



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA
APLICADAS À FARMÁCIA



TESE DE DOUTORADO

**ESTABELECIMENTO DE UM MODELO TRIDIMENSIONAL PARA DETERMINAÇÃO DA
EFICÁCIA E SEGURANÇA FARMACOLÓGICA DE DERIVADOS DE NITROFURANOS E
INDÓLICOS E AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO DE *Histoplasma capsulatum***

CAROLINA ORLANDO VASO

Orientadora: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida

Coorientadora: Dra. Caroline Barcelos Costa Orlandi

Araraquara

2022

CAROLINA ORLANDO VASO

Estabelecimento de um modelo tridimensional para determinação da eficácia e segurança farmacológica de derivados de nitrofuranos e indólicos e avaliação da infecção de *Histoplasma capsulatum*

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

Orientadora: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida

Coorientadora: Dra. Caroline Barcelos Costa Orlandi

Araraquara, SP

2022

V673e

Vaso, Carolina Orlando.

Estabelecimento de um modelo tridimensional para determinação da eficácia e segurança farmacológica de derivados de nitrofuranos e indólicos e avaliação da infecção de *Histoplasma capsulatum* / Carolina Orlando Vaso. – Araraquara: [S.n.], 2022.
187 f. : il.

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

Orientadora: Ana Marisa Fusco Almeida.

Coorientadora: Caroline Barcelos Costa Orlandi.

1. *Histoplasma capsulatum*. 2. Modelos tridimensionais. 3. Mecanismo de ação. 4. Atividade antifúngica. 5. Biofilmes. 6. Citotoxicidade. I. Fusco-Almeida, Ana Marisa, orient. II. Costa-Orlandi, Caroline Barcelos, coorient. III. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Estabelecimento de um modelo tridimensional para determinação da eficácia e segurança farmacológica de derivados de nitrofuranos e indólicos e avaliação da infecção de *Histoplasma capsulatum*

AUTORA: CAROLINA ORLANDO VASO

ORIENTADORA: ANA MARISA FUSCO ALMEIDA

COORIENTADORA: CAROLINE BARCELOS COSTA ORLANDI

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

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

Prof. Dr. LUIS R MARTINEZ (Participação Virtual)
College of Dentistry / University of Florida

Prof. Dr. LUIS OCTÁVIO REGASINI (Participação Virtual)
Departamento de Química e Ciências Ambientais / Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas do Câmpus de São José do Rio Preto da Unesp

Dra. DANIELA DE VITA (Participação Virtual)
Department of Environmental Biology / Sapienza University of Rome

Araraquara, 29 de novembro de 2022

“Não sou nada.
Nunca serei nada.
Não posso querer ser nada.
À parte isso, tenho em mim todos os sonhos do mundo.”
Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre conduzir meus passos e me proteger.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – processo nº 2020/15586-4), pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - processo nº 134559/2018-5), pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - processo nº 88887.500765/2020-00) pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho. Essas instituições tornaram possível a minha formação e realização da tese de doutorado.

A professora Ana Marisa (Má), por ter sido minha orientadora, por sempre me aconselhar, me ensinar, ter paciência, por acreditar na minha capacidade e por todo o suporte fornecido seja ele acadêmico ou não, durante esses anos. E principalmente, por sempre demonstrar tanta garra e coragem para atravessar todos os desafios da vida, com certeza, foram características essenciais que irei levar comigo, para a construção de uma melhor profissional.

A minha coorientadora Caroline Barcelos (Carol mãe), por todo o suporte fornecido, todos os ensinamentos, por sempre mostrar o caminho certo de solucionar os problemas (que as vezes davam muito errado), por instigar dia após dia a me desenvolver e me tornar uma pesquisadora melhor. Por ter me proporcionado tantos debates e discussões científicas ao longo desses anos, que sem dúvida, fizeram me dedicar e estudar cada vez mais. Obrigada por todo o cuidado e carinho, você sempre foi um grande exemplo para mim.

A professora Maria José (Zezé) por me receber de braços abertos, por todas as discussões científicas e por sempre me incluir nos seus projetos e parcerias. Foi muito importante para o meu aprendizado.

Ao professor Luigi Scipione da Universidade de Roma "La Sapienza" – Itália e sua equipe, por ter cedido os compostos e por todos os ensinamentos e ajuda nessa colaboração.

A equipe do laboratório de proteômica, Carol B., Niura, Larissa, Marcos, Jenyffie, Kaila, Letícia, Jean, Angélica, Ana Carolina, Marina (Andrei), Marina (IC), Jaqueline, Mariana, Samanta, William, Lígia, Lariane, Carol M. (Panta), Nathália, Priscila, Patrícia (Laranja), Cláudia, Paulo, Kelvin, Fanciny, Haroldo, Fernando, Tiago e Junya pelos momentos de convivência e aprendizados durante todo esse tempo.

A Rosângela (Rô) por toda ajuda com o fungo, por ter cedido o laboratório de micologia, pela amizade, convívio, pelos cafés, bolos, risadas e pelo que se torno em minha

vida, sempre sendo luz e ensinamento onde passa. A nossa vizinha de laboratório Marisa (Marisinha), uma das pessoas mais amoras e bondosas que já conheci, obrigada pelos cafés divertidos, conversas, risadas e por todo o apoio. E a Cristina (Cris secretária) por ser esse doce de pessoa e sempre ter uma palavra amiga.

As minhas amigas do laboratório Núra, Carol Barcelos, Larissa e Jenyffie por toda ajuda, apoio e principalmente pela amizade. Com vocês os dias se tornaram mais leve, as risadas mais longas e os dias tristes menos cinzentos. Obrigada por terem feito parte desse momento tão importante.

A Núra por ter cedido um pedaço da sua casa e por sempre enfrentar junto comigo todos os obstáculos encontrados, acreditando dia após dia, que tudo daria certo. Obrigada por ser minha irmã, amiga, colega e psicóloga (rs).

Ao meu pai (Waldyr), mãe (Suely), irmão (Arthur), esposo (Vitor) e todos os meus familiares por sempre serem meu combustível, mesmo nos momentos mais difíceis. Por acreditarem em mim, me escutarem, me apoiarem e principalmente por vibrarem comigo a cada pequena conquista.

As minhas amigas Ana Eliza, Ana Priscila e Marina que mesmo nos desencontros da vida, sempre estiveram presentes com uma palavra de carinho e apoio. As meninas da faculdade Priscila, Uliane e Isabela, por sempre me incentivarem, desde quando iniciei na vida acadêmica.

Ao pessoal da pós-graduação por todo o suporte fornecido ao longo dessa jornada e por estarem sempre prontos a ajudar e responder todos nossos questionamentos. A todas as meninas do DAC (portaria e limpeza) pelo convívio diário, risadas e conversas.

E a todos que de forma direta ou indireta me ajudaram a alcançar esse sonho.

RESUMO

As culturas tridimensionais (3D) são um tipo de cultivo celular que têm o propósito de simular mais fidedignamente o tecido *in vivo*. As doenças fúngicas afetam mais de 1 bilhão de pessoas em todo o mundo. A crescente evolução da resistência microbiana e os efeitos adversos dos antifúngicos atuais auxiliam no surgimento de novos medicamentos. Esse estudo teve o objetivo de estabelecer esferoides de células pulmonares para avaliar a toxicidade de derivados de nitrofuranos e indólicos e explorar a interação *H. capsulatum*-hospedeiro. Além disso, objetivou-se estudar a toxicidade desses compostos *in vivo* utilizando animais alternativos, bem como averiguar o(s) seu(s) possível(is) mecanismo(s) de ação. Esferoides das linhagens pulmonares A549 e MRC-5 foram caracterizados pelo método de azul de Trypan, resazurina e iodeto de propídeo. O tamanho, a forma e densidade celular foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e confocal. Testes de sensibilidade foram conduzidos de acordo com o documento M27-A3, proposto pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), com pequenas modificações nos ensaios com *H. capsulatum*. A citotoxicidade foi avaliada em esferoides e em monocamada, por meio da adição de resazurina. A toxicidade *in vivo* foi avaliada no modelo de *Caenorhabditis elegans*, *Galleria mellonella* e *Zebrafish*. Foi verificada ação antibiofilme dos compostos mais potentes para *H. capsulatum*, pelo método de redução do sal tetrazólico (XTT). Os danos nos biofilmes maduros, foram visualizados por MEV e confocal. O mecanismo de ação foi averiguado pela quantificação do ergosterol da membrana, verificação de danos de parede com *Calcofluor White*, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) utilizando 2,7-dichlorodihydrofluoresceína, morte celular pelo ensaio de iodeto de propídeo (IP)/Anexina e técnica de PCR em tempo real. As interações entre células planctônicas e de biofilme maduro de *H. capsulatum* foram realizadas nos esferoides e comparadas às infecções nas mesmas condições em monocamadas, por PCR em tempo real. Os esferoides apresentaram diâmetros entre 370-600 µm e viabilidade maior que 80% após 10 dias de formação. A MEV e confocal mostraram uma arquitetura esferoidal íntegra e constituída por células interconectadas entre si. Dos compostos testados contra *H. capsulatum*, 18 foram mais eficazes com valores de CIM₉₀ de 0,122 a 61,25 µg/mL. No geral, os compostos testados foram menos tóxicos nos esferoides comparativamente à monocamada. Dentre os compostos testados o L7CF 166 (derivado de nitrofurano), o L7CF 197 (derivado indólico) e L7CF 219 (derivado nitrofurano/indólico) foram os mais específicos para o *H. capsulatum*. Nos modelos alternativos *C. elegans*, *G. mellonella* e *zebrafish* a toxicidade dos compostos foi baixa, mesmo em concentrações elevadas. Os compostos inibiram o biofilme inicial e maduro na concentração igual ou duas vezes a requerida para as células planctônicas. As micrografias mostraram uma redução na atividade metabólica, na espessura e na matriz extracelular dos biofilmes. Os três compostos reduziram a quantidade do ergosterol presente na membrana fúngica. Dois compostos L7CF 166 e L7CF 219 foram capazes de causar deformações na parede celular. Já os L7CF 197 e L7CF 219 foram capazes de induzir EROs nas células. Além disso, os três compostos provocaram morte celular por via necrótica. Os esferoides infectados com a forma planctônica obtiveram uma modulação negativa para o gene CBP1. Já os esferoides infectados com biofilme, apresentaram modulação positiva para o gene CBP1 e a GAPDH e, modulação negativa para gene DDR8. Adicionalmente, foram testados a série de derivados de nitrofuranos contra diferentes espécies de fungos. A citotoxicidade foi avaliada utilizando os cultivos em monocamada e esferoides de A549 e MRC-5 e toxicidade *in vivo* no modelo alternativo de *C.elegans*. A maioria dos compostos apresentou baixa atividade inibitória.

Os valores mais potentes de CIM₉₀ foram de 0,48 µg/mL contra *Paracoccidioides brasiliensis* (L7CF 182), 0,98 µg/mL contra *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes* (L7CF 193) e 3,9 µg/mL contra cepas de *Candida* e *Cryptococcus neoformans* (L7CF 113 e L7CF 181, respectivamente). Além disso, todos os compostos apresentaram baixa toxicidade quando testados *in vitro* e *in vivo*. Baseado nesses resultados, os esferoides mostram-se viáveis para o estudo de toxicidade de fármacos e para experimentos de infecção. No geral, os resultados sugerem que derivados de nitrofuranos e indólicos são compostos promissores para o tratamento de infecções fúngicas.

Palavras-chave: *Histoplasma capsulatum*; modelos tridimensionais, mecanismo de ação; atividade antifúngica; biofilmes; citotoxicidade; nitrofuranos; indólicos; *Trichophyton rubrum*; *Trichophyton mentagrophytes*; *Candida* sp., *Cryptococcus neoformans*; *Paracoccidioides brasiliensis*; animais alternativos.

ABSTRACT

Three-dimensional (3D) cultures are a type of cell culture that are intended to simulate tissue *in vivo* more faithfully. Fungal diseases affect more than 1 billion people worldwide. The increasing evolution of microbial resistance and the adverse effects of current antifungal drugs assist in the emergence of new drugs. This study aims to establish lung cell spheroids to evaluate the toxicity of nitrofuran and indole derivatives and explore the *H. capsulatum*-host interaction. Furthermore, we aim to study the toxicity of these compounds *in vivo* using alternative animals, as well as to investigate their possible mechanism(s) of action. Spheroids from the A549 and MRC-5 lung lines were characterized by Trypan blue, resazurin and propidium iodide methods. Cell size, shape and density were evaluated by scanning electron microscopy (SEM) and confocal microscopy. Sensitivity tests were conducted according to document M27-A3, proposed by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), with minor modifications in the assays with *H. capsulatum*. Cytotoxicity was assessed in spheroids and in monolayer by addition of resazurin. *In vivo* toxicity was evaluated in the *Caenorhabditis elegans*, *Galleria mellonella* and Zebrafish model. Antibiofilm action of the most potent compounds was verified for *H. capsulatum* by the tetrazolium salt reduction (XTT) method. The damage in the mature biofilms was visualized by SEM and confocal. The mechanism of action was ascertained by quantification of membrane ergosterol, verification of wall damage with Calcofluor White, production of reactive oxygen species (ROS) using 2,7-dichlorodihydrofluorescein, cell death by propidium iodide (PI)/Anexin assay and real-time PCR technique. Interactions between planktonic and mature biofilm cells of *H. capsulatum* were performed on the spheroids and compared to infections under the same conditions in monolayers by real-time PCR. The spheroids showed diameters between 370-600 μm and viability higher than 80% after 10 days of formation. SEM and confocal showed an intact spheroidal architecture consisting of cells interconnected with each other. Of the compounds tested against *H. capsulatum*, 18 were most effective with MIC₉₀ values from 0.122 to 61.25 $\mu\text{g/mL}$. Overall, the compounds tested were less toxic on spheroids compared to the monolayer. Among the compounds tested L7CF 166 (nitrofuran derivative), L7CF 197 (indole derivative) and L7CF 219 (nitrofuran/indole derivative) were the most specific for *H. capsulatum*. In the alternative models *C. elegans*, *G. mellonella* and zebrafish the toxicity of the compounds was low, even at high concentrations. The compounds inhibited the initial and mature biofilm at concentration equal to or twice that required for planktonic cells. Micrographs showed a reduction in metabolic activity, thickness, and extracellular matrix of the biofilms. All three compounds reduced the amount of ergosterol present in the fungal membrane. Two compounds L7CF 166 and L7CF 219 were able to cause deformations in the cell wall. L7CF 197 and L7CF 219, on the other hand, were able to induce ROS in the cells. In addition, all three compounds caused cell death via necrotic pathway. The spheroids infected with the planktonic form obtained a negative modulation for the CBP1 gene. The spheroids infected with biofilm showed positive modulation for CBP1 gene and GAPDH, and negative modulation for DDR8 gene. Additionally, the series of nitrofuran derivatives were tested against different fungal species. Cytotoxicity was evaluated using monolayer and spheroid cultures of A549 and MRC-5 and *in vivo* toxicity in the alternative *C. elegans* model. Most of the compounds showed low inhibitory activity. The most potent MIC₉₀ values were

0.48 µg/mL against *Paracoccidioides brasiliensis* (L7CF 182), 0.98 µg/mL against *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* (L7CF 193) and 3.9 µg/mL against *Candida* and *Cryptococcus neoformans* strains (L7CF 113 and L7CF 181, respectively). Furthermore, all compounds showed low toxicity when tested *in vitro* and *in vivo*. Based on these results, the spheroids show to be viable for drug toxicity study and for infection experiments. Overall, the results suggest that nitrofurans and indole derivatives are promising compounds for the treatment of fungal infections.

Keywords: *Histoplasma capsulatum*; three-dimensional models, mechanism of action; antifungal activity; biofilms; cytotoxicity; nitrofurans; indoles; *Trichophyton rubrum*; *Trichophyton mentagrophytes*; *Candida sp.*, *Cryptococcus neoformans*; *Paracoccidioides brasiliensis*; alternative animals.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Etapas do desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* que inclui cinco estágios: (I) adsorção, (II) adesão, (III) formação de microcolônias, (IV) biofilme maduro e (V) dispersão (COSTA-ORLANDI; SARDI; PITANGUI; DE OLIVEIRA et al., 2017).....39
- Figura 2** - Imagens representativa dos esferoides da linhagem A549 medindo 396,7 μm (A) e MRC-5 medindo 407,24 μm (B), obtidas em campo claro utilizando o equipamento InCell Analyser na magnificação de 10 $\times$73
- Figura 3** - Estruturas formadas utilizando diferentes concentrações de suspensões celulares. A: formação incompleta do modelo 3D; B: formação de pequenos esferoides no mesmo poço na concentração de 6×10^3 céls/poço e C: diâmetro do esferoide maior que o recomendado na concentração de 5×10^4 céls/poço.....74
- Figura 4** - Diâmetro dos esferoides das linhagens celulares A549 e MRC-5 no quarto, sétimo e décimo dia de formação. Houve significância estatística entre os diâmetros obtidas na linhagem A549 do 4º dia em relação ao 10º dia e para a linhagem MRC-5 do 4º dia em relação ao 7º e 10º dia. Valores expressos em média e desvio padrão. Os valores de p (***) foram calculados pela análise *One Way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni.76
- Figura 5** - Viabilidade celular utilizando o método de azul de Trypan nas linhagens celulares A549 (A) - e MRC-5 (B) nos modelos tridimensional e monocamada. A viabilidade celular se manteve estável até o décimo dia em ambos os modelos. As barras de erro indicam desvios padrão. Não houve diferença estatística entre as condições quando calculadas pela análise *One Way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni.79
- Figura 6** - Viabilidade celular pelo método de resazurina no modelo tridimensional das linhagens celulares A549 (A) e MRC-5 (B). A viabilidade manteve-se elevada após dez dias de formação dos esferoides. As barras de erro indicam desvios padrão. Não houve diferença

estatística quando comparada as condições calculadas pela análise *One Way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni..... 81

Figura 7 - Viabilidade celular utilizando iodeto de propídeo no quarto dia de cultura. **A** – cultura celular para a linhagem A549; **B** – cultura celular para a linhagem MRC-5. Em ambos os modelos, a viabilidade manteve-se elevada. As barras de erro indicam desvios padrão. Não houve diferença estatística quando comparada as condições calculadas pela análise *One Way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni. 82

Figura 8 - Imagem representativa da topografia dos esferoides formados pela linhagem A549. **A** – A linha amarela indica o diâmetro do esferoide, medindo 389,25 μm ; **B** – esferoide na magnificação de 250 $\times$; **C**- imagem na magnificação de 500 $\times$; **D** –magnificação de 1000 $\times$. . 83

Figura 9 - Imagem representativa da topografia dos esferoides formados pela linhagem MRC-5. **A**- linha amarela diâmetro de 389,33 μm ; **B** – esferoide na magnificação de 250X; **C**- imagem na magnificação de 500X e **D** – magnificação de 1000X. 84

Figura 10 - Imagem de microscopia de fluorescência do esferoide da linhagem celular A549 no quarto dia de cultivo. **A** – marcação do corante Hoesch (núcleo); **B** – marcação com Alexa Fluor Faloidina 647 (citoplasma); **C** – merge das marcações e **D** – merge com barra de profundidade..... 86

Figura 11 - Imagem de microscopia de fluorescencia do esferoide da linhagem celular MRC-5 no quarto dia de cultivo. **A** – marcação do corante Hoesch (núcleo); **B** – marcação com Alexa Fluor Faloidina 647 (citoplasma); **C** – merge das marcacoes e **D** – merge com barra de profundidade..... 87

Figura 12 – Fórmula molecular dos derivados de nitrofuranos..... 89

Figura 13 – Fórmula molecular dos derivados indólicos. 89

Figura 14 - Sobrevivência das cepas AU37 e N2 de *C. elegans* em diferentes concentrações dos derivados de nitrofurano e indólicos. **A** – Porcentagem de sobrevivência das larvas

tratadas com o derivado de nitrofurano L7CF 166. **B** – Porcentagem de sobrevivência das larvas colocadas em contato com o derivado indólico L7CF 197. **C** – Porcentagem de sobrevivência das larvas colocadas em contato com o derivado de nitrofurano/indólico L7CF 219. Valores expressos em média e desvio padrão. As barras de erro indicam desvios padrão. Os valores de p (*p<0,05; ***p < 0,001) foram calculados pela análise *One Way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni comparando todas as condições. 100

Figura 15 - Imagens representativas da cepa AU37 de *C. elegans*. Todas as imagens foram obtidas na concentração de 250 µg/mL para o composto L7CF 166 (**B**), L7CF 219 (**C**) e L7CF 197 (**D**). As setas pretas indicam larvas com forma sinusoidal (vivas) como no controle (**A**) e a seta vermelha, indica uma larva em formato de bastão (morta). 102

Figura 16 - Curva de sobrevivência para os diferentes compostos (**A**) derivado de nitrofurano L7C66, (**B**) derivado misto L7CF 219 e (**C**) derivado indólico L7CF 197. As curvas de sobrevivência foram plotadas pelo método Kaplan-Meier e analisadas por Log-rank (Mantel-Cox) não havendo diferença estatística quando comparada todas as condições. 103

Figura 17 - Imagens de embriões de *zebrafish* com 72 horas pós fertilização (hpf). **A**, **B** e **C** apresentam o grupo controle e as imagens **D**, **E** e **F** são o grupo tratado com o derivado de nitrofurano L7CF 166. As setas amarelas indicam um embrião com desenvolvimento normal para 72hpf. A seta vermelha indica um embrião com retardo no desenvolvimento e as setas azuis indicam embriões com coagulação. 106

Figura 18 - Curva de sobrevivência por tempo dos embriões de *Zebrafish*. **A** – Curva referente ao derivado de nitrofurano L7CF 166 e **B** – curva referente ao derivado misto L7CF 219. As curvas de sobrevivência foram plotadas pelo método Kaplan-Meier e analisadas por Log-rank (Mantel-Cox) não havendo diferença estatística quando comparada todas as condições. 106

Figura 19 - Imagem representativa de microscopia confocal do biofilme maduro sem tratamento de *H. capsulatum* EH-315 coradas com Concanavalin A - conjugado com Alexa flúor 488 (verde) e FUN-1 (vermelho). Em **A**, **B** e **C** vista do corte ortogonal dos biofilmes e **D**, **E** e **F** representação da imagem tridimensional para verificação da espessura e arquitetura. O biofilme apresenta grande quantidade de material extracelular e algumas hifas (**A**), além disso, alta atividade metabólica (**B** e **C**) e espessura em torno de 200 µm (**D**, **E** e **F**). 110

Figura 20 - Imagem representativa de microscopia confocal de *H. capsulatum* EH-315 tratado com L7CF 166 (**A** e **D**), L7CF 219 (**B** e **E**) e L7CF 197 (**C** e **F**) coradas com Concanavalin A - conjugado com Alexa fluor 488 e FUN-1. Em **A**, **B** e **C** visto do corte ortogonal dos biofilmes e **D**, **E** e **F** representação distribuição tridimensional dos biofilmes. As células tratadas com L7CF 166 (**A**), L7CF 219 (**B**) e L7CF 197 (**C**) apresentaram baixa atividade metabólica, com coloração amarelo esverdeado e uma redução na espessura do biofilme (**D**, **E** e **F**). 111

Figura 21 - Imagem representativa de microscopia de eletrônica de varredura de biofilmes de *H. capsulatum* EH-315 tratado com L7CF 166 e L7CF 219. A comunidade controle (**A** e **D**), apresentaram grande quantidade de células, além da presença de matriz extracelular (seta vermelha). Já os tratamentos com L7CF 166 (**B**) e L7CF 219 (**C**) foram capazes de causar uma grande inibição na maturação dos biofilmes (seta amarela). Além disso, o composto L7CF 219 (**F**) foi capaz de ocasionar pequenos buracos dentro das células (seta azul). 113

Figura 22 - Quantificação do ergosterol extraído do fungo *H. capsulatum* EH-315 tratado com L7CF 166, L7CF 197, L7CF 219, itraconazol e anfotericina B. Todos os tratamentos causaram redução das quantidades de esteróis extraídas da membrana. Indicando possível alvo no ergosterol ou na sua cadeia de síntese. Valores expressos em média e desvio padrão. As barras de erro indicam desvios padrão. Os valores de p (**p<0,01; ***p < 0,001) foram

calculados pela análise *One Way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni comparando todas as condições. 116

Figura 23 - Imagem representativa de microscopia de varredura a laser confocal de *H. capsulatum* EH-315 tratado com L7CF 166, L7CF 219, L7CF 197, itraconazol e anfotericina B e, coradas com *calcofluor white*. As células tratadas com L7CF 166 (**D**) mostraram pequenas falhas na parede celular (seta laranja). Já as células tratadas com anfotericina B (**B**) apresentaram prolongamentos (seta verde). Itraconazol (**C**) e L7CF 219 (**E**) causaram irregularidades no formato das células (setas vermelhas). Tanto as células sem tratamento (**A**) quanto as tratadas com o composto L7CF 197 (**F**) apresentaram-se com parede contínua e regular (seta branca). Os ensaios foram conduzidos em triplicata e em dois experimentos independentes. 119

Figura 24 - Medição da produção de EROs após tratamento de *H. capsulatum* EH-315 com L7CF 166, 197, 219, anfotericina B, itraconazol e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O fármaco anfotericina B, peróxido de hidrogênio e os compostos L7CF 197 e L7CF 219 induziram a formação de EROs quando comparados ao controle sem tratamento. O tratamento com itraconazol não induziu a formação de EROs quando comparado ao controle. Valores expressos em média e desvio padrão. As barras de erro indicam desvios padrão. Os valores de p (*p<0,05; ***p < 0,001) foram calculados pela análise *One Way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni comparando todas as condições. 121

Figura 25 - Mecanismo de morte celular induzida por apoptose (**A**) e necrose (**B**) após o tratamento de *H. capsulatum* EH-315 com anfotericina B (AmB), itraconazol, L7CF 166, 197 e 219. Todos os compostos testados induziram morte por necrose, em comparação com o controle não tratado. Apenas a AmB induziu a morte por via apoptótica. Valores expressos em média e desvio padrão. As barras de erro indicam desvios padrão. Os valores de p

(*p<0,05; **p<0,01; ***p < 0,001) foram calculados pela análise *One Way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni comparando todas as condições..... 123

Figura 26 - Imagem representativa de um eletroferograma com o RIN (A) e o gel virtual (B) de uma das amostras controle. O RIN apresenta o pico 18S e 28S, assim como o gel, apresenta as duas bandas ribossomais correspondentes e não há arraste no RNA..... 125

Figura 27 - Níveis de expressão relativa dos genes CatP e Erg 11 representados por Log₂Fold change na cepa de EH-315 tratada com L7CF 166 (A), L7CF 219 (B) e L7CF 197 (C), em comparação ao controle sem tratamento. A significância estatística foi determinada por teste t e indicada por asteriscos: *p <0,05..... 127

Figura 28 – Cultivo tridimensional (3D) infectado com a forma planctônica de *H. capsulatum*. A- Marcação do fungo com FITC (verde); B- as barras laterais mostram a homogeneidade da infecção, que se espalhou pelas células do cultivo 3D..... 129

Figura 29 - Cultivo tridimensional (3D) infectado com o estágio maduro do biofilme de *H. capsulatum*. A- Marcação do fungo com FITC (verde); B- as barras laterais mostram a homogeneidade da infecção, que se espalhou pelas células do cultivo 3D..... 130

Figura 30 - Esferoides das linhagens A549 e MRC-5 infectados com a forma planctônica de *H. capsulatum*. A – Marcação do núcleo da célula pulmonar; B- marcação do fungo no interior dos esferoides; C – marcação do citoplasma da célula pulmonar; D – merge das marcações; E – merge com a barra de profundidade..... 131

Figura 31 - Esferoides das linhagens A549 e MRC-5 infectados com a forma de biofilme de *H. capsulatum*. A – Marcação do núcleo da célula pulmonar; B- marcação do fungo no interior dos esferoides; C – marcação do citoplasma da célula pulmonar; D – merge das marcações; E – merge com a barra de profundidade..... 132

Figura 32 - Expressão gênica de esferoides pulmonares da linhagem MRC-5 infectados com a cepa de *H. capsulatum* EH-315 na forma planctônica (A) e de biofilme (B), após 24h de

infecção, quando comparados as respectivas infecções em monocamada em Log₂ Fold change.

Na forma planctônica (A) o gene CBP1 foi reprimido. Na forma de biofilme os genes CBP1 e GAPDH foram induzidos e o gene DDR48 reprimido. A significância estatística foi determinada por teste t e indicada por asteriscos: *p<0,05; **p<0,01..... 135

Figura 33 - Gráficos representativos da CIM₉₀ obtidos para cada espécie fúngica, para os 17 derivados de nitrofurano testados. 146

Figura 34 - Viabilidade das larvas de *Caenorhabditis elegans* após tratamento com os compostos testados. A viabilidade das larvas foi superior a 80% com todos os nitrofuranos testados, mesmo na maior concentração. Foram utilizadas vinte larvas por concentração em três experimentos independentes. Valores expressos em média e desvio padrão. As barras de erro indicam desvios padrão. Os valores de p (*p<0,05; **p<0,01; p < 0,001) foram calculados pela análise *One Way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni comparando todas as condições. 154

Figura 35 - Imagens do estágio L4 de *Caenorhabditis elegans*: larvas na concentração do composto igual a 250 µg/mL. (A) - grupo controle, a seta preta indica uma larva viva, em sua forma sinusoidal; (B - F) imagens representativas dos compostos L7CF113, 182, 181 e 193, respectivamente; as setas pretas apontam para uma larva viva em sua forma característica (senoidal) e a seta laranja mostra uma larva morta em sua forma característica de bastonete. 155

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos genes desenhados para PCR em tempo real relacionado ao mecanismo de ação dos compostos.	68
Tabela 2 – Primers desenhados para a análise do nível de expressão gênica dos esferoides e monocamada infectados com as formas planctônica e biofilme de <i>H. capsulatum</i>	72
Tabela 3 – Quantificação celular para as linhagens celulares nos dois modelos 2D e 3D, representados pela média e desvio padrão, por poço, após quatro, sete e dez dias de formação.	77
Tabela 4 - Resultados da concentração inibitória mínima obtidas na cepa EH315 quando testadas contra os derivados de nitrofurano e indólicos.	92
Tabela 5 - Concentração inibitória e fungicida mínima dos derivados de nitrofurano, indólicos, anfotericina B e itraconazol contra as cepas EH-315 e ATCC G217-B. Relação CFM/CIM ₉₀ dos compostos.....	94
Tabela 6 - Resultados do CC ₅₀ e índice de seletividade (IS) na linhagem celular A549 nas cepas EH-315 e ATCC G217-B em ambos os modelos monocamada e tridimensional.....	97
Tabela 7 - Resultados do CC ₅₀ e índice de seletividade (IS) na linhagem celular MRC-5 nas cepas EH-315 e ATCC G217-B em ambos os modelos monocamada e tridimensional.....	98
Tabela 8 - Concentração inibitória mínima e concentração inibitória mínima séssil dos compostos L7CF 166, L7CF 219 e L7CF 197, contra a forma planctônica, biofilme inicial nas cepas EH315 e ATCC G217-B de <i>H. capsulatum</i>	108
Tabela 9 - Valores mínimos de concentração inibitória e fungicida (µg/mL) dos 17 derivados nitrofuranos contra <i>Candida albicans</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. glabrata</i> e <i>Cryptococcus neoformans</i> ..	148
Tabela 10 - Valores mínimos de concentração inibitória e fungicida (µg/mL) dos 17 derivados nitrofuranos contra <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	149

Tabela 11 - Valores mínimos de concentração inibitória e fungicida ($\mu\text{g/mL}$) dos 17 derivados nitrofuranos contra dermatófitos.	150
Tabela 12 - Índice de seletividade ($\text{CC}_{50}/\text{CIM}_{90}$) de derivados de nitrofurano contra diferentes espécies de fungos em comparação com uma célula pulmonar A549.	152
Tabela 13 - Índice de seletividade ($\text{CC}_{50}/\text{CIM}_{90}$) de derivados de nitrofurano contra diferentes espécies de fungos em comparação com as células pulmonares MRC-5.	153

LISTA DE ABREVIATURAS

2D. Cultura monocamada
3D. Culturas tridimensionais
AmB. Anfotericina B
BHI. *Brain Heart Infusion*
BSA. *Bovine Serum Albumin*
CatB. Catalase B
CatP. Catalase P
CBP. *Calcium Binding Protein*
CC₅₀. Índice capaz de inibir 50% da proliferação celular
cDNA. *complementary DNA*
CFM. Concentração fungicida mínima
CIM₉₀. Concentração inibitória mínima 90%
CLSI. *Clinical and Laboratory Standards Institute*
CO₂. Dióxido de carbono
ConA: Concanavalin A
DMEM. *Dulbecco's modified Eagle's medium*
DMSO. Dimetilsulfóxido
DNA. Ácido desoxirribonucleico
EROs. Espécies Reativas de Oxigênio
FDA. *Food and Drug Administration*
GAPDH. Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
h. Hora
H₂DCFDA. 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
H₂O₂. Água oxigênada
HAM-F12. *Ham's F12 Nutrient Mixture*
HEPES. 2-[4-(2-hydroxyethyl) piperazin-1-yl] ethanesulfonic acid
HIV. Vírus da imunodeficiência humana
Hsps. *Heat shock proteins*
IDSA. Sociedade Americana de Doença Infeciosa
IP. Iodeto de propídeo
IS. Índice de seletividade
ITZ. Itraconazol
LAm A. Latino Americano A
LAm B. Latina Americano B
MEC. Matriz extracelular
MEV. Microscopia eletrônica de varredura
MOI. Multiplicidade de infecção
MOPS. ácido 3-(*N*-morfolina) propanossulfônico
NaCl. Cloreto de sódio
NAm 1. América do Norte 1
NAm 2. América do Norte 2
NGM. Meio de crescimento de nematóides

OD. Densidade ótica
OECD. *Organisation for Economic Co-operation and Development*
OMS. Organização Mundial da Saúde
Pb 18. *Paracoccidioides brasiliensis*
PBS. *Phosphate Buffered Saline*
PCR. *Polimerase chain reaction*
pH. Potencial hidrogeniônico
qPCR. PCR em Tempo Real
RIN. *RNA integrity number*
RJ. Rio de Janeiro
RNA. ácido ribonucleico
rpm. Rotação por minuto
RPMI. *Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium*
SFB. Soro fetal bovino
SIDA. Síndrome da Imunodeficiência Humana
SNC. Sistema Nervoso Central
SP. São Paulo
TA. Temperatura ambiente
TM. Temperatura de melting
TRB. Terbinafina
UV. Luz ultravioleta
XTT. *2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5 sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide)*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
1.1. MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE MAMÍFEROS	24
1.1.1. Cultura Celular	25
1.1.1.1. Culturas tridimensionais.....	26
1.2.1. Animais alternativos aos mamíferos	28
1.2.1.1. <i>Galleria mellonella</i>	29
1.2.1.2. <i>Caenorhabditis elegans</i>	29
1.2.1.3. <i>Zebrafish</i>	30
1.2. HISTOPLASMOSE E EPIDEMIOLOGIA	30
1.3. <i>HISTOPLASMA CAPSULATUM</i>	32
1.4. PATOGENIA E FATORES DE VIRULÊNCIA.....	33
1.5. BIOFILMES.....	38
1.6. TERAPÊUTICA E SUAS PROBLEMÁTICAS	40
1.6.1. Mecanismo de ação	43
1.7. NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS.....	45
<i>Parte I – Caracterização dos cultivos tridimensionais e eficácia e segurança farmacológica dos derivados de nitrofurano e indólicos testados em Histoplasma capsulatum e interação patógeno-hospedeiro.</i>	
2. OBJETIVO GERAL.....	50
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
3.1. CULTURA DE CÉLULAS.....	51
3.2. PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE CULTURA CELULAR TRIDIMENSIONAL (3D).....	51
3.3. CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE CULTURA CELULAR 3D	52
3.3.1. Tamanho dos esferoides	52
3.3.2. Quantificação celular e viabilidade celular por azul de <i>Trypan</i>	52
3.3.3. Viabilidade celular pelo método colorimétrico com resazurina.....	53
3.3.4. Viabilidade celular por iodeto de propídeo (IP).....	54
3.3.5. Análise topográfica dos esferoides.....	54
3.3.6. Microscopia confocal de varredura à laser.....	55
3.4. MICRORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO	55

3.5. OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS DERIVADOS DE NITROFURANOS E INDÓLICOS E FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS	56
3.6. TESTE DE SENSIBILIDADE AOS COMPOSTOS PELA TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO	57
3.6.1. Diluição dos derivados de nitrofuranos e indólicos.....	57
3.6.2. Diluição dos fármacos.....	57
3.6.3. Concentração inibitória mínima para <i>H. capsulatum</i>	58
3.6.4. Concentração fungicida mínima (CFM).....	59
3.7. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE NOS MODELOS TRIDIMENSIONAL (3D) E MONOCAMADA (2D) PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO DA RESAZURINA	59
3.8. ENSAIO DE TOXICIDADE NO MODELO <i>IN VIVO</i> <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i>	60
3.9. TOXICIDADE <i>IN VIVO</i> EM MODELO ALTERNATIVO <i>GALLERIA MELLONELLA</i>	60
3.10. ENSAIO DE TOXICIDADE <i>IN VIVO</i> EM MODELO <i>ZEBRAFISH</i>	61
3.11. TESTE DE SENSIBILIDADE FRENTE AOS BIOFILMES DE <i>HISTOPLASMA CAPSULATUM</i>	62
3.11.1. Ensaio de microscopia confocal de varredura à laser dos biofilmes para avaliação da espessura e metabolismo	63
3.11.2. Análise topográfica dos biofilmes tratados por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	63
3.12. MECANISMOS DE AÇÃO	64
3.12.1. Dosagem de ergosterol	64
3.12.2. Verificação de dano de parede celular por meio da coloração com <i>Calcofluor white</i>	65
3.12.3 Quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROs)	66
3.12.4. Necrose / apoptose	66
3.12.5. Análise do perfil de expressão de genes relacionados aos mecanismos de ação por PCR em tempo real (RT-PCR)	67
3.13. INFECÇÃO EM CULTIVO TRIDIMENSIONAL PELA TÉCNICA DE IMUNOFLUORÊSCENCIA	69
3.13.1. AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO DAS FORMAS PLANCTÔNICAS E DE BIOFILME EM MONOCAMADA E CULTIVO TRIDIMENSIONAL PELO MÉTODO DE RT-PCR.....	71
3.14. ANÁLISE ESTATÍSTICA	72
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
4.1. PADRONIZAÇÃO DA CULTURA TRIDIMENSIONAL.....	73
4.2. CARACTERIZAÇÃO DA CULTURA TRIDIMENSIONAL	75
4.2.1. Tamanho dos esferoides	75
4.2.2. Quantificação celular por azul de <i>Trypan</i>	77
4.2.3. Viabilidade celular por azul de <i>Trypan</i> e resazurina	79

4.2.4. Viabilidade por iodeto de propídeo	81
4.2.5. Topografia dos esferoides avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	83
4.2.6. Microscopia de fluorescência confocal	85
4.3. TESTE DE SENSIBILIDADE	88
4.3.1. Derivados de nitrofurano e indólicos	88
4.3.2. Concentração inibitória e fungicida mínima	91
4.4. TESTE DE CITOTOXICIDADE EM MODELO 2D E 3D E CÁLCULO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE DOS COMPOSTOS PARA <i>H. CAPSULATUM</i>	95
4.5. ENSAIO DE TOXICIDADE <i>IN VIVO</i> NO MODELO <i>C. ELEGANS</i>	100
4.6. TOXICIDADE <i>IN VIVO</i> EM <i>G. MELLONELLA</i>	103
4.7. TOXICIDADE <i>IN VIVO</i> EM EMBRIÕES DE <i>ZEBRAFISH</i>	105
4.8. TESTE DE SENSIBILIDADE FRENTE AOS BIOFILMES	107
4.8.1. Microscopia confocal dos biofilmes para análise de espessura e viabilidade	109
4.8.2. Análise topográfica dos biofilmes tratados por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	112
4.9. MECANISMO DE AÇÃO	116
4.9.1. Dosagem de ergosterol	116
4.9.2. Análise do dano de parede por coloração com <i>Calcofluor White</i> e microscopia confocal	118
4.9.3. Quantificação das espécies reativas de oxigênio (EROs)	120
4.9.4. Ensaio de necrose/apoptose	122
4.9.5. Análise do nível de expressão gênica	124
4.10. ESTABELECIMENTO DA INFECÇÃO NOS CULTIVOS TRIDIMENSIONAIS POR IMUNOFLUORESCÊNCIA	128
4.10.1. Análise do perfil de expressão gênica das infecções em monocamada e cultivo tridimensional	134
<i>Parte II – Eficácia e segurança farmacologia dos derivados de nitrofurano contra espécies de Candida, Paracoccidioides brasiliensis, Cryptococcus neoformans e dermatófitos.</i>	
5. OBJETIVO GERAL	139
5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	139
6. MATERIAL E MÉTODOS	140
6.1. COMPOSTOS E FÁRMACOS	140
6.2. MICRORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO	141
6.3. SUSCETIBILIDADE FÚNGICA A DERIVADOS DE NITROFURANO E DROGAS ANTIFÚNGICAS	141
6.3.1. <i>Candida sp.</i> e <i>Cryptococcus neoformans</i>	141
6.3.2. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	142
6.3.3. <i>Trichophyton rubrum</i> e <i>T. mentagrophytes</i>	142

6.4.	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA DE FUNGICIDA (CFM).....	143
6.5.	MANUTENÇÃO DE LINHAGEM CELULAR	143
6.6.	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM MODELOS DE MONOCAMADA E TRIDIMENSIONAL PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO DE RESAZURINA	144
6.7.	TOXICIDADE <i>IN VIVO</i> NO MODELO DE <i>C. ELEGANS</i>	144
6.8.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	145
7.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	146
7.1.	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE AMPLO ESPECTRO	146
7.2.	DETERMINAÇÃO DE CIM ₉₀ E MFC PARA ESPÉCIES DE <i>CANDIDA</i> E <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i>	147
7.3.	DETERMINAÇÃO DE CIM ₉₀ E CFM PARA <i>P. BRASILIENSIS</i>	148
7.4.	Determinação de CIM ₉₀ e CFM para <i>T. mentagrophytes</i> e <i>T. rubrum</i>	149
7.5.	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO DE RESAZURINA E ÍNDICE DE SELETIVIDADE	150
7.6.	TOXICIDADE NO MODELO <i>IN VIVO</i> DE <i>C. ELEGANS</i>	154
8.	CONCLUSÕES	159
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	161

1. INTRODUÇÃO

1.1. MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE MAMÍFEROS

A pesquisa científica necessita de inovação constante e, para que isso ocorra, há necessidade de novas metodologias que sejam capazes de correlacionar avanço científico e ao mesmo tempo propiciar o bem-estar animal. Os animais em pesquisa são preciosos para o avanço na compreensão da biologia em diferentes âmbitos, desde a elucidação do comportamento, entendimento de doenças, distúrbios, desenvolvimento de fármacos e outras atividades. No entanto, muitos países adotaram legislações para restringir o uso de animais vertebrados em determinados setores, inclusive na área de experimentação animal, tornando cada vez mais rigorosa a utilização de animais mamíferos. Neste quesito, o princípio dos 3 R's criado em 1959 por Russel e Burch, tem sido utilizado até os dias atuais em legislações e guias de experimentação animal em muitos países (ADLER; BASKETTER; CRETON; PELKONEN *et al.*, 2011; CLARK, 2017; ROBINSON; KRIEGER; KHAN; HUFFMAN *et al.*, 2019; TRAVERSA; JOACHIM, 2018).

Os 3 R's têm origem na língua inglesa e significam *replacement* (substituição), *reduction* (redução) e *refinement* (refinamento). O primeiro "R" diz respeito a substituição dos animais vertebrados por outros organismos invertebrados, embriões de vertebrados, métodos *in silico* ou microrganismos. Já existem métodos que são capazes de substituir o uso de animais em pesquisa, como abordagens de engenharia de tecidos, métodos computacionais, cultura celular que permitem que células-tronco cresçam, expandam e formem um tecido tridimensional. Há também as culturas tridimensionais *in vitro* de esferoides, os organoides e os animais alternativos, como os vertebrados com um sistema neurofisiológico com menor sensibilidade (embriões de *zebrafish*) ou invertebrados como *Galleria mellonella*, *Caenorhabditis elegans*, entre outros (ARCK, 2019; CLARK, 2017; HUANG; LEE; HSU; LIAO *et al.*, 2021; SNEDDON; HALSEY; BURY, 2017).

O segundo “R” trata sobre a redução no número de animais. Esta redução visa minimizar o número de animais utilizados nos experimentos. No entanto, a mesma não poderá comprometer a qualidade dos experimentos e, para isto, é imprescindível sempre utilizar técnicas complementares, como as citadas acima: cultura celular, outros organismos, modelos computacionais, etc. E por último, o terceiro “R” diz respeito ao refinamento. Em um determinado momento torna-se necessário o uso de algum tipo de espécie animal. Caso isto venha ocorrer, é fundamental que haja uma melhoria no tratamento do animal, proporcionando o bem-estar dos mesmos, essencial para o funcionamento biológico saudável e um repertório comportamental normal. Portanto, refinar procedimentos para reduzir sua invasão ou o grau de estresse que causam e aperfeiçoar a habitação e a criação de animais deve ser o objetivo de qualquer cientista (ARCK, 2019; SNEDDON; HALSEY; BURY, 2017; TRAVERSA; JOACHIM, 2018).

1.1.1. Cultura Celular

Nas últimas décadas, a cultura celular tornou-se umas das técnicas mais utilizadas em substituição ou em complementariedade a utilização de animais *in vivo*. A cultura de células surgiu no século XX com Harrison e Carrel. Essa técnica se iniciou com o estudo do comportamento das células animais fora do corpo em um ambiente controlado. Nos dias atuais, a cultura de células se expandiu e tornou-se uma importante ferramenta para a avaliação de doenças degenerativas, terapia celular, teste de toxicidade e eficácia de novas moléculas, métodos de simulação de infecções, entres outras infinitas possibilidades (ABBAS; MORADI; HU; REGUDO *et al.*, 2021; GRÄSSER; BUBEL; SOSSONG; OBERRINGER *et al.*, 2018; MOLINARO ; CAPUTO ; AMENDOEIRA, 2012).

A cultura de células em monocamada (2D) é um dos modelos mais utilizados, devido a sua facilidade na troca de meio de cultura, subcultura, análise e a facilidade de

padronização. No entanto, nos tempos atuais percebeu-se que esse tipo de cultura celular tem limitações, já que elas crescem em uma garrafa plástica formando uma camada com arquitetura simples, resultando em perda de função fisiológica, devido à degeneração de características no seu desenvolvimento. Esse tipo de cultura *in vitro*, apesar de apresentar uma certa similaridade com a realidade, ainda traz alguns problemas no desenvolvimento e crescimento celular. Esse cultivo, não possui uma arquitetura tridimensional e heterogeneidade de um tecido *in vivo*, além de uma adesão celular reduzida (DESROCHERS; PALMA; KAPLAN, 2014; FRIEDRICH; SEIDEL; EBNER; KUNZ-SCHUGHART, 2009; GRÄSSER; BUBEL; SOSSONG; OBERRINGER *et al.*, 2018; HABANJAR; DIAB-ASSAF; CALDEFIE-CHEZET; DELORT, 2021).

1.1.1.1. Culturas tridimensionais

As culturas tridimensionais (3D), vêm estabelecendo um papel importante em estudos *in vitro*. É um modelo alternativo promissor para pesquisar possíveis medicamentos numa maior distribuição e eficácia nos tecidos. O investimento nesses novos modelos pode gerar uma redução nos custos em pesquisa, permitindo a identificação de novas moléculas, e diminuindo conseqüentemente o tempo de seu desenvolvimento pela indústria farmacêutica. Evidências experimentais entre cultivos 3D e camundongos, mostram que alguns medicamentos têm toxicidade similar nesses modelos, e que diferem do que ocorre em 2D (BELFIORE; AGHAEI; LAW; DOBROWOLSKI *et al.*, 2021; FRIEDRICH; SEIDEL; EBNER; KUNZ-SCHUGHART, 2009; SILVA; S, 2014).

Uma das metodologias utilizadas para os cultivos tridimensionais é a de *scaffold free*. Trata-se de um cultivo de baixa adesão, que utiliza gel de agarose para o cultivo das células. Trata-se de uma técnica de fácil execução, simples, com menor investimento econômico e demanda de tempo e sem necessidade de aprovação de comitê de ética (BELFIORE;

AGHAEI; LAW; DOBROWOLSKI *et al.*, 2021; DOKE; DHAWALE, 2015; KUPPAST, 2012). Os esferoides são formados pela interação de células, que se unem formando uma cultura 3D. Existem várias metodologias para sua formação e eles são capazes de criar interações célula-célula e célula-matriz semelhantes ao tecido (BELFIORE; AGHAEI; LAW; DOBROWOLSKI *et al.*, 2021; SALEH, 2017). Portanto, cultivar células em 3D. permite um ambiente fisiológico intenso de contato direto entre célula-célula, bem como o contato das células com os componentes da matriz extracelular, que é composta principalmente de colágeno I, colágeno III e fibronectina. Além disso, existem diferenças nas respostas celulares, na expressão gênica e comportamento celular, ao contrário do que se observa nos modelos em monocamada (DOKE; DHAWALE, 2015; GRÄSSER; BUBEL; SOSSONG; OBERRINGER *et al.*, 2018; SALEH, 2017).

Os esferoides são essencialmente idênticos entre si, levando em consideração sua estrutura, morfologia, microambiente e fisiologia celular, proporcionando modelos mais confiáveis para ensaios de avaliação de toxicidade e/ou eficácia de compostos potenciais candidatos a fármaco (GRÄSSER; BUBEL; SOSSONG; OBERRINGER *et al.*, 2018). Apesar de uma arquitetura simples, é capaz de reproduzir o ambiente *in vivo* (EDMONDSON; BROGLIE; ADCOCK; YANG, 2014; KIM, 2005). Além disso, pesquisas recentes vêm demonstrando a importância desses cultivos celulares no estudo da interação patógeno-hospedeiro (HARB; FAKHREDDINE; ZARAKET; SALEH, 2021). A utilização dos cultivos 3D tem auxiliado na verificação da progressão das doenças infecciosas e na elucidação de mecanismos de defesa e escape dos patógenos, que muitas vezes não eram identificados utilizando os cultivos em monocamada (BARUA; HUANG; LI; YANG *et al.*, 2021; HARB; FAKHREDDINE; ZARAKET; SALEH, 2021; HERRINGTON; POULSOM; KOEPPEN; COATES, 2021).

1.2.1. Animais alternativos aos mamíferos

Os animais são utilizados há muitos anos para a compreensão da fisiologia, anatomia, produção de vacinas, fármacos, compreensão de doenças, entre outros, fornecendo dados altamente relevantes para o progresso da ciência, aliviando assim o sofrimento humano perante o surgimento de novos males. No entanto, os modelos mamíferos vêm se tornando cada vez mais restritos e incondizentes com as novas diretrizes científicas (ADLER; BASKETTER; CRETON; PELKONEN *et al.*, 2011; CLARK, 2017; ROBINSON; KRIEGER; KHAN; HUFFMAN *et al.*, 2019).

