

## RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta **Dissertação** será disponibilizado somente a partir de 21/03/2022.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

**Kelvin Sousa dos Santos**

**DESENVOLVIMENTO DE MODELO TRIDIMENSIONAL DE CULTURA  
CELULAR PARA ESTUDOS DE INTERAÇÃO FUNGO-HOSPEDEIRO**

Araraquara

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

**Kelvin Sousa dos Santos**

**DESENVOLVIMENTO DE MODELO TRIDIMENSIONAL DE CULTURA  
CELULAR PARA ESTUDOS DE INTERAÇÃO FUNGO-HOSPEDEIRO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biotecnologia aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP como pré-requisito para obtenção do título de Mestre.

**ORIENTADOR:** PROF. DR. ANDREI MOROZ

**COORIENTADORA:** PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. ANA MARISA FUSCO ALMEIDA

Araraquara

2020

---

**S237d** Santos, Kelvin Sousa dos.  
Desenvolvimento de modelo tridimensional de cultura celular para estudos de interação fungo-hospedeiro / Kelvin Sousa dos Santos. – Araraquara: [S.n.], 2020.  
97 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 concentração:.

Orientador: Andrei Moroz.  
Coorientadora: Ana Marisa Fusco Almeida.

1. Cultura 3D. 2. Alginato de sódio. 3. Interação fungo-hospedeiro. 4. Pérolas de alginato. I. Moroz, Andrei, orient. II. Almeida, Ana Marisa Fusco, coorient. III. Título.

---

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

**CAPES: 33004030081P7**  
**Esta ficha não pode ser modificada**

KELVIN SOUSA DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE MODELO TRIDIMENSIONAL DE CULTURA  
CELULAR PARA ESTUDOS DE INTERAÇÃO FUNGO-HOSPEDEIRO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP como pré-requisito para obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Andrei Moroz – (Orientador) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP FCF)

---

Profa. Dra. Elenice Deffune – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP FMB)

---

Profa. Dra. Renata Rosito Tonelli – Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

Este trabalho foi desenvolvido na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/SP – UNESP, sendo o mestrando contemplado com bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq. O projeto contou, também, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (processo nº 2013/05853-1)

## Dedicatória

Dedico este trabalho as pessoas que me permitiram chegar até aqui, a minha mãe Angela que sempre apoiou todas as minhas decisões, e ao meu pai Nilson.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado várias oportunidades na vida, e dentre elas ter me feito escolher essa para esse momento.

Agradeço imensamente a minha mãe Angela por sempre concordar e apoiar todas as minhas escolhas sem questionamentos ou julgamentos, apenas desejando que tudo desse certo, e estando certa em todas as vezes que me aconselhou. Ao meu pai Nilson e todos os ensinamentos que me deu durante a minha vida, esses que guardarei para sempre.

A minha tia Odete Alegre pelos pequenos incentivos na minha educação, desde que era criança e que hoje se tornaram imensuráveis para mim.

A minha professora de ciências Erika Oliveira que já sabia que eu estaria aqui antes mesmo de mim, e que teve um papel enorme na minha vida acadêmica, obrigado por ter me incentivado desde criança a ler as revistinhas de ciência da escola e pelas histórias do seu mestrado e doutorado, mesmo que eu ainda não soubesse muito bem o que isso significava naquela época, e obrigado por sempre ter acreditado em mim.

Ao meu orientador Dr. Prof. Andrei Moroz por ter me recebido em seu laboratório, e ter me dado a oportunidade de trabalhar com o que eu sempre tive vontade de fazer, agradeço pela orientação e todo trabalho que realizamos aqui.

A minha coorientadora Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Marisa Fusco Almeida, por ter me recebido também no núcleo de proteômica com tanta prontidão e pela importante ajuda no desenvolvimento desse trabalho, deixando seu laboratório de portas abertas para mim, muito obrigado.

A Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Maria José, pela importante receptividade no núcleo de proteômica, assim como nas reuniões do grupo de Micologia que foram de grande ajuda.

Ao pessoal do meu laboratório por tornar tempos difíceis, em dias mais leves, Marina Fontes por ter me ensinado tanto sobre cultura de celular, sempre vou lembrar de tudo que aprendi com você em cada coisinha que eu fizer, agradeço também a Franciny por toda ajuda, e ao Breno que mesmo a pouco tempo no laboratório já foi



de grande ajuda, espero que vocês continuem contribuindo para a área de anticorpos monoclonais do nosso laboratório.

As pessoas que me ajudavam nos momentos de maior desespero, Junya Singulani e Lariane Teodoro, Junya muito obrigado por sempre ter tirado todas as minhas dúvidas, mesmo que as vezes a uma grande distância, por sua seriedade e todos os conselhos. Lari muito obrigado por toda a ajuda com o Pb, sempre vou lembrar também de toda a sua ajuda e das histórias compartilhadas entre as nossas graduações que mesmo em lugares diferentes, eram sempre tão parecidas, agradeço da paciência de vocês.

A minha amiga Nathália Fregonezi que passou uma graduação inteira comigo compartilhando dos mesmos sofrimentos diários dos estágios do 4<sup>a</sup> ano, e que só a gente sabe como foi. Obrigado por ter me acompanhado nesse mestrado, e por toda a amizade que construímos nesses conturbados 6 anos, olha só quanto tempo já faz. Quem eu vi fazer a matrícula na faculdade mesmo sem me conhecer, e que ainda quase 4 anos depois eu vi casar. Muito obrigado Nat.

As minhas amigas da faculdade da bancada 1, Amanda, Mariana, Giovanna, e Bruna. A Monalisa e a Ju Sorbo também.

Aos meus professores do 4<sup>a</sup> ano de biomedicina, que com certeza foram imprescindíveis para que eu pudesse chegar aqui, Miriane, Adilson, Patrícia, Andrezza, Flávia e principalmente a Juliana Monteiro que me ensinou micologia com muito sacrifício a quem não gostava de leveduras, e que sempre ensinou sua disciplina com muito amor pelo que faz.

A Cláudia Tavares, pela ajuda com os equipamentos do laboratório, com as minhas dúvidas de cultura de células, e pelos cafés. Ao pessoal antigo do laboratório que eu tive o prazer de conhecer a tempo, Haroldo, Priscila, Panta e Laranja.

Ao projeto PIPE Fase II 17/50354-4 da FAPESP e a prof<sup>a</sup> Ketylin Migliato que também foi de ajuda nesse projeto, assim como o projeto FAPESP 8/19083-7 do prof Andrei. Ao CNPQ pela bolsa de mestrado. A todos citados meu muito obrigado.

## RESUMO

A cultura em monocamada tem sido um método padrão e bem estabelecido para diferentes análises celulares *in vitro*, tais como testes de citotoxicidade, mutagenicidade, genotoxicidade e infecções celulares por microrganismos para estudos de doenças. Entretanto, uma das desvantagens desse método são as limitações impostas devido às discrepâncias biológicas entre a cultura em monocamada e o organismo vivo, tridimensional (3D). Existem diversos estudos na literatura que exemplifica a alta semelhança entre culturas 3D e organismos vivos, os quais tem o potencial de gerar dados complementares devido a maior complexidade observada nestes modelos propostos. O presente trabalho propõe o desenvolvimento um modelo alternativo para testes celulares, o qual será envolvido por uma matriz polimérica de alginato de sódio, perfazendo, assim, uma cultura de células 3D. Dessa forma, nessa dissertação, propõe-se uma análise adicional da interação fungo-hospedeiro, utilizando o patógeno *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) como o organismo infectante, o qual até então fora estudado em modelos compostos por uma única camada celular, frequentemente denominada de monocamada. Para o preparo do modelo, uma suspensão de células A549 e MRC-5 foram adicionadas a uma solução de alginato de sódio que foi gotejada em outra solução (cloreto de cálcio) causando a microencapsulação das células em pérolas de alginato, as quais foram monitoradas diariamente em microscopia invertida com contraste de fase e fluorescência. Foram avaliados parâmetros como viabilidade celular (citotoxicidade), atividade metabólica, progressão do número de células (proliferação) utilizando diferentes métodos para ambas as células. Após esta caracterização inicial do modelo 3D, este foi infectado com *P. brasiliensis* por tempo a ser padronizado e as pérolas foram divididas para dois experimentos: i) verificação da presença do fungo dentro do arcabouço e sua possível interação com as células indicadas, utilizando microscopia confocal; ii) tentativa do isolamento do fungo de dentro da pérola e subsequente plaqueamento em meio de cultura próprio. O modelo proposto apresentou baixa citotoxicidade às células A549, indícios de aumento da densidade celular (indicativo de proliferação celular) e manutenção da viabilidade celular durante a maior parte do período de cultivo. Durante as análises de infecção utilizando microscopia confocal, foi possível verificar a presença do fungo dentro do arcabouço testado, o qual foi, então, isolado do mesmo e cultivado em meio de cultura, mostrando também que os componentes da matriz extra-celular

possuem influencia no processo de infecção no modelo tridimensional proposto, além da célula A549 ter se mostrado ideal para estudos de interação tanto para o modelo 3D quanto para a monacamada.

**Palavras-chave:** Cultura 3D. Alginato de sódio. Interação fungo- hospedeiro. Pérolas de alginato.

## ABSTRACT

Monolayer culture has been a standard and well-established method for different in vitro cell analyses, such as cytotoxicity, mutagenicity, genotoxicity and cellular infections by microorganisms for disease studies. However, one of the disadvantages of this method is the limitations imposed due to biological discrepancies between monolayer culture and the living tridimensional (3D) organism. There are several studies in the literature that exemplify the high similarity between 3D cultures and living organisms, which have the potential to generate complementary data due to the greater complexity observed in these proposed models. The present work proposes the development of an alternative model for cellular tests, which will be surrounded by a polymeric matrix of sodium alginate, thus making a culture of 3D cells. Thus, in this dissertation, an additional analysis of the fungus-host interaction is proposed, using the pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) as the infecting organism, which until then had been studied in models composed of a single cell layer, often called monolayer. For model preparation, a suspension of A549 and MRC-5 cells was added to a sodium alginate solution which was dripped into another solution (calcium chloride) causing cell microencapsulation in alginate pearls, which were monitored daily under inverted microscopy with phase contrast and fluorescence. Parameters such as cell viability (cytotoxicity), metabolic activity, progression of the number of cells (proliferation) were evaluated different methods for both cells. After this initial characterization of the 3D model, this was infected with *P. brasiliensis* for time to be standardized and the pearls were divided for two experiments: i) verification of the presence of the fungus within the framework and its possible interaction with the indicated cells, using confocal microscopy; ii) attempt to isolate the fungus from within the pearl and subsequent plating in its own culture medium. The proposed model showed low cytotoxicity to A549 cells, evidence of increased cell density (indicative of cell proliferation) and maintenance of cell viability during most of the culture time. During the analysis of infection using confocal microscopy, it was possible to verify the presence of the fungus within the tested framework, which was then isolated from it and grown in culture medium, also was observed that the components of the extra-cellular matrix have

an influence on infection process in the three-dimensional model, in addition to the A549 cell presents an ideal type of culture for interaction studies as the 3D model as the monolayer.

