



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



TESE DE DOUTORADO

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

CAROLINA ORLANDO VASO

Orientadora: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida

Coorientadora: Dra. Caroline Barcelos Costa Orlandi

Araraquara

2022

CAROLINA ORLANDO VASO

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

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

Orientadora: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida

Coorientadora: Dra. Caroline Barcelos Costa Orlandi

Araraquara, SP

2022

V673e

Vaso, Carolina Orlando.

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

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

Orientadora: Ana Marisa Fusco Almeida.

Coorientadora: Caroline Barcelos Costa Orlandi.

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: CAROLINA ORLANDO VASO

ORIENTADORA: ANA MARISA FUSCO ALMEIDA

COORIENTADORA: CAROLINE BARCELOS COSTA ORLANDI

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

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

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

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

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

Araraquara, 29 de novembro de 2022

“Não sou nada.

Nunca serei nada.

Não posso querer ser nada.

À parte isso, tenho em mim todos os sonhos do mundo.”

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

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

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

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

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

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

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

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

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

Figura 13 – Fórmula molecular dos derivados indólicos. 89

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LISTA DE TABELAS

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS

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

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

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
1.1. MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE MAMÍFEROS	24
1.1.1. Cultura Celular	25
1.1.1.1. Culturas tridimensionais.....	26
1.2.1. Animais alternativos aos mamíferos	28
1.2.1.1. <i>Galleria mellonella</i>	29
1.2.1.2. <i>Caenorhabditis elegans</i>	29
1.2.1.3. <i>Zebrafish</i>	30
1.2. HISTOPLASMOSE E EPIDEMIOLOGIA	30
1.3. <i>HISTOPLASMA CAPSULATUM</i>	32
1.4. PATOGENIA E FATORES DE VIRULÊNCIA.....	34
1.5. BIOFILMES.....	38
1.6. TERAPÊUTICA E SUAS PROBLEMÁTICAS	40
1.6.1. Mecanismo de ação	43
1.7. NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS.....	45
<i>Parte I – Caracterização dos cultivos tridimensionais e eficácia e segurança farmacológica dos derivados de nitrofurano e indólicos testados em Histoplasma capsulatum e interação patógeno-hospedeiro.</i>	
2. OBJETIVO GERAL.....	50
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
3.1. CULTURA DE CÉLULAS.....	51
3.2. PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE CULTURA CELULAR TRIDIMENSIONAL (3D).....	51
3.3. CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE CULTURA CELULAR 3D	52
3.3.1. Tamanho dos esferoides	52
3.3.2. Quantificação celular e viabilidade celular por azul de <i>Trypan</i>	52
3.3.3. Viabilidade celular pelo método colorimétrico com resazurina.....	53
3.3.4. Viabilidade celular por iodeto de propídeo (IP).....	54
3.3.5. Análise topográfica dos esferoides.....	54
3.3.6. Microscopia confocal de varredura à laser.....	55
3.4. MICRORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO	55

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

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

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

1. INTRODUÇÃO

1.1. MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE MAMÍFEROS

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

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

Caenorhabditis elegans, entre outros (ARCK, 2019; CLARK, 2017; HUANG; LEE; HSU; LIAO *et al.*, 2021; SNEDDON; HALSEY; BURY, 2017).

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

1.1.1. Cultura Celular

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

A cultura de células em monocamada (2D) é um dos modelos mais utilizados, devido a sua facilidade na troca de meio de cultura, subcultura, análise e a facilidade de padronização. No entanto, nos tempos atuais percebeu-se que esse tipo de cultura celular tem limitações, já que elas crescem em uma garrafa plástica formando uma camada com arquitetura simples, resultando em perda de função fisiológica, devido à degeneração de características no seu desenvolvimento. Esse tipo de cultura *in vitro*, apesar de apresentar uma certa similaridade com a realidade, ainda traz alguns problemas no desenvolvimento e crescimento celular. Esse cultivo, não possui uma arquitetura tridimensional e heterogeneidade de um tecido *in vivo*, além de uma adesão celular reduzida (DESROCHERS; PALMA; KAPLAN, 2014; FRIEDRICH; SEIDEL; EBNER; KUNZ-SCHUGHART, 2009; GRÄSSER; BUBEL; SOSSONG; OBERRINGER *et al.*, 2018; HABANJAR; DIAB-ASSAF; CALDEFIE-CHEZET; DELORT, 2021).