Nesse quesito, os animais alternativos apresentam algumas vantagens em relação aos mamíferos, como o baixo custo, fácil manutenção e não necessidade de aprovação pelos comitês de ética para a sua utilização (FREIRES; SARDI; DE CASTRO; ROSALEN, 2017). Os testes *in vivo* tendem a fornecer múltiplas avaliações no estudo de eficácia e segurança farmacológica. Além disso, a utilização da combinação de modelos *in vitro* e *in vivo* fornecem uma avaliação mais ampla dos compostos, analisando tanto seus efeitos em tecidos específicos como seu efeito em um todo no animal (FREIRES; SARDI; DE CASTRO; ROSALEN, 2017; SZABO; SVENSSON AKUSJÄRVI; SAXENA; LIU *et al.*, 2017; VENNIRO; CAPRIOLI; SHAHAM, 2016).

Em relação aos animais alternativos, os modelos mais utilizados são os invertebrados *Artemia salina*, *Drosophila melanogaster*, *Galleria mellonella* e *Caenorhabditis elegans* e entre os vertebrados temos o *Danio rerio* (zebrafish) e *Oryzias latipes* (peixe medaka) (FREIRES; SARDI; DE CASTRO; ROSALEN, 2017; SZABO; SVENSSON AKUSJÄRVI; SAXENA; LIU *et al.*, 2017; VENNIRO; CAPRIOLI; SHAHAM, 2016). Segundo o estudo conduzido por Freires e colaboradores (2017), dentre os animais alternativos, os mais citados são a *Drosophila melanogaster* (40%), seguido do zebrafish (29,74%), *C. elegans* (26,53%), *G. mellonella* (1,14%) e *A. salina* (0,70%).

1.2.1.1. *Galleria mellonella*

A *G. mellonella* é um animal invertebrado, conhecido como larva da traça-da-cera (KAVANAGH; REEVES, 2004). Possui um sistema imunológico semelhante ao sistema imune inato de mamíferos, apresentando resposta imune celular e humoral. A resposta imune celular consiste em células fagocíticas, os hemócitos, que desempenham papel tanto na encapsulação como na coagulação. Já a resposta humoral envolve proteínas similares ao do sistema complemento, melanina e peptídeos antimicrobianos (TSAI; LOH; PROFT, 2016). A sua utilização em pesquisa, permite observar os efeitos tóxicos de um novo composto. Além disso, ajuda a reduzir o uso de mamíferos durante as avaliações pré-clínicas, bem como os custos no desenvolvimento de medicamentos (DESBOIS; COOTE, 2012; PIATEK; SHEEHAN; KAVANAGH, 2021; TSAI; LOH; PROFT, 2016).

1.2.1.2. *Caenorhabditis elegans*

Os nematoides, como o *C. elegans*, são um dos seres vivos mais abundantes no planeta. Esse invertebrado tem vida livre, é hermafrodita, com alta taxa de reprodução, medindo cerca de 1mm e se alimenta de bactérias não patogênicas, especialmente a *Escherichia coli* (ADAMS; FODOR; KOPPENHÖFER; STACKEBRANDT *et al.*, 2006; IRAZOQUI; URBACH; AUSUBEL, 2010). O seu genoma é totalmente codificado, o que facilita a utilização em muitos estudos e inclusive modificações genéticas no animal (IRAZOQUI; URBACH; AUSUBEL, 2010). Além disso, possuem uma alta homologia genética e uma resposta imune inata similar à dos mamíferos, o que torna esse modelo um aliado no desenvolvimento de novos fármacos (BREGER; FUCHS; APERIS; MOY *et al.*, 2007; EWBANK; ZUGASTI, 2011).

1.2.1.3. Zebrafish

O *Danio rerio* é popularmente conhecido como *zebrafish* ou peixe paulistinha. É um organismo vertebrado, pertencente à família *Cyprinidae* e originário do continente asiático (MEYERS, 2018). Sobrevivem bem em temperatura ambiente (cerca de 28°C) e se alimentam preferencialmente de insetos, zooplânctons ou ração (MEYERS, 2018; SUNDIN; MORGAN; FINNØEN; DEY *et al.*, 2019). São de fácil reprodução e em cativeiro seu ciclo reprodutivo pode ser o ano todo, desde que, tenham uma luminosidade adequada, já que tendem a iniciar sua reprodução no período da manhã. Após a fertilização os embriões eclodem e o fim do período embrionário ocorre dentro de 72 horas (KIMMEL; BALLARD; KIMMEL; ULLMANN *et al.*, 1995; STREISINGER; WALKER; DOWER; KNAUBER *et al.*, 1981; SURIYAMPOLA; SHELTON; SHUKLA; ROY *et al.*, 2016). Possuem vida média de 3 a 5 anos, no entanto, a partir do segundo ano, já são considerados velhos. Seu genoma já foi totalmente codificado, e os resultados mostram que esses pequenos animais possuem 71% de genes semelhantes aos dos humanos. Os seus embriões são muito utilizados em testes de teratogenicidade, apresentando baixo custo, fácil reprodução, boa correlação dos testes com mamíferos, além disso, eles possuem fígado, rins e barreiras hematoencefálicas funcionais (MACRAE; PETERSON, 2015; MEYERS, 2018).

1.2. HISTOPLASMOSE E EPIDEMIOLOGIA

As doenças fúngicas acometem mais de 1 bilhão de pessoas no mundo todo e têm sintomatologia diversificada, podendo variar quanto a sua gravidade, de simples até doença grave e levar os indivíduos acometidos à morte. A taxa de mortalidade é altamente relevante, já que representa mais de 1,6 milhões de óbitos, se assemelhando à taxa de mortalidade da tuberculose e sendo três vezes mais elevada que a registrada por malária, e mesmo assim a maioria das doenças fúngicas ainda são negligenciadas. As crescentes mudanças

socioeconômicas, somadas ao aumento do número de pessoas que apresentam comprometimento do sistema imune ocasionado por exemplo, por pandemias de HIV/SIDA e, mais recentemente, pelo vírus Sars-Cov2, além de doenças pulmonares crônicas, cânceres e transplantes de órgãos são os responsáveis pelo aumento dessa taxa de mortalidade, que afeta tanto os países em desenvolvimento quanto os desenvolvidos (BASSO; POESTER; BENELLI; STEVENS *et al.*, 2021; BONGOMIN; GAGO; OLADELE; DENNING, 2017; LASS-FLÖRL; SAMARDZIC; KNOLL, 2021; LIMPER; ADENIS; LE; HARRISON, 2017; MESSINA; MARIN; CACERES; ROMERO *et al.*, 2020).

Dados divulgados pela *World Health Organization* (WHO) em outubro de 2022, alertaram que as doenças fúngicas representam uma ameaça global emergente e pouco conhecida, que está se agravando devido ao rápido surgimento de resistência antifúngica e, em muitos cenários, acesso limitado a diagnósticos de qualidade e tratamento. Foram realizadas classificações em crítico, alto e média prioridade. O grupo crítico inclui *Cryptococcus neoformans*, *Candida auris*, *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans*. O grupo alta prioridade inclui *Candida glabrata*, *Histoplasma* spp., *Mucorales*, *Fusarium* spp., *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*. Os patógenos do grupo de média prioridade são *Scedosporium* spp., *Lomentospora prolificans*, *Coccidioides* spp., *Candida krusei*, *Cryptococcus gattii*, *Talaromyces marneffeii*, *Pneumocystis jirovecii* e *Paracoccidioides* spp. (WHO, 2022)

A micose sistêmica denominada histoplasmose é causada pelo fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum*. Esta doença foi descrita pela primeira vez no início do século XX por Samuel Darling, no Panamá, mas, somente em 1934, o microrganismo foi identificado como dimórfico (AIDÉ, 2009; FERREIRA; BORGES, 2009).

A histoplasmose é considerada uma micose de distribuição mundial, já descrita em todos os continentes, com exceção da Antártica (WHEAT; AZAR; BAHR; SPEC *et al.*,

2016). As regiões mais afetadas incluem América do Norte (principalmente as regiões que circundam os rios Ohio e Mississipi) e América do Sul. No Brasil sua distribuição é por todas as regiões, afetando principalmente o Sudeste, região com o maior número de casos. Há relatos em outras partes do mundo como sul e leste europeu, África, Ásia e Austrália (AIDÉ, 2009; SALZER; BURCHARD; CORNELLY; LANGE *et al.*, 2018).

Segundo dados publicados por Bongomin e colaboradores (2017), *H. capsulatum* é um dos principais patógenos fúngicos causadores de doença fúngica grave. A incidência anual de histoplasmose fica em torno de 500 mil casos e, em alguns surtos, 50% das infecções resultam em doença clínica (ASHRAF; KUBAT; POPLIN; ADENIS *et al.*, 2020; BONGOMIN; KWIZERA; DENNING, 2019; GOUGHENOUR; RAPPLEYE, 2017). A incidência da histoplasmose em pacientes com HIV/SIDA nas áreas endêmicas varia de 2–25%, 50-75% destes, representam a primeira infecção, tendo uma taxa de óbito de aproximadamente 60% (ADENIS; NACHER; HANF; VANTILCKE *et al.*, 2014; BONGOMIN; GAGO; OLADELE; DENNING, 2017; LIMPER; ADENIS; LE; HARRISON, 2017).

1.3. *Histoplasma capsulatum*

Até recentemente, a taxonomia do gênero *Histoplasma* era dividida em três grupos, baseados na distribuição geográfica e manifestações clínicas. *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* é a variedade mais comum no mundo e é considerado o principal agente causador de histoplasmose em humanos; *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* é encontrado na África e *Histoplasma capsulatum* var. *farciminosum* acomete equinos (KASUGA; WHITE; KOENIG; MCEWEN *et al.*, 2003; MITTAL; PONCE; GENDLINA; NOSANCHUK, 2019). No entanto, na classificação filogenética realizada por Kasuga e colaboradores (2003), foram identificados oito clados geneticamente diferentes: América do Norte 1 (NA_m 1) e 2 (NA_m 2), Grupo Latino-Americano A (LA_m A) e B (LA_m B), Austrália, Países baixos, Eurásia e

África. Já Teixeira e colaboradores (2016) propuseram novos clados filogenéticos, sendo RJ, LAm A1, LAm A2, LAm B e BAC1. Sepúlveda e colaboradores (2017), estudaram cinco clusters, incluindo o do Panamá linhagem H-81, Nam1, Nam 2, LAm A e Africana. Com isto, os autores sugeriram um novo renome: *H. capsulatum sensu stricto* Darling 1906 (Panamá), *H. mississippiense* sp. nov. (NAm); *H. ohienne* sp. nov. (NAm 2), *H. suramericanum* sp. nov. (LAm A) e africana. Sabe-se ainda que algumas espécies deste fungo permanecem desconhecidas e novas classificações podem ainda surgir (KASUGA; WHITE; KOENIG; MCEWEN *et al.*, 2003; MITTAL; PONCE; GENDLINA; NOSANCHUK, 2019; RODRIGUES; BEALE; HAGEN; FISHER *et al.*, 2020; SEPÚLVEDA; MÁRQUEZ; TURISSINI; GOLDMAN *et al.*, 2017; VITE-GARÍN; ESTRADA-BÁRCENAS; GERNANDT; REYES-MONTES *et al.*, 2021).

Por se tratar de um fungo dimórfico, *H. capsulatum* apresenta dois fenótipos diferentes, dependendo da temperatura em que se encontra: micélio e de levedura. Na temperatura ambiente, em torno de 25 a 30°C, o micélio forma uma colônia branca aérea, com hifas septadas, finas e hialinas, que contém microconídeos que apresentam parede fina e lisa (2-6 µm) e macroconídeos tuberculados, cobertos por projeções espiculadas, podendo chegar até 25 µm. Já a 37°C, as leveduras são pequenas (3 à 5 µm de diâmetro), ovaladas, podem apresentar gemulação única e as colônias têm aspecto úmido, lisas e de coloração branco-amarelado (FERREIRA; BORGES, 2009; KASUGA; WHITE; KOENIG; MCEWEN *et al.*, 2003; MITTAL; PONCE; GENDLINA; NOSANCHUK, 2019).

1.4. PATOGENIA E FATORES DE VIRULÊNCIA

O crescimento e o desenvolvimento do fungo *H. capsulatum* está associado a solos ricos em matéria orgânica e nitrogênio como os que contém excrementos de aves e morcegos.

O homem se infecta pela inalação dos conídios ou fragmentos de hifas presentes na natureza (FERREIRA; BORGES, 2009; GOUGHENOUR; RAPPLEYE, 2017).

O tamanho pequeno desses propágulos facilita aerossolização após perturbações ambientais, como a ação provocada pelo vento, limpeza do ambiente, demolições, entre outros. Com isto, há a deposição destes pequenos fragmentos nos alvéolos pulmonares. Esses fatores fazem com que certas atividades ocupacionais contribuam como fator de risco primário para a infecção (GOUGHENOUR; RAPPLEYE, 2017; LIMPER; ADENIS; LE; HARRISON, 2017).

Após a inalação, dentro dos pulmões, o fungo, por ser um corpo estranho é reconhecido pelas células fagocíticas e é fagocitado pelos macrófagos alveolares. Os conídios transitam para a fase patogênica, ou seja, há a conversão da forma micelial para a forma leveduriforme, devido à temperatura corporal. Dependendo do estado imunológico do indivíduo, o microrganismo pode permanecer latente ou se multiplicar no interior destas células. Daí se estabelece a infecção pulmonar primária, que pode se disseminar por via linfática e sanguínea, podendo causar inflamação em outros órgãos como baço e medula óssea (acometendo preferencialmente o sistema fagocítico mononuclear), provocando assim a histoplasmose disseminada (FERREIRA; BORGES, 2009; KAUFFMAN, 2007). As leveduras são capazes de sobreviver às defesas imunológicas inatas, podendo permanecer inativas por anos e reativados em decorrência de uma imunossupressão (FERREIRA; BORGES, 2009; GOUGHENOUR; RAPPLEYE, 2017; LIMPER; ADENIS; LE; HARRISON, 2017).

O sistema imune produz uma resposta pró-inflamatória (Th1 / Th17) que se torna necessária para controlar o crescimento do fungo. Portanto, pessoas infectadas com vírus HIV correm maior risco de desenvolverem a histoplasmose disseminada, já que elas têm sua resposta imunológica reduzida. Caso essa doença não seja tratada a tempo, pode ser letal

(ARAÚZ; PAPINENI, 2021; KAUFFMAN, 2007; LIMPER; ADENIS; LE; HARRISON, 2017). Outros fatores relacionados ao hospedeiro, como baixa contagem de CD4 e CD8, utilização de alguns medicamentos (corticosteroides, quimioterápicos), indivíduos transplantados, favorecem o aparecimento da doença (FERREIRA; BORGES, 2009; GOUGHENOUR; RAPPLEYE, 2017; LIMPER; ADENIS; LE; HARRISON, 2017).

As manifestações clínicas dependem do estado imunológico do hospedeiro e da dose infecciosa. A doença é geralmente assintomática ou se manifesta como uma doença respiratória aguda que é autolimitada em pessoas imunocompetentes, mas pode resultar em doença grave com comprometimento pulmonar progressivo ou infecção disseminada em imunocomprometidos (SALZER; BURCHARD; CORNELLY; LANGE *et al.*, 2018). Na maioria dos casos, há a presença sintomas pulmonares, como tosse e dor torácica, além de, febre, calafrios, cefaleia, mialgia e anorexia (FERREIRA; BORGES, 2009).

Além do estado imunológico do hospedeiro, os fatores de virulência relacionados ao fungo também podem contribuir para uma maior invasão, proliferação e sobrevivência desse patógeno. Um dos mecanismos para se evitar a invasão de *H. capsulatum* é a produção de espécies reativas de oxigênio pelas células fagocíticas. Em contrapartida, o fungo pode driblar as defesas do hospedeiro e produzir algumas partículas como superóxido dismutase extracelular (Sod3) que neutralizam e protegem o fungo desse ataque (HOLBROOK; SMOLNYCKI; YOUSEFF; RAPPLEYE, 2013; JOHNSON; KLOTZ; YORK; KRUFTH *et al.*, 2002; YOUSEFF; HOLBROOK; SMOLNYCKI; RAPPLEYE, 2012). Além disso, as catalases como a CatB e a CatP são importantes para esse processo (HOLBROOK; SMOLNYCKI; YOUSEFF; RAPPLEYE, 2013). A CatB, também conhecida como antígeno M, é uma glicoproteína com massa molecular de aproximadamente 90 kDa. Essa glicoproteína contém epítomos proteicos específicos da espécie e epítomos glicosídicos, que facilitam a identificação da espécie e a reação com anticorpos humanos (GUIMARÃES;

HAMILTON; DE; NOSANCHUK *et al.*, 2008; HAMILTON; BARTHOLOMEW; FIGUEROA; FENELON *et al.*, 1990; HOLBROOK; SMOLNYCKI; YOUSEFF; RAPPLEYE, 2013; JOHNSON; KLOTZ; YORK; KRUFTH *et al.*, 2002; ZANCOPE-OLIVEIRA; REISS E FAU - LOTT; LOTT TJ FAU - MAYER; MAYER LW FAU - DEEPE *et al.*, 1999). A CatP tem aproximadamente 57 kDa de massa molecular, sendo descrita como uma catalase peroxissomal monofuncional, similar a catalase P já descrita para *Paracoccidioides brasiliensis* (GUIMARÃES; HAMILTON; DE; NOSANCHUK *et al.*, 2008; HOLBROOK; SMOLNYCKI; YOUSEFF; RAPPLEYE, 2013). Alguns estudos já descreveram que ambas as catalases atuam como importante fator de virulência para o fungo (ALBUQUERQUE; NAKAYASU; RODRIGUES; FRASES *et al.*, 2008; JOHNSON; KLOTZ; YORK; KRUFTH *et al.*, 2002).

Outro fator de virulência importante é a proteína ligante de cálcio 1, denominada CBP 1. Ela possui uma massa molecular de 7,8 kDa e é uma das mais abundantes na fase leveduriforme (AZIMOVA; HERRERA; DUVENAGE; VOORHIES *et al.*, 2021; BATANGHARI; GOLDMAN, 1997). Essa proteína permite o desenvolvimento do fungo na célula hospedeira. Estudos demonstraram que em sua ausência, embora o fungo consiga infectar macrófagos, não é capaz de lisar as células em experimentos *in vitro* e *in vivo* (AZIMOVA; HERRERA; DUVENAGE; VOORHIES *et al.*, 2021; ENGLISH; VAN PROOYEN; ÖRD; SIL, 2017; ISAAC; BERKES; ENGLISH; HOCKING MURRAY *et al.*, 2015; SEBGHATI, TRICIA SCHURTZ; ENGLE, JACQUELYN; GOLDMAN, WILLIAM E., 2000).

O gene DDR48 já foi descrito como um importante mecanismo de sobrevivência do fungo na patogênese, sendo capaz de combater os efeitos do óxido nítrico e reparar o DNA (MOSTAFA; AWAD, 2014; TREGER; MCENTEE, 1990). Além disso, estudos com espécies de *Candida* demonstraram que esse gene atuou na resposta a drogas antifúngicas

(BLANCETT; RUNGE; REYES; KENNEDY *et al.*, 2020; SHENG; SCHUSTER, 1993). Isso foi observado no estudo conduzido por Blancett e colaboradores (2020), os autores utilizaram de cepas mutantes de *H. capsulatum* e descobriram que o gene também foi importante na resposta antifúngica, além de, ajudar na sobrevivência do fungo na patogênese.

Durante a fase de transição morfológica, alguns genes são de suma importância para que isso ocorra. Com o aumento da temperatura há a produção de proteínas de choque térmico (*Heat-shock proteins* - Hsps) (BURNIE; CARTER; HODGETTS; MATTHEWS, 2006). As Hsps são chaperonas responsáveis por responder a vários estímulos como mudança de pH, estresse oxidativo e ao aumento da temperatura (ALMEIDA; BAEZA; ALMEIDA-PAES; BAILÃO *et al.*, 2021; BURNIE; CARTER; HODGETTS; MATTHEWS, 2006). A principal Hsp descrita para *H. capsulatum* é a Hsp60, considerada uma molécula de massa molecular de 60 kDa. Algumas funções dessa proteína já foram descritas para o fungo, como atuar como mediador da ligação do fungo a células hospedeiras (macrófagos), interagir com outras proteínas, no dimorfismo, estresse térmico e patogênese (CLEARE; ZAMITH-MIRANDA; NOSANCHUK, 2017; GOMEZ; GOMEZ; DEEPE, 1991; GUIMARÃES; DE CERQUEIRA; NOSANCHUK, 2011; GUIMARÃES; FRASES; GOMEZ; ZANCOPÉ-OLIVEIRA *et al.*, 2009; GUIMARÃES; NAKAYASU; SOBREIRA; CORDERO *et al.*, 2011; HABICH; KEMPE; GOMEZ; LILLICRAP *et al.*, 2006).

Na sua fase leveduriforme, o *H. capsulatum* necessita de alguns genes para que haja a sua manutenção. Dentre esses temos a YPS3, presente na superfície da parede do fungo, com massa molecular de 20 kDa. Essa proteína se liga a quitina na parede celular. Estudos anteriores demonstraram que o seu silenciamento resultou em uma menor virulência, reduzindo a colonização fúngica (BOHSE; WOODS, 2005; 2007a; b; KEATH; PAINTER; KOBAYASHI; MEDOFF, 1989; WEAVER; SHEEHAN; KEATH, 1996).

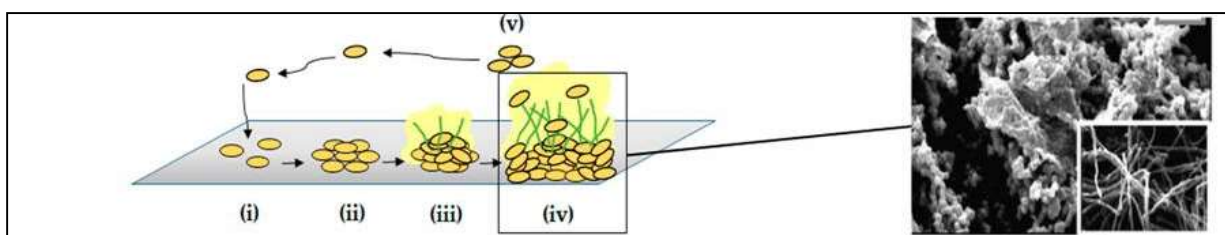
A proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é descrita como uma proteína da via glicolítica e detectada na superfície celular de fungos (MUNIZ, 2009). Um estudo conduzido por Pitangui (2017), indicou por meio de análise transcriptômica que o gene que codifica essa proteína foi significativamente modulado positivamente nos biofilmes comparativamente a forma planctônica. Fregonezi (2020), demonstraram que supostamente a GAPDH tem caráter de adesina em biofilmes de *Histoplasma*, uma vez que o seu bloqueio, ocasionou uma redução na formação dos biofilmes e diminuição em sua robustez.

1.5. BIOFILMES

Os biofilmes são comunidades de microrganismos que se desenvolvem em superfícies vivas ou inertes e são rodeados por uma matriz extracelular contendo polissacarídeos e outros elementos. A formação dos biofilmes representa a principal forma de crescimento e desenvolvimento microbiano, além de permitir que sobrevivam em ambientes hostis (BONHOMME; D'ENFERT, 2013; MITCHELL; ZARNOWSKI; SANCHEZ; EDWARD *et al.*, 2015; STOODLEY; SAUER; DAVIES; COSTERTON, 2002). Além disto, estas comunidades sésseis se diferem das células livres (planctônicas) com relação ao crescimento, transcrição de genes e tradução de proteínas (MITCHELL; ZARNOWSKI; SANCHEZ; EDWARD *et al.*, 2015).

O desenvolvimento dos biofilmes fúngicos pode ser dividido em vários estágios. O modelo clássico é representado pelas etapas: adsorção, adesão das células, proliferação celular, maturação e dispersão (**Figura 1**) (LOHSE; GULATI; JOHNSON; NOBILE, 2018).

Figura 1 - Etapas do desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* que inclui cinco estágios: (I) adsorção, (II) adesão, (III) formação de microcolônias, (IV) biofilme maduro e (V) dispersão (COSTA-ORLANDI; SARDI; PITANGUI; DE OLIVEIRA *et al.*, 2017).



Grande parte dos microrganismos são capazes de formar biofilmes, sejam eles procariotos ou eucariotos. Pitangui e colaboradores (2012), descreveram a habilidade de formação de biofilme *in vitro* por *H. capsulatum*.

Uma das principais problemáticas relacionadas ao combate dos biofilmes infecciosos é a formação da matriz extracelular polimérica, que funciona como barreira física, prejudicando a penetração de antimicrobianos e protegendo as células internas no biofilme. Há relatos de biofilmes fúngicos que são 1000 vezes mais resistentes aos antifúngicos que as células planctônicas. Além disso, os biofilmes estão associados a uma maior resistência aos mecanismos imunológicos do hospedeiro, contribuindo para a manutenção da doença e/ou infecção por longos períodos (COSTA-ORLANDI; SARDI; PITANGUI; DE OLIVEIRA *et al.*, 2017; MARTINEZ; CASADEVALL, 2006; PITANGUI; SARDI; SILVA; BENADUCCI *et al.*, 2012; WU; WANG; LIU; DONG *et al.*, 2017).

Os biofilmes são também capazes de colonizar biomateriais utilizados clinicamente como cateteres, próteses, entre outros, causando grande impacto na saúde pública. Portanto, é emergente o estudo aprofundado deste modo de crescimento e sua sensibilidade antimicrobiana, já que a incidência de infecções fúngicas invasivas tem aumentado

drasticamente, principalmente em hospedeiros imunocomprometidos (WU; WANG; LIU; DONG *et al.*, 2017).

1.6. TERAPÊUTICA E SUAS PROBLEMÁTICAS

A terapêutica da histoplasmose varia de acordo com o quadro clínico e o estado imunológico do paciente (FERREIRA; BORGES, 2009). A Sociedade Americana de Doença Infecciosas (IDSA) e o Ministério da Saúde, classificam a histoplasmose de doença leve, moderada a grave (AZAR; HAGE, 2017; BRASIL, 2017; FERREIRA; BORGES, 2009; WHEAT; FREIFELD; KLEIMAN; BADDLEY *et al.*, 2007). Os antifúngicos atuais usados clinicamente para histoplasmose pertencem às classes dos polienos e azóis, destacando-se a anfotericina B, cetoconazol, itraconazol e fluconazol (FERREIRA; BORGES, 2009). Entretanto, os mais convencionalmente utilizados são a anfotericina B e o itraconazol (AZAR; HAGE, 2017). A anfotericina B continua sendo o fármaco mais eficaz e o recomendado para a histoplasmose disseminada grave. O itraconazol é indicado como tratamento de manutenção após o tratamento de ataque com a anfotericina B, nos casos menos graves ou na profilaxia, o fluconazol pode ser recomendado (WHEAT; CONNOLLY; SMEDEMA; DURKIN *et al.*, 2006; WHEAT; FREIFELD; KLEIMAN; BADDLEY *et al.*, 2007).

Pelo fato do *H. capsulatum* ser preferencialmente intracelular, cria-se uma barreira adicional à penetração dos fármacos antifúngicos. Por outro lado, a administração por longos períodos de medicamentos sistêmicos, eleva significativamente o potencial para problemas com toxicidade no hospedeiro, sem contar que a maioria dos pacientes apresenta um estado de saúde debilitado (GOUGHENOUR; RAPPLEYE, 2017; HAGE; CONNOLLY; HORAN; DURKIN *et al.*, 2011).

Os azóis são moléculas orgânicas cíclicas que podem ser divididas em dois grupos: imidazóis e triazóis. Os imidazóis são representados pelo clotrimazol, miconazol e

cetoconazol, foram os primeiros azóis desenvolvidos, no entanto, apresentavam alta toxicidade, efeitos colaterais graves e inúmeras interações com outros medicamentos e acabaram sendo substituídos pelos triazóis. Os triazóis de primeira geração são representados pelos fármacos itraconazol e fluconazol e apresentam segurança farmacológica melhorada. A segunda geração dos triazóis é composta pelos fármacos voriconazol, posaconazol e isavuconazo (CAMPOY; ADRIO, 2017; NAGAPPAN; DERESINSKI, 2007; PEYTON; GALLAGHER; HASHEMZADEH, 2015).

Os imidazóis como o cetoconazol, embora tenham se mostrado eficazes para a forma crônica de histoplasmose, não são considerados tratamento de primeira linha para infecções graves ou com risco de vida, pois algumas cepas apresentam resistência a estes antifúngicos (LI; CIBLAK; NORDOFF; PASARELL *et al.*, 2000; SPEC; CONNOLLY; MONTEJANO; WHEAT, 2017). O fluconazol é utilizado como uma alternativa, no entanto, há preocupações com o desenvolvimento de resistência e menor eficácia, além de já ter apresentado falhas terapêuticas (SPEC; CONNOLLY; MONTEJANO; WHEAT, 2017).

O voriconazol tem se mostrado promissor no tratamento de patógenos fúngicos. Em estudos conduzidos por vários autores, foi relatado que este fármaco possui atividade fungistática contra *H. capsulatum* (ESPINEL-INGROFF, 1998; LI; CIBLAK; NORDOFF; PASARELL *et al.*, 2000). No entanto, já há relatos de resistência de algumas cepas a este antifúngico, não sendo indicado para o tratamento da histoplasmose (WHEAT; CONNOLLY; SMEDEMA; DURKIN *et al.*, 2006).

O isavuconazol é um triazol estruturalmente semelhante ao fluconazol e voriconazol, mas apresenta um anel aromático extra projetado para melhorar sua absorção, aumentando a sua biodisponibilidade e fornecendo uma barreira maior ao desenvolvimento de resistência (FALCI; PASQUALOTTO, 2013; SPEC; CONNOLLY; MONTEJANO; WHEAT, 2017).

A disponibilidade de antifúngicos orais como os da classe dos azóis é algo importante para tratar as infecções fúngicas, por ser uma via de administração rápida e não necessitando da intervenção de outros profissionais. Os azóis são conhecidos por impedir a biossíntese do ergosterol. Pelo fato de o ergosterol ser análogo ao colesterol (molécula que compõe a membrana celular dos mamíferos), o efeito observado nos fungos pode ser também observado células animais resultando em hepatotoxicidade e problemas com interações entre diferentes fármacos que atuam no sistema citocromo P450. Além disso, já foi relatado problemas de biodisponibilidade, principalmente no sistema nervoso central (SNC), devido à dificuldade de penetração da barreira hematoencefálica (CAMPOY; ADRIO, 2017; CHANG; YU; HEITMAN; WELLINGTON *et al.*, 2017; GOUGHENOUR; RAPPLEYE, 2017).

Os polienos são classificados como moléculas naturais orgânicas anfipáticas e geralmente produzidas por *Streptomyces*. A anfotericina B (AmB) é um polieno considerado padrão-ouro para infecções fúngicas sistêmicas há mais de cinco décadas (ANDERSON; CLAY; CIOFFI; DIAZ *et al.*, 2014; LIMPER; ADENIS; LE; HARRISON, 2017; PRASAD; SHAH; RAWAL, 2016; WHEAT; AZAR; BAHR; SPEC *et al.*, 2016). Esse fármaco altera a molécula se liga ao ergosterol presente na membrana fúngica e embora tenha uma afinidade menor ao colesterol em comparação ao ergosterol, está associado a alta toxicidade hepática e renal principalmente quando utilizado em períodos longos. Além disso, a AmB é administrada por via endovenosa, intra-hospitalar e com constante monitoramento da função hepática e renal. Em vista à sua alta toxicidade, nas últimas décadas foram desenvolvidas formulações lipídicas com o propósito de melhorar a biodisponibilidade e principalmente os efeitos colaterais. As formulações incluem encapsulação em lipossomas ou em fita e complexos lipídicos semelhantes a discos (BATES; SU; YU; CHERTOW *et al.*, 2001; CHANG; YU; HEITMAN; WELLINGTON *et al.*, 2017; FUENTEFRÍA; PIPPI; DALLA LANA; DONATO *et al.*, 2018).

Uma outra problemática pertinente, se insere na resistência antifúngica, relatada com mais frequência nos últimos anos. Os mecanismos de resistência já descritos para a maioria dos antifúngicos incluem a diminuição da concentração intracelular efetiva, que pode ser resultante da super ativação dos mecanismos de efluxo; superexpressão ou alteração conformacional do alvo; sequestro do fármaco ou não ativação do pró-fármaco; desvios metabólicos e formação de mutantes resistentes (CHANG; YU; HEITMAN; WELLINGTON *et al.*, 2017; GOUGHENOUR; RAPPLEYE, 2017; SANGLARD, 2016).

Além disso, os biofilmes estão associados a resistência de vários medicamentos, incluindo azóis, polienos e pirimidina. Dados recentes mostraram que a matriz do biofilme participa do mecanismo de resistência, capaz de sequestrar agentes antifúngicos. Esse já foi demonstrado para o fluconazol e já há especulações para a anfotericina B em biofilme de *C. albicans*. Outros fatores relacionados a resistência de biofilmes a antifúngicos são: o estado fisiológico do biofilme, densidade celular (*quórum sensing*), superexpressão de alvos de drogas, resistência mediada por bomba de efluxo, difusão limitada, tolerância e células persistes (BONHOMME; D'ENFERT, 2013; COSTA-ORLANDI; SARDI; PITANGUI; DE OLIVEIRA *et al.*, 2017; DESAI; MITCHELL; ANDES, 2014; HARDING; MARQUES; HOWARD; OLSON, 2009; RAMAGE; RAJENDRAN; SHERRY; WILLIAMS, 2012; SANGLARD, 2016).

1.6.1. Mecanismo de ação

Tanto os azóis quanto os polienos têm como alvo o ergosterol da membrana fúngica ou a sua cadeia de síntese (AZAR; HAGE, 2017; FUENTEFRÍA; PIPPI; DALLA LANA; DONATO *et al.*, 2018). O ergosterol é o esterol mais abundante da membrana fúngica e é responsável por regular a permeabilidade e fluidez, sendo um dos principais alvos terapêuticos para antifúngicos (DHINGRA; CRAMER, 2017).

Os azóis atuam inibindo a enzima 14- α -dimetilase do complexo citocromo P450, que é responsável pela conversão do lanosterol ao ergosterol, inibindo o crescimento e a replicação fúngica (CAMPOY; ADRIO, 2017). Os polienos se ligam ao ergosterol, levando a formação de poros na membrana, resultando na perda de íons. Com isso, desencadeia um desequilíbrio iônico e osmótico, danificando a integridade da membrana e levando à morte (ANDERSON; CLAY; CIOFFI; DIAZ *et al.*, 2014; CAMPOY; ADRIO, 2017; SCORZONI; DE PAULA E SILVA; MARCOS; ASSATO *et al.*, 2017). Uma outra vertente vem demonstrando a capacidade da anfotericina B em agir como um modelo de “esponja”, ou seja, em retirar o ergosterol da membrana. Esse modelo pode estar intimamente ligado ao seu efeito fungicida que o fármaco provoca nas células (ANDERSON; CLAY; CIOFFI; DIAZ *et al.*, 2014; GUO; ZHANG; LI; XIAO *et al.*, 2021; LEWANDOWSKA; SOUTAR; GREENWOOD; NIMEROVSKY *et al.*, 2021)

Um outro mecanismo descrito para anfotericina B, leva a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi descrito por Sokol-Anderson e colaboradores (1986) e Mesa-Arango e colaboradores (2014), que resulta em morte celular por estresse oxidativo (SANGALLI-LEITE; SCORZONI; MESA-ARANGO; CASAS *et al.*, 2011; SCORZONI; DE PAULA E SILVA; MARCOS; ASSATO *et al.*, 2017).

As EROs são produzidas pelas mitocôndrias das células sob determinadas condições fisiológicas, como subproduto natural da cadeia respiratória. No entanto, há condições que fazem com que as EROs se elevem, como na presença de oxidantes, luz ultravioleta (UV) ou outros estímulos externos, podem interferir em proteínas, lipídios e DNA, com isto causam danos celulares e morte. Por esses motivos, as EROs têm sido associadas ao processo de apoptose e ao envelhecimento. Este efeito secundário da anfotericina é um importante mediador no efeito fungicida (MESA-ARANGO; TREVIJANO-CONTADOR; ROMÁN,

ELVIRA; SÁNCHEZ-FRESNEDA, RUTH *et al.*, 2014; SCORZONI; DE PAULA E SILVA; MARCOS; ASSATO *et al.*, 2017; THANNICKAL; FANBURG, 2000).

1.7. NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS

Os nitrofuranos são compostos por um anel de 5-nitrofurano e vários substituintes na posição 2, na sua fórmula principal. Eles são descritos como antibióticos com amplo espectro de ação. O primeiro nitrofurano foi descrito em 1944 e estes fármacos foram amplamente utilizados por décadas na área agropecuária, para prevenir e controlar doenças, além de serem adicionados na alimentação animal para estimular o crescimento (KRASAVIN; PARCHINSKY; KANTIN; MANICHEVA *et al.*, 2017; ZHAO; GUO; QUAN; JIANG *et al.*, 2016). Na década de 90, a Europa banuiu o uso de nitrofuranos para fins agropecuários e mais adiante em 2002 outros países como Estados Unidos e China também o baniram para uso animal, devido aos resíduos que estes fármacos deixavam na carne, provocando possíveis efeitos colaterais em humanos como anomalias hematológicas, anemia aplásica além de seu efeito cancerígeno, mutagênico e genotóxico. Os nitrofuranos eram altamente utilizados em doenças infecciosas do trato urinário, mas seu uso também foi correlacionado ao aparecimento de mutações e cânceres, casos de toxicidade pulmonar, cardíaca e no sistema reprodutor, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade, principalmente, em tratamentos de longa duração. Atualmente, muitos grupos de pesquisa vêm estudando as formulações de nitrofuranos, tentando diminuir sua toxicidade e seus efeitos colaterais, já que apresentam excelente atividade antimicrobiana (ALDEEK; HSIEH; UGOCHUKWU; GERARD *et al.*, 2018; CLAUSSEN; STOCKS; BHAT; FISH *et al.*, 2017; MARCELINO, 2018; ZHAO; GUO; QUAN; JIANG *et al.*, 2016).

No âmbito da reposição farmacológica, foram descobertas ações adicionais dos nitrofuranos como: anti-*Leishmania*, antifúngica, tripanocida e anti-proliferativo nas

linhagens de células cancerígenas (KRASAVIN; PARCHINSKY; KANTIN; MANICHEVA *et al.*, 2017; MARCELINO, 2018; ZHAO; GUO; QUAN; JIANG *et al.*, 2016). Estudos recentes, mostraram que o derivado de nitrofurano, niturtimox, foi eficaz no combate ao *Trypanossoma cruzi*, causador da doença de Chagas. Após anos de estudos, pesquisadores demonstraram que em humanos o seu uso causou alguns efeitos adversos leves, como: problemas gastrointestinais, vômitos, dor abdominal, diarreia etc. Portanto, a agência regulatória *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o seu uso comercial para o tratamento da doença de Chagas em crianças, com o objetivo de melhorar o acesso a terapia parasitária de 300 mil pessoas. Além disso, a União Europeia estabeleceu um acordo, com vigência a partir de novembro de 2022, que dispõe o limite tolerável de metabólitos de nitrofuranos na alimentação animal, desde que testes laboratoriais provem que eles não causem malefícios a saúde. Grupos de pesquisa de todo o mundo, vem realizando reformulações que tornem esses compostos, seguros para a saúde humana e eficazes contra doenças (U.S. *Food and Drug Administration*, 2020, União Europeia, 2022; ABBOTT; MONTGOMERY; CHANCEY, 2022; FALK; BERENSTEIN; MOSCATELLI; MORONI *et al.*, 2022).

Na literatura há uma defasagem de relatos sobre o estudo da atividade antifúngica dos nitrofuranos. Alguns autores mostraram uma potente atividade antifúngica e anti-biofilme contra espécies de *Candida*, com capacidade de inibição da adesão e agregação de células (DE VITA; FRIGGERI; D'AURIA; PANDOLFI *et al.*, 2014; KAMAL; HUSSAINI; SUCHARITHA; POORNACHANDRA *et al.*, 2015). Com relação à avaliação da toxicidade, estudos mostraram que esses compostos não são tóxicos para embriões de *Zebrafish*, larvas de *C. elegans* e *Galleria mellonella* e possuem baixa toxicidade quando testado em linhagens de células humanas (KAMAL; HUSSAINI; SUCHARITHA; POORNACHANDRA *et al.*, 2015; MARCELINO, 2018; VASO; PANDOLFI; BILA; DE VITA *et al.*, 2022).

Além dos derivados de nitrofuranos, outro grupo de compostos com destaque quanto à atividade antifúngica são os derivados indólicos. Os indólicos apresentam sistemas de anéis heterocíclicos e suas aplicações são em condições fisiopatológicas, como câncer, inflamação, infecções microbianas (KARIMABAD; MAHMOODI; JAFARZADEH; DAREKORDI *et al.*, 2019; NIETO; LUPTON, 2020). De Vita e colaboradores (2016) e Pandolfi e colaboradores (2019), demonstraram que esses derivados tiveram uma excelente atividade contra a forma planctônica de *Candida albicans*. Nos biofilmes, em baixas concentrações, ocasionaram uma inibição na formação de biofilmes e foram capazes de erradicar o biofilme maduro. Além disto, apresentaram baixa toxicidade, mesmo em concentrações mais elevadas (500 µg/mL) (DE VITA; SIMONETTI; PANDOLFI; COSTI *et al.*, 2016; PANDOLFI; D'ACIERNO; BORTOLAMI; DE VITA *et al.*, 2019).

Villa e Lopez-Ribot (2017) provaram que os derivados indólicos foram capazes de reduzir a atividade metabólica do biofilme pré-formado de *C. albicans* em até 80%, entretanto, quando avaliada a seu efeito sinérgico com o com o fluconazol foi observada redução da viabilidade apenas em células planctônicas (89%). Oh e colaboradores (2012), relataram que os derivados indólicos foram capazes de induzir o gene NRG1 responsável por reduzir a filamentação fúngica de *C. albicans* e a formação de biofilme, além disto, os compostos não apresentaram toxicidade em células de mamífero em experimentos *in vitro* (OH; GO; MYLONAKIS; KIM, 2012; VILA; LOPEZ-RIBOT, 2017).

Neste contexto, legislações mundiais e brasileiras (Lei 11.794/08 - conhecida como Lei Arouca) buscam métodos alternativos mais confiáveis. As culturas tridimensionais, tem o propósito de simular mais fidedignamente o tecido *in vivo*, tratando-se de uma proposta inovadora que levará à obtenção de uma plataforma *in vitro* 3D para o *screening* de novos fármacos e propiciará um modelo de estudo mais seguro para a avaliação da interação fungo-hospedeiro (CRABBÉ; LIU; MATTHIJS; RIGOLE *et al.*, 2017; WELLS; SALICK;

WISKOW; HO *et al.*, 2016). Por outro lado, o crescente número de infecções fúngicas, somado aos também crescentes relatos de resistência antifúngica e à formação de biofilmes por *H. capsulatum*, faz-se emergente a busca por novos antifúngicos, que sejam mais eficazes e que tenham toxicidade reduzida. O tratamento para a histoplasmose é limitado e com altos riscos de toxicidade ao paciente, sendo assim, é essencial o aprofundamento na descoberta de moléculas com propriedades inibitórias potentes, menos tóxicas, mesmo nas concentrações requeridas para o extermínio dos biofilmes. Na literatura, há poucos estudos que verificam atividade inibitória de novas moléculas tanto contra a forma planctônica e principalmente de biofilme de *H. capsulatum* (DE AGUIAR CORDEIRO; DE FARIAS MARQUES; DE AGUIAR CORDEIRO; DA SILVA *et al.*, 2014; EDWARDS; KEMSKI; RAPPLEYE, 2013; KATHURIA; SINGH; MEIS; CHOWDHARY, 2014; LI; CIBLAK; NORDOFF; PASARELL *et al.*, 2000; MELO; SANTOS; MARQUES; REGASINI *et al.*, 2017; WHEAT; CONNOLLY; SMEDEMA; BRIZENDINE *et al.*, 2001).

Parte I – Caracterização dos cultivos tridimensionais e eficácia e segurança farmacológica dos derivados de nitrofurano e indólicos testados em Histoplasma capsulatum e interação patógeno-hospedeiro.

2. OBJETIVO GERAL

Estabelecer um modelo tridimensional (esferoides) de células pulmonares para o estudo da atividade antifúngica e toxicidade dos compostos derivados de nitrofurano e indólicos e avaliar a interação *Histoplasma*-hospedeiro.

2.2. Objetivos específicos

- Padronizar e caracterizar a técnica de cultura tridimensional usando a metodologia de revestimento de gel de agarose para as linhagens de células pulmonares A549 e MRC-5;
- Verificar a atividade antifúngica de compostos derivados de nitrofurano e indólicos pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM₉₀) e concentração fungicida mínima (CFM) para *H. capsulatum*;
- Avaliar a toxicidade dos compostos *in vitro* em monocamada, modelo tridimensional e *in vivo* em modelos alternativos aos mamíferos *C. elegans*, *Galleria mellonella* e *zebrafish*;
- Verificar a atividade dos compostos mais potentes contra biofilmes de *H. capsulatum*;
- Verificar o(s) possível(is) mecanismo(s) de ação do(s) composto(s) no fungo, por microscopia confocal, quantificação do ergosterol da membrana, ensaio de necrose e apoptose, indução de espécies reativas de oxigênio (EROs) e PCR em tempo real;
- Estudar as interações entre células planctônicas e após a passagem por biofilme de *H. capsulatum* nos esferoides (3D) e compará-las às infecções das mesmas condições em monocamadas (2D).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CULTURA DE CÉLULAS

Foram utilizadas duas linhagens de células pulmonares: A549 (ATCC ® CCL-185), derivada de células epiteliais de carcinoma humano, com propriedades alveolares conservadas (GIARD et al., 1972) e MRC-5 (ATCC ® CCL-171), derivada de tecido pulmonar normal humano (JACOBS, 1966). Ambas foram cultivadas em meio *Dulbecco's modified Eagle's médium* (DMEM) (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma) e mantidas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C (NAKANO; FUKUHARA-TAKAKI; JONO; NAKAJOU *et al.*, 2006). Após o descongelamento, as células foram expandidas até atingirem 80% de confluência, para em seguida serem tripsinizadas e transferidas para outra garrafa de cultura (Kasvi). Ambas as linhagens foram utilizadas para os ensaios experimentais somente após uma passagem pós-descongelamento, para que houvesse uma maior interação célula-célula/célula-matriz (FRIEDRICH; SEIDEL; EBNER; KUNZ-SCHUGHART, 2009).

3.2. PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE CULTURA CELULAR TRIDIMENSIONAL (3D)

O modelo esferoide celular 3D foi desenvolvido conforme Friedrich e colaboradores (2009), com pequenas modificações. Para o revestimento das placas de 96 poços (Kasvi) com agarose (LCG), o pó foi dissolvido em água destilada estéril na concentração de 1,5%, autoclavado e mantido em banho-maria à temperatura de 60°C para a manutenção da fase líquida. Cerca de 50 µL foram pipetados de modo a revestir o fundo das placas. O revestimento foi feito para impedir a adesão das linhagens celulares no fundo das placas e permitir a formação de uma estrutura esferoide. As suspensões de células MRC-5 e A549 foram preparadas em concentrações que variaram de 1×10^3 a 6×10^4 células/poço em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. Cerca de 200 µL das suspensões

das diferentes concentrações foram transferidas para os poços revestidos com agarose. As placas foram incubadas a 37°C por 96 h, tempo mínimo para a formação dos cultivos 3D, em uma atmosfera umidificada de 5% de CO₂ (FRIEDRICH; SEIDEL; EBNER; KUNZ-SCHUGHART, 2009; SALEH, 2017). Como controle, as mesmas concentrações e condições supracitadas foram utilizadas para formar as monocamadas celulares.

3.3. CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE CULTURA CELULAR 3D

3.3.1. Tamanho dos esferoides

Para avaliar o tamanho dos esferoides, imagens no quarto, sétimo e décimo dia foram capturadas no equipamento *In Cell Analyser 2000* (GE Healthcare), pertencente ao Núcleo da Proteômica da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” em Araraquara, em uma magnificação de 10×. O diâmetro das células em 3D foi verificado pelo software *Image J*, levando em consideração o diâmetro horizontal com valores entre 370 - 600 µm, para a padronização do modelo (FRIEDRICH; SEIDEL; EBNER; KUNZ-SCHUGHART, 2009; SALEH, 2017).

3.3.2. Quantificação celular e viabilidade celular por azul de *Trypan*

Foi realizada a contagem das células vivas e mortas que compõem os esferoides após o quarto, sétimo e décimo dia de cultivo. Para isso, oito esferoides de cada linhagem celular foram transferidos para tubos cônicos (Falcon), lavados duas vezes com solução PBS 1× (*Phosphate Buffered Saline*) e dissociados por ação enzimática da tripsina (Gibco), por aproximadamente 8 minutos. Transcorrido o tempo, foi adicionado o meio de cultura celular DMEM acrescido de 10% de SBF para interromper a ação da tripsina. As células já dissociadas foram centrifugadas, lavadas duas vezes com PBS 1× e coradas com Azul de Trypan (1:1 v/v) para contagem em hemocítômetro. A viabilidade celular por azul

de trypan foi calculada da seguinte forma: viabilidade celular = total de células viáveis (não coradas)/ total de células (coradas e não coradas) $\times$ 100. E para a quantificação celular foram contabilizadas todas as células e foi considerado seu fator de diluição. O mesmo procedimento foi realizado para poços de cultivo em monocamada (SALEH, 2017).

3.3.3. Viabilidade celular pelo método colorimétrico com resazurina

Após o quarto, sétimo e décimo dia de cultivo dos esferoides, 20 μ L de solução de resazurina a 50 μ M (Sigma) foram adicionados aos poços das placas contendo os esferoides. As placas foram incubadas por 24 h a 37°C e as absorbâncias foram obtidas em espectrofotômetro (Epoch 2) nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm. Os poços controles continham apenas meio DEMEM + SFB utilizado como branco, célula em monocamada (controle positivo) e poços com DMSO (controle negativo). A taxa de sobrevivência celular foi calculada como: sobrevivência celular = densidade ótica da resazurina (OD resazurina) / (controle OD) $\times$ 100% (XIAO; ZHANG; WANG; YU *et al.*, 2010). A resazurina é um indicador redox permeável às células, que pode ser usado para monitorar o número de células viáveis. Trata-se de um corante azul que é internalizado pelas células e metabolicamente reduzido à resorufina, que é rosa fluorescente, liberado livremente das células. A quantidade de resorufina produzida é proporcional ao número de células viáveis que podem ser quantificadas utilizando um fluorômetro de microplaca equipado com um conjunto de filtros de excitação de 570 nm/600 nm de emissão, ou também por absorbância em um espectrômetro, utilizado neste experimento, em 570/600 nm (EILENBERGER; KRATZ; ROTHBAUER; EHMOSER *et al.*, 2018; GOEGAN; JOHNSON; VINCENT, 1995; XIAO; ZHANG; WANG; YU *et al.*, 2010).

3.3.4. Viabilidade celular por iodeto de propídeo (IP)

As viabilidades das monocamadas e dos esferoides, foram avaliadas pelo método de análise da integridade da membrana celular por citometria de fluxo. Este método baseia-se na adição do iodeto de propídeo (IP), um marcador nuclear fluorescente, que penetra somente em células com a membrana não-integra, emitindo fluorescência com alta intensidade. As monocamadas e os esferoides foram preparados conforme descrito no item 3.3.2. no quarto dia de incubação (96 h). As células dissociadas foram centrifugadas, lavadas duas vezes com solução tampão PBS 1× e marcadas com IP (2 µg/mL). Para o controle negativo foram utilizadas as células referentes a cada condição sem adição da marcação de IP. A análise foi realizada pelo citômetro de Fluxo BD FACSCanto I, pertencente ao Núcleo de Proteômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp de Araraquara. As populações de células foram determinadas por meio de *dot plots* e histogramas utilizando o programa Diva (SALEH, 2017).

