

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **Dissertação** será disponibilizado somente a partir de 27/06/2025.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à
Farmácia

Angélica Romão Carvalho

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

Araraquara, SP

2023

Angélica Romão Carvalho

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

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Marisa Fusco-Almeida
Coorientador: Dr. Paulo César Gomes

**Araraquara, SP
2023**

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

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

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

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: ANGÉLICA ROMÃO CARVALHO

ORIENTADORA: ANA MARISA FUSCO ALMEIDA

COORDENADOR: PAULO CESAR GOMES

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

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

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

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

Araraquara, 27 de junho de 2023

AGRADECIMENTOS

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

Ao meu companheiro, Diego, sempre paciente e carinhoso.

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

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

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

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

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

KEYWORDS: *Histoplasma*, peptide, biofilm.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Valores médios de absorvância relativos à quantificação de biomassa para as cepas G186A (A) e EH-315 (B) expostos aos peptídeos MK58911 e MK4589. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.....38
- Figura 2.** Valores médios de absorvância relativos à toxicidade nos modelos celulares monocamada (A) e esferóide (B) expostos ao peptídeo MK58911. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ** $p < 0,01$ comparado ao grupo controle.....44
- Figura 3.** Curvas de sobrevivência das larvas de *T. molitor* expostas ao peptídeo MK58911.....46
- Figura 4.** Fotografia das larvas de *T. molitor* expostas ao peptídeo MK58911 em 0 horas (A) e 120 horas (B) após exposição.....47
- Figura 5.** Porcentagem de formação de pupas em 120 horas após exposição ao peptídeo MK58911. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.....47
- Figura 6.** Curvas de sobrevivência dos embriões de *Danio rerio* expostos ao peptídeo MK58911.....48
- Figura 7.** Frequência de movimentos espontâneos dos embriões expostos ao peptídeo MK58911 em 24 hpf.....50
- Figura 8.** Médias de batimentos cardíacos nos embriões expostos ao peptídeo MK58911 em 48 hpf. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ 51
- Figura 9.** Médias das dosagens espectrofotométricas do peptídeo MK58911 durante acoplamento à resina. Absorvância em UV a 280nm.....52
- Figura 10.** Cromatograma das frações P0 e P1.....52

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

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

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1. Peptídeos analisados no ensaio de determinação da sensibilidade fúngica e suas estruturas.....	27
Tabela 2. Resumo das porcentagens de inibição de biomassa estatisticamente significantes para as cepas G186A e EH-315.....	38
Tabela 3. Valores de CIM dos fármacos anfotericina B e itraconazol para ambas as cepas de <i>H. capsulatum</i>	39
Tabela 4. Valores de CIM, CIM combinada e ICIF para as cepas G186A e EH-315.....	42
Tabela 5. Valores de inibição da viabilidade metabólica e IC50 para a linhagem A549 nos modelos monocamada e esferóide após tratamento com o peptídeo MK58911.....	45
Tabela 6. Parâmetros de análise e seus resultados em embriões e larvas jovens de <i>Danio rerio</i>	49
Tabela 7. Tabela de contingência contendo as frequências (n) e porcentagens (%) de movimentos espontâneos observados em 20s para o grupo controle e grupos expostos ao MK58911.....	50
Quadro 1. Esquema das microplacas montadas para o ensaio de atividade sinérgica. Valores de concentração final dos compostos em µg/mL. Valores em itálico: MK58911, Valores em negrito: itraconazol. CE: controle de esterilidade, CC: controle de crescimento.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN: acetonitrila

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

AMPs: *antimicrobial peptides* (peptídeos antimicrobianos)

CIF: concentração inibitória fracionada

CIM: concentração inibitória mínima

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

HAM-F12: Ham's F12 Nutrient Mixture

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

IC50: concentração inibitória média

ICIF: índice de concentração inibitória fracionada

IFN- γ : interferon-gama

IL-12: interleucina 12

LAAC: leupeptina, aprotinina, antipaina, quimiostatina

LC50: concentração letal média

MS-222: tricaína metassulfonada

MKs: peptídeos análogos de mastoparanos

OMS: Organização Mundial da Saúde

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

PMSF: fenil metil sufonil fluoreto

RPMI-1640: Roswell Park Memorial Institute 1640

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida

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

TFA: ácido trifluoroacético

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

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

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Histoplasma capsulatum* E A HISTOPLASMOSE

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2. BIOFILMES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS (AMPs)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.4. MODELOS CELULARES

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

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

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

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

1.5. MODELO ALTERNATIVO *Danio rerio*

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

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

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

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

1.6. MODELO ALTERNATIVO *Tenebrio molitor*

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

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

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

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

5. CONCLUSÃO

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

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

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

A realização da cromatografia de afinidade inicialmente permitiu determinar os parâmetros experimentais mais adequados para a análise, a qual futuramente deve ser realizada novamente e complementada com outros ensaios. O objetivo deste experimento foi isolar proteínas do *H. capsulatum* que poderiam ter afinidade ao MK58911. Deste modo, mesmo utilizando apenas a forma planctônica do *H. capsulatum*, foi possível observar a existência de duas bandas diferenciais no SDS-PAGE relativas à interação entre o extrato proteico e o MK58911. Tal resultado indica que há interações entre as proteínas fúngicas e o peptídeo, o que poderia sugerir a existência de mecanismos de ação que expliquem a diminuição na formação do biofilme sem a alteração de viabilidade metabólica observada para o *H. capsulatum* tratado com o MK58911.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

BALTAZAR, L. M. et al. Concentration-dependent protein loading of extracellular vesicles released by *Histoplasma capsulatum* after antibody treatment and its modulatory action upon macrophages. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 8065, 23 maio 2018.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

GUIMARÃES, A. J. et al. *Histoplasma capsulatum* Heat-Shock 60 Orchestrates the Adaptation of the Fungus to Temperature Stress. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. e14660, 10 fev. 2011.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

9, 2019.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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