Deste ponto em diante o protocolo coincide para os ensaios com células de biofilmes e com células planctônicas. Após estabelecida a viabilidade com corante Azul de Trypan, preparou-se o inóculo em meio de cultura na concentração de $1x10^6$ células/mL. Adicionou-se os inóculos (100 µL/poço) às microplacas contendo a diluição seriada dos peptídeos realizada previamente. Após a junção, as concentrações finais obtidas para os peptídeos foram de 500 a 0,97 µg/mL e o inóculo final foi de $5x10^5$ células/mL. Ainda, nas mesmas microplacas foram alocados o controle de esterilidade do meio, constituído apenas do meio de cultura e o controle de crescimento contendo o inóculo em meio de cultura sem a presença de peptídeos. Incubou-se as placas a 37º C, por 144 horas, em agitação à 150 RPM para culturas planctônicas e em microaerofilia, sem agitação, para biofilmes. Realizou-se o ensaio de sensibilidade com os fármacos comerciais anfotericina B e itraconazol (concentrações finais de 2,5 a 0,004 µg/mL) para o *H. capsulatum* em ambas as cepas e formas. Foram realizados quatro experimentos independentes para o MK58911 e três para o restante dos peptídeos, com as concentrações em triplicata ou quadruplicata.

A análise da viabilidade fúngica foi realizada através do corante de viabilidade metabólica resazurina para ambas as formas (culturas planctônicas e biofilmes). Acrescentou-se 20 µL de resazurina (0,02%) aos poços, seguindo-se à incubação a

37º C por 24h e subsequente leitura em espectrofotômetro (Epoch™ 2 Microplate Spectrophotometer - Biotek) nos comprimentos de onda 570nm e 600nm (PEETERS et al., 2008; PAULA; SILVA et al., 2013).

Realizou-se ainda a quantificação de biomassa dos biofilmes com o corante cristal violeta. Para tanto, inicialmente descartou-se os meios de cultura dos poços, seguindo-se a lavagem destes com PBS. Em seguida fixou-se os biofilmes com 200 µL de metanol por 15 minutos com posterior descarte e secagem da microplaca a temperatura ambiente. Adicionou-se 200 µL de cristal violeta (0,1%) por 20 minutos, após os quais houve o descarte e lavagem dos poços com água destilada até remoção do excesso de corante. A sua ressolubilização foi realizada com 200 µL ácido acético (33%) com posterior leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570nm (PEETERS et al., 2008; GONÇALVES et al., 2020).

3.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SINÉRGICA

A avaliação do sinergismo foi realizada com o objetivo de verificar a atividade antifúngica contra o biofilme de *H. capsulatum* por meio da união entre o MK58911 e o itraconazol (fármaco de escolha contra a histoplasmose).

Os biofilmes foram maturados e recolhidos como descrito nos itens 3.1 e 3.3 acima. Os experimentos foram realizados em microplacas de 96 poços as quais foram ordenadas da seguinte forma para o ensaio do tabuleiro de xadrez: na coluna 1, de A a D, adicionou-se 200 µL do meio HAM-F12 suplementado como descrito anteriormente (controle de esterilidade). De E a H, adicionou-se 100 µL do meio e 100 µL do inóculo previamente preparado em HAM-F12 suplementado na concentração de $1x10^6$ células/mL de *H. capsulatum* (inóculo final: $5x10^5$ células/mL) (controle de crescimento). Na coluna 12 foi realizada a diluição seriada do fármaco itraconazol (concentrações finais 0,004 a 0,00006 µg/mL) e na linha H, a diluição seriada do MK58911 (concentrações finais 500 a 0,97 µg/mL), em ambos foi ainda adicionado o inóculo a $1x10^6$ células/mL (inóculo final: $5x10^5$ células/mL). Para análise do sinergismo os compostos foram combinados em diversas concentrações. Deste modo, a montagem da microplaca nesta fase iniciou-se com a diluição seriada do MK58911 na coluna 2, nas linhas A a G. Adicionou-se nesses poços 50 µL do peptídeo em concentração 4x acima a inicial (2000 µg/mL) e realizou-se a diluição seriada nas colunas 3 a 11 (diluições no sentido das linhas). Em seguida, foi

acrescentado o itraconazol previamente diluído em concentrações 4 vezes acima das iniciais (0,016 a 0,00024 µg/mL), novamente 50 µL por poço, nas colunas 2 a 11, nas linhas A a G, com as diluições organizadas no sentido das colunas (Quadro 1). Logo após acrescentou-se 100 µL do inóculo em concentração mencionada acima nos poços com os compostos combinados. Incubou-se as placas a 37º C, por 144 horas, sob microaerofilia, sem agitação. A leitura foi realizada com o corante resazurina como descrito no item 3.3. Foram realizados dois experimentos independentes.

Quadro 1. Esquema das microplacas montadas para o ensaio de atividade sinérgica. Valores de concentração final dos compostos em µg/mL. Valores em itálico: MK58911, Valores em negrito: itraconazol. CE: controle de esterilidade, CC: controle de crescimento.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CE	*500* **0,004**	*250* **0,004**	*125* **0,004**	*62,5* **0,004**	*31,2* **0,004**	*15,6* **0,004**	*7,8* **0,004**	*3,9* **0,004**	*1,9* **0,004**	*0,9* **0,004**	**0,004**
B	CE	*500* **0,002**	*250* **0,002**	*125* **0,002**	*62,5* **0,002**	*31,2* **0,002**	*15,6* **0,002**	*7,8* **0,002**	*3,9* **0,002**	*1,9* **0,002**	*0,9* **0,002**	**0,002**
C	CE	*500* **0,001**	*250* **0,001**	*125* **0,001**	*62,5* **0,001**	*31,2* **0,001**	*15,6* **0,001**	*7,8* **0,001**	*3,9* **0,001**	*1,9* **0,001**	*0,9* **0,001**	**0,001**
D	CE	*500* **0,0005**	*250* **0,0005**	*125* **0,0005**	*62,5* **0,0005**	*31,2* **0,0005**	*15,6* **0,0005**	*7,8* **0,0005**	*3,9* **0,0005**	*1,9* **0,0005**	*0,9* **0,0005**	**0,0005**
E	CC	*500* **0,00025**	*250* **0,00025**	*125* **0,00025**	*62,5* **0,00025**	*31,2* **0,00025**	*15,6* **0,00025**	*7,8* **0,00025**	*3,9* **0,00025**	*1,9* **0,00025**	*0,9* **0,00025**	**0,00025**
F	CC	*500* **0,00012**	*250* **0,00012**	*125* **0,00012**	*62,5* **0,00012**	*31,2* **0,00012**	*15,6* **0,00012**	*7,8* **0,00012**	*3,9* **0,00012**	*1,9* **0,00012**	*0,9* **0,00012**	**0,00012**
G	CC	*500* **0,00006**	*250* **0,00006**	*125* **0,00006**	*62,5* **0,00006**	*31,2* **0,00006**	*15,6* **0,00006**	*7,8* **0,00006**	*3,9* **0,00006**	*1,9* **0,00006**	*0,9* **0,00006**	**0,00006**
H	CC	*500*	*250*	*125*	*62,5*	*31,2*	*15,6*	*7,8*	*3,9*	*1,9*	*0,9*	

Fonte: elaborado pela autora.

A verificação do efeito combinado dos compostos foi realizada através do índice de concentração inibitória fracionada (ICIF). O cálculo do ICIF consiste na soma da concentração inibitória fracionada (CIF) do composto 1 mais a CIF do composto 2. A CIF, por sua vez, corresponde a divisão da concentração inibitória mínima (CIM) do composto em combinação pela CIM do composto isolado.

$$\frac{CIM\ combinação}{CIM\ isolado} = CIF$$

$$CIF\ MK58911 + CIF\ itraconazol = ICIF$$

De acordo com o valor obtido, o efeito pode ser classificado como sinérgico (ICIF ≤ 0,5), indiferente (0,5 < ICIF ≤ 4,0) e antagônico (ICIF > 4,0) (ODDS, 2003; CORDEIRO et al., 2014; SANGALLI-LEITE, 2016; SINGULANI et al., 2019).

3.5. TOXICIDADE EM MODELOS CELULARES

O ensaio de toxicidade em cultura celular foi realizado nos modelos monocamada e esferóides simultaneamente. Para tal, utilizou-se a linhagem celular A549 (ATCC CCL-185), linhagem epitelial pulmonar originária de carcinoma. Inicialmente, incubou-se a linhagem em garrafas a 37º C, com 5% de CO_2, em meio de cultura *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) suplementado com soro fetal bovino (FBS) a 10%. Os experimentos foram realizados após duas subculturas (passagens) posteriores ao descongelamento das células (VASO et al., 2022).

Previamente o fundo dos poços das microplacas (96 poços) foi coberto com 50 µL de agarose a 1,5% com o objetivo de possibilitar a formação dos esferóides. Foram adicionados 200 µL/poço da suspensão celular ($3x10^3$ células/mL) às microplacas com agarose para formação dos esferóides e sem agarose para a formação da monocamada. Incubou-se ambas as microplacas nas mesmas condições, 37º C, com 5% de CO_2, por 96h. Após este período, adicionou-se o peptídeo MK58911 nas concentrações finais de 500 a 0,97 µg/mL com posterior incubação nas mesmas condições descritas por 72 horas. Realizou-se dois experimentos independentes com cada modelo, com cada concentração em quintuplicata. A análise da viabilidade celular foi realizada através do corante de viabilidade metabólica resazurina (50 µM) e posterior leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 570nm e 600nm (XIAO et al., 2010; VASO et al., 2022).

3.6. TOXICIDADE EM EMBRIÕES DE *Danio rerio*

Os embriões foram obtidos a partir da procriação de casais adultos mantidos em aquários com sistema de filtragem, a 28 ± 1 °C, pH 7,0 – 7,5, com alimentação

disponível três vezes ao dia, sendo esta composta por ração seca e náuplios de *Artemia salina*, em fotoperíodo 14/10 horas (claro/escuro) (TSANG et al., 2017; ALESTRÖM et al., 2019). Antes da experimentação, avaliou-se os embriões obtidos quanto a viabilidade, aqueles considerados fertilizados e viáveis foram alocados em microplacas de 96 poços (dois por poço) imersos em 100 µL de meio embriônico (NaCl, KCl, $CaCl_2.2H_2O$, $MgSO_4.7H_2O$). Em seguida acrescentou-se aos poços 100 µL do peptídeo MK58911, solubilizado em meio embriônico, em concentrações 2x acima das concentrações finais de 62,5 a 3,9 µg/mL (GALEANE et al., 2019; OECD, 2013).

Analisou-se a ocorrência de mortes e parâmetros indicadores de distúrbios de desenvolvimento através de observações em microscópio estereoscópio (ZEISS SteREO Discovery.V12) em 5, 24, 48, 72 e 96 horas pós fertilização (hpf) (OECD, 2013; GALEANE et al., 2019). Foram realizados cinco experimentos independentes com o total de 61 animais por grupo.

Os seguintes parâmetros foram determinados quanto a sua presença ou ausência nos embriões e larvas jovens: coagulação, batimento cardíaco, separação da cauda, atraso no desenvolvimento, má formação dos otólitos, pigmentação, circulação sanguínea caudal, visualização das nadadeiras peitorais, resposta ao toque, má formação da notocorda, eclosão dos embriões, má formação dos somitos, edema do pericárdio, edema do saco vitelínico, má formação dos olhos, protrusão da boca e curvatura da cauda (OECD, 2013; FRAYSSE et al., 2006; HERMSEN et al., 2011; BEEKHUIJZEN et al., 2015; HELLFELD et al., 2020; GAWEL et al., 2020).

Os demais parâmetros foram quantificados: movimentação espontânea, frequência cardíaca e comprimento da cauda (FRAYSSE et al., 2006; HERMSEN et al., 2011; BEEKHUIJZEN et al., 2015).

Quantificou-se a movimentação espontânea em 24 hpf e a frequência cardíaca em 48 hpf através de contagens visuais cronometradas em 20 e 10 segundos, respectivamente. Analisou-se o comprimento da cauda após eutanásia dos animais com tricaína metassulfonada tamponada (MS-222) (1g/L) seguida por hipoclorito de sódio (6,15%) (CONCEA, 2018). As larvas foram fotografadas lateralmente com auxílio de microscópio estereoscópio e o comprimento da cauda mensurado no software de processamento de imagens *ImageJ* (National Institutes of Health – USA).