**Keywords:** 3D culture. Sodium alginate. Fungus-host interaction. Alginate beads.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Modelos de cultura 3D para pesquisa em ciências biomédicas

Diversos métodos de ensaios *in vitro* foram desenvolvidos com base em cultura de células e tecidos humanos, a maioria destes baseados em células depende do crescimento ancorado das mesmas como monocamadas bidimensionais (2D). Estas células, geralmente imortalizadas, permitem etapas de trabalho em culturas simples e eficientes (VERJANS, et. al, 2018). As culturas de células 2D servem como o principal método *in vitro* da pesquisa celular básica e frequentemente são empregadas para estudos de atividade, metabolismo e toxicidade de fármacos antes das etapas *in vivo* (OECD No. 129, 2010). Para o rastreio de medicamentos oncológicos, os ensaios de citotoxicidade são tipicamente realizados em linhagens celulares tumorais estabelecidas, cultivadas em culturas de monocamada, pois estas possuem uma rápida velocidade de proliferação, além disso, faz-se o uso também de linhagens celulares transformadas (ADAN; KIRAZ; BARAN, 2016). Esses tipos de células imortalizadas geralmente não se assemelham à função celular nativa encontrada nas células primárias normais, mas são selecionados para um objetivo específico de pesquisa, devido ao aumento da capacidade proliferativa ou maior eficiência de revestimento (da HORA, et. al, 2019).

A introdução de coculturas, onde células de diferentes fenótipos são cultivadas no mesmo ambiente, representa um maior grau de semelhança *in vivo* em comparação com a cultura em monocamada. (BAKER; CHEN, 2012). Estes sistemas mais avançados são particularmente úteis em estudos que visam entender as interações entre células tumorais epiteliais e células estromais (MOROZ, et. al, 2013<sup>2</sup>) e em estudos nos quais é importante a interação célula-célula para a correta diferenciação de células-tronco ou a manutenção do fenótipo diferenciado de células-tronco que passaram pelo processo de diferenciação (MOROZ, et. al, 2013<sup>1</sup>).

Especificamente, os tecidos epiteliais (tecido de interesse da presente dissertação) são compostos de células dispostas em folhas com fortes ligações intercelulares, que formam barreiras físicas revestindo as cavidades dos principais órgãos (pulmão, pele, intestino, etc.) e os protegem de ações físicas, químicas e

microbianas externas (SCHIMEK, et. al, 2018; BARKAUSKAS, et. al, 2017). Muitos tecidos epiteliais possuem arquitetura espacial tridimensional (3D), como tecidos alongados, tecidos compactos, invaginações, evaginações e morfologias onduladas. Tais estruturas complexas podem gerar gradientes de fatores bioquímicos que conduzem à compartimentalização dos diferentes tipos de células e são determinantes para funções específicas de órgãos (TORRAS, et al, 2018). Modelos funcionais *in vitro* de monocamada são importantes para pesquisa básica, modelagem de doenças, descoberta de medicamentos e substituição de tecidos perfazendo uma demanda crescente por modelos *in vitro* que são capazes de reproduzir a complexa arquitetura epitelial dos tecidos *in vivo*. No entanto, ainda que os modelos 2D possam fornecer informações úteis sobre respostas biológicas precoces e sejam adequados para a triagem de medicamentos de alto rendimento, eles possuem limitada capacidade preditiva (XU; FARACH-CARSON; JIA, 2015).

Atualmente, a maioria dos ensaios com culturas de células em monocamadas as cultivam em substratos planos e rígidos, porém as células raramente encontram tais situações (SKROBANSKA, et. al, 2014); ao contrário, normalmente situam-se em ambientes 3D e são cercadas por outras células e componentes de matriz extracelular (MEC) em todas as direções. Portanto, embora a cultura 2D ainda seja um método importante para estudos baseados em células, pois gera resultados rápidos, suas limitações foram gradativamente observadas em relação às culturas 3D (DAUD, et. al, 2012; SKROBANSKA, et. al, 2014; YI, et. al, 2017; LIN, et. al, 2020). Em um esforço para superar essas limitações e em uma espécie de mudança de paradigma, surgiram modelos 3D que capturaram, de maneira mais fiel, as respostas fisiológicas complexas *in vitro*, mimetizando o ambiente natural do tecido (EDMONDSON, et. al, 2014). Existem muitas características pelas quais esses modelos se assemelham a tecidos saudáveis e a tumores *in vivo*, incluindo interações célula-célula, presença de componentes de matriz, hipóxia, necrose central e resistência a medicamentos (DAUD, et. al, 2012; EDMONDSON, et. al, 2014; XU; FARACH-CARSON; JIA, 2015; YI, et. al, 2017).

Como as matrizes de células 3D representam melhor o ambiente de sinalização física e química, elas atraíram a atenção da comunidade científica e foram utilizadas para diversas aplicações biomédicas/biotecnológicas, tais como engenharia de tecidos e medicina regenerativa (RAVI, et. al, 2014). Estudos de eficácia terapêutica associados com modelos 3D também apresentaram diferenças marcantes nas respostas quando os mesmos são confrontados com culturas em monocamada (CHEN, et. al, 2016). Além disso, modelos 3D são vastamente utilizados para estudos de *screening* de fármacos, muitas vezes buscando gerar similaridades com tumores sólidos a fim de reproduzir algumas das situações que acontecem *in vivo* (GODUGU, et. al, 2013).

Atualmente, existem diversas maneiras de se realizar um cultivo 3D: **i)** órgão em um *chip* (*organ on a chip*); **ii)** esferoides; **iii)** uso de arcabouços porosos rígidos; **iv)** culturas em botão celular (*cell pellet*) e **v)** encapsulação em arcabouços líquidos-sólidos, revisados abaixo.

### **1.1.1 Órgão em um *chip* (*organ on a chip*)**

Órgãos em *chips* são sistemas de cultura de células em sistemas microfluídicos que recapitulam, *in vitro*, a estrutura, função, fisiologia e patologia dos órgãos humanos. Eles foram originalmente fabricados se embasando em métodos adaptados da fabricação de *microchips* de computadores (BEIN, et. al, 2018). O modelo se baseia inicialmente na produção de uma pastilha de silício gerada por fotolitografia coberta com material fotorresistente a luz ultravioleta. O polidimetilsiloxano (PDMS) é então derramado nesse molde, criando assim uma cópia positiva e, posteriormente, essa cópia é selada em uma lâmina de vidro, formando canais de circuito fechado. Todo esse processo é conhecido como litografia refinada. O PDMS é comumente utilizado na miniaturização de órgãos devido às suas propriedades de biocompatibilidade, facilidade em moldar e transparência, permitindo sua fácil visualização (MITTAL, et. al, 2018). Esses dispositivos contêm micro canais ocultos criados em microdispositivos poliméricos ou de vidro, revestidos por células vivas (MITTAL, et. al, 2019). Huh, et al. (2012) criaram um chip de pulmão capaz de simular um edema pulmonar a fim de direcionar estudos de medicamentos para esses modelos, enquanto GAO, et al.



(2013) utilizaram células imortalizadas de intestino (CACO-2) para estudos de permeabilização de fármacos, todos esses estudos procuram usar modelos mais complexos com a intenção de aprimorar as respostas obtidas em culturas em monocamada.

### 1.1.2 Esferoides

Os primeiros relatos de organização celular em esferóides surgiram de acordo com Harmer, (1922); Ellison, (1922); Howarth, (1931), pelo relato de casos de carcinoma onde as lesões apresentavam condições esféricas e se classificavam com essa denominação. Atualmente esse termo compreende técnicas de agregamento de células que tem como principal objeto de estudo a mimetização de tumores com a finalidade de estudar potenciais fármacos (CESAZRS; TAMAMÁ, 2016). A cultura 3D em esferoides se define por manter algumas características fisiológicas mais preservadas (KIM, et. al, 2018). Para a formação desse modelo, as células precisam ser cultivadas em uma condição que não lhes permita aderir a uma superfície sólida e Friedrich, et. al, (2009) descreveu um importante método de fácil execução para formação de esferoides, além de citar linhagens celulares com possíveis dificuldades em se organizarem nessas condições. Posteriormente, publicações também descreveram atualizações e guias sobre maneiras de realizar *screening* de fármacos com estes modelos, citando vantagens tais como observação da massa tumoral, presença de zonas com baixas concentrações de oxigênio - também presentes em tumores *in vivo* - e a similaridade encontrada nos tecidos em relação a dificuldade de acesso de fármacos antineoplásicos. É citado também que neste modelo a resposta das células cancerígenas às intervenções terapêuticas é melhor reproduzida na cultura esferoidal *in vitro* do que na cultura aderente 2D (FRIEDRICH, et. al, 2007<sup>1</sup>; FRIEDRICH, et. al, 2007<sup>2</sup>). Quanto às limitações desse método citam-se que devido a sua estrutura esferoidal, a difusão de nutrientes, oxigênio e resíduos pelo interior dos esferoides é comprometida dependendo do tamanho dos esferoides (CESAZRS; TAMAMÁ, 2016).

