

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

THAYANA DUTRA DE ANDRADE

**EFEITO DO FLUCONAZOL NA INFECÇÃO PARACOCCIDIOIDOMICÓTICA EM
MODELO EXPERIMENTAL MURINO**

Alfenas/MG

2025

THAYANA DUTRA DE ANDRADE

**EFEITO DO FLUCONAZOL NA INFECÇÃO PARACOCCIDIOIDOMICÓTICA EM
MODELO EXPERIMENTAL MURINO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro.

Orientador: Profa. Dr^a. Eva Burger
Coorientadora: Dr^a. Lauana Aparecida Santos

Alfenas/MG

2025

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Andrade, Thayana Dutra de.

Efeito do Fluconazol na infecção paracoccidioidomicótica em modelo experimental murino / Thayana Dutra de Andrade. - Alfenas, MG, 2025.
94 f. : il. -

Orientador(a): Eva Burger.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2025.
Bibliografia.

1. Imunomodulação. 2. Fluconazol. 3. Paracoccidioides brasiliensis. 4. Paracoccidioides lutzii. I. Burger, Eva, orient. II. Título.

THAYANA DUTRA DE ANDRADE

EFEITO DE DIFERENTES FORMULAÇÕES DE FLUCONAZOL NA INFECÇÃO PARACOCCIDIÓDICA EM
MODELO EXPERIMENTAL MURINO

O Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Interação Patógeno Hospedeiro.

Aprovada em: 2 de abril de 2025.

Profa. Dra. Eva Burger

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

Prof. Dr. James Venturini

Instituição: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul- UFMS

Profa. Dra. Amanda Latércia Tranches Dias

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Eva Burger, Professor do Magistério Superior**, em 09/04/2025, às 16:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1487909** e o código CRC **5587D6D0**.

*Dedico este trabalho aos meus **pais**, que mesmo sem oportunidades, através de muito trabalho e luta, abriram os caminhos para que eu ocupasse este lugar hoje. Que este trabalho seja o símbolo das nossas pequenas vitórias.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus e aos meus guias espirituais, pela proteção e sabedoria que foram determinantes para que eu pudesse chegar aqui. Em todas as minhas escolhas me sinto protegida e abençoada, pois sei que não estou sozinha por onde andar.

*Agradeço à minha mãe, **Maria de Fátima Dutra Andrade**, que é grande exemplo de mulher batalhadora e forte, meu grande motivo de buscar ser uma grande profissional. Cada pequena conquista tem origem no seu apoio e não haveria palavras ou dissertações suficientes para agradecê-la. Também ao meu pai, **João José de Andrade** (in memorium), que me ensinou o valor do trabalho e da honestidade. Ao meu companheiro, **Matheus Luca Carotta Gabriel**, o qual não poderia deixar de agradecer pela paciência, conselhos e por ser minha âncora nos momentos de dificuldade. Desde o primeiro degrau até o atual momento, quando passamos a dividir a bancada, é meu grande incentivador, sempre fazendo dos meus sonhos, nossos. Agradeço a todos meus amigos e colegas, que em algum momento dessa longa jornada trouxeram palavras de apoio e incentivo, e também momentos de descontração em meio ao cansaço. Em especial a **Ana Flávia Memento Siqueira** e **Pedro Oliveira Felipe**, amigos de longa data, que foram parte importante da minha jornada até aqui. Encontrar pessoas que podemos dividir nossos sonhos, faz o fardo um pouco mais leve.*

*Agradeço especialmente à minha orientadora, **Prof. Dra. Eva Burger** pelos conselhos, broncas, conversas e ensinamentos. Me sinto muito honrada por ser orientada por uma profissional referência e destaque em sua área de atuação, e também uma grande mulher, a qual tive a oportunidade de me tornar amiga nestes anos de mestrado e partilhar das suas ilustres histórias. Ao laboratório de Imunopatologia de Micoses, onde fui acolhida e tive a oportunidade de crescer como profissional e trabalhar com pessoas incríveis, os quais guardarei inúmeras lembranças. Aos meus companheiros de bancada, **Júlia de Castro Dutra**, **Enrico Picolli Marinho** e **Otávio Augusto Carletto**, meu muito obrigada. Em especial, agradeço a **Dra. Lauana Aparecida Santos**, minha coorientadora e colega de profissão, pela paciência e carinho que divide seus conhecimentos e experiências, e pelo apoio em todas as etapas deste mestrado. Agradeço também ao **Prof. Dr. Luiz***

*Cosme Cotta Malaquias, que se tornou um amigo durante esses anos de mestrado, pelos ensinamentos compartilhados durante as disciplinas, apoio nos experimentos e pelas suas sábias palavras. Agradeço à **Prof. Dra. Amanda Latércia Tranches Dias**, que me cedeu a oportunidade de realizar o estágio docente em suas aulas de microbiologia básica ao curso de farmácia, onde pude aprender e aprimorar conhecimentos, e também amadurecer meu ponto de vista como futura docente.*

*Agradeço ao **Prof. Dr. Diogo Teixeira Carvalho** e seu aluno de doutorado, **Cleydson Finotti Cordeiro**, pelas suas contribuições e pela parceria para realização desta pesquisa. Agradeço ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPGCB)** e todos os professores do programa, onde tive a oportunidade de crescer profissionalmente, e ao coordenador do programa **Prof. Dr. Masaharu Ikegaki**, por todo apoio durante este período.*

*Finalmente, agradeço à **Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL)**, a todos seus funcionários, em especial aos do **Departamento de Microbiologia e Imunologia (DMI)**, local onde me senti acolhida desde o primeiro dia e fiz grandes amigos, que pretende levar por toda vida.*

*O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)** – Código de Financiamento 001.*

A bolsa de mestrado concedida foi crucial para a realização do mesmo e permanência na universidade. Sem o fomento é impossível fazer pesquisa de qualidade. Espero que a ciência brasileira continue crescendo e os pesquisadores sejam cada vez mais valorizados.

Minha eterna gratidão a todos aqueles que de alguma forma ajudaram, de forma direta ou indireta, a chegar até aqui e concluir este trabalho.

“Nada na vida é para ser temido, apenas compreendido. Agora é o momento de compreender mais para que possamos temer menos.”

(Marie Curie, 1920)

RESUMO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica e endêmica de característica granulomatosa, causada pelos fungos do complexo *Paracoccidioides* spp. Há poucos fármacos disponíveis para tratamento desta micose. Tendo isso em vista, foi investigado o efeito da utilização do fármaco Fluconazol (FLC) na PCM. Visando avaliar seus efeitos, foi avaliada a citotoxicidade do FLC frente à PI e Pb18, empregando ensaios *in vitro*. A citotoxicidade também foi testada frente a células esplênicas. Na sequência, por meio da infecção subcutânea em *air pouch* em camundongos *swiss*, foram obtidas amostras para os experimentos *ex vivo*. Nos experimentos *in vitro*, as três doses de FLC demonstraram reduzir o número de fungos viáveis de PI. As doses também reduziram o número absoluto de Pb18. Para avaliar a capacidade antimicrobiana do fármaco, a técnica de macrodiluição foi realizada utilizando 1, 2 e 3 mg/mL. Nos experimentos *ex vivo* observou-se que a concentração de FLC de 2 mg/mL estimulou maior migração celular comparado com a de 1 mg/mL, com ambas as cepas fúngicas. Em contrapartida, nos grupos infectados com Pb18 não houve diferença entre os grupos infectados e tratados. Não houve diferença na produção de H₂O₂ nos grupos infectados por PI, porém, na infecção por Pb18, a produção foi menor que no grupo controle no grupo tratado com 2 mg/mL. Por outro lado, a dose de 2 mg/mL estimulou a produção de catalase na infecção por PI. A maior produção de EROS foi obtida empregando tratamento com 2mg/mL de FLC na infecção por PI e 1 mg/mL na infecção por Pb18. O tratamento com FLC resultou em efeitos diferentes nas duas cepas do fungo: na infecção por PI estimulou a produção de IL-17, IL-12 e TNF- α e na infecção por Pb18 causou decréscimo da produção de IL-4, IL-17, KC, TNF- α e aumento de IL-1 β . Analisados em conjunto, os resultados sugerem que as diferentes doses de FLC, na presença de PI ou Pb18 estimulam de maneiras diferentes as células da resposta imune. Apesar disso, o fármaco é capaz de gerar estímulo celular com conseqüente combate aos fungos, demonstrando sua eficácia na paracoccidioidomicose experimental.

Palavras-chave: Imunomodulação; Fluconazol; *Paracoccidioides brasiliensis*; *Paracoccidioides lutzii*

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic and endemic granulomatous mycosis caused by fungi of the *Paracoccidioides* spp. complex. There are currently few pharmacological options available for the treatment of this mycosis. In light of this, the effects of the antifungal drug Fluconazole (FLC) on PCM were investigated. To assess its effects, the cytotoxicity of FLC was evaluated against *Paracoccidioides lutzii* (PI) and *Paracoccidioides brasiliensis* strain 18 (Pb18) using *in vitro* assays. Cytotoxicity was also tested in splenic cells. Subsequently, samples for *ex vivo* experiments were obtained through subcutaneous infection using the air pouch model in Swiss mice. In the *in vitro* experiments, all three doses of FLC demonstrated a reduction in the number of viable PI fungi. Similarly, the doses also reduced the absolute number of Pb18 cells. To evaluate the antimicrobial activity of the drug, a macrodilution technique was employed using concentrations of 1, 2, and 3 mg/mL. In the *ex vivo* experiments, it was observed that the 2 mg/mL concentration of FLC stimulated greater cell migration compared to 1 mg/mL in infections with both fungal strains. Conversely, in the groups infected with Pb18, no significant differences were observed between infected and treated groups. There was no difference in H₂O₂ production in the PI-infected groups; however, during Pb18 infection, H₂O₂ production was lower in the group treated with 2 mg/mL compared to the control. On the other hand, the 2 mg/mL dose stimulated catalase production during PI infection. The highest production of reactive oxygen species (ROS) was observed with 2 mg/mL of FLC during PI infection and 1 mg/mL during Pb18 infection. Treatment with FLC resulted in differential effects on the two fungal strains: in PI infection, it stimulated the production of IL-17, IL-12, and TNF- α , while in Pb18 infection, it led to a decrease in IL-4, IL-17, KC, and TNF- α levels, and an increase in IL-1 β . Taken together, the results suggest that different doses of FLC, in the presence of either PI or Pb18, stimulate immune response cells in distinct ways. Nonetheless, the drug is capable of eliciting cellular activation leading to fungal control, thereby demonstrating its efficacy in experimental paracoccidioidomycosis.

Keywords: Immunomodulation; Fluconazole; *Paracoccidioides brasiliensis*; *Paracoccidioides lutzii*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vias de estresse oxidativo e nitrosativo nos neutrófilos	22
Figura 2 - Esquema da escolha das doses de Fluconazol utilizada nos ensaios	30
Figura 3 - Camundongos infectados via <i>air pouch</i>	33
Figura 4 - Cronologia do modelo de infecção <i>air pouch</i>	34
Figura 5 - Cinética do número absoluto de células fúngicas viáveis tratadas com álcool etílico (E+PI), propanona (Ac+PI), álcool metílico (M+PI) e posteriormente com Fluconazol diluído em álcool metílico (PI+Met+FLC 1mg/mL) (PI+Met+FLC 2mg/mL) (PI+Met+FLC 3mg/mL)	42
Figura 6 - Cinética do número absoluto de células viáveis de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (Pb18) tratadas com álcool metílico (Pb18+Met) e Fluconazol (Pb18+FLC 1 mg) (Pb18+FLC 2 mg) (Pb18+FLC 3 mg), respectivamente.	43
Figura 7 - Atividade antifúngica dos diferentes diluentes, álcool etílico (PI+Al), propanona (PI+Ac) e álcool metílico (PI+M) e posteriormente de diferentes concentrações de Fluconazol (PI+FLC 1 mg/mL), (PI+FLC 2 mg/mL), (PI+FLC 3 mg/mL) (Pb18+FLC 1mg), (Pb18+FLC 2mg) e (Pb18+FLC 3mg) através da quantificação de unidades formadoras de colônia (UFC) de <i>P. lutzii</i> e Pb18 na avaliação após 72 horas.	44
Figura 8 - Cinética do número absoluto de células esplênicas viáveis tratadas com álcool etílico (Esp+Al), propanona (Esp+Ac), álcool metílico (Esp+M) e posteriormente com Fluconazol (Esp+Met+FLC 1mg) (Esp+ Met+FLC 2mg) (Esp+Met+FLC 3mg), respectivamente.....	46
Figura 9 - Atividade mitocondrial de células esplênicas tratadas com álcool etílico (Esp+Al), propanona (Esp+Ac), álcool metílico (Esp+M) e posteriormente com Fluconazol (Esp+Met+FLC 1mg) (Esp+Met+FLC 2mg) (Esp+Met+FLC 3mg), respectivamente.....	47
Figura 10 - Cinética do número absoluto de células fúngicas viáveis na presença de células esplênicas tratadas com álcool etílico (Esp+PI+Al), propanona (Esp+PI+Al), álcool metílico (Esp+PI+M) e posteriormente com Fluconazol (Esp+PI+Met+FLC 1mg/mL) (Esp+PI+Met+FLC	

2mg/mL) (Esp+PI+Met+FLC 3mg/mL), respectivamente.....	48
Figura 11 - Cinética do número absoluto de células fúngicas viáveis na presença de células esplênicas tratadas com álcool metílico (Esp+Pb18+Met) e Fluconazol (Esp+Pb18+Met+FLC 1mg) (Esp+Pb18+Met+FLC 2mg) (Esp+Pb18+Met+FLC 3mg), respectivamente.	49
Figura 12 - Efeito do Fluconazol 1 mg/mL e 2 mg/mL no número absoluto de células e na atividade das desidrogenases mitocondriais na <i>air pouch</i>	51
Figura 13 - Efeito do Fluconazol 1 mg/mL e 2 mg/mL no número absoluto de células do exsudato e na atividade das desidrogenases mitocondriais na <i>air pouch</i> em animais infectados com Pb18.	52
Figura 14 - Efeito do Fluconazol nas concentrações de 1 mg/mL e 2 mg/mL sobre o número de <i>P. lutzii</i> e Pb18 através das unidades formadoras de colônia (UFC) na <i>air pouch</i>	53
Figura 15 - Efeito do Fluconazol 1mg/mL e 2mg/mL em relação à síntese proteica total pelas células que afluíram à <i>air pouch</i> em animais infectados com <i>P. lutzii</i> ou Pb18.....	54
Figura 16 - Efeito do Fluconazol 1 mg/mL e 2 mg/mL na produção de óxido nítrico (NO) a partir de células obtidas da <i>air pouch</i> subcutânea em animais infectados com <i>P. lutzii</i> ou Pb18.....	55
Figura 17 - Efeito do Fluconazol na produção de peróxido de hidrogênio a partir de células obtidas da <i>air pouch</i> em animais infectados com <i>P. lutzii</i> ou Pb18.....	56
Figura 18 - Efeito do Fluconazol na produção de catalase a partir de células obtidas da <i>air pouch</i> em animais infectados com <i>P. lutzii</i> ou Pb18.	57
Figura 19 - Efeito do Fluconazol na produção de espécies reativas de oxigênio a partir de células obtidas da <i>air pouch</i> em animais infectados com <i>P. lutzii</i> em duas horas.	59
Figura 20 - Efeito do Fluconazol na produção de espécies reativas de oxigênio a partir de células obtidas da <i>air pouch</i> subcutânea em animais infectados com Pb18 no tempo de 2 horas.	59
Figura 21 - Efeito do Fluconazol no teor das citocinas IL-4 e IL-10 secretadas pelas células do afluxo obtidos da <i>air pouch</i> em animais infectados com <i>P. lutzii</i> e Pb18.	60