3.3.5. Análise topográfica dos esferoides

A análise da topografia dos esferoides foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os esferoides foram transferidos para placas de 24 poços, de modo que cada esferoide ficasse em um poço. Os poços foram lavados duas vezes com solução tampão PBS 1× e fixados com solução de glutaraldeído a 2,5% por 30 minutos. Em seguida, os esferoides foram lavados com água destilada estéril em temperatura ambiente e as placas foram secas à temperatura ambiente. Os fundos das placas foram cortados com um bisturi. As amostras foram montadas em cilindros de alumínio com prata e colocadas em um evaporador de alto vácuo para o revestimento com camada de ouro. As análises foram conduzidas em microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM-6610LV na Faculdade de Odontologia da UNESP de Araraquara) (KIRK; SKEPPER; DONALD, 2009; SALEH, 2017).

3.3.6. Microscopia confocal de varredura à laser

Após o quarto dia de formação, um esferoide foi transferido por poço de cada placa de 24 poços. Os esferoides foram lavados cuidadosamente por duas vezes com solução PBS 1x e fixados com solução de paraformaldeído a 4% e incubados *overnight* à temperatura de 4°C. No dia seguinte, os poços foram novamente lavados com PBS 1× e 500 µL de solução de Triton x 0,05% foram adicionados e as placas foram novamente incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente (TA). Transcorrido o tempo, o Triton x foi retirado e 500 µL de *Bovine Serum Albumin* BSA 2% (Sigma-Aldrich) foram adicionados e deixados por 1 h em TA. Como marcador foi utilizado o fluoróforo Alexa flúor 647 conjugado com Faloidina (Thermofisher), que se liga à actina do citoesqueleto das células, emitindo uma fluorescência vermelha. O marcador de fluorescência foi preparado em BSA a 2% em uma diluição de 1:2000 e 500 µL dessa preparação foram adicionados em cada poço das placas contendo os esferoides, seguido por incubação por 1 h em TA. Por fim, foi preparada uma solução de Hoechts (Invitrogen), que cora em azul os ácidos nucleicos, em uma diluição 1:2000 em BSA 2%, adicionado aos poços e posterior incubação por 15 minutos em TA. Finalizadas as marcações, os poços contendo os esferoides foram lavados com PBS 1× por três vezes. As imagens foram obtidas pelo Microscópio Eletrônico de Fluorescência Confocal (Carl Zeiss LSM 800 com Airyscan) da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araraquara-SP e as análises foram realizadas pelo software Zen Blue 3.2 (KIRK; SKEPPER; DONALD, 2009; SALEH, 2017).

3.4.MICRORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Nos ensaios, foi utilizada a cepa de *H. capsulatum* EH-315 caracterizado como isolado de alta virulência e classificada como BAC-1 (TEIXEIRA; PATANÉ; TAYLOR; GÓMEZ *et al.*,

2016). Essa cepa foi gentilmente cedida em colaboração com o grupo de pesquisa liderado pela Profa. Dra. Maria Lúcia Taylor, da Universidade Nacional Autônoma do México (UNAM). Foi também utilizada a cepa referência ATCC 26032 (G217B), isolado humano Norte Americano, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Allan Guimarães da Universidade Federal Fluminense do Rio de Janeiro. Ambas as cepas foram mantidas em ágar *Brain Heart Infusion* (BHI), suplementado com L-cisteína e glicose por 96 h a 37°C e no meio *Ham's F12 Nutrient Mixture* (HAM-F12) (Gibco), suplementado com glicose (18.2 g/L), ácido glutâmico (1 g/L), 2-[4-(2-hydroxyethyl) piperazin-1-yl] ethanesulfonic acid (HEPES) (6 g/L) e L-cisteína (8.4 mg/L) e mantidas sob agitação (150 rpm), a 37°C por 72 h (BALTAZAR; ZAMITH-MIRANDA; BURNET; CHOI *et al.*, 2018).

3.5.OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS DERIVADOS DE NITROFURANOS E INDÓLICOS E FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS

Foram sintetizados ao todo 61 compostos, que eram classificados entre derivados de nitrofurano (17) e derivados indólicos (44). Dentre esses dois grupos, havia três compostos mistos, que eram formados tanto por nitrofuranos como por indólicos. Todos os compostos foram elaborados e produzidos em colaboração com o Prof. Dr. Luigi Scipione da Universidade de Roma - La Sapienza (Roma – Itália). Trata-se de uma série de derivados de éster, amida e chalconas ligados a grupamentos nitro e indólicos (ARIAS; HERRERA; GARAY; RODRIGUES *et al.*, 2017; DE VITA; FRIGGERI; D'AURIA; PANDOLFI *et al.*, 2014; DE VITA; SIMONETTI; PANDOLFI; COSTI *et al.*, 2016; GALLARDO-MACIAS; KUMAR; JASKOWSKI; RICHMANN *et al.*, 2019; GOMES; BRAGA; GRZELAK; NEVES *et al.*, 2017; GUERRA; MALTA; LARANJEIRA; MAIA *et al.*, 2011; HOLLA; VEERENDRA; SHIVANANDA, 2004; JIN; GENG; YU; TAO *et al.*, 2009; PANDOLFI; D'ACIERNO; BORTOLAMI; DE VITA *et al.*, 2019; PRESS; WRIGHT; CHAN; HAUG *et*

al., 1987; TANGALLAPALLY; YENDAPALLY; LEE; HEVENER *et al.*, 2004; TAWARI; BAIRWA; RAY; RAJAN *et al.*, 2010; VASO; BILA; PANDOLFI; DE VITA *et al.*, 2022; VASO; PANDOLFI; BILA; DE VITA *et al.*, 2022). Os fármacos antifúngicos anfotericina B e itraconazol foram adquiridos comercialmente (Sigma-Aldrich).

3.6. TESTE DE SENSIBILIDADE AOS COMPOSTOS PELA TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO

3.6.1. Diluição dos derivados de nitrofuranos e indólicos

Trinta miligramas de cada composto foram diluídos em 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth), obtendo, portanto, uma concentração de 30.000 µg/mL em solução-estoque. Os compostos foram armazenados em microtubos (Kasvi) no freezer a -80°C. As soluções-trabalho para o teste de microdiluição foram preparadas a partir das soluções-estoque em meio *Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium* (RPMI-1640) com glutamina, sem bicarbonato e com vermelho de fenol como indicador de pH (Gibco®) e tamponado com MOPS - [ácido 3-(N-morfolina) propanossulfônico] (*Sigma- Aldrich*), adicionado 2% de glicose e pH=7. As concentrações finais dos compostos nas placas de microdiluição variaram de 125 a 0,48 µg/mL. Para os compostos mais potentes, o intervalo de concentração utilizado para o teste variou de 125 a 0,007 µg/mL.

3.6.2. Diluição dos fármacos

Os fármacos anfotericina B e itraconazol, foram preparados em soluções-estoque como preconizado no documento M27-A3, proposto pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* CLSI (2008a). Em seguida, as soluções-trabalho foram preparadas através da diluição das soluções-estoque em meio RPMI-1640 com glutamina, sem bicarbonato e com vermelho de fenol como indicador de pH (*Gibco®*) e tamponado com MOPS -[ácido 3-(N-

morfolina) propanossulfônico] (*Sigma- Aldrich*), pH=7, nas proporções de 1:100. No teste de sensibilidade frente ao *H. capsulatum*, a anfotericina B, como o itraconazol foram testados no intervalo de concentração de 2 a 0,007 µg/mL.

3.6.2. Concentração inibitória mínima para *H. capsulatum*

O teste de sensibilidade para o *H. capsulatum* foi realizado segundo as normas do CLSI M27-A3 (2008a) com modificações propostas por Li e colaboradores (2000), Wheat e colaboradores (2001) e Kathuria e colaboradores (2014). O inóculo inicial foi realizado em solução salina estéril a 0,85% e estabelecida a concentração no intervalo de 1×10^6 a 5×10^6 leveduras/mL. Posteriormente foi feita uma diluição de 1:10 no meio RPMI-1640 tamponado com MOPS e com 2% glicose. Em seguida, foram distribuídos 100 µL do inóculo nas placas de 96 poços (das colunas 2-12) contendo 100 µL da diluição seriada dos compostos. Foram feitos conjuntamente os seguintes controles: o controle de esterilidade do meio (coluna 1), contendo 200 µL do meio RPMI-1640 e o controle de crescimento (Coluna 12), contendo 100 µL do meio RPMI e 100 µL do inóculo. Desse modo o volume final de cada poço foi de 200 µL e a concentração final das células foi de 5×10^4 a $2,5 \times 10^5$ células/mL. As placas foram incubadas por 144 h, a 37°C em agitação a 150 rpm (rotações por minuto). Os fármacos anfotericina B e itraconazol foram testados na concentração final de 1 a 0,0019 µg/mL. O controle de qualidade foi realizado com *C. krusei* ATCC 6258 com o AmB na concentração de 16 a 0,03 µg/mL. Foi realizada a leitura visual do crescimento com e sem o acréscimo de 20 µL do corante de viabilidade celular resazurina a 0,03% (SILVA; OLIVEIRA; SILVA; SANGALLI-LEITE *et al.*, 2013).

3.6.4. Concentração fungicida mínima (CFM)

A concentração fungicida mínima foi realizada conforme descrito por Costa-Orlandi et al., (2020). Foram retiradas alíquotas de 100 μ L do conteúdo dos poços e, foi plaqueadas em placas de Petri contendo ágar BHI suplementado com L-cisteína e glicose posteriormente, foram incubadas à 37°C por 96 h. Concentrações iguais ou superiores à CIM₉₀ foram usadas. O CFM foi definido como a concentração mais baixa do composto que não apresenta crescimento de colônias de fungos.

3.7. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE NOS MODELOS TRIDIMENSIONAL (3D) E MONOCAMADA (2D) PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO DA RESAZURINA

Após a padronização do modelo tridimensional como descrito no item 3.2 e a realização dos testes de sensibilidade para a triagem dos compostos ativos, foram realizados ensaios de citotoxicidade para ambas as linhagens (A549 e MRC-5) em monocamada (2D) e em formato de esferoides (3D). Após o estabelecimento das monocamadas e dos esferoides em placas de 96 poços, foram removidos os sobrenadantes e adicionados 100 μ L das diferentes concentrações dos compostos (500 à 0,48 μ g/mL), diluídos em meio DMEM + 10% SFB, seguido de incubação por mais 72 h. A viabilidade foi verificada por meio da adição de resazurina conforme descrito por Xião e colaboradores (2010). A absorbância foi medida no espectrofotômetro em 570 e 600 nm. Foi calculada a concentração citotóxica capaz de inibir 50% da proliferação celular (CC₅₀), pelo software GraphPad Prism 5.0. O índice de seletividade (IS), foi calculado através da relação CC₅₀ pela concentração inibitória mínima (CIM₉₀)

3.8. ENSAIO DE TOXICIDADE NO MODELO *in vivo* *Caenorhabditis elegans*

Foram utilizadas duas cepas: a cepa do tipo selvagem (N2) e a cepa mutante (AU37 [glp-4 (bn2) I; sek-1 (km4) X]). As cepas foram mantidas em placas contendo meio de crescimento de nematóides (NGM) semeadas com *E. coli* OP50 a 16°C. Para o ensaio de toxicidade, foi realizada a etapa de sincronização dos adultos jovens no estágio L4. Cerca de 20 larvas foram transferidas para cada poço de placas de 96 poços contendo 100 µL de um meio composto por 60% de NaCl 50 mM; 40% de caldo BHI; 10 mg/mL de colesterol em etanol; 200 mg / mL de ampicilina e 90 mg/mL de canamicina. Em seguida, foram adicionados 100 µL de diluições do derivado de nitrofurano (L7CF 166), indólico (L7CF 197) e o derivado misto nitrofurano/indólico (L7CF 219), obtendo concentrações finais em cada poço variando de 250 a 0,48 µg / mL. As placas foram incubadas a 25°C por 24 h. A sobrevivência foi avaliada pela mobilidade e forma do nematóide (larvas em forma de vara foram consideradas mortas, enquanto larvas sinusoidais foram consideradas vivas) em microscópio óptico invertido em lentes objetivas 40× e imagens foram capturadas e analisadas através do software *ImageJ* (ABDULLAH; JA'AFAR; YASIN; TAHA *et al.*, 2019; COSTA-ORLANDI; SERAFIM-PINTO; DA SILVA; BILA *et al.*, 2020; MEDINA-ALARCÓN; SINGULANI; VOLTAN; SARDI *et al.*, 2017; SCORZONI; DE LUCAS; MESA-ARANGO; FUSCO-ALMEIDA *et al.*, 2013).

3.9. TOXICIDADE *in vivo* EM MODELO ALTERNATIVO *Galleria mellonella*

Para o experimento foram selecionadas larvas de coloração clara, com peso entre 0,2 e 0,3g. Após a seleção e pesagem, as larvas foram colocadas em placas de Petri (n = 10 para cada grupo experimental: controle sem tratamento, tratamento com PBS 1×, e tratamento com quatro diluições de cada composto escolhido) e incubadas à 37°C *overnight*. Soluções dos compostos L7CF 166, L7CF 197 e L7CF 219 foram preparadas em PBS 1×, para a

administração de doses nas concentrações de 10, 50, 100 e 200 mg/kg. Foi feita antisepsia das larvas com álcool a 70% e, em seguida foram injetados dez microlitros das soluções de cada composto supracitado no último par de pró-pata (direita) com o auxílio de uma seringa de Hamilton. As larvas foram incubadas em estufa a 37°C e monitoradas diariamente por sete dias. Foram consideradas mortas, quando não exibiram nenhum movimento em resposta ao toque (SINGULANI; GALEANE; RAMOS; GOMES *et al.*, 2019).

3.10. ENSAIO DE TOXICIDADE *in vivo* EM MODELO *Zebrafish*

Os peixes foram mantidos em aquários com temperatura controlada ($28 \pm 0,5^\circ\text{C}$), com um ciclo de 14h de luz/10 h de escuro. Após o acasalamento dos peixes adultos, os embriões foram recolhidos e lavados com meio embriônico (NaCl 10 mM; KCl 0,34 mM; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,66 mM; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,66 mM) com azul de metileno 0,00003% e colocados em placas de Petri. Os embriões fertilizados que se apresentavam normais foram selecionados para o teste. Foram transferidos para placas de 96 poços (2 embriões/poço e 8 embriões/concentração) e diferentes concentrações do derivado de nitrofurano L7CF 166 e do derivado misto L7CF 219 foram preparadas (1,95; 3,90; 7,81; 15,62 e 31,25 $\mu\text{g/mL}$) e colocadas em contato com os embriões. Os embriões foram expostos aos compostos nos tempos de 6, 24, 48 e 72 h pós-fertilização (hpf). As placas foram mantidas a 28°C e nos tempos determinados foram observados fenótipos de má formação como coagulação de óvulos fertilizados, falta de formação de sômite, falta de desprendimento da cauda e falta de batimentos cardíacos (OECD, 2013). Para a visualização dos danos ocasionados pelos compostos foi utilizada a Lupa *Leica* e imagens foram obtidas e processadas pelo *software Zen Blue 3.0* (SINGULANI; SCORZONI; GOMES; NAZARÉ *et al.*, 2017).

3.11. TESTE DE SENSIBILIDADE FRENTE AOS BIOFILMES DE *Histoplasma capsulatum*

Os biofilmes de *Histoplasma* foram formados conforme descrito por Gonçalves et al., (2020). Para os ensaios de sensibilidade foram utilizados o derivado de nitrofurano L7CF 166, o derivado indólico L7CF 197 e o derivado misto L7CF 219, além dos controles com anfotericina e itraconazol. O inóculo inicial foi preparado em PBS na concentração de 5×10^6 células/mL. Cerca de 200 μ L das suspensões fúngicas foram transferidos para placas de 96 poços, que posteriormente foram incubadas a 37°C em atmosfera de microaerofilia formada em jarra de vela por 12 h para a pré-adesão das células. Após o período de pré-adesão o sobrenadante foi descartado e foi acrescentado aos poços 200 μ L de meio HAM-F12 e, as placas foram novamente incubadas nas mesmas condições de temperatura e atmosfera de oxigênio por 36 h (biofilme no estágio inicial) e 144 horas (biofilme no estágio maduro). Após os tempos determinados, os biofilmes foram tratados com 200 μ L com diferentes concentrações dos compostos e fármacos diluídos no meio HAM-F12 e, novamente incubados por mais 144 horas. As atividades metabólicas foram quantificadas pelo método de redução de XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide). O XTT é um sal de tetrazólio (amarelo), que na presença de células viáveis é clivado por enzimas desidrogenase, se convertendo a um sal de formazana (laranja). O reagente resultante é solúvel em água e a intensidade da cor é diretamente proporcional à quantidade de células metabolicamente ativas. Finalmente as placas foram lidas no espectrofotômetro na absorbância em 490 nm (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006). Foi considerada uma inibição de 50% da atividade metabólica em relação ao controle sem tratamento.

3.11.1. Ensaio de microscopia confocal de varredura à laser dos biofilmes para avaliação da espessura e metabolismo

Para os ensaios de imunofluorescência, os biofilmes foram formados até a maturação (144 h) em placas de 24 poços contendo lamínulas redondas de vidro no fundo dos poços. Os biofilmes maduros foram tratados com as concentrações inibitórias encontradas no item 3.11. Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado e os biofilmes fixados com solução de paraformaldeído a 4%, seguido por incubação *overnight* a 4°C. Em seguida, foi realizada a coloração utilizando 100 µL de uma solução de PBS contendo 25 µM de ConA (Concanavalin A - conjugado com Alexa fluor 488 - Invitrogen), que se liga a resíduos de glicose e manose, tanto na parede celular quanto na matriz extracelular e, 10 µM de FUN-1 (Invitrogen), uma sonda de avaliação da viabilidade fluorescente. As placas foram incubadas a 37°C, por 45 min, protegidas da luz. Em seguida, as lamínulas foram lavadas com PBS 1×, removidas dos poços e colocadas sob 4 µL de Fluoromount-G (Sigma-Aldrich), previamente depositado em lâminas de microscópio para observação em microscópio confocal ZEISS LSM 800 Airyscan com programa de captura e processamento de imagem Software ZEN BLUE 2.3 System, Localizado na Faculdade de Odontologia da UNESP-Araraquara, Brasil (COSTA-ORLANDI; MARTINEZ; BILA; FRIEDMAN *et al.*, 2021; COSTA-ORLANDI; SARDI; SANTOS; FUSCO-ALMEIDA *et al.*, 2014).

3.11.2. Análise topográfica dos biofilmes tratados por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Nos ensaios de MEV, após 144 h de maturação, os biofilmes foram tratados com a concentração inibitória dos compostos em placas de 24 poços, conforme o item 3.11. Os fundos das placas foram lavados três vezes com PBS 1× para remoção do meio de cultura excedente e fixados com 800 µL de solução de glutaraldeído (SigmaAldrich) a 2,5% e

paraformaldeído a 2%, *overnight* a 4°C. Em seguida, foram realizadas três lavagens com PBS 1×. As amostras foram então desidratadas com concentrações crescentes de álcool etílico, de 50% a etanol absoluto à temperatura ambiente e secas nas mesmas condições. Antes da análise ao microscópio, os fundos das placas foram cortados com a ajuda de um bisturi, montados em cilindros de alumínio com prata (stubs) e colocadas em um evaporador de alto vácuo (Denton Vacuum Desk V, Jeol USA) para o revestimento de ouro. Os danos na topografia dos biofilmes foram analisados em microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-6610LV, localizado na Faculdade de Odontologia da UNESP-Araraquara, Brasil (COSTA-ORLANDI; SARDI; SANTOS; FUSCO-ALMEIDA *et al.*, 2014; GONÇALVES; COSTA-ORLANDI; BILA; VASO *et al.*, 2020)

3.12. MECANISMOS DE AÇÃO

3.12.1. Dosagem de ergosterol

A quantificação do ergosterol foi realizada conforme o protocolo descrito por Arthington-Skaggs e colaboradores (1999) com pequenas adaptações. A cepa EH-315 de *H. capsulatum* foi subcultivada no meio HAM-F12 por 72 h. Após este tempo foi preparado um inóculo na concentração de 1×10^6 céls/mL no meio HAM-F12. Cinco mililitros da suspensão fúngica foram colocadas em tubos cônicos de 15 mL juntamente com 5 mL das concentrações subinibitórias dos compostos ou fármacos. Foram utilizados os compostos L7CF 166 (0,122 µg/mL), L7CF 197 (1,95 µg/mL) e L7CF 219 (0,06 µg/mL) representando os derivados de nitrofuranos, indólicos e nitrofurano/indólico, respectivamente. Os fármacos anfotericina (0,03 µg/mL) e itraconazol (0,06 µg/mL) foram utilizados como controle. Em seguida, os tubos foram incubados sob agitação de 150 rpm por 168 h. Após a incubação, os tubos foram centrifugados e lavados com água destilada estéril. Adicionou-se 3 mL de solução alcoólicas de KOH 25% em cada tubo e homogeneizados no vórtex por 1 minuto. Em seguida, as

suspensões foram transferidas para tubos de vidro com rosca e incubadas em banho-maria a 85° C por 1 h. Foi adicionado 1 mL de água destilada estéril e 3 mL de n-heptano após do resfriamento das amostras a temperatura ambiente. Com ajuda de pérolas de vidro as amostras foram agitadas por 10 min para a extração dos esteróis. A camada de n-heptano (a fase superior da mistura) foi transferida para microtubos e levadas a -20°C por 24 h. As análises foram realizadas em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 200 a 400 nm com espectro de ultravioleta (UV). As curvas padrões foram preparadas com o ergosterol de pureza 95% nas concentrações que variaram de 75 a 10 µg/mL (BILA; COSTA-ORLANDI; VASO; BONATTI *et al.*, 2021).

3.12.2. Verificação de dano de parede celular por meio da coloração com *Calcofluor white*

Para a avaliação o de dano de parede, as suspensões fúngicas, os compostos e os fármacos foram preparados de acordo com o item 3.12.1. As placas, contendo lâminas de vidro redondas estéreis, foram incubadas sob agitação (150 rpm), por 168 h a 37°C. Em seguida, foram centrifugadas e lavadas com PBS para retirada de células não aderentes das lamínulas. Foi adicionado 1 mL de paraformaldeído a 4% e as placas incubadas a 4°C *overnight*. Após este período, uma solução de 100 mg/mL de *Calcofluor White* (Sigma) em PBS foi preparada conforme instruções do fabricante, e foi adicionado 1 mL da solução aos poços das placas, que foram incubadas por 40 minutos em temperatura ambiente (TA). Transcorrido o tempo, as placas foram centrifugadas, lavadas duas vezes com PBS e foi montado lâmina – lamínula com Fluoromount-G (Thermofisher) e a leitura foi realizada no Microscópio de Fluorescência Confocal (Carl Zeiss LSM 800 com Airyscan, pertencente a Faculdade de Odontologia do Campus de Araraquara (FOAr)/UNESP (BILA; COSTA-ORLANDI; VASO; BONATTI *et al.*, 2021).

3.12.3 Quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROs)

A produção intracelular de EROs após o tratamento de *H. capsulatum* (EH-315) com as concentrações do CIM₉₀ dos compostos L7CF 166 (0,24 µg/mL), L7CF 197 (3,90 µg/mL) e L7CF 219 (0,122 µg/mL) foi avaliada utilizando 50 µM de H₂DCFDA (2,7 dichlorodihydrofluorescein diacetate, *Invitrogen*). Como controle, foram utilizados os tratamentos com anfotericina B (0,03 µg/mL), itraconazol (0,06 µg/mL), água oxigenada (10 mM - H₂O₂) e inóculo sem tratamento. Para isto, foi realizado um inóculo de leveduras de *H. capsulatum* na concentração de 1×10⁶ céls/mL (duas vezes mais concentrado), foi feito o tratamento, de modo que, a concentração final fosse o CIM₉₀ de cada composto e fármacos e os tubos foram incubados a 37°C por 2 h, protegidos da luz (MESA-ARANGO; TREVIJANO-CONTADOR; ROMÁN; SÁNCHEZ-FRESNEDA *et al.*, 2014; SANGALLI-LEITE; SCORZONI; MESA-ARANGO; CASAS *et al.*, 2011). Após o tempo de incubação, as amostras foram lavadas, e foi adicionado 500 µL de paraformaldeído a 4% e incubados na câmara-fria por 4 h. Transcorrido este tempo, foram novamente centrifugados e foi adicionado 500 uL de PBS e transferidas para os tubos de citômetro. Foi adicionado 1,5 µL da solução de H₂DCFDA, incubados a temperatura ambiente e ao abrigo de luz por 10 min. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo BD FACS Canto I, localizado no Núcleo da Proteômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Unesp – Araraquara.

3.12.4. Necrose / apoptose

O ensaio de necrose/apoptose foi realizado conforme o item 3.12.3. foram utilizados os compostos L7CF 166, L7CF 197 e L7CF 219 e, os fármacos anfotericina B e itraconazol como controles. Como marcadores, foi utilizado o Kit de detecção de apoptose (*Sigma-Aldrich*, A9210) conforme orientações do fabricante. As amostras foram incubadas por 2 horas a 37°C protegidos da luz. Foi realizado um controle positivo, onde havia apenas o fungo

com as marcações de Anexina/Iodeto de propídeo (IP). Decorrido o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas e lavadas com PBS 1× e, as células foram suspendidas em 500 µL do tampão do kit e posteriormente transferidas para tubos de citômetro. A leitura foi realizada no Citômetro Fluxo BD FACSCanto I, pertencente a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp de Araraquara.

3.12.5. Análise do perfil de expressão de genes relacionados aos mecanismos de ação por PCR em tempo real (RT-PCR)

Nos ensaios de análise do perfil de expressão gênica a cepa EH-315 foi tratada por 168h com concentrações subinibitórias dos compostos L7CF 166 (0,122 µg/mL), L7CF 197 (1,95 µg/mL) e L7CF 219 (0,06 µg/mL). Como controle, foi utilizada a mesma cepa sem nenhum tratamento. O conteúdo dos poços das placas foi cuidadosamente retirado, colocado em tubos cônicos submetidos a centrifugação e sucessivas lavagens com PBS para a obtenção de um pellet.

- Extração, quantidade e qualidade do RNA

O RNA total foi extraído com o kit *Illustra RNAspin Isolation* (GE Life Sciences). A concentração e pureza foram determinadas pela leitura em espectrofotômetro Nanodrop™ 2000 (*Thermo Scientific™*), nas absorvâncias de 260 e 280 nm e a integridade foi avaliada por eletroforese capilar utilizando o equipamento *Agilent 2100 Bioanalyzer* (*Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA*).

- Primers

Os primers foram sintetizados de acordo com as sequencias disponibilizadas por Blancett e colaboradores (2020), Youseff & Rappleye (2013) e Youseff e colaboradores

(2012). Foram selecionados genes envolvidos com a biossíntese do ergosterol (Erg11a) e uma catalase referente ao estresse oxidativo (CatP). O gene CatB foi utilizado como normalizador (**Tabela 1**) (BLANCETT; RUNGE; REYES; KENNEDY *et al.*, 2020; HOLBROOK; SMOLNYCKI; YOUSEFF; RAPPLEYE, 2013; YOUSEFF; HOLBROOK; SMOLNYCKI; RAPPLEYE, 2012).

Tabela 1 - Sequência dos genes desenhados para PCR em tempo real relacionado ao mecanismo de ação dos compostos.

Gene	Forward primer	Reverse primer
Erg11a	TTCTTGGAACAAAAGGCAACG	CGAGGTTAGCCCGTATTTGAC
CatB	CGGTGCTGGACAAATGTT	AGACCGTGAGTGAGTTGTA
CatP	CCAACTTACACTGACTCCAATG	ATGGTGGTGATATCGCTGA

- Obtenção do cDNA

Para a obtenção das fitas de cDNA, o RNA total foi tratado com o kit DNase I (*Sigma-Aldrich*). Posteriormente, o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando o kit *high-capacity cDNA reverse transcription* (*Applied Biosystems*), de acordo com as orientações dos fabricantes.

- Validação dos primers

Os primers foram diluídos em água MilliQ de modo que todos se encontrassem na mesma concentração, conforme *datasheet* de cada primer. Nos experimentos de validação, foi realizado um pool de cDNA, com cinco pontos de diluição. Os genes validados, foram aqueles que obtiveram um único pico referente a temperatura de melting (TM), indicando ausência de produtos inespecíficos como dímeros ou *hairpins*. Foi também verificada a

eficiência de amplificação, que mostra quanto a molécula alvo amplifica a cada ciclo durante a fase exponencial da reação, os níveis variaram entre 90% e 120% (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Todas as reações foram realizadas no equipamento Termociclador 7500 *Real Time PCR System* (*Applied Biosystems*) pertencente ao laboratório de Multiusuários da Genômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp de Araraquara. Os resultados foram analisados utilizando o software 7500 Software v2.3.

- Método do Ct Comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

As qPCR's foram feitas no equipamento 7500 *Real Time PCR Instrument* (*Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific*) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, com o sistema de detecção *Power SYBR™ Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific*). As reações foram preparadas em um volume total de 20 μ L, utilizando 13,6 ng de cDNA e 0,5 μ M de cada oligonucleotídeo. Foram feitos dois experimentos independentes em triplicata para cada condição testada. A expressão relativa foi calculada pelo método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, usando o gene *CatB* como endógeno. As células não tratadas foram usadas como referência.

3.13. INFECÇÃO EM CULTIVO TRIDIMENSIONAL PELA TÉCNICA DE IMUNOFLUORÊSCENCIA

Os esferoides foram formados como descrito anteriormente e infectados com células planctônicas e com células provenientes de biofilmes maduros de *H. capsulatum*. As células fúngicas foram marcadas com FITC (Ivotrogen) em uma concentração de 1:2000 em BSA 2%, antes de serem colocadas em contato com os esferoides. Para a forma planctônica o fungo foi subcultivado em HAM-12 por 96 h a 37°C (BALTAZAR; ZAMITH-MIRANDA; BURNET; CHOI *et al.*, 2018). A suspensão fúngica foi preparada em meio DMEM acrescido de 10% de

SFB de modo a obter uma multiplicidade de infecção (MOI) de 5:1 (BATANGHARI; DEEPE; DI CERA; GOLDMAN, 1998). Já para o biofilme em estágio maduro, foi realizada a pré-adesão de 12 h em salina a 0,85% em placas de 96 poços. Foi adicionado o meio HAM-F12 e as placas foram incubadas em uma atmosfera com baixa tensão de oxigênio a 37°C por 144 h (GONÇALVES; COSTA-ORLANDI; BILA; VASO *et al.*, 2020). Após maturação, o meio foi retirado, e foram realizadas lavagens com PBS para a retirada de células não aderentes. Os fundos das placas foram raspados para desfazer os biofilmes, com o auxílio de uma ponteira estéril, após a adição de PBS. Uma suspensão fúngica com os biofilmes desfeitos foi preparada em meio DMEM acrescido de 10% de SFB, de modo a obter uma MOI 5:1 e colocadas em contato com os esferoides. As placas foram levadas a estufa de CO₂ por 24 h a 37°C de modo a estabelecer a infecção. Após o tempo de infecção, os esferoides infectados foram transferidos para placas de 24 poços e fixados com 500 µL de paraformaldeído a 4% e incubados *overnight* em câmara fria. Em seguida, o paraformaldeído foi retirado, os poços lavados com PBS e as marcações com Alexa Fluor 647 Faloidina (citoplasma) e *Hoechts* (núcleo), foram realizadas. Como controle foram utilizados esferoides infectados marcados apenas com FITC, tanto para a forma planctônica como a de biofilme. Finalizadas as marcações, os poços contendo os esferoides foram lavados 2 vezes com PBS 1× e foi adicionado 500 µL de PBS. As imagens foram obtidas pelo Microscópio de Fluorescência Confocal (*Carl Zeiss LSM 800* com Airyscan) da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araraquara-SP e as análises foram realizadas pelo software Zen Blue 3.2 (KIRK; SKEPPER; DONALD, 2009; SALEH, 2017).

3.13.1. AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO DAS FORMAS PLANCTÔNICAS E DE BIOFILME EM MONOCAMADA E CULTIVO TRIDIMENSIONAL PELO MÉTODO DE RT-PCR

Para a avaliação da expressão de alguns genes de infecção, as infecções com células planctônicas e biofilmes foram conduzidas na linhagem celular MRC-5 em monocamada como em 3D. As placas contendo os esferoides e a monocamada foram infectadas com *H. capsulatum* EH-315 de modo a se obter um MOI 5:1 e incubados por 24 h, conforme descrito no item 3.13. Transcorrido esse tempo, os esferoides transferidos para tubos cônicos, centrifugados e lavados duas vezes com PBS e congelados em freezer -80°C. Já para a monocamada, foi esgotado o meio, feita a lavagem com PBS e a tripsinização. A tripsina foi inativa com a adição de DMEM acrescido de 10% de SFB e todo o conteúdo foi transferido para tubos cônicos, centrifugados, lavados com PBS e armazenados em freezer -80° C.

Para a extração do RNA as amostras foram liofilizadas no Liofilizador Labconco *FreeZone 4.5 L- 105C Benchtop Freeze Dryer* pertencente ao Núcleo de Proteômica, da UNESP de Araraquara. Após a liofilização foi feita a extração, dosagem, análise da integridade, construção da fita de cDNA e a reação de qPCR, conforme descrito no item anterior. Todos os primers foram obtidos na literatura (**Tabela 2**) (BLANCETT; RUNGE; REYES; KENNEDY *et al.*, 2020; BOHSE; WOODS, 2007a; b; HOLBROOK; SMOLNYCKI; YOUSEFF; RAPPLEYE, 2013; JOHNSON; KLOTZ; YORK; KRUFTH *et al.*, 2002; MUNIZ, 2009; SEBGHATI, TRICIA SCHURTZ; ENGLE, JACQUELYN T.; GOLDMAN, WILLIAM E., 2000; SUÁREZ-ÁLVAREZ; SAHAZA; BERZUNZA-CRUZ; BECKER *et al.*, 2019; YOUSEFF; HOLBROOK; SMOLNYCKI; RAPPLEYE, 2012).

Tabela 2 – Primers desenhados para a análise do nível de expressão gênica dos esferoides e monocamada infectados com as formas planctônica e biofilme de *H. capsulatum*.

Gene	Forward primer	Reverse primer
CatB	CGGTGCTGGACAAATGTT	AGACCGTGAGTGAGTTGTA
DDR48	GACAATACTACCACCTATGGGTCTAA	CTTATCAGCGATGGTTTCCTTCTG
GAPDH	AACGACCCCTTCATTGAC	TCCACGACATACTCAGCAC
CBP1	CTCCAAGGTTATCGCTCC	GCAGTAGCAGCGCAAGCG

3.14. ANÁLISE ESTATÍSTICA

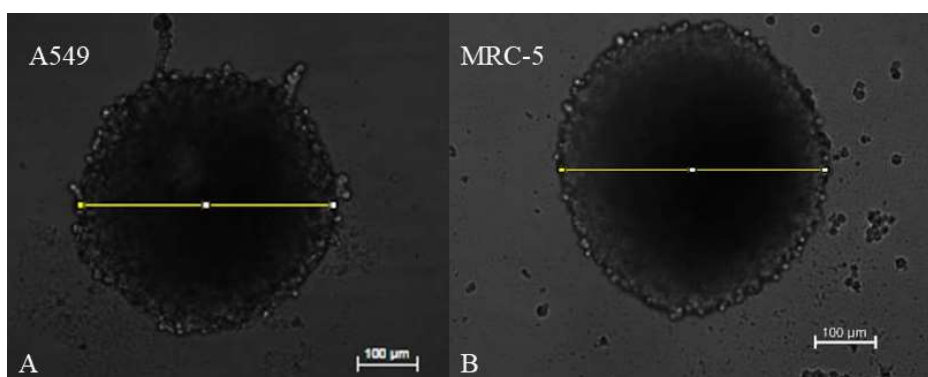
Para os testes realizados com os esferoides foram utilizados no mínimo quatro esferoides e foram feitos três experimentos independentes. Todos os demais ensaios foram realizados em triplicata e em três experimentos independentes. Para o CC₅₀, foi aplicada uma regressão linear semi-logarítmica. Curvas de sobrevivência foram aplicadas para o modelo alternativo de *Galleria mellonella* e para o *zebrafish* plotadas pelo método Kaplan-Meier e analisadas por Log-rank (Mantel-Cox). Para os experimentos de PCR em tempo real foi utilizado test t. Todos os dados foram submetidos à análise estatística utilizando o teste t ou análise de variância (One Way ANOVA) com pós-teste de Bonferroni, por meio do software GraphPad Prism 5.0. Os valores de *p* menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. PADRONIZAÇÃO DA CULTURA TRIDIMENSIONAL

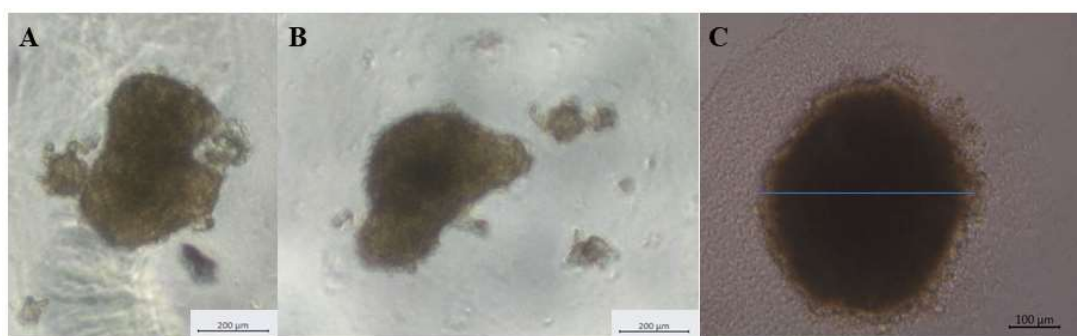
A melhor concentração para a obtenção de esferoides adequados foi de 3×10^3 céls/poço para a linhagem A549 (**Figura 2A**), e de 2×10^3 céls/poço para a linhagem a MRC-5. Nessas concentrações obteve-se um esferoide por poço, circulares, com membrana íntegra e diâmetro que variava de 370 a 600 μm (**Figura 2B**).

Figura 2 - Imagens representativa dos esferoides da linhagem A549 medindo 396,7 μm (**A**) e MRC-5 medindo 407,24 μm (**B**), obtidas em campo claro utilizando o equipamento *InCell Analyser* na magnificação de 10 $\times$.



Nas demais concentrações testadas, houve problemas como a não formação de uma estrutura circular, formação de mais de um esferoide por poço, tamanho maior ou menor do que o indicado na literatura (**Figura 3**).

Figura 3 - Estruturas formadas utilizando diferentes concentrações de suspensões celulares. **A:** formação incompleta do modelo 3D; **B:** formação de pequenos esferoides no mesmo poço na concentração de 6×10^3 céls/poço e **C:** diâmetro do esferoide maior que o recomendado na concentração de 5×10^4 céls/poço.



De acordo com a literatura, a concentração de células para a formação das estruturas esferoidais pode variar de 1×10^3 a 6×10^4 céls/poço (FRIEDRICH; SEIDEL; EBNER; KUNZ-SCHUGHART, 2009; GUO; CHEN; JI; CHEN *et al.*, 2019; LIAO; WANG; XU; YOU *et al.*, 2019; SALEH, 2017). As características dos esferoides formados neste trabalho corroboraram com esses estudos, não apenas na concentração de células, mas também pelo fato das células em 3D apresentarem estrutura circular e integridade da membrana. Esses fatores contribuem, para distribuições adequadas de oxigênio, mantendo a alta viabilidade, proliferação e desenvolvimento (BYRNE, 2010). Este tipo de cultura em três dimensões, permite que as células se encontrem em diferentes estágios nutricionais e em diferentes fases do ciclo celular, mimetizando o microambiente dos tecidos *in vivo* (EDMONDSON; BROGLIE; ADCOCK; YANG, 2014).

Além disto, as células utilizadas para a confecção das culturas tridimensionais devem ter um tempo de cultivo superior a 48 horas para a expressão de todos os componentes da matriz extracelular e para propiciar a interação célula-célula/célula-matriz e, conseqüentemente, uma maior compactação por um período de tempo mais longo

(FRIEDRICH; SEIDEL; EBNER; KUNZ-SCHUGHART, 2009; LARUE; KHALIL; FREYER, 2004).

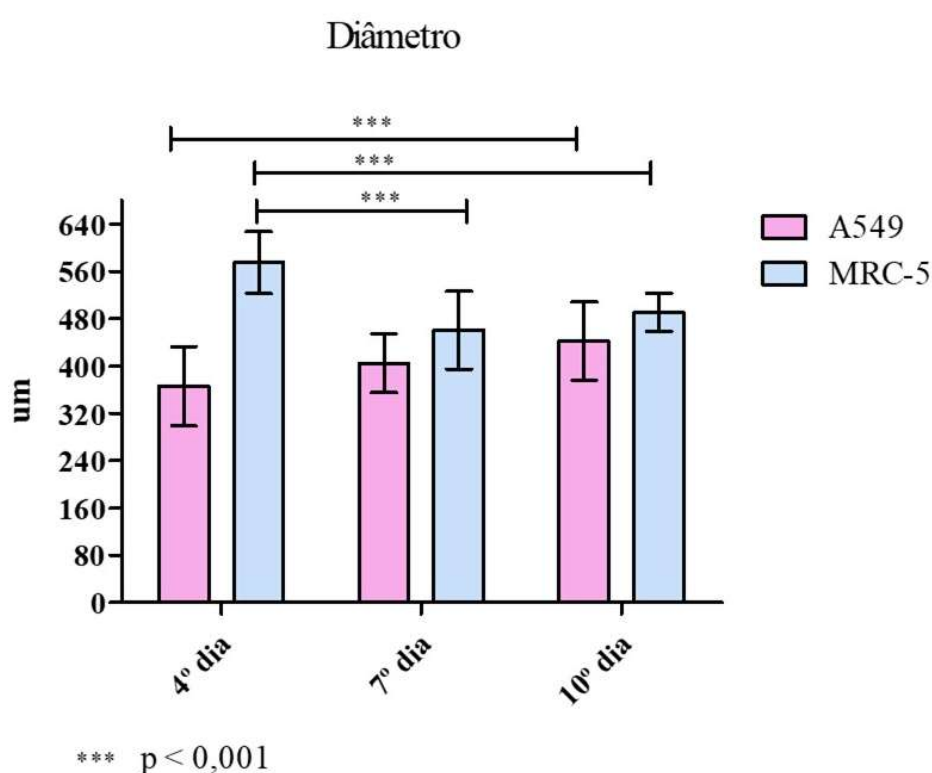
O modelo escolhido com revestimento em gel de agarose foi considerado adequado, já que a agarose forma uma superfície semissólida e impede que as células se adiram ao poço e sejam capazes de interagir entre si e formar uma estrutura tridimensional (CARLSSON; YUHAS, 1984; FRIEDRICH; SEIDEL; EBNER; KUNZ-SCHUGHART, 2009). Sendo assim, o uso da agarose para a formação de esferoides em culturas 3D é considerado simples e fácil (RAVI; PARAMESH; KAVIYA; ANURADHA *et al.*, 2015).

4.2. CARACTERIZAÇÃO DA CULTURA TRIDIMENSIONAL

4.2.1. Tamanho dos esferoides

Após a determinação da concentração ideal para a formação dos esferoides, foi feita a caracterização do modelo tridimensional, com o objetivo de determinar o diâmetro em momentos diferentes. As imagens foram obtidas no 4º, 7º e 10º dia e processadas pelo *software ImageJ*. Os esferoides obtidos no quarto dia para a linhagem celular A549 apresentaram um diâmetro médio de $365,98 \pm 66,95 \mu\text{m}$. Já para linhagem MRC-5 os esferoides apresentaram um diâmetro de aproximadamente $574,74 \pm 52,03 \mu\text{m}$. Já no sétimo dia, o diâmetro médio para linhagem A549 foi de $404,78 \pm 49,92 \mu\text{m}$ e para a linhagem MRC-5 de $460,38 \pm 65,94 \mu\text{m}$ e no décimo dia $441,80 \pm 65,97 \mu\text{m}$ (A549) e $490,87 \pm 32,23 \mu\text{m}$ (MRC-5) (**Figura 4**). Ao comparar os diâmetros no decorrer dos dias, observou-se um aumento no tamanho dos esferoides da linhagem A549 do quarto dia quando comparado ao décimo dia ($p < 0,001$). Já para os esferoides da linhagem MRC-5 houve uma redução do diâmetro quarto dia comparado ao sétimo dia ($p < 0,001$) e ao décimo dia ($p < 0,001$).

Figura 4 - Diâmetro dos esferoides das linhagens celulares A549 e MRC-5 no quarto, sétimo e décimo dia de formação. Houve significância estatística entre os diâmetros obtidos na linhagem A549 do 4º dia em relação ao 10º dia e para a linhagem MRC-5 do 4º dia em relação ao 7º e 10º dia. Valores expressos em média e desvio padrão. Os valores de p (***) ($p < 0,001$) foram calculados pela análise *One Way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni.



Nos cultivos tridimensionais, a taxa de proliferação costuma ser mais lenta dependendo do sistema 3D utilizado e da linhagem celular (EDMONDSON; BROGLIE; ADCOCK; YANG, 2014). No geral, as linhagens em cultura 3D têm uma fase de crescimento exponencial e depois de um certo período, os esferoides atingem uma fase linear. Nesta fase, a largura da borda proliferativa externa permanece constante até que os esferoides obtenham um tamanho adequado. A partir daí é estabelecido um equilíbrio entre as taxas líquidas de

crescimento e de morte celular (BYRNE, 2010; LIN; CHANG, 2008; OWEN; BYRNE; LEWIS, 2004).

Os tamanhos adequados dos esferoides são capazes de mimetizar melhor o ambiente *in vivo*. As culturas com diâmetros menores 200 μm provavelmente não desenvolverão todas as características fisiológicas e apresentaram limitação na difusão de moléculas, incluindo o oxigênio e acúmulo de metabólitos. No entanto, esferoides com diâmetros maiores 600 μm podem desenvolver uma grande área de necrose central, inviabilizando a troca de nutrientes e a distribuição dos fármacos por todo o cultivo 3D (FRIEDRICH; SEIDEL; EBNER; KUNZ-SCHUGHART, 2009; KUNZ-SCHUGHART; KREUTZ; KNUECHEL, 1998; LIN; CHANG, 2008; ROMERO; ZUKOWSKI; MUELLER-KLIESER, 1997).

4.2.2. Quantificação celular por azul de *Trypan*

Em ambos os modelos 2D e 3D e linhagens celulares houve um aumento significativo na proliferação celular quando comparado ao dia de plaqueamento. No geral, o cultivo 3D apresentou uma taxa de proliferação celular menor que o do cultivo 2D. Os modelos produzidos pela linhagem celular A549 mantiveram a quantidade de célula estável até o décimo dia. Já o modelo 2D da linhagem celular MRC-5 apresentou um aumento na proliferação celular no sétimo dia ($p < 0,05$). Em relação ao cultivo 3D, houve um aumento celular no sétimo ($p < 0,001$) e no décimo dia ($p < 0,01$), conforme dados apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Quantificação celular para as linhagens celulares nos dois modelos 2D e 3D, representados pela média e desvio padrão, após quatro, sete e dez dias de formação. Valores expressos em média e desvio. Os valores de p (* $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) foram calculados pela análise *One Way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni comparando todas as condições.

Linhagem	Modelo	4º dia	7º dia	10º dia
A549	Monocamada (2D)	$5.23 \times 10^4 \pm 7.56 \times 10^3$	$8.50 \times 10^4 \pm 2.73 \times 10^4$	$1.03 \times 10^5 \pm 2.08 \times 10^3$
	Esferoide (3D)	$8.33 \times 10^3 \pm 2.36 \times 10^3$	$1.23 \times 10^4 \pm 1.53 \times 10^3$	$1.25 \times 10^4 \pm 2.08 \times 10^3$
MRC-5	Monocamada (2D)	$1.91 \times 10^5 \pm 1.53 \times 10^4$	$3.56 \times 10^5 \pm 3.96 \times 10^4(*)$	$3.06 \times 10^5 \pm 3.58 \times 10^4$
	Esferoide (3D)	$2.69 \times 10^3 \pm 6.67 \times 10^2$	$4.25 \times 10^4 \pm 3.75 \times 10^3(***)$	$3.13 \times 10^4 \pm 7.60 \times 10^3(**)$

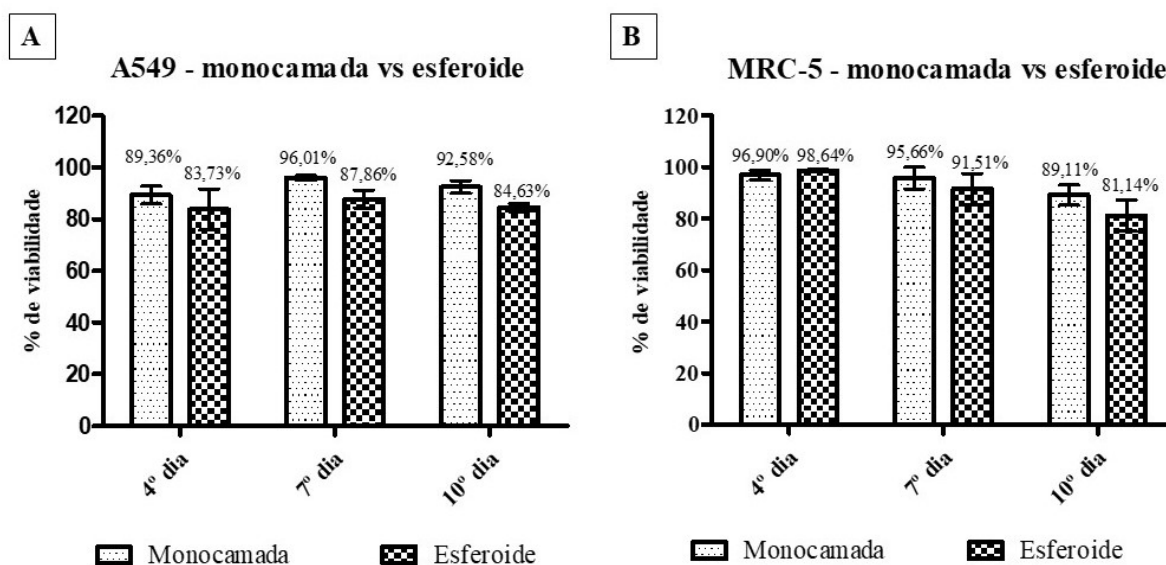
Neste trabalho, foi observada uma taxa de proliferação menor nos modelos 3D quando comparado às monocamadas, corroborando com o descrito por Gurski e colaboradores (2010) e Xu e colaboradores (2012) e justificando as diversas fases de desenvolvimento do esferoide. O corante azul de trypan é utilizado como um corante vital, que não é absorvido pelas células saudáveis (viáveis). Já as células que tiveram um rompimento de membrana são coradas de azul. As culturas tridimensionais têm uma taxa de crescimento menor comparativamente com as culturas em monocamada (EDMONDSON; BROGLIE; ADCOCK; YANG, 2014). Além disso, a quantidade de célula costuma ser variável, dependendo da linhagem celular utilizada (BONNIER; KEATING; WRÓBEL; MAJZNER *et al.*, 2015; FIORENTZIS; KATOPODIS; KALIRAI; SEITZ *et al.*, 2019).