### **1.1.3 Arcabouços (*scaffolds*): rígidos ou semi-sólidos**

Culturas utilizando arcabouços - ou andaimes -, podem ser geradas usando vários polímeros naturais (colágeno, gelatina, elastina, fibroína, quitosana, quitina, fibrina, fibrinogênio, plasma rico em plaquetas, celulose, etc.) além de materiais sintéticos (MOROZ, et. al, 2013<sup>1</sup>; MOROZ, et. al, 2013<sup>2</sup>; RAVI, et. al, 2014). Alguns destes possuem sua porosidade variada de forma que ela possa ser grande o suficiente para acomodar uma célula, porém suficiente para a difusão de nutrientes, uma vez que as células estão contidas dentro deste andaime (SATO, et. al, 2002). A natureza do comportamento das células nos sistemas 3D pode ser influenciada pelo tipo de arcabouço ou matriz utilizada e muitos tipos foram desenvolvidos atualmente para uso de cultura de células 3D. Além disso, o tipo de arcabouço ou matriz dependerá do tipo de célula que está sendo cultivada e também conforme determinado pelo objetivo e natureza do estudo (ABE, et. al, 2004; UEMURA, et. al, 2003; TAKEZAWA, et. al, 2004). Ainda existem grupos que utilizam matrizes extracelulares naturais e sintéticas, tecidos descelularizados, híbridos naturais e sintéticos, metais, cerâmicas, vidros bioativos e nanotubos de carbono, onde cada um dos arcabouços e matrizes possuem propriedades características e podem ser usados para uma aplicação específica, suprimindo alguma necessidade específica para aquele microambiente (EVARISTO, et. al, 2014; BERTANHA, et. al, 2014; AAMODT; GRAINGER, 2016; JÍMENEZ-GASTÉLUM, 2019; LERMAN, et. al, 2018; CIRALDO, et. al, 2018; FAN; STAUFER; ACCARDO, 2019).

### **1.1.4 Cultura em botão celular (*cell pellet*)**

Outro método 3D de estudos de células é a cultura em botão, método que compreende o ato de centrifugação de um conjunto de células, em tubo cônico, com o intuito das mesmas se agregarem formando um botão (em inglês, *pellet*) no fundo do tubo. Composto por agregados celulares, esse método viabiliza aumentar a complexidade da cultura em relação a culturas em monocamada (ZHANG, et. al, 2004). Muitos estudos que utilizam esse processo estão direcionados a estudos de condrócitos (ZHANG, et. al, 2004; CAPITO; SPECTOR, et. al, 2006; STEWART, et. al, 2009; PARK, et. al, 2006). Nestes

estudos, foi observado que na cultura em monocamada os condrócitos frequentemente mudam seu fenótipo para fibroblastoide e passam a secretar colágeno tipo I, perdendo a capacidade de expressar colágeno tipo II, típico do tecido cartilaginoso hialino (SCHNABEL, et. al, 2002). Ao reintroduzirem as células em ambiente 3D, usando a cultura em *pellet*, os autores observaram a reversão do efeito: as células voltaram a expressar colágeno tipo II.

Capito e Spector (2006) utilizaram os *pellets* para avaliação da diferenciação de condrócitos, e observaram que culturas em monocamada produzem pouca quantidade de glicosaminoglicanos (GAGs) mesmo quando utilizado um meio de cultura ricamente suplementado, enquanto as culturas em *pellets* produzem altas concentrações de GAGs, *agregam* e colágeno tipo II, sem a necessidade de suplementação utilizada no cultivo em monocamada.

Outro estudo comparativo relatou que os componentes de MEC que são gerados durante o cultivo em *pellets* não são observados em culturas de explantes, mostrando que estes são inferiores quando comparados com o método 3D em *pellet* (STEWART, et. al, 2009). Corroborando estes resultados, Zhang, et. al, (2004) compararam *pellets* e explantes e observaram aumento da densidade de condrócitos nos *pellets* duas vezes maior em relação à cultura de explantes.

### **1.1.5 Encapsulação**

Dentre os métodos citados para sistemas de cultura de células 3D, o encapsulamento celular é uma alternativa promissora para formar um esferoide celular com uso de um arcabouço e tem potencial significativo para aplicações de engenharia de tecidos ou modelos de triagem de drogas (MOROZ, et. al, 2013<sup>1</sup>; EDMONDSON, et. al, 2014; MAROUNEK, et. al, 2017). Das potenciais substâncias utilizadas, o alginato de sódio se destaca, sendo um material constituído por cadeias poliméricas individualizadas, que está associada a um íon de sódio (CALIARI; BURDICK, 2016; MELVIK; DORNISH, 2004; DESAI; PARK, 2005). Quando o alginato de sódio é misturado com o cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), para cada íon de cálcio que interage com as cadeias de alginato, a mesma perde dois íons de sódio. Essa troca de íons tem como consequência a formação de

cadeias associadas entre si por um íon de cálcio (duas a duas) que antes estavam individualizadas (ANDERSEN; AUK-EMBLEM; DORNISH, 2015). O polímero formado possui uma constituição mais densa, sendo assim mais rígido. Essa reação química é instantânea, reversível, e por isso há a formação de pérolas observadas imediatamente após esse contato das soluções (TODD, 1970; LIMA; SOLDI; BORSALI, 2009), as quais podem ser posteriormente desfeitas para recuperação das células encapsuladas.

O material deve resistir ao processo de cultivo sem liberar seu conteúdo. Além disso, seu principal diferencial é a porosidade da matriz, a qual permite a difusão de nutrientes provenientes do meio de cultura, além de permitir o acúmulo de componentes produzidos pelas células encapsuladas (principalmente MEC) e, dependendo do tamanho dos poros, migração celular. O tamanho dos poros presentes no arcabouço pode ser alterado mediante a modificação da estrutura do gel, com combinação de diferentes tipos de biopolímeros, que agrega o aproveitamento das vantagens da composição química de cada composto, ou pela concentração de alginato utilizada (BITTENCOURT, et. al, 2009; PATIL et. al, 2010; SZEKALSKA, et. al, 2016).

## **1.2 Uso de culturas 3D como modelo de infecção para microrganismos**

Como demonstrado, muitas vezes, métodos de cultivos 3D podem ser mais eficientes do que a cultura em monocamadas e um dos primeiros relatos de modelos 3D para estudar infecções, neste caso, virais, foi publicado por Long, et. al, (1998) e para infecções bacterianas por Nickerson, et. al, (2001). Como exemplo, o método de cultura *rotating-wall vessel* induz as células a manterem seu fenótipo, sem perda do mesmo; a constante rotação do aparelho permite também que as células se aglomerem através da rotação, aumentando a interação célula-célula e reforçando a agregação. Isso se dá devido a produção de importantes proteínas associadas com a ligação entre as células como ocludina, E-caderina e  $\beta$ -catenina. Além disso, também é observado o acúmulo de colágeno tipo IV, um importante constituinte da membrana basal. Comparativamente, seria necessário adicionar muitos compostos de MEC a uma

cultura em monocamada para se atingirem resultados semelhantes aos citados acima. Outros pesquisadores notaram que durante a infecção de agregados formados por rotação, foi observado que cepas de *P. aeruginosa* não possuem uma taxa de invasão tão eficaz quando comparada aos resultados obtidos em monocamadas, e precisam de um tempo maior de contato para causar danos severos aos grupos de células (CARTERSON, et. al, 2005).

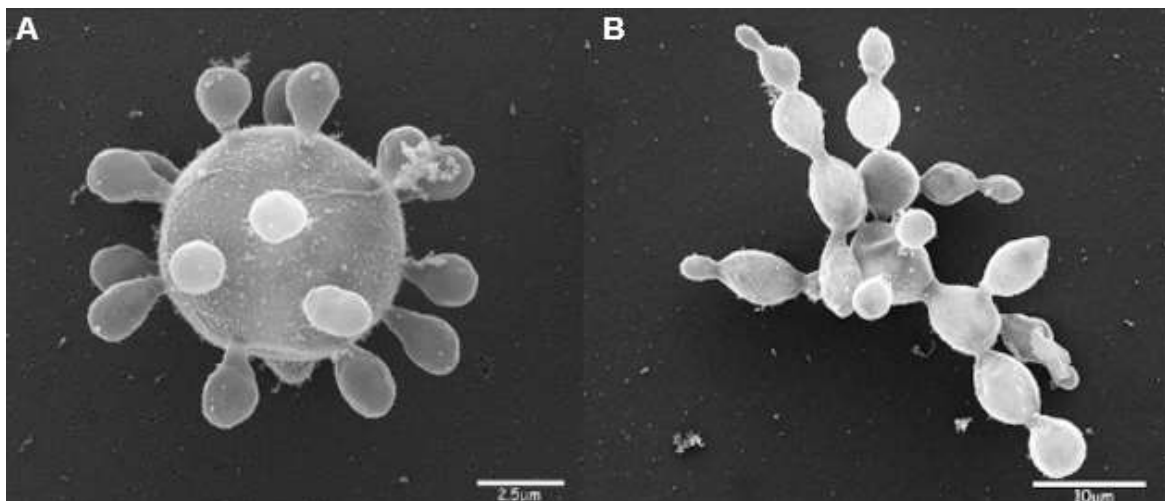
Diferentes métodos para culturas 3D já foram propostos. Segundo Wilkinson et. al, (2019), é possível realizar a co-cultura de diferentes tipos celulares envolvidos por hidrogéis - a presença dessa variedade de células gera uma organização complexa que é denominada pelos autores como organoides (DRIESSCHE, et. al, 2017). Chandorkar, et. al, (2017) recomendam o uso de células primárias em sistemas 3D pois, em comparação com linhagem celulares já estabelecidos, estas exibem maior semelhança com as células e tecidos originais. Foi demonstrado, em estudo que buscava mimetizar porções do pulmão, que as células dendríticas inseridas no modelo 3D eram capazes de migrar em resposta à ação de *Aspergillus*. No entanto, a obtenção de culturas primárias é um processo trabalhoso e complicado, requer tecido viável de biópsias, os quais são de difícil obtenção, portanto, muitos autores utilizam as linhagens para estes fins (DIAS, et. al, 2018).