Figura 22 - Efeito do Fluconazol no teor das citocinas KC, GM-CSF e IL-17 secretadas pelas células do afluxo obtidos da <i>air pouch</i> em animais infectados com <i>P. lutzii</i> e Pb18.....	61
Figura 23 - Efeito do Fluconazol no teor das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-1 β e IL-12 secretadas pelas células do afluxo obtidos da <i>air pouch</i> em animais infectados com <i>P. lutzii</i> e Pb18.	62
Figura 24 - Atividade dos fagócitos após tratamento com FLC 2mg/mL na infecção por <i>P. lutzii</i>	64
Figura 25 - Atividade dos fagócitos após tratamento com FLC 2mg/mL na infecção por Pb18	65
Figura 26 - Cinética do número absoluto de células fúngicas viáveis tratadas com Fluconazol diluído em álcool etílico (PI+E+FLC 1mg/mL) (PI+E+FLC 2mg/mL) (PI+E+FLC 3mg/mL), propanona (PI+Ac+FLC 1mg/mL) (PI+Ac+FLC 2mg/mL) (PI+Ac+FLC 3mg/mL) e álcool metílico (PI+Met+FLC 1mg/mL) (PI+Met+FLC 2mg/mL) (PI+Met+FLC 3mg/mL), respectivamente.....	85
Figura 27 - Número de esplenócitos viáveis após tratamento com Fluconazol diluído em álcool etílico (PI+E+FLC 1mg/mL) (PI+E+FLC 2mg/mL) (PI+E+FLC 3mg/mL), propanona (PI+Ac+FLC 1mg/mL) (PI+Ac+FLC 2mg/mL) (PI+Ac+FLC 3mg/mL) e álcool metílico (PI+Met+FLC 1mg/mL) (PI+ Met+FLC 2mg/mL) (PI+Met+FLC 3mg/mL), respectivamente.....	86
Figura 28 - Unidades formadoras de colônias (UFC) de <i>P. lutzii</i> após tratamento com Fluconazol diluído em álcool etílico (PI+E+FLC 1mg/mL) (PI+E+FLC 2mg/mL) (PI+E+FLC 3mg/mL), propanona (PI+Ac+FLC 1mg/mL) (PI+Ac+FLC 2mg/mL) (PI+Ac+FLC 3mg/mL) e álcool metílico (PI+ Met+FLC 1mg/mL) (PI+Met+FLC 2mg/mL) (PI+Met+FLC 3mg/mL), respectivamente.....	87
Figura 29 - Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) pelas células obtidas da <i>air pouch</i> de animais infectados com <i>P. lutzii</i> e tratados com as doses de Fluconazol no tempo de 6 horas (A) e 18 horas (B).....	88
Figura 30 - Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) pelas células	

obtidas da *air pouch* de animais infectados com Pb18 e tratados com as doses de Fluconazol no tempo de 6 horas (A) e 18 horas (B)..... 89

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	AGENTE CAUSADOR	17
2.2	PARACOCCIDIOIDOMICOSE	18
2.3	IMUNOPATOLOGIA DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE.....	19
2.4	TRATAMENTOS DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE.....	23
2.4.1	Fluconazol	23
2.5	MODELO EXPERIMENTAL DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE	25
3	OBJETIVOS	26
3.1	OBJETIVO GERAL.....	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS <i>IN VITRO</i>	26
3.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS <i>EX VIVO</i>	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	27
4.2	ANIMAIS	27
4.3	ISOLADO DE <i>PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS</i> E <i>PARACOCCIDIOIDES LUTZII</i> ...	27
4.4	FLUCONAZOL	28
4.5	MODELO <i>IN VITRO</i>	28
4.5.1	Teste de susceptibilidade antifúngica	29
4.5.2	Efeito do Fluconazol <i>in vitro</i> sobre esplenócitos.....	29
4.6	MODELO SUBCUTÂNEO DE <i>AIR POUCH</i>	30
4.6.1	Grupos experimentais	30
4.6.2	Preparação de suspensões fúngicas para a infecção de camundongos....	30
4.6.3	Indução da <i>air pouch</i> subcutânea.....	31
4.6.4	Tratamento com Fluconazol	31
4.6.5	Obtenção e cultivo de células da bolsa de ar subcutânea.....	32
4.6.7	Atividade metabólica celular (MTT)	32
4.6.6	Quantificação de proteínas totais	33
4.6.8	Dosagem de peróxido de hidrogênio.....	33
4.6.9	Dosagem de catalase.....	33

4.6.10	Dosagem de oxido nítrico (NO)	34
4.6.11	Dosagem de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS)	34
4.6.12	Quantificação de citocinas.....	34
4.6.13	Capacidade microbicida dos fagócitos	35
4.6.14	Quantificação de unidades formadoras de colônia (UFC) nas <i>air pouch</i> ..	36
4.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	36
5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	37
5.1	<i>IN VITRO</i>	37
5.2	<i>EX VIVO</i>	38
6	RESULTADOS.....	39
6.1	RESULTADOS <i>IN VITRO</i>	39
6.1.1	Ensaio <i>in vitro</i> da citotoxicidade do fármaco Fluconazol sobre <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i>	39
6.1.2	Ensaio <i>in vitro</i> da citotoxicidade do fármaco Fluconazol sobre culturas de células esplênicas	43
6.2	RESULTADOS <i>EX VIVO</i>	48
6.2.1	Avaliação das células do exsudato oriundas das <i>air pouch</i>	48
6.2.1	Ensaio bioquímicos em sobrenadantes de células oriundas das <i>air pouch</i>	52
6.2.2	Teor das citocinas produzidas pelas células do exsudato obtidos nas bolsas de ar subcutâneas	62
6.2.3	Capacidade microbicida dos fagócitos	66
7	DISCUSSÃO.....	69
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	74
	REFERÊNCIAS.....	75
	ANEXOS.....	83
10	CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIFAL (CEUA)	84
11	MATERIAL SUPLEMENTAR	84
12	CERTIFICADOS DE PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS	86

1 INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma infecção sistêmica causada por fungos termicamente dimórficos do complexo *Paracoccidioides* spp. Caracteriza-se como uma doença granulomatosa sistêmica, com maior acometimento dos pulmões, mucosa do trato aerodigestivo superior (UADT), pele e glândulas adrenais, contudo, pode vir a acometer qualquer órgão do organismo (Mendes *et al.*, 2017).

A PCM é uma doença endêmica nos países da América Latina, sendo que os países da América do Sul apresentam maior incidência (Restrepo; McEwen; Castañeda, 2001). A população mais acometida são homens, com idade entre 30 e 50 anos, e principalmente aqueles que exercem atividade agrícola (McEwen *et al.*, 1995). A doença pode ter diferentes apresentações, dependendo de fatores como idade, sexo e integridade do sistema imunológico do paciente, assim como da quantidade de fungos inalados e características da cepa (Shankar *et al.*, 2011). A PCM é classificada em infecção subclínica, forma juvenil aguda/subaguda ou forma adulta crônica (Mendes *et al.*, 2017).

A caracterização filogenética das espécies de *Paracoccidioides* spp. é recente (Carrero *et al.*, 2008), e a descrição formal de *P. lutzii*, denominado previamente de Pb01-like, foi proposta por Teixeira e colaboradores em 2009, em homenagem ao descobridor do *P. brasiliensis*, Adolfo Lutz (Teixeira *et al.*, 2009). Por este motivo, dados referentes à incidência da PCM causada por *P. lutzii* estão subnotificados, na qual grande parte da literatura descreve a interação entre o hospedeiro e *P. brasiliensis* (Theodoro *et al.*, 2012).

No tratamento da PCM o Itraconazol, Sulfametazol-trimetropim e a Anfotericina B são as principais opções (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2018). Contudo, com o objetivo de evitar recaídas, a terapia antifúngica é mantida por longos períodos, mesmo havendo melhora clínica. Com isso, há necessidade de buscar alternativas com menor tempo de tratamento e que haja uma interação com a resposta imune do hospedeiro, afim de diminuir os danos causados no desenvolvimento da resposta imune e do longo tratamento (Menezes; Soares; Fontes, 2006).

O fluconazol é um antifúngico da classe dos triázóis, com baixa hepatotoxicidade e boa biodisponibilidade no líquido cefalorraquidiano (Zervos; Meunier, 1993). É um fármaco com eficácia contra outros fungos patogênicos, como *Histoplasma capsulatum* (Graybill; Palou; Ahrens, 1986) e *Cryptococcus neoformans*

(Troke *et al.*, 1987). Apesar disso, é pouco empregado no tratamento da PCM, sendo restrito apenas quando há contraindicação dos outros antifúngicos preconizados no tratamento. Também é utilizado quando há acometimento do sistema nervoso central (Do Valle *et al.*, 1998) e intraespinal (Francesconi *et al.*, 2011). Em modelo experimental murino, fluconazol foi capaz de diminuir a carga fúngica tecidual, com maior sobrevivência dos animais quando comparado a outros antifúngicos (Silva Granzoto; Vitali; Martinez, 2013). Na literatura não existem trabalhos que demonstrem a interação do fármaco com a resposta imunológica do hospedeiro na paracoccidiodomicose. Com isso, busca-se verificar os efeitos do fluconazol sobre o PCM, de maneira a sugerir um tratamento eficaz.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 AGENTE ETIOLÓGICO

O gênero *Paracoccidioides* faz parte do filo Ascomycota, classe Eurotiomycetes, ordem Onygenales, família Ajellomycetaceae (Brito, 2012; Rodrigues *et al.*, 2023). Esses fungos são caracterizados como saprofiticos, termodimórficos e associados a sangue quente de hospedeiros vertebrados (Restrepo; McEwen; Castaneda, 2001). Mais recentemente, com o advento da taxonomia molecular, foram identificadas quatro espécies do complexo de *P. brasiliensis*, e *P. lutzii*, geneticamente isolado e com diferenças morfológicas (Turissini *et al.*, 2017).

Paracoccidioides spp. foi relatado pela primeira vez em 1908 por Adolfo Lutz. Através da observação de pacientes com uma doença nasofaríngea, Lutz descreveu um fungo com múltiplas células de brotamento (Lutz, 1908). Contudo, o nome *Paracoccidioides brasiliensis* foi oficialmente aceito apenas em 1971 durante a reunião da Organização Pan-Americana da Saúde sobre paracoccidioidomicose em Medellín, na Colômbia. Com o desenvolvimento de técnicas de sequenciamento genético, várias espécies, como *P. americana* (PS2), *P. restrepiensis* (PS3), *P. venezuelensis* (PS4), pertencentes ao grupo genético de *P. brasiliensis* (Teixeira *et al.*, 2014), e as não cultiváveis *P. loboii* e *P. cetii*, foram identificadas como pertencentes ao gênero *Paracoccidioides* spp. (Turissini *et al.*, 2017). Apesar de atualmente, o termo paracoccidioidomicose definir as doenças causadas por todas as espécies de *Paracoccidioides*, a doença granulomatosa sistêmica clássica é causada apenas por *P. brasiliensis* e *P. lutzii* (Rodrigues *et al.*, 2023).

Em 2008, Carrero *et al.* identificaram um isolado atípico, classificado a princípio como *P. brasiliensis*, porém altamente divergente dos outros isolados e das outras espécies filogenéticas descritas anteriormente. Posteriormente, Teixeira *et al.* (2009), utilizando o método de concordância genealógica de reconhecimento filogenético de espécies (GCPSR), confirmaram que o isolado, denominado inicialmente de Pb01-like, constituía uma nova espécie filogenética pertencente ao gênero *Paracoccidioides*. Teixeira *et al.* (2009) sugeriram o nome *Paracoccidioides lutzii* a espécie, em homenagem ao médico micologista descobridor da doença, Adolfo Lutz.

2.2 PARACOCCIDIOIDOMICOSE

A paracoccidiodomicose (PCM) é uma infecção de alta prevalência na América Latina, principalmente no Brasil. A doença tem sua incidência e prevalência subestimadas, uma vez que não há uma política de notificação obrigatória (Gegembauer *et al.*, 2014). Além disso, o diagnóstico pode ser complexo, já que a PCM pode ser assintomática, ou disseminar-se pelo organismo, a depender da interação do fungo com a resposta imune do paciente (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2018).

A infecção por *Paracoccidioides* spp. é adquirida por via respiratória. Na natureza o fungo se desenvolve em estruturas filamentosas que produz conídios. Ao inalar estes conídios, tem origem a forma leveduriforme do fungo (Martinez; Moya, 2009). As profissões ou atividades com envolvimento do solo contaminado são o principal fator de risco. Grande parte dos pacientes acometidos com PCM exerceram atividades agrícolas, terraplanagem, preparo do solo e jardinagem. Alcoolismo e tabagismo também estão classificados como fatores de risco, tendo em vista que estão associados ao desenvolvimento da micose (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2018).

A interação entre o hormônio estrogênio de mamíferos, considerado o hormônio sexual feminino, às proteínas presentes em *P. brasiliensis* foi demonstrada (Stover *et al.*, 1986). Dessa forma, o estrogênio se mostrou capaz de bloquear a transformação do fungo saprofítico em levedura *in vitro* e *in vivo* (Shankar *et al.*, 2011), o que possivelmente tornou a PCM em mulheres em idade reprodutiva uma doença escassa.

A apresentação clínica da PCM depende de diversas variáveis inerentes ao processo infeccioso, como a duração do processo, idade, sexo e a integridade do sistema imunológico (Burger, 2021). Não há uma caracterização da infecção primária, tendo em vista o longo período de incubação, desde o contato com fungo até o desenvolvimento da doença. O entendimento dos eventos iniciais da infecção é dificultado pela falta de esclarecimento sobre o habitat de *Paracoccidioides* spp. e pelo baixo número de casos agudos (Shankar *et al.*, 2011). Além disso, a incidência e prevalência da PCM são subestimadas, uma vez que não é uma doença de notificação (Martinez, 2017).

A PCM é classificada em: forma subclínica, juvenil aguda/subaguda, moderada,

grave, forma adulta ou crônica, forma mista e forma residual. A forma aguda/subaguda é considerada a mais grave da PCM, na qual há disseminação de *Paracoccidioides* por vários órgãos (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2017). Geralmente é de progressão rápida, com sintomas graves e mau prognóstico. Esta forma é diagnosticada principalmente em crianças desnutridas e pacientes com menos de 30 anos, além de pacientes portadores do vírus HIV em qualquer idade (Shankar *et al.*, 2011). A forma subclínica é caracterizada como infecção silenciosa, na qual o fungo pode permanecer inativo por um longo período. É detectada através da reação de hipersensibilidade tardia ao teste cutâneo de reatividade à paracoccidioidina. Apesar disso, posteriormente, em um quadro de imunossupressão, pode ter origem a manifestação clínica da PCM (Brummer *et al.*, 1993).