1.1.1.1. Culturas tridimensionais

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

Uma das metodologias utilizadas para os cultivos tridimensionais é a de *scaffold free*. Trata-se de um cultivo de baixa adesão, que utiliza gel de agarose para o cultivo das células.

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

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

2021; HARB; FAKHREDDINE; ZARAKET; SALEH, 2021; HERRINGTON; POULSOM; KOEPPEN; COATES, 2021).

1.2.1. Animais alternativos aos mamíferos

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

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

Em relação aos animais alternativos, os modelos mais utilizados são os invertebrados *Artemia salina*, *Drosophila melanogaster*, *Galleria mellonella* e *Caenorhabditis elegans* e entre os vertebrados temos o *Danio rerio* (zebrafish) e *Oryzias latipes* (peixe medaka) (FREIRES; SARDI; DE CASTRO; ROSALEN, 2017; SZABO; SVENSSON AKUSJÄRVI; SAXENA; LIU *et al.*, 2017; VENNIRO; CAPRIOLI; SHAHAM, 2016). Segundo o estudo

conduzido por Freires e colaboradores (2017), dentre os animais alternativos, os mais citados são a *Drosophila melanogaster* (40%), seguido do *zebrafish* (29,74%), *C. elegans* (26,53%), *G. mellonella* (1,14%) e *A. salina* (0,70%).

1.2.1.1. *Galleria mellonella*

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

1.2.1.2. *Caenorhabditis elegans*

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

aliado no desenvolvimento de novos fármacos (BREGER; FUCHS; APERIS; MOY *et al.*, 2007; EWBANK; ZUGASTI, 2011).

1.2.1.3. *Zebrafish*

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

1.2. HISTOPLASMOSE E EPIDEMIOLOGIA

As doenças fúngicas acometem mais de 1 bilhão de pessoas no mundo todo e têm sintomatologia diversificada, podendo variar quanto a sua gravidade, de simples até doença grave e levar os indivíduos acometidos à morte. A taxa de mortalidade é altamente relevante,

já que representa mais de 1,6 milhões de óbitos, se assemelhando à taxa de mortalidade da tuberculose e sendo três vezes mais elevada que a registrada por malária, e mesmo assim a maioria das doenças fúngicas ainda são negligenciadas. As crescentes mudanças socioeconômicas, somadas ao aumento do número de pessoas que apresentam comprometimento do sistema imune ocasionado por exemplo, por pandemias de HIV/SIDA e, mais recentemente, pelo vírus Sars-Cov2, além de doenças pulmonares crônicas, cânceres e transplantes de órgãos são os responsáveis pelo aumento dessa taxa de mortalidade, que afeta tanto os países em desenvolvimento quanto os desenvolvidos (BASSO; POESTER; BENELLI; STEVENS *et al.*, 2021; BONGOMIN; GAGO; OLADELE; DENNING, 2017; LASS-FLÖRL; SAMARDZIC; KNOLL, 2021; LIMPER; ADENIS; LE; HARRISON, 2017; MESSINA; MARIN; CACERES; ROMERO *et al.*, 2020).

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

A micose sistêmica denominada histoplasmose é causada pelo fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum*. Esta doença foi descrita pela primeira vez no início do século XX

por Samuel Darling, no Panamá, mas, somente em 1934, o microrganismo foi identificado como dimórfico (AIDÉ, 2009; FERREIRA; BORGES, 2009).

A histoplasmose é considerada uma micose de distribuição mundial, já descrita em todos os continentes, com exceção da Antártica (WHEAT; AZAR; BAHR; SPEC *et al.*, 2016). As regiões mais afetadas incluem América do Norte (principalmente as regiões que circundam os rios Ohio e Mississipi) e América do Sul. No Brasil sua distribuição é por todas as regiões, afetando principalmente o Sudeste, região com o maior número de casos. Há relatos em outras partes do mundo como sul e leste europeu, África, Ásia e Austrália (AIDÉ, 2009; SALZER; BURCHARD; CORNELLY; LANGE *et al.*, 2018).