### **1.3 Paracoccidioidomicose**

A paracoccidioidomicose é uma doença fúngica que faz parte da lista de micoses endêmicas composta pela histoplasmose, blastomicose e coccidioidomicose, paracoccidioidomicose, sendo a última predominante em países da América Latina. Seu agente etiológico, denominado *Paracoccidoides spp.* é um fungo termodimórfico, que possui a capacidade de se converter de uma fase micelial, onde o fungo cresce em uma temperatura aproximada de 25°C (temperatura ambiente), apresentando hifas septadas hialinas com artroconídios e clamidósporos, Figura 1); para a fase leveduriforme, que é encontrada a 37°C (temperatura do corpo humano), possuindo uma célula de morfologia arredondada com multibrotamentos característicos dessa fase do microrganismo, Figura 1) (MARTINEZ, 2015).

Essa habilidade de variação morfológica é amplamente descrita na literatura como um fator de virulência fúngica. Esse patógeno é capaz de causar uma infecção que pode progredir para doença granulomatosa sistêmica com doença tegumentar e visceral. Além disso, também é descrita uma outra espécie denominada *P. lutzii* identificada no gênero *Paracoccidioides* com alta variabilidade antigênica, cuja área endêmica envolve as regiões Centro-Oeste e Norte do Brasil (MARTINEZ, 2015; SHIKANAI-YASUDA, 2017).

**Figura 1: Termodimorfismo.** A) Morfologia fúngica de levedura encontrada na temperatura de 37°C; B) Morfologia fúngica da hifa encontrada em temperaturas de aproximadamente 25°C.



**Fonte:** Adaptado de Gegembauer et al., 2014. Serology of Paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii*. PLoS Neglected Tropical Diseases. vol.8 no.7, p. 3

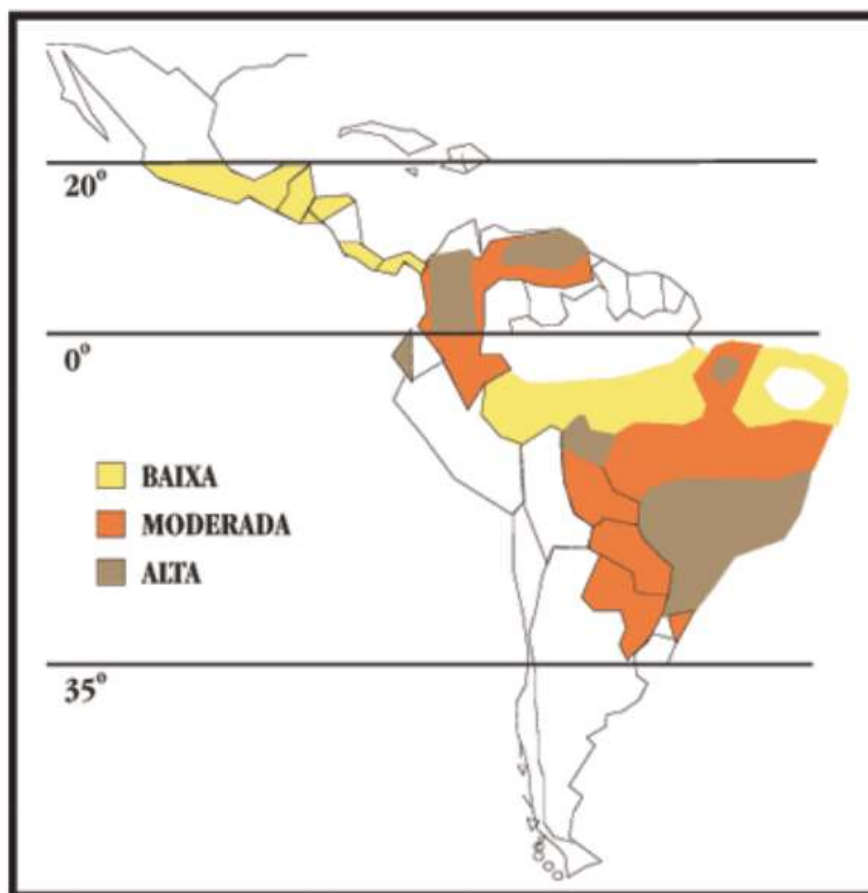
O curso natural da infecção por *P. brasiliensis* ocorre em homens e animais e é adquirida pela via respiratória após a inalação de conídios fúngicos suspensos no ar, que atingem a via respiratória chegando até o pulmão, importante local de tropismo do fungo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Dentre as formas clínicas da paracoccidioidomicose, se categorizam: i) forma aguda ou subaguda (forma juvenil, frequente em indivíduos jovens), que representa em torno de 25% dos casos da doença, possui uma evolução rápida com a disseminação do fungo por vários órgãos e atuação do sistema fagocítico mononuclear, responsável pelo evidenciamento dos sintomas, dentre eles linfadenomegalia localizada ou

generalizada, que pode, na evolução, apresentar supuração, fistulização e hepatoesplenomegalia, além de manifestações digestivas, lesões cutâneas (ou de mucosas), envolvimento osteoarticular e, raramente, comprometimento pulmonar (FORTES, et. al, 2011; SHIKANAI-YASUDA, et. al, 2017); ii) forma crônica (frequente em adultos) que tem predominância de 74 a 96% dos casos no sexo masculino, a qual se instala de forma mais lenta, com duração da sintomatologia acima de quatro meses. Esse curso silencioso da doença dificulta o diagnóstico que, quando feito, se deve a *check-ups* realizados pelo paciente. Uma característica importante desse estágio é o comprometimento pulmonar presente em 90% dos casos. (SHIKANAI-YASUDA, et. al, 2017). Infecções por *Paracoccidioides* também apresentam um perfil comum de manifestação clínica oral, com presença de lesões com úlceras granulomatosas na mucosa labial fazendo com que a doença seja frequentemente diagnosticada por dentistas (MARQUES, et. al, 1983; SPOSTO, et. al, 1994; MARQUES, 2008; TOLENTINO, et. al, 2010).

#### **1.4 Problemática das doenças fúngicas**

Há sugestões de que a endemicidade da paracoccidioidomicose prevaleça na América Latina (Figura 2), pois os casos distantes desse local referem-se a pessoas que alguma vez residiram na América (SHIKANAI-YASUDA, et. al, 2009). Além disso, é notório que sua frequência se destaque em trabalhadores rurais, agricultores, operários da construção civil e que sua incidência seja maior em homens do que em mulheres, devido a presença de uma proteína citosólica no fungo que é capaz de se ligar ao hormônio 17- $\beta$ -estradiol, onde a ação desse hormônio dificulta a periodicidade da transformação da fase micelial para a fase leveduriforme, reduzindo assim a hegemonia da doença no sexo feminino (RESTREPO, et. al, 1984). É conhecido que a ação do estrógeno estimula a produção de IL-12; Pinzam, et al. (2010) correlacionaram que durante a ação da paracoccina produzida pelo fungo no período da infecção são produzidos um conjunto de citocinas (IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) em resposta a mesma, que tem relação com o desenvolvimento de um perfil protetivo de resistência a doença, uma vez que há o impedimento da transformação do fungo em levedura.

**Figura 2: Distribuição geográfica da paracoccidioidomicose no Brasil.** Representação dos níveis de distribuição da doença nas américas, sendo o Brasil uma área endêmica da doença



**Fonte:** Shikanai et al., 2006. Consenso em paracoccidioidomicose. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. vol.39 no.3, p. 297-310.

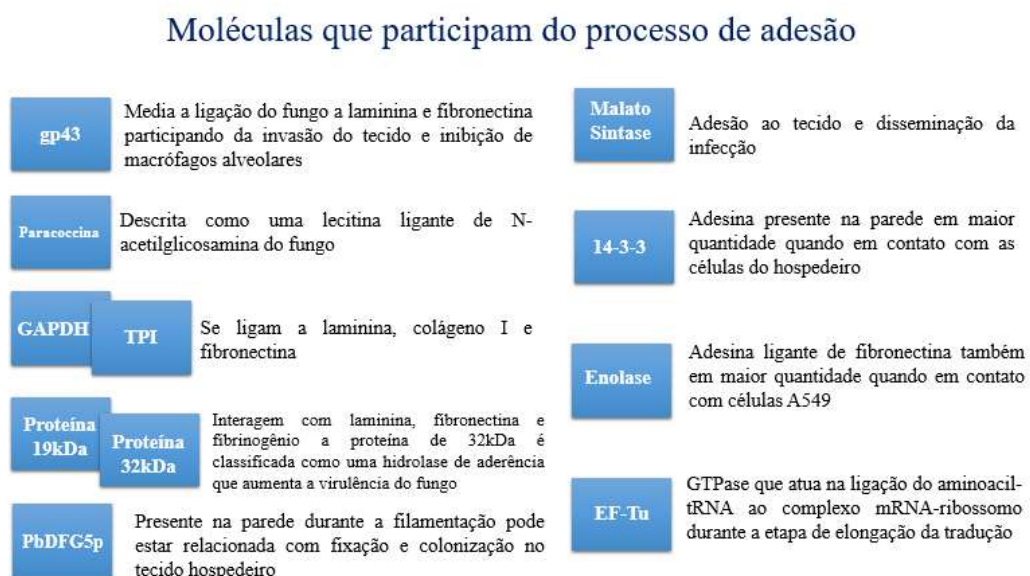
### 1.5 Patogenia e fatores de virulência

Os agentes de micoses possuem alguns aspectos que podem auxiliar o seu crescimento em condições adversas e favorecer o estabelecimento da patologia. O estudo de determinantes que participam desse processo de virulência pode facilitar a compreensão de eventos característicos das doenças causadas por fungos (CAMACHO; NIÑO-VEJA, 2017). Além de eventos relacionados a essa interação fungo-hospedeiro, também se ressalta o estudo para possíveis alvos terapêuticos que podem ser representados por moléculas que são expressas na superfície da membrana fúngica, que da mesma forma



podem direcionar pontos de estudo ao combate da doença (SARDI, et. al, 2015; MARCOS et. al, 2016; BERNARDI, et. al, 2017; SINGULANI, et. al, 2017; MARCOS, et. al, 2019). Descrito como um mecanismo complexo, a interação fungo-hospedeiro é um processo que influencia diretamente nos fatores que contribuem para a virulência do fungo (Figura 3), através de moléculas que estabelecem uma conexão até o tecido do hospedeiro (OLIVEIRA, et. al, 2015). Adesinas e proteínas semelhantes a adesina são componentes da superfície celular e/ou do metabolismo de alguns microrganismos que os conferem a capacidade de fixação às células, tecidos e/ou superfícies abióticas. Elas são as primeiras moléculas responsáveis pelo contato do patógeno para posterior invasão da célula hospedeira e, portanto, indispensáveis e determinantes de sua virulência. Devido à sua importância na invasão da célula hospedeira, adesinas são frequentemente estudadas justamente por também servirem como potenciais alvos para intervenção terapêutica (fármacos e/ou vacinas). Assim, abordagens diferenciais, como modelos de cultura 3D, abrem caminho para análises de novas moléculas que podem ser expressas em diferentes condições para o mesmo microrganismo (SILVA, et. al, 2011<sup>1</sup>).