O diagnóstico da doença é feito através do exame micológico direto, e podem ser observadas estruturas leveduriformes com brotamentos, características de *Paracoccidioides* spp. O exame laboratorial é realizado em amostras clínicas obtidas de lesões suspeitas (Ambrósio *et al.*, 2014). A sorologia é adequada para o acompanhamento do paciente e é capaz de identificar antígenos e anticorpos (Rodrigues *et al.*, 2023). As técnicas moleculares também podem ser utilizadas como alternativa para diagnóstico da PCM. Alguns métodos podem detectar *Paracoccidioides* spp. em diversos tipos de amostras, como escarro, pus, tecido fresco biopsiado, fluido de lavado bronco alveolar e fluido cérebro-espinhal (Pinheiro *et al.*, 2020).

O controle de cura da PCM ainda não está bem estabelecido, parâmetro importante para definir o momento da interrupção do tratamento, com a finalidade de evitar recaídas. Apesar disso, a regressão dos sinais clínicos, estabilização dos achados radiológicos, negatificação sorológica e micológica, são parâmetros utilizados para a tomada de decisão (Ambrósio *et al.*, 2014).

2.3 IMUNOPATOLOGIA DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE

Paracoccidioides spp. é capaz de infectar e gerar doença em pacientes imunocompetentes, caracterizando uma doença endêmica. No hospedeiro, pode ser encontrado em meio intracelular e também no extracelular. Portanto, é necessário a combinação de vários mecanismos do sistema imune em resposta ao fungo (Burger,

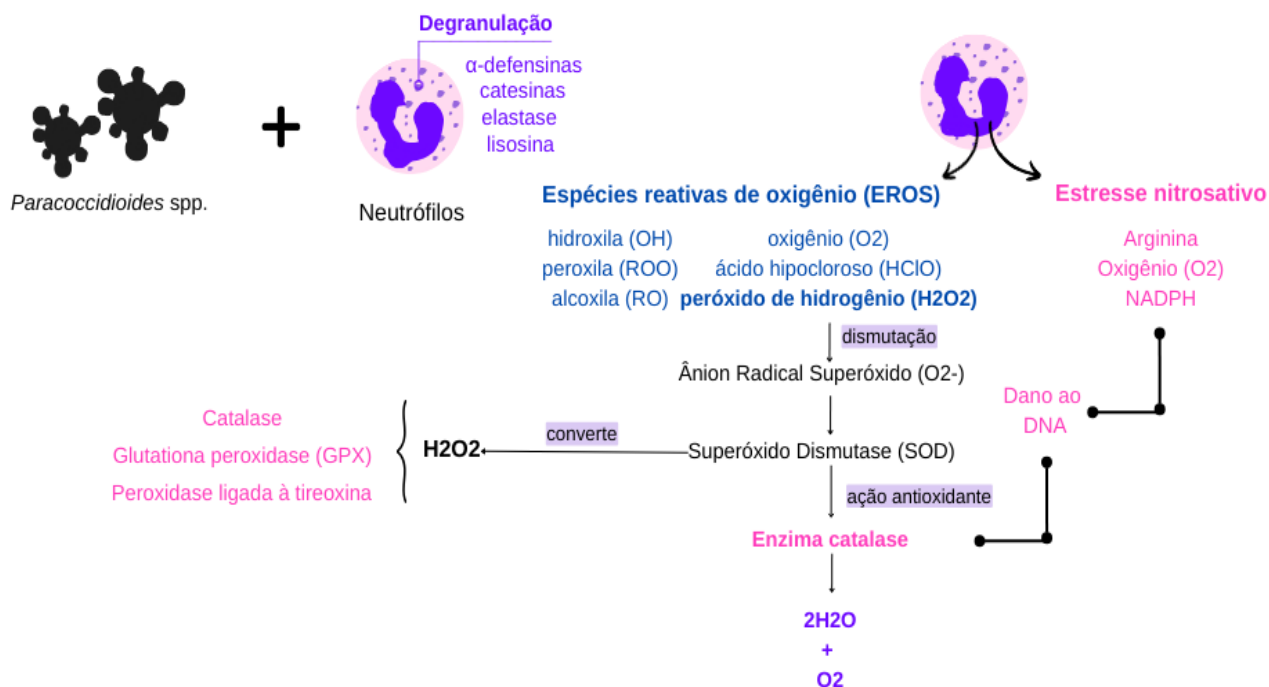
2021).

A formação de granulomas é uma característica marcante da PCM. Nessas estruturas, há a contenção do microrganismo que se encontra em equilíbrio com o sistema imunológico, sem disseminação (Burger, 2021). Granulomas bem definidos e encapsulados são importantes para o controle da infecção. Estes granulomas são constituídos por macrófagos gigantes multinucleados e outros leucócitos, envoltos por linfócitos, responsáveis por estimular os macrófagos (Nishikaku *et al.*, 2009). Além disso, o granuloma é cercado por fibroblastos produtores de fibras colágenas (Fortes *et al.*, 2011). Camundongos incapazes de montar granulomas organizados, devido a deficiência de TNF- α , apresentaram disseminação de *Paracoccidioides* spp. e consequente mortalidade (Souto *et al.*, 2000)

Os neutrófilos ou polimorfonucleares (PMNs) são as células leucocitárias mais abundantes no sangue humano e são as primeiras a serem recrutadas no local da infecção. Os PMNs são responsáveis por realizar fagocitose, degranulação e produção de armadilhas extracelulares (NET), além de serem capazes de se movimentarem através de *swarming* (Rosales, 2018).

Neutrófilos tem importante papel na resposta imune protetora contra *Paracoccidioides* spp., uma vez que realiza a eliminação direta do fungo e realiza a modulação da resposta imune adaptativa (Pina *et al.*, 2006). Nos granulomas, os neutrófilos são responsáveis por fagocitar os fungos e também por gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) e liberar citocinas pró e anti-inflamatórias que irão estimular a resposta imune (Hahn *et al.*, 2022). Os neutrófilos exercem sua atividade fungicida contra *Paracoccidioides* spp. através da produção de ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais de hidroxila (OH^\cdot), íon hipoclorito (OCl^-), ácido hipoclorito (HOCl) e cloraminas. Essas espécies reativas são produzidas através da NADPH oxidase e do sistema de mieloperoxidase (Meloni-Bruneri *et al.*, 1996).

Figura 1 - Vias de estresse oxidativo e nitrosativo nos neutrófilos



Fonte: do autor (2024)

A resposta humoral contra *Paracoccidioides spp.* é eficaz quando o fungo se encontra extracelularmente, permitindo a ativação do sistema complemento e da citotoxicidade celular mediada por anticorpos. Por outro lado, na fase em que o patógeno se encontra intracelular, a imunidade humoral é neutralizada, com predomínio da resposta imune celular (Burger, 2021). Portanto, altos níveis de anticorpos específicos contra *Paracoccidioides spp.* são correlacionados com as formas mais graves da doença, onde os mesmos não apresentam papel protetor (Fiorillo; Martinez, 1984).

Apesar dos altos níveis de anticorpos estarem associados com a forma severa da doença (De Almeida *et al.*, 1998), anticorpos policlonais tem efeito opsonizante frente a leveduras de *P. brasiliensis in vitro*, o que resultou no aumento da fagocitose, redução da carga fúngica e formação de granulomas bem organizados (Bueno *et al.*, 2016).

A resposta imune celular é responsável pelo controle da infecção, onde diferentes padrões de regulação dos linfócitos T tem demonstrado diferentes apresentações clínicas (Mendes *et al.*, 2017). A ativação dos linfócitos T auxiliares (Th) são o mecanismo central na resposta imune adquirida (Burger *et al.*, 2021). A

modulação da resposta Th1 e Th17 e conseqüentemente a presença das citocinas IL-17, IL-22, IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-10 estão relacionadas com um perfil de resistência ao *Paracoccidioides* em camundongos (Tristão *et al.*, 2017). Nos pacientes com predomínio destes perfis, geralmente a doença apresenta-se na forma crônicas leves ou moderadas, com granulomas compactos (Burger, 2021).

Por outro lado, os padrões de resposta Th2 e Th9 são associados à susceptibilidade ao *Paracoccidioides*, e, portanto, às formas juvenis agudas/subagudas e na forma adulta crônica grave, com granulomas desorganizados. Esses perfis estão associados a produção das citocinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, TGF- β e IL-27 (Hahn *et al.*, 2022).

Quadro 1 - Produção e atividade das principais citocinas e quimiocinas na PCM

Citocinas e Quimiocinas	Exerce ação sobre	Função
IL-4	Inibe macrófagos; estimula linfócitos B	Induz o perfil Th2
IL-10	Inibe macrófagos e síntese de outras CK. Estimulação de plasmócitos.	Inibe inflamação e citotoxicidade.
KC (CXCL1)	Ativação de neutrófilos	Aumento de processos inflamatórios; induz a quimiotaxia
GM-CSF	Progenitores hematopoiéticos; aumento da ativação de granulócitos maduros	Estimula da proliferação e diferenciação dos fatores hematopoiéticos de granulócitos e macrófagos
IL-17	Recrutamento de neutrófilos	Papel pró-inflamatório contra bactérias e fungos
TNF-α	Ativação de monócitos e neutrófilos	Papel na resposta inflamatória; indução de outras CK
IL-12	Estimula a proliferação de células NK e LT CD8+	Estimula síntese de IFN- γ e perfil Th1
IFN-γ	Ativa macrófagos, granulócitos e NK	Inibe replicação viral; ativa produção de NO; induz perfil Th1
IL-1β	Proliferação de linfócitos T	Induz síntese de TNF e IL-8

Fonte: do autor (2024). Adaptado de Ferreira *et al.* (20087), Loures *et al.*

(2015), Romagnolo *et al.* (2017) e Peron *et al.* (2020).

2.4 TRATAMENTOS DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE

Apesar de *Paracoccidioides* spp. ser susceptível à maioria dos antifúngicos disponíveis, para o tratamento da PCM Itraconazol e Sulfametoxazol-Trimetoprim (SMX-TMP) são os fármacos de escolha em formas localizadas leves ou moderadas, com eficácia descrita na literatura. A anfotericina B é empregada em casos graves e disseminados, com envolvimento do sistema nervoso central. Outras medidas, como interrupção de tabagismo, alcoolismo e incremento de uma dieta adequada, são essenciais para a cura do paciente (Ambrósio *et al.*, 2014).

Para a escolha do melhor tratamento, deve-se levar em conta a gravidade da doença e a saúde renal e hepática do paciente (Del Negro *et al.*, 2000). Geralmente, a terapêutica na PCM é mantida por longos períodos, de um a dois anos, com o objetivo de evitar recaídas, já que o critério de cura da doença é complexo (Menezes; Soares; Fontes, 2006). Através do tratamento procura-se controlar os sintomas clínicos, regular parâmetros laboratoriais e posteriormente, fazer a manutenção até a melhora dos marcadores imunológicos e inflamatórios (Shikanai-Yasuda, 2015).

2.4.1 Fluconazol

Com o objetivo de evitar recaídas, a terapia antifúngica é mantida por longos períodos, mesmo havendo melhora clínica. Com isso, há necessidade de buscar alternativas com menor tempo de tratamento e que interajam com a resposta imune, afim de diminuir os danos causados no desenvolvimento da resposta imune e do longo tratamento (Menezes; Soares; Fontes, 2006).

O Fluconazol é um antifúngico pertencente à classe dos triazóis. O fármaco é apresentado como um composto cristalino branco. Existem limitações para avaliação da sua eficácia *in vitro*, onde maioria dos microrganismos apresenta maior susceptibilidade *in vivo* (Zervos; Meunier, 1993). O Fluconazol apresenta característica fungistática, que impede a conversão de lanosterol em ergosterol, o que inibe a síntese de esteróis presentes na membrana fúngica e também sua replicação (Goa; Barradell, 2012). É um antifúngico sintético, com baixa ligação a proteínas plasmáticas, com depuração renal. Possui meia vida plasmática média de 30 horas e

apresenta boa tolerância em adultos (Debruyne, 1997). Existem relatos de alterações nas enzimas hepáticas, contudo, há normalização com a descontinuação do tratamento (Brammer; Farrow; Faulkner, 1990).

Fluconazol se mostrou eficaz em uma grande variedade de modelos animais de infecção fúngica, como por *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis* (Graybill; Palou; Ahrens, 1986) e *Histoplasma capsulatum* (Troke *et al.*, 1987). Em ensaio *in vitro* com *C. neoformans*, Fluconazol induziu o acúmulo de ERO intracelular, com conseqüente aumento do dano ao material genético, além de causar alterações na expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo (Peng *et al.*, 2018). Nesse sentido, Fluconazol é o tratamento de escolha como terapia de manutenção em pacientes com AIDS que tiveram meningite criptocócica, com maior eficácia que o Itraconazol (Saag *et al.*, 1999).

Fluconazol também foi empregado de forma profilática em pacientes submetidos ao transplante de medula óssea, no qual reduziu a incidência de infecções sistêmicas por *Candida* spp. e menor mortalidade por infecções fúngicas (Goodman *et al.*, 1992).

Geralmente é empregado no tratamento da PCM apenas quando há contraindicação do uso dos fármacos mais aplicados no tratamento, como Itraconazol e Anfotericina B. Também está entre os fármacos de escolha quando há o acometimento do sistema nervoso central, uma vez que apresenta boa biodisponibilidade no líquido cefalorraquidiano (Hahn *et al.*, 2022).

Granzoto, Vitali e Martinez (2013) descreveram em seu trabalho que o uso de Fluconazol para o tratamento de paracoccidiodomicose em modelo murino (ratos Wistar) apresentou melhor desempenho quando comparado com outras drogas antifúngicas, como Voriconazol e Sulfametazol–Trimetropim. Fluconazol foi capaz de reduzir a carga fúngica tecidual de forma mais intensa, com eficácia similar à Anfotericina B e Itraconazol, além de prolongar a sobrevivência dos animais (Silva Granzoto; Vitali; Martinez, 2013).

Moura e colaboradores (1994) relataram o tratamento bem-sucedido da paracoccidiodomicose humana com Fluconazol para paciente com envolvimento neuromedular. Também a relatos da utilização do fluconazol associado ao uso de Sulfametazol–Trimetropina para o tratamento de casos com envolvimento neural (Do Valle *et al.*, 1998) e intraespinhal (Francesconi *et al.*, 2011). O II Consenso Brasileiro

de Paracoccidiodomicose (2018) preconiza a terapêutica com uso de 600 a 800 mg de fluconazol por dia (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2018).

A concentração de 50 e 100 mg/kg de Fluconazol administradas por via oral, foi capaz de proteger camundongos de dose letal de *P. brasiliensis* (Stevens *et al.*, 1990). Martinez *et al.* (1999) demonstraram que quando administrado por via parenteral houve redução do número de leveduras no pulmão e no baço, apesar de não haver a eliminação total. Quando o tratamento foi administrado por via intraperitoneal demonstrou atividade antifúngica superior ao tratamento com Anfotericina-B.