Segundo o guia da OECD (2010) para métodos alternativos de citotoxicidade, a concentração recomendada para testes em monocamada celulares é entre $1,0 - 2,0 \times 10^4$ céls/mL. Outros autores relatam que as concentrações ideais para testes de citotoxicidade em monocamada devem ser de 5×10^3 até 1×10^6 céls/poço dependendo da linhagem celular testada (BONNIER; KEATING; WRÓBEL; MAJZNER *et al.*, 2015; CATUNDA; VIEIRA; DE OLIVEIRA; DA SILVA *et al.*, 2017; CHUN; MUN, 2015; DUBIAK-SZEPIETOWSKA; KARCZMARCZYK; WINCKLER; FELLER, 2016; FIORENTZIS; KATOPODIS; KALIRAI; SEITZ *et al.*, 2019; ZWOLAK, 2014). De acordo com nossos resultados, após 96 horas de cultivo, para ambas linhagens e modelos, obtivemos quantidades de células suficientes para serem conduzidos testes de citotoxicidade.

4.2.3. Viabilidade celular por azul de *Trypan* e resazurina

Além da quantificação celular, o método de azul de Trypan foi utilizado para realizar ensaios de viabilidade celular. Os resultados apontam que para ambas as linhagens celulares utilizadas (A549 e MRC-5) e ambos os modelos (2D e 3D), houve uma viabilidade celular elevada, acima de 80%, mesmo após dez dias de cultivo. Além disso, não se observa significância na viabilidade em função do tempo na monocamada quanto no modelo tridimensional (**Fig. 5**).

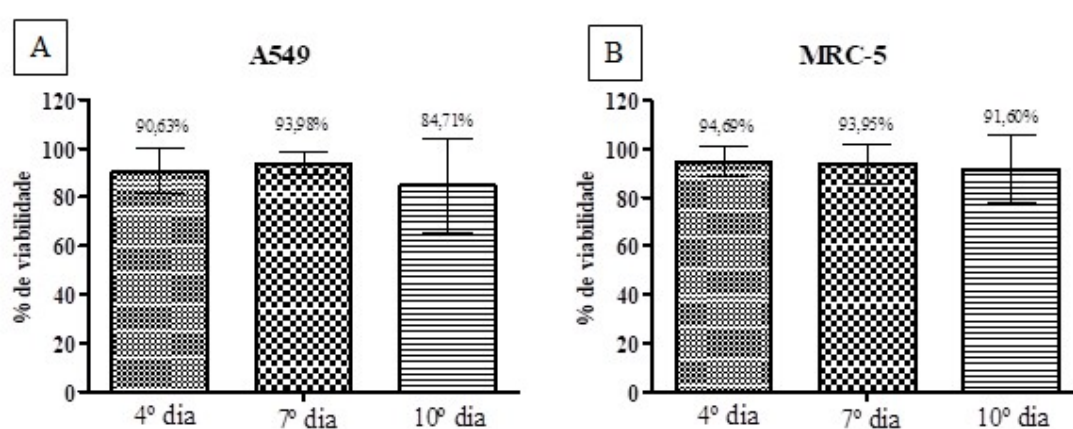
Figura 5 - Viabilidade celular utilizando o método de azul de Trypan nas linhagens celulares A549 (**A**) - e MRC-5 (**B**) nos modelos tridimensional e monocamada. A viabilidade celular se manteve estável até o décimo dia em ambos os modelos. As barras de erro indicam desvios padrão. Não houve diferença estatística entre as condições quando calculadas pela análise *One Way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni.



As culturas 3D têm uma taxa de proliferação e desenvolvimento menores que a monocamada e por conseguinte, apresentam um núcleo necrótico rodeado por uma borda viável, que consiste em uma camada interna de células quiescentes e uma camada externa de células em proliferação (LIN; CHANG, 2008; OWEN; BYRNE; LEWIS, 2004). Por este motivo, os esferoides geralmente costumam apresentar uma viabilidade celular menor ou igual a monocamada (KAPUR; WANG; SHANG; YUN *et al.*, 2012). No entanto, ambos os modelos apresentam viabilidade semelhante ao longo dos dias.

Além do corante azul de Trypan, a resazurina também foi utilizada para determinar a viabilidade. A resazurina é um indicador redox permeável às células, que pode ser usado para monitorar o número de células viáveis. Para este ensaio, a viabilidade foi verificada no quarto, sétimo e décimo dia, apenas para o modelo tridimensional, objetivando verificar o comportamento dele no decorrer dos dias. Os resultados mostraram que mesmo após dez dias de cultivo, os esferoides de ambas as linhagens permaneceram com viabilidade superior a 84%. (Figura 6).

Figura 6 - Viabilidade celular pelo método de resazurina no modelo tridimensional das linhagens celulares A549 (A) e MRC-5 (B). A viabilidade manteve-se elevada após dez dias de formação dos esferoides. As barras de erro indicam desvios padrão. Não houve diferença estatística quando comparada as condições calculadas pela análise *One Way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni.



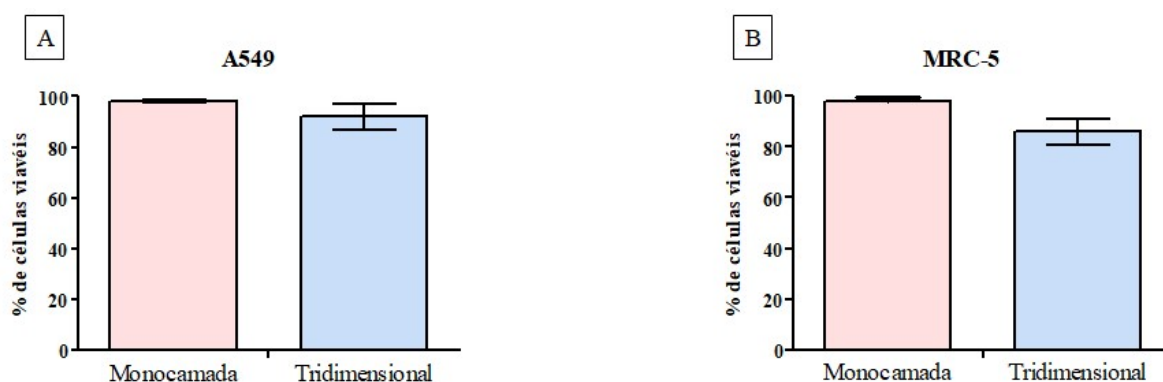
Os resultados entre azul de trypan e resazurina foram semelhantes e mostraram que os esferoides se mantiveram estáveis e viáveis no período avaliado. De acordo com a literatura, o cultivo 3D apresenta poucas células mortas, mesmo tendo uma região central com células quiescentes e necróticas e tem alta viabilidade celular e uma estabilidade que pode perdurar por cerca de três semanas (KRONEMBERGER, 2018; MOURA, 2015).

4.2.4. Viabilidade por iodeto de propídeo

Outro método utilizado para a verificação da viabilidade celular, foi a marcação por iodeto de propídeo avaliada por citometria de fluxo. Foram utilizados os esferoides no quarto dia de desenvolvimento e culturas em monocamada. As células em monocamada mantiveram uma viabilidade média de 98,25% (A549) e 97,87% (MRC-5), enquanto para as culturas

tridimensionais a viabilidade média foi de 92,00% (A549) e de 85,96% para linhagem MRC-5 (**Fig. 7**). Assim como nos resultados dos métodos anteriores, os esferoides apresentaram a mesma viabilidade que as células em monocamadas.

Figura 7 - Viabilidade celular utilizando iodeto de propídeo no quarto dia de cultura. **A** – cultura celular para a linhagem A549; **B** – cultura celular para a linhagem MRC-5. Em ambos os modelos, a viabilidade manteve-se elevada. As barras de erro indicam desvios padrão. Não houve diferença estatística quando comparada as condições calculadas pela análise *One Way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni.



Ao se analisar os resultados obtidos pela técnica de azul de *Trypan*, resazurina e IP no quarto dia para os cultivos tridimensionais para as linhagens A549 e MRC-5, os resultados mostram uma alta viabilidade variando de 83 a 99%. Já para o cultivo em monocamada, os resultados de azul de *Trypan* e IP mostram que a viabilidade variou para ambas as linhagens de 92 a 98,5%. A viabilidade celular foi um dos fatores determinantes para continuidade ao estudo, já que foi necessário a obtenção de esferoides viáveis para os testes de citotoxicidade e ensaios de interação patógeno-hospedeiro.

4.2.5. Topografia dos esferoides avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As topografias dos esferoides das linhagens celulares A549 e MRC-5 foram observadas no quarto dia de cultivo (**Fig. 8 e 9**). Observou-se células organizadas em arquitetura esferoidal, lisa e arredonda. Os esferoides encontravam-se íntegros, as células aparentemente apresentam interações entre si, o que é característico deste modelo celular.

Figura 8 - Imagem representativa da topografia dos esferoides formados pela linhagem A549.

A – A linha amarela indica o diâmetro do esferoide, medindo 389,25 μm ; **B** – esferoide na magnificação de 250 $\times$; **C** - imagem na magnificação de 500 $\times$; **D** –magnificação de 1000 $\times$.

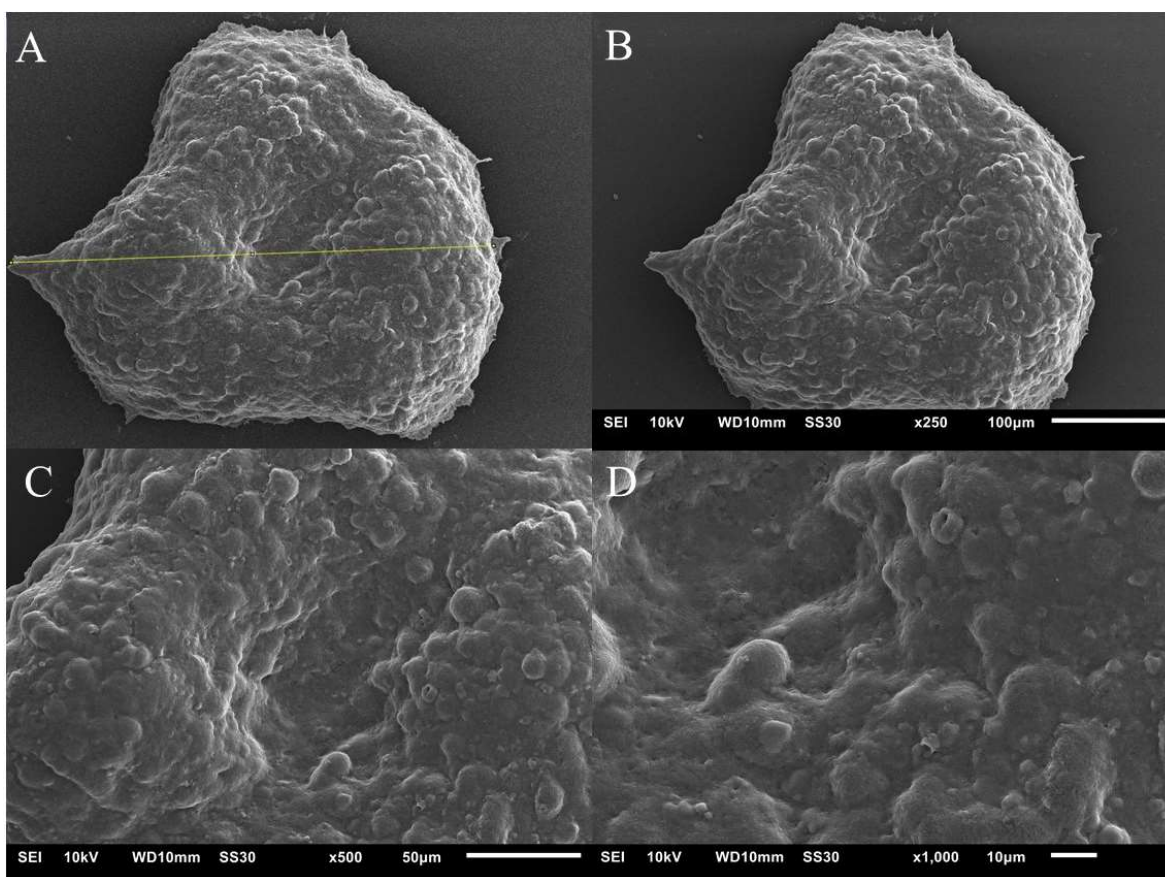
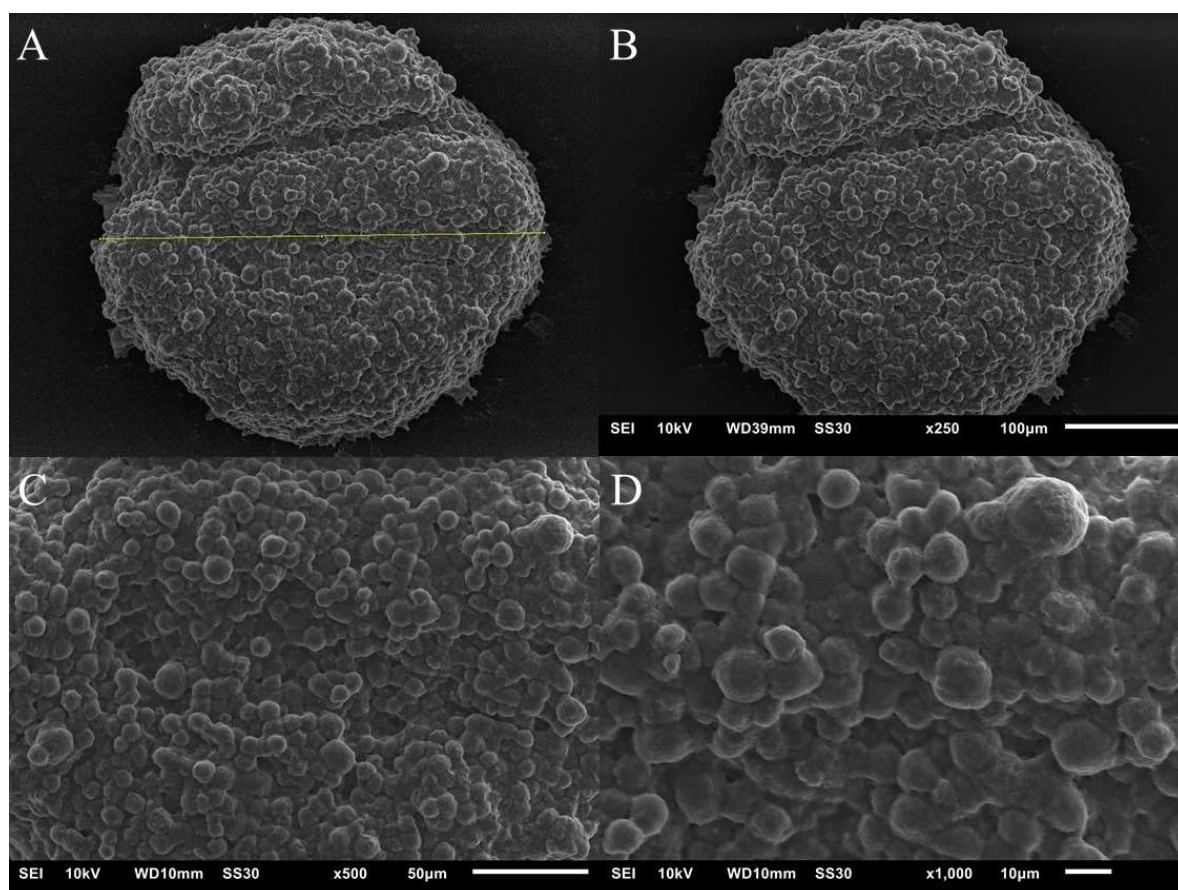


Figura 9 - Imagem representativa da topografia dos esferoides formados pela linhagem MRC-5. **A**- linha amarela diâmetro de 389,33 μm ; **B** – esferoide na magnificação de 250X; **C**- imagem na magnificação de 500X e **D** – magnificação de 1000X.



Neste tipo de técnica não se observa a morfologia celular característica da cultura em monocamada, sendo esta uma das diferenças que ocorre entre a célula em 2D e 3D (EDMONDSON; BROGLIE; ADCOCK; YANG, 2014). No trabalho conduzido por Saleh (2017), foi observado que os esferoides tinham uma estrutura circular regular e compacta, com células em aspecto liso e sem rompimentos aparentes. Nas imagens acima observou-se uma forte interação entre as células, com alguns prolongamentos. Algumas linhagens

celulares são capazes de produzir componentes como colágeno e fibronectina (JEONG; LEE; SHIN; CHUNG *et al.*, 2016; NEDERMAN; NORLING; GLIMELIUS; CARLSSON *et al.*, 1984; SALEH, 2017). A MEV tem sido usada há muitos anos para fornecer imagens superficiais de alta resolução. Devido à amplificação de suas objetivas serem aprimoradas torna-se uma ferramenta fundamental para investigações da superfície de amostras (KIRK; SKEPPER; DONALD, 2009).

4.2.6. Microscopia de fluorescência confocal

As imagens de microscopia de fluorescência dos esferoides, de ambas as linhagens, foram observadas no quarto dia de cultivo (**Fig. 10 e 11**). O núcleo das células foi corado em azul (**Fig. 10A e 11A**), enquanto o citoplasma foi corado de vermelho (**Fig. 10B e 11B**). Na sobreposição (merge) (**Fig. 10C e 11C**) observou-se células organizadas em arquitetura esferoidal e esferoides íntegros. As **Fig. 10 D e 11D**, mostram a espessura dos esferoides.

Figura 10 - Imagem de microscopia de fluorescência do esferoide da linhagem celular A549 no quarto dia de cultivo. **A** – marcação do corante Hoesch (núcleo); **B** – marcação com Alexa Fluor Faloidina 647 (citoplasma); **C** – merge das marcações e **D** – merge com barra de profundidade.

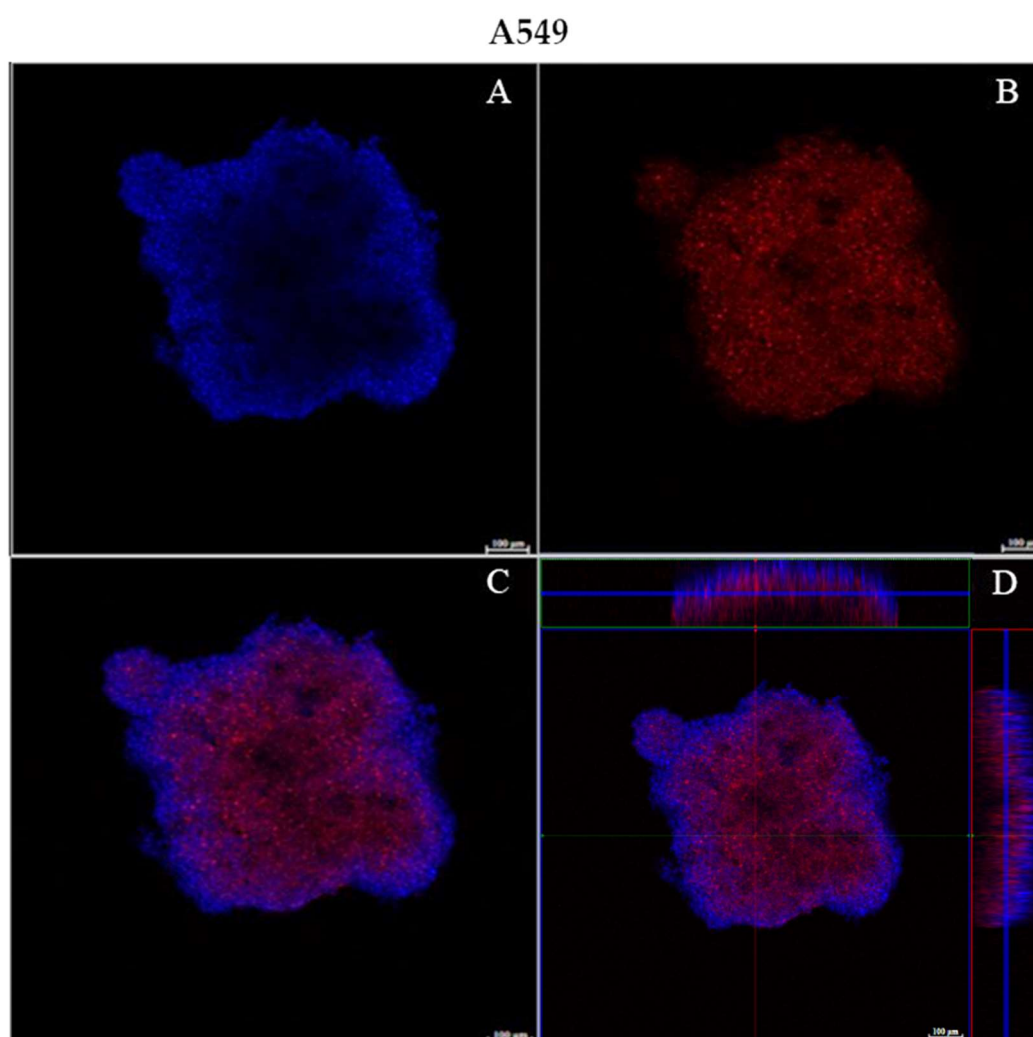
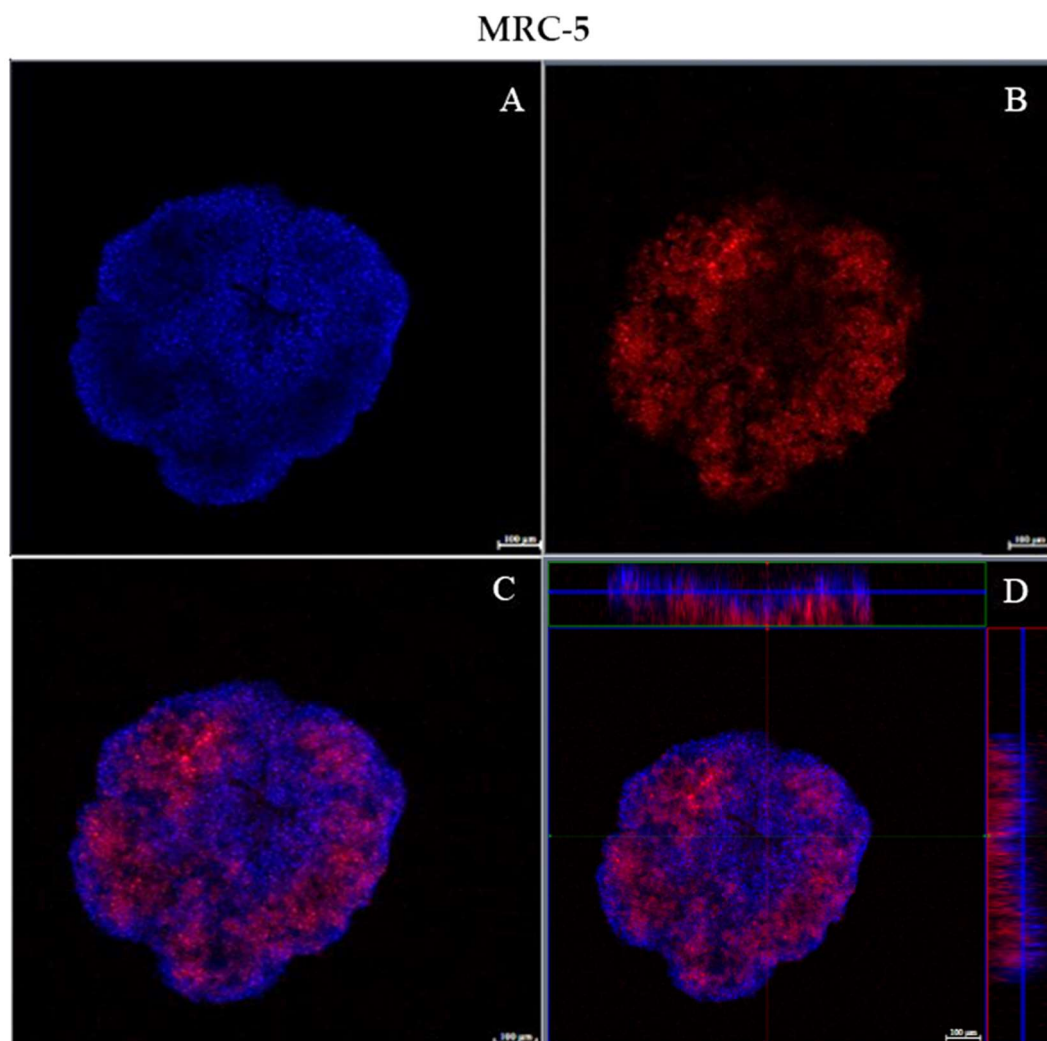


Figura 11 - Imagem de microscopia de fluorescência do esferoide da linhagem celular MRC-5 no quarto dia de cultivo. **A** – marcação do corante Hoesch (núcleo); **B** – marcação com Alexa Fluor Faloidina 647 (citoplasma); **C** – merge das marcacoes e **D** – merge com barra de profundidade.



Os cultivos tridimensionais produzem um macro e um microambiente distinto dos cultivos em monocamada. Esse ambiente permite que haja diferenças na oxigenação, perfusão, pH e estados metabólicos, por isso o tamanho dos cultivos tridimensionais interfere diretamente no equilíbrio desses ambientes (DANHIER; FERON; PRÉAT, 2010; TEVIS; COLSON; GRINSTAFF, 2017).

Alguns estudos vêm demonstrando que os cultivos tridimensionais expressam diferentes níveis de caderinas (glicoproteínas que costumam funcionar como uma cola entre as células) e integrinas, sendo as principais famílias de proteínas intercelulares que se conectam com a matriz extracelular (MEC). Esses componentes se ligam a macromoléculas como laminina, fibronectina e colágeno, formando uma matriz extracelular complexa, que se assemelha ao *in vivo* (HUSSEY; KEANE; BADYLAK, 2017; KRONEMBERGER; MIRANDA; TAVARES; MONTENEGRO *et al.*, 2021; MCMILLEN; HOLLEY, 2015).

4.3. TESTE DE SENSIBILIDADE

4.3.1. Derivados de nitrofurano e indólicos

Os derivados de nitrofurano foram sintetizados conforme Karimabad e colaboradores (2019), bem como os compostos indólicos conforme De Vita e colaboradores (2016) e Guerra e colaboradores (2011), todos os dados analíticos estavam de acordo com os relatados anteriormente (VASO; BILA; PANDOLFI; DE VITA *et al.*, 2022; VASO; PANDOLFI; BILA; DE VITA *et al.*, 2022). A **figura 12** e **13** demonstra a série de derivados de nitrofuranos e indólicos, respectivamente, resintetizados e utilizados nesse estudo.

Figura 12 – Fórmula molecular dos derivados de nitrofuranos.

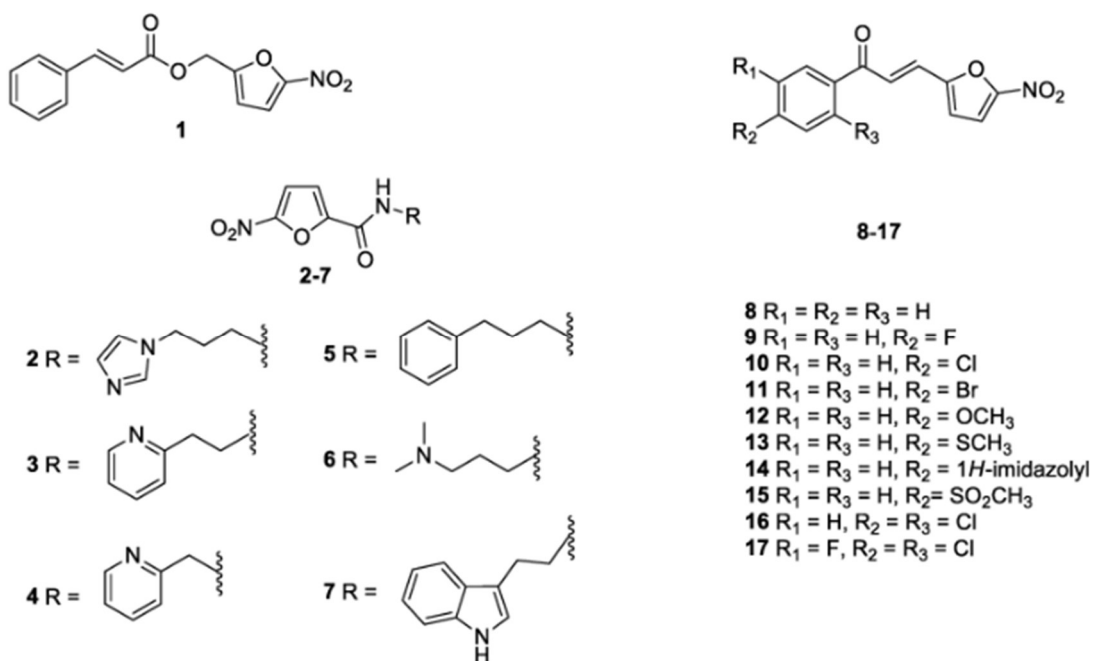
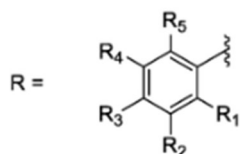
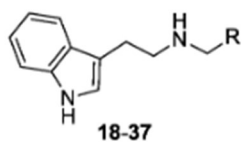
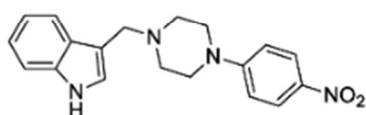
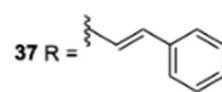
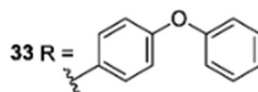
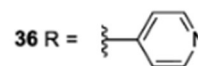
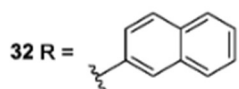
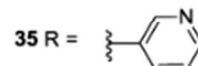
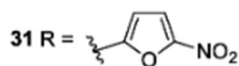
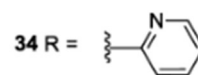
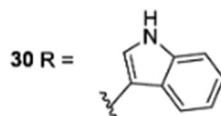
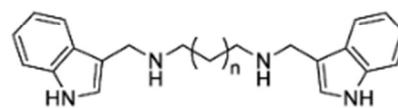
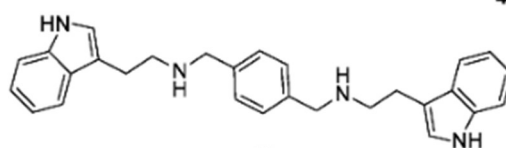
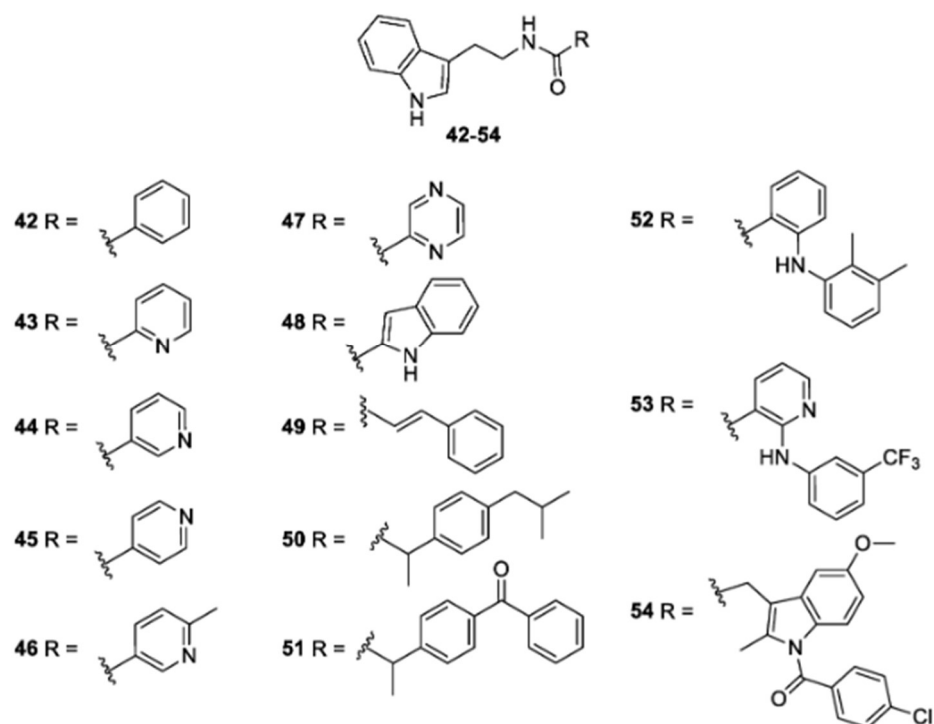


Figura 13 – Fórmula molecular dos derivados indólicos.



- 18** $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = H$
19 $R_1 = R_2 = R_4 = R_5 = H$; $R_3 = N(CH_3)_2$
20 $R_1 = R_2 = R_4 = R_5 = H$; $R_3 = Br$
21 $R_1 = R_3 = R_4 = R_5 = H$; $R_2 = Br$
22 $R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = H$; $R_1 = Br$
23 $R_1 = R_2 = R_4 = R_5 = H$; $R_3 = NO_2$
24 $R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = H$; $R_1 = NO_2$
25 $R_1 = R_2 = R_4 = R_5 = H$; $R_3 = Cl$
26 $R_1 = R_3 = R_4 = R_5 = H$; $R_2 = OH$
27 $R_2 = R_3 = R_4 = H$; $R_1 = NO_2$; $R_5 = Cl$
28 $R_1 = R_4 = R_5 = H$; $R_2 = NO_2$; $R_3 = OCH_3$
29 $R_1 = R_5 = H$; $R_2 = R_3 = R_4 = OCH_3$

**38****39** $n = 2$ **40** $n = 3$ **41**



4.3.2. Concentração inibitória e fungicida mínima

O teste de sensibilidade das cepas de *H. capsulatum* EH-315 e ATCC G217-B contra os derivados de nitrofuranos e indólicos foi dividido em duas etapas. Inicialmente foi feito um *screening* com a cepa EH-315 a fim de selecionar os compostos mais potentes. Em seguida, foram conduzidos os testes subsequentes com a cepa ATCC G217-B. Os valores de CIM₉₀ foi de 0,122 até 125 µg/mL entre os 45 compostos que apresentaram atividade anti- *Histoplasma capsulatum* (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultados da concentração inibitória mínima obtidas na cepa EH315 quando testadas contra os derivados de nitrofurano e indólicos.

Composto	L7CF166	L7CF167	L7CF181	L7CF182	L7CF183	L7CF190	L7CF191	L7CF192	L7CF193	L7CF194
Concentração (µg/mL)	0,25	31,25	0,25	1,95	0,98	15,6	62,5	0,98	7,8	7,8

Composto	L7CF147	L7CF148	L7CF174	L7CF175	L7CF176	L7CF178	L7CF179	L7CF180	L7CF185	L7CF186
Concentração (µg/mL)	31,25	125	31,25	15,6	≥ 125	15,6	3,9	7,8	31,25	3,9

Composto	L7CF187	L7CF195	L7CF196	L7CF197	L7CF198	L7CF199	L7CF201	L7CF202	L7CF204
Concentração (µg/mL)	31,25	≥ 125	62,5	3,9	≥ 125	31,25	7,8	1,95	≥ 125

Composto	L7CF205	L7CF206	L7CF212	L7CF213	L7CF214	L7CF215	L7CF216	L7CF217	L7CF218	L7CF219
Concentração (µg/mL)	≥ 125	15,6	31,25	62,5	125	62,5	31,25	≥ 125	125	0,122

Composto	L7CF220	L7CF222	L7CF223	L7CF225	L7CF226	L7CF227	L7CF228	L7CF229	L7CF230	L7CF231
Concentração (µg/mL)	≥ 125	≥ 125	≥ 125	125	≥ 125	125	≥ 125	≥ 125	31,25	7,8

Composto	L7CF232	L7CF233	L7CF234	L7CF235	L7CF236	L7CF260	L7CF261	L7CF262	L7CF263	L7CF113
Concentração (µg/mL)	≥ 125	7,8	62,5	62,5	62,5	3,9	7,8	62,5	≥ 125	≥ 125

Composto	L7C165
Concentração (µg/mL)	31,25

Foram selecionados, compostos com valores de $CIM_{90} \leq 7,8 \mu\text{g/mL}$ (totalizando dezoito) e sua atividade antifúngica foi avaliada contra a cepa ATCC G217-B. A **Tabela 5** apresenta os valores de CIM_{90} e CFM e a relação entre CFM/CIM_{90} dos 18 compostos selecionados, contra as cepas EH-315 e ATCC G217-B. Os fármacos anfotericina B e itraconazol também foram testados. Treze compostos resultaram também em excelente atividade inibitória contra ambas as cepas, com valores de CIM_{90} no intervalo de 0,122 a 7,81 $\mu\text{g/mL}$. Todos os compostos apresentaram perfil fungicida em ambas as cepas demonstrando valores de CFM igual ou duas vezes maiores que a CIM_{90} . Além disso, a relação entre CFM/CIM_{90} foi menor que quatro. A cepa ATCC G217-B mostrou-se mais resistente a alguns compostos que a cepa EH-315 com valores de CIM_{90} cerca 8 vezes superiores. O oposto foi observado para o fármaco itraconazol, que inibiu o crescimento da cepa ATCC G217-B na concentração de 0,007 $\mu\text{g/mL}$, cerca de 18 vezes menor que a CIM_{90} para a cepa EH-315 (0,125 $\mu\text{g/mL}$).

Tabela 5 - Concentração inibitória e fungicida mínima dos derivados de nitrofurano, indólicos, anfotericina B e itraconazol contra as cepas EH-315 e ATCC G217-B. Relação CFM/CIM₉₀ dos compostos.

Compostos	Derivado	EH-315 (µg/mL)			ATCC G217-B (µg/mL)		
		CIM ₉₀	CFM	CFM/CIM ₉₀	CIM ₉₀	CFM	CFM/CIM ₉₀
L7CF166	Nitrofurano	0,24	0,24	1	0,48	0,48	1
L7CF181	Nitrofurano	0,24	0,24	1	1,95	1,95	1
L7CF182	Nitrofurano	1,95	1,95	1	3,9	3,9	1
L7CF183	Nitrofurano	0,98	0,98	1	3,9	3,9	1
L7CF192	Nitrofurano	0,98	0,98	1	3,9	3,9	1
L7CF193	Nitrofurano	7,81	7,81	1	7,81	15,62	2
L7CF194	Nitrofurano	7,81	7,81	1	7,81	15,62	2
L7CF219	Nitrofurano/Indólico	0,122	0,122	1	0,98	0,98	1
L7CF 260	Nitrofurano	3,9	7,81	2	7,81	7,81	1
L7CF 261	Nitrofurano	7,81	15,62	2	≥ 250	> 250	≥1
L7CF179	Indólico	3,9	3,9	1	31,25	31,25	1
L7CF180	Indólico	7,81	7,81	1	61,25	61,25	1
L7CF186	Indólico	3,9	3,9	1	31,25	31,25	1
L7CF197	Indólico	3,9	3,9	1	3,9	3,9	1
L7CF201	Indólico	7,81	7,81	1	7,81	7,81	1
L7CF202	Indólico	1,95	1,95	1	3,9	3,9	1
L7CF231	Indólico	7,81	7,81	1	7,81	7,81	1
L7CF233	Indólico	7,81	7,81	1	15,62	15,62	1
Anfotericina B	Polieno	0,06	-	-	0,03	-	-
Itraconazol	Azol	0,125	-	-	0,007	-	-

CIM₉₀ – concentração capaz de inibir 90% das células; CFM – concentração fungicida mínima, CFM/CIM₉₀ - relação entre as concentrações fungicida e inibitória.

A concentração inibitória dos fármacos, encontra-se na faixa de valores descrita na literatura. Os valores da CIM₉₀ da anfotericina B varia entre 0,03 a 2 µg /mL e 0,003 a 0,5 µg/mL para o itraconazol (GOUGHENOUR; BALADA-LLASAT; RAPPLEYE, 2015; GOUGHENOUR; RAPPLEYE, 2017; KATHURIA; SINGH; MEIS; CHOWDHARY, 2014; LEMONTE; WASHUM; SMEDEMA; SCHNIZLEIN-BICK *et al.*, 2000; WHEAT; CONNOLLY; SMEDEMA; BRIZENDINE *et al.*, 2001).

Por se tratar de uma micose sistêmica e um fungo que tem uma predileção de ser internalizado nas células, o seu tratamento requer períodos longos, podendo perdurar até 24 meses, com doses alternadas de anfotericina B e itraconazol, o que acaba ocasionando sérios problemas de toxicidade (AZAR; LOYD; RELICH; WHEAT *et al.*, 2020; DE AGUIAR CORDEIRO; DE FARIAS MARQUES; DE AGUIAR CORDEIRO; DA SILVA *et al.*, 2014; WHEAT; FREIFELD; KLEIMAN; BADDLEY *et al.*, 2007).

Todos os compostos testados apresentaram uma atividade fungicida, ou seja, foram capazes de eliminar o microrganismo quando tratados na concentração da CIM₉₀. A relação CFM/CIM₉₀ foi menor que quatro, o que indica um perfil fungicida. Valores maiores que quatro apresentam perfil fungistático (BILA; COSTA-ORLANDI; VASO; BONATTI *et al.*, 2021; HAZEN, 1998).

4.4. TESTE DE CITOTOXICIDADE EM MODELO 2D E 3D E CÁLCULO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE DOS COMPOSTOS PARA *H. capsulatum*

Após os testes de sensibilidade, a toxicidade dos 18 compostos selecionados foi avaliada nos modelos celulares de monocamada (2D) e tridimensional (3D). Foram calculados o CC₅₀, que corresponde ao valor da concentração do composto que resulta em inibição de 50% da viabilidade celular e o índice de seletividade (IS), que corresponde à razão do CC₅₀

pela CIM₉₀ (DO CARMO SILVA; DE OLIVEIRA; DE SOUZA; BARBOSA *et al.*, 2020; SHIKANAI-YASUDA, 2015).

Treze compostos para a linhagem celular A549 e quatorze compostos para a linhagem MRC-5 apresentaram valores de CC₅₀ iguais ou superiores aos das monocamadas, com valores para os esferoides de 13,22 a ≥ 250 $\mu\text{g/mL}$. Os compostos L7CF 166, L7CF 181, L7CF 182, L7CF183, L7CF192, L7CF 219, L7CF 261, L7CF 179, L7CF 186, L7CF 197, L7CF 201, L7CF 231 e L7CF 233 tiveram os melhores valores de CC₅₀. A maioria dos compostos apresentou maior especificidade para a célula fúngica do que para as células hospedeiras, com variação de IS de 2049,18 a 0,98 (**Tabela 6 e 7**). O maior IS para *H. capsulatum* cepa EH-315 foi referente ao composto L7CF 219, no cultivo tridimensional na linhagem A549, sendo de 2049,18. Outros compostos, como o L7CF 166, L7CF 181, L7CF 182, L7CF 183, L7CF 192, L7CF 193, L7CF 197 e L7CF 201, obtiveram IS variando de 9,74 a 2049,18, em ambas as linhagens, modelos apresentados e nas cepas fúngicas. O índice de seletividade é utilizado para indicar o quão seletivo o composto é para eliminar a célula fúngica e não a célula hospedeira, avaliando a relação entre segurança e potência dos compostos. Valores superiores a 10, costumam ser mais seletivos e específicos (BILA; COSTA-ORLANDI; VASO; BONATTI *et al.*, 2021; OCHOA-PACHECO; ESCALONA ARRANZ; BEAVEN; PERES-ROSES *et al.*, 2017; SINGULANI; GALEANE; RAMOS; GOMES *et al.*, 2019).

Os compostos L7CF 166 (derivado de nitrofurano), o L7CF 197 (derivado indólico) e L7CF 219 (derivado nitrofurano/indólico) foram escolhidos para a continuação dos experimentos dos mecanismos de ação, avaliação nos biofilmes e toxicidade *in vivo*. Na escolha levou-se em consideração o grupo molecular que cada um pertencia, a CIM₉₀ e o IS.

Tabela 6 - Resultados do CC₅₀ e índice de seletividade (IS) na linhagem celular A549 nas cepas EH-315 e ATCC G217-B em ambos os modelos monocamada e tridimensional.

Compostos	A549					
	Monocamada			Esferoide		
	EH-315		ATCC G217-B	EH-315		ATCC G217-B
	CC ₅₀	IS	IS	CC ₅₀	IS	IS
L7CF166	12,24	50,16	25,50	56,06	229,75	116,79
L7CF181	30,11	125,45	15,44	43,01	179,20	22,05
L7CF182	231,2	118,56	59,28	>250	128,20	64,10
L7CF183	29,50	30,10	7,56	62,96	64,24	16,14
L7CF192	23,41	23,88	6,00	17,25	17,60	4,42
L7CF193	>250	>32,01	>32,01	104,8	13,41	13,41
L7CF194	38,67	4,95	4,95	32,97	4,22	4,22
L7CF219	8,58	70,32	8,75	>250	>2049,18	>255,1
L7CF260	33,44	8,83	4,40	27,61	7,07	3,53
L7CF 261	34,23	4,38	0,13	58,56	7,5	0,23
L7CF 179	>250	>64,1	>8	>250	>64,1	>8
L7CF 180	4,00	0,51	0,06	4,78	0,61	0,07
L7CF 186	>250	>64,1	>8	71,28	18,27	2,28
L7CF197	81,41	20,87	20,87	81,41	20,76	20,76
L7CF201	81,41	10,42	10,42	81,41	10,42	10,42
L7CF202	12,26	6,28	3,14	13,22	6,77	1,69
L7CF231	40,00	5,12	5,12	40,00	5,12	5,12
L7CF233	42,79	5,47	2,73	60,50	7,74	3,87

CC₅₀ – índice que mede a inibição de 50% da proliferação celular. IS – índice de seletividade (CC₅₀/CIM90)

Tabela 7 - Resultados do CC₅₀ e índice de seletividade (IS) na linhagem celular MRC-5 nas cepas EH-315 e ATCC G217-B em ambos os modelos monocamada e tridimensional.

Compostos	MRC-5					
	Monocamada			Esferoide		
	EH-315		ATCC G217-B	EH-315		ATCC G217-B
	CC ₅₀	IS	IS	CC ₅₀	IS	IS
L7CF166	62,56	256,39	130,33	67,79	277,82	141,22
L7CF181	39,76	165,66	20,38	81,41	339,20	41,74
L7CF182	>250	>128,20	>64,10	>250	>128,20	>64,10
L7CF183	135,2	137,95	34,66	>250	>255,10	>64,10
L7CF192	47,23	48,19	12,11	169,6	173,06	43,48
L7CF193	228,0	29,19	29,19	76,12	9,74	9,74
L7CF194	215,4	27,58	27,58	57,92	7,41	7,41
L7CF219	71,24	583,93	72,69	73,50	602,45	75,00
L7CF260	26,8	6,87	3,43	7,68	1,96	0,98
L7CF 261	11,51	1,47	0,04	22,02	2,82	0,08
L7CF 179	>250	>64,1	>8	>250	>64,1	>8
L7CF 180	3,38	0,49	0,06	6,82	0,87	0,11
L7CF 186	>250	>64,1	>8	>250	>64,1	>8
L7CF197	24,70	6,33	6,33	26,14	6,70	6,70
L7CF201	20,39	2,61	2,61	25,35	3,57	3,57
L7CF202	18,74	9,56	4,78	14,03	7,19	3,59
L7CF231	33,77	4,32	4,32	52,34	6,70	6,70
L7CF233	40,00	5,12	2,56	40,00	5,12	2,56

CC₅₀ – índice que mede a inibição de 50% da proliferação celular. IS – índice de seletividade (CC₅₀/CIM90)

A literatura aponta que os esferoides geralmente possuem valores um CC₅₀ maior que as culturas em monocamada. Em um estudo conduzido por Loessner e colaboradores (2010), os autores verificaram que houve uma redução de 40 a 60%, ao tratarem células tumorais em 3D com fármacos anticancerígenos, fato que se assemelha ao que ocorre *in vivo*, enquanto na monocamada esta redução foi de 80%. Muitos estudos mostraram que as culturas de esferoides são mais aprimoradas para testes de citotoxicidade, mostrando-se capazes de mimetizar o ambiente *in vivo* (BAEK; SEO; LEE; HULME *et al.*, 2016; EDMONDSON;

BROGLIE; ADCOCK; YANG, 2014; KARLSSON; FRYKNÄS; LARSSON; NYGREN, 2012; PROCTOR; FOSTER; VOGT; SUMMERS *et al.*, 2017; SCHREIBER-BRYNZAK; KLAPPROTH; UNGER; LICHTSCHEIDL-SCHULTZ *et al.*, 2015).

As culturas 3D apresentam uma organização espacial dos receptores, que afeta a transdução de sinal do exterior para o interior das células e influenciam a expressão gênica e o comportamento celular. No geral, as culturas 3D representam vantagens em relação as culturas 2D, isto mostra a necessidade de usar diferentes modelos experimentais para investigações pré-clínicas, que sejam confiáveis e capazes avaliar e melhorar o potencial de novos compostos (EDMONDSON; BROGLIE; ADCOCK; YANG, 2014; KARLSSON; FRYKNÄS; LARSSON; NYGREN, 2012).

Os relatos de baixa toxicidade de derivados de nitrofurano já foram constatados no estudo conduzido por Marcelino (2018), que ao testar o perfil citotóxico, verificou a viabilidade de 100% nas linhagens celulares HaCat, 3T3 e HepG2 quando tratadas com concentrações de 250 µg/mL. Kamal e colaboradores (2015) analisaram a toxicidade de nitrofuranos triazólicos na linhagem de fibroblasto pulmonar (MRC-5). Os autores observaram que os compostos não eram citotóxicos em concentrações de 100 µM. De Vita e colaboradores (2014) testaram derivados de nitrofuranos conjugados com ácido caféico e constatarem valores de CC₅₀ relativamente altos, que variavam de 120 a 256 µg/mL. Já Palace-Berl e colaboradores (2018), ao testarem alguns derivados de nitrofuranos encontraram valores de CC₅₀ variando de 1,17 a 300 µM. Com relação aos derivados indólicos, alguns autores relataram baixa toxicidade mesmo em concentrações mais elevadas (DE VITA; SIMONETTI; PANDOLFI; COSTI *et al.*, 2016; OH; GO; MYLONAKIS; KIM, 2012; VILA; LOPEZ-RIBOT, 2017).