**Figura 3. Fatores de virulência.** Importantes moléculas que participam do processo de adesão do fungo *Paracoccidioides spp.* durante o processo de infecção.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Estudos prévios demonstraram capacidade significativa de maior adesão de *P. brasiliensis* a pneumócitos quando comparado a *P. lutzii*. Também foi demonstrado que *P. brasiliensis* é mais virulento que *P. lutzii*, de acordo com dados obtidos usando um modelo *in vivo*. Isto suporta o fato de que a aderência e a virulência estão intimamente relacionadas e reforça a importância da adesão no processo de infecção desses fungos (OLIVEIRA, et. al, 2015).

O *Paracoccidioides spp.* é capaz de reconhecer várias moléculas do hospedeiro, como componentes da MEC (SILVA, et. al, 2011<sup>2</sup>). A MEC é um conjunto complexo de componentes, dentre os quais cita-se o colágeno, fibras de elastina, GAGs, proteoglicanos (PGs), fibronectina, laminina, sulfato de heparano, hialuronato, sulfato de condroitina, dentre outros. Alguns destes componentes são importantes no processo de infecção do fungo, a ligação pode se estabelecer com adesinas ou invasinas classificados também como fatores de virulência responsáveis pela ligação de estruturas do fungo com essas proteínas de matriz, todos esses componentes servem como substrato para a fixação de microrganismos colonizadores (DUNSMORE; RANNELS, 1996; MENDES-GIANNINI, et. al, 2004; MENDES-GIANNINI, et. al, 2005; MENDES-GIANNINI, et. al, 2006; BALESTRINI; NIKLASON, 2015).

Comparando a adesão aos componentes da MEC de duas espécies de *Paracoccidioides brasiliensis*, de Oliveira et. al, (2015) também demonstraram que *P. brasiliensis* adere mais à fibronectina em contraste com *P. lutzii*, que apresentou tropismo para os colágenos tipo I e IV ligação mediada pela malato sintase, enquanto a laminina é um proteína de matriz que permite maior adesão a cepa de Pb 01 (*Paracoccidioides lutzii*), enquanto a fibronectina auxilia a maior adesão do Pb18, todas estas fazendo uma conexão do fungo para que o mesmo possa exercer a infecção.

Outro exemplo de fator de virulência recentemente descrito foi a capacidade de *Pb18* em liberar vesículas extracelulares (VE): esse comportamento tem como consequência a liberação de epítomos antigênicos que podem ser reconhecidos em soros de pacientes com a doença, além de sugerir a influência deste mecanismo na resposta imune adaptativa (ZAMITH-MIRANDA et. al, 2018; SILVA, et. al, 2010; VALLEJO, et. al, 2012; SILVA, et. al, 2015; MUKHERJEE, et. al, 2016; GARCÍA-CARNERO, 2018).

## 2. DISCUSSÃO

O uso da linhagem A549 (Figura 4A), para desenvolvimento do modelo 3D, foi delineado baseando-se no histórico de trabalhos produzidos no Núcleo de Proteômica, que historicamente utiliza essa linhagem celular como modelo *in vitro* de estudo para interações fungo-hospedeiro. Seu uso foi iniciado quando a célula ficou disponível no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), a partir disso a A549 sempre apresentou resultados satisfatórios em experimentos *in vitro* conduzidos para estudos de fungos, que tem como alvo o sistema respiratório (BERNARDI, et. al, 2017; SCORZONI, et. al, 2017; de OLIVEIRA, et. al, 2016; SILVA, et. al, 2015; del VECCHIO, et. al, 2009; da SILVA, et. al, 2007) . Trabalhos de outros pesquisadores também utilizaram está linhagem com a mesma finalidade (del VECCHIO, et. al, 2009; HERNÁNDEZ, et. al, 2010; SILVA, et. al, 2015; OLIVEIRA, et. al, 2015). Trabalhos prévios do grupo demonstraram, também, que essa linhagem possui plena capacidade de interação com as células fúngicas, uma vez que seu fenótipo tumoral leva à expressão de mais proteínas e ligantes de adesão, que em células não tumorais são pouco expressas (da SILVA, et. al, 2013). Outros grupos de pesquisadores demonstraram, independentemente, a importância desta linhagem durante a detecção de uma parte dos mecanismos de ação na interação entre as células fúngicas e as células hospedeiras, via fibronectina e fibrinogênio (GONZALES, et. al, 2008).

Além disso, seu uso também se justifica devido ao tropismo do *Pb18* por células pulmonares observado em pacientes, uma vez que esse é o seu principal sítio de infecção, que se inicia através de conídios contidos no solo liberados pela sua fase micelial presente no ambiente (SHIKANAI-YASUDA, et. al, 2018). Quando o fungo adentra o organismo do hospedeiro, ele pode atingir os pulmões onde estão presentes pneumócitos e fibroblastos pulmonares, além de componentes da MEC do pulmão (de OLIVEIRA, et. al, 2014; MARCOS, et. al, 2012; SILVA, et. al, 2011; MENDES-GIANNINI, et. al, 2006) . Portanto, buscamos construir um modelo *in vitro*, 3D, que mimetize, da melhor maneira possível, essas condições encontradas pelo fungo no organismo vivo (OLIVEIRA, et. al, 2015)

A padronização do desenvolvimento do modelo 3D de alginato (Figura 5 A-F) foi feita de acordo com resultados prévios publicados pelo grupo do professor orientador (BITTENCOURT, et. al, 2009; MOROZ, et. al, 2009), quando fora utilizada uma concentração de 1.5 % alginato, sendo essa suficiente para a troca de nutrientes necessária para as células cultivadas, que eram condrócitos ou células mesenquimais (BITTENCOURT, et. al, 2009) . A curva de viabilidade celular realizada por azul de Trípino (Figura 9) utilizando a linhagem celular A549 apresentou uma redução de aproximadamente 25% da viabilidade após o período de 7 dias de cultivo em gel utilizando a concentração de 1,5%, com as trocas de meio sendo realizadas a cada 48h. Avaliando-se a viabilidade após três dias de cultivo (72h Figura 9), percebe-se que esta é de aproximadamente 84%. Dois dias depois (120h), a viabilidade ainda se encontra acima de 75%. Desta forma, podemos concluir que o alginato não gera citotoxicidade excessiva às células encapsuladas. É importante citar que a maioria dos experimentos de triagem da citotoxicidade de fármacos, utilizando modelos *in vitro*, geralmente dura no máximo 72h, momento no qual a viabilidade aferida está dentro dos padrões aceitáveis. Porém, devido a essa redução significativa da viabilidade observada nas células no modelo 3D quando comparadas com a cultura de células em monocamada, novos experimentos foram conduzidos com um valor menor de concentração do gel 0,5% v/v a fim de promover um ambiente mais relaxado com poros maiores para acesso de nutrientes para as células promovendo assim uma melhor condição de cultivo. (NAM, et. al, 2019; NING, et. al, 2016; MOHANTY, et. al, 2016).

Verificando a viabilidade obtida com os resultados provenientes do método da resazurina para a célula A549 (Figura 11), representada em porcentagem, nota-se variações das curvas entre as diferentes densidades celulares avaliadas, uma das curvas para a célula A549 contendo  $2 \times 10^4$  células por pérola apresenta alta viabilidade baseada na atividade metabólica, porém esse evento acontece devido a não conversão total do corante no tempo 0h (controle), isso faz com que a comparação das medidas dos dias subsequentes fiquem com um padrão exacerbado gerando conseqüentemente alta variância estatística como observado na (Tabela 1), isso pode acontecer devido à falta de exposição da superfície de contato celular, ou ao número reduzido de células equivalente a essa densidade

(BONNIER, et. al, 2015). Quando observamos a curva referente a densidade de  $1 \times 10^5$  células A549 (figura 11), verifica-se que a mesma acompanha parcialmente a viabilidade celular do cultivo em monocamada até o período de 72h, sendo também a densidade celular que apresenta menos variância estatística (Tabela 1). Estudos da literatura como de Wang et. al, (2018) apresentam semelhança entre o resultado de atividade metabólica, para a cultura 3D, apresentando o mesmo perfil gráfico obtido neste experimento. No caso da densidade de  $5 \times 10^5$  células A549, essa pode sugerir a princípio um maior contato célula-célula devido ao alto número de células encapsulada, porém no caso do modelo 3D as células apresentam um resultado de atividade metabólica um pouco abaixo da densidade anterior, também apresentando uma variância estatística um pouco maior. Outro fator importante a se analisar a respeito dessa curva é que devido ao alto número de células com maiores tempos de cultivo pode ser que aconteça uma perda total de viabilidade devido ao alto consumo de nutrientes e a alta excreção de metabólitos (SMITH, et. al, 2017).

Analisando a viabilidade celular pelo método da resazurina com a célula MRC-5 (Figura 12) observamos um perfil gráfico com curvas mais aproximadas entre as densidades, exceto pela densidade de  $2 \times 10^4$  que, assim como na célula A549, apresenta valores elevados. Isso reforça a suspeita de que essa densidade celular que usualmente é utilizada para células em monocamada não seja ideal para modelos tridimensionais devido ao impedimento de obtenção de padrão de viabilidade por métodos colorimétricos. Seguindo a análise estatística realizada para essa linhagem celular (tabela 2) a densidade que menos apresentou diferença estatística quando comparada com a monocamada foi a de  $5 \times 10^5$ .

Comparando-se os dados obtidos da viabilidade, ambos os métodos utilizados (aferição em câmara de Neubauer e resazurina) geraram resultados favoráveis para ambas as células até o quinto dia de cultivo, ou seja, alta viabilidade das células encapsuladas nas pérolas de alginato. Assim, estes resultados reforçam a possibilidade de uso deste modelo em pesquisas biomédicas.