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

1.3. *Histoplasma capsulatum*

Até recentemente, a taxonomia do gênero *Histoplasma* era dividida em três grupos, baseados na distribuição geográfica e manifestações clínicas. *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* é a variedade mais comum no mundo e é considerado o principal agente causador de histoplasmose em humanos; *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* é encontrado na África e *Histoplasma capsulatum* var. *farciminosum* acomete equinos (KASUGA; WHITE;

KOENIG; MCEWEN *et al.*, 2003; MITTAL; PONCE; GENDLINA; NOSANCHUK, 2019). No entanto, na classificação filogenética realizada por Kasuga e colaboradores (2003), foram identificados oito clados geneticamente diferentes: América do Norte 1 (NAM 1) e 2 (NAM 2), Grupo Latino-Americano A (LAM A) e B (LAM B), Austrália, Países baixos, Eurásia e África. Já Teixeira e colaboradores (2016) propuseram novos clados filogenéticos, sendo RJ, LAM A1, LAM A2, LAM B e BAC1. Sepúlveda e colaboradores (2017), estudaram cinco clusters, incluindo o do Panamá linhagem H-81, Nam1, Nam 2, LAM A e Africana. Com isto, os autores sugeriram um novo renome: *H. capsulatum sensu stricto* Darling 1906 (Panamá), *H. mississippiense* sp. nov. (NAM); *H. ohienne* sp. nov. (NAM 2), *H. suramericanum* sp. nov. (LAM A) e africana. Sabe-se ainda que algumas espécies deste fungo permanecem desconhecidas e novas classificações podem ainda surgir (KASUGA; WHITE; KOENIG; MCEWEN *et al.*, 2003; MITTAL; PONCE; GENDLINA; NOSANCHUK, 2019; RODRIGUES; BEALE; HAGEN; FISHER *et al.*, 2020; SEPÚLVEDA; MÁRQUEZ; TURISSINI; GOLDMAN *et al.*, 2017; VITE-GARÍN; ESTRADA-BÁRCENAS; GERNANDT; REYES-MONTES *et al.*, 2021).

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

1.4. PATOGENIA E FATORES DE VIRULÊNCIA

O crescimento e o desenvolvimento do fungo *H. capsulatum* está associado a solos ricos em matéria orgânica e nitrogênio como os que contém excrementos de aves e morcegos. O homem se infecta pela inalação dos conídios ou fragmentos de hifas presentes na natureza (FERREIRA; BORGES, 2009; GOUGHENOUR; RAPPLEYE, 2017).

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

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

O sistema imune produz uma resposta pró-inflamatória (Th1 / Th17) que se torna necessária para controlar o crescimento do fungo. Portanto, pessoas infectadas com vírus HIV correm maior risco de desenvolverem a histoplasmose disseminada, já que elas têm sua resposta imunológica reduzida. Caso essa doença não seja tratada a tempo, pode ser letal (ARAÚZ; PAPINENI, 2021; KAUFFMAN, 2007; LIMPER; ADENIS; LE; HARRISON, 2017). Outros fatores relacionados ao hospedeiro, como baixa contagem de CD4 e CD8, utilização de alguns medicamentos (corticosteroides, quimioterápicos), indivíduos transplantados, favorecem o aparecimento da doença (FERREIRA; BORGES, 2009; GOUGHENOUR; RAPPLEYE, 2017; LIMPER; ADENIS; LE; HARRISON, 2017).

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

Além do estado imunológico do hospedeiro, os fatores de virulência relacionados ao fungo também podem contribuir para uma maior invasão, proliferação e sobrevivência desse patógeno. Um dos mecanismos para se evitar a invasão de *H. capsulatum* é a produção de espécies reativas de oxigênio pelas células fagocíticas. Em contrapartida, o fungo pode driblar as defesas do hospedeiro e produzir algumas partículas como superóxido dismutase extracelular (Sod3) que neutralizam e protegem o fungo desse ataque (HOLBROOK; SMOLNYCKI; YOUSEFF; RAPPLEYE, 2013; JOHNSON; KLOTZ; YORK; KRUFTE *et al.*, 2002; YOUSEFF; HOLBROOK; SMOLNYCKI; RAPPLEYE, 2012). Além disso, as catalases como a CatB e a CatP são importantes para esse processo (HOLBROOK;