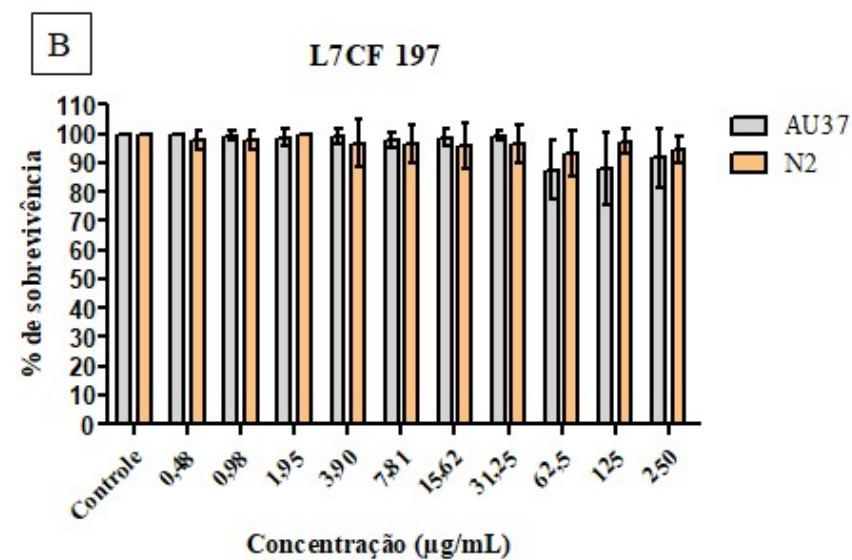
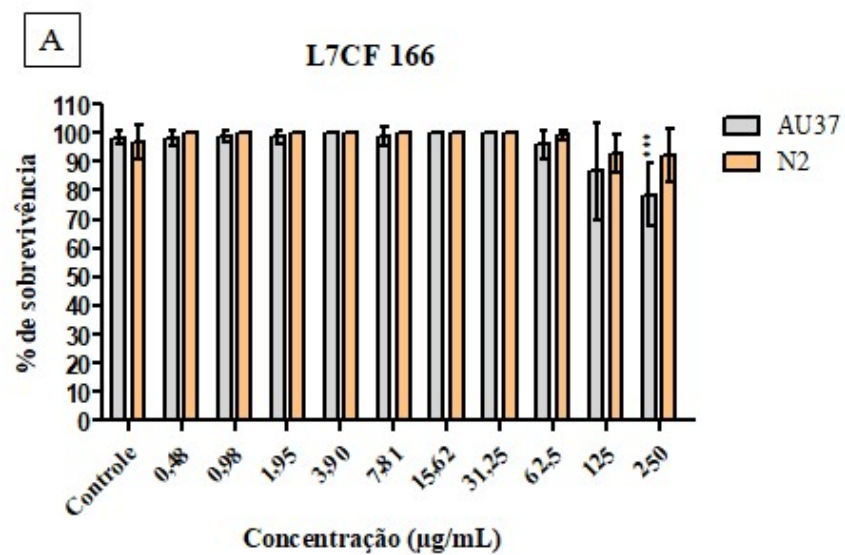
Os ensaios baseados em cultura celular são uma ferramenta fundamental e uma das principais utilizadas para avaliar a potencial de eficácia de novos compostos. Os custos com

ensaios pré-clínicos são extremamente altos e estima-se que de todos os novos compostos testados apenas 21% destes vão a fase clínica de ensaio I. Por isto, a importância de se investir no estudo de métodos alternativos, como é o caso das culturas tridimensionais, para se obter resultados mais confiáveis, que visem cumprir as legislações recentes de diminuição do uso de animais em experimentos (EDMONDSON; BROGLIE; ADCOCK; YANG, 2014). Com isto, é possível demonstrar a efetividade destes compostos como excelentes protótipos antifúngicos.

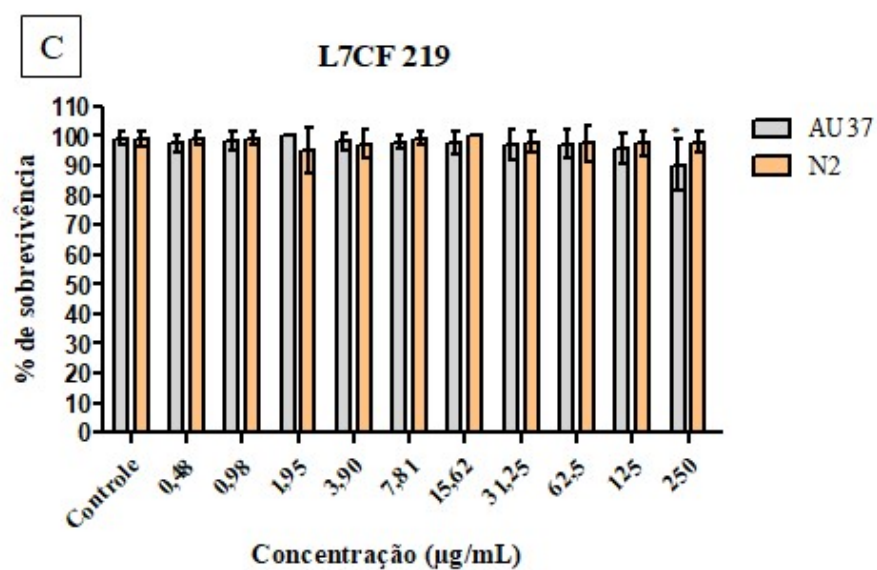
4.5. ENSAIO DE TOXICIDADE *in vivo* NO MODELO *C. elegans*

Os resultados do teste de toxicidade em *C. elegans*, mostraram que todos os compostos apresentaram porcentagem de sobrevivência alta (**Figura 14 e 15**). A toxicidade só ocorreu nas concentrações mais altas (125 e 250 µg/mL) para a cepa AU37, no entanto, 78% das larvas mantiveram-se vivas. Para a cepa N2, mesmo nas concentrações elevadas apenas 5% das larvas morreram.

Figura 14 - Sobrevivência das cepas AU37 e N2 de *C. elegans* em diferentes concentrações dos derivados de nitrofurano e indólicos. **A** – Porcentagem de sobrevivência das larvas tratadas com o derivado de nitrofurano L7CF 166. **B** – Porcentagem de sobrevivência das larvas colocadas em contato com o derivado indólico L7CF 197. **C** – Porcentagem de sobrevivência das larvas colocadas em contato com o derivado de nitrofurano/indólico L7CF 219. Valores expressos em média e desvio padrão. As barras de erro indicam desvios padrão. Os valores de p (*p<0,05; ***p < 0,001) foram calculados pela análise *One Way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni comparando todas as condições.

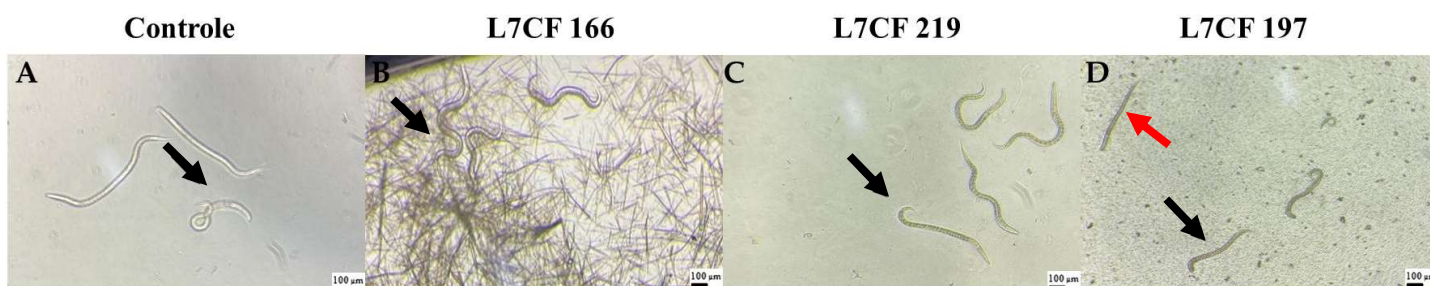


*** $p < 0,001$



* $p < 0,05$

Figura 15 - Imagens representativas da cepa AU37 de *C. elegans*. Todas as imagens foram obtidas na concentração de 250 µg/mL para o composto L7CF 166 (B), L7CF 219 (C) e L7CF 197 (D). As setas pretas indicam larvas com forma sinusoidal (vivas) como no controle (A) e a seta vermelha, indica uma larva em formato de bastão (morta).



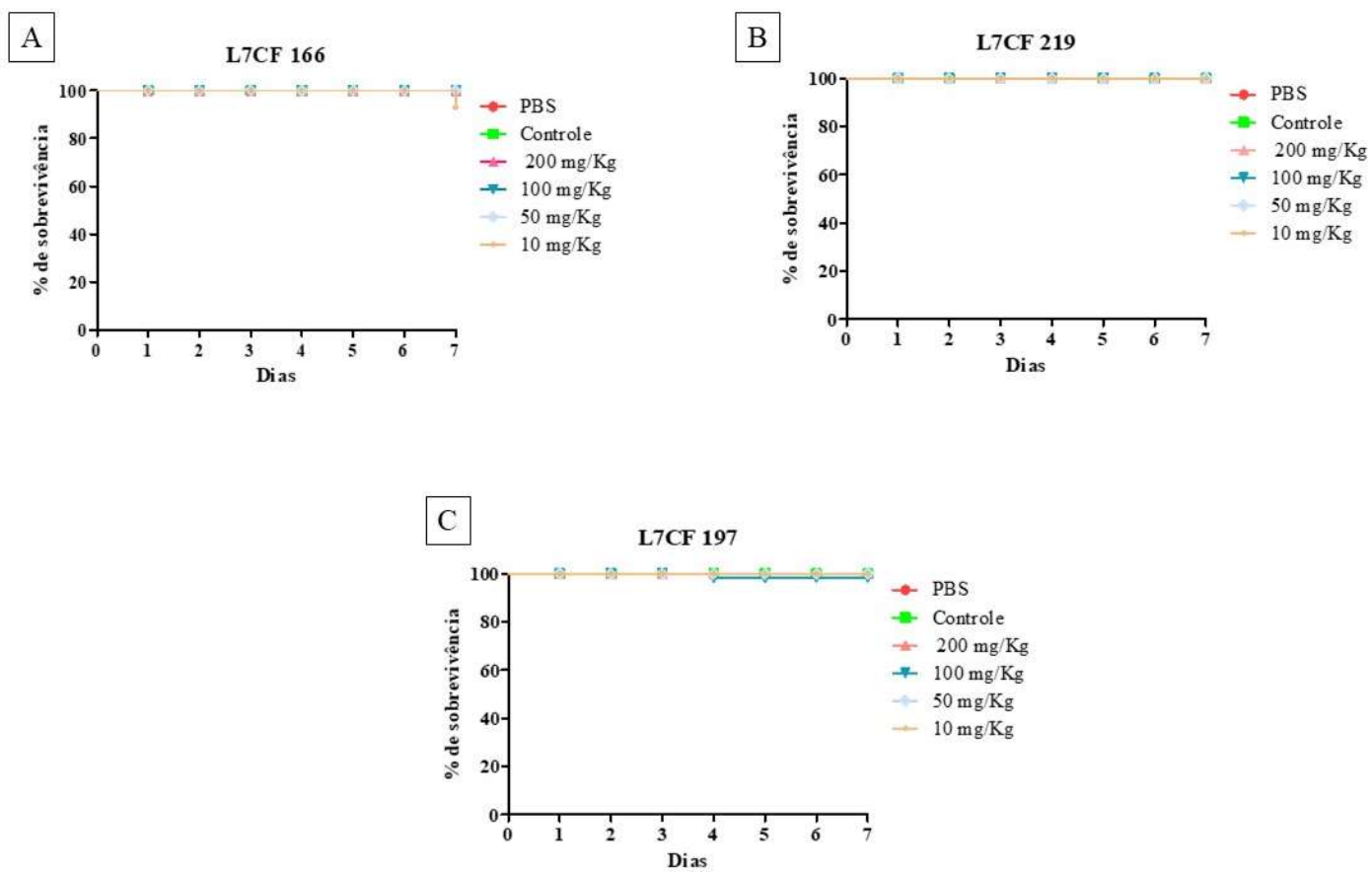
Nossos resultados apontam que os compostos testados na cepa AU37, foram mais sensíveis em relação a cepa N2. Resultados semelhantes no estudo de toxicidade *in vivo*, utilizando o modelo alternativo *C. elegans* foi encontrado por Costa-Orlandi e colaboradores (2020). Os autores relataram que a cepa mutante AU37 mostrou-se mais sensível em relação a cepa N2. Além disto, os compostos se apresentaram promissores mantendo uma baixa toxicidade, mesmo nas concentrações mais elevadas, como já observado nos experimentos com culturas celulares.

C. elegans é classificado como um nematoide com cerca de 1mm, que se alimenta de bactérias e fungos que decompõem o solo. Ele foi caracterizado na década de 60, e tem sido essencial na pesquisa, principalmente na área de toxicologia (HUNT, 2017). A cepa AU37, tem uma mutação *glp-4*, que faz com que a larva seja incapaz de se reproduzir a 25° C e a mutação na *sek-1* responsável por tornar a larva mais sensível a vários patógenos (SCORZONI; DE LUCAS; MESA-ARANGO; FUSCO-ALMEIDA *et al.*, 2013; SINGULANI; SCORZONI; GOMES; NAZARÉ *et al.*, 2017).

4.6. TOXICIDADE *in vivo* EM *G. mellonella*

Os resultados de toxicidade *in vivo* em *G. mellonella*, mostraram que os três compostos não apresentaram toxicidade nesses animais, em nenhuma das concentrações testadas (**Figura 16**). Para o derivado de nitrofurano L7CF 166 (**Fig. 16A**) e o indólico L7CF 197 (**Fig. 16C**), houve a morte de uma larva na concentração de 10 e 100 mg/Kg, no sétimo e quarto dia, respectivamente. No entanto, a viabilidade é superior a 95%, não havendo nenhuma significância estatística entre os grupos tratados e os controles.

Figura 16 - Curva de sobrevivência para os diferentes compostos (**A**) derivado de nitrofurano L7C66, (**B**) derivado misto L7CF 219 e (**C**) derivado indólico L7CF 197. As curvas de sobrevivência foram plotadas pelo método Kaplan-Meyer e analisadas por Log-rank (Mantel-Cox) não havendo diferença estatística quando comparada todas as condições.



Estudos de toxicidade aguda *in vivo* associadas a animais alternativos como *G. mellonella* vem demonstrando grande similaridade com resultados obtidos em camundongos (MCCANN; SANTOS; DA SILVA; ROMANOS *et al.*, 2012). No estudo conduzido por Pandolfi e colaboradores (2019), os derivados indólicos não causaram toxicidade nesses animais. Em suma, a maioria das larvas apresentou uma taxa de sobrevivência que variou de 70 a 100% após 72 h de exposição aos compostos em concentrações que variavam de 5 a 1000 mg/mL. Outros estudos com esses animais, mostram que a aplicação de baixas doses de nanopartículas de óxido de zinco foram eficazes contra *Candida albicans* e não foram letais em *G. mellonella* (XU; LI; PAN; ZHENG *et al.*, 2021). Já em estudos aplicando íons metálicos empregados no estudo da atividade antifúngica, também se mostram com baixa/nula toxicidade (FREI; KING; LOWE; CAIN *et al.*, 2021). No estudo de Alves e colaboradores (2021) com cinamaldeído, os autores demonstram que o composto foi atóxico em animais invertebrados e não apresentou efeitos genotóxicos, sendo um potencial candidato para o tratamento de infecções orais. Alguns autores realizaram testes de toxicidade utilizando *G. mellonella* e mamíferos, como camundongo e demonstraram alta correlação nos resultados de toxicidade entre os animais (KAVANAGH; SHEEHAN, 2018; MAGUIRE; DUGGAN; KAVANAGH, 2016; MCCANN; SANTOS; DA SILVA; ROMANOS *et al.*, 2012).

4.7. TOXICIDADE *in vivo* EM EMBRIÕES DE *Zebrafish*

Em relação aos embriões do peixe-zebra, dos parâmetros analisados, houve o fenômeno de coagulação, um indicador de toxicidade letal (**Figura 17C, E e F**) e retardo no desenvolvimento (**Fig. 17B**). O tempo de 72hpf (**Fig.18**) foi o mais crítico de exposição, no entanto, não houve significância estatística entre os tratamentos e o controle, mostrando que em ambos os grupos, houve embriões com desenvolvido comprometido.

Figura 17 - Imagens de embriões de *zebrafish* com 72 horas pós fertilização (hpf). **A**, **B** e **C** apresentam o grupo controle e as imagens **D**, **E** e **F** são o grupo tratado com o derivado de nitrofurano L7CF 166. As setas amarelas indicam um embrião com desenvolvimento normal para 72hpf. A seta vermelha indica um embrião com retardo no desenvolvimento e as setas azuis indicam embriões com coagulação.

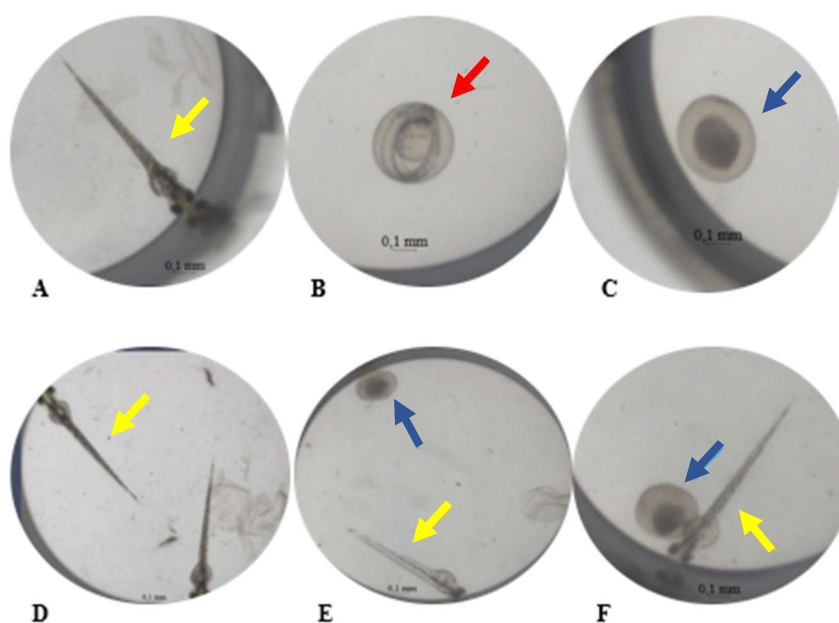
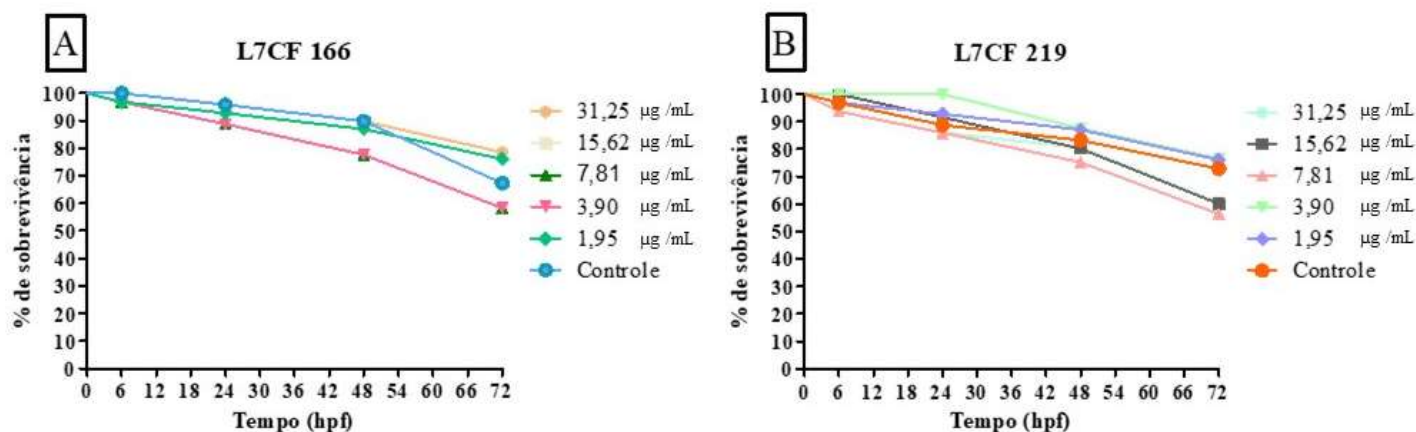


Figura 18 - Curva de sobrevivência por tempo dos embriões de *Zebrafish*. **A** – Curva referente ao derivado de nitrofurano L7CF 166 e **B** – curva referente ao derivado misto L7CF 219. As curvas de sobrevivência foram plotadas pelo método Kaplan-Meier e analisadas por Log-rank (Mantel-Cox) não havendo diferença estatística quando comparada todas as condições.



Ao correlacionar os experimentos realizados *in vivo*, nos animais *G. mellonella*, *C. elegans* e *Zebrafish*, nenhum dos compostos testados se mostrou tóxico para os animais, nas concentrações utilizadas.

No trabalho conduzido por Costa-Orlandi e colaboradores (2020) o protococatecuato de nonila em nanoemulsões não se mostrou tóxico em uma concentração de 125 µg/mL em embriões após 72 hpf. O mesmo, foi relatado por Singulani e colaboradores (2017), ao testarem derivados de ácido gálico incorporados em nanoestruturas. Portanto, por possuírem grande similaridade aos humanos, esse modelo animal, se tornou uma alternativa viável para reproduzir o perfil tóxico e teratogênico de compostos, moléculas e nanopartículas (COSTA-ORLANDI; SERAFIM-PINTO; DA SILVA; BILA *et al.*, 2020; SINGULANI; SCORZONI; GOMES; NAZARÉ *et al.*, 2017; SINGULANI; SCORZONI; LOURENCETTI; OLIVEIRA *et al.*, 2018).

4.8. TESTE DE SENSIBILIDADE FRENTE AOS BIOFILMES

Após a comprovação da sua potência e baixa toxicidade, os compostos foram testados contra biofilmes de *H. capsulatum* em estágio inicial e, maduros. Bem como em células planctônicas na mesma concentração utilizada para a formação dos biofilmes (5×10^6 céls/mL). Os fármacos anfotericina B e itraconazol foram utilizados. Os resultados mostraram

que apesar do biofilme ser comprovadamente um fenótipo de resistência, todos os compostos foram igualmente potentes nas células planctônicas e biofilmes apresentando concentração inibitória mínima igual ou duas vezes superior a CIM₅₀ da planctônica (**Tabela 8**). Além disso, foi verificado que o composto L7CF 197 foi mais potente na inibição da maturação dos biofilmes da cepa EH-315 com concentração inibitória mínima de 15,62 µg/mL quando comparado a sua ação na maturação do biofilme da cepa ATCC G217-B (62,5 µg/mL).

Ambas as cepas frente à anfotericina B apresentaram o mesmo perfil de atividade que o L7CF 166, L7CF 219 e L7CF197, com variação das CIM₅₀ de 0,5 e 2 µg/mL, na forma planctônica, biofilme inicial e biofilme maduro. O itraconazol inibiu as formas planctônicas a partir da concentração 1 µg/mL, em ambas as cepas. No entanto, este fármaco não apresentou nenhuma atividade anti-biofilme (CIM_{S50} ≥ 128 µg/mL)

Tabela 8 - Concentração inibitória mínima e concentração inibitória mínima séssil dos compostos L7CF 166, L7CF 219 e L7CF 197, contra a forma planctônica, biofilme inicial nas cepas EH315 e ATCC G217-B de *H. capsulatum*

	EH-315 (µg/mL)			ATCC G217-B (µg/mL)		
	Planctônica 5×10 ⁶ céls/mL	Biofilme inicial	Biofilme maduro	Planctônica 5×10 ⁶ céls/mL	Biofilme inicial	Biofilme maduro
	CIM ₅₀	CIM _{S50}	CIM _{S50}	CIM ₅₀	CIM _{S50}	CIM _{S50}
L7CF 166	7,81	15,62	15,62	7,81	3,9	7,81
L7CF 219	31,25	31,25	31,25	31,25	15,62	31,25
L7CF 197	7,81	7,81	15,62	31,25	31,25	62,5
AmB	0,5	0,25	1	2	4	4
ITZ	1	≥ 128	≥ 128	1	≥ 128	≥ 128

CIM₅₀ – concentração inibitória de 50% das células; CIM_{S50} – concentração inibitória séssil de 50% dos biofilmes; AmB – anfotericina B; ITZ – itraconazol

4.8.1. Microscopia confocal dos biofilmes para análise de espessura e viabilidade

As imagens dos biofilmes sem tratamento mostram uma comunidade coesa de espessura em torno de 200 μm e células ativas metabolicamente, porém, a sua taxa de metabolismo varia de alto (células coradas de vermelho) a moderado (acastanhado). Adicionalmente, os biofilmes apresentam regiões coradas em verde que correspondem às paredes celulares e material extracelular (Con-A) (**Figura 19**). Os biofilmes tratados, apresentaram pouca/ausência de células metabolicamente ativas, com FUN-1 amarelado e Con-A verde e grande redução na espessura do biofilme. Para o composto L7CF 166 apresentam uma espessura de aproximadamente 75 μm (**Figura 20A e 20D**) e L7CF 197 $\cong$ 50 μm (**Figura 20B e 20E**). O biofilme tratado com L7CF 219 apresentou uma redução na quantidade de células para a formação do biofilme (**Figura 20C e 20F**) e pouca atividade metabólica (amarelado).

Figura 19 - Imagem representativa de microscopia confocal do biofilme maduro sem tratamento de *H. capsulatum* EH-315 coradas com Concanavalin A - conjugado com Alexa flúor 488 (verde) e FUN-1 (vermelho). Em **A**, **B** e **C** vista do corte ortogonal dos biofilmes e **D**, **E** e **F** representação da imagem tridimensional para verificação da espessura e arquitetura. O biofilme apresenta grande quantidade de material extracelular e algumas hifas (**A**), além disso, alta atividade metabólica (**B** e **C**) e espessura em torno de 200 μm (**D**, **E** e **F**).

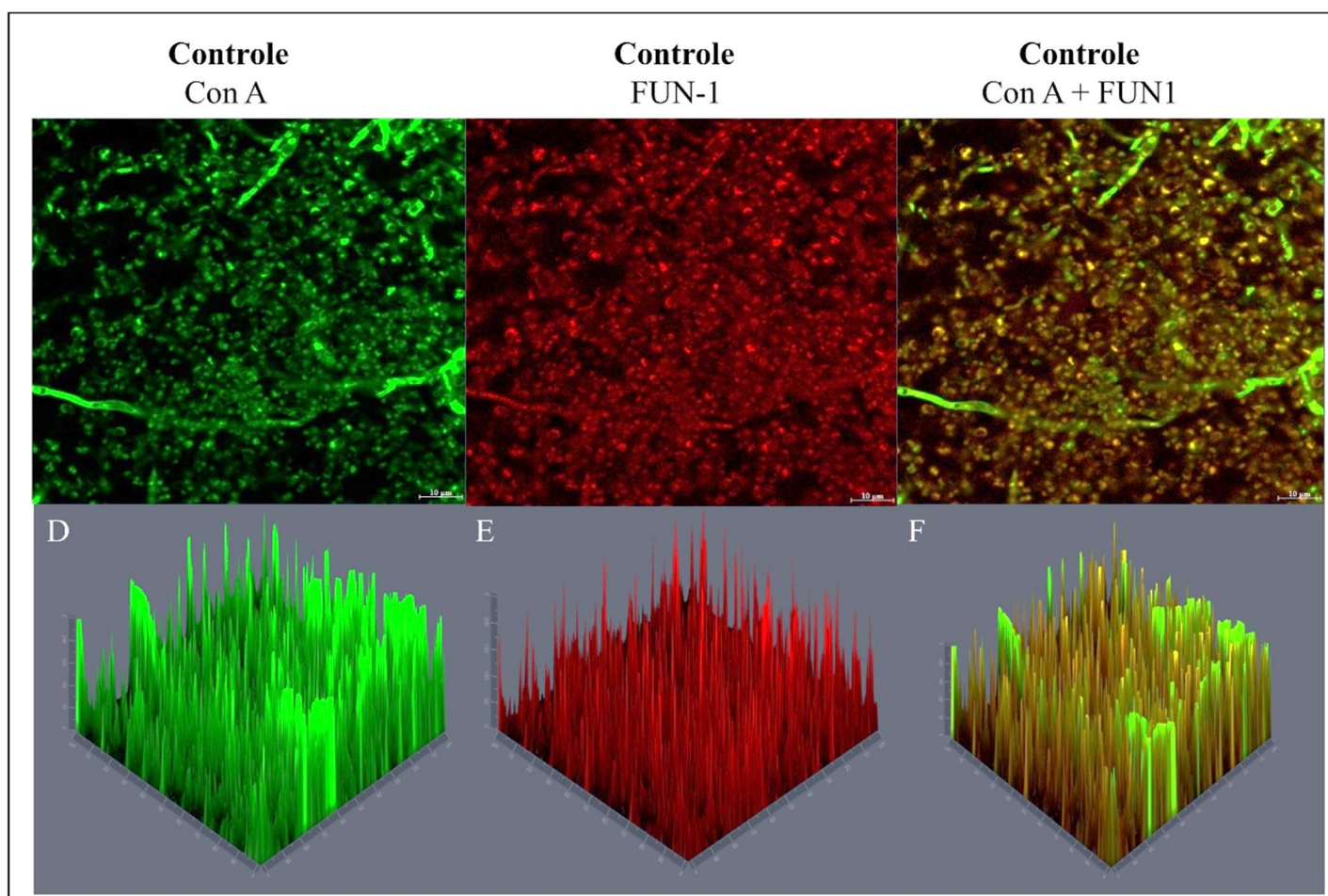
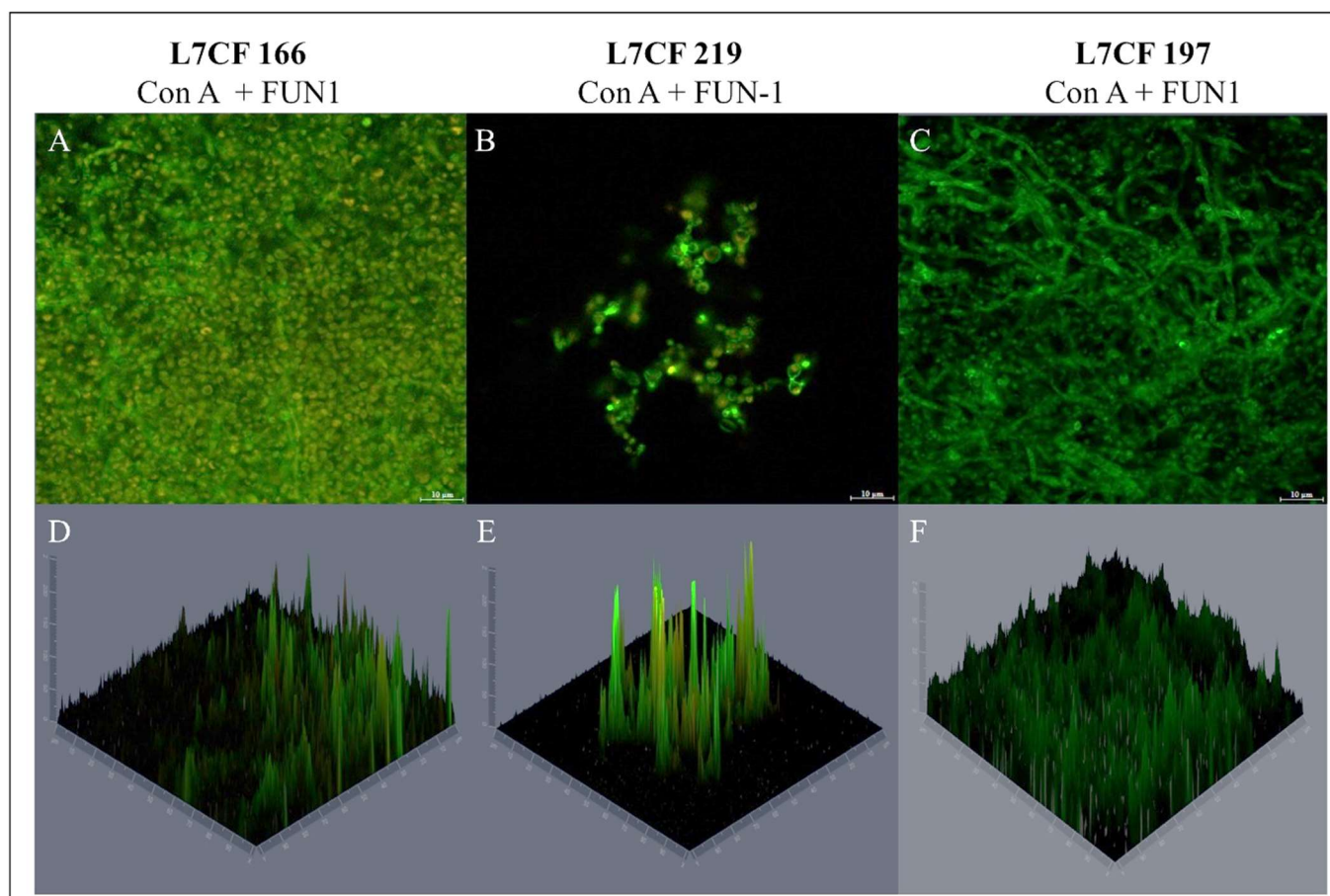


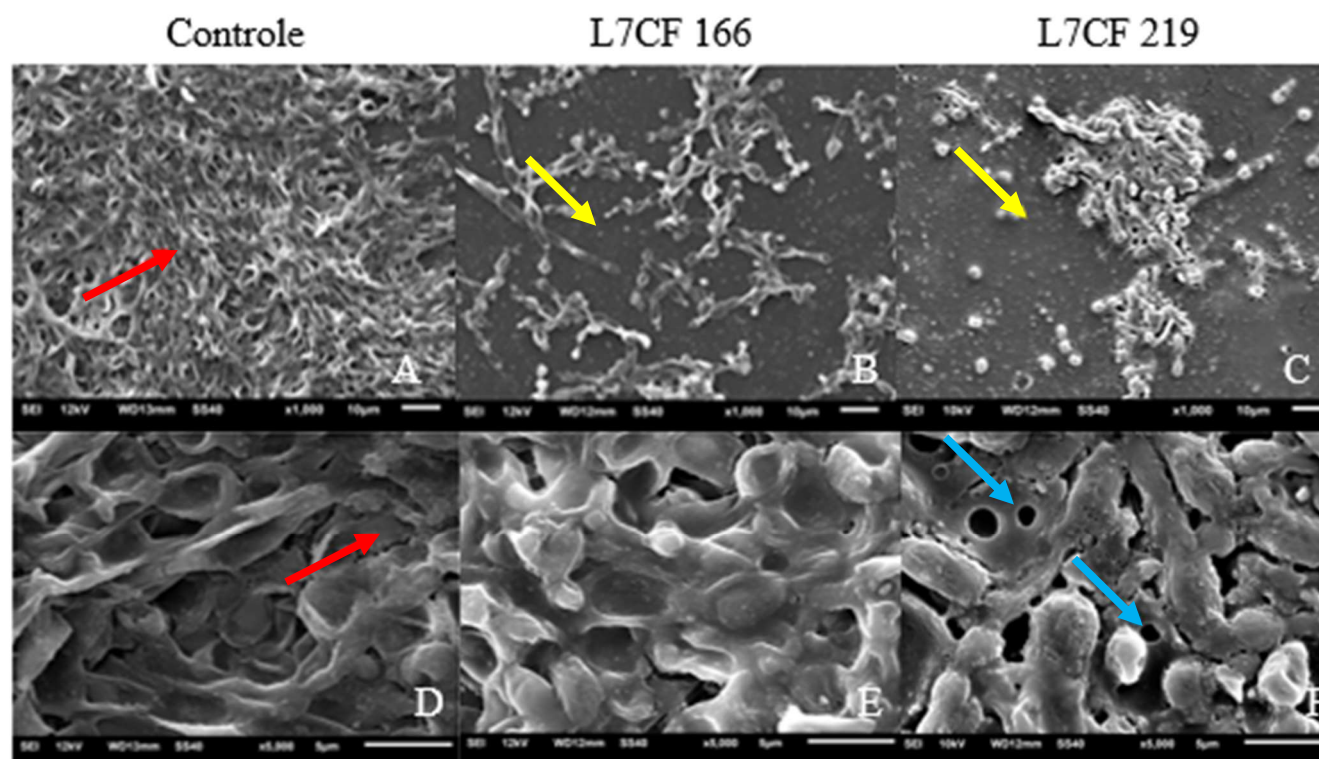
Figura 20 - Imagem representativa de microscopia confocal de *H. capsulatum* EH-315 tratado com L7CF 166 (A e D), L7CF 219 (B e E) e L7CF 197 (C e F) coradas com Concanavalin A - conjugado com Alexa fluor 488 e FUN-1. Em A, B e C visto do corte ortogonal dos biofilmes e D, E e F representação distribuição tridimensional dos biofilmes. As células tratadas com L7CF 166 (A), L7CF 219 (B) e L7CF 197 (C) apresentaram baixa atividade metabólica, com coloração amarelo esverdeado e uma redução na espessura do biofilme (D, E e F).



4.8.2. Análise topográfica dos biofilmes tratados por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Nas imagens de MEV é possível observar que o controle sem tratamento, apresenta um emaranhado de células, coberto por uma matriz extracelular (**Figura 21A a 21D**). No tratamento com os compostos L7CF 166 (**Fig. 21B**) e L7CF 219 (**Fig. 21C**) houve uma grande redução na quantidade de células, demonstrando a efetividade dos compostos para inibir biofilmes maduros. O composto L7CF 219 (**Fig. 21F**), foi capaz de provocar, pequenas falhas no conteúdo extracelular da matriz dos biofilmes de *Histoplasma*. Além disso, devido à grande inibição (extinção) e as consecutivas lavagens que a técnica requer, não foi possível obtermos imagens dos biofilmes tratados com o composto L7CF 197.

Figura 21 - Imagem representativa de microscopia de eletrônica de varredura de biofilmes de *H. capsulatum* EH-315 tratado com L7CF 166 e L7CF 219. A comunidade controle (A e D), apresentaram grande quantidade de células, além da presença de matriz extracelular (seta vermelha). Já os tratamentos com L7CF 166 (B) e L7CF 219 (C) foram capazes de causar uma grande inibição na maturação dos biofilmes (seta amarela). Além disso, o composto L7CF 219 (F) foi capaz de ocasionar pequenos buracos dentro das células (seta azul).



Os derivados de nitrofurano e indólicos apresentaram uma excelente atividade contra forma planctônica como na de biofilme de *H. capsulatum*. Os resultados obtidos por XTT (atividade metabólica) se corroboram com os obtidos por microscopia confocal e de varredura, mostrando que o derivado de nitrofurano L7CF 166 como o derivado indólico L7CF197 foram capazes de ocasionar uma redução da atividade metabólica em 50% na concentração de 15,62 µg/mL, resultando em redução na espessura do biofilme e baixa atividade metabólica, como observado nas imagens de microscopia. Para o derivado misto L7CF 219 foi observada uma redução da atividade metabólica na concentração de 31,25 µg/mL, além disso se verificou uma redução na quantidade de células no biofilme e na sua espessura. Esse composto, ocasionou pequenos poros nas células fúngica, isso pode estar relacionado ao seu mecanismo de ação, que estudos tem mostrado uma redução no ergosterol.

Os biofilmes são estruturas de difícil erradicação, pois além de possuírem uma matriz extracelular complexa, já se tem relatos de mecanismos de resistência aos antimicrobianos (DEL POZO, 2021; SAMROT; ABUBAKAR MOHAMED; FARADJEVA; SI JIE *et al.*, 2021). Em relação ao tratamento dos biofilmes formados por *H. capsulatum* poucos estudos vêm sendo realizados. Brilhante e colaboradores (2015), demonstraram que para uma redução do biofilme em aproximadamente 95% foi necessário concentrações 100 vezes maiores que a CIM, com os fármacos anfotericina B, itraconazol e com farnesol. Entretanto, quando essa concentração foi reduzida para 1,25× CIM, a redução do biofilme para a anfotericina B foi de 15%, itraconazol 20% e o farnesol de 96%. Já no estudo conduzido por Cordeiro e colaboradores (2014), os autores demonstraram que o tratamento dos biofilmes maduros com derivados de isoniazida em concentrações 100, 50 e 25 vezes maiores que a CIM obtiveram uma redução de 50% da atividade metabólica dos biofilmes maduros. Quando combinaram

derivados de isoniazida com anfotericina B, obtiveram uma redução de até 80% nos biofilmes maduros.

Os derivados de nitrofurano, bem como os derivados indólicos já foram descritos na literatura como potentes inibidores de biofilme. No estudo conduzido Marcelino (2018), demonstrou que os derivados de nitrofurano, tiveram eficiente atividade anti-biofilme contra espécies de *Candida* na concentração de 62,5 µg/mL. Esses dados corroboraram com os obtidos por De Vita e colaboradores (2016) com relação a eficácia em biofilmes maduros. Já Pandolfi e colaboradores (2019) ao testar derivados indólicos contra *C. albicans* mostraram inibição de 50% do biofilme maduro na concentração de 2 µg/mL para os compostos testados.

Apesar dos excelentes resultados relacionados à eficácia da anfotericina B, trata-se de um fármaco com efeitos adversos consideravelmente tóxicos, o que muitas vezes torna o tratamento inviável, já que a maioria dos indivíduos com histoplasmose possuem um sistema imunológico debilitado. Há estudos que mostram uma taxa de mortalidade de aproximadamente 50% em indivíduos com AIDS e histoplasmose concomitantes, devido à insuficiência renal provocada pelo uso da AmB. Independentemente de ser um fármaco efetivo, é necessário o estudo de novos compostos, que não causem outras comorbidades aos pacientes (DE AGUIAR CORDEIRO; DE FARIAS MARQUES; DE AGUIAR CORDEIRO; DA SILVA *et al.*, 2014; PEIGNE; LIDOVE; CHAUCHARD; ROUSSEAU *et al.*, 2006).

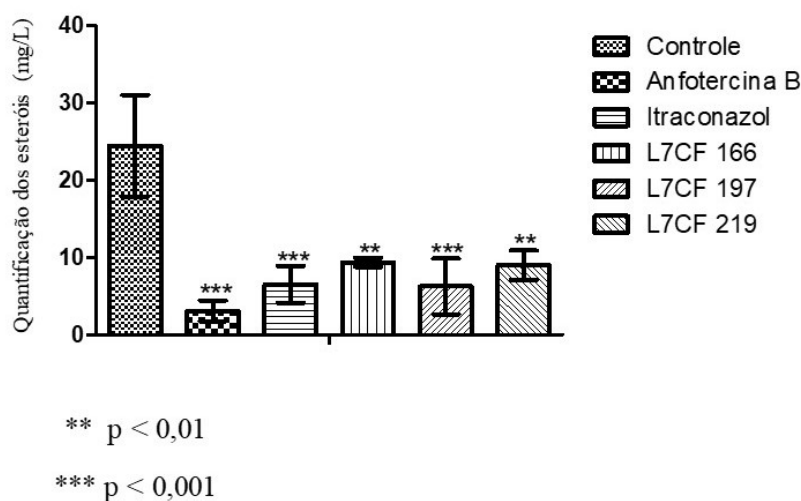
Como já é relatado, alguns biofilmes apresentam concentrações de inibição até 100 vezes maiores que a CIM no biofilme maduro. Para algumas espécies de *Candida*, *Cryptococcus* e *Aspergillus*, os azóis, como o itraconazol não são capazes de causar expressivas inibições nos biofilmes maduros (FINKEL; MITCHELL, 2011; MOWAT; WILLIAMS; JONES; MCCHLERY *et al.*, 2009; WU; WANG; LIU; DONG *et al.*, 2017).

4.9.MECANISMO DE AÇÃO

4.9.1. Dosagem de ergosterol

Os esteróis da membrana fúngica foram quantificados após o tratamento de *H. capsulatum* com três compostos, L7CF 166, L7CF 197 e L7CF 219. O tratamento com anfotericina B, itraconazol e o fungo sem tratamento foram utilizados como controle. Os resultados mostraram que o tratamento com os três compostos L7CF 166 ($p < 0,01$); L7CF 197 ($p < 0,001$) e L7CF 219 ($p < 0,01$), reduziram a quantidade de ergosterol da membrana fúngica quando comparado ao controle sem tratamento. Os fármacos anfotericina B e itraconazol também reduziram a quantidade do ergosterol extraído, como esperado ($p < 0,001$) (**Figura 22**). Estes resultados nos permitem sugerir que os compostos podem atuar no ergosterol, seja na via da biossíntese do ergosterol ou por ligação ao mesmo.

Figura 22 - Quantificação do ergosterol extraído do fungo *H. capsulatum* EH-315 tratado com L7CF 166, L7CF 197, L7CF 219, itraconazol e anfotericina B. Todos os tratamentos causaram redução das quantidades de esteróis extraídas da membrana. Indicando possível alvo no ergosterol ou na sua cadeia de síntese. Valores expressos em média e desvio padrão. As barras de erro indicam desvios padrão. Os valores de p (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) foram calculados pela análise *One Way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni comparando todas as condições.



Estudo conduzido por Kamal e colaboradores (2015), demonstrou que o tratamento com derivado de nitrofurano 9f reduziu a quantidade de ergosterol da membrana de *Candida parapsilosis*. Gerpe e colaboradores (2009) ao testar derivados de nitrofurano contra *Trypanossoma cruzi*, mostraram que o ergosterol foi completamente esgotado no parasita. Uma das hipóteses levantadas foi que os compostos se acumulam na célula e interferem na via da síntese do ergosterol, inibindo a enzima esqualeno epoxidase.

Com relação aos indólicos, no estudo conduzido por Pagniez e colaboradores (2020), mostraram que o tratamento de *C. albicans* com um derivado indol-triazol também reduziu o ergosterol da membrana. Além disso, os autores demonstraram que o composto bloqueou a CYP51, impedindo a transformação do lanosterol em ergosterol. Outro estudo levantou a hipótese que esses compostos podem inibir a biossíntese de ergosterol atuando na Erg 11 (POOJA; PRASHER; SINGH; PAWAR *et al.*, 2014).

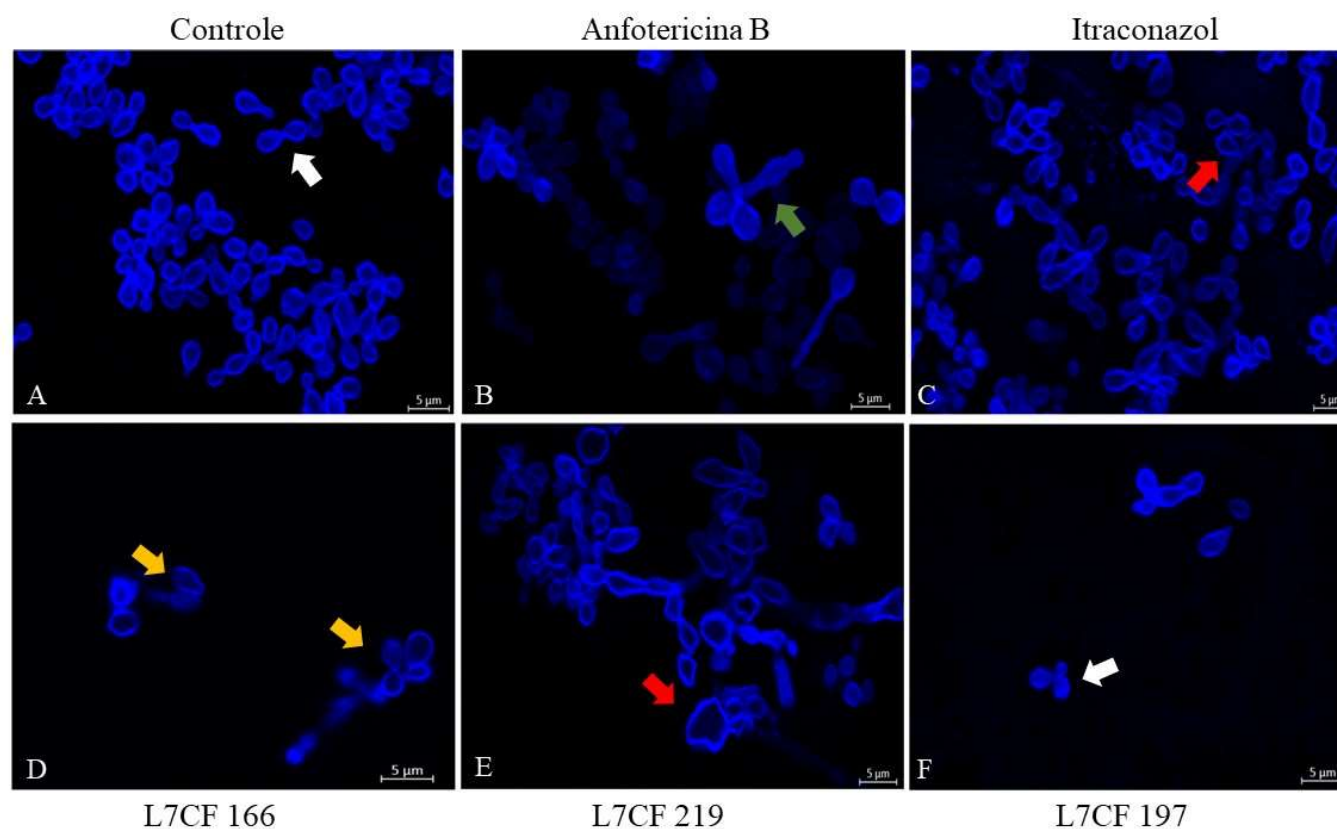
A anfotericina B tem como seu principal mecanismos de ação a ligação ao ergosterol, resultando em um complexo que ocasiona a formação de poros na membrana e leva ao extravasamento de íons (BARCHIESI; SCHIMIZZI; CASELLI; NOVELLI *et al.*, 2000; MESA-ARANGO; TREVIJANO-CONTADOR; ROMÁN; SÁNCHEZ-FRESNEDA *et al.*,

2014; SCORZONI; DE PAULA E SILVA; MARCOS; ASSATO *et al.*, 2017). O itraconazol impede a conversão do lanosterol em ergosterol, inibindo a síntese do mesmo (KATHIRAVAN; SALAKE; CHOTHE; DUDHE *et al.*, 2012; SCORZONI; DE PAULA E SILVA; MARCOS; ASSATO *et al.*, 2017).

4.9.2. Análise do dano de parede por coloração com *Calcofluor White* e microscopia confocal

A fim de verificar possíveis danos à parede celular de *H. capsulatum*, foi utilizado o fluoróforo *Calcofluor White*, que cora a quitina e celulose da parede celular (HARRINGTON; HAGEAGE, 2003). As imagens obtidas por microscopia confocal evidenciaram que o tratamento com o composto L7CF 166 provocou descontinuidade da coloração na parede celular (**Fig. 23D**) em vários pontos das lâminas. O tratamento com o composto L7CF 219 aparentemente não provocou alterações na parede, mas causou deformidade nas leveduras, como aumento de tamanho e irregularidade no seu formato (**Fig. 23E**). Por fim, o composto L7CF 197 não provocou alteração estrutural e/ou dano (**Fig. 23F**).

Figura 23 - Imagem representativa de microscopia de varredura a laser confocal de *H. capsulatum* EH-315 tratado com L7CF 166, L7CF 219, L7CF 197, itraconazol e anfotericina B e, coradas com *calcofluor white*. As células tratadas com L7CF 166 (**D**) mostraram pequenas falhas na parede celular (seta laranja). Já as células tratadas com anfotericina B (**B**) apresentaram prolongamentos (seta verde). Itraconazol (**C**) e L7CF 219 (**E**) causaram irregularidades no formato das células (setas vermelhas). Tanto as células sem tratamento (**A**) quanto as tratadas com o composto L7CF 197 (**F**) apresentaram-se com parede contínua e regular (seta branca). Os ensaios foram conduzidos em triplicata e em dois experimentos independentes.