Em relação ao número total de células, que foram contadas em câmara de Neubauer para célula A549, percebe-se que a cultura de monocamada gera mais células, no entanto, as pérolas de alginato foram capazes de dobrar o número de

células iniciadas com aproximadamente  $2,0 \times 10^4$  células por pérola e em 168h apresentaram  $4,0 \times 10^4$ , quando comparado o número inicialmente plaqueado e o recuperado ao término do experimento. Assim, embora não abundante, pode-se afirmar que o modelo foi capaz de permitir a proliferação das células encapsuladas.

Com relação aos achados morfológicos, nas imagens adquiridas com o *In Cell Analyzer*, foi observada alta celularidade, que inclusive dificultou a passagem de luz, gerando artefato na imagem (opacidade), fato que corrobora os resultados anteriormente discutidos. Além disso, as imagens obtidas na microscopia de contraste de fase (Figuras 6 e 7) mostram nitidamente a alta concentração das células em menor aumento, corroborando o resultado obtido no *In Cell Analyzer*. Percebe-se, também, comparando-se as imagens em menor aumento dos dois pontos temporais, que praticamente todas as células encontram-se translúcidas em 24h, e aproximadamente 50% das células tornaram-se opacas em 144h, o que pode ser resultado do aumento de granulosidade interna.

Seguindo as análises quantitativas e resultados estatísticos descritos anteriormente, os experimentos de infecção da cepa Pb18 foram conduzidos em pérolas de alginato contendo  $1 \times 10^5$  células por pérola, para células A549 e MRC-5. O experimento realizado com células A549 não contendo componentes da MEC em modelo 3D (Figuras 13 e 14) apresentaram estruturas aglomeradas morfolologicamente distintas das células onde em maior aumento observamos leveduras com características de Pb. No modelo 3D contendo componentes da MEC foi observado que o este apresenta um número ainda maior de estruturas leveduriformes, o que faz todo sentido, devido às interações entre o fungo e a MEC. O mesmo experimento, desta vez com o inóculo fúngico corado anteriormente com *calcofluor white* (Figuras 23 e 24), corroboram os resultados anteriores, uma vez que este corante fluorescente tem atuação em estruturas da parede fúngica, diferenciando assim as leveduras de células animais (SANKETH; PATIL; RAO, 2016). Seguindo com a célula MRC-5 no modelo 3D foram observadas raras leveduras presentes no modelo (Figuras 18,19 e 26), porém ainda assim presentes como observado em maior aumento. Isso sugere a hipótese de que as células A549, assim como citada em referências anteriores, sejam um modelo celular excelente para estudos de Pb. Quando comparadas as

infecções de monocamada com modelo 3D vimos que há uma presença considerável (valores qualitativos), de leveduras na monocamada. Outra verificação interessante nas imagens é que nos modelos tridimensionais, para ambas as células, as leveduras são encontradas nas dobras criadas durante o processo de gelificação do alginato (CALIARI; BURDICK, 2016). Em apoio aos resultados obtidos sem e com fluorescência utilizando o *calcofluor white* também foi realizado uma análise confocal de uma pérola de alginato de células A549 infectadas com Pb18 não contendo componentes da MEC.

O experimento de infecção das pérolas de alginato revelou alta quantidade de células fúngicas no interior do arcabouço (Figura 30) e pontos de contato entre células fúngicas e células A549, mediante a verificação de: **i)** presença de abundante coloração azulada, proveniente do corante específico a componentes químicos presente na parede celular deste microrganismo, ausente na composição das células A549, tanto na imagem principal (Figura 12, pontas de seta) quanto nas barras (Figura 12, barras superior e lateral); **ii)** óbvia proximidade entre as células fúngicas e A549, notado tanto na imagem principal (Figura 12, setas) quanto nas barras, notado pela sobreposição das colorações verde (células A549) e azul (fungo) (Figura 12, barras superior e lateral, asterisco). Embora esta análise não seja capaz de determinar com certeza se houve interação direta, via moléculas de adesão nas células fúngicas e ligantes nas células-alvo, é incontestável o fato que há, em abundância, células fúngicas dentro do arcabouço. Uma vez que estas foram adicionadas após a gelificação, a única maneira de chegarem às camadas mais profundas do arcabouço é por migração.

Corroborando o afirmado acima, o resultado da (Figura 32) de um experimento de plaqueamento do conteúdo pós infecção para obtenção de número de colônias, mostra que o fungo foi isolado, de dentro das pérolas de alginato, após o experimento de infecção, o que permite diversas possibilidades de uso do modelo proposto em pesquisa biomédica. Por exemplo, as evidências coletadas permitem sugerir que o modelo proposto pode ser utilizado para estudos de interação fungo-hospedeiro, no qual fármacos poderiam ser triados quanto sua capacidade de modular a expressão de moléculas de adesão nas

células fúngicas, uma vez que é relativamente simples recuperar as mesmas e então realizar análises moleculares.

Além disso, verificamos que a adição de componentes da MEC tem uma influência na presença/interação das leveduras de Pb18 com o modelo 3D (Figura 32) sendo estatisticamente significativos os valores obtidos apenas para os modelos tridimensionais, com ou sem adição de componentes da MEC. Ainda analisando esse resultado podemos ver que o isolamento de colônias pós infecção foi muito maior dentre as células A549 que as células MRC-5, reforçando ainda mais a viabilidade destas células para estudo do Pb em modelos tridimensionais.

Outra estratégia utilizada foi a confecção de um outro tipo de modelo tridimensional, dessa vez em forma de tapete, onde as células são posicionadas em camadas. Foi realizado experimento piloto (Figuras 33, 34, 35, 36 e 37) onde nas análises microscópicas realizadas até o presente, o modelo mostrou indícios de células com aspectos morfológicos aderentes, além de também apresentar permeabilidade para absorção de nutrientes da cocultura A549/MRC-5. Com o passar do tempo de cultivo foi observado o mesmo evento verificado nas pérolas de alginato onde o modelo apresenta uma densa população de células que é um indicativo de proliferação, assim como já indicado em resultados anteriores. Novos experimentos, com a adição de MEC na camada contendo as células MRC-5, a fim de simular uma lâmina basal, serão realizados pelo grupo.

Até o presente momento, nosso modelo agrega algumas características desejáveis para um eficiente modelo de estudo in vitro: **i)** tridimensionalidade; **ii)** porosidade; **iii)** permite proliferação celular, uma vez que o número de células foi contado; **iv)** permite migração celular, uma vez que foram identificadas células fúngicas nas pérolas.



### 3. CONCLUSÕES

- O modelo de cultura 3D foi padronizado para as células A549 e MRC-5, fornecendo condições para o cultivo das mesmas e permitindo troca de nutrientes e proliferação celular, sendo a taxa de viabilidade relacionada com o tempo de cultivo das células, linhagem celular e densidade celular utilizada no modelo de hidrogel. Foi observado que as células cultivadas no modelo permanecem estáticas, porém ativas metabolicamente apesar da viabilidade sofrer um decréscimo após 120h.
- Foi realizado o cocultivo de células e fungos, havendo indícios de que o fungo é capaz de permear o gel e encontrar as células, que são o sítio de infecção do mesmo; as células epiteliais de adenocarcinoma pulmonar A549 são mais indicadas do que o fibroblasto MRC-5, uma vez que o Pb18 aparentemente estaria em maior quantidade no modelo criado com essa célula; a presença de componentes da MEC favorece a presença do fungo. Também foi constatado que é possível re-isolar o fungo após a infecção no modelo proposto tornando assim viáveis análises de pós infecção.
- Apesar do sucesso do re-isolamento, a quantidade necessária obtida de RNA foi menor do que 200 µg/mL. Assim, novos experimentos serão necessários a fim de confirmar se realmente há uma alteração de expressão de fatores de virulência do fungo quando em contato com um modelo tridimensional.
- Foi desenvolvido, também, um modelo 3D de cultura utilizando duas linhagens celulares, sobrepostas em forma de tapete.

#### 4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAMODT, J. M.; GRAINGER, D. W. Extracellular matrix-based biomaterial scaffolds and the host response. **Biomaterials**, v. 86, p. 68-82, 2016.

ABE, M. et al. Cartilage-scaffold composites produced by bioresorbable  $\beta$ -chitin sponge with cultured rabbit chondrocytes. **Tissue engineering**. v. 10, n. 3-4, p. 585-594, 2004.

ADAN, A.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. v. 17, n. 14, p. 1213 - 1221, 2016.

ANDERSEN, T. AUK-EMBLEM, P.; DORNISH, M. 3D cell culture in alginate hydrogels. **Microarrays**, v. 4, n. 2, p. 133-161, 2015.

BAKER, M. B.; CHEN, C. S. Deconstructing the third dimension – how 3D culture microenvironments alter cellular cues. **Journal of Cell Science**. v. 125, n. 13, p. 3015 – 3024, 2012.

BALESTRINI, J. L.; NIKLASON, L. E. Extracellular matrix as a driver for lung regeneration. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 43, n. 3, p.568-576, Março de 2015.

BARKAUSKAS, C. E. et al. Lung organoids: current uses and future promise. **Development**. v. 144, n. 6, p. 986 – 997, 2017.

BEIN, A. et al. Microfluidic Organ-on-a-Chip Models of Human Intestine. **Cellular and molecular gastroenterology and hepatology**, v. 5, n. 4, p. 659–668, 2018.

BERNARDI, T. et al. Anti-apoptotic effects of decyl gallate on the induction of apoptosis in A549 pneumocytes by *Pb18 gp43*. **Medical mycology**, v. 55, n. 8, p. 890-894, 2017.

BERNARDI, T. et al. Anti-apoptotic effects of decyl gallate on the induction of apoptosis in A549 pneumocytes by *Pb18 gp43*. **Medical Mycology**, v. 55, n. 8, p. 890-894, 2017.

BERTANHA, M. et al. Morphofunctional characterization of decellularized vena cava as tissue engineering scaffolds. **Experimental Cell Research**, v. 326, p. 103-11. 2014.

BITTENCOURT, R. A. C., et al. Chondrocyte cultures in 3D scaffold: alginate hydrogel. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 17, n. 4, p. 242-246, 2009.