SMOLNYCKI; YOUSEFF; RAPPLEYE, 2013). A CatB, também conhecida como antígeno M, é uma glicoproteína com massa molecular de aproximadamente 90 kDa. Essa glicoproteína contém epítomos proteicos específicos da espécie e epítomos glicosídicos, que facilitam a identificação da espécie e a reação com anticorpos humanos (GUIMARÃES; HAMILTON; DE; NOSANCHUK *et al.*, 2008; HAMILTON; BARTHOLOMEW; FIGUEROA; FENELON *et al.*, 1990; HOLBROOK; SMOLNYCKI; YOUSEFF; RAPPLEYE, 2013; JOHNSON; KLOTZ; YORK; KRUFTH *et al.*, 2002; ZANCOPÉ-OLIVEIRA; REISS E FAU - LOTT; LOTT TJ FAU - MAYER; MAYER LW FAU - DEEPE *et al.*, 1999). A CatP tem aproximadamente 57 kDa de massa molecular, sendo descrita como uma catalase peroxissomal monofuncional, similar a catalase P já descrita para *Paracoccidioides brasiliensis* (GUIMARÃES; HAMILTON; DE; NOSANCHUK *et al.*, 2008; HOLBROOK; SMOLNYCKI; YOUSEFF; RAPPLEYE, 2013). Alguns estudos já descreveram que ambas as catalases atuam como importante fator de virulência para o fungo (ALBUQUERQUE; NAKAYASU; RODRIGUES; FRASES *et al.*, 2008; JOHNSON; KLOTZ; YORK; KRUFTH *et al.*, 2002).

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

O gene DDR48 já foi descrito como um importante mecanismo de sobrevivência do fungo na patogênese, sendo capaz de combater os efeitos do óxido nítrico e reparar o DNA (MOSTAFA; AWAD, 2014; TREGER; MCENTEE, 1990). Além disso, estudos com espécies de *Candida* demonstraram que esse gene atuou na resposta a drogas antifúngicas (BLANCETT; RUNGE; REYES; KENNEDY *et al.*, 2020; SHENG; SCHUSTER, 1993). Isso foi observado no estudo conduzido por Blancett e colaboradores (2020), os autores utilizaram de cepas mutantes de *H. capsulatum* e descobriram que o gene também foi importante na resposta antifúngica, além de, ajudar na sobrevivência do fungo na patogênese.

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

Na sua fase leveduriforme, o *H. capsulatum* necessita de alguns genes para que haja a sua manutenção. Dentre esses temos a YPS3, presente na superfície da parede do fungo, com massa molecular de 20 kDa. Essa proteína se liga a quitina na parede celular. Estudos

anteriores demonstraram que o seu silenciamento resultou em uma menor virulência, reduzindo a colonização fúngica (BOHSE; WOODS, 2005; 2007a; b; KEATH; PAINTER; KOBAYASHI; MEDOFF, 1989; WEAVER; SHEEHAN; KEATH, 1996).

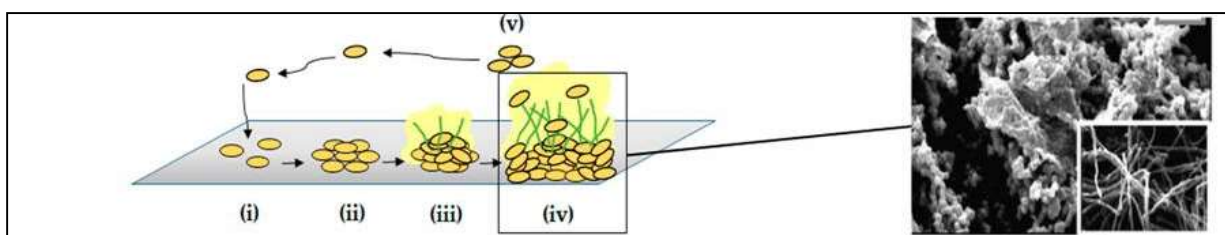
A proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é descrita como uma proteína da via glicolítica e detectada na superfície celular de fungos (MUNIZ, 2009). Um estudo conduzido por Pitangui (2017), indicou por meio de análise transcriptômica que o gene que codifica essa proteína foi significativamente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