Sabendo da interação entre o antifúngico e resposta imune do hospedeiro no combate ao microrganismo, é importante conhecer os mecanismos imunológicos envolvidos para que a terapia antifúngica tenha sucesso. Para o estabelecimento de um tratamento é necessário definir qual dose do fármaco apresentará melhor desempenho frente a PCM.

2.5 MODELO EXPERIMENTAL DA PARACOCCIDIODOMICOSE

Vários modelos animais são capazes de desenvolver a patologia causada por *Paracoccidioides* spp. de maneira similar àquela gerada em humanos. O modelo murino é considerado padrão ouro no estudo da PCM. São utilizadas diferentes linhagens de camundongos, classificadas de acordo com sua susceptibilidade (De Oliveira *et al.*, 2015).

Calich *et al.* (1985), demonstraram a diferença entre linhagens de camundongos susceptíveis (B10.A), com desenvolvimento de uma infecção similar à de pacientes com a forma grave da doença, e também outra linhagem de camundongos resistentes (A/Sn, A/J), que desenvolvem uma infecção parecida com a de pacientes com a forma crônica. Também há linhagens de camundongos consideradas intermediárias (BALB/c).

Os camundongos considerados resistentes tem em sua resposta imunológica a presença de macrófagos, ativação de PMNs, baixos títulos de anticorpos, altos níveis de IFN- γ e baixos níveis de IL-4, IL-5 e IL-10. Por outro lado, os camundongos susceptíveis tem as citocinas do perfil Th2 elevadas e baixas concentrações de IFN- γ (Kashino *et al.*, 2000).

A bolsa de subcutânea ou simplesmente bolsa *air pouch*, é um modelo empregado em estudos *ex vivo* de inflamação aguda ou crônica. A bolsa é formada no dorso dos camundongos após a injeção de ar estéril, onde posteriormente podem ser injetados microrganismos ou agentes inflamatórios (Selye, 1953). Meloni-Bruneri *et al.* (1996) demonstraram que houve alteração no metabolismo oxidativo de PMNs altamente puras obtidas em *air pouch* de camundongos resistentes e susceptíveis a infecção por Pb18.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o tratamento da paracoccidiodomicose experimental utilizando o antifúngico Fluconazol.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS *IN VITRO*

- a) Avaliar a susceptibilidade de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* com o antifúngico Fluconazol *in vitro*;
- b) Avaliar a citotoxicidade do antifúngico Fluconazol em culturas de esplenócitos.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS *EX VIVO*

- a) Avaliar o tratamento para paracoccidiodomicose com o antifúngico Fluconazol por via subcutânea em modelo de infecção *air pouch* em animais infectados com *P. lutzii* e *P. brasiliensis*;
- b) Avaliar o efeito do tratamento sobre as células que afluem após a infecção subcutânea por meio dos parâmetros bioquímicos e sobre o fungo por parâmetros microbiológicos;
- c) Avaliar o tratamento com Fluconazol sobre a imunidade inata e adquirida.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em pesquisa com animais da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). Após aprovação do projeto (nº 0029/2023) deu-se início aos estudos experimentais, de acordo com as normas empregadas pelo CEUA (UNIFAL-MG) e baseado nos procedimentos que vem sendo realizados pelos integrantes do grupo de pesquisa em projetos anteriores aprovados por comitês de ética da Universidade de São Paulo (USP) e da UNIFAL.

4.2 ANIMAIS

Os animais utilizados nesse projeto foram camundongos fêmeas de 6 semanas da linhagem *Swiss outbreed*, obtidos do Biotério da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). Esses animais foram criados na UNIFAL-MG, mantidos em salas com controle de temperatura, alimentados com comida esterilizada e água filtrada *ad libitum*.

4.3 ISOLADO DE *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*

Os isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) e *Paracoccidioides lutzii* (Pb01) utilizados no projeto foram mantidos no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da UNIFAL-MG. Os fungos foram semeados e cultivados em meio de cultura semi-sólido de Fava Netto em tubos, e mantidos em estufa a 37°C, repicados a cada 7 dias (Fava Netto, 1955).

4.3.1 Meio de cultivo Fava Netto

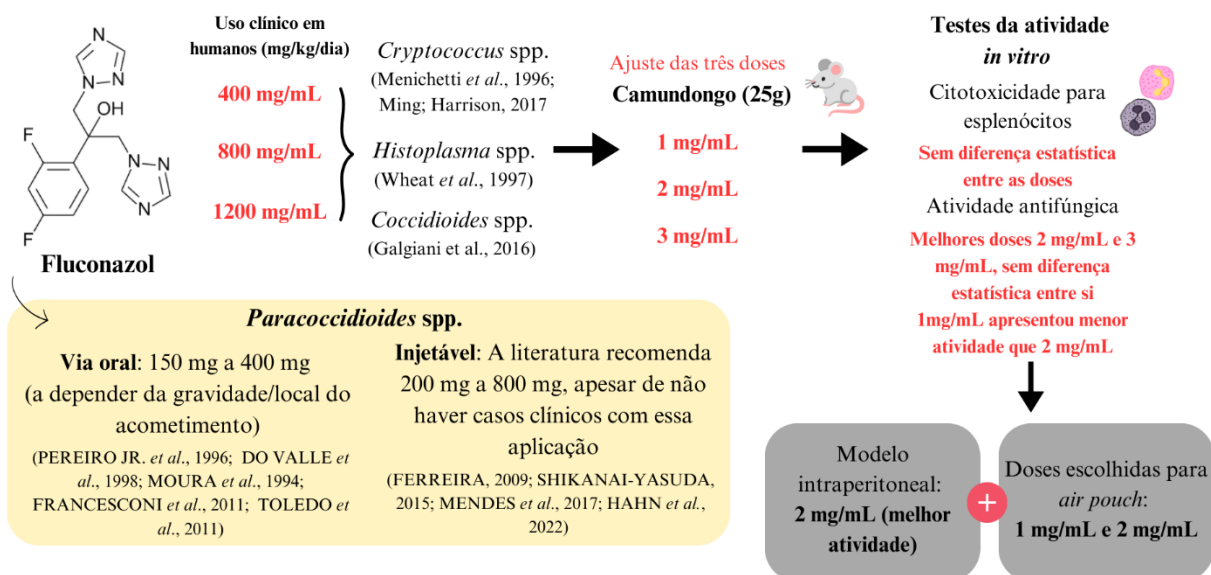
O meio utilizado para grande parte dos ensaios e manutenção das cepas foi descrito por Fava Netto (1955). O meio consiste em uma combinação de peptona à 14%, protease 4%, extrato de levedura e carne a 7%, NaCl em 7%, suplementado com 42% de dextrose.

4.4 FLUCONAZOL

O Fluconazol utilizado nos ensaios é um produto da empresa Pfizer (UK-49,858; Pfizer Munich, F.R.G.). A formulação encontra-se em pó.

As dosagens utilizadas no ensaio *in vitro* foram definidas através das dosagens recomendadas para humanos em infecções por outros fungos patogênicos e ajustadas ao peso dos camundongos (aproximadamente 25 gramas). Portanto, a primeira dose teste é a de 1 mg/dia que equivale à 400 mg em humanos, a segunda 2 mg/dia equivale a 800mg e por fim, a terceira, 3 mg/dia, a 1200 mg de Fluconazol.

Figura 2 - Esquema da escolha das doses de Fluconazol utilizada nos ensaios



Fonte: do autor (2024)

4.5 MODELO *IN VITRO*

Para a execução dos testes *in vitro*, o fármaco foi exposto em contato com culturas de *P. lutzii* e *P. brasiliensis*. Posteriormente foi realizada a análise de toxicidade do Fluconazol, no qual as três concentrações (1, 2 e 3mg/mL) do fármaco foram cultivadas com células esplênicas provenientes do baço de camundongos saudáveis.

4.5.1 Teste de susceptibilidade antifúngica

Para o teste de susceptibilidade antifúngica, foram utilizados os isolados de *Paracoccidioides lutzii* (Pb01) e *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18). O inóculo fúngico foi preparado a partir de colônias jovens (12 dias de crescimento), ajustadas de acordo com a escala de 0,5 de Macfarland em tubos Falcon e cultivadas em caldo Fava Netto, suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS) por 72 horas a 35°C.

As três diferentes concentrações de Fluconazol foram testadas, e suas diluições foram realizadas em série no caldo Fava Netto. Além disso, os diferentes diluentes recomendados pelo fabricante do fármaco, acetona, álcool etílico e álcool metílico, foram testados de forma isolada e conjunta ao fármaco, com o objetivo de observar sua influência na atividade antifúngica. Na sequência, os tubos foram agitados por 72 horas e avaliados durante todos os dias de cultura (24, 48 e 72 horas). A viabilidade das células fúngicas foi determinada pela coloração do corante vital Janus Green B. Com o passar das 72 horas, a suspensão fúngica foi centrifugada a 1780g e os pellets obtidos foram ressuspensos em 100 µL de PBS e dispersos em placas de Petri com meio Fava Netto, com auxílio de um dispensador Drigalski estéril. O crescimento fúngico das placas foi mantido por um período de 12 dias, quando as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contabilizadas.

4.5.2 Efeito do Fluconazol *in vitro* sobre esplenócitos

Animais saudáveis foram anestesiados e foi realizada a coleta do baço. As células foram preparadas por maceração usando uma pinça, em 5 mL de meio RPMI 1640 com L-glutamina, e posteriormente foram isoladas via centrifugação (500g). O sedimento de células é incubado por 4 minutos com tampão de lise de glóbulos vermelhos (uma parte de 0,17 mol/L de Tris para nove partes de 0,16 mol/L de cloreto de amônio). Na sequência, as células foram lavadas e ressuspensas a uma concentração de 1×10^6 células/mL em meio RPMI 1640 suplementado com 5% de soro bovino fetal e antibióticos (100 mg/mL de penicilina e 100mg/mL de estreptomicina). Finalmente, as células foram cultivadas em placas de fundo plano de 24 e 96 poços a 1×10^6 células/poço durante 24, 48 e 72 horas a 37°C em incubadora com CO₂ a 5%. As células esplênicas foram tratadas com as três diferentes concentrações Fluconazol e outro cultivo celular não foram tratadas (grupo controle).

Em um co-cultivo celular, células do baço também foram infectadas com 10µL dos isolados fúngicos (Pb18 e Pb01) e tratadas com as diferentes concentrações de Fluconazol, com a finalidade de avaliar a influência do tratamento na atividade destas células frente às cepas fúngicas.

A viabilidade de células esplênicas tratadas com as diferentes concentrações de Fluconazol e aquelas infectadas e tratadas com Fluconazol foram avaliadas por 24, 48 e 72 horas de incubação utilizando o corante azul de tripano. Além disso, também foi realizada a avaliação da viabilidade do fungo exposto a células esplênicas e tratado com diferentes concentrações de fluconazol utilizando o corante vital Janus Green B. Em 24, 48 e 72h, as culturas de células foram utilizadas para analisar a citotoxicidade das concentrações de fluconazol por meio do ensaio colorimétrico de MTT (tetrazólio).

4.6 MODELO SUBCUTÂNEO DE *AIR POUCH*

Os animais foram infectados por via subcutânea *air pouch* e tratados com fármaco Fluconazol.

4.6.1 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 6 grupos experimentais contendo 3 animais por grupo, sendo eles:

- Grupo 1:** animais infectados com *P. lutzii*;
- Grupo 2:** animais infectados com *P. lutzii* e tratados com Fluconazol 1mg/mL;
- Grupo 3:** animais infectados com *P. lutzii* e tratados com Fluconazol 2mg/mL;
- Grupo 4:** animais infectados com *P. brasiliensis*;
- Grupo 5:** animais infectados com *P. brasiliensis* e tratados com Fluconazol 1mg/mL;
- Grupo 6:** animais infectados com *P. brasiliensis* e tratados com Fluconazol 2mg/mL;

4.6.2 Preparação de suspensões fúngicas para a infecção de camundongos

As células fúngicas foram lavadas com solução salina estéril a 0,9% e centrifugadas a 1300G por três vezes, e então, utilizadas para preparar as suspensões para inoculações. A viabilidade das células foi determinada pela coloração do corante

Janus Green B (Berliner; Reça, 1966), para que as suspensões tivessem a concentração ajustada para 5×10^6 de células leveduriformes viáveis/ml (cél/ml). Finalmente, foi realizada a contagem em hemocitômetro, para que fosse feita inoculação.

4.6.3 Indução da *air pouch* subcutânea

A técnica *air pouch* consiste em induzir uma bolsa de ar na região dorsal de camundongos através de injeção subcutânea de 2mL de ar estéril, conforme descrito por Meloni-Bruneri *et al.* (1996). Após formação da *air pouch* os animais foram inoculados com 0,1mL da suspensão fúngica.

Figura 3 - Camundongos infectados via *air pouch*

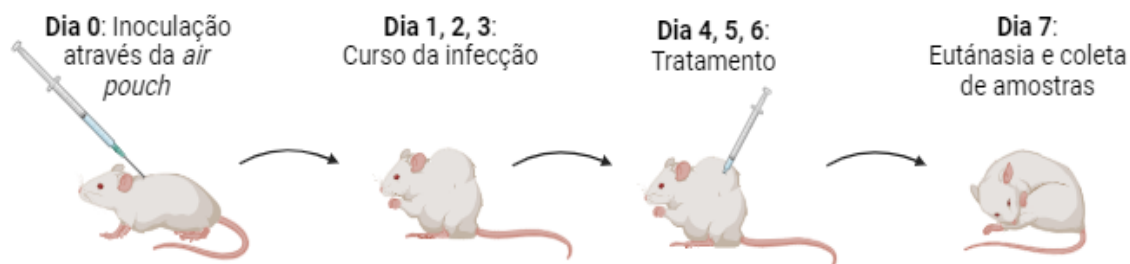


Fonte: Do autor (2024)

4.6.4 Tratamento com Fluconazol

Os animais dos grupos 2, 3, 5 e 6 foram tratados com as duas concentrações de Fluconazol que apresentaram os melhores resultados nos testes *in vitro*, e que apresentaram diferença estatística entre si. Além disso, através dos resultados *in vitro*, o álcool metílico também foi escolhido como diluente. Os animais foram tratados através da injeção de 100 μ L das dosagens do Fluconazol diretamente na *air pouch*. O tratamento foi realizado nos últimos 3 dias de infecção subcutânea, onde houve formação da *air pouch* com a presença do afluxo de células no local da infecção.

Figura 4 - Cronologia do modelo de infecção *air pouch*



Fonte: do autor (2024).

Legenda: Produzido com software Biorender.

4.6.5 Obtenção e cultivo de células da bolsa de ar subcutânea

As células foram coletadas após sete dias da inoculação dos camundongos. Os animais foram eutanasiados com a associação dos anestésicos Cloridrato de Cetamina 300mg/kg e Cloridrato de Xilazina 30mg/kg. A dose de anestésicos administrada foi maior que dose utilizada para a indução anestésica de como recomendado na Resolução Normativa no 37 Diretriz da prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Após a confirmação do óbito, através da verificação de sinais como apneia, assistolia, mucosas pálidas e ausência de reflexo corneal, foi feita uma incisão da pele com bisturi. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro estéril, as células foram coletadas e transferidas para um homogeneizador de vidro estéril, onde foram separadas por maceração.