CALIARI, S. R.; BURDICK, J. A. A Practical Guide to Hydrogels for Cell Culture. **Nature Methods**, v. 13, n. 5, p. 405–414. Abril de 2016.

CALIARI, Steven R.; BURDICK, Jason A. A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nature methods*, v. 13, n. 5, p. 405-414, 2016.

CAMACHO, E.; NIÑO-VEGA, G. A. *Paracoccidioides spp.*: virulence factors and immune-evasion strategies. **Mediators of inflammation**, v. 2017, 2017.

CAPITO, R.M.; SPECTOR M. Effect of expansion medium on ex vivo gene transfer and chondrogenesis in type II collagen-glycosaminoglycan scaffolds in vitro. **Osteoarthritis Cartilage**. v. 14, n. 12 p. 1203–1213, 2006.

CARTERSON, A. J. et al. A549 lung epithelial cells grown as three-dimensional aggregates: alternative tissue culture model for *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 2, p. 1129-1140, 2005.

CESAZRS. Z. Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells International**. v. 2016, 2016.

CHANDORKAR, P. et al. Fast-track development of an in vitro 3D lung/immune cell model to study *Aspergillus* infections. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2017.

CHEN, Y. W. et al. Surface modified alginate microcapsules for 3D cell culture. **Surface Science**, v. 648, p. 47-52, Junho de 2016.

CIRALDO, F. E. et al. Tackling bioactive glass excessive in vitro bioreactivity: Preconditioning approaches for cell culture tests. **Acta biomaterialia**, v. 75, p. 3-10, 2018.

da HORA, C.C. et al. Patient-Derived Glioma Models: From Patients to Dish to Animals. **Cells**, v. 8, p. 1177-96, 2019.

DA SILVA, J. L. M. et al. Epithelial cells treated with genistein inhibit adhesion and endocytosis of Pb18. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 92, n. 1, p. 129-135, 2007.

da SILVA, J.F. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* 30 kDa adhesin: identification as a 14-3-3 protein, cloning and subcellular localization in infection models. **PLoS One**, v. 8, p. e62533, 2013.

DAUD, M. F. et al. An aligned 3D neuronal-glia co-culture model for peripheral nerve studies. **Biomaterials**, v. 33, n. 25, p. 5901-5913. 2012.

DE OLIVEIRA, H. C. et al. Peptides derived from a phage display library inhibit adhesion and protect the host against infection by Pb18 and *Paracoccidioides lutzii*. **Frontiers in pharmacology**, v. 7, p. 509, 2016.

DEL VECCHIO, A. et al. Induction of apoptosis in A549 pulmonary cells by two Pb18 samples. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 5, p. 749-754, 2009.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. P. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. **Drying Technology**, v. 23, p. 7, 2005.

DIAS, K. C. et al. Development and characterization of a 3D oral mucosa model as a tool for host-pathogen interactions. **Journal of microbiological methods**, v. 152, p. 52-60, 2018.

DRIESSCHE, V. D. et al. Evaluation of Combination Therapy for *Burkholderia cenocepacia* Lung Infection in Different *in vitro* and *in vivo* models. **PLoS One**. v. 12, n. 3, Março de 2017.

DUNSMORE, S. E.; RANNELS, D. E. Extracellular matrix biology in the lung. **American Journal of Physiology**, v. 270, n. 1, p. 3-27, 1996.

EDMONDSON, R. et al. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 12, n. 4, p. 207-218, 2014.

ELLISON, J. Case of Squamous-celled Carcinoma of the Cervix Uteri associated with a Nodule of Spheroidal-celled Carcinoma in the Body. **Proceedings of the Royal Society of Medicine**. v. 15, section. Gynaecol Section, p. 10-11, 1922.

EVARISTO, T.C. Light-emitting diode effects on combined decellularization of tracheae. A novel approach to obtain biological scaffolds. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 8, p. 485-92, 2014.

FAN, D. STAUFER, U.; ACCARDO, A. Engineered 3D Polymer and Hydrogel Microenvironments for Cell Culture Applications. **Bioengineering**, v. 6, n. 4, p. 113, 2019.

FORTES, M. R. P. et al. Imunologia da Paracoccidioidomicose. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 86, n. 3, p. 516-524, 2011.

FRIEDRICH, J. EBNER, R.; KUNZ-SCUGHART, L. A. Experimental Anti-Tumor Therapy in 3-D: Spheroids--Old Hat or New Challenge? **International Journal of Radiation Biology**. v. 83, n. 11-12, p. 849-871. Novembro-Dezembro de 2007.<sup>1</sup>

FRIEDRICH, J. et al. A Reliable Tool to Determine Cell Viability in Complex 3-d Culture: The Acid Phosphatase Assay. **Journal of Biomolecular Screening**. v. 12, n. 7, p. 927-937. 2007.<sup>2</sup>

FRIEDRICH, J. et al. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. **Nature Protocols**. v. 4, p. 309 – 324. 2009.

GAO, D. et al. Characterization of Drug Permeability in Caco-2 Monolayers by Mass Spectrometry on a Membrane-Based Microfluidic Device. **Lab on a Chip**. v. 13, n. 5, p. 978–985. 2013.

GARCÍA-CARNERO, L. C. et al. Current trends to control fungal pathogens: exploiting our knowledge in the host-pathogen interaction. **Infection and Drug Resistance**. v. 11, n. 3, p. 903-913, 2018.

GODUGU, C. et al. AlgiMatrix™ based 3D cell culture system as an in-vitro tumor model for anticancer studies. **PloS one**, v. 8, n. 1, 2013.

GONZALES, A. et al. Pb18 conidia recognize fibronectin and fibrinogen which subsequently participate in adherence to human type II alveolar cells: involvement of a specific adhesin. **Microbiology and Pathogens**. v. 44, p. 389-401. 2008.

HARMER. W. D. Spheroidal-celled Carcinoma of Nasal Fossa and Antrum. **Proceedings of the Royal Society of Medicine**. v. 15, section. Laryngol Section, p. 33. 1922.

HERNÁNDEZ, O. et al. A 32-Kilodalton Hydrolase Plays an Important Role in Pb18 Adherence to Host Cells and Influences **Pathogenicity**. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 12, p. 5280-5286, 2010.

HOWARTH, W. Spheroidal-celled Carcinoma of Superior Maxilla. **Proceedings of the Royal Society of Medicine**. v. 25, n.2, p. 227–229.1931.

HUH, D. et al. A human disease model of drug toxicity–induced pulmonary edema in a lung-on-a-chip microdevice. **Science translational medicine**, v. 4 n. 159. 2012.

JIMÉNEZ-GASTÉLUM, G. R. et al. Antimicrobial Properties of Extracellular Matrix Scaffolds for Tissue Engineering. **BioMed Research International**, v. 2019, 2019.

KIM, M. et al. Three-Dimensional Spheroid Culture Increases Exosome Secretion from Mesenchymal Stem Cells. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. v. 15, n. 4, p. 427–436. Agosto de 2018.

LERMAN, M. J. et al. The evolution of polystyrene as a cell culture material. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 24, n. 5, p. 359-372, 2018.

LIMA, A. M. F.; SOLDI, V.; BORSALI, R. Dynamic light scattering and viscosimetry of aqueous solutions of pectin, sodium alginate and their mixtures: effects of added salt, concentration, counterions, temperature and chelating agent. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 20, n. 9, São Paulo, 2009.

LIN, A. et al. 3D cell culture models and organ-on-a-chip: Meet separation science and mass spectrometry. **Electrophoresis**, n. 41, p. 56-64, 2020.

LONG, J. P. PIERSON, S.; HUGHES, J. H. Rhinovirus Replication in HeLa Cells Cultured Under Conditions of Simulated Microgravity. **Aviation, Space and Environmental Medicine**. v. 69, n. 9, p. 851-6 Setembro de 1998.

MARCOS, C. M. et al. Decreased expression of 14-3-3 in Pb18 confirms its involvement in fungal pathogenesis. **Virulence**. v. 7, n. 2, p. 72-84, 8 de Dezembro de 2016.

MARCOS, C. M. et al. *Pb18* 14-3-3 protein is important for virulence in a murine model. **Medical mycology**, v. 57, n. 7, p. 900-904, 2019.

MARCOS, C. M. et al. Surface-expressed enolase contributes to the adhesion of *Pb18* to host cells. **FEMS yeast research**, v. 12, n. 5, p. 557-570, 2012.

MAROUNEK, M. et al. Comparative study of the hypocholesterolemic and hypolipidemic activity of alginate and amidated alginate in rats. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 105, n. pt 1, p. 620-624, Dezembro de 2017.

MARQUES, S. A. et al. Aspectos Epidemiológicos da Paracoccidiodomicose na Área Endêmica de Botucatu (São Paulo - Brasil). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 25, n. 2, p. 87-92, 01 de Janeiro de 1983.

MARQUES, S. A. Paracoccidiodomicose: centenário do primeiro relato de caso. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 83, n. 3, p. 271-273, 2008.

MARTINEZ, R. Epidemiology of Paracoccidiodomycosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 57, n. 19, p. 11-20, 2015.

Medicine. **Bentham Science Publishers**. v. 12, n. 233 – 246, 2017.

MELVIK, J. E.; DORNISH, M. Alginate as a Carrier for Cell Immobilisation. **Fundamentals of Cell Immobilisation Biotechnology**. v. 8, p.33-51, 2004.

MENDES-GIANNINI, M. J. S. et al. Binding of extracellular matrix proteins to *Pb18*. **Microbes and Infection**. v. 8, n. 6, p. 1550-1559, 8 de Maio de 2006.

MENDES-GIANNINI, M. J. S. et al. Binding of extracellular matrix proteins to *Pb18*. **Microbes and infection**, v. 8, n. 6, p. 1550-1559, 2006.

MENDES-GIANNINI, M. J. S. et al. Interaction of pathogenic fungi with host cells: Molecular and cellular approaches. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 45, n. 3, p. 383-394, 1 de September de 2005.

MENDES-GIANNINI, M. J. S. et al. Invasion of epithelial mammalian cells by Pb18 leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell. **Microbes and Infection**. v. 6, n. 10, p. 882-891, 6 de Agosto de 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doenças Infecciosas e Parasitárias. **Guia de Bolso 8ª Edição Revista**. p. 328, Brasília, 2010.