1.5. BIOFILMES

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

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

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



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

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

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

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

1.6. TERAPÊUTICA E SUAS PROBLEMÁTICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.6.1. Mecanismo de ação

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

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

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

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

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

1.7. NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

8. CONCLUSÕES

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

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

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

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- HUNT, P. R. The *C. elegans* model in toxicity testing. **J Appl Toxicol**, 37, n. 1, p. 50-59, Jan 2017.
- HUSSEY, G. S.; KEANE, T. J.; BADYLAK, S. F. The extracellular matrix of the gastrointestinal tract: a regenerative medicine platform. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, 14, n. 9, p. 540-552, Sep 2017.
- HWANG, I.-S.; LEE, J.; LEE, D. G. Indole-3-carbinol Generates Reactive Oxygen Species and Induces Apoptosis. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 34, n. 10, p. 1602-1608, 2011.
- IMBEAUD, S.; GRAUDENS, E.; BOULANGER, V.; BARLET, X. *et al.* Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. **Nucleic acids research**, 33, n. 6, p. e56-e56, 2005.
- IRAZOQUI, J. E.; URBACH, J. M.; AUSUBEL, F. M. Evolution of host innate defence: insights from *Caenorhabditis elegans* and primitive invertebrates. **Nature reviews. Immunology**, 10, n. 1, p. 47-58, 2010.
- ISAAC, D. T.; BERKES, C. A.; ENGLISH, B. C.; HOCKING MURRAY, D. *et al.* Macrophage cell death and transcriptional response are actively triggered by the fungal virulence factor Cbp1 during *H. capsulatum* infection. **Molecular Microbiology**, 98, n. 5, p. 910-929, 2015.
- IVASKIENE, M.; MATUSEVICIUS, A. P.; GRIGONIS, A.; ZAMOKAS, G. *et al.* Efficacy of Topical Therapy with Newly Developed Terbinafine and Econazole Formulations in the Treatment of Dermatophytosis in Cats. **Pol J Vet Sci**, 19, n. 3, p. 535-543, Sep 1 2016.
- JEONG, S.-Y.; LEE, J.-H.; SHIN, Y.; CHUNG, S. *et al.* Co-Culture of Tumor Spheroids and Fibroblasts in a Collagen Matrix-Incorporated Microfluidic Chip Mimics Reciprocal Activation in Solid Tumor Microenvironment. **PloS one**, v.11, n. 7, p. e0159013, 2016.
- JIN, H.; GENG, Y.; YU, Z.; TAO, K. *et al.* Lead optimization and anti-plant pathogenic fungi activities of daphneolone analogues from *Stellera chamaejasme* L. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 93, p. 133-137, 2009.
- JOHNSON, C. H.; KLOTZ, M. G.; YORK, J. L.; KRUF, V. *et al.* Redundancy, phylogeny and differential expression of *Histoplasma capsulatum* catalases. **Microbiology (Reading)**, 148, n. Pt 4, p. 1129-1142, Apr 2002.
- KAMAL, A.; HUSSAINI, S. M.; SUCHARITHA, M. L.; POORNACHANDRA, Y. *et al.* Synthesis and antimicrobial potential of nitrofurantriazole congeners. **Org Biomol Chem**, 13, n. 36, p. 9388-9397, Sep 28 2015.
- KAPUR, S. K.; WANG, X.; SHANG, H.; YUN, S. *et al.* Human adipose stem cells maintain proliferative, synthetic and multipotential properties when suspension cultured as self-assembling spheroids. **Biofabrication**, 4, n. 2, p. 025004, 2012.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MARCELINO, M. Desenvolvimento de derivados nitrofuranos antifúngicos para o controle de infecções por *Candida* spp. 2018. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de pesquisa em Microbiologia.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

VITE-GARÍN, T.; ESTRADA-BÁRCENAS, D. A.; GERNANDT, D. S.; REYES-MONTES, M. D. *et al.* *Histoplasma capsulatum* Isolated from *Tadarida brasiliensis* Bats Captured in Mexico Form a Sister Group to North American Class 2 Clade. **Journal of Fungi**, 7, n. 7, 2021.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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