De acordo com Meloni & Bruneri (1994), a realização de um pool de células das bolsas de ar subcutâneas de três animais diferentes é necessária, pois corresponde a $\cong 667$ PMN/animal, para a obtenção de uma concentração de 1×10^6 células/mL, que corresponde a quantidade de células necessárias para realização dos experimentos.

4.6.7 Atividade metabólica celular

Em uma placa de 96 poços de fundo plano foram pipetados 100 μ L da suspensão de células da bolsa na concentração de 1×10^6 cél/mL acrescido de 100 μ L de RPMI. Após isso, foi adicionado a cada um dos poços 20 μ L do reagente MTT a 5

mg/mL, e a placa incubada por 4 horas em estufa com 5% de CO₂ e temperatura de 37°C. Posteriormente, todo o sobrenadante foi retirado e foram pipetados 200µL de DMSO em cada poço. Após 10 minutos foi realizada a leitura da placa em leitor de ELISA a 540 nm.

O ensaio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) é um ensaio colorimétrico empregado para avaliar a atividade metabólica celular, uma vez que as mitocôndrias são uma das principais responsáveis por metabolizar o sal em formazan, de coloração azulada.

4.6.6 Quantificação de proteínas totais

A quantificação das proteínas dos sedimentos armazenados foi realizada pelo método do ácido bicinconínico (BCA). A leitura das densidades ópticas foram feitas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 560 nm. Os resultados foram expressos em µg de proteína/mL, comparando-se a densidade óptica com uma curva padrão contendo concentrações conhecidas de proteína sérica bovina (BSA).

4.6.8 Dosagem de peróxido de hidrogênio

A liberação de H₂O₂ foi medida através do ensaio de oxidação de vermelho de fenol dependente de peroxidase de rábano descrito por (Pick; Mizel, 1981). O experimento foi realizado em microplaca de 96 poços. A solução de vermelho de fenol é preparada com PBS gelado contendo dextrose 5,5 mM, vermelho de fenol 0,56 mM e 8,5 U/mL de peroxidase de rábano tipo II. As células suspensas em solução fresca de vermelho de fenol foram incubadas por 1 hora a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂. A reação foi interrompida com 10µL de NaOH 1M. A absorbância foi medida em leitor de microplaca e a conversão da absorbância em µM H₂O₂ foi deduzida de uma curva padrão obtida com concentrações conhecidas de H₂O₂ (5 a 40 µM), conforme descrito por (Pick; Keisari, 1980).

4.6.9 Dosagem de catalase

A catalase tem distribuição intracelular e extracelular, e dismuta o H₂O₂ em H₂O e O₂. A atividade da catalase foi determinada através da metodologia descrita por Aebi

(1984), onde estabelece medir a decomposição de H_2O_2 por minuto a 240 nm. Para isso, os sedimentos do cultivo das células da bolsa (proteínas) foram incubados em PBS pH 7,0. Ao adicionar H_2O_2 10 mM é iniciada a reação e monitora-se a absorvância por um minuto. A cinética da decomposição de H_2O_2 foi obtida utilizando o coeficiente de extinção molar a 240 nm ($43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Os resultados foram expressos em U/mg de proteína, sendo que U corresponde a atividade enzimática que é capaz de promover hidrólise em 1 μmol de H_2O_2 por minuto.

4.6.10 Dosagem de óxido nítrico (NO)

As concentrações de óxido nítrico (NO) foram medidas nos sobrenadantes das culturas de células provenientes da infecção por *air pouch*. Foram pipetados 100 μL dos sobrenadantes e 100 μL do reagente Griess em placas de 96 poços e incubados à temperatura ambiente durante 10 minutos. A absorvância foi medida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. Os resultados estão expressos em μM , pela conversão dos valores a partir de uma curva padrão realizada com nitrito de sódio nas concentrações de 100 a 78 μM para cada placa.

O reagente de Griess foi preparado no momento da utilização, empregando partes iguais da solução de A-sulfanilamida a 1% em H_3PO_4 a 2,5% e a solução de B-naftilenodiamina a 0,1% em água destilada.

4.6.11 Dosagem de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS)

Para dosar a concentração total de espécies reativas de oxigênio (EROS) nos sobrenadantes das culturas de células, foi empregada a técnica de quimiluminescência descrita por Shani; Czuba; Scheller (1992) e adaptada por Szliszka *et al.* (2013). As amostras foram colocadas em microplacas de 96 poços e em seguida, foi adicionada a solução de luminol (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA). A absorvância foi determinada em 0, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 1400, 1600 e 1800 segundos no leitor de ELISA em 450nm, para posterior confecção da curva padrão.

4.6.12 Quantificação de citocinas

Os sobrenadantes das células coletadas foram armazenados à temperatura de -80°C . Posteriormente, foram usados para dosagem de citocinas, realizadas através de kits de ELISA disponíveis comercialmente para TNF- α , GM-CSF, IL-1 β , KC, IL-10, IL-4, IL-12 e IL-17.

Através do ELISA de captura foram obtidas as concentrações das citocinas, baseado no uso de anticorpos monoclonais específicos para cada citocina, marcados por biotina. Os complexos biotina-avidina e H_2O_2 -peroxidase permite a determinação da concentração da citocina presente através das medidas de densidade óptica. As placas de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpo de captura diluído em cada orifício das placas e na sequência incubadas por 18 horas. Posteriormente, os sítios livres foram bloqueados, e depois da incubação pelo tempo adequado foram adicionados os padrões com concentrações conhecidas de cada citocina, e os sobrenadantes da cultura celular. Após 2 horas foram adicionados os conjugados de avidina-peroxidase. A placa foi incubada e foi adicionado o ABTS, substrato cromogênico. Neste período as placas foram mantidas ao abrigo da luz e o desenvolvimento da cor foi monitorado até que a curva padrão consiga ser visualizada. A cada adição de reagente, as placas são lavadas por quatro vezes com PBS acrescido de 0,05% Tween 20. A leitura das densidades óticas foi realizada em leitor automático, a 405 nm de comprimento de onda. As concentrações de cada citocina foram determinadas tendo como base a reta de regressão linear contínua obtida dos dados referentes às curvas-padrão. Os resultados são expressos em picogramas por 100 μL de sobrenadante de cultura celular.

4.6.13 Capacidade microbicida dos fagócitos

Para avaliar a capacidade de microbicida dos fagócitos obtidos na *air pouch* foi utilizada a metodologia proposta por Green *et al.* (2007) e Magon *et al.* (2020) e adaptado por Cerdeira *et al.* (2016). A técnica avalia a capacidade de fagocitose e de destruição de microrganismos por essas células.

Para isso, suspensões fúngicas na concentração de $5 \times 10^6/\text{mL}$ não opsonizadas foram incubadas juntamente com as células a $1 \times 10^6/\text{cel}/\text{mL}$ a 37°C , por 10, 30 e 90 minutos, com solução salina balanceada de Hank (HBSS).

Para cessar a atividade dos neutrófilos, as amostras foram tratadas com PBS gelado e depois as amostras foram centrifugadas a 1780g por 10 minutos. Os pellets, com as leveduras intracelulares, e os sobrenadantes, com leveduras extracelulares, foram diluídos em H₂O pH 11, para lise das células. Após diversas diluições em H₂O, as amostras foram distribuídas em placas de Petri com meio BHI suplementado com 1% de glicose, 30% de fator de crescimento e de 10% de soro fetal bovino.

As placas foram incubadas a 37°C e o crescimento das colônias foi quantificado por 15 dias. Os resultados foram expressos através de gráficos de constante de fagocitose (kp) e de constante de killing (kk). A fagocitose e o killing pelos fagócitos obedecem a uma cinética de primeira ordem, calculada através de uma Função W de Lambert (Hampton *et al.*, 1994; Magon *et al.*, 2020).

4.6.14 Quantificação de unidades formadoras de colônia (UFC) nas *air pouch*

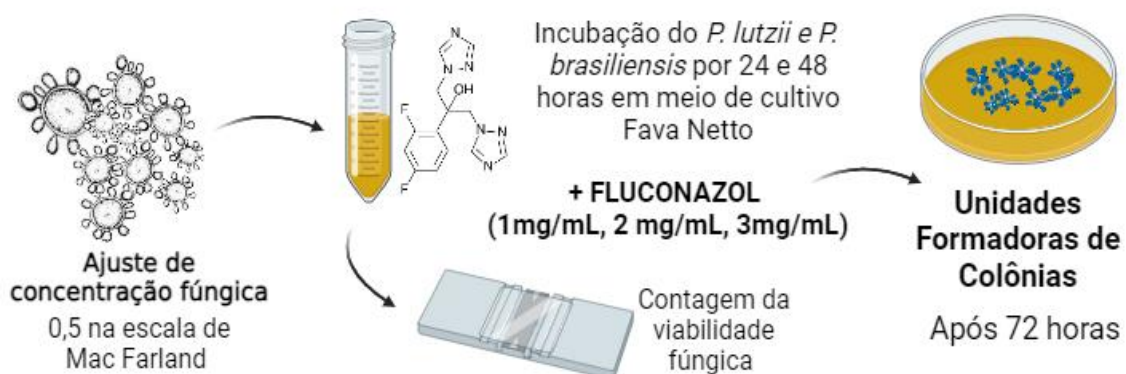
As células coletadas das *air pouch* foram separadas em tubos Falcon, mantidas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) e centrifugadas por 10 minutos 1780g. Os pellets foram ressuspensos em 100 µL de PBS e dispersos em placas de Petri com meio Fava Netto, com auxílio um dispensador Drigalski estéril. O crescimento fúngico da placa foi mantido pelo período de 12 dias, e posteriormente as colônias foram contabilizadas.

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste T e a variância dos dados avaliadas através de One-way e Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey, através do programa GraphPad Prism® considerando 5% de significância ($p < 0,05$) (Nishikaku *et al.* 2009). Adicionalmente, foi realizada a análise de distribuição dos dados, através do Teste de Shapiro-Wilk. Para aqueles dados considerados não normais, foi realizada a análise através do teste de Kruskal Wallis. Para os cálculos de Kp e Kk foi utilizada uma tabela do Microsoft Excel® disponibilizada como material eletrônico suplementar por Magon *et al.* (2020). (disponível em: <https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-0716-0154-9_12>)..+

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

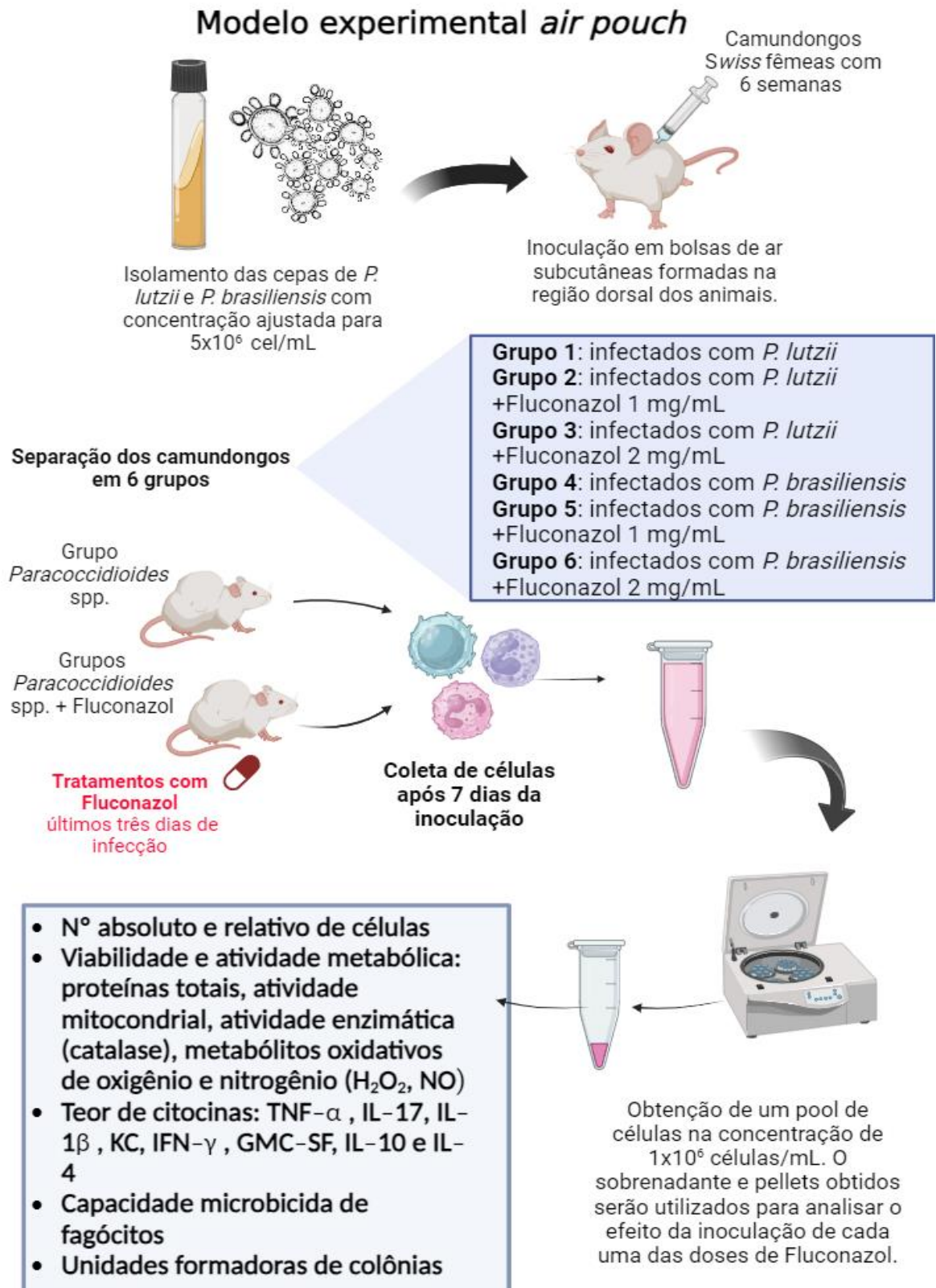
5.1 *In vitro*



Citotoxicidade para esplenócitos



Fonte: do autor (2024). Criado no software Biorend

5.2 *Ex vivo*

Fonte: do autor (2024). Criado no software Biorender.