3.7. TOXICIDADE EM LARVAS DE *Tenebrio molitor*

Os animais foram mantidos dentro de potes plásticos com farelo de trigo como substrato e alimento, e cenoura ralada como fonte de água. Os potes foram mantidos em incubadora BOD a 26 ºC +/-0,5 ºC. Separou-se larvas na faixa de peso de 0,10 - 0,15 g em quatro grupos (oito larvas por grupo) para os experimentos de toxicidade. O abdômen das larvas foi higienizado com etanol 70% antes das aplicações. A aplicação do peptídeo MK58911 foi realizada nas concentrações de 10, 50 e 100 mg/Kg (equivalentes a 125, 625 e 1250 µg/mL) em PBS. As injeções de 10 µL entre o segundo e terceiro esternites abdominais das larvas foram executadas com o auxílio de uma microseringa (Hamilton@, modelo 701N). No grupo controle foi aplicado apenas tampão PBS. Lavou-se a microseringa antes das aplicações com hipoclorito de sódio (3x), etanol absoluto PA (3x) e tampão PBS (5x). Entre as aplicações as lavagens ocorreram com etanol absoluto PA (1x) e tampão PBS (3x).

Após as aplicações, incubou-se os grupos em placas de petri com farelo de trigo e cenoura ralada disponíveis, em incubadora BOD a 26 ºC +/-0,5 ºC. Os animais foram acompanhados por cinco dias, nos quais avaliou-se a presença de melanização e formação de pupas por observação e a mortalidade através de responsividade ao toque. Foram realizados três experimentos independentes com o total de 24 animais por grupo.

3.8. EXTRAÇÃO PROTEICA TOTAL

Realizou-se a extração de proteínas totais a partir de células planctônicas da cepa G186A. O extrato foi utilizado para a realização da cromatografia de afinidade descrita no próximo item. A cultura do *H. capsulatum* foi realizada como descrito no item 3.1. Após incubação, a suspensão de células foi centrifugada e o meio de cultura descartado. O pellet celular foi lavado com tampão tris-HCl a 10mM (pH8,8) e ressuspenso no mesmo tampão juntamente com os seguintes inibidores de protease: 1µL/mL de uma mistura de leupeptina, aprotinina, antipaina, quimiostatina (LAAC) e 10µL/mL de fenil metil sufonil fluoreto (PMSF). A ruptura celular foi promovida pela adição de pérolas de vidro estéreis a suspensão, seguida por ciclos alternados de congelamento em nitrogênio líquido e agitação em vórtex. Após os quais, realizou-se a centrifugação a 4000 rpm, 4 ºC por 45 minutos. Recolheu-se o sobrenadante em novos tubos aos quais adicionou-se uma solução de ácido

tricloroacético / acetona (10/90%) v/v para a precipitação das proteínas. Os tubos foram armazenados a -20 ºC por duas horas, após as quais realizou-se a centrifugação a 4000 rpm, 4º C por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado, o pellet de proteínas liofilizado e armazenado a -80 ºC.

3.9. CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

O objetivo pretendido ao realizar a cromatografia de afinidade é de avaliar se há existência de interações entre as proteínas presentes no fungo e o peptídeo MK58911.

O preparo da resina (CNBr activated Sepharose 4B – GE Healthcare) foi realizado de acordo com o manual do fabricante. Realizou-se a lavagem da resina com solução de HCl a 1 mM, em seguida, acrescentou-se a esta 4 mg do peptídeo MK58911 previamente solubilizados em tampão de acoplamento (0,1M NaHCO3, 0,5M NaCl, pH 8,3). Incubou-se a suspensão sob agitação, a 4 ºC, durante a noite. Posteriormente, adicionou-se à coluna (Poly-Prep Chromatography Columns – Bio-Rad) tampão de acoplamento e em seguida a suspensão, prosseguindo-se a lavagem do conjunto com tampão de acoplamento. Foram coletadas duas alíquotas durante o processo de acoplamento do peptídeo: solução de peptídeo em tampão de acoplamento antes do contato com a resina (P0), suspensão de peptídeo-resina após introdução na coluna (P1). Estas alíquotas foram analisadas através de leitura espectrofotométrica em 280nm e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A etapa seguinte consistiu no bloqueio de grupos ativos remanescentes com 0,1 M tris-HCl, pH 8,0. Finalizando o preparo da coluna, realizou-se lavagens com ciclos alternados de pH utilizando tampão ácido (0,1 M ácido acético/acetato de sódio, 0,5 M NaCl, pH 4,0) e tampão básico (0,1 M tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 8,0).

Realizado o equilíbrio da coluna com tampão de ligação (10 mM tris-HCl, pH 7,5), procedeu-se a corrida com o extrato proteico de *H. capsulatum* solubilizado em dodecil sulfato de sódio (SDS) 8 M, seguindo-se a lavagem da coluna com tampão de ligação e finalizando com tampão de lavagem (10 mM tris-HCl, 5 mM NaCl, pH 7,5). A eluição das proteínas ligadas ao peptídeo foi realizada com tampão de eluição (100 mM glicina, pH 2,5).

Executou-se o procedimento descrito em duas colunas: teste e controle, tendo como única diferença a ausência do peptídeo MK58911 na coluna controle. Ainda,

alíquotas de ambas as colunas foram coletadas após passagem do extrato proteico (Prot 1), após passagem do tampão de lavagem (Prot 2) e após eluição (Gli). Tais alíquotas foram analisadas quanto a dosagem proteica através de leitura espectrofotométrica em 280 nm e perfil eletroforético através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

3.10. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Utilizou-se o sistema Ultra Fast liquid Chromatography (UFLC) (Nexera-Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) para acompanhamento da eficiência do processo de acoplamento do peptídeo à resina cromatográfica. Foram aplicados 30 µL de cada amostra (P0 e P1) com auxílio do injetor automático (SIL-20AXR, Shimadzu). As análises cromatográficas foram realizadas sob condição isocrática (60% de B (0-15 min): solução (A) – 0,05% de ácido trifluoroacético (TFA) em água, solução (B) - 0,05% de TFA em acetonitrila (ACN), utilizando-se uma coluna XBrigdeTM BEH300 C18 (2,1x100 mm; 3,5 µm) (Waters). A eluição dos componentes foi monitorada por absorbância a 215 nm, com fluxo de 0,2 mL/min.

3.11. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Os perfis proteicos das alíquotas coletadas durante a cromatografia de afinidade foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) sob condições redutoras (Laemmli, 1970; Studier, 1973). Preparou-se os géis de separação a 12% e de empilhamento a 5% de acrilamida. Para tal, utilizou-se uma solução estoque de acrilamida/ bis-acrilamida (30/0,8%). A polimerização do gel de separação foi realizada em solução de Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 e SDS (0,4%), em presença de N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamida (TEMED) (0,1%) e persulfato de amônio (APS) (0,1%). O gel de empilhamento foi polimerizado em presença de TrisHCl 0,5 M, pH 6,8 e SDS (0,4%), além de TEMED (0,05%) e APS (0,1%). Diluiu-se as alíquotas em tampão de amostra (Tris-HCl [tris (hidroxi-metil) aminometano] 62,5 mM pH 6,8, SDS a 2%, glicerol a 10%, ditiotreitol 0,5M e bromofenol a 0,002%) na proporção 1:4 e as amostras foram dissociadas em banho maria por 3 minutos. Realizou-se a corrida em cuba eletroforética (Mini-PROTEAN Tetra cell – Bio-Rad) sob tensão de 80V até a penetração das amostras no gel de separação, e a seguir a 120 V até o final

do processo. Inicialmente revelou-se o gel com Azul de Coomassie G-250, e posteriormente com coloração por prata.

3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores de absorbância obtidos através da leitura com resazurina foram corrigidos através da seguinte fórmula:

$$[(Abs570 - Abs600) - média(Abs570br - Abs600br)]$$

Onde:

Abs570 = absorbância em 570nm do controle de crescimento ou testes

Abs570br = absorbância em 570nm do controle de esterilidade (branco)

Abs600 = absorbância em 600nm do controle de crescimento ou testes

Abs600br = absorbância em 570nm do controle de esterilidade (branco)

Tal correção se faz necessária para que seja obtido o valor real de absorbância referente ao composto resorufina, gerado por células viáveis a partir da metabolização do composto resazurina. Os valores de absorbância do cristal violeta não necessitam de tal correção, uma vez que não há alteração colorimétrica no ensaio (ANSAR AHMED et al., 1994; PEREIRA et al, 2020). Os percentuais de viabilidade e biomassa foram calculados a partir das médias do grupo controle de crescimento e dos grupos teste com a seguinte fórmula (SINGULANI et al., 2019; PEREIRA et al, 2020):

$$(média\ \ teste/média\ controle)\ x100$$

Inicialmente verificou-se os pressupostos de normalidade e homoscedasticidade através dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. A ocorrência de grupos não-normais direcionou a análise ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e post hoc de Dunn. Grupos normais e heterocedásticos, por sua vez foram analisados através de ANOVA com correção de Welch e post hoc de Games-Howell. E finalmente grupos normais e homocedásticos, foram analisados através ANOVA *one way* com post hoc de Tukey (ensaios de viabilidade metabólica,

quantificação de biomassa, toxicidade em modelos celulares, quantificação de batimentos cardíacos e comprimento da cauda em *D. rerio*) (CAPP e NIENOV, 2020).

Ainda, plotou-se curvas de sobrevivência e malformações através do método Kaplan-Meier com análise pelo teste de Log-rank. Valores de IC50 e LC50 foram definidos através de regressão linear (ensaios de sobrevivência e malformações em *Danio rerio,* sobrevivência e formação de pupas em *Tenebrio molitor*). Para a análise de movimentos espontâneos em *D. rerio* utilizou-se o teste do qui-quadrado.

Foram utilizados nestes procedimentos os softwares Excel (Microsoft – USA), BioEstat 5.3 (AYRES et al., 2007 – Instituto Mamirauá), Jasp 0.16.4 (University of Amsterdam – Netherlands) e GraphPad Prism 5.0 (Dotmatics – USA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE FÚNGICA AOS PEPTÍDEOS

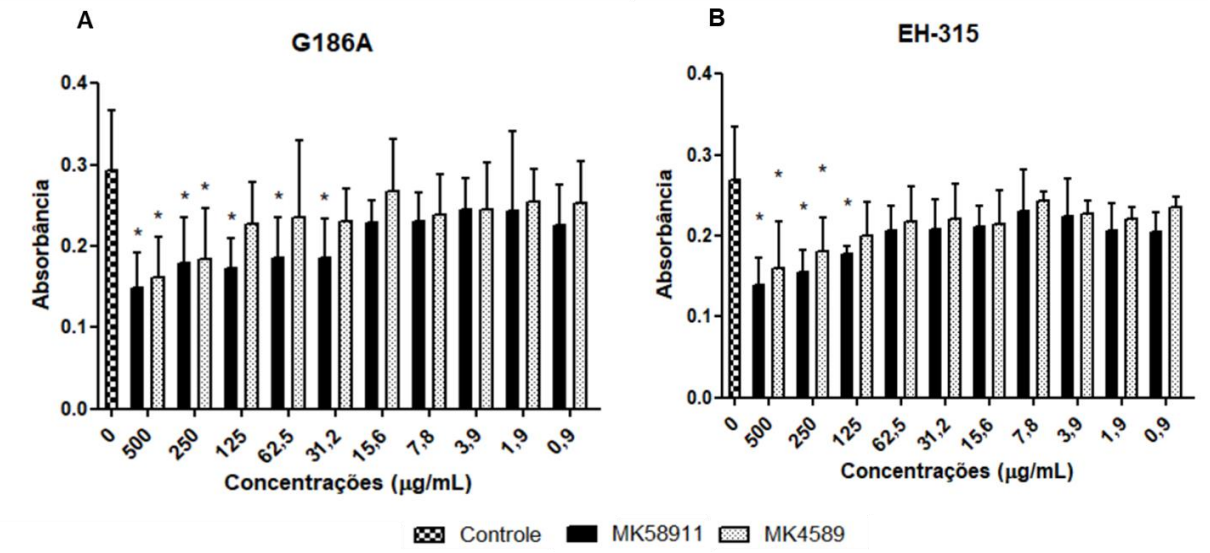
A determinação da viabilidade metabólica através do corante resazurina permite a identificação visual facilitada de células vivas mediante a alteração colorimétrica do meio (LAVOGINA et al., 2022). A resazurina, originalmente azul, é reduzida a resorufina, molécula de tonalidade rosa ao ser exposta aos carreadores de elétrons (NADH, NADPH, FADH) presentes na cadeia respiratória celular. Tal processo só é possível em células vivas. Ainda, a técnica permite leitura espectrofotométrica o que aumenta a exatidão dos resultados (RAMPERSAD, 2012; LAVOGINA et al., 2022).

Os ensaios de sensibilidade com os peptídeos PepM1 e PepM2, não resultaram na diminuição de viabilidade das cepas G186A e EH-315 em nenhuma das formas (planctônico e biofilme). O mesmo ocorreu com os peptídeos MK5789, MK58911 e MK4589, não foram observadas alterações na viabilidade fúngica em nenhuma das cepas e formas.