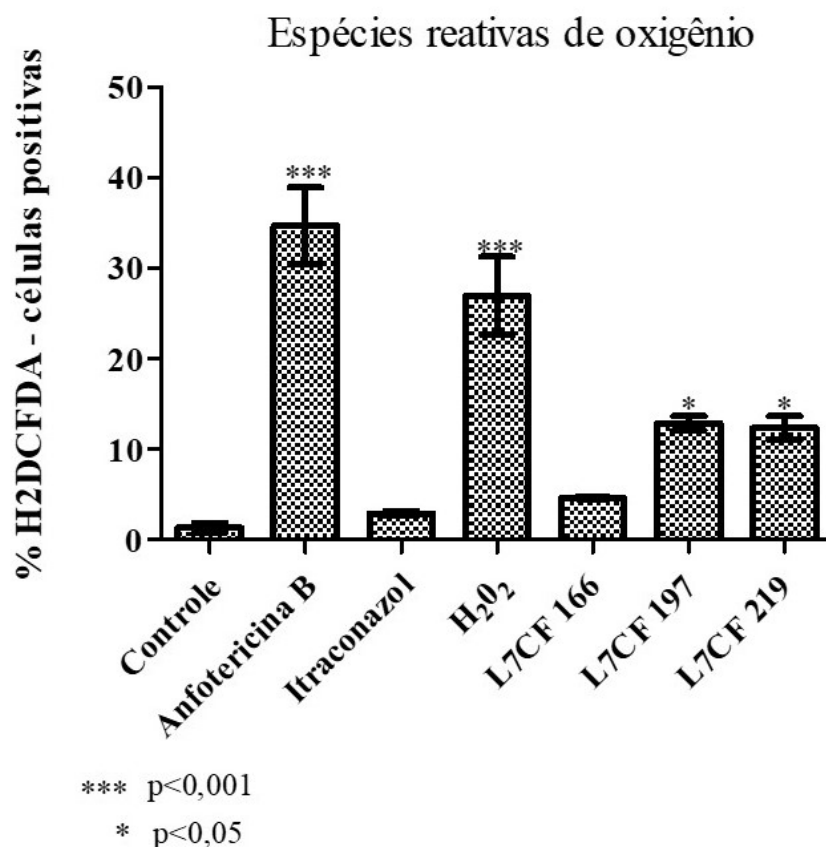
Pooja e colaboradores (2014), ao estudarem os danos causados pelo tratamento das leveduras de *C. albicans* com derivados indólicos, não verificaram alteração na parede celular. Os autores utilizaram a mesma técnica de coloração com o fluoróforo *Calcofluor White*.

As paredes celulares fúngicas são estruturalmente fortes, rígidas e ao mesmo tempo flexíveis. Dentre suas funções, está a de ser resistentes para suportar os efeitos adversos do ambiente e, ao mesmo tempo maleável, devido à pressão osmótica exercida pela célula (GOW; LATGE; MUNRO; HEITMAN, 2017). A parede celular da levedura de *H. capsulatum* é composta por glucose, manose, galactose, alfa e beta glucana, quitina e em menor quantidade, lipídeos e proteínas (GUIMARÃES; DE CERQUEIRA; NOSANCHUK, 2011; RAPPLEYE; EISSENBERG; GOLDMAN, 2007).

4.9.3. Quantificação das espécies reativas de oxigênio (EROs)

Os resultados da quantificação de EROs mostraram que os tratamentos com os derivados indólico (L7CF 197) e o nitrofurano/indólico (L7CF 219) causaram um aumento significativo na produção de espécies reativas de oxigênio ($p < 0,05$). Surpreendentemente, o tratamento com a AmB também propiciou a formação de EROs, em níveis mais elevados que o peróxido de hidrogênio, utilizado como controle positivo ($p < 0,05$). O itraconazol não induziu a geração de EROs (**Figura 24**).

Figura 24 - Medição da produção de EROs após tratamento de *H. capsulatum* EH-315 com L7CF 166, 197, 219, anfotericina B, itraconazol e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O fármaco anfotericina B, peróxido de hidrogênio e os compostos L7CF 197 e L7CF 219 induziram a formação de EROs quando comparados ao controle sem tratamento. O tratamento com itraconazol não induziu a formação de EROs quando comparado ao controle. Valores expressos em média e desvio padrão. As barras de erro indicam desvios padrão. Os valores de p (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$) foram calculados pela análise *One Way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni comparando todas as condições.



Um estudo conduzido por Gallardo-Garrido e colaboradores (2020), evidencia que a geração de EROs em derivados de nitrofuranos é independente do grupamento nitro, e que

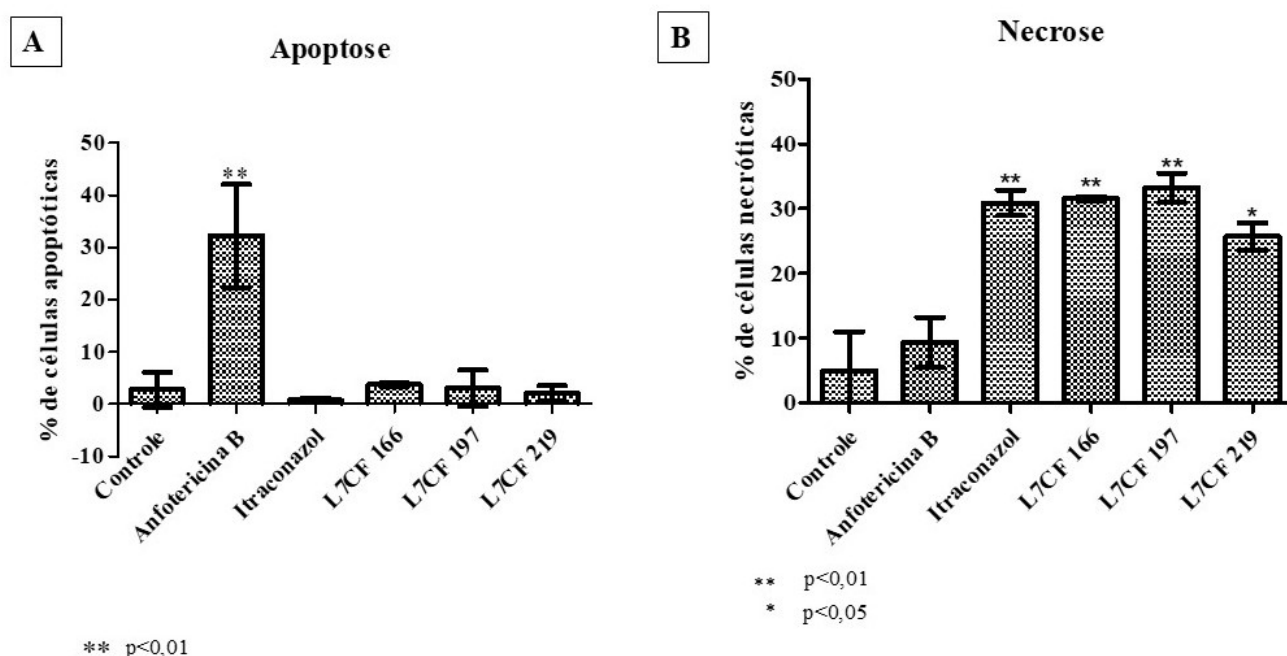
diferentes compostos podem ter diferentes comportamentos quanto à produção de espécies reativas de oxigênio. Hwang e colaboradores (2011), relataram a produção de EROs após o tratamento de *C. albicans* com um derivado indólico, corroborando com o presente trabalho.

Com relação à AmB, alguns estudos na literatura evidenciam a produção de EROs no tratamento de *C. neoformans* (MESA-ARANGO; TREVIJANO-CONTADOR; ROMÁN; SÁNCHEZ-FRESNEDA *et al.*, 2014; SINGULANI; GALEANE; RAMOS; GOMES *et al.*, 2019) e em dermatófitos (BILA; COSTA-ORLANDI; VASO; BONATTI *et al.*, 2021), reforçando as diversas estratégias desse fármaco em erradicar a célula fúngica.

4.9.4. Ensaio de necrose/apoptose

Os resultados do ensaio de necrose/apoptose mostraram que todos os compostos (L7CF 166, 197 e 219), além do fármaco itraconazol ($p < 0,05$; $p < 0,01$), induziram a morte celular por via necrótica, não havendo a indução significativa de morte por apoptose. Já a AmB ($p < 0,01$) induziu morte celular por apoptose (**Figura 25**).

Figura 25 - Mecanismo de morte celular induzida por apoptose (A) e necrose (B) após o tratamento de *H. capsulatum* EH-315 com anfotericina B (AmB), itraconazol, L7CF 166, 197 e 219. Todos os compostos testados induziram morte por necrose, em comparação com o controle não tratado. Apenas a AmB induziu a morte por via apoptótica. Valores expressos em média e desvio padrão. As barras de erro indicam desvios padrão. Os valores de p (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) foram calculados pela análise *One Way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni comparando todas as condições.



Existem dois caminhos de morte celular: o de apoptose, também chamado de morte programada, que promove um estresse nas células e ativa as caspases e requer energia (ELMORE, 2007); e de necrose que não requer a utilização de energia (PROSKURYAKOV; GABAI, 2010; TOWER, 2015).

A morte celular por apoptose foi descrita por Kerr e colaboradores em 1972 (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972). É uma morte celular genética, biologicamente programada, sem

perda da integridade da membrana celular e compartilhada por vários organismos. Este tipo de morte pode ser provocado por uma variedade de fatores como deficiência de hormônios, citocinas, ativação de receptores de morte, por agentes virais, químicos, físicos, entre outros (ABEDIN; WANG; MCDONNELL; LEHMANN *et al.*, 2007). A morte celular necrótica, é ocasionada tanto por fatores físicos como químicos. Ela ocorre de forma acidental e causa interrupção dos processos celulares, como: alteração na membrana celular, perda da capacidade de multiplicação e diminuição no metabolismo. Provocando uma instabilidade na homeostase celular e consequentemente na sobrevivência dessas células. Por conta disso, esse tipo de morte celular, ocasiona alterações irreversíveis na célula (ABEDIN; WANG; MCDONNELL; LEHMANN *et al.*, 2007; BRÖKER; KRUYT; GIACCONE, 2005).

Um dos ensaios mais utilizados para marcação de morte celular por necrose/apoptose é através da combinação de Anexina V e IP. As células necróticas se apresentam positivas somente para o IP, enquanto, as células em apoptose inicial (membrana íntegra), positivas somente para Anexina V, e as células em apoptose tardia ou necrose (dupla marcação), além das células viáveis sem marcação (CARVALHO *et al.*, 2010).

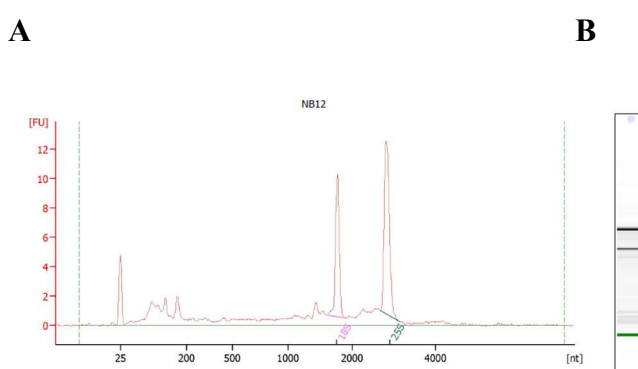
4.9.5. Análise do nível de expressão gênica

Os ensaios de quantificação do RNA mostraram que todas as amostras analisadas tinham quantidades suficientes de RNA, que variaram de 85 a 504,84 ng/μL. Além disso, a razão A260/280, que confirma a pureza das amostras, ficou entre 2,04 a 2,19. Wilfinger e colaboradores (1997), consideram amostras ideais, aquelas que contenham quantidade de RNA acima de 50 ng/μL com grau de pureza entre 1,7 e 2,2 para absorvância entre 260/280.

Com relação à integridade, as amostras apresentaram uma média de número de integridade do RNA (RIN) de 7, ideal para os ensaios de PCR. Além disso, no gel virtual observou-se as duas bandas, referentes aos picos das subunidades ribossômicas 18S e 28S,

conforme exemplo da **figura 26**. Os valores de RIN variam de 1 a 10 na escala de qualidade (sendo 10 o melhor) (IMBEAUD; GRAUDENS; BOULANGER; BARLET *et al.*, 2005).

Figura 26 - Imagem representativa de um eletroferograma com o RIN (A) e o gel virtual (B) de uma das amostras controle. O RIN apresenta o pico 18S e 28S, assim como o gel, apresenta as duas bandas ribossomais correspondentes e não há arraste no RNA.



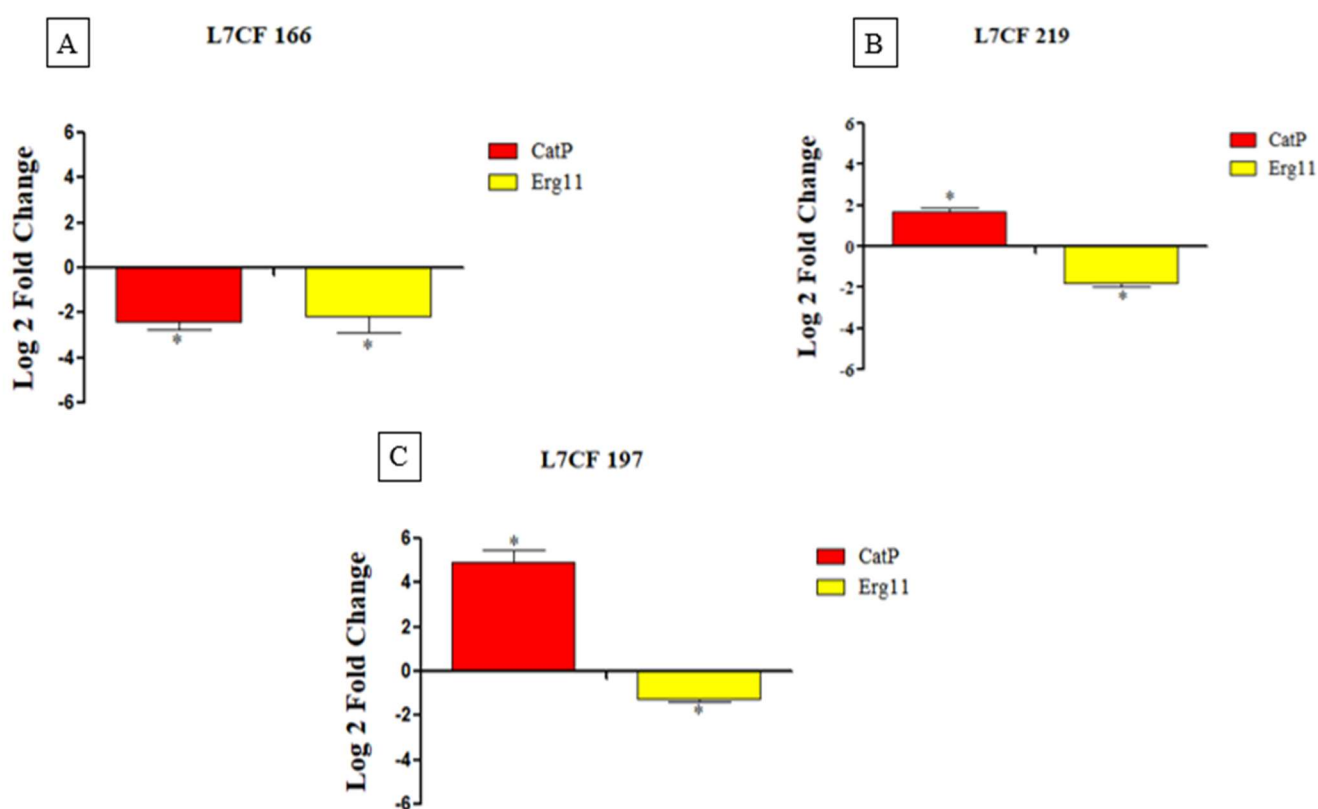
Após a obtenção dos cDNAs, os primers foram validados. Todos apresentaram apenas um pico na curva de melting e eficiência entre 90 e 120%. O gene *Erg11a*, está relacionado a biossíntese do ergosterol e trata-se de um homólogo do gene *ERG11*, responsável principalmente por codificar a enzima 14- α -dimetilase que transforma o lanosterol em ergosterol (BLANCETT; RUNGE; REYES; KENNEDY *et al.*, 2020; BLOSSER; CRAMER, 2012; DUBOIS; SMULIAN, 2016; OSMAN MOHAMED; SULIMAN MOHAMED; ABDELRAHMAN HUSSAIN; FATAHALRAHMAN AHMED, 2021). Os outros dois genes validados foram o *CatB*, que tem um peso molecular de 90 kDa e está presente em leveduras de *H. capsulatum*, considerado um gene constitutivo (GUIMARÃES; HAMILTON; DE; NOSANCHUK *et al.*, 2008; HOLBROOK; SMOLNYCKI; YOUSEFF; RAPPLEYE, 2013; JOHNSON; KLOTZ; YORK; KRUFTE *et al.*, 2002; PINE; MALCOLM; GROSS; GRAY, 1978; ZANCOPÉ-OLIVEIRA; REISS E FAU - LOTT; LOTT TJ FAU - MAYER; MAYER

LW FAU - DEEPE *et al.*, 1999). Já a CatP é uma catalase de 60 kDa presente quando há estresse oxidativo (HOLBROOK; SMOLNYCKI; YOUSEFF; RAPPLEYE, 2013; PINE; MALCOLM; GROSS; GRAY, 1978).

- Método do Ct Comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

Para as análises do método comparativo, foi utilizado o gene endógeno CatB como normalizador e controle sem tratamento como referência. As análises mostraram que as células tratadas com o composto L7CF 166, tiveram uma repressão do gene Erg11 ($p < 0,05$) (**Fig. 27A**). O mesmo ocorreu para as células tratadas com L7CF 219 (**Fig. 27B**) e L7CF 197 (**Fig. 27C**), ($p < 0,05$). Para a catalase CatP, as células tratadas com o composto L7CF 166, foram induzidas ($p < 0,05$) (**Fig. 27C**), enquanto, as células tratadas com L7CF 197 e L7CF 219, foram reprimidas (**Fig. 27 A e B**).

Figura 27 - Níveis de expressão relativa dos genes CatP e Erg 11 representados por *Log₂Fold change* na cepa de EH-315 tratada com L7CF 166 (A), L7CF 219 (B) e L7CF 197 (C), em comparação ao controle sem tratamento. A significância estatística foi determinada por teste t e indicada por asteriscos: *p < 0,05.



Após os resultados da expressão gênica nota-se que todos os testes relacionados ao mecanismo de ação se complementam. Todos os compostos foram capazes de reduzir o ergosterol da membrana tanto pelos testes bioquímicos, quanto por PCR em tempo real. Esses resultados comprovam que os derivados de nitrofurano, o indólico e o misto, têm um efeito na

biossíntese do ergosterol, já que o gene *Erg11*, está relacionado a codificação da enzima lanosterol 14 α -demetilase que transforma o lanoesterol em ergosterol (BLANCETT; RUNGE; REYES; KENNEDY *et al.*, 2020; POOJA; PRASHER; SINGH; PAWAR *et al.*, 2014; SCORZONI; DE PAULA E SILVA; MARCOS; ASSATO *et al.*, 2017).

Com relação ao gene que codifica a Catalase P (CatP), o tratamento com os compostos L7CF 219 e L7CF 197 fez com que a sua expressão fosse induzida. Já o tratamento com L7CF 166, reprimiu expressão do mesmo gene. Esses resultados corroboram com os observados nos testes bioquímicos nos quais, os compostos L7CF 219 e L7CF 197 induziram a produção EROs, enquanto o L7CF 166 não induziu a produção de EROs. De acordo com um estudo publicado por Blancett e colaboradores (2021), a CatP aumenta sua expressão quando há um aumento de EROs intracelular para eliminá-los mais rapidamente. Portanto, podemos verificar que os resultados são similares, e a indução do gene, é capaz de liberar EROs, como uma forma de defesa da célula fúngica.

4.10. ESTABELECIMENTO DA INFECÇÃO NOS CULTIVOS TRIDIMENSIONAIS POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

As figuras **28**, **29**, **30** e **31**, representam a infecção dos esferoides tanto pela forma planctônica como de biofilme. O fungo foi capaz de infectar os esferoides na sua forma planctônica (**Fig. 28**) e no estágio de biofilme maduro (**Fig. 29**). Nas imagens, observa-se uma homogeneidade na infecção, onde todo o cultivo 3D foi tomado pelo fungo marcado com FITC (verde). As figuras **30** e **31**, mostram as marcações realizadas tanto nas células originárias dos mamíferos como as células fúngicas. A **Fig. 30**, representa a infecção ocasionado pela forma planctônica do fungo com 24h, na **Fig. 30A** temos a marcação do núcleo da célula de mamífero (azul), **Fig. 30B**, temos a marcação fúngica (verde), **Fig. 30C** a marcação do citoplasma da célula pulmonar (vermelho), **Fig. 30D** a sobreposição apresenta todas as

marcações, assim como a **Fig. 30E**, com a barra de profundidade. Na **Fig. 31**, realizou-se as mesmas marcações que para a **Fig. 30**, no entanto, os esferoides foram infectados com biofilme em estágio maduro.

Figura 28 – Cultivo tridimensional (3D) infectado com a forma planctônica de *H. capsulatum*. **A**- Marcação do fungo com FITC (verde); **B**- as barras laterais mostram a homogeneidade da infecção, que se espalhou pelas células do cultivo 3D.

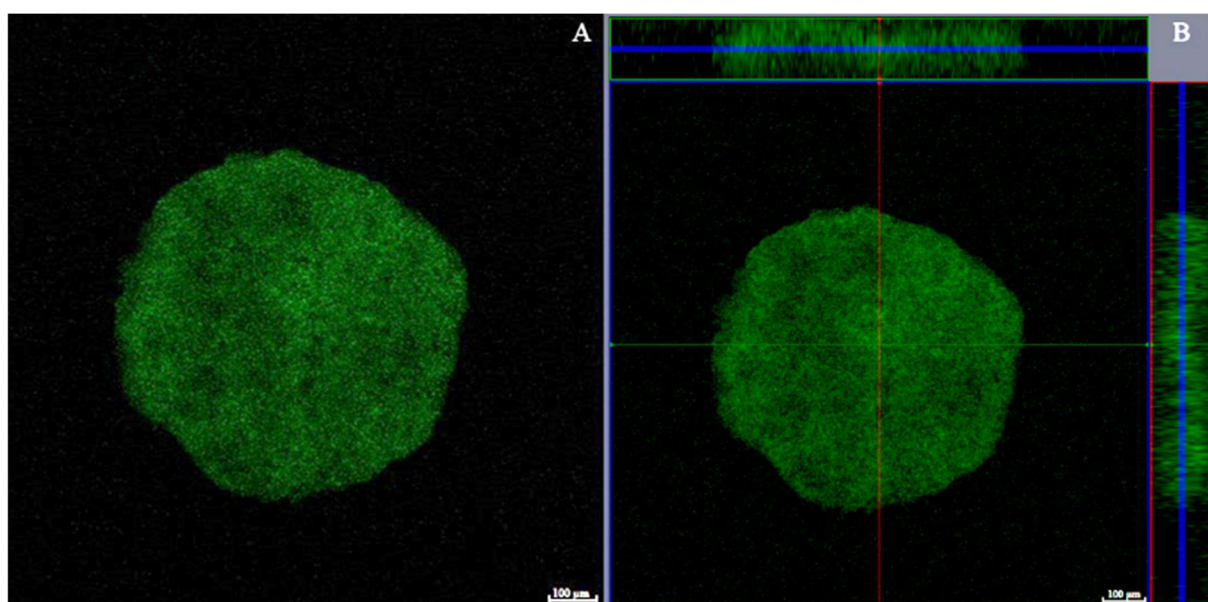


Figura 29 - Cultivo tridimensional (3D) infectado com o estágio maduro do biofilme de *H. capsulatum*. **A**- Marcação do fungo com FITC (verde); **B**- as barras laterais mostram a homogeneidade da infecção, que se espalhou pelas células do cultivo 3D.

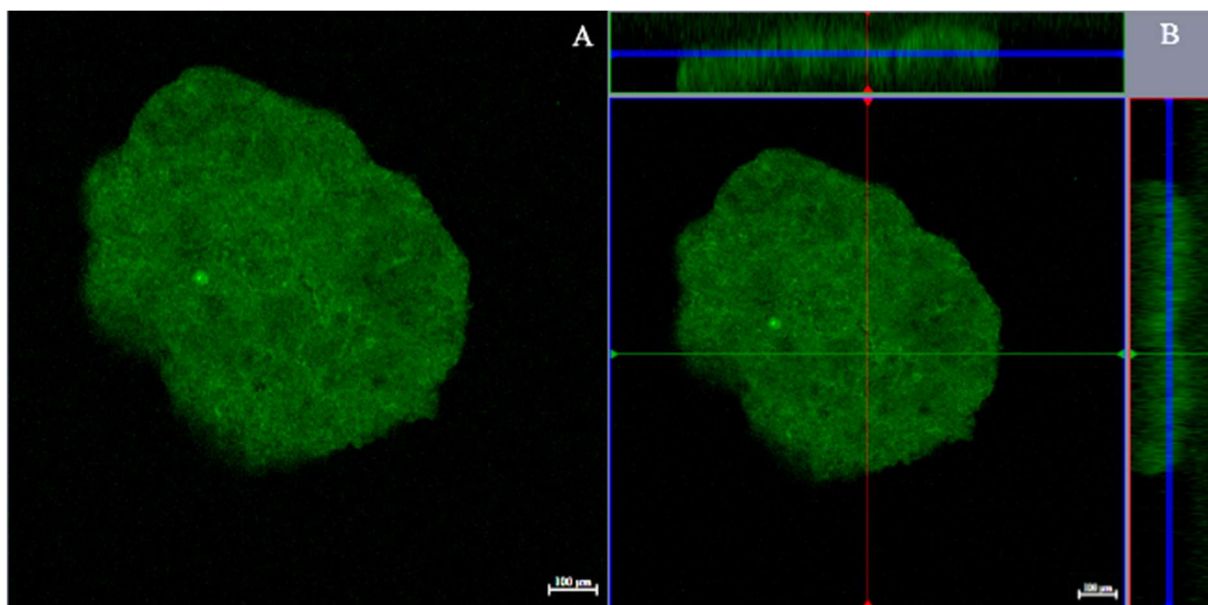


Figura 30 - Esferoides das linhagens A549 e MRC-5 infectados com a forma planctônica de *H. capsulatum*. **A** – Marcação do núcleo da célula pulmonar; **B**- marcação do fungo no interior dos esferoides; **C** – marcação do citoplasma da célula pulmonar; **D** – merge das marcações; **E** – merge com a barra de profundidade.

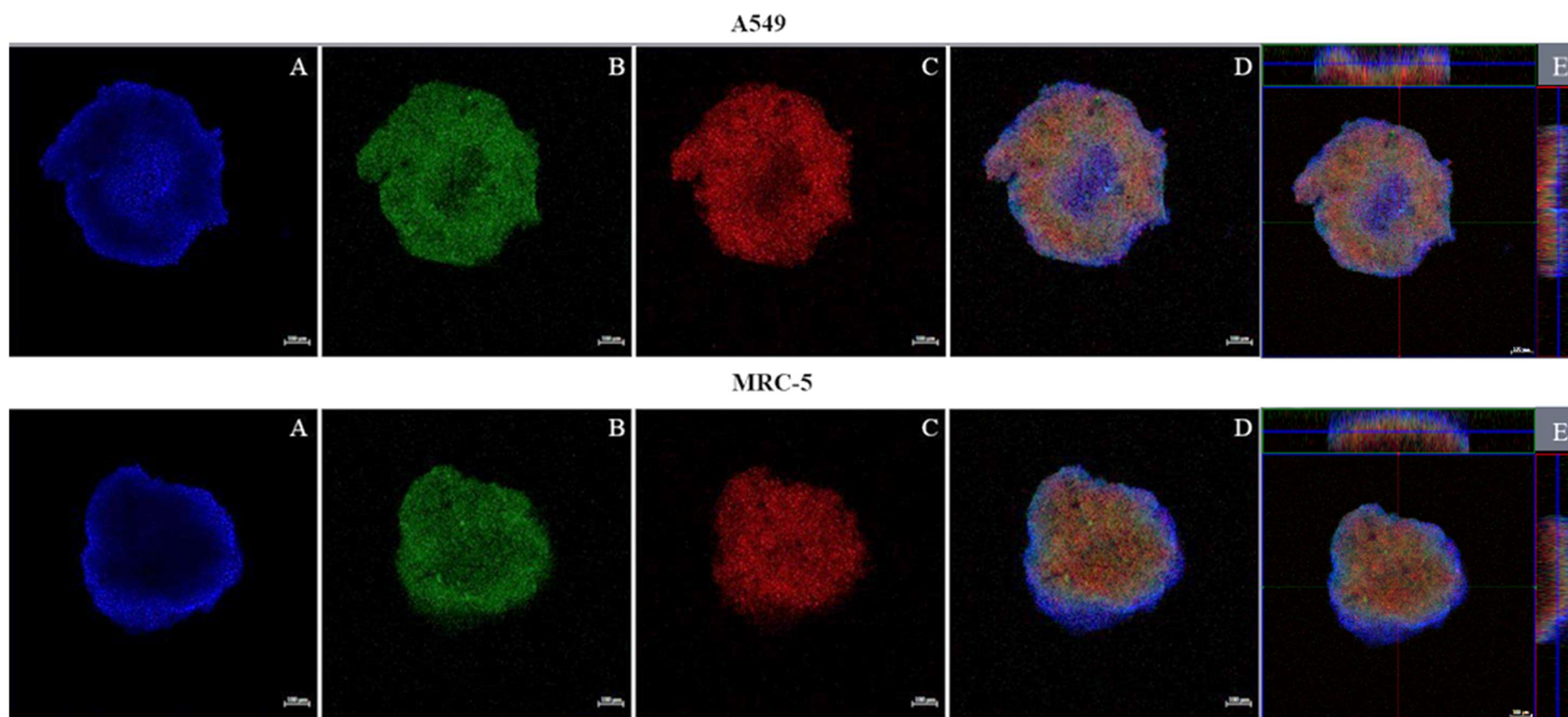
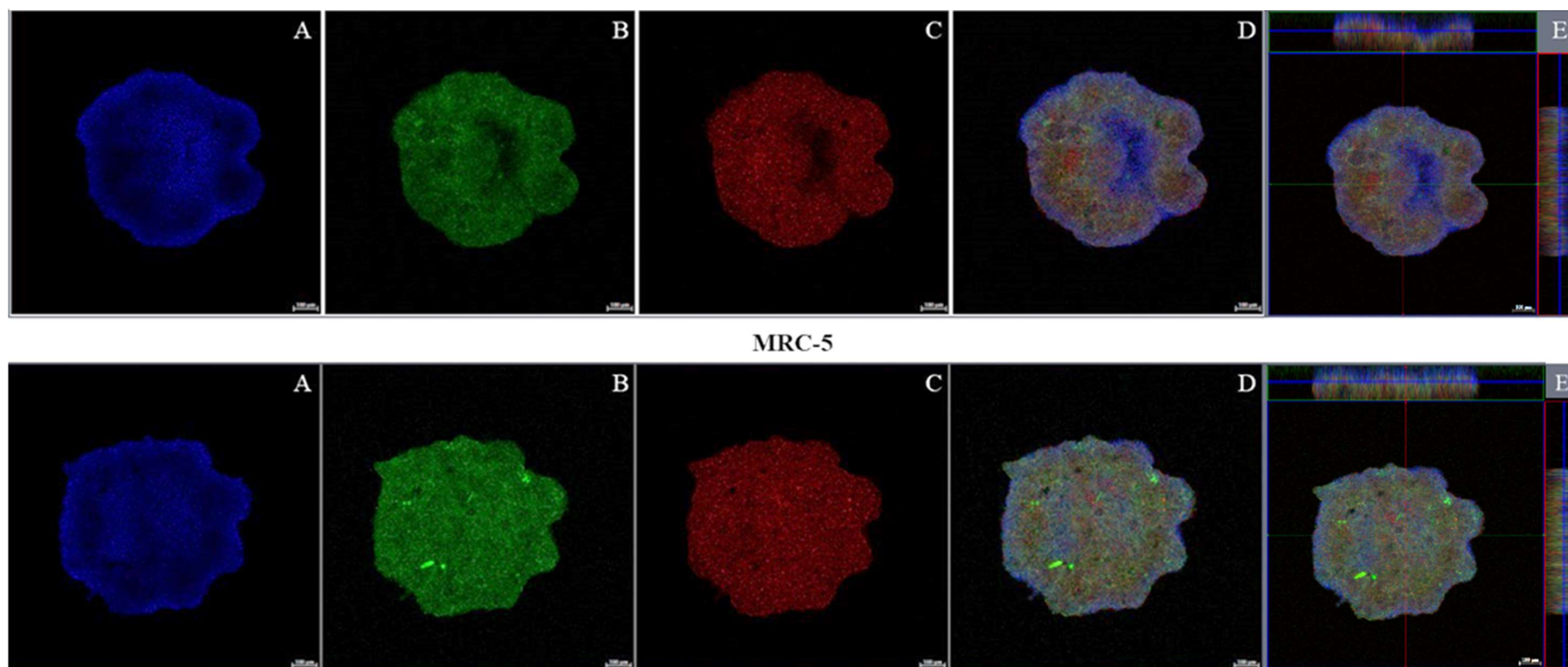


Figura 31 - Esferoides das linhagens A549 e MRC-5 infectados com a forma de biofilme de *H. capsulatum*. **A** – Marcação do núcleo da célula pulmonar; **B**- marcação do fungo no interior dos esferoides; **C** – marcação do citoplasma da célula pulmonar; **D** – merge das marcações; **E** – merge com a barra de profundidade.



Para os experimentos de infecção nos cultivos tridimensionais, a multiplicidade de infecção (MOI) foi definida levando-se em consideração a quantidade de células que tinha nos esferoides no quarto dia (formação). Para a linhagem celular A549, a média de células no quarto dia foi de $8,33 \times 10^3$ células/poço e para a MRC-5 foi de $2,69 \times 10^3$ células/poço. Portanto, foi preparado uma suspensão fúngica da cepa EH-315, de modo que a concentração final nos poços fosse uma MOI de 5:1. O MOI e o tempo de infecção foram determinados de acordo com trabalhos anteriores que mostraram ser um número adequado de células fúngicas em relação a células de mamíferos (EVANS; SCHULTZ; BOIMAN; MCKELL *et al.*, 2021; PITANGUI; DE LACORTE SINGULANI; SARDI; DE SOUZA *et al.*, 2021; PITANGUI; SARDI; SILVA; BENADUCCI *et al.*, 2012; ZAMITH-MIRANDA; HEYMAN; BURNET; COUVILLION *et al.*, 2021).

No estudo conduzido por Wang e colaboradores (2021), os autores desenvolveram um modelo tridimensional de células uroteliais humanas como modelo de infecção para biofilmes de *C. albicans* e testar a eficiência de terapias antifúngicas baseadas em nanopartículas (NP). Os resultados foram promissores, e os autores demonstraram que os biofilmes foram capazes de infectar os cultivos 3D e a NP exibiu baixa toxicidade para as células uroteliais e alta eficiência em eliminar os biofilmes no cultivo 3D. Esse estudo, juntamente com nossos resultados mostram a importância dos cultivos 3D como um modelo *in vitro* confiável para o estudo da interação patógeno-hospedeiro, o que poderia ajudar a reduzir o uso de animais em pesquisa.

4.10.1. Análise do perfil de expressão gênica das infecções em monocamada e cultivo tridimensional

Todas as amostras analisadas tinham quantidades suficientes de RNA, que variaram de 61,6 a 878,7 ng/μL. Além disso, a razão A260/280, que confirma a pureza das amostras, ficou entre 2,09 a 2,18. Em relação a integridade do RNA, todas as amostras no gel virtual apresentaram duas bandas, sem degradação do RNA e o RIN no geral apresentou valor 8.

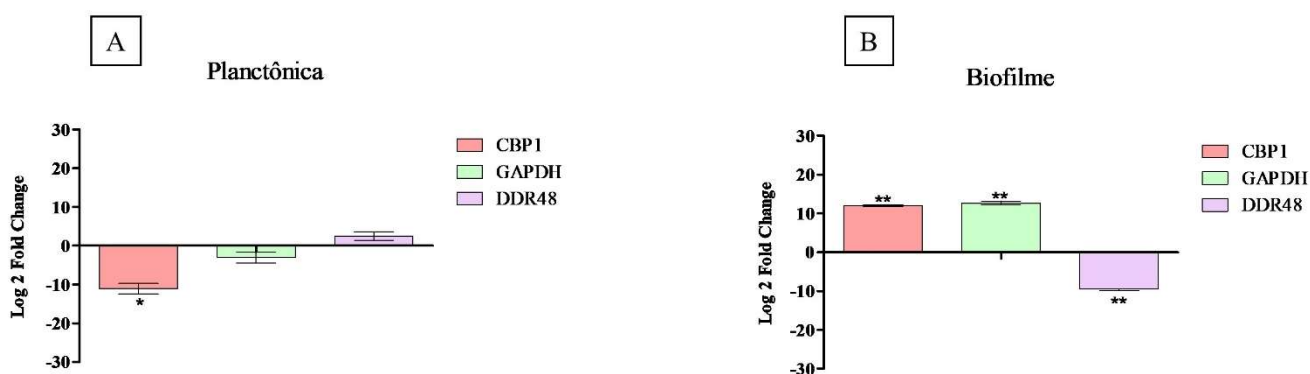
Todos os primers validados apresentaram eficiência entre 90 e 120%. A proteína “*Calcium Binding Protein*” (CBP) foi o primeiro fator de virulência descrito para *H. capsulatum*. Trata-se de uma proteína ligante de cálcio conhecida como CBP1 e tem importante relação no processo de virulência fúngica (BALTAZAR; ZAMITH-MIRANDA; BURNET; CHOI *et al.*, 2018; BATANGHARI; GOLDMAN, 1997; MAGRINI; GOLDMAN, 2001; SEBGHATI; ENGLE; GOLDMAN, 2000). A *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) é descrita como uma proteína da via glicolítica e detectada na superfície celular de fungos (MUNIZ, 2009). Além disso, o estudo conduzido por Sardi e colaboradores (2015), mostrou que a GAPDH foi o gene de maior expressão nos biofilmes em comparação com a forma planctônica. Outro primer validado foi referente ao gene DDR48, descrito como um mecanismo importante para a sobrevivência do fungo na patogênese, resposta ao estresse oxidativo e resposta a drogas antifúngicas (BLANCETT; RUNGE; REYES; KENNEDY *et al.*, 2020).

- Método do Ct Comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

Nas análises foi utilizado o gene endógeno CatB como normalizador e as amostras de referência foram monocamada infectada com a forma planctônica e com biofilme. Para a forma planctônica (**Fig. 32A**), o gene CBP1 encontra-se reprimido ($p < 0,05$) em relação ao controle. Para a **Figura 32B**, que faz referência aos esferoides infectados com biofilme

maduro, o gene CBP1 e GAPDH foram induzidos ($p<0,01$) e 12,61 ($p<0,01$). O gene DDR48, por sua vez, foi reprimido ($p<0,01$).

Figura 32 - Expressão gênica de esferoides pulmonares da linhagem MRC-5 infectados com a cepa de *H. capsulatum* EH-315 na forma planctônica (A) e de biofilme (B), após 24h de infecção, quando comparados as respectivas infecções em monocamada em $\text{Log}_2 \text{Fold change}$. Na forma planctônica (A) o gene CBP1 foi reprimido. Na forma de biofilme os genes CBP1 e GAPDH foram induzidos e o gene DDR48 reprimido. A significância estatística foi determinada por teste t e indicada por asteriscos: * $p<0,05$; ** $p<0,01$.



Alguns estudos vêm demonstrando a importância do gene CBP1 tanto para o crescimento e desenvolvimento de leveduras de *H. capsulatum*, como também para a sua patogênese (HOLBROOK; RAPPLEYE, 2008). No estudo conduzido por Sebghati, Engle e Goldman (2000), foi verificado que cepas silenciadas para o gene CBP1 foram incapazes *in vitro* de degradar macrófagos e de se proliferar em modelo *in vivo* com camundongos. Em continuidade, Azimova e colaboradores (2021), demonstraram que cepas silenciadas de *H. capsulatum* foram capazes de crescer e se desenvolver dentro de células hospedeiras (*in*

vitro), no entanto, não foram capazes de destruir essas células. Isaac e colaboradores (2015), utilizaram cepas mutantes para CBP1 e verificaram que elas foram capazes de crescer, mas não induziram a morte de macrófagos em experimentos *in vitro*. No entanto, em experimentos *in vivo* utilizando camundongos, os autores mostraram que na presença de CBP1 os animais desenvolveram a infecção e houve um crescimento das leveduras. Esse estudo destaca a importância desse gene como mecanismo de virulência para *H. capsulatum* em ativar vias de morte nas células hospedeiras.

Nossos achados nas infecções em cultivos tridimensionais, demonstraram que na forma planctônica esse gene estava reprimido, já nos esferoides infectados com a forma de biofilme, estava induzido. Por ser um gene ligado a patogênese fúngica e achados vem demonstrando que os biofilmes são importantes fatores de virulência, acredita-se que a indução desse gene possa estar relacionada a maior capacidade de infecção e proliferação dessas comunidades.

Em relação a GAPDH, estudos anteriores de análise transcriptômica entre a forma planctônica e de biofilme mostraram indução desse gene, nos biofilmes formados por *H. capsulatum* (PITANGUI, 2017). Além disso, Sardi e colaboradores (2015), também mostraram uma indução em biofilmes formados por *P. brasiliensis*. E por sua vez, Bailão e colaboradores (2006) em ensaios de *in vivo* utilizando camundongos e o fungo *P. brasiliensis*, verificaram que a GAPDH estava induzida, nos fungos recuperados pós infecção, sugerindo ser um importante fator de virulência na patogênese. Resultados similares foram demonstrados nesse estudo, os esferoides infectados com a forma de biofilme, tiveram uma indução para esse gene, superior ao encontrado na forma planctônica.

Em ensaios conduzidos *in vitro*, utilizando macrófagos e *H. capsulatum* mostraram que o gene DDR48 é importante para a sobrevivência do fungo, já que mutantes silenciados para esse gene, tiveram uma redução na taxa de sobrevivência dentro das células hospedeiras.

E, foi essencial para a sobrevivência de leveduras dentro de macrófagos murinos, estando relacionado a um possível mecanismo de patogênese (BLANCETT; RUNGE; REYES; KENNEDY *et al.*, 2020). Além disso, verificou-se que o fungo depende do gene DDR48 para se adaptar e se recuperar ao estresse celular, ocasionado pelo ambiente hostil e também pela resposta aos antifúngicos (BLANCETT; RUNGE; REYES; KENNEDY *et al.*, 2021). Estudos conduzidos com *C. albicans*, verificaram que o gene é expresso durante a formação do biofilme e na formação de filamentos, estando presente na parede celular (CLEARY; MACGREGOR; SAVILLE; THOMAS, 2012; STASCHKE; DEY; ZABORSKE; PALAM *et al.*, 2010).

Para os esferoides infectados com a forma planctônica, apesar da indução não foi significativa. Já para as infecções com o biofilme, foi obtida uma repressão desse gene. Não existem trabalhos até o momento, que relacionam genes de virulência fúngica com células infectadas com biofilmes de *H. capsulatum* portanto, trata-se de resultados inéditos e mais estudos devem ser realizados para confirmar as hipóteses.

Nesse trabalho foi feita a caracterização dos esferoides das linhagens de células pulmonares, além da confirmação da eficácia e potência antifúngica de derivados de nitrofuranos e indólicos contra *H. capsulatum*. Além disso, os compostos mostraram serem eficazes em inibir biofilmes formados por *H. capsulatum*, apresentando baixa ou nula toxicidade *in vitro* e *in vivo*. Como possível mecanismo de ação, eles podem estar relacionados a inibição da biossíntese do ergosterol (Erg11), além de produzirem EROs e morte necrótica. Os modelos tridimensionais mostram-se viáveis para estudos de citotoxicidade e de interação patógeno-hospedeiro.

Parte II – Eficácia e segurança farmacologia dos derivados de nitrofurano contra espécies de Candida, Paracoccidioides brasiliensis, Cryptococcus neoformans e dermatófitos.

5. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antifúngica e segurança *in vitro* e *in vivo* dos derivados de nitrofurano contra as cepas de *Paracoccidioides* spp., *Cryptococcus neoformans*, espécies de *Candida* e dermatófitos.

5.1. Objetivos específicos

- Verificar a atividade antifúngica de compostos derivados de nitrofurano pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM₉₀) nas cepas de *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes*;
- Avaliar a concentração fungicida mínima (CFM) nas cepas;
- Avaliar a toxicidade dos compostos *in vitro* em monocamada, modelo tridimensional e *in vivo* no modelo alternativo de *C. elegans*.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Compostos e fármacos

Os derivados de nitrofurano foram obtidos em colaboração com o grupo de pesquisa do professor Dr. Luigi Scpione da Universidade de Roma "La Sapienza" – Itália. A síntese dos derivados de nitrofurano foi realizada de acordo com a literatura (ARIAS; HERRERA; GARAY; RODRIGUES *et al.*, 2017; DE VITA; FRIGGERI; D'AURIA; PANDOLFI *et al.*, 2014; GALLARDO-MACIAS; KUMAR; JASKOWSKI; RICHMANN *et al.*, 2019; JIN; GENG; YU; TAO *et al.*, 2009; PANDOLFI; D'ACIERNO; BORTOLAMI; DE VITA *et al.*, 2019; TANGALLAPALLY; YENDAPALLY; LEE; HEVENER *et al.*, 2004; VASO; PANDOLFI; BILA; DE VITA *et al.*, 2022).

Os antifúngicos anfotericina B (AmB) e terbinafina (TRB) foram adquiridos comercialmente (Sigma-Aldrich, Milano, Itália).

Os derivados de nitrofurano foram solubilizados em 100% de dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração de estoque de 30.000 µg/mL e foram armazenados a -80 °C. As soluções estoque de antifúngicos foram preparadas considerando sua pureza, utilizando os cálculos recomendados no documento M27-A3. As soluções de trabalho dos compostos (0,06–250 µg/mL) e as drogas AmB (0,007–4 µg/mL) e TRB (0,001–1 µg/mL) foram preparados em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI)-1640 com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio e com vermelho de fenol como indicador de pH, tamponado com sal hemissódico do ácido 4-morfolinopropanossulfônico (MOPS) com 2% de glicose com pH = 7.

6.2. Microrganismos e condições de cultivo

- *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata* e *Cryptococcus neoformans*

Foram utilizadas as cepas de *Candida albicans* (ATCC 90028); *C. krusei* (ATCC 6258); *C. glabrata* (ATCC 90030) e *Cryptococcus neoformans* (H99/ATCC 208821). As cepas de foram subcultivadas em ágar Sabouraud dextrose por 24 h (espécies de *Candida*) e 48 h (*C. neoformans*), conforme descrito no documento M27-A3 do *Clinical Institute Standards Laboratory* (CLSI, 2008a).

- *Paracoccidioides brasiliensis*

Foi utilizada a cepa de *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb 18), originalmente isolado de um caso de paracoccidioidomicose pulmonar em São Paulo, SP, Brasil (DE MACEDO; TEIXEIRA; BARKER; ZANCOPÉ-OLIVEIRA *et al.*, 2019). O fungo foi mantido em meio Fava-Netto a 37°C por 96 h (SILVA; OLIVEIRA; SILVA; SANGALLI-LEITE *et al.*, 2013).

- *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes*

Para os dermatófitos foram utilizadas as cepas *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 11481) e *T. rubrum* (ATCC) 28289). As cepas foram mantidas em ágar extrato de malte com 2%; peptona de tecido animal, 2%; glicose e 2%; ágar, com pH 5,7, e foram incubados a 28°C por 7 dias ou até a esporulação (BILA; COSTA-ORLANDI; VASO; BONATTI *et al.*, 2021; COSTA-ORLANDI; SERAFIM-PINTO; DA SILVA; BILA *et al.*, 2020).

6.3. Suscetibilidade fúngica a derivados de nitrofurano e drogas antifúngicas

6.3.1. *Candida* sp. e *Cryptococcus neoformans*

O teste de suscetibilidade para espécies de *Candida* e *C. neoformans* foi realizado conforme recomendado no CLSI M27-A3 (CLSI, 2008a). O inóculo das leveduras foi ajustado a uma

concentração de 5×10^6 células/mL, seguida de uma diluição de 1:50 usando NaCl 0,85% e 1:20 usando meio RPMI-1640. Diluições dos compostos e medicamentos antifúngicos de referência foram dispensados em uma microplaca de 96 poços em um volume total de 100 μ L/poço; posteriormente, foram adicionados 100 μ L/poço do inóculo e as placas foram incubadas a 37°C por 24 h (*Candida* sp.) e 48 h (*C. neoformans*). Foi realizada leitura visual e colorimétrica com resazurina 0,03% (BILA; COSTA-ORLANDI; VASO; BONATTI *et al.*, 2021; COSTA-ORLANDI; SARDI; SANTOS; FUSCO-ALMEIDA *et al.*, 2014; SILVA; OLIVEIRA; SILVA; SANGALLI-LEITE *et al.*, 2013). O controle de qualidade foi realizado com cepas de *C. krusei* ATCC 6258, utilizando a droga AmB. A CIM foi considerada quando a inibição foi de pelo menos 90% do crescimento quando comparada ao controle (CIM₉₀).

6.3.2. *Paracoccidioides brasiliensis*

Os experimentos foram conduzidos conforme descrito por de Paula e Silva e colaboradores (2013); suspensões fúngicas foram preparadas na concentração de 5×10^6 células/mL, diluídas a 1:50 em NaCl 0,85% e 1:20 em meio RPMI-1640. Diluição seriada dos compostos foi realizada e os compostos foram colocados em contato com a suspensão fúngica. As placas foram incubadas a 37°C por 48 h a 150 rpm, e 20 μ L de *Alamar Blue* (Invitrogen) foram adicionados e incubados por mais 24 h para leituras colorimétricas.

6.3.3. *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes*

Os experimentos foram realizados de acordo com CLSI M38-A2 (CLSI, 2008b) para dermatófitos, com pequenas modificações conforme descrito por Costa-Orlandi e colaboradores (2020). As suspensões fúngicas foram ajustadas contando os conídios no hemocitômetro em uma concentração final de $2,5 \times 10^3$ células/mL em meio RPMI-1640. Esse foi adicionado aos poços que continham as diluições seriadas dos compostos e incubado a 35°C durante 96 h com agitação (150

rpm). As leituras visuais e colorimétricas foram feitas com a adição de 20 µL de resazurina 0,03% (SILVA; OLIVEIRA; SILVA; SANGALLI-LEITE *et al.*, 2013). O controle de qualidade foi realizado com a cepa de *T. rubrum* ATCC MYA-4438, com o fármaco TRB.

6.4. Determinação da Concentração Mínima de Fungicida (CFM)

A concentração fungicida mínima foi realizada conforme descrito por Costa-Orlandi e colaboradores (2020). Alíquotas de 100 µL do conteúdo dos poços foram retiradas e semeadas em meio específico para cada fungo. *Candida* spp. e *C. neoformas* foram semeados em ágar Sabouraud dextrose e incubados a 37°C por 24 h e 48 h; *P. brasiliensis* foi plaqueado em meio Fava-Neto a 37°C por 72 h e dermatófitos em ágar Sabouraud a 28°C por 96 h. Concentrações maiores ou iguais ao CIM₉₀ foram usadas. A concentração fungicida mínima é a concentração mais baixa do composto ou fármaco onde não ocorre o desenvolvimento de 99,9% dos microrganismos (COSTA-ORLANDI; SERAFIM-PINTO; DA SILVA; BILA *et al.*, 2020).

6.5. Manutenção de linhagem celular

Foram utilizadas duas linhagens celulares: a de células epitelial pulmonar A549 (ATCC® CCL-185) e de células de fibroblasto pulmonar MRC-5 (ATCC® CCL-171). Ambas foram cultivadas em meio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich) e incubados em 5% de CO₂ a 37 ° C (NAKANO; FUKUHARA-TAKAKI; JONO; NAKAJOU *et al.*, 2006). Após o descongelamento, as linhagens celulares foram expandidas para atingirem 80% de confluência, e estarem prontas para serem tripsinizadas e transferidas para outro frasco. Para os experimentos, as células só foram utilizadas, após serem realizadas duas passagens pós descongelamento.