6 RESULTADOS

6.1 RESULTADOS *IN VITRO*

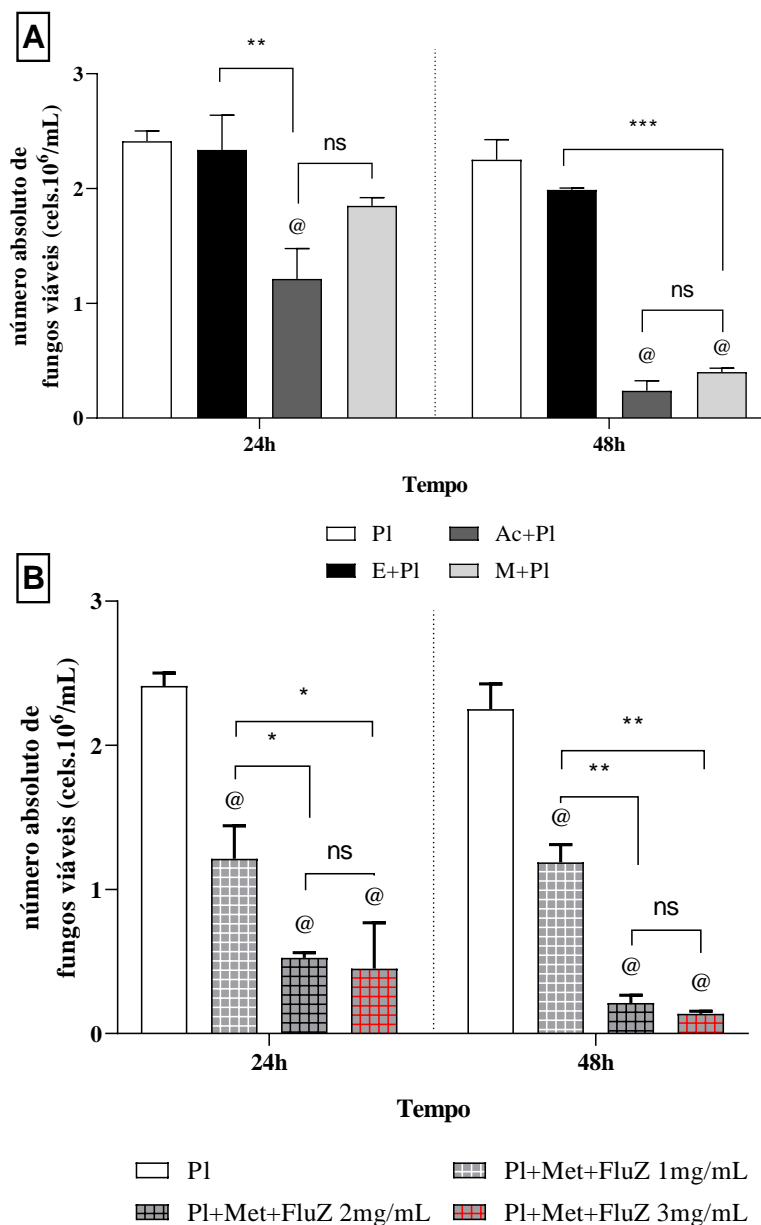
6.1.1 Ensaio *in vitro* da citotoxicidade do fármaco Fluconazol sobre *P. brasiliensis* e *P. lutzii*

Através dos ensaios realizados *in vitro* foi possível avaliar a citotoxicidade do Fluconazol frente às células fúngicas. Todos os experimentos *in vitro* foram realizados com os três diferentes diluentes recomendados pelo fabricante isoladamente e em conjunto com as concentrações de Fluconazol. Com base nos resultados apresentados o diluente escolhido foi o álcool metílico, e, portanto, os resultados com os outros diluentes encontram-se no Apêndice A.

A Figura 5A traz a cinética da viabilidade fúngica de *P. lutzii* nos diferentes tempos, frente aos três diluentes recomendados pela fabricante do Fluconazol. Em 24 horas apenas as células fúngicas tratadas com Propanona apresentaram uma redução quando comparadas ao controle (PI). No tempo de 48 horas houve redução no número de células fúngicas na presença de propanona e álcool metílico.

A figura 5B mostra a cinética da viabilidade fúngica de *P. lutzii* nos diferentes tempos, frente às três doses de Fluconazol. No tempo de 24 horas, as três doses testadas foram capazes de reduzir o número absoluto de células fúngicas em comparação a PI. Além disso, o número de fungos foi significativamente menor ($p < 0,05$) nas doses de 2 mg/mL e 3 mg/mL em comparação à 1 mg/mL, mas não apresentaram diferença entre si. Em 48 horas, o mesmo comportamento é observado.

Figura 5 - Cinética do número absoluto de células fúngicas viáveis tratadas com álcool etílico (E+PI), propanona (Ac+PI), álcool metílico (M+PI) e posteriormente com Fluconazol diluído em álcool metílico (PI+Met+FLC 1mg/mL), (PI+Met+FLC 2mg/mL), (PI+Met+FLC 3mg/mL)



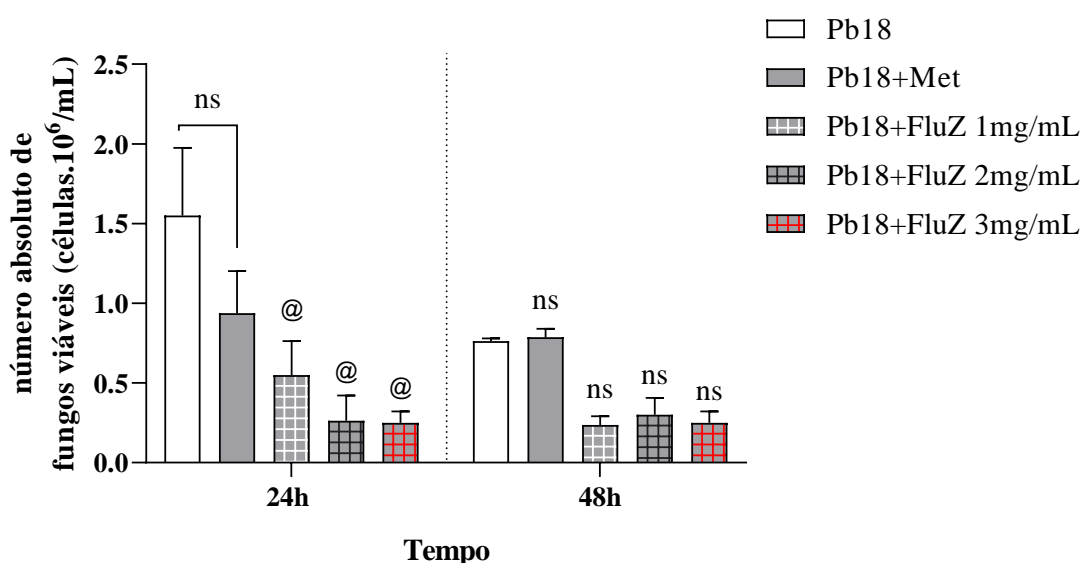
Fonte: do autor (2024)

Legenda: A – Número de células fúngicas viáveis de *P. lutzii* tratadas com os diluentes em tempos diferentes. B – Número de células fúngicas viáveis de *P. lutzii* durante diferentes tempos e tipos de tratamento. Os resultados de cada grupo são representados como média \pm erro padrão da média. Os testes foram realizados em triplicata. A- Diferença estatística entre grupos (@) $p < 0,05$ entre PI e os diferentes tratamentos, (ns) $p > 0,05$ (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$ entre tratamentos, teste Two Way ANOVA, pós -Teste de Tukey. B – Diferença estatística entre grupos (@) $p < 0,05$ entre PI e os diferentes tratamentos, (ns) $p > 0,05$ (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,01$ entre os tratamentos, teste Two Way ANOVA, Tukey pós- teste.

Ainda em relação à citotoxicidade do Fluconazol frente às células fúngicas, a

Figura 6 apresenta a cinética do número absoluto de *P. brasiliensis* frente as diferentes doses de Fluconazol testadas. Em 24 horas, o número de fungos viáveis tratados com as três doses de Fluconazol foi significativamente menor que Pb18, porém, sem diferença entre si. Curiosamente, no tempo de 48 horas não houve diferença entre nenhum dos grupos testados.

Figura 6 - Cinética do número absoluto de células viáveis de *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) tratadas com álcool metílico (Pb18+Met) e Fluconazol (Pb18+FLC 1 mg), (Pb18+FLC 2 mg), (Pb18+FLC 3 mg), respectivamente.

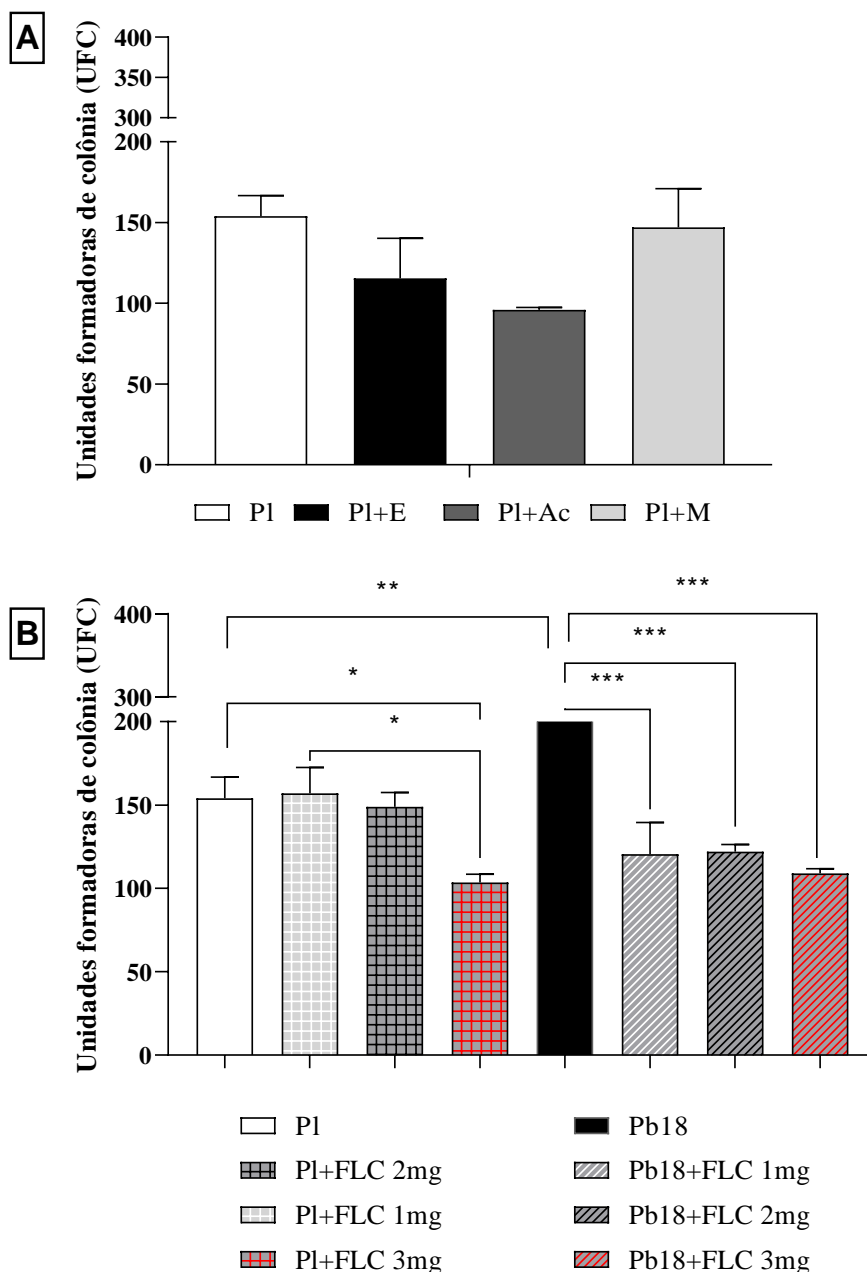


Fonte: do autor (2024)

Legenda: Número de células fúngicas viáveis durante diferentes tempos e tipos de tratamento. Os resultados de cada grupo são representados como média \pm erro padrão da média. Os testes foram realizados em triplicata. Diferença estatística entre grupos (@) $p < 0,05$ entre Pb18 e os diferentes tratamentos, teste Two Way ANOVA, pós-teste de Tukey.

Ainda sobre o efeito do Fluconazol frente a *P. lutzii* nas concentrações testadas, foi avaliado o crescimento através das unidades formadoras de colônia, conforme demonstrado na Figura 7B. O resultado demonstra que o número de colônias é menor quando empregado o tratamento com 3 mg/mL de Fluconazol em comparação com o controle sem tratamento. O teste também foi realizado apenas com os diluentes, que como demonstrado na figura 7A, não houve diferença entre os tratamentos.

Figura 7 - Atividade antifúngica dos diferentes diluentes, álcool etílico (PI+Al), propanona (PI+Ac) e álcool metílico (PI+M) e posteriormente de diferentes concentrações de Fluconazol (PI+FLC 1 mg/mL), (PI+FLC 2 mg/mL), (PI+FLC 3 mg/mL) (Pb18+FLC 1mg), (Pb18+FLC 2mg) e (Pb18+FLC 3mg) através da quantificação de unidades formadoras de colônia (UFC) de *P. lutzii* e Pb18 na avaliação após 72 horas.



Fonte: do autor (2024)

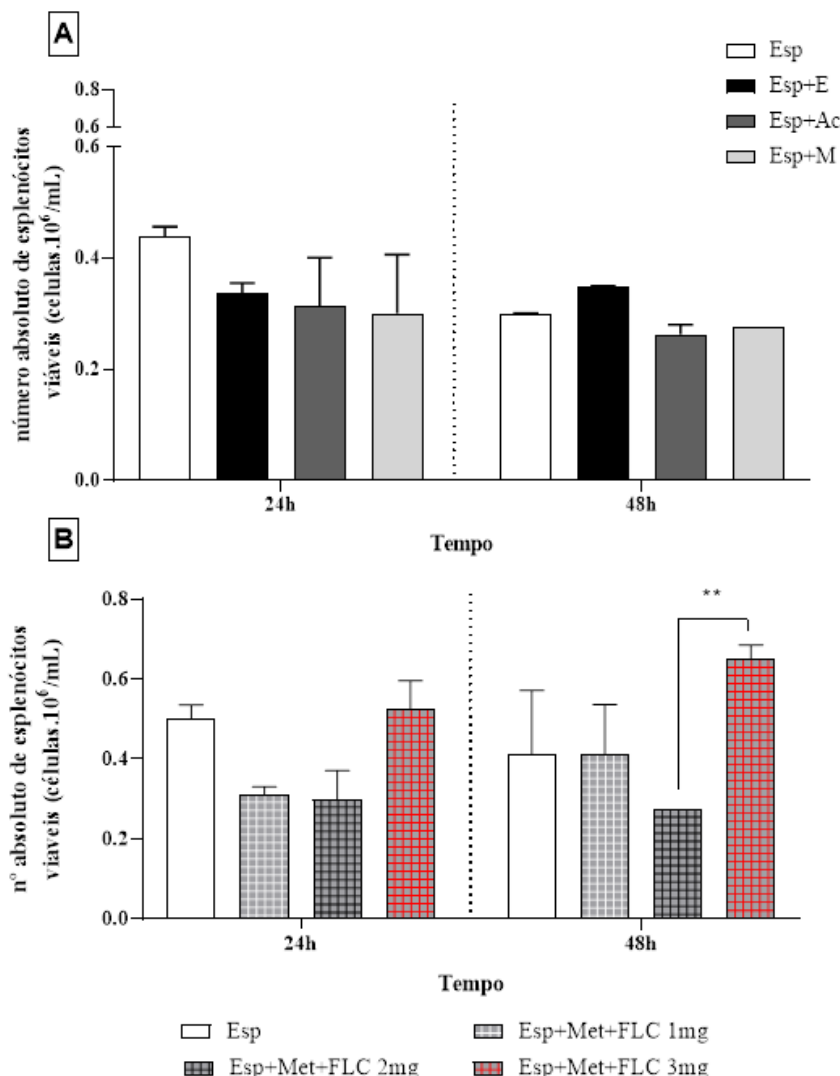
Legenda: A- Unidades formadoras de colônia de *P. lutzii* (PI) na presença dos diluentes. B- Unidade formadoras de colônia de *P. lutzii* e de Pb18 na presença dos diferentes tratamentos. Os resultados de cada grupo são representados como média ± erro padrão da média. Os testes foram realizados em triplicata. Distribuição normal entre os dados (Teste de Shapiro-Wilk) B- Diferença estatística entre grupos (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$ entre os grupos controle e os tratamentos, teste One Way ANOVA, pós teste de Tukey.