Com relação a biomassa nas culturas de biofilme, PepM1 causou 50,0% de inibição ($p < 0,05$) na cepa EH-315 na concentração de 500 µg/mL. Para PepM2 e outras concentrações de PepM1 não foi observada diminuição de biomassa.

Os peptídeos MK58911 e MK4589 também foram capazes de inibir a formação de biomassa nos biofilmes de ambas as cepas de *H. capsulatum*. Os valores médios de absorbância, bem como o desvio padrão da quantificação de biomassa para os peptídeos MK58911 e MK4589 estão ilustrados na Figura 1.

Figura 1. Valores médios de absorbância relativos à quantificação de biomassa para as cepas G186A (**A**) e EH-315 (**B**) expostos aos peptídeos MK58911 e MK4589. * p < 0,05 comparado ao grupo controle.



Fonte: elaborada pela autora.

Tabela 2. Resumo das porcentagens de inibição de biomassa estatisticamente significantes para as cepas G186A e EH-315.

	G186A		EH-315		
Concentrações (µg/mL)	**MK58911**	**MK4589**	**MK58911**	**MK4589**	**PepM1**
500	49,1%	44,7%	48,6%	40,7%	50,0%
250	38,9%	37,4%	42,5%	33,2%	-
125	41,0%	-	33,8%	-	-
62,5	36,8%	-	-	-	-
31,2	36,7%	-	-	-	-

Fonte: elaborada pela autora.

O peptídeo MK58911 foi responsável por inibir a biomassa na cepa G186A da concentração de 500 µg/mL (49,1%; $p < 0,05$) até a concentração de 31,2 µg/mL com 36,7% de inibição ($p < 0,05$). Com relação a cepa EH-315 o mesmo peptídeo inibiu sua biomassa desde a concentração de 500 µg/mL (48,6%; $p < 0,05$) até a concentração de 125 µg/mL com 33,8% de inibição ($p < 0,05$). O peptídeo MK4589 agiu inibindo a biomassa da cepa G186A nas concentrações de 500 µg/mL (44,7%; $p < 0,05$) e 250 µg/mL (37,4%; $p < 0,05$). Agiu também na cepa EH-315 inibindo sua

biomassa na concentração de 500 µg/mL em 40,7% ($p < 0,05$) e na concentração de 250 µg/mL em 33,2% ($p < 0,05$) (Tabela 2). O peptídeo MK5789 não foi capaz de inibir a formação de biomassa em nenhuma das cepas.

Por conseguinte, observa-se que o peptídeo com melhor desempenho em relação à capacidade de inibição da formação de biomassa em biofilmes foi o MK58911, sendo escolhido para dar prosseguimento aos ensaios seguintes (toxicidade e cromatografia).

Realizou-se ainda como controle de qualidade, ensaios de sensibilidade com os fármacos anfotericina B e itraconazol, ambos indicados no tratamento de infecções por *H. capsulatum*. A concentração inibitória mínima (CIM) encontrada para a anfotericina B foi de 0,31 µg/mL ($p < 0,01$) para culturas planctônicas e para os biofilmes 1,25 µg/mL ($p < 0,01$) em ambas as cepas. No caso do itraconazol, o valor de CIM < 0,004 µg/mL ($p < 0,01$) foi observado para ambas as cepas e condições (Tabela 3).

Tabela 3. Valores de CIM dos fármacos anfotericina B e itraconazol para ambas as cepas *de H. capsulatum*

	Anfotericina B	**Itraconazol**
Planctônico	0,31 µg/mL	< 0,004 µg/mL
Biofilme	1,25 µg/mL	< 0,004 µg/mL

Fonte: elaborada pela autora.

A crescente necessidade de novos medicamentos gerada por cepas resistentes e biofilmes trouxe à tona o interesse científico em peptídeos antimicrobianos (AMPs). Essas moléculas bastante diversas, conhecidas por sua atividade antimicrobiana, tem sido elucidadas quanto a diversos aspectos inclusive seus mecanismos de ação (RIDYARD; OVERHAGE, 2021).

Sugere-se que os AMPs catiônicos, como os MKs e Peps analisados neste trabalho, podem agir na membrana celular de fungos e bactérias através de interações eletrostáticas causando o efluxo de componentes intracelulares, levando-os a morte (DE SOUZA et al., 2015; GALEANE et al., 2019).

Os AMPs também podem agir em biofilmes, através de mecanismos clássicos de ação microbicida como o descrito para os mastoparanos. No entanto, há

peptídeos descritos na literatura capazes de inibir ou destruir biofilmes em concentrações abaixo de suas concentrações inibitórias mínimas mediante mecanismos de ação não-clássicos (BATONI et al., 2016; DOSTERT et al, 2019). Há peptídeos que apresentam mais de um mecanismo de ação, agindo tanto na viabilidade celular quanto na formação de biofilmes (BATONI et al., 2016).

Um exemplo bem descrito de peptídeo com ação antibiofilme é a catelicidina LL-37, este AMP catiônico de origem humana é capaz de inibir a formação de biofilmes de bactérias como *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa.* Os mecanismos de ação deste peptídeo em biofilmes de *P. aeruginosa* não envolvem mecanismos clássicos de morte celular, em contrapartida agem diminuindo a adesão das células à superfície, afetando a regulação de genes envolvidos no *Quorum Sensing* e estimulando a motilidade bacteriana mediada por pili tipo IV (DOSTERT et al, 2019; DI SOMMA et al., 2020).

Em *C. albicans*, este peptídeo apresenta duas ações: antifúngica e inibição de adesão. Tsai e colaboradores (2011) observaram morte celular em concentrações ≥ 20 µg/mL. No entanto em concentrações sub-letais, o peptídeo diminuiu a adesão das leveduras tanto em superfície abiótica *in vitro,* quanto em superfícies epiteliais *in vivo.* Os autores sugerem que devido aos resultados, o mecanismo envolvido com a perda de adesão não está relacionado ao mecanismo antifúngico. A interação entre o LL-37 e carboidratos da parede celular fúngica, em especial mananas, foi a responsável pela diminuição na adesão. O grupo reitera a importância do processo de adesão para o estabelecimento da infecção no hospedeiro, bem como na formação de biofilmes. O *H. capsulatum*, embora em menor quantidade, também possui mananas na composição de sua parede celular. Sabe-se ainda que estas estruturas estão relacionadas ao seu processo de adesão ao hospedeiro (GUIMARÃES et al., 2011).

O peptídeo sintético AS10, desenvolvido com base no peptídeo LL-37 por De Brucker e colaboradores (2014), inibiu a formação de biofilmes de *C. albicans*. Com o intuito de descobrir se este peptídeo teria influência no processo de adesão das células, os pesquisadores o adicionaram aos biofilmes após a fase de adesão. Diferentemente do LL-37, o AS10 não altera a capacidade de adesão da *C. albicans*. Ainda, este peptídeo não foi capaz de erradicar biofilmes maduros, o que aponta para a existência de outro mecanismo deste peptídeo relacionado a formação dos biofilmes para a espécie.

Outro exemplo de peptídeo com ação antibiofilme é o AMP híbrido CAMA, desenvolvido por Mataraci e Dosler (2012). Essa molécula formada por porções dos peptídeos cecropin A e melitina A, inibiu a formação de biofilme de uma cepa de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) (DI SOMMA et al., 2020). O peptídeo catiônico sintético IDR-1018 também inibiu a formação de biofilme de MRSA e outras bactérias, destruindo ainda seus biofilmes maduros (BATONI et al., 2016). O seu efeito inibitório também foi observado em biofilmes de *C. albicans* por Freitas e colaboradores (2017).

Dias e colaboradores (2020) analisaram os efeitos do NDBP-5.7, peptídeo derivado do escorpião *Opisthacanthus cayaporum,* em *C. albicans.* Para células planctônicas este peptídeo apresentou a CIM de 35,8 µg/mL. No entanto, quando aplicado a biofilmes não foi observada atividade antifúngica. Apesar deste resultado, o grupo constatou que o tratamento foi capaz de causar permeabilização nas células do biofilme fúngico, além de alterações morfológicas (pequenos vacúolos intracelulares e acumulação de material fibrilar na parede) ambos sem diminuição na viabilidade celular. Segundo os autores, o peptídeo possui carga líquida +1 e tendência a formar estrutura em α-hélice. Ambas as características são comuns em peptídeos que possuem a membrana celular como alvo, como os mastoparanos.

O peptídeo AMP-17*,* analisado por Sun e colaboradores (2022), parece agir em múltiplos alvos do biofilme de *C. albicans*. Os pesquisadores constataram que o peptídeo inibe tanto o processo de adesão quanto a transição de leveduras para hifas (característica de virulência importante para a espécie). Além disso, o peptídeo parece influenciar na regulação gênica do fungo. Observou-se diminuição na expressão de genes associados a adesão e filamentação, bem como aumento na expressão de genes que regulam negativamente a produção da matriz do biofilme. Ademais, houve inibição da síntese do ergosterol, o que diminui a viabilidade fúngica tanto em células planctônicas como em biofilmes.

Os análogos de mastoparanos investigados neste estudo, apresentaram em outros trabalhos atividade contra as formas planctônicas de *Cryptococcus* spp., *Paracoccidioides* spp., *C. albicans,* além de diversas bactérias (DE SOUZA et al., 2015; GALEANE et al., 2019; SINGULANI et al., 2019). Um dos análogos de moricin também foi efetivo contra células planctônicas de *C. albicans* (dados não publicados). No entanto, sua ação em *H. capsulatum* está sendo investigada pela primeira vez.

Mediante a ação antifúngica descrita para estes peptídeos, bem como a ação antibiofilme demonstrada em *H. capsulatum*, deve-se considerar a possibilidade de haver mais de um mecanismo de ação para estas moléculas, inclusive a existência de mecanismos não-clássicos, com ação específica em biofilmes. Ainda, tendo em vista as características estruturais destes peptídeos (carga líquida positiva, hidrofobicidade, anfipacidade), mecanismos que envolvam os componentes de parede ou membrana celular não podem ser descartados. No entanto, a interação pode ocorrer com diferentes componentes destes sítios, levando a alterações no processo de adesão, produção de matriz, regulação gênica, entre outros. Estas interações podem resultar em perturbações na formação dos biofilmes sem necessariamente ocasionar diminuição na viabilidade celular.

Diferenças entre cepas também podem ter papel importante na resposta aos AMPs. Ambas as cepas de *H. capsulatum* possuem características únicas: a ATCC G186A tem origem humana, é pertencente ao clado Panamá/H81 e ao quimiotipo II (presença de α-1,3-glucana na parede celular) (FREGONEZI et al., 2020). A EH-315, por sua vez, pertence ao clado BAC1, originária do morcego *Mormoops megalophylla,* com grande potencial para infectar macrófagos e com grande virulência observada *in vitro* e *in vivo (*TEIXEIRA et al., 2016; PITANGUI et al., 2021*).* Vite-Garín e colaboradores (2021) classificaram o clado BAC1 como grupo-irmão do clado NAm2, ou seja, ambos possuem um ancestral comum exclusivo, portanto é possível que compartilhem características como a condição de quimiotipo I (ausência de de α-1,3-glucana na parede celular), apesar de tais características não terem sido descritas para a cepa EH-315 (EDWARDS et al., 2011). Portanto as diferenças entre cepas podem estar ligadas aos mecanismos de ação dos peptídeos, levando a diferentes respostas aos compostos.

4.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SINÉRGICA

Os valores de ICIF obtidos da análise combinatória entre o MK58911 e o fármaco itraconazol foram 0,53 para a cepa G186A e 0,62 para a cepa EH-315. Tais valores classificam a interação dos compostos como indiferente. Apesar desta classificação, observou-se na combinação entre os compostos a queda da CIM do itraconazol de 0,002 µg/mL para 0,001 µg/mL. Para o MK58911, constatou-se atividade antifúngica desde a concentração de 500 µg/mL até a concentração de

15,6 µg/mL para a cepa G186A e até 62,5 µg/mL para a cepa EH-315 (Tabela 4). Estes resultados demonstram que embora não possa ser considerado o sinergismo, também não é possível considerar que há total ausência de efeito combinado.

Tabela 4. Valores de CIM, CIM combinada e ICIF para as cepas G186A e EH-315.

	CIM		**CIM combinada**		**ICIF**
	MK58911	Itraconazol	MK58911	Itraconazol	
G186A	> 500 µg/mL	0,002 µg/mL	15,6 µg/mL	0,001 µg/mL	0,53
EH-315	> 500 µg/mL	0,002 µg/mL	62,5 µg/mL	0,001 µg/mL	0,62

Fonte: elaborada pela autora.