6.6. Ensaio de citotoxicidade em modelos de monocamada e tridimensional pelo método colorimétrico de resazurina

Testes de citotoxicidade foram realizados para ambas as linhagens (A549 e MRC-5), em ambas os modelos, tridimensional e monocamada, para verificar o índice de seletividade (IS), conforme descrito por Bila e colaboradores (2021), Vaso e colaboradores (2022) e Friedrich e colaboradores (2009). Após o tempo de incubação, necessário para a formação dos esferoides (96 h), 100 μ L do meio foi removido das placas de ambos os modelos e 100 μ L de diferentes concentrações dos compostos mais potentes (0,48 a 250 μ g/mL) foi adicionado, diluído em meio DMEM + 10% SFB e novamente incubados por mais 72 h. A viabilidade foi verificada adicionando 50 μ M de resazurina (Sigma-Aldrich), conforme descrito por Xião e colaboradores (2010). A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 570 e 600 nm. O IS foi calculado usando a razão entre o CC₅₀ e o CIM₉₀.

6.7. Toxicidade *in vivo* no modelo de *C. elegans*

Os experimentos foram realizados com a cepa mutante (AU37 [glp-4 (bn2) I; sek-1 (km4) X]). A cepa foi mantida em placas contendo meio de crescimento de nematóides (NGM) semeado com *Escherichia coli* OP50 a 16°C. A etapa de sincronização de adultos jovens no estágio L4 foi realizada para o teste de toxicidade. Cerca de 20 larvas foram transferidas para cada poço de placas de 96 poços contendo 100 μ L de um meio composto por 60% de NaCl 50 mM; 40% de caldo BHI; 10 mg/mL de colesterol em etanol; 200 mg/mL de ampicilina e 90 mg/mL de canamicina. Em seguida, foram adicionados 100 μ L de diluições de derivados de nitrofurano (mostrando o melhor índice de seletividade contra as espécies fúngicas). As concentrações finais em cada poço variaram de 250 a 31,25 μ g/mL. As placas foram incubadas a 25°C por 24 h. A sobrevivência foi avaliada pela mobilidade e forma do nematoide (larvas em forma de bastão foram consideradas mortas, enquanto larvas sinusoidais foram consideradas vivas) sob um microscópio óptico invertido em

lentes objetivas de 40× (ABDULLAH; JA'AFAR; YASIN; TAHA *et al.*, 2019; COSTA-ORLANDI; SERAFIM-PINTO; DA SILVA; BILA *et al.*, 2020; MEDINA-ALARCÓN; SINGULANI; VOLTAN; SARDI *et al.*, 2017; SCORZONI; DE LUCAS; MESA-ARANGO; FUSCO-ALMEIDA *et al.*, 2013).

6.8. Análise estatística

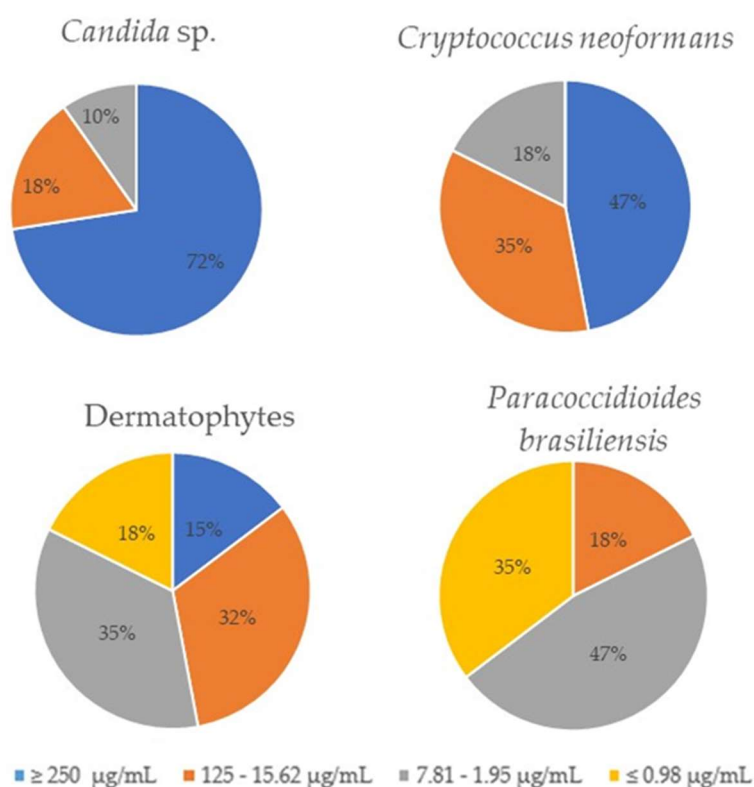
Todos os testes foram realizados em triplicata e em três experimentos independentes. Os dados foram submetidos à análise estatística por meio de análise de variância (*One-way ANOVA*) com pós-teste de Bonferroni, utilizando o software *GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Todos os valores de p inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. Atividade antifúngica de amplo espectro

Em geral, as leveduras foram resistentes à maioria dos compostos com prevalência de CIM₉₀ maior ou igual a 250 µg/mL em 72% dos compostos contra espécies de *Candida* e 47% contra *C. neoformans* (**Figura 33**). *P. brasiliensis* (47%) e dermatófitos (35%) foram mais sensíveis aos nitrofuranos, com CIM₉₀ prevalente de 7,81–1,95 µg/mL (**Figura 33**). Além disso, *P. brasiliensis* foi particularmente sensível aos compostos testados; apresentando CIM₉₀ entre 31,25 e 0,48 µg/mL (**Figura 33**).

Figura 33 - Gráficos representativos da CIM₉₀ obtidos para cada espécie fúngica, para os 17 derivados de nitrofurano testados.



As doenças fúngicas podem afetar a mucosa oral, pele, unhas, cabelos, pulmões, cérebro ou vários órgãos e tecidos simultaneamente (COSTA-ORLANDI; SERAFIM-PINTO; DA SILVA; BILA *et al.*, 2020; DONG; YOU; XU, 2020; IVASKIENE; MATUSEVICIUS; GRIGONIS; ZAMOKAS *et al.*, 2016; KAUFFMAN, 2009; LEE; DEL POZZO; SALAMANCA; HERNANDEZ *et al.*, 2019; MAZIARZ; PERFECT, 2016). As constantes mudanças globais e o advento de novas pandemias e doenças crônicas favorecem a difusão de patógenos fúngicos como *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Trichophyton* e fungos dimórficos como *H. capsulatum* e *P. brasiliensis* (BONGOMIN; GAGO; OLADELE; DENNING, 2017; LIMPER; ADENIS; LE; HARRISON, 2017; QUEIROZ-TELLES; ESCUISSATO, 2011).

As doenças fúngicas são frequentemente negligenciadas, e a identificação rápida e precisa de fungos na prática clínica é limitada. Além disso, como algumas infecções requerem um longo período de intervenção medicamentosa, sem contar as altas taxas de recorrência, os tratamentos com antifúngicos podem ser caros, além de sua toxicidade (BONGOMIN; GAGO; OLADELE; DENNING, 2017; GUPTA; STEC, 2019; SUN; HOY; HEITMAN, 2020). Por esse motivo, surge a busca por novas alternativas terapêuticas eficazes para infecções fúngicas, aliadas a pesquisas que minimizem o uso de mamíferos.

7.2. Determinação de CIM₉₀ e MFC para espécies de *Candida* e *Cryptococcus neoformans*

Para espécies de *Candida*, a CIM₉₀ variou de 3,9 a valores superiores a 250 µg/mL (**Tabela 9**). A maioria dos compostos apresentou perfil fungicida com valores de CFM de 7,81 a maiores que 250 µg/mL (**Tabela 9**). Para *Cryptococcus neoformans*, a CIM₉₀ dos derivados nitrofuranos também variou de 3,9 a maiores que 250 µg/mL, com perfil totalmente fungicida, sendo a CFM igual ou duas vezes maior que a CIM₉₀ (**Tabela 9**). Os resultados do

teste de suscetibilidade para a cepa de *C. krusei* com AmB deram uma CIM₉₀ de 1 µg/mL, comprovando a qualidade dos experimentos.

Tabela 9 - Valores mínimos de concentração inibitória e fungicida (µg/mL) dos 17 derivados nitrofuranos contra *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *Cryptococcus neoformans*.

Compostos	<i>C. albicans</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. neoformans</i>	
	CIM ₉₀	CFM	CIM ₉₀	CFM	CIM ₉₀	CFM	CIM ₉₀	CFM
L7CF113	3,9	125	31,25	31,25	7,81	≥250	31,25	31,25
L7CF165	7,8	≥250	250	≥250	7,81	≥250	31,25	31,25
L7CF166	125	250	250	≥250	250	≥250	≥250	≥250
L7CF167	250	≥250	≥250	≥250	≥250	≥250	≥250	≥250
L7CF181	125	250	62,5	62,5	125	125	7,81	15,62
L7CF182	≥250	≥250	250	≥250	≥250	≥250	31,25	62,5
L7CF183	250	≥250	250	250	≥250	≥250	31,25	62,5
L7CF190	≥250	≥250	≥250	≥250	≥250	≥250	≥250	≥250
L7CF191	≥250	≥250	≥250	≥250	≥250	≥250	250	250
L7CF192	15,62	31,25	250	≥250	31,25	≥250	7,81	15,62
L7CF193	250	≥250	250	≥250	250	≥250	62,5	125
L7CF194	250	≥250	≥250	≥250	≥250	≥250	250	≥250
L7CF219	250	≥250	250	≥250	≥250	≥250	62,5	62,5
L7CF260	15,62	62,5	15,62	31,25	7,81	7,81	3,9	3,9
L7CF261	≥250	≥250	≥250	≥250	≥250	≥250	≥250	≥250
L7CF262	≥250	≥250	≥250	≥250	≥250	≥250	≥250	≥250
L7CF263	≥250	≥250	≥250	≥250	≥250	≥250	≥250	≥250
AmB	-	-	1	-	-	-	0,06	-

CIM₉₀—concentração inibitória mínima capaz de inibir pelo menos 90% do crescimento; CFM—concentração fungicida mínima; AmB: Anfotericina B.

7.3. Determinação de CIM₉₀ e CFM para *P. brasiliensis*

Os escores da CIM₉₀ variaram de 0,48 a 31,25 µg/mL para *P. brasiliensis* (Tabela 10). O composto L7CF113 apresentou perfil fungistático quando testado contra a cepa *P. brasiliensis*; enquanto, os demais compostos ativos apresentaram perfil fungicida. A AmB apresentou CIM₉₀ de 0,13 µg/mL.

Tabela 10 - Valores mínimos de concentração inibitória e fungicida ($\mu\text{g/mL}$) dos 17 derivados nitrofuranos contra *Paracoccidioides brasiliensis*.

<i>P. brasiliensis</i>		
Compostos	CIM ₉₀	CFM
L7CF113	3,9	62,5
L7CF165	0,98	1,95
L7CF166	0,98	0,98
L7CF167	1,95	1,95
L7CF181	15,62	31,25
L7CF182	0,48	0,98
L7CF183	3,9	7,81
L7CF190	31,25	125
L7CF191	31,25	31,25
L7CF192	0,48	1,95
L7CF193	3,9	3,9
L7CF194	0,98	0,98
L7CF219	1,95	1,95
L7CF260	1,95	1,95
L7CF261	3,9	7,81
L7CF262	0,98	0,98
L7CF263	1,95	3,9
AmB	0,13	

CIM₉₀—concentração inibitória mínima capaz de inibir pelo menos 90% do crescimento; CFM—concentração fungicida mínima; AmB: Anfotericina B.

7.4. Determinação de CIM₉₀ e CFM para *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*

Para ambas as cepas de dermatófitos *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*, a CIM₉₀ variou de 0,98 a maiores que 250 $\mu\text{g/mL}$ (**Tabela 11**). Os compostos L7CF 182 e L7CF 183 apresentaram perfil fungistático em *T. mentagrophytes*, enquanto L7CF 167 apresentou perfil fungistático em *T. rubrum*. O TRB apresentou uma CIM₉₀ de 0,03 $\mu\text{g/mL}$ para a cepa controle *T. rubrum* ATCCMYA-4438, comprovando a qualidade dos experimentos.

Tabela 11 - Valores mínimos de concentração inibitória e fungicida ($\mu\text{g/mL}$) dos 17 derivados nitrofuranos contra dermatófitos.

Compostos	<i>T. rubrum</i>		<i>T. mentagrophytes</i>		<i>T. rubrum</i> ATCC MYA-4438
	CIM ₉₀	CFM	CIM ₉₀	CFM	CIM ₉₀
L7CF113	≥ 250	≥ 250	15,6	15,6	-
L7CF165	0,98	1,95	0,98	1,95	-
L7CF166	7,8	15,6	7,8	7,8	-
L7CF167	7,8	31,25	7,8	7,8	-
L7CF181	15,65	31,25	31,25	62,5	-
L7CF182	125	125	62,5	250	-
L7CF183	125	125	31,25	250	-
L7CF190	125	≥ 250	125	125	-
L7CF191	≥ 250	≥ 250	≥ 250	≥ 250	-
L7CF192	0,98	1,95	1,95	1,95	-
L7CF193	0,98	1,95	1,95	1,95	-
L7CF194	3,9	7,81	3,9	7,81	-
L7CF219	125	≥ 250	125	≥ 250	-
L7CF260	1,95	3,9	1,95	1,95	-
L7CF261	7,8	15,6	7,8	15,6	-
L7CF262	0,98	1,95	0,98	0,98	-
L7CF263	≥ 250	≥ 250	≥ 250	≥ 250	-
TRB	-	-	-	-	0,03

CIM₉₀—concentração inibitória mínima capaz de inibir pelo menos 90% do crescimento; MFC—concentração fungicida mínima; TRB: terbinafina.

7.5. Ensaio de citotoxicidade pelo método de resazurina e índice de seletividade

O ensaio de citotoxicidade foi realizado pelo método colorimétrico de resazurina. Após quantificar a viabilidade, calculou-se a concentração de inibição dos compostos em 50% da proliferação celular (CC₅₀). Para a linhagem celular A549, a CC₅₀ variou de 8,58 a >250 $\mu\text{g/mL}$ para a monocamada e tridimensional de 6,87 a maiores que 250 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 12). O índice de seletividade (IS) variou de 0,03 a 64,10 (monocamada e tridimensional) para espécies de *Candida*, 0,04 a 11,03 (monocamada e tridimensional) para *C. neoformans*, 0,22 a 520,83 (monocamada e tridimensional) para *P. brasiliensis* e 0,03 a 255,10 (monocamada e tridimensional) para dermatófitos. Para a linhagem celular MRC-5, a CC₅₀ variou de 1,56 a >250 $\mu\text{g/mL}$ para monocamada e para os cultivos tridimensionais 3,22 a >250 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela

13). O IS para ambos os modelos, monocamada e tridimensional, variou de 0,006 a 64,10 para espécies de *Candida*, 0,006 a 20,87 para *C. neoformas*, 0,49 a 520,83 para *P. brasiliensis*, 0,006 a 232,65 para *T. rubrum* e 0,006 a 116,92 para *T. mentagrophytes*.

Tabela 13 - Índice de seletividade (CC₅₀/CIM₉₀) de derivados de nitrofurano contra diferentes espécies de fungos em comparação com as células pulmonares MRC-5.

	<i>Paracoccidioides brasiliensis Pb18</i>		<i>Cryptococcus neoformans</i>		<i>Candida albicans ATCC 90028</i>		<i>Candida krusei ATCC 6258</i>		<i>Candida glabrata ATCC 90030</i>		<i>T. mentagrophytes</i>		<i>T. rubrum</i>	
Compostos	IS 2D	IS 3D	IS 2D	IS 3D	IS 2D	IS 3D	IS 2D	IS 3D	IS 2D	IS 3D	IS 2D	IS 3D	IS 2D	IS 3D
L7CF113	61,67	64,10	7,70	8,00	61,67	64,10	7,70	8,00	30,79	32,01	15,42	16,03	0,96	1,00
L7CF165	6,87	3,32	0,21	0,10	0,85	0,41	0,03	0,01	0,85	0,41	6,80	3,29	6,80	3,29
L7CF166	64,49	69,89	0,25	0,27	0,50	0,54	0,25	0,27	0,25	0,27	8,02	8,69	8,02	8,69
L7CF167	15,10	33,94	0,12	0,27	0,12	0,27	0,12	0,27	0,12	0,27	3,83	8,62	3,83	8,62
L7CF181	2,54	5,21	10,19	20,87	0,32	0,65	0,64	1,30	0,32	0,65	1,27	2,61	2,54	5,20
L7CF182	520,83	520,83	8,00	8,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	4,00	4,00	2,00	2,00
L7CF183	34,67	64,10	8,67	16,03	0,54	1,00	0,54	1,00	0,54	1,00	4,33	8,00	1,08	2,00
L7CF190	2,90	6,08	0,36	0,76	0,36	0,76	0,36	0,76	0,36	0,76	0,73	1,52	0,73	1,52
L7CF191	0,4992	0,98	0,06	0,12	0,06	0,12	0,06	0,12	0,06	0,12	0,06	0,12	0,06	0,12
L7CF192	98,40	353,33	3,03	10,87	3,02	10,86	0,19	0,68	1,51	5,43	24,22	86,97	48,19	173,06
L7CF193	58,46	19,52	0,91	0,30	0,91	0,30	0,91	0,30	0,91	0,30	116,92	39,04	232,65	77,67
L7CF194	222,06	59,71	0,86	0,23	0,86	0,23	0,86	0,23	0,86	0,23	55,23	14,85	55,23	14,85
L7CF219	36,53	37,69	1,14	1,18	0,28	0,29	0,28	0,29	0,28	0,29	0,57	0,59	0,57	0,59
L7CF260	13,74	3,94	6,87	1,97	1,72	0,49	1,72	0,49	3,43	0,98	13,74	3,94	13,74	3,94
L7CF261	2,95	5,65	0,05	0,09	0,05	0,09	0,05	0,09	0,05	0,09	1,48	2,82	1,48	2,82
L7CF262	4,23	11,19	0,02	0,04	0,02	0,04	0,02	0,04	0,02	0,04	4,23	11,19	4,23	11,19
L7CF263	0,80	33,49	0,00624	0,26	0,01	0,26	0,00624	0,26	0,00624	0,26	0,00624	0,26	0,00624	0,26

7.6. Toxicidade no modelo *in vivo* de *C. elegans*

De acordo com os resultados do índice de seletividade, os compostos L7CF113, 182, 181 e 193 foram avaliados *in vivo* em *C. elegans*. Todos os compostos foram testados em larvas de AU37, apresentaram viabilidade superior a 80%, mesmo quando tratadas com a maior concentração dos compostos testados (250 µg/mL). Os compostos L7CF113 e L7CF 193 causaram menor toxicidade nas larvas, e, mantiveram a viabilidade maior que 94% na concentração de 250 µg/mL (**Figura 34**). As larvas tratadas com os compostos L7CF 182 e L7CF 181 apresentaram diminuição da viabilidade apenas no maior valor de concentração (250 µg/mL) quando comparadas ao controle ($p < 0,01$; $p < 0,05$; $p < 0,001$, respectivamente) (**Figura 34**). As imagens das larvas foram obtidas dos poços com maior concentração de compostos (250 µg/mL); como pode ser observado, há poucas larvas mortas (em forma de bastonete), e a maioria delas são sinusoidais (vivas) (**Figura 35**).

Figura 34 - Viabilidade das larvas de *Caenorhabditis elegans* após tratamento com os compostos testados. A viabilidade das larvas foi superior a 80% com todos os nitrofuranos testados, mesmo na maior concentração. Foram utilizadas vinte larvas por concentração em três experimentos independentes. Valores expressos em média e desvio padrão. As barras de erro indicam desvios padrão. Os valores de p ($*p < 0,05$; $**p < **$; $p < 0,001$) foram calculados pela análise *One Way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni comparando todas as condições.

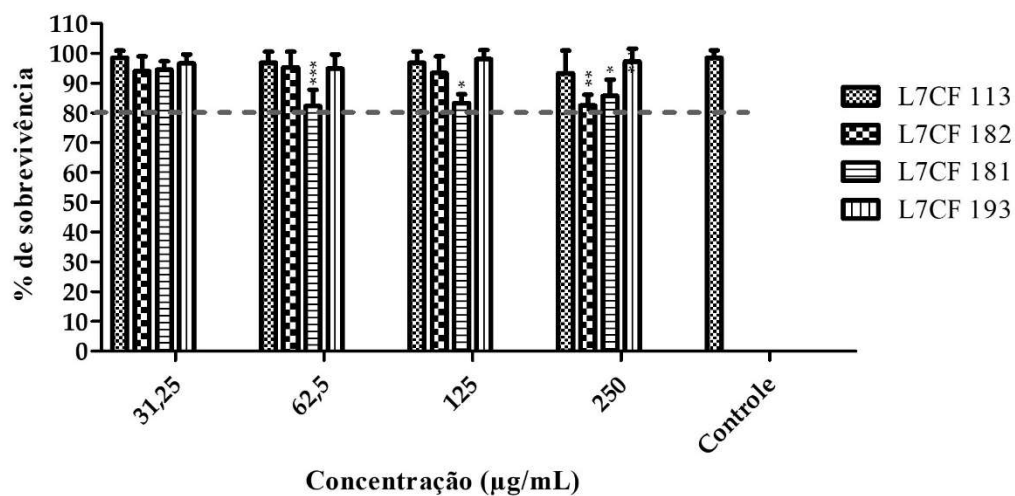
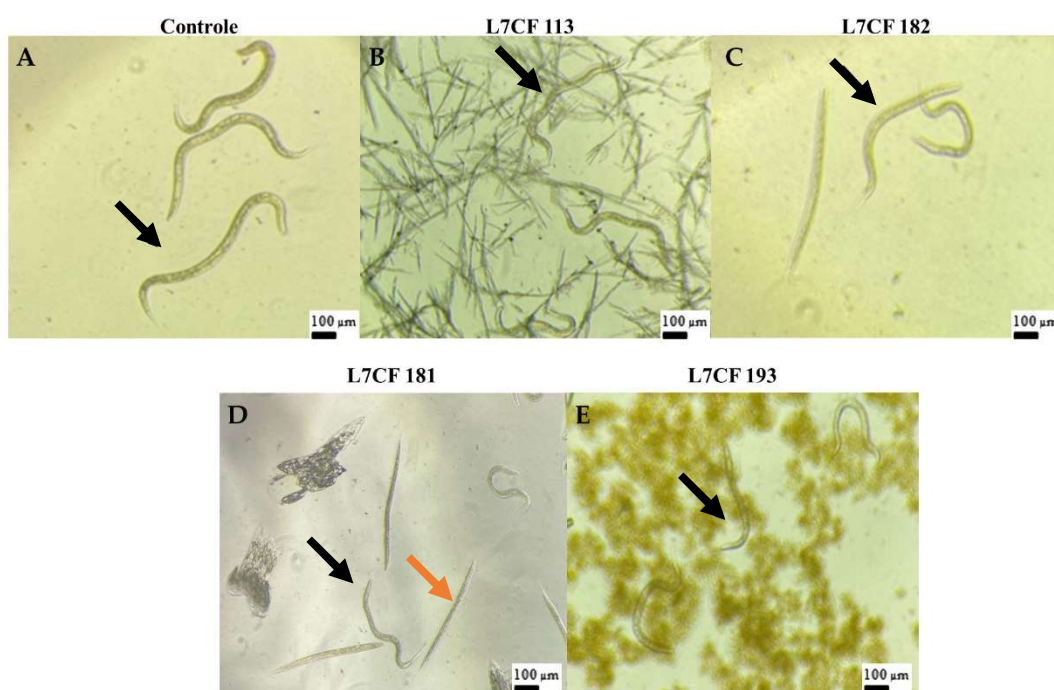


Figura 35 - Imagens do estágio L4 de *Caenorhabditis elegans*: larvas na concentração do composto igual a 250 µg/mL. (A) - grupo controle, a seta preta indica uma larva viva, em sua forma sinusoidal; (B - F) imagens representativas dos compostos L7CF113, 182, 181 e 193, respectivamente; as setas pretas apontam para uma larva viva em sua forma característica (senoidal) e a seta laranja mostra uma larva morta em sua forma característica de bastonete.



As culturas de células, se tornaram uma das técnicas mais aplicadas para substituir ou complementar estudos em animais *in vivo*, auxiliando nos testes de toxicidade e eficácia de novas moléculas (GRÄSSER; BUBEL; SOSSONG; OBERRINGER *et al.*, 2018; MOLINARO ; CAPUTO ; AMENDOEIRA, 2012). Além das culturas de células, animais alternativos aos mamíferos são amplamente utilizados para testes de segurança farmacológica. *C. elegans* é classificado como nematóide e mede cerca de 1 mm de comprimento, alimentando-se de bactérias e fungos que se decompõem no solo. Foi caracterizada na década de 1960 e tem sido essencial em pesquisas, particularmente em toxicologia (HUNT, 2017). A cepa AU37 possui uma mutação *glp-4* que torna as larvas incapazes de se reproduzir a 25°C, enquanto a mutação em *sek-1* é responsável por tornar as larvas mais sensíveis a diversos patógenos (SCORZONI; DE LUCAS; MESA-ARANGO; FUSCO-ALMEIDA *et al.*, 2013; SINGULANI; SCORZONI; GOMES; NAZARÉ *et al.*, 2017).

Um dos parâmetros utilizados para verificar a segurança e potência de medicamentos ou protótipos é o índice de seletividade. Valores maiores que dez são considerados um sinal de especificidade e alta seletividade (BAGLA; MCGAW; ELGORASHI; ELOFF, 2014; BILA; COSTA-ORLANDI; VASO; BONATTI *et al.*, 2021; OCHOA-PACHECO; ESCALONA ARRANZ; BEAVEN; PERES-ROSES *et al.*, 2017). Nossos achados mostram que o nitrofurano L7CF 113 foi o mais promissor entre os compostos testados contra espécies de *Candida*, com valores de CIM₉₀ variando de 3,9 a 31,25 µg/mL e índice de seletividade variando de 7,7 a 64,10. Resultados semelhantes com derivados de nitrofurano foram obtidos por De Vita e colaboradores (2014; 2016), com valores de CIM₅₀ contra *C. albicans* entre 0,5 e ≥128 µg/mL, e por Kamal e colaboradores (2015), com valores de CIM contra *C. albicans* de 3,9 a 62,5 µg/mL. Além disso, entre os compostos testados em larvas de *C. elegans*, o composto L7CF 113 apresentou um percentual de viabilidade de 94% na concentração de 250 µg/mL quando analisamos a toxicidade aguda deste composto, sugerindo assim a toxicidade baixa/nula deste derivado de nitrofurano.

O composto L7CF 181 apresentou maior potência contra *C. neoformans* (CIM₉₀ 7,81 µg/mL e CFM 15,62 µg/mL), com IS de 7,72 a 20,87 em células A549 e MRC5, respectivamente. A toxicidade aguda em larvas de *C. elegans* foi analisada, este composto apresentou viabilidade de 85,65% na concentração mais alta testada (250 µg/mL). Relatos de resistência antifúngica em cepas de *Cryptococcus* estão aumentando (MAY; STONE; WIESNER; BICANIC *et al.*, 2016; NIELSEN; VEDULA; SMITH; MEYA *et al.*, 2016). No entanto, isolados resistentes ao fluconazol foram relatados (CHEN; CHANG; LIU; CHEN *et al.*, 2015; SMITH; ACHAN; HULLSIEK; MCDONALD *et al.*, 2015) e acredita-se que seu surgimento seja devido ao uso frequente da droga como preventivo (PONTÓN; RÜCHEL; CLEMONS; COLEMAN *et al.*, 2000) de meningite criptocócica ou antigenemia criptocócica assintomática (CHEN; CHANG; LIU; CHEN *et al.*, 2015; SMITH; ACHAN; HULLSIEK; MCDONALD *et al.*, 2015).

Em relação ao *P. brasiliensis*, o derivado mais potente foi o composto L7CF 182 (CIM₉₀ 0,48 µg/mL e CFM 0,98 µg/mL), com valores de IS de 481,66 a 520,83 nas células A549 e MRC5. Em relação à toxicidade aguda em larvas de *C. elegans*, o composto apresentou uma viabilidade de 82,48% na concentração mais alta testada (250 µg/mL). Fungos causadores de micose sistêmica, como o *P. brasiliensis*, apresentam tratamento limitado e com altos níveis de toxicidade (DO CARMO SILVA; DE OLIVEIRA; DE SOUZA; BARBOSA *et al.*, 2020). Esses dados indicam que os derivados nitrofuranos apresentam boas propriedades antifúngicas (tanto fungistáticas quanto fungicidas) para essa espécie; por outro lado, também apresentaram boa seletividade e baixa toxicidade, tanto em linhagens celulares quanto em larvas.

O composto L7CF 193 foi o mais potente e o mais seletivo em cepas de dermatófitos, apresentando atividade fungicida contra *T. rubrum* (CIM₉₀ 0,98 µg/mL e CFM 1,95 µg/mL) e *T. mentagrophytes* (CIM₉₀ 1,95 µg/mL e CFM 1,95 µg/mL). Além disso, este composto apresentou baixa toxicidade *in vitro*, com valores de IS para *T. rubrum* de 106,94 a 255,10 em A549 e 77,67 a 232,65 em células MRC5, respectivamente, e valores de IS para *T. mentagrophytes* de 53,74 a

128,20 em A549 e 39,04 a 116,92 em células MRC5. Em *C. elegans*, a viabilidade foi de 97,20% na maior concentração testada (250 µg/mL). Os dermatófitos são fungos filamentosos com alta prevalência na população humana (BILA; COSTA-ORLANDI; VASO; BONATTI *et al.*, 2021; COSTA-ORLANDI; SARDI; SANTOS; FUSCO-ALMEIDA *et al.*, 2014) e geralmente causam infecções de difícil erradicação e muitas vezes recorrentes (BILA; COSTA-ORLANDI; VASO; BONATTI *et al.*, 2021; GUPTA; COOPER, 2008).

Nossos resultados mostraram que alguns derivados nitrofuranos possuem atividade antifúngica de amplo espectro, com baixa toxicidade e grande potencial para tratar infecções causadas por esses fungos. No geral, este estudo trouxe resultados esperançosos, pois alguns dos derivados estudados apresentaram baixa toxicidade tanto em testes *in vitro* quanto *in vivo* e, em sua maioria, apresentaram perfil fungicida.

8. CONCLUSÕES

Como análise dos resultados do presente trabalho pode-se concluir que:

- Ambas as linhagens celulares propostas foram capazes de formar modelos tridimensionais pelo método de revestimento de agarose;
- Os esferoides de ambas as linhagens, mantiveram-se íntegros por pelo menos dez dias após a formação, com viabilidade elevada, quando analisado por azul de *Trypan*, resazurina e citometria de fluxo;
- As imagens de microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal mostram um modelo esferoidal, constituído por células arredondas e conectadas entre si;
- Dezoito compostos testados apresentam baixa concentração inibitória atividade anti-*Histoplasma* e com perfil fungicida;
- O modelo em cultura 3D mostrou-se menos sensível resultando em um valor de CC_{50} maior que o modelo em monocamada;
- Nos ensaios de toxicidade em modelo alternativo de *C. elegans*, *G. mellonella* e *zebrafish*, os compostos, provocaram baixa toxicidade mesmo em concentrações mais elevadas.
- Em relação ao mecanismo de ação, em geral, após o tratamento com os compostos houve produção de EROs, redução da quantidade de ergosterol na membrana fúngica, rompimento da parede celular e indução de morte por necrose.
- Os compostos apresentaram um efeito anti-biofilme potente com concentração inibitória mínima igual ou duas vezes a requerida para inibir as células planctônicas;
- Nas imagens dos biofilmes maduros tratados, houve uma redução no metabolismo celular, redução na matriz extracelular e no número de células;
- Tanto a forma planctônica como a de biofilme, foram capazes de infectar os cultivos 3D, apresentando uma homogeneidade na infecção;

- Nas análises de expressão gênica comparativa entre a infecção em monocamada e os cultivos 3D, verificou-se diferença estatística significativa no gene CBP1 (tanto na planctônica como no biofilme), GAPDH e DDR8 (biofilme), comprovando que os cultivos 3D podem ser utilizados como um modelo de infecção;
- O resultado do amplo espectro de ação, mostrou eficácia dos derivados de nitrofuranos em outras cepas fúngicas, com perfil fungicida e fungistático e baixa toxicidade tanto *in vitro* nos cultivos celulares e *in vivo* em *C. elegans*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, M.; MORADI, F.; HU, W.; REGUDO, K. L. *et al.* Vertebrate cell culture as an experimental approach - limitations and solutions. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, 254, p. 110570, Jun-Jul 2021.
- ABDULLAH, N. A.; JA'AFAR, F.; YASIN, H. M.; TAHA, H. *et al.* Physicochemical analyses, antioxidant, antibacterial, and toxicity of propolis particles produced by stingless bee *Heterotrigona itama* found in Brunei Darussalam. **Heliyon**, 5, n. 9, p. e02476, Sep 2019.
- ABEDIN, M. J.; WANG, D.; MCDONNELL, M. A.; LEHMANN, U. *et al.* Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage. **Cell Death & Differentiation**, 14, n. 3, p. 500-510, 2007/03/01 2007.
- ADAMS, B. J.; FODOR, A.; KOPPENHÖFER, H. S.; STACKEBRANDT, E. *et al.* Reprint of "Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens"[*Biol. Control* 37 (2006) 32-49]. **Biological control**, 38, n. 1, p. 4-21, 2006.
- ADENIS, A.; NACHER, M.; HANF, M.; VANTILCKE, V. *et al.* HIV-associated histoplasmosis early mortality and incidence trends: from neglect to priority. **PLoS neglected tropical diseases**, v.8, n. 8, p. e3100, 2014.
- ADLER, S.; BASKETTER, D.; CRETON, S.; PELKONEN, O. *et al.* Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects—2010. **Archives of Toxicology**, 85, n. 5, p. 367-485, 2011.
- AIDÉ, M. Capítulo 4 - Histoplasmose. **J Bras Pneumol.**, 35, n. 2009, 2009.
- ALBUQUERQUE, P. C.; NAKAYASU, E. S.; RODRIGUES, M. L.; FRASES, S. *et al.* Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. **Cell Microbiol**, 10, n. 8, p. 1695-1710, Aug 2008.
- ALDEEK, F.; HSIEH, K. C.; UGOCHUKWU, O. N.; GERARD, G. *et al.* Accurate Quantitation and Analysis of Nitrofurantoin Metabolites, Chloramphenicol, and Florfenicol in Seafood by Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Method Validation and Regulatory Samples. **J Agric Food Chem**, 66, n. 20, p. 5018-5030, May 23 2018.
- ALMEIDA, M. A.; BAEZA, L. C.; ALMEIDA-PAES, R.; BAILÃO, A. M. *et al.* Comparative Proteomic Analysis of *Histoplasma capsulatum* Yeast and Mycelium Reveals Differential Metabolic Shifts and Cell Wall Remodeling Processes in the Different Morphotypes. **Front Microbiol**, 12, p. 640931, 2021.
- ALVES, D. D. N.; MARTINS, R. X.; FERREIRA, E. D. S.; ALVES, A. F. *et al.* Toxicological Parameters of a Formulation Containing Cinnamaldehyde for Use in Treatment of Oral Fungal Infections: An *In Vivo* Study. **BioMed Research International**, 2021, p. 2305695, 2021.

ANDERSON, T. M.; CLAY, M. C.; CIOFFI, A. G.; DIAZ, K. A. *et al.* Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. **Nature Chemical Biology**, 10, n. 5, p. 400-406, 2014.

ARAÚZ, A. B.; PAPINENI, P. Histoplasmosis. **Infect Dis Clin North Am**, 35, n. 2, p. 471-491, Jun 2021.

ARCK, P. C. When 3 Rs meet a forth R: Replacement, reduction and refinement of animals in research on reproduction. **J Reprod Immunol**, 132, p. 54-59, Apr 2019.

ARCK, P. C. When 3 Rs meet a forth R: Replacement, reduction and refinement of animals in research on reproduction. **Journal of Reproductive Immunology**, 132, p. 54-59, 2019.

ARIAS, D. G.; HERRERA, F. E.; GARAY, A. S.; RODRIGUES, D. *et al.* Rational design of nitrofurán derivatives: Synthesis and valuation as inhibitors of Trypanosoma cruzi trypanothione reductase. **Eur J Med Chem**, 125, p. 1088-1097, Jan 5 2017.

ASHRAF, N.; KUBAT, R. C.; POPLIN, V.; ADENIS, A. A. *et al.* Re-drawing the Maps for Endemic Mycoses. **Mycopathologia**, 185, n. 5, p. 843-865, 2020.

AZAR, M. M.; HAGE, C. A. Clinical Perspectives in the Diagnosis and Management of Histoplasmosis. **Clin Chest Med**, 38, n. 3, p. 403-415, Sep 2017.

AZAR, M. M.; LOYD, J. L.; RELICH, R. F.; WHEAT, L. J. *et al.* Current Concepts in the Epidemiology, Diagnosis, and Management of Histoplasmosis Syndromes. **Semin Respir Crit Care Med**, 41, n. 1, p. 13-30, Feb 2020.

AZIMOVA, D.; HERRERA, N.; DUVENAGE, L.; VOORHIES, M. *et al.* Cbp1, a rapidly evolving fungal virulence factor, forms an effector complex that drives macrophage lysis. **bioRxiv**, p. 2021.2009.2016.459956, 2021.

BAEK, N.; SEO, O. W.; LEE, J.; HULME, J. *et al.* Real-time monitoring of cisplatin cytotoxicity on three-dimensional spheroid tumor cells. **Drug design, development and therapy**, 10, p. 2155-2165, 2016.

BAGLA, V. P.; MCGAW, L. J.; ELGORASHI, E. E.; ELOFF, J. N. Antimicrobial activity, toxicity and selectivity index of two biflavonoids and a flavone isolated from Podocarpus henkelii (Podocarpaceae) leaves. **BMC Complement Altern Med**, 14, p. 383, Oct 8 2014.

BAILÃO, A. M.; SCHRANK, A.; BORGES, C. L.; DUTRA, V. *et al.* Differential gene expression by Paracoccidioides brasiliensis in host interaction conditions: Representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. **Microbes and Infection**, 8, n. 12, p. 2686-2697, 2006.

BALTAZAR, L. M.; ZAMITH-MIRANDA, D.; BURNET, M. C.; CHOI, H. *et al.* Concentration-dependent protein loading of extracellular vesicles released by Histoplasma capsulatum after antibody treatment and its modulatory action upon macrophages. **Scientific Reports**, 8, n. 1, p. 8065, 2018.

BARCHIESI, F.; SCHIMIZZI ANNA, M.; CASELLI, F.; NOVELLI, A. *et al.* Interactions between Triazoles and Amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 44, n. 9, p. 2435-2441, 2000.

BARUA, N.; HUANG, L.; LI, C.; YANG, Y. *et al.* Comparative Study of Two-Dimensional (2D) vs. Three-Dimensional (3D) Organotypic Keratinocyte-Fibroblast Skin Models for *Staphylococcus aureus* (MRSA) Infection. **International journal of molecular sciences**, 23, n. 1, p. 299, 2021.

BASSO, R. P.; POESTER, V. R.; BENELLI, J. L.; STEVENS, D. A. *et al.* COVID-19-Associated Histoplasmosis in an AIDS Patient. **Mycopathologia**, 186, n. 1, p. 109-112, 2021.

BATANGHARI, J. W.; DEEPE, G. S., JR.; DI CERA, E.; GOLDMAN, W. E. Histoplasma acquisition of calcium and expression of CBP1 during intracellular parasitism. **Mol Microbiol**, 27, n. 3, p. 531-539, Feb 1998.

BATANGHARI, J. W.; GOLDMAN, W. E. Calcium dependence and binding in cultures of *Histoplasma capsulatum*. **Infect Immun**, 65, n. 12, p. 5257-5261, Dec 1997.

BATES, D. W.; SU, L.; YU, D. T.; CHERTOW, G. M. *et al.* Mortality and Costs of Acute Renal Failure Associated with Amphotericin B Therapy. **Clinical Infectious Diseases**, 32, n. 5, p. 686-693, 2001.

BELFIORE, L.; AGHAEI, B.; LAW, A. M. K.; DOBROWOLSKI, J. C. *et al.* Generation and analysis of 3D cell culture models for drug discovery. **Eur J Pharm Sci**, 163, p. 105876, Aug 1 2021.

BILA, N. M.; COSTA-ORLANDI, C. B.; VASO, C. O.; BONATTI, J. L. C. *et al.* 2-Hydroxychalcone as a Potent Compound and Photosensitizer Against Dermatophyte Biofilms. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 11, n. 399, 2021-May-13 2021.

BLANCETT, L. T.; RUNGE, K. A.; REYES, G. M.; KENNEDY, L. A. *et al.* The *Histoplasma capsulatum* DDR48 Gene Is Required For Survival Within Macrophages, Response To Oxidative Stress, And Resistance to Antifungal Drugs. **bioRxiv**, p. 2020.2010.2025.354308, 2020.

BLANCETT, L. T.; RUNGE, K. A.; REYES, G. M.; KENNEDY, L. A. *et al.* Deletion of the Stress Response Gene DDR48 from *Histoplasma capsulatum* Increases Sensitivity to Oxidative Stress, Increases Susceptibility to Antifungals, and Decreases Fitness in Macrophages. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, 7, n. 11, p. 981, 2021.

BLOSSER, S. J.; CRAMER, R. A. SREBP-dependent triazole susceptibility in *Aspergillus fumigatus* is mediated through direct transcriptional regulation of *erg11A* (*cyp51A*). **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 56, n. 1, p. 248-257, 2012.

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

BOHSE, M. L.; WOODS, J. P. Expression and interstrain variability of the YPS3 gene of *Histoplasma capsulatum*. **Eukaryotic cell**, 6, n. 4, p. 609-615, 2007a.

- BOHSE, M. L.; WOODS, J. P. RNA interference-mediated silencing of the YPS3 gene of *Histoplasma capsulatum* reveals virulence defects. **Infection and immunity**, 75, n. 6, p. 2811-2817, 2007b.
- BONGOMIN, F.; GAGO, S.; OLADELE, R. O.; DENNING, D. W. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. **J Fungi (Basel)**, 3, n. 4, Oct 18 2017.
- BONGOMIN, F.; KWIZERA, R.; DENNING, D. W. Getting Histoplasmosis on the Map of International Recommendations for Patients with Advanced HIV Disease. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, 5, n. 3, p. 80, 2019.
- BONHOMME, J.; D'ENFERT, C. *Candida albicans* biofilms: building a heterogeneous, drug-tolerant environment. **Current Opinion in Microbiology**, 16, n. 4, p. 398-403, 2013/08/01/ 2013.
- BONNIER, F.; KEATING, M. E.; WRÓBEL, T. P.; MAJZNER, K. *et al.* Cell viability assessment using the Alamar blue assay: A comparison of 2D and 3D cell culture models. **Toxicology in Vitro**, 29, n. 1, p. 124-131, 2015/02/01/ 2015.
- BRASIL. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos. Ministério da Saúde. Brasília 2017.
- BREGER, J.; FUCHS, B. B.; APERIS, G.; MOY, T. I. *et al.* Antifungal chemical compounds identified using a *C. elegans* pathogenicity assay. **PLoS Pathog**, 3, n. 2, p. e18, Feb 2007.
- BRÖKER, L. E.; KRUYT, F. A.; GIACCONE, G. Cell death independent of caspases: a review. **Clin Cancer Res**, 11, n. 9, p. 3155-3162, May 1 2005.
- BURNIE, J. P.; CARTER, T. L.; HODGETTS, S. J.; MATTHEWS, R. C. Fungal heat-shock proteins in human disease. **FEMS Microbiol Rev**, 30, n. 1, p. 53-88, Jan 2006.
- BYRNE, H. M. Dissecting cancer through mathematics: from the cell to the animal model. **Nature Reviews Cancer**, 10, n. 3, p. 221-230, 2010/03/01 2010.
- CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochem Pharmacol**, 133, p. 86-96, Jun 1 2017.
- CARLSSON, J.; YUHAS, J. M. Liquid-overlay culture of cellular spheroids. **Recent Results Cancer Res**, 95, p. 1-23, 1984.
- CATUNDA, R. Q.; VIEIRA, J. R.; DE OLIVEIRA, E. B.; DA SILVA, E. C. *et al.* Cytotoxicity evaluation of three dental adhesives on vero cells in vitro. **J Clin Exp Dent**, 9, n. 1, p. e61-e66, Jan 2017.
- CHANG, Y. L.; YU, S. J.; HEITMAN, J.; WELLINGTON, M. *et al.* New facets of antifungal therapy. **Virulence**, 8, n. 2, p. 222-236, Feb 17 2017.

CHEN, Y.-C.; CHANG, T.-Y.; LIU, J.-W.; CHEN, F.-J. *et al.* Increasing trend of fluconazole-non-susceptible *Cryptococcus neoformans* in patients with invasive cryptococcosis: a 12-year longitudinal study. **BMC infectious diseases**, 15, 2015.

CHUN, S.-I.; MUN, C.-W. Cytotoxicity of TSP in 3D Agarose Gel Cultured Cell. **PloS one**, v.10, n. 6, p. e0128739, 2015.

CLARK, J. The 3Rs in research: a contemporary approach to replacement, reduction and refinement. **British Journal of Nutrition**, 120, p. 1-7, 2017.

CLAUSSEN, K.; STOCKS, E.; BHAT, D.; FISH, J. *et al.* How Common Are Pulmonary and Hepatic Adverse Effects in Older Adults Prescribed Nitrofurantoin? **J Am Geriatr Soc**, 65, n. 6, p. 1316-1320, Jun 2017.

CLEARE, L. G.; ZAMITH-MIRANDA, D.; NOSANCHUK, J. D. Heat Shock Proteins in Histoplasma and Paracoccidioides. **Clin Vaccine Immunol**, 24, n. 11, Nov 2017.

CLEARY, I. A.; MACGREGOR, N. B.; SAVILLE, S. P.; THOMAS, D. P. Investigating the function of Ddr48p in *Candida albicans*. **Eukaryotic cell**, 11, n. 6, p. 718-724, 2012.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts (M27-A3). 2008a.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi (M38-A2). 2008b.

COSTA-ORLANDI, C. B.; MARTINEZ, L. R.; BILA, N. M.; FRIEDMAN, J. M. *et al.* Nitric Oxide-Releasing Nanoparticles Are Similar to Efinaconazole in Their Capacity to Eradicate *Trichophyton rubrum* Biofilms. **Front Cell Infect Microbiol**, 11, p. 684150, 2021.

COSTA-ORLANDI, C. B.; SARDI, J. C. O.; PITANGUI, N. S.; DE OLIVEIRA, H. C. *et al.* Fungal Biofilms and Polymicrobial Diseases. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v.3, n. 2, 2017.

COSTA-ORLANDI, C. B.; SARDI, J. C. O.; SANTOS, C. T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. *et al.* In vitro characterization of *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* biofilms. **Biofouling**, 30, n. 6, p. 719-727, 2014.

COSTA-ORLANDI, C. B.; SERAFIM-PINTO, A.; DA SILVA, P. B.; BILA, N. M. *et al.* Incorporation of Nonyl 3,4-Dihydroxybenzoate Into Nanostructured Lipid Systems: Effective Alternative for Maintaining Anti-Dermatophytic and Antibiofilm Activities and Reducing Toxicity at High Concentrations. **Front Microbiol**, 11, p. 1154, 2020.

CRABBÉ, A.; LIU, Y.; MATTHIJS, N.; RIGOLE, P. *et al.* Antimicrobial efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in a three-dimensional lung epithelial model and the influence of fetal bovine serum. **Scientific Reports**, 7, n. 1, p. 43321, 2017.

DANHIER, F.; FERON, O.; PRÉAT, V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. **J Control Release**, 148, n. 2, p. 135-146, Dec 1 2010.

DE AGUIAR CORDEIRO, R.; DE FARIAS MARQUES, F. J.; DE AGUIAR CORDEIRO, R.; DA SILVA, M. R. *et al.* Synthesis and antifungal activity in vitro of isoniazid derivatives against *histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 58, n. 5, p. 2504-2511, 2014.

DE MACEDO, P. M.; TEIXEIRA, M. M.; BARKER, B. M.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. *et al.* Clinical features and genetic background of the sympatric species *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides americana*. **PLoS Negl Trop Dis**, 13, n. 4, p. e0007309, Apr 2019.

DE VITA, D.; FRIGGERI, L.; D'AURIA, F. D.; PANDOLFI, F. *et al.* Activity of caffeic acid derivatives against *Candida albicans* biofilm. **Bioorg Med Chem Lett**, 24, n. 6, p. 1502-1505, Mar 15 2014.

DE VITA, D.; SIMONETTI, G.; PANDOLFI, F.; COSTI, R. *et al.* Exploring the anti-biofilm activity of cinnamic acid derivatives in *Candida albicans*. **Bioorg Med Chem Lett**, 26, n. 24, p. 5931-5935, Dec 15 2016.

DEL POZO, J. L. Novel treatment dynamics for biofilm-related infections. **Expert Rev Anti Infect Ther**, 19, n. 11, p. 1443-1456, Nov 2021.

DESAI, J. V.; MITCHELL, A. P.; ANDES, D. R. Fungal Biofilms, Drug Resistance, and Recurrent Infection. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, 4, n. 10, October 1, 2014.

DESBOIS, A. P.; COOTE, P. J. Utility of Greater Wax Moth Larva (*Galleria mellonella*) for Evaluating the Toxicity and Efficacy of New Antimicrobial Agents. **Adv Appl Microbiol**, 78, p. 25-53, 2012.

DESROCHERS, T. M.; PALMA, E.; KAPLAN, D. L. Tissue-engineered kidney disease models. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 69-70, p. 67-80, 2014.

DHINGRA, S.; CRAMER, R. A. Regulation of Sterol Biosynthesis in the Human Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus*: Opportunities for Therapeutic Development. **Frontiers in Microbiology**, 8, n. 92, 2017-February-01 2017.

DO CARMO SILVA, L.; DE OLIVEIRA, A. A.; DE SOUZA, D. R.; BARBOSA, K. L. *et al.* Overview of Antifungal Drugs against *Paracoccidioidomycosis*: How Do We Start, Where Are We, and Where Are We Going? **Journal of Fungi**, 6, n. 4, 2020.

DOKE, S. K.; DHAWALE, S. C. Alternatives to animal testing: A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, 23, n. 3, p. 223-229, 2015.

DONG, K.; YOU, M.; XU, J. Genetic Changes in Experimental Populations of a Hybrid in the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. **Pathogens**, 9, n. 1, 2020.

DUBIAK-SZEPIETOWSKA, M.; KARCZMARCZYK, A.; WINCKLER, T.; FELLER, K.-H. A cell-based biosensor for nanomaterials cytotoxicity assessment in three dimensional cell culture. **Toxicology**, 370, p. 60-69, 2016.

DUBOIS, J. C.; SMULIAN, A. G. Sterol Regulatory Element Binding Protein (Srb1) Is Required for Hypoxic Adaptation and Virulence in the Dimorphic Fungus *Histoplasma capsulatum*. **PLOS ONE**, 11, n. 10, p. e0163849, 2016.

EDMONDSON, R.; BROGLIE, J. J.; ADCOCK, A. F.; YANG, L. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. **ASSAY and Drug Development Technologies**, 12, n. 4, p. 207-218, 2014.