A Figura 7B também apresenta o efeito das doses de Fluconazol frente *P. brasiliensis*, através das unidades formadoras de colônia (UFC). Observa-se que as três doses foram capazes de reduzir o número de colônias em comparação ao controle sem tratamento, sem diferença estatística entre si.

6.1.2 Ensaio *in vitro* da citotoxicidade do fármaco Fluconazol sobre culturas de células esplênicas

Os testes *in vitro* com culturas de células esplênicas obtidas de camundongos saudáveis foram realizados com a finalidade de avaliar se o Fluconazol apresenta toxicidade frente estas células nas concentrações testadas. A figura 8A traz o número absoluto de esplenócitos viáveis frente aos diluentes, que não apresentaram redução significativa em nenhum dos dois tempos testados. A figura 8B mostra o número absoluto de células esplênicas frente as três concentrações de Fluconazol, e revela que o fármaco não alterou a viabilidade das mesmas, sugerindo não apresentar toxicidade.

Figura 8 - Cinética do número absoluto de células esplênicas viáveis tratadas com álcool etílico (Esp+Al), propanona (Esp+Ac), álcool metílico (Esp+M) e posteriormente com Fluconazol (Esp+Met+FLC 1mg) (Esp+ Met+FLC 2mg) (Esp+Met+FLC 3mg), respectivamente.



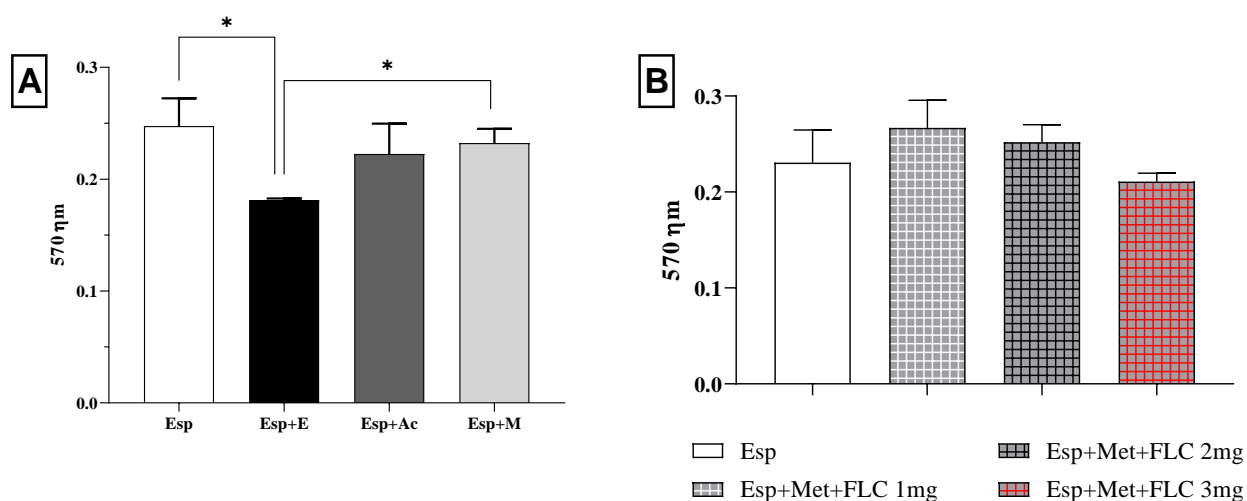
Fonte: do autor (2024)

Legenda: A – Número absoluto de células esplênicas viáveis tratadas com os tipos de diluente em diferentes momentos. B – Número absoluto de células esplênicas viáveis nos diferentes momentos e tipos de tratamento. Os resultados para cada grupo são representados como média \pm erro padrão da média. Os testes foram realizados em triplicata. B – Diferença estatística entre grupos (**) $p < 0,01$ entre os tratamentos, teste Two Way ANOVA, pós-teste de Tukey.

Afim de conferir se as células esplênicas se mantinham ativas metabolicamente na presença do Fluconazol, foi empregado o teste das desidrogenases mitocondriais, onde se avalia a metabolização do MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide). Como demonstrado na Figura 10, não houve alteração na atividade metabólica das células quando cultivadas com as diferentes doses do

fármaco Fluconazol. Frente aos diluentes, houve uma menor atividade mitocondrial dos esplenócitos no grupo tratado com álcool etílico, como apresentado na Figura 9A. Por outro lado, nenhuma das concentrações de Fluconazol testadas influenciou na atividade das desidrogenases mitocondriais, como apresentado na Figura 9B. Este resultado corrobora com o resultado anterior, no qual Fluconazol não apresenta toxicidade frente as células esplênicas.

Figura 9 - Atividade mitocondrial de células esplênicas tratadas com álcool etílico (Esp+Al), propanona (Esp+Ac), álcool metílico (Esp+M) e posteriormente com Fluconazol (Esp+Met+FLC 1mg), (Esp+Met+FLC 2mg), (Esp+Met+FLC 3mg), respectivamente.



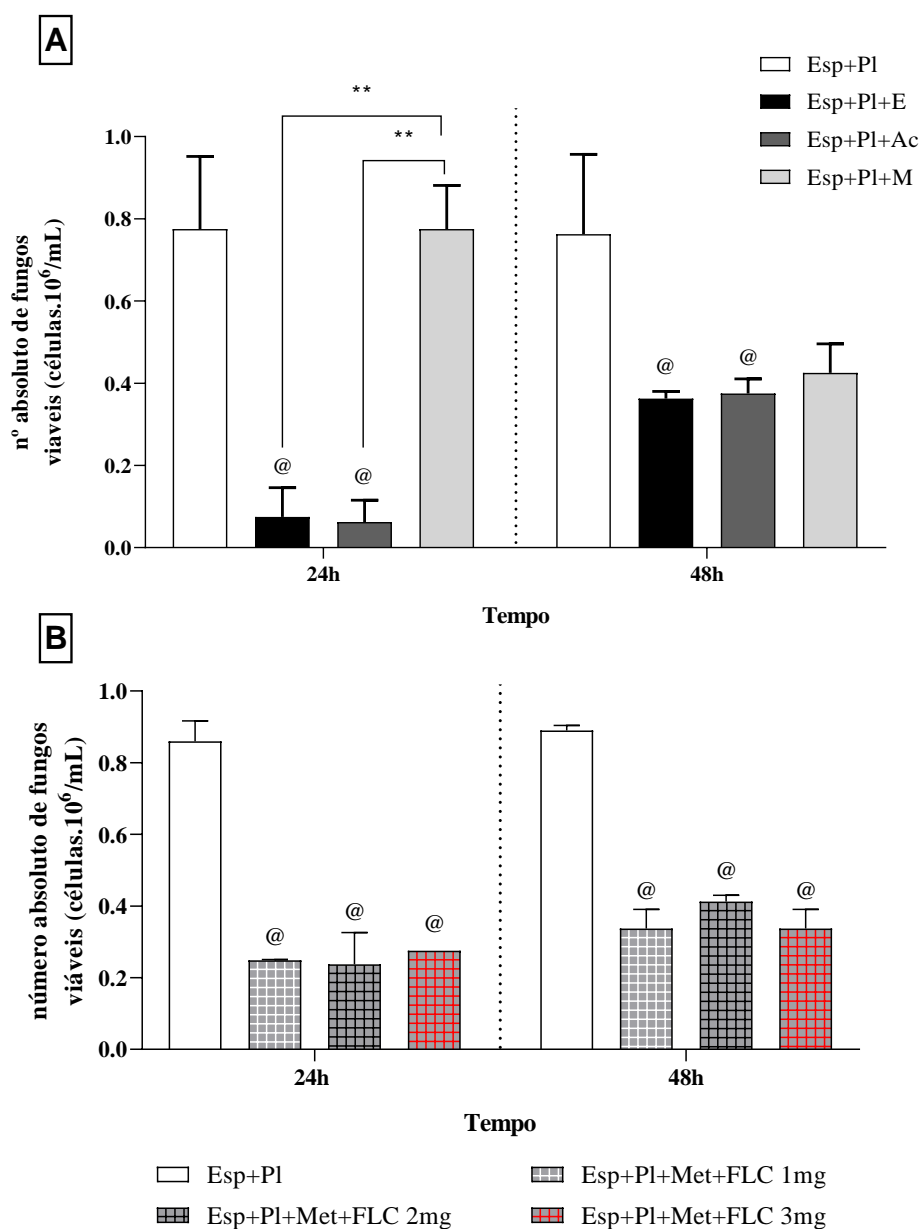
Fonte: do autor (2024)

Legenda: A- Atividade mitocondrial das células esplênicas na presença de diluentes. B- Atividade mitocondrial das células esplênicas durante diferentes tempos e tipos de tratamento. Os resultados para cada grupo são representados como média \pm erro padrão da média. Os testes foram realizados em triplicata. A- Diferença estatística entre grupos (*) $p < 0,05$ entre diferentes grupos de tratamento, teste Two Way ANOVA, pós-teste de Tukey.

Através de co-cultivos das cepas em conjunto com as células esplênicas, foi avaliado o efeito do Fluconazol sobre o número absoluto de fungos viáveis. Portanto, na Figura 10 são apresentados resultados no qual se avalia a melhora na capacidade das células esplênicas em eliminar *P. lutzii*. No decorrer dos diferentes tempos, no grupo de esplenócitos apenas infectados e não tratados, não há alteração na viabilidade fúngica. Por outro lado, quando os esplenócitos foram tratados com álcool etílico e propanona, a viabilidade fúngica foi significativamente menor ($p < 0,01$) em relação as células apenas infectadas (Esp+PI), como demonstrado na Figura 11A.

Além disso, quando as células esplênicas infectadas com *P. lutzii* foram tratadas com as diferentes doses de Fluconazol houve uma redução da viabilidade fúngica em comparação as células apenas infectadas (Esp+PI), em ambos os tempos testados. Estes resultados sugerem que o fármaco Fluconazol foi eficaz e capaz de estimular mecanismos celulares para eliminação de *P. lutzii*.

Figura 10 - Cinética do número absoluto de células fúngicas viáveis na presença de células esplênicas tratadas com álcool etílico (Esp+PI+Al), propanona (Esp+PI+Al), álcool metílico (Esp+PI+M) e posteriormente com Fluconazol (Esp+PI+Met+FLC 1mg/mL), (Esp+PI+Met+FLC 2mg/mL), (Esp+PI+Met+FLC 3mg/mL), respectivamente.



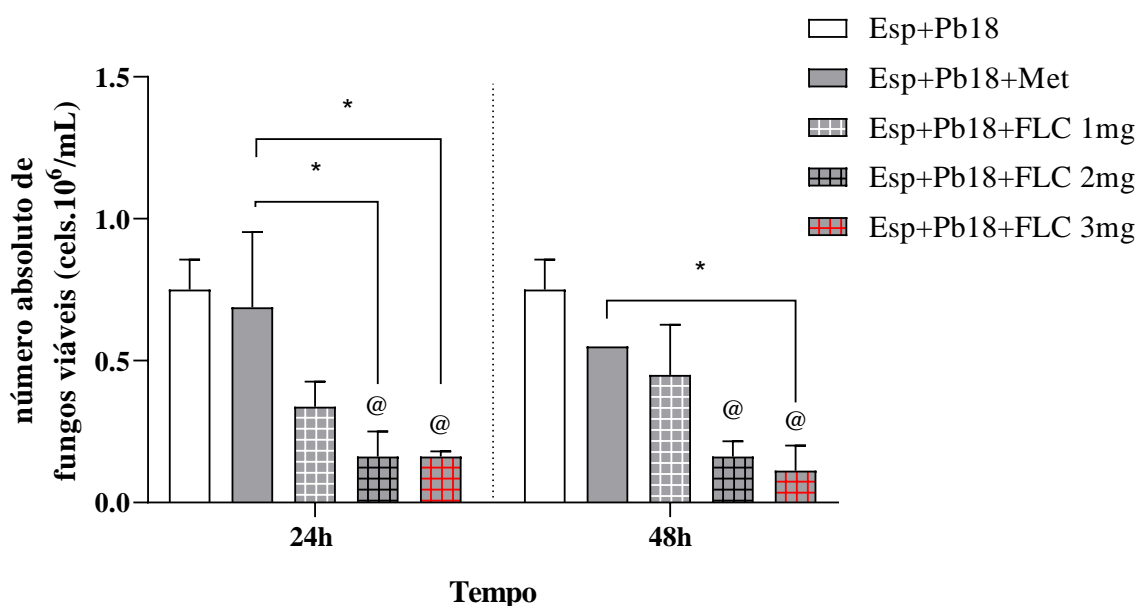
Fonte: do autor (2024)

Legenda: A – Número absoluto de células fúngicas viáveis tratadas com os tipos de diluentes nos

diferentes tempos. B – Número absoluto de células fúngicas viáveis em diferentes tempos e tipos de tratamento. Os resultados para cada grupo são representados como média \pm erro padrão da média. Os testes foram realizados em triplicata. A- Diferença estatística entre grupos (@) $p < 0,05$ entre Esp+PI e os diferentes tratamentos, (*) $p < 0,01$ entre tratamentos, teste Two Way ANOVA, pós-teste de Tukey.

Na Figura 11 são apresentados resultados nos quais é avaliado se o tratamento melhora a capacidade das células esplênicas em eliminar *P. brasiliensis*. Como anteriormente, quando as células esplênicas infectadas com Pb18 receberam as doses de 2 mg/mL e 3 mg/mL de Fluconazol, a viabilidade fúngica foi significativamente menor ($p < 0,05$) do que as células infectadas e não tratadas (Esp+Pb18) em 24 horas de tratamento. Portanto, os resultados sugerem que Fluconazol também é eficaz na eliminação de Pb18 e estimulação dos mecanismos celulares para a eliminação do fungo.

Figura 11 - Cinética do número absoluto de células fúngicas viáveis na presença de células esplênicas tratadas com álcool metílico (Esp+Pb18+Met) e Fluconazol (Esp+Pb18+Met+FLC 1mg) (Esp+Pb18+Met+FLC 2mg) (Esp+Pb18+Met+FLC 3mg), respectivamente.



Fonte: do autor (2024)

Legenda: Número absoluto de células fúngicas viáveis em diferentes momentos e tipos de tratamento. Os resultados para cada grupo são representados como média \pm erro padrão da média. Os testes foram realizados em triplicata. Diferença estatística entre grupos (@) $p < 0,05$ entre Esp+Pb18 e os diferentes tratamentos, (*) $p < 0,05$ entre tratamentos, teste Two Way ANOVA, pós-teste de Tukey.