Odds (2003) pondera sobre a baixa reprodutibilidade do ensaio do tabuleiro, afirmando que a variação em um único ponto coloca a CIM em uma faixa de três diluições (± 1 diluição, uma diluição acima ou abaixo). Por esta razão não é possível interpretar os resultados em escala completamente precisa, tendo em vista que essas variações podem levar a valores de ICIF diferentes. Interações consideradas aditivas (0,5 < ICIF ≤ 1,0) podem ser consideradas positivas quando, por conta do erro experimental, são na verdade indiferentes ou não existentes.

No entanto, muitos autores ainda optam por uma classificação mais abrangente dos valores de ICIF, considerando a combinação sinérgica quando ICIF ≤ 0,5; aditiva ou parcialmente sinérgica quando 0,5 < ICIF ≤ 1,0; indiferente quando 1,0 < ICIF ≤ 4,0 e antagonista quando ICIF > 4,0 (ZUSMAN et al., 2013; GÓMARA; RAMÓN-GARCÍA, 2019).

Meletiadis e colaboradores (2010) questionam em seu estudo a classificação defendida por Odds. O grupo afirma que a variação verdadeira dos valores de ICIF em ensaios de tabuleiro foi pouco estudada, além disso a grande maioria dos valores encontrados por outros autores varia entre 0,5 e 4, o que levanta questões sobre a validade do conceito.

Os autores realizaram combinações sabidamente aditivas utilizando fármacos iguais (*i.e.* anfotericina + anfotericina ou voriconazol + voriconazol) e a combinação antagônica de anfotericina + voriconazol, todas frente ao *Aspergillus fumigatus*.

Deste modo, observaram que os valores para as combinações aditivas variaram de 0,52 a 2,31, enquanto para a combinação antagônica, os valores foram em sua maioria maiores que 2,0, mas raramente maiores que 4,0. Ainda em seu estudo combinatório observaram que a faixa considerada aditiva (com combinações do mesmo fármaco), com valores de 0,5 a 2,0 possuía maior simetria do que a faixa recomendada de 0,5 a 4,0. A faixa de 0,5 a 4 é mais ampla tendendo para o antagonismo do que para sinergia, pois contém duas fileiras de poços que tendem para antagonismo (até 2 diluições acima da CIM) e uma fileira de poços que tendem para sinergia (até 1 diluição abaixo da CIM). Já a faixa de 0,5 a 2 é simétrica porque inclui concentrações uma diluição acima e abaixo do MIC. Ao utilizar o método de Monte Carlo o grupo constatou que as combinações de drogas iguais foram corretamente identificadas como aditivas em mais de 88% das vezes. O grupo ainda conclui que o método do tabuleiro é na verdade bastante reprodutível, com faixas estreitas de ICIFs, que raramente variam de valores sinérgicos a valores antagônicos (MELETIADIS et al., 2010).

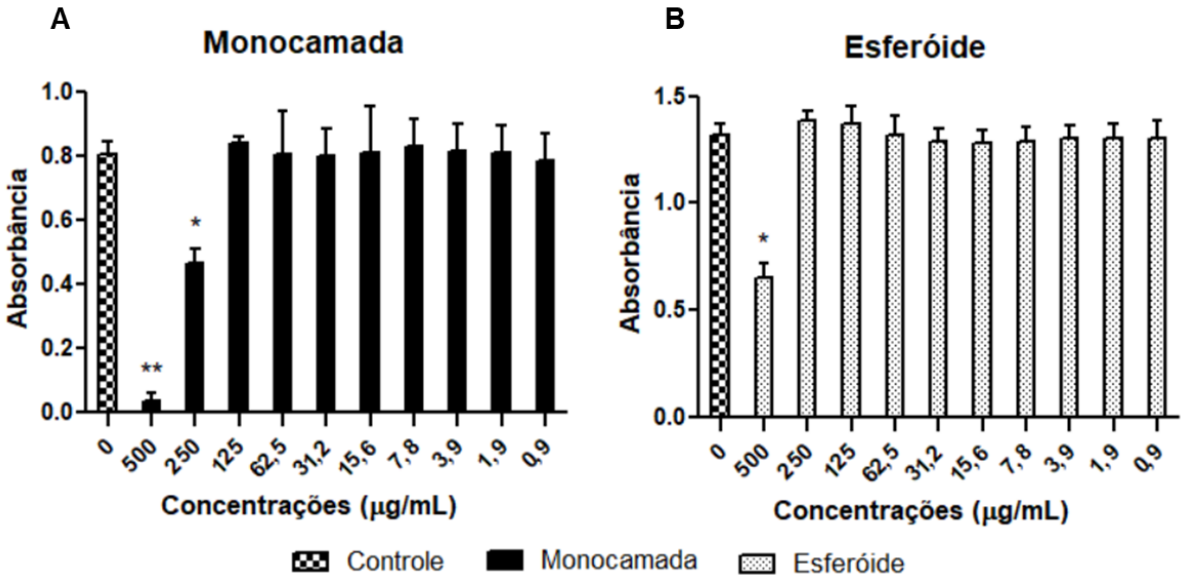
Portanto, considerando a existência de interações sinérgicas leves em um contexto de análise menos conservador e ainda mais, que os valores encontrados neste trabalho (0,53 e 0,62) estão muito mais próximos de 0,5 do que de 1,0, pode-se inferir que há atividade aditiva dos compostos MK58911 e itraconazol frente ao *H. capsulatum.*

4.3. TOXICIDADE EM MODELOS CELULARES

O *H. capsulatum* inicia a infecção no hospedeiro através da via pulmonar podendo disseminar-se por meio do sistema mononuclear fagocitário. No entanto, as células mais abundantes nos alvéolos são os pneumócitos, os quais têm papel fundamental na patogenia da doença. O fungo é capaz de aderir a suas superfícies, infectá-los e ainda provocar a liberação de citocinas inflamatórias por eles (PITANGUI et al.,2012; MAZA; SUZUKI, 2016). Deste modo, a linhagem A549 coloca-se como importante representante deste grupo de células no estudo toxicológico do MK58911.

Os valores médios de absorbância, bem como o desvio padrão dos grupos relativos ao ensaio de toxicidade em modelos celulares estão ilustrados na Figura 2.

Figura 2. Valores médios de absorbância relativos à toxicidade nos modelos celulares monocamada (**A**) e esferóide (**B**) expostos ao peptídeo MK58911. * p < 0,05 comparado ao grupo controle. ** p < 0,01 comparado ao grupo controle.



Fonte: elaborada pela autora.

Nos ensaios de citotoxicidade em monocamada observou-se diminuição na viabilidade celular na concentração de 500 µg/mL com 96,1% ($p < 0,01$) e na concentração de 250 µg/mL com 42,0% ($p < 0,05$) de inibição. No modelo esferóide, a diminuição na viabilidade celular foi menor, apenas 50,0% ($p < 0,05$) na concentração 500 µg/mL. Os valores de IC50 calculados foram de 292 µg/mL para a monocamada e 500 µg/mL para os esferóides (Tabela 5).

Tabela 5. Valores de inibição da viabilidade metabólica e IC50 para a linhagem A549 nos modelos monocamada e esferóide após tratamento com o peptídeo MK58911.

Modelo	**Inibição da viabilidade metabólica (%)**		**IC50**
	500 µg/mL	**250 µg/mL**	
Monocamada	96,1%	42,0%	292 µg/mL
Esferóide	50,0%	-	500 µg/mL

Fonte: elaborada pela autora.

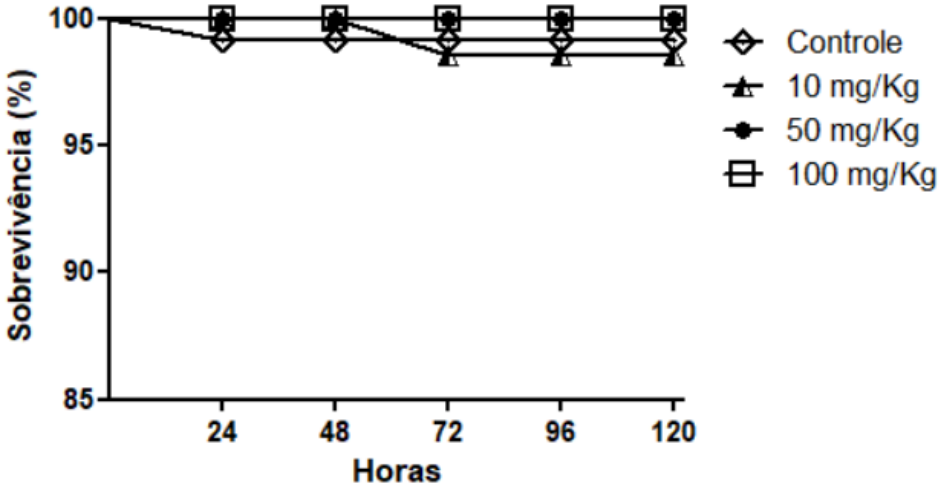
O peptídeo MK58911 foi analisado em trabalhos anteriores quanto a toxicidade em diferentes tipos celulares demostrando baixa toxicidade em modelo monocamada. Nas linhagens de fibroblastos pulmonares MRC-5 e glioblastoma U87, o peptídeo não apresentou toxicidade nas concentrações testadas, exibindo valores de IC50 > 500 µg/mL (SINGULANI et al., 2019; SINGULANI et al., 2021). Para o modelo celular de queratinócitos HaCat, a alteração de viabilidade causada pelo peptídeo foi bastante similar aos resultados encontrados neste trabalho, demonstrando alta citotoxicidade em 500 µg/mL e 20% de inibição em 250 µg/mL (GALEANE et al., 2019).

Neste trabalho a toxicidade do MK58911 foi analisada pela primeira vez no modelo celular de esferóides. Observou-se menor toxicidade neste modelo em comparação a monocamada. A sensibilidade diminuída de modelos 3D pode ocorrer devido a redução do acesso a compostos no meio, alterações celulares devido a hipóxia ou mudanças no ciclo celular (KAPAŁCZYŃSKA et al., 2018). Tabtimmai e colaboradores observaram o mesmo tipo de resposta ao analisarem o efeito do peptídeo catiônico Cn-AMP1 em monocamada e esferóides da linhagem celular A549. Na cultura 2D, o peptídeo causou a diminuição dose-dependente da viabilidade celular, enquanto nos esferóides não houve alteração. Os autores atribuem esta diferença a uma expressão aumentada de junções de oclusão em esferóides de A549 em relação a sua cultura em monocamada. Tal aumento na expressão de proteínas como a ocludina, reduziria a difusão do peptídeo em questão, impedindo a citotoxicidade. Maruhashi e colaboradores (2018) e Akizuki e colaboradores (2018) observaram que culturas de esferóides *knockdown* para as junções claudina-1 e claudina-2, apresentaram maior sensibilidade a doxorrubicina. O que indica que as junções de oclusão podem estar relacionadas com o aumento da resistência química dos esferóides de A549.

4.4. TOXICIDADE EM LARVAS DE *Tenebrio molitor*

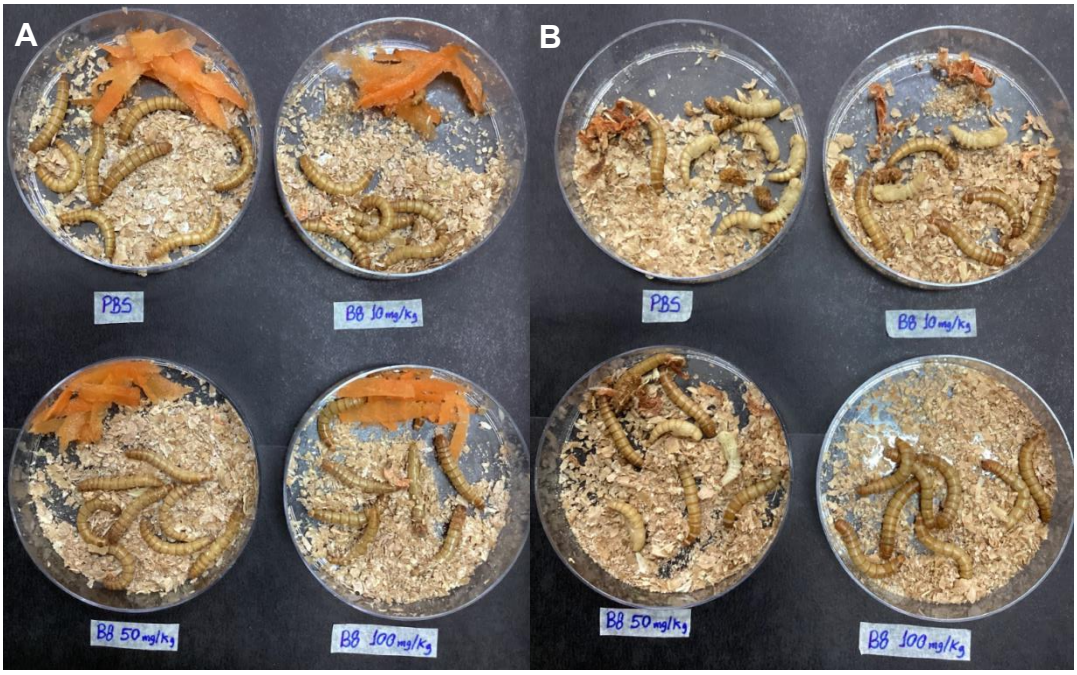
Nos ensaios de toxicidade em modelo *T. molitor*, não foi observada diferença estatística significativa entre as curvas de sobrevivência das larvas expostas ao peptídeo MK58911 e o grupo controle. O peptídeo não foi capaz de causar diminuição na sobrevivência das larvas (Figura 3) ou melanização nas mesmas (Figura 4).