EDWARDS, J. A.; KEMSKI, M. M.; RAPPLEYE, C. A. Identification of an aminothiazole with antifungal activity against intracellular *Histoplasma capsulatum*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 57, n. 9, p. 4349-4359, 2013.

EILENBERGER, C.; KRATZ, S. R. A.; ROTHBAUER, M.; EHMOSER, E. K. *et al.* Optimized alamarBlue assay protocol for drug dose-response determination of 3D tumor spheroids. **MethodsX**, 5, p. 781-787, 2018.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

ENGLISH, B. C.; VAN PROOYEN, N.; ÖRD, T.; SIL, A. The transcription factor CHOP, an effector of the integrated stress response, is required for host sensitivity to the fungal intracellular pathogen *Histoplasma capsulatum*. **PLoS Pathog**, 13, n. 9, p. e1006589, Sep 2017.

ESPINEL-INGROFF, A. In vitro activity of the new triazole voriconazole (UK-109,496) against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and common and emerging yeast pathogens. **J Clin Microbiol**, 36, n. 1, p. 198-202, Jan 1998.

EVANS, H. M.; SCHULTZ, D. F.; BOIMAN, A. J.; MCKELL, M. C. *et al.* Restraint of Fumarate Accrual by HIF-1 α Preserves miR-27a-Mediated Limitation of Interleukin 10 during Infection of Macrophages by *Histoplasma capsulatum*. **mBio**, 12, n. 6, p. e0271021-e0271021, 2021.

EWBANK, J. J.; ZUGASTI, O. C. elegans: model host and tool for antimicrobial drug discovery. **Disease models & mechanisms**, 4, n. 3, p. 300-304, 2011.

FALCI, D. R.; PASQUALOTTO, A. C. Profile of isavuconazole and its potential in the treatment of severe invasive fungal infections. **Infection and drug resistance**, 6, p. 163-174, 2013.

FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S. [Histoplasmosis]. **Rev Soc Bras Med Trop**, 42, n. 2, p. 192-198, Mar-Apr 2009.

FINKEL, J. S.; MITCHELL, A. P. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. **Nature Reviews Microbiology**, 9, n. 2, p. 109-118, 2011.

FIORENTZIS, M.; KATOPODIS, P.; KALIRAI, H.; SEITZ, B. *et al.* Conjunctival melanoma and electrochemotherapy: preliminary results using 2D and 3D cell culture models in vitro. **Acta ophthalmologica**, 97, n. 4, p. e632-e640, 2019.

FREGONEZI, N. F. **Fatores de virulência do fungo *Histoplasma capsulatum* envolvidos na formação de biofilmes**. 2020. 92 f. (Dissertação de mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP.

FREI, A.; KING, A. P.; LOWE, G. J.; CAIN, A. K. *et al.* Nontoxic Cobalt(III) Schiff Base Complexes with Broad-Spectrum Antifungal Activity. **Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)**, 27, n. 6, p. 2021-2029, 2021.

FREIRES, I. A.; SARDI, J. C.; DE CASTRO, R. D.; ROSALEN, P. L. Alternative Animal and Non-Animal Models for Drug Discovery and Development: Bonus or Burden? **Pharm Res**, 34, n. 4, p. 681-686, Apr 2017.

FRIEDRICH, J.; SEIDEL, C.; EBNER, R.; KUNZ-SCHUGHART, L. A. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. **Nat Protoc**, 4, n. 3, p. 309-324, 2009.

FUENTEFRIA, A. M.; PIPPI, B.; DALLA LANA, D. F.; DONATO, K. K. *et al.* Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. **Lett Appl Microbiol**, 66, n. 1, p. 2-13, Jan 2018.

GALLARDO-GARRIDO, C.; CHO, Y.; CORTÉS-RIOS, J.; VASQUEZ, D. *et al.* Nitrofurans beyond redox cycling: Evidence of Nitroreduction-independent cytotoxicity mechanism. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 401, p. 115104, 2020.

GALLARDO-MACIAS, R.; KUMAR, P.; JASKOWSKI, M.; RICHMANN, T. *et al.* Optimization of N-benzyl-5-nitrofur-2-carboxamide as an antitubercular agent. **Bioorg Med Chem Lett**, 29, n. 4, p. 601-606, Feb 15 2019.

GERPE, A.; ÁLVAREZ, G.; BENÍTEZ, D.; BOIANI, L. *et al.* 5-Nitrofurans and 5-nitrothiophenes with anti-Trypanosoma cruzi activity and ability to accumulate squalene. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 17, n. 21, p. 7500-7509, 2009.

GOEGAN, P.; JOHNSON, G.; VINCENT, R. Effects of serum protein and colloid on the alamarBlue assay in cell cultures. **Toxicology in Vitro**, 9, n. 3, p. 257-266, 1995.

GOMES, M. N.; BRAGA, R. C.; GRZELAK, E. M.; NEVES, B. J. *et al.* QSAR-driven design, synthesis and discovery of potent chalcone derivatives with antitubercular activity. **Eur J Med Chem**, 137, p. 126-138, Sep 8 2017.

GOMEZ, F. J.; GOMEZ, A. M.; DEEPE, G. S., JR. Protective efficacy of a 62-kilodalton antigen, HIS-62, from the cell wall and cell membrane of *Histoplasma capsulatum* yeast cells. **Infect Immun**, 59, n. 12, p. 4459-4464, Dec 1991.

GONÇALVES, L. N. C.; COSTA-ORLANDI, C. B.; BILA, N. M.; VASO, C. O. *et al.* Biofilm Formation by *Histoplasma capsulatum* in Different Culture Media and Oxygen Atmospheres. **Front Microbiol**, 11, p. 1455, 2020.

GOUGHENOUR, K. D.; BALADA-LLASAT, J.-M.; RAPPLEYE, C. A. Quantitative Microplate-Based Growth Assay for Determination of Antifungal Susceptibility of

Histoplasma capsulatum Yeasts. **Journal of clinical microbiology**, 53, n. 10, p. 3286-3295, 2015.

GOUGHENOUR, K. D.; RAPPLEYE, C. A. Antifungal therapeutics for dimorphic fungal pathogens. **Virulence**, 8, n. 2, p. 211-221, Feb 17 2017.

GOW, N. A. R.; LATGE, J.-P.; MUNRO, C. A.; HEITMAN, J. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. **Microbiology Spectrum**, 5, n. 3, p. 5.3.01, 2017.

GRÄSSER, U.; BUBEL, M.; SOSSONG, D.; OBERRINGER, M. *et al.* Dissociation of mono- and co-culture spheroids into single cells for subsequent flow cytometric analysis. **Ann Anat**, 216, p. 1-8, Mar 2018.

GUERRA, A. S.; MALTA, D. J.; LARANJEIRA, L. P.; MAIA, M. B. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activities of indole-imidazolidine derivatives. **Int Immunopharmacol**, 11, n. 11, p. 1816-1822, Nov 2011.

GUIMARAES, A.; DE CERQUEIRA, M.; NOSANCHUK, J. Surface Architecture of Histoplasma Capsulatum. **Frontiers in Microbiology**, 2, n. 225, 2011-November-18 2011.

GUIMARÃES, A. J.; FRASES, S.; GOMEZ, F. J.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. *et al.* Monoclonal antibodies to heat shock protein 60 alter the pathogenesis of Histoplasma capsulatum. **Infect Immun**, 77, n. 4, p. 1357-1367, Apr 2009.

GUIMARÃES, A. J.; HAMILTON, A. J.; DE, M. G. H. L.; NOSANCHUK, J. D. *et al.* Biological function and molecular mapping of M antigen in yeast phase of Histoplasma capsulatum. **PLoS One**, 3, n. 10, p. e3449, 2008.

GUIMARÃES, A. J.; NAKAYASU, E. S.; SOBREIRA, T. J.; CORDERO, R. J. *et al.* Histoplasma capsulatum heat-shock 60 orchestrates the adaptation of the fungus to temperature stress. **PLoS One**, 6, n. 2, p. e14660, Feb 10 2011.

GUO, X.; CHEN, Y.; JI, W.; CHEN, X. *et al.* Enrichment of cancer stem cells by agarose multi-well dishes and 3D spheroid culture. **Cell and Tissue Research**, 375, n. 2, p. 397-408, 2019/02/01 2019.

GUO, X.; ZHANG, J.; LI, X.; XIAO, E. *et al.* Sterol Sponge Mechanism Is Conserved for Glycosylated Polyene Macrolides. **ACS central science**, 7, n. 5, p. 781-791, 2021.

GUPTA, A. K.; COOPER, E. A. Update in Antifungal Therapy of Dermatophytosis. **Mycopathologia**, 166, n. 5, p. 353-367, 2008.

GUPTA, A. K.; STEC, N. Recent advances in therapies for onychomycosis and its management. **F1000Res**, 8, 2019.

GURSKI, L. A.; PETRELLI, N. J.; JIA, X.; FARACH-CARSON, M. C. 3D Matrices for Anti-Cancer Drug Testing and Development. **Oncology Issues**, 25, n. 1, p. 20-25, 2010.

HABANJAR, O.; DIAB-ASSAF, M.; CALDEFIE-CHEZET, F.; DELORT, L. 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. **Int J Mol Sci**, 22, n. 22, Nov 11 2021.

HABICH, C.; KEMPE, K.; GOMEZ, F. J.; LILICRAP, M. *et al.* Heat shock protein 60: identification of specific epitopes for binding to primary macrophages. **FEBS Lett**, 580, n. 1, p. 115-120, Jan 9 2006.

HAGE, C. A.; CONNOLLY, P.; HORAN, D.; DURKIN, M. *et al.* Investigation of the efficacy of micafungin in the treatment of histoplasmosis using two North American strains of *Histoplasma capsulatum*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 55, n. 9, p. 4447-4450, 2011.

HAMILTON, A. J.; BARTHOLOMEW, M. A.; FIGUEROA, J.; FENELON, L. E. *et al.* Evidence that the M antigen of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* is a catalase which exhibits cross-reactivity with other dimorphic fungi. **J Med Vet Mycol**, 28, n. 6, p. 479-485, 1990.

HARB, A.; FAKHREDDINE, M.; ZARAKET, H.; SALEH, F. A. Three-Dimensional Cell Culture Models to Study Respiratory Virus Infections Including COVID-19. **Biomimetics (Basel, Switzerland)**, 7, n. 1, p. 3, 2021.

HARDING, M. W.; MARQUES, L. L.; HOWARD, R. J.; OLSON, M. E. Can filamentous fungi form biofilms? **Trends Microbiol**, 17, n. 11, p. 475-480, Nov 2009.

HARRINGTON, B. J.; HAGEAGE, G. J., JR. Calcofluor White: A Review of its Uses and Applications in Clinical Mycology and Parasitology. **Laboratory Medicine**, 34, n. 5, p. 361-367, 2003.

HAZEN, K. C. Fungicidal versus fungistatic activity of terbinafine and itraconazole: an in vitro comparison. **J Am Acad Dermatol**, 38, n. 5 Pt 3, p. S37-41, May 1998.

HERRINGTON, C. S.; POULSOM, R.; KOEPPEN, H.; COATES, P. J. Recent Advances in Pathology: the 2021 Annual Review Issue of The Journal of Pathology. **The Journal of Pathology**, 254, n. 4, p. 303-306, 2021.

HOLBROOK, E. D.; RAPPEYE, C. A. *Histoplasma capsulatum* pathogenesis: making a lifestyle switch. **Current Opinion in Microbiology**, 11, n. 4, p. 318-324, 2008.

HOLBROOK, E. D.; SMOLNYCKI, K. A.; YOUSEFF, B. H.; RAPPEYE, C. A. Redundant catalases detoxify phagocyte reactive oxygen and facilitate *Histoplasma capsulatum* pathogenesis. **Infection and immunity**, 81, n. 7, p. 2334-2346, 2013.

HOLLA, B. S.; VEERENDRA, B.; SHIVANANDA, M. K. Non-linear optical properties of new arylfuranylpropenones. **Journal of Crystal Growth**, 263, n. 1, p. 532-535, 2004.

HUANG, H.-J.; LEE, Y.-H.; HSU, Y.-H.; LIAO, C.-T. *et al.* Current Strategies in Assessment of Nanotoxicity: Alternatives to In Vivo Animal Testing. **International journal of molecular sciences**, 22, n. 8, p. 4216, 2021.

HUNT, P. R. The *C. elegans* model in toxicity testing. **J Appl Toxicol**, 37, n. 1, p. 50-59, Jan 2017.

HUSSEY, G. S.; KEANE, T. J.; BADYLAK, S. F. The extracellular matrix of the gastrointestinal tract: a regenerative medicine platform. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, 14, n. 9, p. 540-552, Sep 2017.

HWANG, I.-S.; LEE, J.; LEE, D. G. Indole-3-carbinol Generates Reactive Oxygen Species and Induces Apoptosis. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 34, n. 10, p. 1602-1608, 2011.

IMBEAUD, S.; GRAUDENS, E.; BOULANGER, V.; BARLET, X. *et al.* Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. **Nucleic acids research**, 33, n. 6, p. e56-e56, 2005.

IRAZOQUI, J. E.; URBACH, J. M.; AUSUBEL, F. M. Evolution of host innate defence: insights from *Caenorhabditis elegans* and primitive invertebrates. **Nature reviews. Immunology**, 10, n. 1, p. 47-58, 2010.

ISAAC, D. T.; BERKES, C. A.; ENGLISH, B. C.; HOCKING MURRAY, D. *et al.* Macrophage cell death and transcriptional response are actively triggered by the fungal virulence factor Cbp1 during *H. capsulatum* infection. **Molecular Microbiology**, 98, n. 5, p. 910-929, 2015.

IVASKIENE, M.; MATUSEVICIUS, A. P.; GRIGONIS, A.; ZAMOKAS, G. *et al.* Efficacy of Topical Therapy with Newly Developed Terbinafine and Econazole Formulations in the Treatment of Dermatophytosis in Cats. **Pol J Vet Sci**, 19, n. 3, p. 535-543, Sep 1 2016.

JEONG, S.-Y.; LEE, J.-H.; SHIN, Y.; CHUNG, S. *et al.* Co-Culture of Tumor Spheroids and Fibroblasts in a Collagen Matrix-Incorporated Microfluidic Chip Mimics Reciprocal Activation in Solid Tumor Microenvironment. **PloS one**, v.11, n. 7, p. e0159013, 2016.

JIN, H.; GENG, Y.; YU, Z.; TAO, K. *et al.* Lead optimization and anti-plant pathogenic fungi activities of daphneolone analogues from *Stellera chamaejasme* L. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 93, p. 133-137, 2009.

JOHNSON, C. H.; KLOTZ, M. G.; YORK, J. L.; KRUF, V. *et al.* Redundancy, phylogeny and differential expression of *Histoplasma capsulatum* catalases. **Microbiology (Reading)**, 148, n. Pt 4, p. 1129-1142, Apr 2002.

KAMAL, A.; HUSSAINI, S. M.; SUCHARITHA, M. L.; POORNACHANDRA, Y. *et al.* Synthesis and antimicrobial potential of nitrofurantriazole congeners. **Org Biomol Chem**, 13, n. 36, p. 9388-9397, Sep 28 2015.

KAPUR, S. K.; WANG, X.; SHANG, H.; YUN, S. *et al.* Human adipose stem cells maintain proliferative, synthetic and multipotential properties when suspension cultured as self-assembling spheroids. **Biofabrication**, 4, n. 2, p. 025004, 2012.

KARIMABAD, M. N.; MAHMOODI, M.; JAFARZADEH, A.; DAREKORDI, A. *et al.* Molecular Targets, Anti-cancer Properties and Potency of Synthetic Indole-3-carbinol Derivatives. **Mini Rev Med Chem**, 19, n. 7, p. 540-554, 2019.

KARLSSON, H.; FRYKNÄS, M.; LARSSON, R.; NYGREN, P. Loss of cancer drug activity in colon cancer HCT-116 cells during spheroid formation in a new 3-D spheroid cell culture system. **Exp Cell Res**, 318, n. 13, p. 1577-1585, Aug 1 2012.

KASUGA, T.; WHITE, T. J.; KOENIG, G.; MCEWEN, J. *et al.* Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. **Molecular Ecology**, 12, n. 12, p. 3383-3401, 2003.

KATHIRAVAN, M. K.; SALAKE, A. B.; CHOTHE, A. S.; DUDHE, P. B. *et al.* The biology and chemistry of antifungal agents: a review. **Bioorg Med Chem**, 20, n. 19, p. 5678-5698, Oct 1 2012.

KATHURIA, S.; SINGH, P. K.; MEIS, J. F.; CHOWDHARY, A. In vitro antifungal susceptibility profile and correlation of mycelial and yeast forms of molecularly characterized *Histoplasma capsulatum* strains from India. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 58, n. 9, p. 5613-5616, 2014.

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

KAUFFMAN, C. A. Histoplasmosis. **Clin Chest Med**, 30, n. 2, p. 217-225, v, Jun 2009.

KAVANAGH, K.; REEVES, E. P. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. **FEMS Microbiology Reviews**, 28, n. 1, p. 101-112, 2004.

KAVANAGH, K.; SHEEHAN, G. The Use of *Galleria mellonella* Larvae to Identify Novel Antimicrobial Agents against Fungal Species of Medical Interest. **Journal of Fungi**, 4, n. 3, p. 113, 2018.

KEATH, E. J.; PAINTER, A. A.; KOBAYASHI, G. S.; MEDOFF, G. Variable expression of a yeast-phase-specific gene in *Histoplasma capsulatum* strains differing in thermotolerance and virulence. **Infect Immun**, 57, n. 5, p. 1384-1390, May 1989.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, 26, n. 4, p. 239-257, Aug 1972.

KIM, J. B. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. **Semin Cancer Biol**, 15, n. 5, p. 365-377, Oct 2005.

KIMMEL, C. B.; BALLARD, W. W.; KIMMEL, S. R.; ULLMANN, B. *et al.* Stages of embryonic development of the zebrafish. **Dev Dyn**, 203, n. 3, p. 253-310, Jul 1995.

KIRK, S. E.; SKEPPER, J. N.; DONALD, A. M. Application of environmental scanning electron microscopy to determine biological surface structure. **J Microsc**, 233, n. 2, p. 205-224, Feb 2009.

KRASAVIN, M.; PARCHINSKY, V.; KANTIN, G.; MANICHEVA, O. *et al.* New nitrofurans amenable by isocyanide multicomponent chemistry are active against multidrug-resistant and poly-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Bioorg Med Chem**, 25, n. 6, p. 1867-1874, Mar 15 2017.

KRONEMBERGER, G. S. **Produção de esferoides a partir de células-tronco/estromais de tecido adiposo humano para fabricação de tecido ósseo *in vitro***. 2018. 128 f. (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Biomedicina Translacional, Universidade do Grande Rio, Duque de Caxias, RJ.

KRONEMBERGER, G. S.; MIRANDA, G. A. S. C.; TAVARES, R. S. N.; MONTENEGRO, B. *et al.* Recapitulating Tumorigenesis in vitro: Opportunities and Challenges of 3D Bioprinting. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, 9, p. 682498-682498, 2021.

KUNZ-SCHUGHART, L.; KREUTZ, M.; KNUECHEL, R. Multicellular spheroids: a three dimensional in vitro culture system to study tumour biology. **International Journal of Experimental Pathology**, 79, 1998.

KUPPAST, I., 2012, A REVIEW ON ALTERNATIVES TO ANIMAL TESTING METHODS IN DRUG DEVELOPMENT.

LARUE, K. E. A.; KHALIL, M.; FREYER, J. P. Microenvironmental Regulation of Proliferation in Multicellular Spheroids Is Mediated through Differential Expression of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors. **Cancer Research**, 64, n. 5, p. 1621, 2004.

LASS-FLÖRL, C.; SAMARDZIC, E.; KNOLL, M. Serology anno 2021-fungal infections: from invasive to chronic. **Clin Microbiol Infect**, 27, n. 9, p. 1230-1241, Sep 2021.

LEE, H. H.; DEL POZZO, J.; SALAMANCA, S. A.; HERNANDEZ, H. *et al.* Reduced phagocytosis and killing of *Cryptococcus neoformans* biofilm-derived cells by J774.16 macrophages is associated with fungal capsular production and surface modification. **Fungal Genetics and Biology**, 132, p. 103258, 2019/11/01/ 2019.

LEMONTE, A. M.; WASHUM, K. E.; SMEDEMA, M. L.; SCHNIZLEIN-BICK, C. *et al.* Amphotericin B combined with itraconazole or fluconazole for treatment of histoplasmosis. **J Infect Dis**, 182, n. 2, p. 545-550, Aug 2000.

LEWANDOWSKA, A.; SOUTAR, C. P.; GREENWOOD, A. I.; NIMEROVSKY, E. *et al.* Fungicidal amphotericin B sponges are assemblies of staggered asymmetric homodimers encasing large void volumes. **Nat Struct Mol Biol**, 28, n. 12, p. 972-981, Dec 2021.

LI, R. K.; CIBLAK, M. A.; NORDOFF, N.; PASARELL, L. *et al.* In vitro activities of voriconazole, itraconazole, and amphotericin B against *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, and *Histoplasma capsulatum*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 44, n. 6, p. 1734-1736, 2000.

LIAO, W.; WANG, J.; XU, J.; YOU, F. *et al.* High-throughput three-dimensional spheroid tumor model using a novel stamp-like tool. **Journal of Tissue Engineering**, 10, p. 2041731419889184, 2019.

LIMPER, A. H.; ADENIS, A.; LE, T.; HARRISON, T. S. Fungal infections in HIV/AIDS. **Lancet Infect Dis**, 17, n. 11, p. e334-e343, Nov 2017.

LIN, R. Z.; CHANG, H. Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. **Biotechnol J**, 3, n. 9-10, p. 1172-1184, Oct 2008.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, 25, n. 4, p. 402-408, Dec 2001.

LOESSNER, D.; STOK, K. S.; LUTOLF, M. P.; HUTMACHER, D. W. *et al.* Bioengineered 3D platform to explore cell-ECM interactions and drug resistance of epithelial ovarian cancer cells. **Biomaterials**, 31, n. 32, p. 8494-8506, Nov 2010.

LOHSE, M. B.; GULATI, M.; JOHNSON, A. D.; NOBILE, C. J. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. **Nat Rev Microbiol**, 16, n. 1, p. 19-31, Jan 2018.

MACRAE, C. A.; PETERSON, R. T. Zebrafish as tools for drug discovery. **Nat Rev Drug Discov**, 14, n. 10, p. 721-731, Oct 2015.

MAGRINI, V.; GOLDMAN, W. E. Molecular mycology: a genetic toolbox for *Histoplasma capsulatum*. **Trends Microbiol**, 9, n. 11, p. 541-546, Nov 2001.

MAGUIRE, R.; DUGGAN, O.; KAVANAGH, K. Evaluation of *Galleria mellonella* larvae as an *in vivo* model for assessing the relative toxicity of food preservative agents. **Cell Biol Toxicol**, 32, n. 3, p. 209-216, Jun 2016.

MARCELINO, M. Desenvolvimento de derivados nitrofuranos antifúngicos para o controle de infecções por *Candida* spp. 2018. Tese (Doutorado) – 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 em Microbiologia.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* Biofilms to Antifungal Agents *in vitro*. **Antimicrob. Agents Chemother**, 50, n. 3, p. 1021-1022, 2006.

MAY, R. C.; STONE, N. R. H.; WIESNER, D. L.; BICANIC, T. *et al.* *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, 14, n. 2, p. 106-117, 2016.

MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infect Dis Clin North Am**, 30, n. 1, p. 179-206, Mar 2016.

MCCANN, M.; SANTOS, A. L. S.; DA SILVA, B. A.; ROMANOS, M. T. V. *et al.* *In vitro* and *in vivo* studies into the biological activities of 1,10-phenanthroline, 1,10-phenanthroline-5,6-dione and its copper(ii) and silver(i) complexes. **Toxicology Research**, 1, n. 1, p. 47-54, 2012.

MCMILLEN, P.; HOLLEY, S. A. Integration of cell-cell and cell-ECM adhesion in vertebrate morphogenesis. **Curr Opin Cell Biol**, 36, p. 48-53, Oct 2015.

MEDINA-ALARCÓN, K. P.; SINGULANI, J. L.; VOLTAN, A. R.; SARDI, J. C. O. *et al.* Alkyl Protocatechuate-Loaded Nanostructured Lipid Systems as a Treatment Strategy for *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* In Vitro. **Front Microbiol**, 8, p. 1048, 2017.

MELO, W. C. M. A.; SANTOS, M. B. D.; MARQUES, B. D. C.; REGASINI, L. O. *et al.* Selective photoinactivation of *Histoplasma capsulatum* by water-soluble derivatives chalcones. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, 18, p. 232-235, 2017.

MESA-ARANGO, A. C.; TREVIJANO-CONTADOR, N.; ROMÁN, E.; SÁNCHEZ-FRESNEDA, R. *et al.* The production of reactive oxygen species is a universal action mechanism of Amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug. **Antimicrob Agents Chemother**, 58, n. 11, p. 6627-6638, Nov 2014.

MESA-ARANGO, A. C.; TREVIJANO-CONTADOR, N.; ROMÁN, E.; SÁNCHEZ-FRESNEDA, R. *et al.* The Production of Reactive Oxygen Species Is a Universal Action Mechanism of Amphotericin B against Pathogenic Yeasts and Contributes to the Fungicidal Effect of This Drug. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 58, n. 11, p. 6627-6638, 2014.

MESSINA, F. A.; MARIN, E.; CACERES, D. H.; ROMERO, M. *et al.* Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in a Patient with Disseminated Histoplasmosis and HIV—A Case Report from Argentina and Literature Review. **Journal of Fungi**, 6, n. 4, 2020.

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

MITCHELL, K. F.; ZARNOWSKI, R.; SANCHEZ, H.; EDWARD, J. A. *et al.* Community participation in biofilm matrix assembly and function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 112, n. 13, p. 4092-4097, 2015.

MITTAL, J.; PONCE, M. G.; GENDLINA, I.; NOSANCHUK, J. D. *Histoplasma Capsulatum*: Mechanisms for Pathogenesis. In: RODRIGUES, M. L. (Ed.). **Fungal Physiology and Immunopathogenesis**. Cham: Springer International Publishing, p. 157-191, 2019.

MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratório de saúde**. 2012.

MOSTAFA, M. S.; AWAD, A. Association of ADH1 and DDR48 expression with azole resistance in *Candida albicans*. **The International Arabic Journal of Antimicrobial Agents**, 4, n. 3, 2014.

MOURA, M. P. S. G. **Padronização da tecnologia de cultivo tridimensional escalonável para engenharia de cartilagem**. 2015. 70 f. (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, Duque de Caxias, Rio de Janeiro.

MOWAT, E.; WILLIAMS, C.; JONES, B.; MCCHLERY, S. *et al.* The characteristics of *Aspergillus fumigatus* mycetoma development: is this a biofilm? **Medical Mycology**, 47, n. sup1, p. S120-S126, 2009.

MUNIZ, M. D. M. **Caracterização molecular de *Histoplasma capsulatum* isolados no Brasil**. 2009. 110 f. (Tese (doutorado)) - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, FIOCRUZ, Rio de Janeiro - Brasil.

NAGAPPAN, V.; DERESINSKI, S. Reviews of anti-infective agents: posaconazole: a broad-spectrum triazole antifungal agent. **Clin Infect Dis**, 45, n. 12, p. 1610-1617, Dec 15 2007.

NAKANO, N.; FUKUHARA-TAKAKI, K.; JONO, T.; NAKAJOU, K. *et al.* Association of advanced glycation end products with A549 cells, a human pulmonary epithelial cell line, is mediated by a receptor distinct from the scavenger receptor family and RAGE. **J Biochem**, 139, n. 5, p. 821-829, May 2006.

NEDERMAN, T.; NORLING, B.; GLIMELIUS, B.; CARLSSON, J. *et al.* Demonstration of an Extracellular Matrix in Multicellular Tumor Spheroids. **Cancer Research**, 44, n. 7, p. 3090, 1984.

NIELSEN, K.; VEDULA, P.; SMITH, K. D.; MEYA, D. B. *et al.* Activity of VT-1129 against *Cryptococcus neoformans* clinical isolates with high fluconazole MICs. **Medical Mycology**, 55, n. 4, p. 453-456, 2016.

NIETO, M. J.; LUPTON, H. K. Indole and Indoline Scaffolds in Antimicrobials: Overview, Synthesis, and Recent Advances in Antimicrobial Research. **Curr Med Chem**, Nov 1 2020.

OCHOA-PACHECO, A.; ESCALONA ARRANZ, J. C.; BEAVEN, M.; PERES-ROSES, R. *et al.* Bioassay-guided In vitro Study of the Antimicrobial and Cytotoxic Properties of the Leaves from *Excoecaria Lucida* Sw. **Pharmacognosy Res**, 9, n. 4, p. 396-400, Oct-Dec 2017.

OECD. Guidelines for the testing of chemicals. Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. Organisation for Economic Co-operation and Development. Paris, France, 2013.

OECD, O.; DEVELOPMENT, F. E. C.-O. A. Guideline for Testing of Chemicals – Guidance Document 129: Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests, 2010.

OH, S.; GO, G. W.; MYLONAKIS, E.; KIM, Y. The bacterial signalling molecule indole attenuates the virulence of the fungal pathogen *Candida albicans*. **J Appl Microbiol**, 113, n. 3, p. 622-628, Sep 2012.

OSMAN MOHAMED, A.; SULIMAN MOHAMED, M.; ABDELRAHMAN HUSSAIN, M.; FATAHALRAHMAN AHMED, I. Detection of antifungal drug-resistant and ERG11 gene mutations among clinical isolates of *Candida* species isolated from Khartoum, Sudan. **F1000Research**, 9, p. 1050, 2021.

OWEN, M. R.; BYRNE, H. M.; LEWIS, C. E. Mathematical modelling of the use of macrophages as vehicles for drug delivery to hypoxic tumour sites. **Journal of Theoretical Biology**, 226, n. 4, p. 377-391, 2004/02/21/ 2004.

PAGNIEZ, F.; LEBOUVIER, N.; NA, Y. M.; OURLIAC-GARNIER, I. *et al.* Biological exploration of a novel 1,2,4-triazole-indole hybrid molecule as antifungal agent. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, 35, n. 1, p. 398-403, 2020.

PALACE-BERL, F.; PASQUALOTO, K. F. M.; ZINGALES, B.; MORAES, C. B. *et al.* Investigating the structure-activity relationships of N'-[(5-nitrofuran-2-yl) methylene] substituted hydrazides against Trypanosoma cruzi to design novel active compounds. **Eur J Med Chem**, 144, p. 29-40, Jan 20 2018.

PANDOLFI, F.; D'ACIERNO, F.; BORTOLAMI, M.; DE VITA, D. *et al.* Searching for new agents active against Candida albicans biofilm: A series of indole derivatives, design, synthesis and biological evaluation. **Eur J Med Chem**, 165, p. 93-106, Mar 1 2019.

PEIGNE, V.; LIDOVE, O.; CHAUCHARD, M.; ROUSSEAU, A. *et al.* [Histoplasmosis leading to diagnosis of HIV infection]. **Presse Med**, 35, n. 12 Pt 1, p. 1849-1850, Dec 2006.

PEYTON, L. R.; GALLAGHER, S.; HASHEMZADEH, M. Triazole antifungals: a review. **Drugs Today (Barc)**, 51, n. 12, p. 705-718, Dec 2015.

PIATEK, M.; SHEEHAN, G.; KAVANAGH, K. Galleria mellonella: The Versatile Host for Drug Discovery, In Vivo Toxicity Testing and Characterising Host-Pathogen Interactions. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, 10, n. 12, p. 1545, 2021.

PINE, L.; MALCOLM, G. B.; GROSS, H.; GRAY, S. B. Evaluation of purified H and M antigens of histoplasmin as reagents in the complement fixation test. **Sabouraudia**, 16, n. 4, p. 257-269, Dec 1978.

PITANGUI, N. D. S. **REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL, METABÓLICA E PERFIL DE MICRORNAs DOS BIOFILMES DE Histoplasma capsulatum: GENES, METABÓLITOS E RNAs NÃO CODIFICANTES COMO ALVOS TERAPÊUTICOS E/OU BIOMARCADORES**. 2017. 245 f. (Tese de doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP

PITANGUI, N. S.; DE LACORTE SINGULANI, J.; SARDI, J. C. O.; DE SOUZA, P. C. *et al.* Differential miRNA Expression in Human Macrophage-Like Cells Infected with Histoplasma capsulatum Yeasts Cultured in Planktonic and Biofilm Forms. **J Fungi (Basel)**, 7, n. 1, Jan 18 2021.

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

PONTÓN, J.; RÜCHEL, R.; CLEMONS, K. V.; COLEMAN, D. C. *et al.* Emerging pathogens. **Medical Mycology**, 38, n. Supplement_1, p. 225-236, 2000.

POOJA; PRASHER, P.; SINGH, P.; PAWAR, K. *et al.* Synthesis of amino acid appended indoles: appreciable anti-fungal activity and inhibition of ergosterol biosynthesis as their probable mode of action. **Eur J Med Chem**, 80, p. 325-339, Jun 10 2014.

PRASAD, R.; SHAH, A. H.; RAWAL, M. K. Antifungals: Mechanism of Action and Drug Resistance. **Advances in experimental medicine and biology**, 892, p. 327-349, 2016.

PRESS, J. B.; WRIGHT, W. B., JR.; CHAN, P. S.; HAUG, M. F. *et al.* Thromboxane synthetase inhibitors and antihypertensive agents. 3. N-[(1H-imidazol-1-yl)alkyl]heteroaryl amides as potent enzyme inhibitors. **J Med Chem**, 30, n. 6, p. 1036-1040, Jun 1987.

PROCTOR, W. R.; FOSTER, A. J.; VOGT, J.; SUMMERS, C. *et al.* Utility of spherical human liver microtissues for prediction of clinical drug-induced liver injury. **Arch Toxicol**, 91, n. 8, p. 2849-2863, Aug 2017.

PROSKURYAKOV, S. Y.; GABAI, V. L. Mechanisms of tumor cell necrosis. **Curr Pharm Des**, 16, n. 1, p. 56-68, Jan 2010.

QUEIROZ-TELLES, F.; ESCUISSATO, D. L. Pulmonary paracoccidioidomycosis. **Semin Respir Crit Care Med**, 32, n. 6, p. 764-774, Dec 2011.

RAMAGE, G.; RAJENDRAN, R.; SHERRY, L.; WILLIAMS, C. Fungal Biofilm Resistance. **International Journal of Microbiology**, 2012, p. 528521, 2012/02/08 2012.

RAPPLEYE, C. A.; EISSENBERG, L. G.; GOLDMAN, W. E. Histoplasma capsulatum alpha-(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the beta-glucan receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 104, n. 4, p. 1366-1370, Jan 23 2007.

RAVI, M.; PARAMESH, V.; KAVIYA, S. R.; ANURADHA, E. *et al.* 3D cell culture systems: advantages and applications. **Journal of cellular physiology**, 230, n. 1, p. 16-26, 2015.

ROBINSON, N. B.; KRIEGER, K.; KHAN, F. M.; HUFFMAN, W. *et al.* The current state of animal models in research: A review. **Int J Surg**, 72, p. 9-13, Dec 2019.

RODRIGUES, A. M.; BEALE, M. A.; HAGEN, F.; FISHER, M. C. *et al.* The global epidemiology of emerging Histoplasma species in recent years. **Studies in Mycology**, 97, p. 100095, 2020.

ROMERO, F. J.; ZUKOWSKI, D.; MUELLER-KLIESER, W. Glutathione content of V79 cells in two- or three-dimensional culture. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, 272, n. 5, p. C1507-C1512, 1997.

SALEH, N. A. **Cultura celular tridimensional: desenvolvimento de um modelo para avaliação da relação entre o microambiente tumoral e a ação de novos agentes antitumorais**. 2017. 112 f. (Doutorado) - Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

SALZER, H. J. F.; BURCHARD, G.; CORNELLY, O. A.; LANGE, C. *et al.* Diagnosis and Management of Systemic Endemic Mycoses Causing Pulmonary Disease. **Respiration**, 96, n. 3, p. 283-301, 2018.

SAMROT, A. V.; ABUBAKAR MOHAMED, A.; FARADJEVA, E.; SI JIE, L. *et al.* Mechanisms and Impact of Biofilms and Targeting of Biofilms Using Bioactive Compounds- A Review. **Medicina (Kaunas)**, 57, n. 8, Aug 18 2021.

SANGALLI-LEITE, F.; SCORZONI, L.; MESA-ARANGO, A. C.; CASAS, C. *et al.* Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst. **Microbes and Infection**, 13, n. 5, p. 457-467, 2011.

SANGLARD, D. Emerging Threats in Antifungal-Resistant Fungal Pathogens. **Frontiers in Medicine**, 3, n. 11, 2016-March-15 2016. Review.

SARDI JDE, C.; PITANGUI NDE, S.; VOLTAN, A. R.; BRAZ, J. D. *et al.* In vitro *Paracoccidioides brasiliensis* biofilm and gene expression of adhesins and hydrolytic enzymes. **Virulence**, 6, n. 6, p. 642-651, 2015.

SCHREIBER-BRYNZAK, E.; KLAPPROTH, E.; UNGER, C.; LICHTSCHEIDL-SCHULTZ, I. *et al.* Three-dimensional and co-culture models for preclinical evaluation of metal-based anticancer drugs. **Investigational New Drugs**, 33, n. 4, p. 835-847, 2015.

SCORZONI, L.; DE LUCAS, M. P.; MESA-ARANGO, A. C.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. *et al.* Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile. **PLoS One**, 8, n. 3, p. e60047, 2013.

SCORZONI, L.; DE PAULA E SILVA, A. C. A.; MARCOS, C. M.; ASSATO, P. A. *et al.* Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis. **Frontiers in Microbiology**, 8, n. 36, 2017-January-23 2017. Review.

SEBGHATI, T. S.; ENGLE, J. T.; GOLDMAN, W. E. Intracellular Parasitism by *Histoplasma capsulatum*: Fungal Virulence and Calcium Dependence. **Science**, 290, n. 5495, p. 1368-1372, 2000.

SEBGHATI, T. S.; ENGLE, J. T.; GOLDMAN, W. E. Intracellular parasitism by *Histoplasma capsulatum*: fungal virulence and calcium dependence. **Science**, 290, n. 5495, p. 1368-1372, Nov 17 2000.

SEPÚLVEDA, V. E.; MÁRQUEZ, R.; TURISSINI, D. A.; GOLDMAN, W. E. *et al.* Genome Sequences Reveal Cryptic Speciation in the Human Pathogen *Histoplasma capsulatum*. **mBio**, 8, n. 6, Dec 5 2017.

SEPÚLVEDA, V. E.; MÁRQUEZ, R.; TURISSINI, D. A.; GOLDMAN, W. E. *et al.* Genome Sequences Reveal Cryptic Speciation in the Human Pathogen *Histoplasma capsulatum*. **mBio**, 8, n. 6, p. e01339-01317, 2017.

SHENG, S.; SCHUSTER, S. M. Purification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* DNA damage-responsive protein 48 (DDRP 48). **Journal of Biological Chemistry**, 268, n. 7, p. 4752-4758, 1993.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. PARACOCIDIOIDOMYCOSIS TREATMENT. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 57 Suppl 19, n. Suppl 19, p. 31-37, Sep 2015.

SILVA; S, D. **Desenvolvimento do cultivo 3D a partir de células primarias de neoplasias mamárias caninas: estudo do apoptose sobre efeito ou não da carboplatina**. 2014. (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP).

SILVA, A. C. A. D. P. E.; OLIVEIRA, H. C.; SILVA, J. F.; SANGALLI-LEITE, F. *et al.* Microplate alamarBlue Assay for Paracoccidioides Susceptibility Testing. **Journal of Clinical Microbiology**, 51, n. 4, p. 1250-1252, 2013.

SINGULANI, J. D. L.; SCORZONI, L.; GOMES, P. C.; NAZARÉ, A. C. *et al.* Activity of gallic acid and its ester derivatives in Caenorhabditis elegans and zebrafish (Danio rerio) models. **Future Medicinal Chemistry**, 9, n. 16, p. 1863-1872, 2017.

SINGULANI, J. L.; GALEANE, M. C.; RAMOS, M.; GOMES, P. C. *et al.* Antifungal Activity, Toxicity, and Membranolytic Action of a Mastoparan Analog Peptide. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 9, 2019.

SINGULANI, J. L.; SCORZONI, L.; GOMES, P. C.; NAZARÉ, A. C. *et al.* Activity of gallic acid and its ester derivatives in Caenorhabditis elegans and zebrafish (Danio rerio) models. **Future Med Chem**, 9, n. 16, p. 1863-1872, Oct 2017.

SINGULANI, J. L.; SCORZONI, L.; LOURENCETTI, N. M. S.; OLIVEIRA, L. R. *et al.* Potential of the association of dodecyl gallate with nanostructured lipid system as a treatment for paracoccidioidomycosis: In vitro and in vivo efficacy and toxicity. **Int J Pharm**, 547, n. 1-2, p. 630-636, Aug 25 2018.

SMITH, K. D.; ACHAN, B.; HULLSIEK, K. H.; MCDONALD, T. R. *et al.* Increased Antifungal Drug Resistance in Clinical Isolates of Cryptococcus neoformans in Uganda. **Antimicrob Agents Chemother**, 59, n. 12, p. 7197-7204, Dec 2015.

SNEDDON, L. U.; HALSEY, L. G.; BURY, N. R. Considering aspects of the 3Rs principles within experimental animal biology. **Journal of Experimental Biology**, 220, n. 17, p. 3007-3016, 2017.

SOKOL-ANDERSON, M. L.; BRAJTBURG, J.; MEDOFF, G. Amphotericin B-Induced Oxidative Damage and Killing of Candida albicans. **The Journal of Infectious Diseases**, 154, n. 1, p. 76-83, 1986.

SPEC, A.; CONNOLLY, P.; MONTEJANO, R.; WHEAT, L. J. In vitro activity of isavuconazole against fluconazole-resistant isolates of Histoplasma capsulatum. **Medical Mycology**, 56, n. 7, p. 834-837, 2017.

STASCHKE, K. A.; DEY, S.; ZABORSKE, J. M.; PALAM, L. R. *et al.* Integration of general amino acid control and target of rapamycin (TOR) regulatory pathways in nitrogen assimilation in yeast. **The Journal of biological chemistry**, 285, n. 22, p. 16893-16911, 2010.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D. G.; COSTERTON, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annu Rev Microbiol**, 56, p. 187-209, 2002.

STREISINGER, G.; WALKER, C.; DOWER, N.; KNAUBER, D. *et al.* Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). **Nature**, 291, n. 5813, p. 293-296, May 28 1981.

SUN, S.; HOY, M. J.; HEITMAN, J. Fungal pathogens. **Curr Biol**, 30, n. 19, p. R1163-r1169, Oct 5 2020.

SUNDIN, J.; MORGAN, R.; FINNØEN, M. H.; DEY, A. *et al.* On the Observation of Wild Zebrafish (*Danio rerio*) in India. **Zebrafish**, 16, n. 6, p. 546-553, Dec 2019.

SURIYAMPOLA, P. S.; SHELTON, D. S.; SHUKLA, R.; ROY, T. *et al.* Zebrafish Social Behavior in the Wild. **Zebrafish**, 13, n. 1, p. 1-8, Feb 2016.

SUÁREZ-ÁLVAREZ, R. O.; SAHAZA, J. H.; BERZUNZA-CRUZ, M.; BECKER, I. *et al.* Dimorphism and Dissemination of *Histoplasma capsulatum* in the Upper Respiratory Tract after Intranasal Infection of Bats and Mice with Mycelial Propagules. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, 101, n. 3, p. 716-723, 2019.

SZABO, M.; SVENSSON AKUSJÄRVI, S.; SAXENA, A.; LIU, J. *et al.* Cell and small animal models for phenotypic drug discovery. **Drug design, development and therapy**, 11, p. 1957-1967, 2017.

TANGALLAPALLY, R. P.; YENDAPALLY, R.; LEE, R. E.; HEVENER, K. *et al.* Synthesis and evaluation of nitrofuranylamides as novel antituberculosis agents. **J Med Chem**, 47, n. 21, p. 5276-5283, Oct 7 2004.

TAWARI, N. R.; BAIRWA, R.; RAY, M. K.; RAJAN, M. G. R. *et al.* Design, synthesis, and biological evaluation of 4-(5-nitrofur-2-yl)prop-2-en-1-one derivatives as potent antitubercular agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 20, n. 21, p. 6175-6178, 2010.

TEIXEIRA, M. D. M.; PATANÉ, J. S. L.; TAYLOR, M. L.; GÓMEZ, B. L. *et al.* Worldwide Phylogenetic Distributions and Population Dynamics of the Genus *Histoplasma*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 10, n. 6, p. e0004732, 2016.

TEVIS, K. M.; COLSON, Y. L.; GRINSTAFF, M. W. Embedded Spheroids as Models of the Cancer Microenvironment. **Adv Biosyst**, 1, n. 10, Oct 2017.

THANNICKAL, V. J.; FANBURG, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 279, n. 6, p. L1005-1028, Dec 2000.

TOWER, J. Programmed cell death in aging. **Ageing Res Rev**, 23, n. Pt A, p. 90-100, Sep 2015.

TRAVERSA, D.; JOACHIM, A. The 3Rs Concept: Time to Change How We Evaluate the Efficacy of Anthelmintics in Companion Animals. **Trends in parasitology**, 34 1, p. 41-52, 2018.

TREGER, J. M.; MCENTEE, K. Structure of the DNA damage-inducible gene DDR48 and evidence for its role in mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and cellular biology**, 10, n. 6, p. 3174-3184, 1990.

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

VASO, C. O.; BILA, N. M.; PANDOLFI, F.; DE VITA, D. *et al.* Evaluation of the Anti-Histoplasma capsulatum Activity of Indole and Nitrofurane Derivatives and Their Pharmacological Safety in Three-Dimensional Cell Cultures. **Pharmaceutics**, 14, n. 5, 2022.

VASO, C. O.; PANDOLFI, F.; BILA, N. M.; DE VITA, D. *et al.* Synthesis and Evaluation of the Antifungal and Toxicological Activity of Nitrofurane Derivatives. **Pharmaceutics**, 14, n. 3, p. 593, 2022.

VENNIRO, M.; CAPRIOLI, D.; SHAHAM, Y. Chapter 2 - Animal models of drug relapse and craving: From drug priming-induced reinstatement to incubation of craving after voluntary abstinence. *In*: EKHTIARI, H. e PAULUS, M. P. (Ed.). **Progress in Brain Research**: Elsevier, 2016. v. 224, p. 25-52.

VILA, T.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Screening the Pathogen Box for Identification of *Candida albicans* Biofilm Inhibitors. **Antimicrob Agents Chemother**, 61, n. 1, Jan 2017.

VITE-GARÍN, T.; ESTRADA-BÁRCENAS, D. A.; GERNANDT, D. S.; REYES-MONTES, M. D. *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**, 7, n. 7, 2021.

WANG, A.; WELDRICK, P. J.; MADDEN, L. A.; PAUNOV, V. N. Enhanced clearing of *Candida* biofilms on a 3D urothelial cell in vitro model using lysozyme-functionalized fluconazole-loaded shellac nanoparticles. **Biomaterials Science**, 9, n. 20, p. 6927-6939, 2021.

WEAVER, C. H.; SHEEHAN, K. C.; KEATH, E. J. Localization of a yeast-phase-specific gene product to the cell wall in *Histoplasma capsulatum*. **Infect Immun**, 64, n. 8, p. 3048-3054, Aug 1996.

WELLS, M. F.; SALICK, M. R.; WISKOW, O.; HO, D. J. *et al.* Genetic Ablation of AXL Does Not Protect Human Neural Progenitor Cells and Cerebral Organoids from Zika Virus Infection. **Cell Stem Cell**, 19, n. 6, p. 703-708, 2016.

WHEAT, L. J.; AZAR, M. M.; BAHR, N. C.; SPEC, A. *et al.* Histoplasmosis. **Infect Dis Clin North Am**, 30, n. 1, p. 207-227, Mar 2016.

WHEAT, L. J.; CONNOLLY, P.; SMEDEMA, M.; BRIZENDINE, E. *et al.* Emergence of Resistance to Fluconazole as a Cause of Failure during Treatment of Histoplasmosis in

Patients with Acquired Immunodeficiency Disease Syndrome. **Clinical Infectious Diseases**, 33, n. 11, p. 1910-1913, 2001.

WHEAT, L. J.; CONNOLLY, P.; SMEDEMA, M.; DURKIN, M. *et al.* Activity of newer triazoles against *Histoplasma capsulatum* from patients with AIDS who failed fluconazole. **J Antimicrob Chemother**, 57, n. 6, p. 1235-1239, Jun 2006.

WHEAT, L. J.; FREIFELD, A. G.; KLEIMAN, M. B.; BADDLEY, J. W. *et al.* Clinical practice guidelines for the management of patients with histoplasmosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**, 45, n. 7, p. 807-825, Oct 1 2007.

World Health Organization (WHO). Fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. Geneva: **World Health Organization**; 2022.

WILFINGER, W. W.; MACKEY, K.; CHOMCZYNSKI, P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. **Biotechniques**, 22, n. 3, p. 474-476, 478-481, Mar 1997.

WU, S.; WANG, Y.; LIU, N.; DONG, G. *et al.* Tackling Fungal Resistance by Biofilm Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, 60, n. 6, p. 2193-2211, 2017.

XIAO, J.; ZHANG, Y.; WANG, J.; YU, W. *et al.* Monitoring of Cell Viability and Proliferation in Hydrogel-Encapsulated System by Resazurin Assay. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 162, n. 7, p. 1996-2007, 2010.

XU, M.-N.; LI, L.; PAN, W.; ZHENG, H.-X. *et al.* Zinc Oxide Nanoparticles Prime a Protective Immune Response in *Galleria mellonella* to Defend Against *Candida albicans*. **Frontiers in Microbiology**, 12, 2021-December-10 2021. Original Research.

XU, X.; GURSKI, L. A.; ZHANG, C.; HARRINGTON, D. A. *et al.* Recreating the tumor microenvironment in a bilayer, hyaluronic acid hydrogel construct for the growth of prostate cancer spheroids. **Biomaterials**, 33, n. 35, p. 9049-9060, 2012.

YOUSEFF, B. H.; HOLBROOK, E. D.; SMOLNYCKI, K. A.; RAPPLEYE, C. A. Extracellular superoxide dismutase protects *Histoplasma* yeast cells from host-derived oxidative stress. **PLoS pathogens**, 8, n. 5, p. e1002713-e1002713, 2012.

ZAMITH-MIRANDA, D.; HEYMAN, H. M.; BURNET, M. C.; COUVILLION, S. P. *et al.* A *Histoplasma capsulatum* lipid metabolic map identifies antifungal targets and virulence factors. **bioRxiv**, p. 2020.2003. 2002.973412, 2021.

ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; REISS E FAU - LOTT, T. J.; LOTT TJ FAU - MAYER, L. W.; MAYER LW FAU - DEEPE, G. S., JR. *et al.* Molecular cloning, characterization, and expression of the M antigen of *Histoplasma capsulatum*. n. 0019-9567 (Print), 1999.

ZHAO, H.; GUO, W.; QUAN, W.; JIANG, J. *et al.* Occurrence and levels of nitrofurantol metabolites in sea cucumber from Dalian, China. **Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess**, 33, n. 11, p. 1672-1677, Nov 2016.

ZWOLAK, I. Comparison of three different cell viability assays for evaluation of vanadyl sulphate cytotoxicity in a Chinese hamster ovary K1 cell line. **Toxicology and Industrial Health**, 32, n. 6, p. 1013-1025, 2016/06/01 2014.