MITTAL, R. et al. Organ-on-chip Models: Implications in Drug Discovery and Clinical Applications. **Journal of Cellular Physiology**. v. 234, n. 6. p. 8352-8380, 2019.

MITTAL, R. et al. Organ-on-chip models: Implications in drug discovery and clinical applications. **Journal of Cellular Physiology**. v. 234, n. 6. p. 8352-8380, 2018.

MOHANTY, S. et al. Impact of alginate concentration on the viability, cryostorage, and angiogenic activity of encapsulated fibroblasts. **Materials Science and Engineering: C**, v. 65, p. 269-277, 2016.

MOROZ, A. et al. Fibronectin induces MMP2 expression in human prostate cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 25, p. 1319-21, 2013.<sup>2</sup>

MOROZ, A. et al. Platelet gel: 3D scaffold for cell culture. **Acta Ortopédica Brasileira**. v. 17, n. 2, p. 43-45, São Paulo, 2009.

MOROZ, A. et al. Platelet lysate 3D scaffold supports mesenchymal stem cell chondrogenesis: an improved approach in cartilage tissue engineering. **Platelets**. v. 24, p. 219-25. 2013.<sup>1</sup>

MUKHERJEE, S. et al. TLR2 and TLR4 mediated host immune responses in major infectious diseases: a review. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 20, n. 2, p. 193-204, Abril de 2016.

NAM, S. et al. Varying PEG density to control stress relaxation in alginate-PEG hydrogels for 3D cell culture studies. **Biomaterials**, v. 200, p. 15-24, 2019.

NICKERSON, C. A. et al. Three-dimensional Tissue Assemblies: Novel Models for the Study of Salmonella Enterica Serovar Typhimurium Pathogenesis. **Infection and Immunity**. v. 69, n.11, p. 7106-20 Novembro de 2001.

NING, L. et al. Influence of mechanical properties of alginate-based substrates on the performance of Schwann cells in culture. **Journal of Biomaterials science, Polymer edition**, v. 27, n. 9, p. 898-915, 2016.

OECD No. 129. Guidance Document on Using Cytotoxicity Tests to Estimate Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests. **Series on Testing and Assessment**, n. 129, 2010.

OLIVEIRA, H. C. et al. Paracoccidioides-host Interaction: An Overview on Recent Advances in the Paracoccidioidomycosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1319, novembro de 2015.

PARK, K. et al. Scaffold-free, engineered porcine cartilage construct for cartilage defect repair—in vitro and in vivo study. **Artificial organs**, v. 30, n. 8, p. 586-596, 2006.

PATIL, J. S. et al. Ionotropic Gelation and Polyelectrolyte Complexation: The Novel Techniques to Design Hydrogel Particulate Sustained, Modulated Drug Delivery System: a Review. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**. v. 5, n. 1, p. 241-248, Março de 2010.

PINZAN, C. F. et al. Immunological basis for the gender differences in *murine Pb18* infection. **PLoS One**, v. 5, n. 5, 2010.

RAVI, M. et al. 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications. **Journal of Cellular Physiology**. v. 230, n. 1, p. 16-26, 2014.

RESTREPO, A. et al. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Pb18*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infection and immunity**, v. 46, n. 2, p. 346-353, 1984.

SANKETH, D. S.; PATIL, Shankargouda; RAO, Roopa S. Estimating the frequency of *Candida* in oral squamous cell carcinoma using Calcofluor White fluorescent stain. *Journal of investigative and clinical dentistry*, v. 7, n. 3, p. 304-307, 2016.

SARDI, J. C. O. et al. In vitro *Pb18* biofilm and gene expression of adhesins and hydrolytic enzymes. **Virulence**. v. 6, n. 6, p. 642-651, 2015.

SATO, M. et al. An atelocollagen honeycomb-shaped scaffold with a membrane seal (ACHMS-scaffold) for the culture of annulus fibrosus cells from an intervertebral disc. **Journal of Biomedical Materials Research**. v. 64A, n. 2, p. 248-256, 2003.



SCHIMEK, K. et al. Bioengineering of a Full-Thickness Skin Equivalent in a 96-Well Insert Format for Substance Permeation Studies and Organ-On-A-Chip Applications. **Bioengineering (Basel)**. v. 5, n. 2, Junho de 2017.

SCHNABEL, M. et al. Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 10, n. 1, p. 62-70, 2002.

SCORZONI, L. et al. Can passage in *Galleria mellonella* activate virulence factors of *Pb18* as in the murine model?. **Medical Mycology**, v. 56, n. 3, p. 374-377, 2018.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. II Consenso Brasileiro em Paracoccidioidomicose – 2017, **Epidemiologia e Serviço de Saúde**. v. 27, n. spe, 2017.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. II consenso brasileiro em paracoccidioidomicose-2017. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 27, p. e0500001, 2018.

SILVA, J. F. et al. Influence of the *Pb18* 14-3-3 and gp43 proteins on the induction of apoptosis in A549 epithelial cells. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 476-484, 2015.

SILVA, J. F. et al. Differentially expressed proteins in *Pb18* involved in extracellular matrix adhesion. *Biochemistry and Molecular Biology*, Abril de 2011.<sup>1</sup>

SILVA, J. F. et al. Differentially expressed proteins in *Pb18* involved in extracellular matrix adhesion. **FASEB Journal**, p. 1, 2011.

SILVA, J. F. et al. Influence of the *Pb18* 14-3-3 and gp43 proteins on the induction of apoptosis in A549 epithelial cells. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 110, n. 4, p. 476-484, Junho de 2015.

SILVA, R. F. Capítulo 8 - Infecções fúngicas em imunocomprometidos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v. 36, n. 1, p. 142-147, 2010.

SILVA, R. P. et al. Differential gene expression analysis of *Pb18* during keratinocyte infection. **Journal of medical microbiology**, v. 60, n. 3, p. 269-280, 2011.<sup>2</sup>

SINGULANI, J. L. et al. Preliminary evaluation of circulating microRNAs as potential biomarkers in paracoccidioidomycosis. **Biomedical reports**, v. 6, n. 3, p. 353-357, 2017.

SKROBANSKA, R. et al. Cell proliferation in in vivo-like three-dimensional cell culture is regulated by sequestration of ERK 1/2 to lipid rafts. **Cell proliferation**, n. 47, v. 4, p. 336-346. 2014.

SMITH, K. E. et al. Acute ischemia induced by high-density culture increases cytokine expression and diminishes the function and viability of highly purified human islets of langerhans. *Transplantation*, v. 101, n. 11, p. 2705, 2017.

SPOSTO, M. R. et al. Paracoccidioidomycosis manifesting as oral lesions: clinical, cytological and serological investigation. **Journal of Oral Pathology & Medicine**. v. 23, n. 2, p. 85-87, 1994.

STEWART, C. M. et al. Phenotypic Stability of Articular Chondrocytes In Vitro: The Effects of Culture Models, Bone Morphogenetic Protein 2, and Serum Supplementation. *Journal of Bone and Mineral Research*. v. 15, n. 1, p. 166-174. 2009.

SZEKALSKA, M. et al. Alginate: current use and future perspectives in pharmaceutical and biomedical applications. **International Journal of Polymer Science**, v. 2016, 2016.

TAKEZAWA, T. et al. Collagen Vitrigel: A Novel Scaffold That Can Facilitate a Three-Dimensional Culture for Reconstructing Organoids. **Cell Transplantation**. v. 13, p. 463 – 473, 2004.

TODD, R. D. Micro Encapsulation and Flavor Industry. **Flavour Industry**. v. 1, p. 768-771, 1970.

TOLENTINO, E. S. et al. Manifestações Bucais da Paracoccidioidomicose: Considerações Gerais e Relato de Caso. **Revista da Faculdade de Odontologia – UPF**. v. 15, n. 1, p. 71-76, 2010.

TORRAS, N. et al. Mimicking Epithelial Tissues in Three-Dimensional Cell Culture Models. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**. v. 6, p. 197, Dezembro de 2018.

UEMURA, T. et al. Transplantation of cultured bone cells using combinations of scaffolds and culture techniques. **Biomaterials**. v. 24, n. 13, p. 2277-2286, 2003.

VALLEJO, M. C. et al. Vesicle and vesicle-free extracellular proteome of Pb18: comparative analysis with other pathogenic fungi. **Journal of Proteome Research**. v. 11, n. 3, p. 1676-1685, Março de 2012.

VECCHIO, A. et al. Induction of apoptosis in A549 pulmonary cells by two Pb18 samples. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 104, n. 5, p. 749-754, Rio de Janeiro, Agosto de 2009.

VERJANS, E. T. et al. Three-dimensional cell culture models for anticancer drug screening: Worth the effort ?. **Journal of cellular physiology**, v. 233, n. 4, p. 2993-3003, 2018.

WANG, X. et al. Tumor-like Lung Cancer Model Based on 3D Bioprinting. **3 Biotech**. v. 8, n. 12, p. 501, Dezembro de 2018.

WILKINSONS, D. C. et al. Development of a Three-Dimensional Bioengineering Technology to Generate Lung Tissue for Personalized Disease Modeling. **STEM CELLS Translational Medicine**. v. 6, n. 2, p. 622-633, 2017.

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, 2010.

XU, X.; FARACH-CARSON, M. C.; JIA, X. Three-Dimensional In Vitro Tumor Models for Cancer Research and Drug Evaluation. **Biotechnology Advances**. v. 32, n. 7, p. 1256 – 1268. 2015

YASUDA-SHIKANAI, M. A. et al. Imunologia das Micoses. **Tratado de Infectologia**. 2009.

YI, S. et al. Extracellular Matrix Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative. **Current Stem Cell Research & Therapy**. v. 12, n. 3, p. 233-246, 2017.

ZAMITH-MIRANDA, D. et al. Fungal extracellular vesicles: modulating host-pathogen interactions by both the fungus and the host. **Microbes and Infection**. v. 20, n. 9-10, p. 501-504, 2018.

ZHANG, Z. et al. Hyaline cartilage engineered by chondrocytes in pellet culture: histological, immunohistochemical and ultrastructural analysis in comparison with cartilage explants. **Journal of anatomy**, v. 205, n. 3, p. 229-237, 2004.