Figura 3. Curvas de sobrevivência das larvas de *T. molitor* expostas ao peptídeo MK58911.



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 4. Fotografia das larvas de *T. molitor* expostas ao peptídeo MK58911 em 0 horas (**A**) e 120 horas (**B**) após exposição.



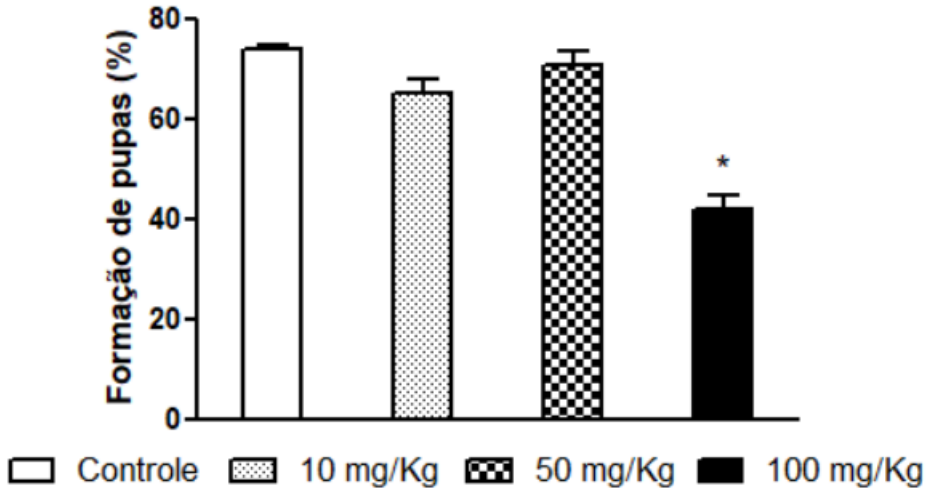
Fonte: elaborada pela autora.

Em estudo anterior, nosso grupo analisou a toxicidade deste peptídeo em larvas de *Galleria mellonella*. Este modelo alternativo invertebrado é bastante

semelhante ao *T. molitor.* Em ambos se observa a presença de sistema imunitário humoral e celular, análogo ao sistema imunológico inato de vertebrados, composto por células fagocíticas (hemócitos), produção de melanina e AMPs próprios (TSAI et al., 2015; VIGNERON et al., 2019). Similarmente, o MK58911 não alterou a sobrevivência ou melanização das larvas de *G. mellonella*.

No entanto, a exposição das larvas ao peptídeo MK58911 causou diminuição na formação de pupas. A concentração de 100 mg/Kg (equivalente a 1250 µg/mL) apresentou apenas 41,7% ($p < 0,05$) de conversão em 120 horas comparado a 73,9 % de conversão no grupo controle (Figura 5). A formação de pupas no modelo *T. molitor* indica prosseguimento do ciclo de vida saudável do animal, podendo ser impedido ou atrasado em larvas expostas a condições não favoráveis ou a xenobióticos (WEAVER; MCFARLANE, 1990; CÉSPEDES et al., 2005). Contudo, é importante ressaltar que esta concentração é extremamente alta, ultrapassando a maior concentração utilizada para os ensaios de sensibilidade fúngica (500 µg/mL).

Figura 5. Porcentagem de formação de pupas em 120 horas após exposição ao peptídeo MK58911. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.



Fonte: elaborada pela autora.

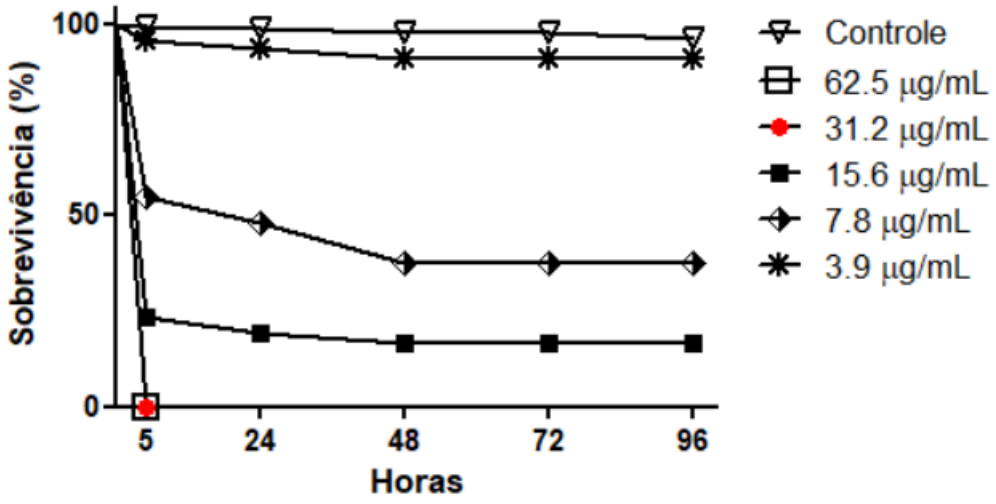
4.5. EMBRIOTOXICIDADE EM *Danio rerio*

A embriotoxicidade neste modelo foi previamente testada com o peptídeo MK58911 em trabalho anterior do grupo. Nesta ocasião, definiu-se o valor de LC50 (concentração letal 50%) do mesmo em 13,02 µg/mL (GALEANE et al., 2019). No

presente trabalho propôs-se uma abordagem mais abrangente deste ensaio. Nesta proposta a observação se estendeu até 96 hpf e parâmetros ausentes na diretiva nº 236 da OECD – FET TEST foram adicionados. Além disso, foram utilizadas concentrações em torno da LC50 publicada, com o intuito de determinar indícios de teratogenicidade específicos em concentrações sub-letais.

Quanto a sobrevivência dos embriões, observou-se diferença estatística em todos os grupos com relação ao controle. O que indica que a viabilidade deles foi afetada em todos os grupos, mostrando-se diretamente proporcional a concentração de peptídeo utilizada. A porcentagem de sobrevivência em 96 hpf variou de 0% para a concentração de 62,5 µg/mL a 91,0% para a concentração de 3,9 µg/mL (Figura 6), o valor de LC50 encontrado foi de 6,9 µg/mL.

Figura 6. Curvas de sobrevivência dos embriões de *Danio rerio* expostos ao peptídeo MK58911.



Fonte: elaborada pela autora.

Definiu-se a incidência de malformações considerando os embriões vivos. Não houve diferença estatística entre os grupos nos parâmetros de malformação cujas observações foram qualitativas, ou seja, parâmetros determinados como “presente” ou “ausente” (Tabela 6), assim como para o parâmetro quantitativo comprimento da cauda. No entanto, foram encontradas diferenças significantes na quantificação dos parâmetros movimentação espontânea e frequência cardíaca.

Tabela 6. Parâmetros de análise e seus resultados em embriões e larvas jovens de *Danio rerio*.

Parâmetros	Leitura	Resultado
Coagulação de embriões	Qualitativo	Indiferente
Batimento cardíaco	Qualitativo	Indiferente
Separação da cauda	Qualitativo	Indiferente
Atraso no desenvolvimento	Qualitativo	Indiferente
Presença de otólitos	Qualitativo	Indiferente
Pigmentação	Qualitativo	Indiferente
Circulação sanguínea caudal	Qualitativo	Indiferente
Nadadeiras peitorais	Qualitativo	Indiferente
Resposta ao toque	Qualitativo	Indiferente
Má formação da notocorda	Qualitativo	Indiferente
Protrusão da boca	Qualitativo	Indiferente
Eclosão dos embriões	Qualitativo	Indiferente
Somitos	Qualitativo	Indiferente
Edema do pericárdio	Qualitativo	Indiferente
Edema do saco vitelínico	Qualitativo	Indiferente
Olhos	Qualitativo	Indiferente
Curvatura da cauda	Qualitativo	Indiferente
Movimentação espontânea	Quantitativo	Significante
Frequência cardíaca	Quantitativo	Significante
Comprimento da cauda	Quantitativo	Indiferente

Fonte: elaborada pela autora.

A tabela de contingência abaixo (Tabela 7) resume as frequências e percentuais de movimentos espontâneos observados nos embriões com 24 hpf. Em relação a este parâmetro, observou-se diferença estatística entre o grupo controle e grupos com concentrações de exposição de 15,6 µg/mL ($p < 0,05$) e 7,8 µg/mL ($p < 0,05$) (Figura 7). O que indica possível influência do peptídeo no desenvolvimento inicial muscular e motoneuronal nos somitos.

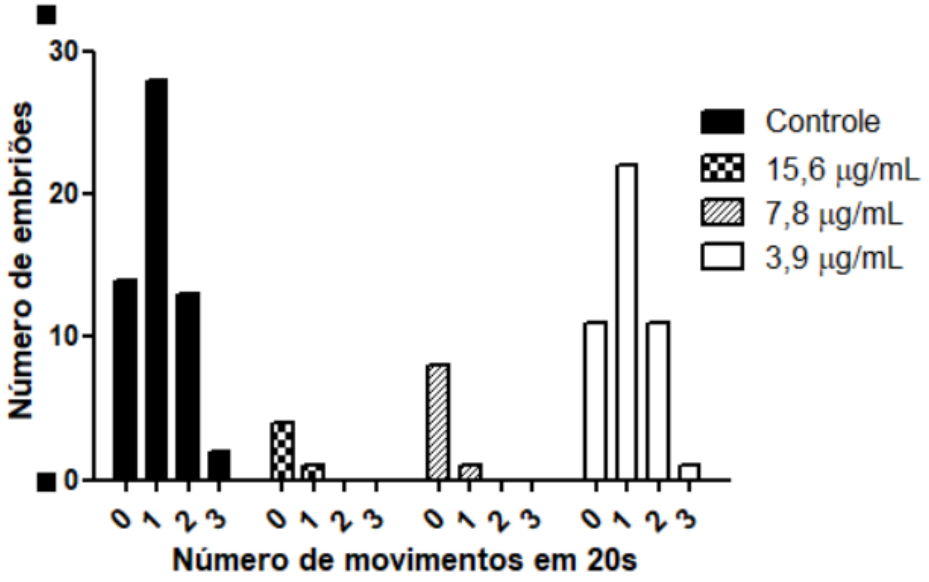
Tabela 7. Tabela de contingência contendo as porcentagens (**A**) e o número de embriões (**B**) referentes as contagens de movimentos espontâneos (0 movimentos, 1 movimento, 2 movimentos ou 3 movimentos) observados em 20s para o grupo controle e grupos expostos ao MK58911.

A	**Número de movimentos espontâneos em 20s**			
Grupos de embriões	**0**	**1**	**2**	**3**
Controle	24,6 %	49,1 %	22,8 %	3,5 %
15,6 µg/mL	80,0 %	20,0 %	0,0 %	0,0 %
7,8 µg/mL	88,9 %	11,1 %	0,0 %	0,0 %
3,9 µg/mL	24,4 %	48,9 %	24,4 %	2,2 %

B	**Número de movimentos espontâneos em 20s**			
Grupos de embriões	**0**	**1**	**2**	**3**
Controle	14	28	13	2
15,6 µg/mL	4	1	0	0
7,8 µg/mL	8	1	0	0
3,9 µg/mL	11	22	11	1

Fonte: elaborada pela autora.

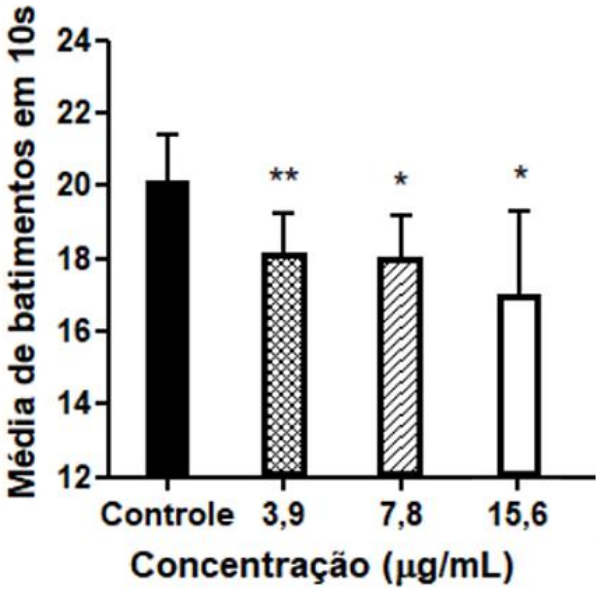
Figura 7. Frequência de movimentos espontâneos dos embriões expostos ao peptídeo MK58911 em 24 hpf.



Fonte: elaborada pela autora.

A frequência cardíaca quantificada em 48 hpf foi alterada em todos os grupos contendo embriões vivos. A média de batimentos cardíacos em 10 segundos para o grupo controle foi de 20,1 e nos grupos teste de 17,0 ($p < 0,05$); 18,0 ($p < 0,05$) e 18,1 ($p < 0,01$) para as concentrações de 15,6 µg/mL, 7,8 µg/mL e 3,9 µg/mL, respectivamente (Figura 8). Indicando possível interferência do peptídeo na função ou estrutura do tecido cardíaco.

Figura 8. Médias de batimentos cardíacos nos embriões expostos ao peptídeo MK58911 em 48 hpf. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.



Fonte: elaborada pela autora.

Diversas moléculas descritas em literatura são capazes de diminuir a frequência de batimentos no modelo, apresentando efeito cardiotóxico. O fármaco propranolol, utilizado como anti-hipertensivo, também reduz a frequência cardíaca em embriões de *Danio rerio,* possivelmente através do mesmo mecanismo de ação apresentado em humanos, o bloqueio de receptores beta-adrenérgicos (FRAYSSE et al., 2006). Fármacos causadores do prolongamento do intervalo QT em humanos, como amiodarona e tamoxifeno, também podem causar diminuição em sua frequência cardíaca, neste caso através da inibição de canais de potássio cardíacos (BURNS et al., 2005).

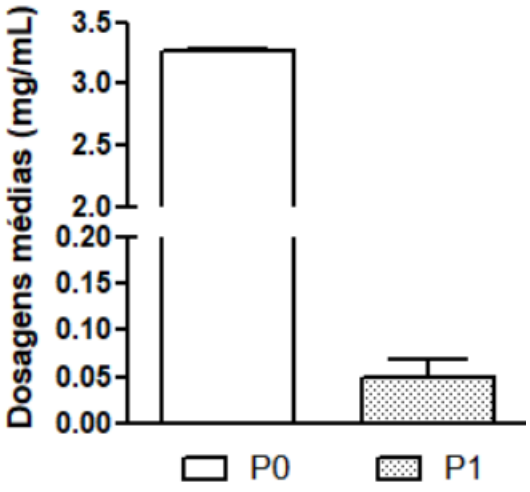
4.6. CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

A cromatografia de afinidade foi realizada como uma tentativa inicial de isolar proteínas do *H. capsulatum* que possam ter afinidade ao MK58911. Quando identificadas, essas proteínas poderiam ajudar a esclarecer como este peptídeo se relaciona com as células do fungo, e consequentemente se há mecanismos adicionais que expliquem a diminuição de biomassa no *H. capsulatum*.

Com o intuito de acompanhar os processos de acoplamento do peptídeo à resina, bem como a corrida cromatográfica do extrato proteico de *H. capsulatum* alíquotas foram coletadas em diversas etapas da cromatografia e analisadas através de leitura espectrofotométrica em 280nm e CLAE.

Inicialmente, realizou-se o processo de acoplamento do peptídeo à resina da coluna, do qual foram coletadas duas alíquotas: solução de peptídeo em tampão de acoplamento antes da aplicação na coluna (P0) e após a aplicação eluído da coluna (P1). As médias das leituras espectrofotométricas foram as seguintes: para P0 3,26 mg/mL e P1 0,05 mg/mL (Figura 9), indicando que 98,5% do total de peptídeo aplicado à resina permaneceu na coluna após as lavagens.

Figura 9. Médias das dosagens espectrofotométricas do peptídeo MK58911 durante acoplamento à resina. Absorbância em UV a 280nm.

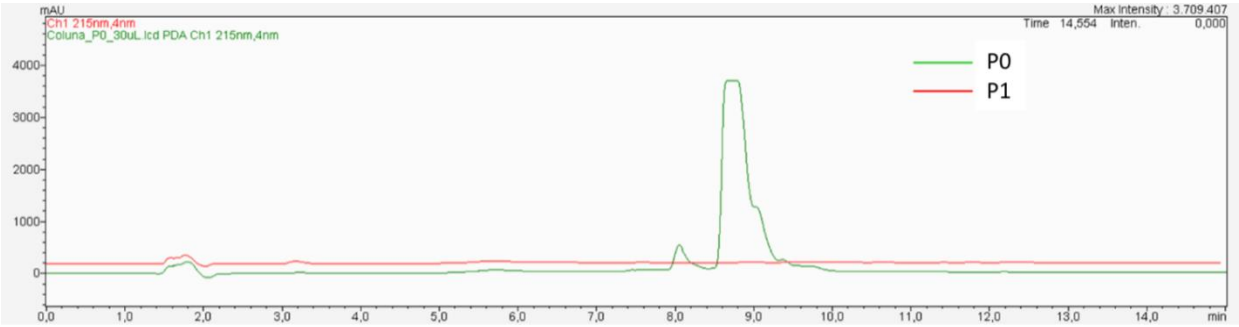


Fonte: elaborada pela autora.

No cromatograma obtido após corrida em CLAE das alíquotas P0 e P1 (Figura 10) observa-se o pico referente ao peptídeo apenas na alíquota P0, o que

corrobora as leituras espectrofotométricas encontradas, indicando que o acoplamento do peptídeo à coluna foi bem-sucedido.

Figura 10. Cromatograma das frações P0 e P1.

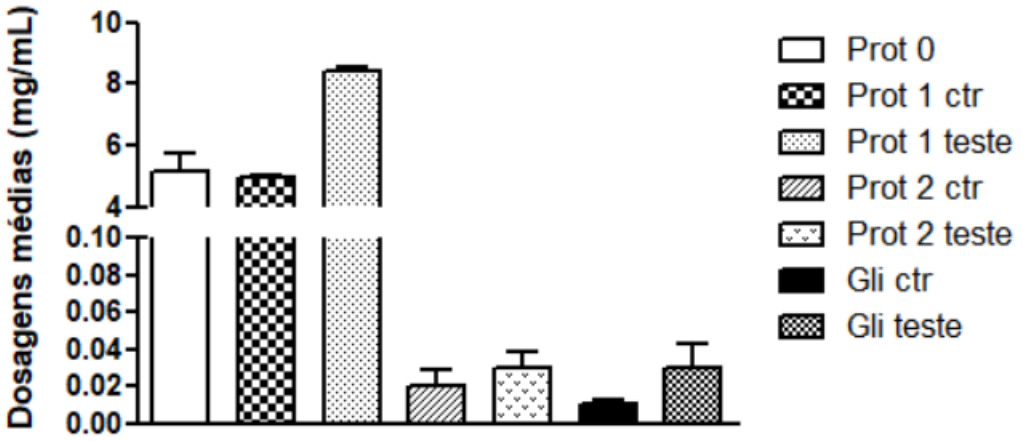


Fonte: elaborada pela autora.

Durante a corrida cromatográfica do extrato proteico foram coletadas quatro alíquotas: solução de extrato proteico em SDS 8M antes da corrida (Prot 0), solução eluída da coluna após passagem do extrato proteico (Prot 1), solução eluída da coluna após passagem do tampão de lavagem (Prot 2) e solução eluída após passagem do tampão glicina (Gli). As médias das leituras espectrofotométricas foram as seguintes: Prot 0 com 5,2 mg/mL; Prot 1 coluna controle com 5,01 mg/mL; Prot 1 coluna teste com 8,40 mg/mL; Prot 2 coluna controle com 0,02 mg/mL; Prot 2 coluna teste com 0,03 mg/mL; Gli coluna controle com 0,01 mg/mL e Gli coluna teste com 0,03 mg/mL (Figura 11).

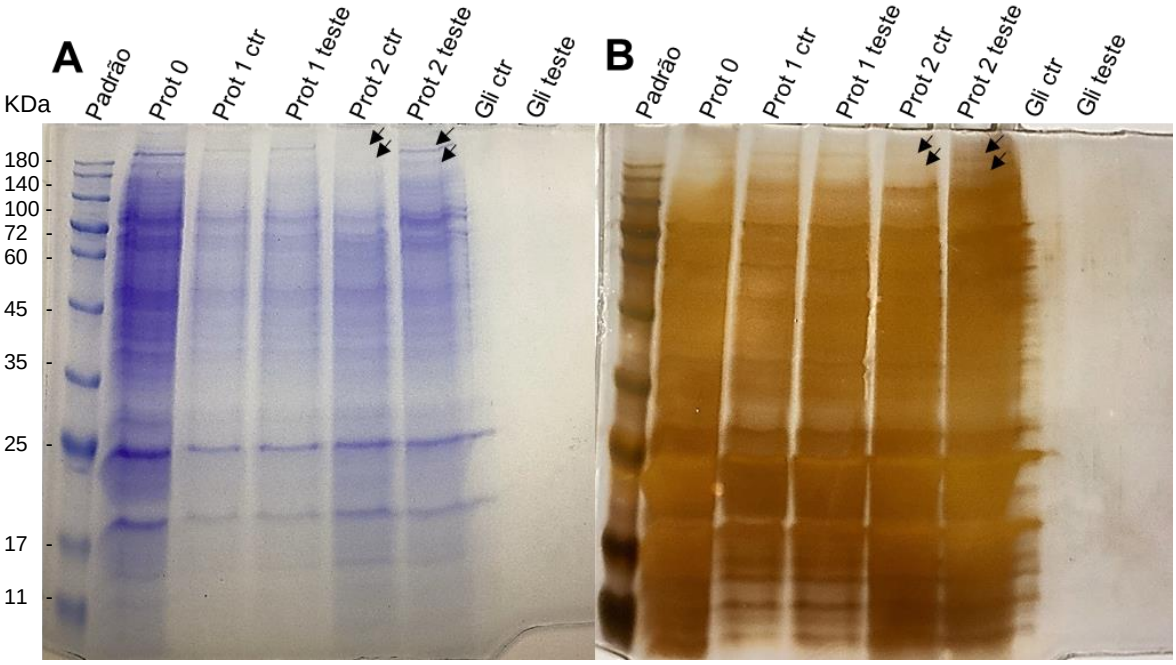
A partir das leituras conclui-se que como esperado a maior parte das proteínas não ficou retida na coluna, uma vez que a corrida foi realizada com um grande *pool* de proteínas das quais poucas apresentariam afinidade ao peptídeo MK58911. Observa-se ainda que após a eluição com glicina, uma pequena quantidade de proteínas é recuperada da coluna.

Figura 11. Médias das dosagens espectrofotométricas da corrida cromatográfica. *ctr: coluna controle, *teste: coluna com peptídeo acoplado.



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 12. Gel de SDS-PAGE contendo as alíquotas da corrida cromatográfica. Coloração por coomasie (**A**) e prata (**B**).



Fonte: elaborada pela autora.

Após eluição, as frações proteicas recuperadas foram analisadas através de SDS-PAGE. Considerando o gel na Figura 12, observa-se inicialmente a ausência

de bandas referentes às alíquotas de eluição (Gli), possivelmente devido à baixa quantidade de proteínas recuperadas nesta fase da corrida cromatográfica, no entanto nas alíquotas recuperadas após passagem do tampão de lavagem pela coluna (Prot 2) observa-se duas bandas ausentes na coluna controle e presentes na coluna teste o que pode indicar que o tampão de lavagem foi capaz de extrair proteínas anteriormente ligadas ao peptídeo acoplado à resina.

5. CONCLUSÃO

Os cinco peptídeos analisados (MK5789, MK58911, MK4589, PepM1 e PepM2) não foram capazes de alterar a viabilidade metabólica do *H. capsulatum* em nenhuma das formas cultivadas (planctônico ou biofilme) quando utilizados isoladamente. No entanto o peptídeo MK58911 quando associado ao fármaco itraconazol, apresentou atividade aditiva com o fármaco frente ao biofilme do fungo.

Quanto a quantificação biomassa em biofilmes, o MK58911 apresentou a melhor performance entre os peptídeos analisados. Inibiu a formação do biofilme sem alterar sua viabilidade celular, o que indica que o efeito inibitório ocorre na formação da matriz extracelular do biofilme. Esta ação antibiofilme é valiosa e deve ser investigada com relação a biofilmes de outros fungos, para os quais a ação antifúngica deste peptídeo em formas planctônicas foi determinada.

Os ensaios toxicológicos demonstraram que o peptídeo MK58911 é teratogênico e embriotóxico em modelo *D. rerio*. No entanto nos modelos celulares a toxicidade ocorreu apenas nas concentrações mais altas de peptídeo. Ainda a alteração na viabilidade das células foi dependente do modelo, com menor toxicidade relacionada ao modelo esferóide. Em *T. molitor*, o MK58911 não apresentou toxicidade, apenas dificultou a formação de pupas quando em alta concentração. Os resultados toxicológicos demonstram que apesar da provável impossibilidade do uso em gestantes, há potencial para a utilização futura deste peptídeo como fármaco para outras populações.

A realização da cromatografia de afinidade inicialmente permitiu determinar os parâmetros experimentais mais adequados para a análise, a qual futuramente deve ser realizada novamente e complementada com outros ensaios. O objetivo deste experimento foi isolar proteínas do *H. capsulatum* que poderiam ter afinidade ao MK58911. Deste modo, mesmo utilizando apenas a forma planctônica do *H.*

capsulatum, foi possível observar a existência de duas bandas diferenciais no SDS-PAGE relativas à interação entre o extrato proteico e o MK58911. Tal resultado indica que há interações entre as proteínas fúngicas e o peptídeo, o que poderia sugerir a existência de mecanismos de ação que expliquem a diminuição na formação do biofilme sem a alteração de viabilidade metabólica observada para o *H. capsulatum* tratado com o MK58911.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIS MEDICAL WRITERS. Long-term use of systemic azole antifungals can result in hepatotoxicity and other serious adverse effects. **Drugs & Therapy Perspectives**, v. 36, n. 3, p. 112–115, mar. 2020.

AIDÉ, M. A. Capítulo 4 - Histoplasmose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 35, n. 11, p. 1145–1151, 2009.

AKIZUKI, R. et al. Decrease in paracellular permeability and chemosensitivity to doxorubicin by claudin-1 in spheroid culture models of human lung adenocarcinoma A549 cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1865, n. 5, p. 769–780, 1 maio 2018.

ALESTRÖM, P. et al. Zebrafish: Housing and husbandry recommendations. **Laboratory Animals**, v. 54, n. 3, p. 213–224, 1 jun. 2020.

AL-HUSAINI, K. et al. Therapeutic potential of a cell penetrating peptide (CPP, NP1) mediated siRNA delivery: Evidence in 3D spheroids of colon cancer cells. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 98, n. 6, p. 1240–1254, 2020.

ALMEIDA, M. DE A. et al. The occurrence of histoplasmosis in Brazil: A systematic review. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 86, p. 147–156, 1 set. 2019.

ASHP. Itraconazole Monograph for Professionals. Disponível em: <https://www.drugs.com/monograph/itraconazole.html>. Acesso em: 4 jun. 2023.

ANSAR AHMED, S.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 170, n. 2, p. 211–224, 15 abr. 1994.

ARRUDA, G. J. B. et al. Estratégias tecnológicas para formulações de anfotericina b em sistemas lipídicos disponíveis no mercado farmacêutico e outros promissores sistemas de administração. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, v. 28, n. 2, p. 59–67, 5 jul. 2016.

AZAR, M. M. et al. Current Concepts in the Epidemiology, Diagnosis, and Management of Histoplasmosis Syndromes. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 41, n. 1, p. 13–30, fev. 2020.

AZAR, M. M.; HAGE, C. A. Clinical Perspectives in the Diagnosis and Management of Histoplasmosis. **Clinics in Chest Medicine**, v. 38, n. 3, p. 403–415, set. 2017.

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. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 8065, 23 maio 2018.

BATISTA, J. M.; MARTINS, M. A. P.; BERTOLLO, C. M. Primary cutaneous histoplasmosis difficult to treat in immunocompetent patient: case report and literature review. **Einstein** (Sao Paulo), v. 19, 13 maio 2021.

BATONI, G.; MAISETTA, G.; ESIN, S. Antimicrobial peptides and their interaction with biofilms of medically relevant bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, Antimicrobial peptides, cell membrane and microbial surface interaction. v. 1858, n. 5, p. 1044–1060, 1 maio 2016.

BEEKHUIJZEN, M. et al. From cutting edge to guideline: A first step in harmonization of the zebrafish embryotoxicity test (ZET) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system. **Reproductive Toxicology**, 43rd Annual Conference of the European Teratology Society. v. 56, p. 64–76, 15 ago. 2015.

BENEDICT, K. et al. Emerging issues, challenges, and changing epidemiology of fungal disease outbreaks. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 12, p. e403–e411, 1 dez. 2017.

BENEDICT, K.; TODA, M.; JACKSON, B. R. Revising Conventional Wisdom About Histoplasmosis in the United States. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 8, n. 7, p. ofab306, 1 jul. 2021.

BENITEZ, L. L.; CARVER, P. L. Adverse Effects Associated with Long-Term Administration of Azole Antifungal Agents. **Drugs**, v. 79, n. 8, p. 833–853, jun. 2019.

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

BRASIL. RESOLUÇÃO NORMATIVA CONCEA No 54, DE 10 DE JANEIRO DE 2022 - DOU - Imprensa Nacional. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou>. Acesso em: 10 jan. 2023.

BURNS, C. G. et al. High-throughput assay for small molecules that modulate zebrafish embryonic heart rate. **Nature Chemical Biology**, v. 1, n. 5, p. 263–264, out. 2005.

CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, Antibiotics - Meeting the Challenges of 21st Century Health Care: Part I. v. 133, p. 86–96, 1 jun. 2017.

CANTERI DE SOUZA, P. et al. An Invertebrate Host to Study Fungal Infections, Mycotoxins and Antifungal Drugs: Tenebrio molitor. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 4, p. 125, dez. 2018.

CAPP, E.; NIENOV, O. H. **Bioestatística quantitativa aplicada**. [s.l.] UFRGS, 2020.

CASSAR, S. et al. Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, v. 33, n. 1, p. 95–118, 21 jan. 2020.

CASTRANOVA, D.; WANG, C. Chapter 31 - Zebrafish Breeding and Colony Management. Em: CARTNER, S. C. et al. (Eds.). **The Zebrafish in Biomedical Research**. American College of Laboratory Animal Medicine. [s.l.] Academic Press, 2020. p. 357–364.

CAVASSIN, F. B. et al. Sixty years of Amphotericin B: An Overview of the Main Antifungal Agent Used to Treat Invasive Fungal Infections. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 10, n. 1, p. 115–147, 1 mar. 2021.

CÉSPEDES, C. L. et al. Insect growth regulatory effects of some extracts and sterols from Myrtillocactus geometrizans (Cactaceae) against Spodoptera frugiperda and Tenebrio molitor. **Phytochemistry**, v. 66, n. 20, p. 2481–2493, 1 out. 2005.

CHEN, J. et al. Is the superbug fungus really so scary? A systematic review and

meta-analysis of global epidemiology and mortality of Candida auris. **BMC Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 827, 11 nov. 2020.

COSTA-ORLANDI, C. B. et al. Fungal Biofilms and Polymicrobial Diseases. **Journal of Fungi** (Basel, Switzerland), v. 3, n. 2, p. 22, 10 maio 2017.

DE AGUIAR CORDEIRO, R. et al. Synthesis and Antifungal Activity In Vitro of Isoniazid Derivatives against Histoplasma capsulatum var. capsulatum. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 2504–2511, maio 2014.

DE BEULE, K.; VAN GESTEL, J. Pharmacology of Itraconazole: **Drugs**, v. 61, n. Supplement 1, p. 27–37, 2001.

DE BRUCKER, K. et al. Derivatives of the Mouse Cathelicidin-Related Antimicrobial Peptide (CRAMP) Inhibit Fungal and Bacterial Biofilm Formation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 9, p. 5395–5404, 14 ago. 2014.

DE PAULA E SILVA, A. C. A. et al. Microplate alamarBlue Assay for Paracoccidioides Susceptibility Testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 1250–1252, abr. 2013.

DEEPE, G. S., Jr.; BUESING, W. R. Deciphering the Pathways of Death of Histoplasma capsulatum-Infected Macrophages: Implications for the Immunopathogenesis of Early Infection. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 1, p. 334–344, 1 jan. 2012.

DI SOMMA, A. et al. Antimicrobial and Antibiofilm Peptides. **Biomolecules**, v. 10, n. 4, p. 652, abr. 2020.

DO NASCIMENTO DIAS, J. et al. Mechanisms of action of antimicrobial peptides ToAP2 and NDBP-5.7 against Candida albicans planktonic and biofilm cells. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 10327, 25 jun. 2020.

DOSTERT, M.; BELANGER, C. R.; HANCOCK, R. E. W. Design and Assessment of Anti-Biofilm Peptides: Steps Toward Clinical Application. **Journal of Innate Immunity**, v. 11, n. 3, p. 193–204, abr. 2019.

DUBOIS, J. C. et al. Yeast Transcriptome and In Vivo Hypoxia Detection Reveals

Histoplasma capsulatum Response to Low Oxygen Tension. **Medical Mycology**, v. 54, n. 1, p. 40–58, 1 jan. 2016.

DUVAL, K. et al. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. **Physiology**, v. 32, n. 4, p. 266–277, jul. 2017.

EFSA PANEL ON NUTRITION, NOVEL FOODS, AND FOOD ALLERGENS (NDA) et al. Safety of dried yellow mealworm (Tenebrio molitor larva) as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. **EFSA Journal**, v. 19, n. 1, p. e06343, 2021.

ELLIS, D. Amphotericin B: spectrum and resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. suppl_1, p. 7–10, 1 jan. 2002.

FALCI, D. R. et al. Histoplasmosis, An Underdiagnosed Disease Affecting People Living With HIV/AIDS in Brazil: Results of a Multicenter Prospective Cohort Study Using Both Classical Mycology Tests and Histoplasma Urine Antigen Detection. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, n. 4, p. ofz073, abr. 2019.

FALCI, D. R.; PASQUALOTTO, A. C. Anfotericina B: uma revisão sobre suas diferentes formulações, efeitos adversos e toxicidade. **Clin. biomed. res**, p. 65–82, 2015.

FECHER, R. A. et al. Inverse Correlation between IL-10 and HIF-1α in Macrophages Infected with Histoplasma capsulatum. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 197, n. 2, p. 565–579, 15 jul. 2016.

FRAYSSE, B.; MONS, R.; GARRIC, J. Development of a zebrafish 4-day embryo-larval bioassay to assess toxicity of chemicals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 63, n. 2, p. 253–267, 1 fev. 2006.

FREGONEZI, N. F. et al. Heat Shock Protein 60, Insights to Its Importance in Histoplasma capsulatum: From Biofilm Formation to Host-Interaction. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 2021.

FREITAS, C. G. et al. An Immunomodulatory Peptide Confers Protection in an Experimental Candidemia Murine Model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 8, p. e02518-16, 25 jul. 2017.

GALEANE, M. C. et al. Study of mastoparan analog peptides against *Candida albicans* and safety in zebrafish embryos (*Danio rerio*). **Future Microbiology**, v. 14, n. 13, p. 1087–1097, set. 2019.

GARFOOT, A. L.; RAPPLEYE, C. A. Histoplasma capsulatum surmounts obstacles to intracellular pathogenesis. **The FEBS journal**, v. 283, n. 4, p. 619–633, fev. 2016.

GAWEL, K. et al. Phenotypic Characterization of Larval Zebrafish (Danio rerio) with Partial Knockdown of the cacna1a Gene. **Molecular Neurobiology**, v. 57, n. 4, p. 1904–1916, 1 abr. 2020.

GÓMARA, M.; RAMÓN-GARCÍA, S. The FICI paradigm: Correcting flaws in antimicrobial in vitro synergy screens at their inception. **Biochemical Pharmacology**, v. 163, p. 299–307, maio 2019.

GÓMEZ, B. L. Histoplasmosis: Epidemiology in Latin America. **Current Fungal Infection Reports**, v. 5, n. 4, p. 199–205, 1 dez. 2011.

GONÇALVES, L. N. C. et al. Biofilm Formation by Histoplasma capsulatum in Different Culture Media and Oxygen Atmospheres. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020.

GRÄSSER, U. et al. Dissociation of mono- and co-culture spheroids into single cells for subsequent flow cytometric analysis. **Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger**, v. 216, p. 1–8, 1 mar. 2018.

GUIMARAES, A.; DE CERQUEIRA, M.; NOSANCHUK, J. Surface Architecture of Histoplasma Capsulatum. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, 2011.

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. e14660, 10 fev. 2011.

HAHN, M. E.; SADLER, K. C. Casting a wide net: use of diverse model organisms to advance toxicology. **Disease Models & Mechanisms**, v. 13, n. 4, p. dmm043844, 1 abr. 2020.

HERMSEN, S. A. B. et al. Relative embryotoxicity of two classes of chemicals in a

modified zebrafish embryotoxicity test and comparison with their in vivo potencies. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 3, p. 745–753, 1 abr. 2011.

KAINZ, K. et al. Fungal infections in humans: the silent crisis. **Microbial Cell**, v. 7, n. 6, p. 143–145, [s.d.].

KAPAŁCZYŃSKA, M. et al. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. **Archives of Medical Science: AMS**, v. 14, n. 4, p. 910–919, jun. 2018.

KAUFFMAN, C. A. Histoplasmosis: a Clinical and Laboratory Update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 115–132, jan. 2007.

KÜGLER, S. et al. Phenotypic variation and intracellular parasitism by Histoplasma capsulatum. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 16, p. 8794–8798, 1 ago. 2000.

LAVOGINA, D. et al. Revisiting the Resazurin-Based Sensing of Cellular Viability: Widening the Application Horizon. **Biosensors**, v. 12, n. 4, p. 196, abr. 2022.

LAWRENCE, C. Lawrence, C. The husbandry of zebrafish (Danio rerio): A review. Aquaculture 269, 1-20. **Aquaculture**, v. 269, p. 1–20, 1 set. 2007.

LEE, C. J.; TYLER, C. R.; PAULL, G. C. Chapter 4 - Geographic Range and Natural Distribution. Em: CARTNER, S. C. et al. (Eds.). **The Zebrafish in Biomedical Research**. American College of Laboratory Animal Medicine. [s.l.] Academic Press, 2020. p. 41–56.

LEI, J. et al. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. **American Journal of Translational Research**, v. 11, n. 7, p. 3919–3931, 15 jul. 2019.

LIMA, S. L.; COLOMBO, A. L.; DE ALMEIDA JUNIOR, J. N. Fungal Cell Wall: Emerging Antifungals and Drug Resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.

MARUHASHI, R. et al. Elevation of sensitivity to anticancer agents of human lung adenocarcinoma A549 cells by knockdown of claudin-2 expression in monolayer and spheroid culture models. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell**

Research, v. 1865, n. 3, p. 470–479, 1 mar. 2018.

MATARACI, E.; DOSLER, S. In vitro activities of antibiotics and antimicrobial cationic peptides alone and in combination against methicillin-resistant Staphylococcus aureus biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 12, p. 6366–6371, dez. 2012.

MATSUZAKI, K. Membrane Permeabilization Mechanisms. Em: MATSUZAKI, K. (Ed.). **Antimicrobial Peptides: Basics for Clinical Application**. Advances in Experimental Medicine and Biology. Singapore: Springer, 2019. p. 9–16.

MAZA, P. K.; SUZUKI, E. Histoplasma capsulatum-Induced Cytokine Secretion in Lung Epithelial Cells Is Dependent on Host Integrins, Src-Family Kinase Activation, and Membrane Raft Recruitment. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 580, 22 abr. 2016.

MCKINSEY, D. S. Treatment and Prevention of Histoplasmosis in Adults Living with HIV. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 6, p. 429, jun. 2021.

MELETIADIS, J. et al. Defining Fractional Inhibitory Concentration Index Cutoffs for Additive Interactions Based on Self-Drug Additive Combinations, Monte Carlo Simulation Analysis, and In Vitro-In Vivo Correlation Data for Antifungal Drug Combinations against Aspergillus fumigatus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 602–609, fev. 2010.

MEYERS, J. R. Zebrafish: Development of a Vertebrate Model Organism. **Current Protocols Essential Laboratory Techniques**, v. 16, n. 1, p. e19, 2018.

MITTAL, J. et al. Histoplasma Capsulatum: Mechanisms for Pathogenesis. Em: RODRIGUES, M. L. (Ed.). **Fungal Physiology and Immunopathogenesis**. Current Topics in Microbiology and Immunology. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 157–191.

NETT, J. E.; ANDES, D. R. Contributions of the Biofilm Matrix to Candida Pathogenesis. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 21, mar. 2020.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them.

The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 52, n. 1, p. 1, jul. 2003.

OECD. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test | READ online. Disponível em: <https://read.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-236-fish-embryo-acute-toxicity-fet-test_9789264203709-en>. Acesso em: 4 jan. 2023.

OMS. fungal priority pathogens list to guide research, development, and public health action. Disponível em: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240060241>. Acesso em: 9 jan. 2023.

PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 72, n. 2, p. 157–165, fev. 2008.

PEREIRA, M. I. A. et al. Resazurin-Based Assay to Evaluate Cell Viability After Quantum Dot Interaction. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 2135, p. 213–221, 2020.

PITANGUI, N. DE S. et al. An Intracellular Arrangement of Histoplasma capsulatum Yeast-Aggregates Generates Nuclear Damage to the Cultured Murine Alveolar Macrophages. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2016.

PITANGUI, N. DE S. et al. Differential miRNA Expression in Human Macrophage-Like Cells Infected with Histoplasma capsulatum Yeasts Cultured in Planktonic and Biofilm Forms. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 1, p. 60, jan. 2021.

PITANGUI, N. S. et al. Adhesion of Histoplasma capsulatum to pneumocytes and biofilm formation on an abiotic surface. **Biofouling**, v. 28, n. 7, p. 711–718, 1 ago. 2012.

RAMOS, I. C. et al. Predictive factors for disseminated histoplasmosis in AIDS patients with fever admitted to a reference hospital in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, p. 479–484, ago. 2018.

RAMPERSAD, S. N. Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. **Sensors**, v. 12, n. 9, p. 12347–12360, set. 2012.

RAPPLEYE, C. A.; EISSENBERG, L. G.; GOLDMAN, W. E. Histoplasma capsulatum α-(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the β-glucan receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 4, p. 1366–1370, 23 jan. 2007.

RAY, S. C.; RAPPLEYE, C. A. Flying under the radar: Histoplasma capsulatum avoidance of innate immune recognition. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, Mammalian innate immunity to fungal infection. v. 89, p. 91–98, 1 maio 2019.

RIDYARD, K. E.; OVERHAGE, J. The Potential of Human Peptide LL-37 as an Antimicrobial and Anti-Biofilm Agent. **Antibiotics**, v. 10, n. 6, p. 650, 29 maio 2021.

RODRIGUES, C. F.; ČERNÁKOVÁ, L. Farnesol and Tyrosol: Secondary Metabolites with a Crucial quorum-sensing Role in Candida Biofilm Development. **Genes**, v. 11, n. 4, p. 444, abr. 2020.

SANGALLI-LEITE, F. et al. Synergistic effect of pedalitin and amphotericin B against Cryptococcus neoformans by in vitro and in vivo evaluation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 5, p. 504–511, 1 nov. 2016.

SANGIORGIO, P. et al. Tenebrio molitorin the circular economy: a novel approach for plastic valorisation and PHA biological recovery. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 38, p. 52689–52701, 1 out. 2021.

SARDI, J. D. C. O. et al. Highlights in pathogenic fungal biofilms. **Revista Iberoamericana De Micologia**, v. 31, n. 1, p. 22–29, 2014.

SEPÚLVEDA, V. E. et al. Genome Sequences Reveal Cryptic Speciation in the Human Pathogen Histoplasma capsulatum. **mBio**, v. 8, n. 6, p. e01339-17, 5 dez. 2017.

SHEEHAN, G. et al. Innate humoral immune defences in mammals and insects: The same, with differences? **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 1625–1639, 31 dez. 2018.

SINGULANI, J. DE L. et al. Antifungal Activity, Toxicity, and Membranolytic Action of a Mastoparan Analog Peptide. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.

9, 2019.

SOARES, L. A. et al. Anti-*Trichophyton* Activity of Protocatechuates and Their Synergism with Fluconazole. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. e957860, 18 jun. 2014.

SOUZA, B. M. DE et al. Structure–activity relationship of mastoparan analogs: Effects of the number and positioning of Lys residues on secondary structure, interaction with membrane-mimetic systems and biological activity. **Peptides**, Festschrift to highlight the career of Abba J. Kastin as a founding editor, researcher, and educator in the peptide field. v. 72, p. 164–174, 1 out. 2015.

STEWART, A. G.; PATERSON, D. L. How urgent is the need for new antifungals? **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 22, n. 14, p. 1857–1870, 22 set. 2021.

SUN, C. et al. The Antimicrobial Peptide AMP-17 Derived from Musca domestica Inhibits Biofilm Formation and Eradicates Mature Biofilm in Candida albicans. **Antibiotics**, v. 11, n. 11, p. 1474, nov. 2022.

TABTIMMAI, L. et al. Cytotoxic assessment of Cn-AMP1 in 2D or 3D spheroid non-small cell lung cancer models. **Asia-Pacific Journal of Science and Technology**, v. 26, 1 jul. 2021.

TAYLOR, M. L. et al. Considerations about the Geographic Distribution of Histoplasma Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 88, n. 7, p. e02010-21, 9 mar. 2022.

TEAME, T. et al. The use of zebrafish (Danio rerio) as biomedical models. **Animal Frontiers: The Review Magazine of Animal Agriculture**, v. 9, n. 3, p. 68–77, jul. 2019.

TEIXEIRA, M. DE M. et al. Worldwide Phylogenetic Distributions and Population Dynamics of the Genus Histoplasma. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 6, p. e0004732, 1 jun. 2016.

TIRADO-SÁNCHEZ, A.; GONZÁLEZ, G. M.; BONIFAZ, A. Endemic mycoses: epidemiology and diagnostic strategies. **Expert Review of Anti-infective Therapy**,

v. 18, n. 11, p. 1105–1117, 1 nov. 2020.

TOBÓN, A. M.; GÓMEZ, B. L. Pulmonary Histoplasmosis. **Mycopathologia**, v. 186, n. 5, p. 697–705, 1 out. 2021.

TSAI, C. J.-Y.; LOH, J. M. S.; PROFT, T. Galleria mellonella infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 214–229, 2 abr. 2016.

TSAI, P.-W. et al. Human Antimicrobial Peptide LL-37 Inhibits Adhesion of Candida albicans by Interacting with Yeast Cell-Wall Carbohydrates. **PLOS ONE**, v. 6, n. 3, p. e17755, 14 mar. 2011.

TSANG, B. et al. Breeding Zebrafish: A Review of Different Methods and a Discussion on Standardization. **Zebrafish**, v. 14, n. 6, p. 561–573, dez. 2017.

VALDEZ, A. F. et al. Pathogenicity & virulence of Histoplasma capsulatum - A multifaceted organism adapted to intracellular environments. **Virulence**, v. 13, n. 1, p. 1900–1919, 31 dez. 2022.

VAN DUIN, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D. Melanization of Cryptococcus neoformans and Histoplasma capsulatum Reduces Their Susceptibilities to Amphotericin B and Caspofungin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 11, p. 3394–3400, nov. 2002.

VASO, C. O. et al. Evaluation of the Anti-Histoplasma capsulatum Activity of Indole and Nitrofuran Derivatives and Their Pharmacological Safety in Three-Dimensional Cell Cultures. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 5, p. 1043, maio 2022.

VIGNERON, A. et al. Immune Defenses of a Beneficial Pest: The Mealworm Beetle, Tenebrio molitor. **Frontiers in Physiology**, v. 10, 2019.

VITE-GARÍN, T. et al. Histoplasma capsulatum Isolated from Tadarida brasiliensis Bats Captured in Mexico Form a Sister Group to North American Class 2 Clade. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 7, p. 529, jul. 2021.

VON HELLFELD, R. et al. Adverse effects in the fish embryo acute toxicity (FET) test: a catalogue of unspecific morphological changes versus more specific effects in

zebrafish (Danio rerio) embryos. **Environmental Sciences Europe**, v. 32, n. 1, p. 122, 29 set. 2020.

WANG, J. et al. Antimicrobial peptides: Promising alternatives in the post feeding antibiotic era. **Medicinal Research Reviews**, v. 39, n. 3, p. 831–859, 2019.

WEAVER, D. K.; MCFARLANE, J. E. The effect of larval density on growth and development of Tenebrio molitor. **Journal of Insect Physiology**, v. 36, n. 7, p. 531–536, jan. 1990.

WHEAT, L. J. et al. Antifungal Drug Resistance in Histoplasmosis. Em: MAYERS, D. L. (Ed.). **Antimicrobial Drug Resistance: Clinical and Epidemiological Aspects**. Infectious Disease. Totowa, NJ: Humana Press, 2009. p. 987–992.

WHEAT, L. J. et al. Histoplasmosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 207–227, mar. 2016.

XIAO, J. et al. Monitoring of Cell Viability and Proliferation in Hydrogel-Encapsulated System by Resazurin Assay. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 7, p. 1996–2007, 1 nov. 2010.

ZUSMAN, O. et al. Systematic Review and Meta-Analysis of In Vitro Synergy of Polymyxins and Carbapenems. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 10, p. 5104–5111, out. 2013.