6.2 RESULTADOS *EX VIVO*

6.2.1 Avaliação das células do exsudato oriundas de bolsas subcutâneas *air pouch*

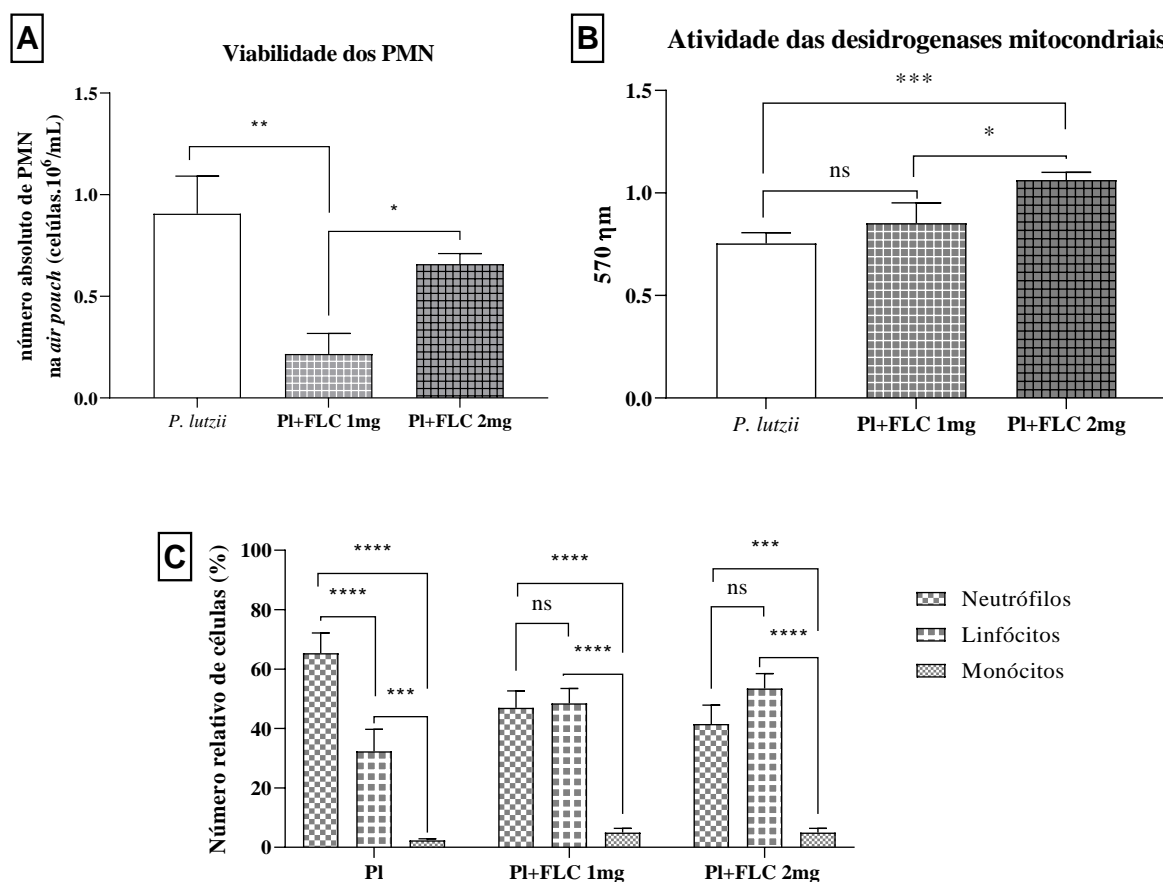
Após a coleta do material presente na *air pouch* dos camundongos infectados com *P. lutzii*, o número absoluto das células viáveis presentes na *air pouch* foi contabilizado, com a finalidade de observar o efeito das doses de 1 e 2 mg/mL de Fluconazol sobre o afluxo de células para a *air pouch*. Para avaliar o estado de ativação metabólico das células presentes na *air pouch* novamente foi empregado o teste das desidrogenases mitocondriais. Posteriormente, também foi realizada a contagem diferencial das células, com o objetivo de entender quais tipos celulares estavam presentes no exsudato.

Na figura 12A é possível observar que em camundongos infectados com PI e tratados com Fluconazol 1mg/mL, o número absoluto de células viáveis do exsudato foi significativamente menor ($p < 0,01$) quando comparado com grupo apenas infectado com PI. Por outro lado, o número absoluto das células do exsudato do grupo infectado e tratado com Fluconazol 2mg/mL não apresentou diferença do grupo controle. Além disso, a atividade das desidrogenases mitocondriais do grupo tratado com 2 mg/mL foi superior em comparação ao grupo apenas infectado ($p < 0,001$), como demonstrado na Figura 8B.

Ademais, a Figura 12C demonstra que as duas doses testadas estimularam uma maior migração de linfócitos para a bolsa, quando em comparação ao controle, os neutrófilos foram as células predominantes. Essa mudança no perfil celular, com redução do número de neutrófilos, com compensação do número de linfócitos pode sugerir um efeito anti-inflamatório do tratamento.

Tendo em vista esses resultados, considera-se 2 mg/mL como a melhor dose dentre as empregadas, sendo capaz de estimular maior migração celular para a *air pouch*, além de promover a ativação metabólica das mesmas.

Figura 12 - Efeito do Fluconazol 1 mg/mL e 2 mg/mL no número absoluto de células e na atividade das desidrogenases mitocondriais na *air pouch*.



Fonte: do autor (2024)

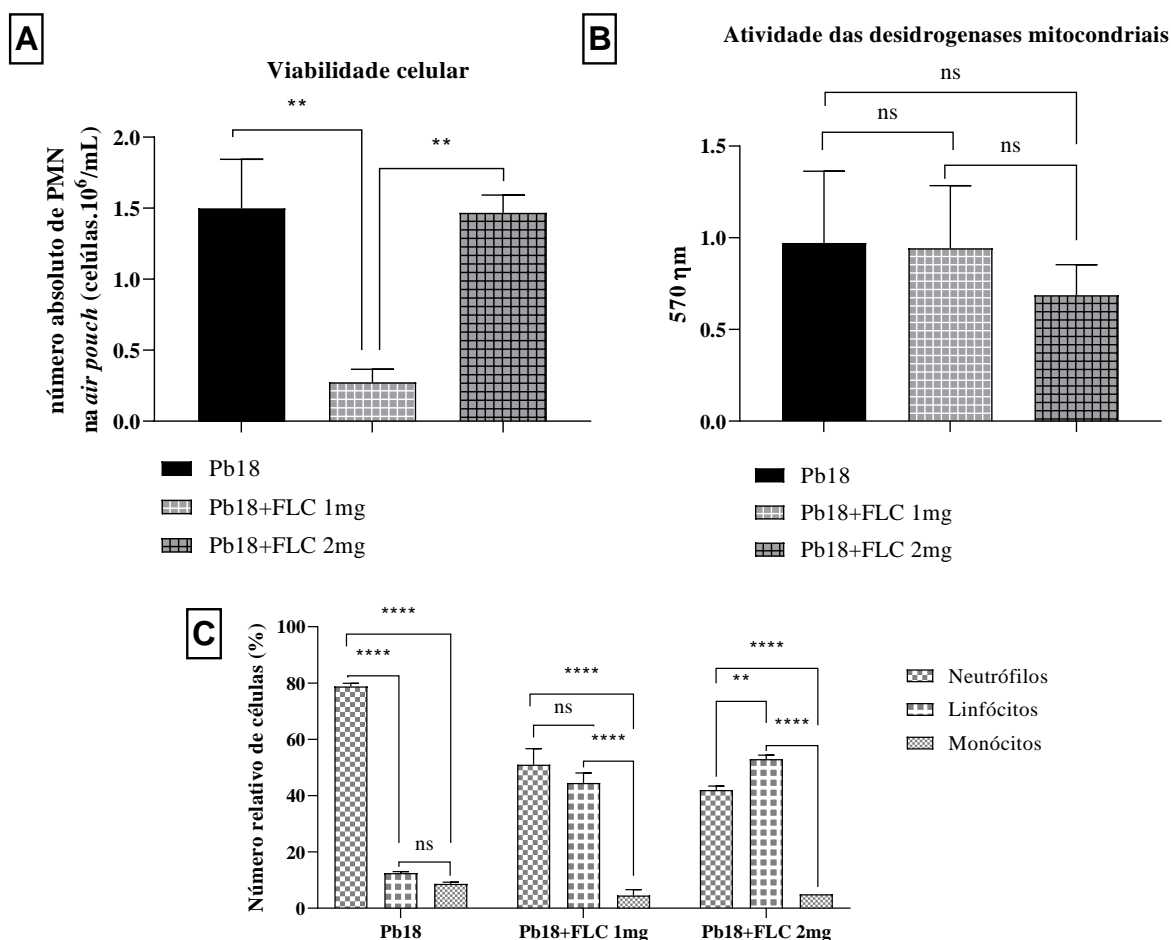
Legenda: A- Número absoluto de células do afluxo na bolsa aérea subcutânea de animais infectados por *P. lutzii* tratados com Fluconazol 1 mg/mL (PI+FLC 1mg) e 2 mg/mL (PI+FLC 2mg). B- Atividade mitocondrial de células na bolsa aérea subcutânea de animais infectados por *P. lutzii* tratados com Fluconazol 1mg/mL (PI+FLC 1mg) e 2 mg/mL (PI+FLC 2mg). C- Contagem diferencial das células oriundas da *air pouch* de camundongos infectados com *P. lutzii*. Os resultados de cada grupo são representados como média \pm erro padrão da média. Os testes foram realizados em triplicata. Diferença estatística entre grupos (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$ e (****) $p < 0,0001$ entre PI e os diferentes tratamentos, e entre tratamentos, Two Way Teste ANOVA, pós-teste de Tukey.

Nos animais com *air pouch* infectados com Pb18, o material também foi coletado e a viabilidade das células foi observada. A figura 13A mostra que assim como na *air pouch* dos animais infectados com PI, o número de células do afluxo viáveis foi inferior naquele grupo infectado com Pb18 tratado com 1 mg/mL de Fluconazol em comparação ao grupo sem tratamento, enquanto em 2 mg/mL a viabilidade aumenta. Apesar disso, não há diferença entre a atividade das desidrogenases mitocondriais, como aponta a Figura 13B.

De forma interessante, como na infecção por *P. lutzii*, o perfil celular também

sofreu alteração na infecção por *P. brasiliensis*. Na Figura 13C é possível observar que há uma diminuição no número de neutrófilos e aumento de linfócitos, em ambas as doses de tratamento.

Figura 13 - Efeito do Fluconazol 1 mg/mL e 2 mg/mL no número absoluto de células do exsudato e na atividade das desidrogenases mitocondriais na *air pouch* em animais infectados com Pb18.



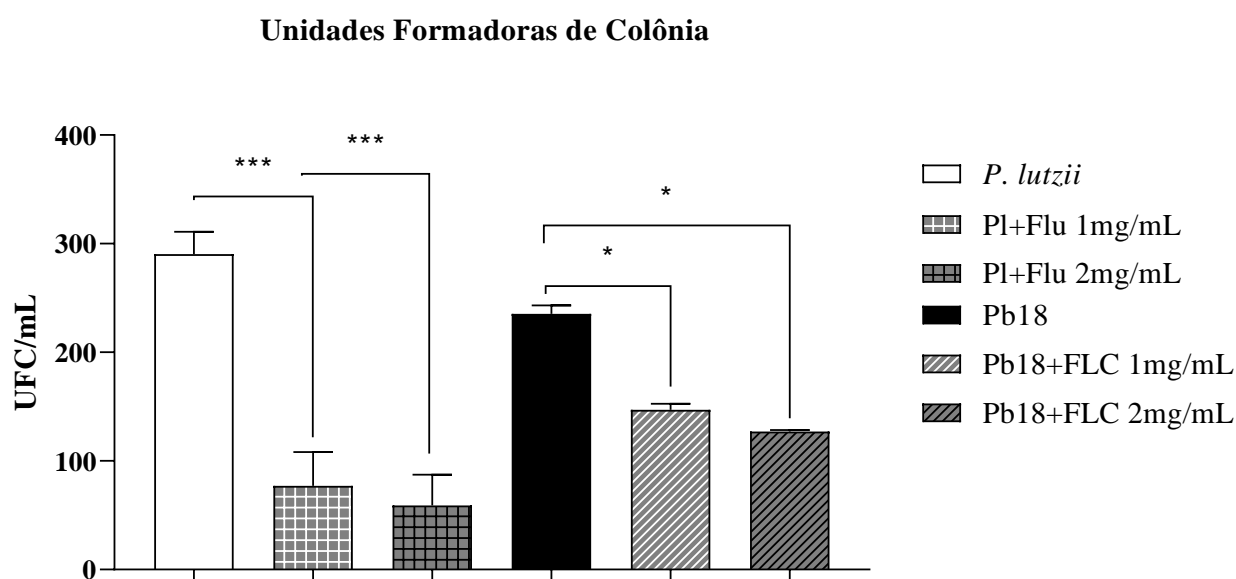
Fonte: do autor (2024)

Legenda: A- Número absoluto de células na *air pouch* subcutânea de animais infectados com Pb18 tratados com Fluconazol 1mg/mL (PI+FLC 1mg) e 2 mg/mL (PI+FLC 2mg). B- Atividade mitocondrial das células na bolsa aérea subcutânea de animais infectados com Pb18 tratados com Fluconazol 1mg/mL (PI+FLC 1mg) e 2 mg/mL (PI+FLC 2mg). C- Contagem diferencial das células oriundas da *air pouch* de camundongos infectados com *P. brasiliensis*. Os resultados de cada grupo são representados como média ± erro padrão da média. Os testes foram realizados em triplicata. Diferença estatística entre grupos (**) $p < 0,01$ entre tratamentos, teste Two Way ANOVA, pós teste de Tukey.

Para avaliar o efeito do tratamento sobre o crescimento fúngico, após a coleta do material presente na *air pouch*, o mesmo foi centrifugado e os pellets obtidos foram ressuspensos em PBS e dispersos em ágar Fava Netto. Após 12 dias as colônias

foram contabilizadas. Na Figura 14 nota-se que as duas doses de Fluconazol empregadas no tratamento, reduziram significativamente ($p < 0,05$) o número de colônias de *P. lutzii*, em comparação ao grupo apenas infectado.

Figura 14 - Efeito do Fluconazol nas concentrações de 1 mg/mL e 2 mg/mL sobre o número de *P. lutzii* e Pb18 através da quantificação das unidades formadoras de colônia (UFC) na *air pouch*



Fonte: do autor (2024)

Legenda: Número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *P. lutzii* e Pb18 após a infecção através da *air pouch* subcutânea e respectivo tratamento. Os resultados de cada grupo estão representados como médias \pm desvio padrão. Distribuição normal entre os dados (Teste de Shapiro-Wilk). Diferença estatística entre os grupos controle e os tratamentos (*) $p < 0,05$, (***) $p < 0,001$ teste *Two Way ANOVA* pós teste de *Tukey*.

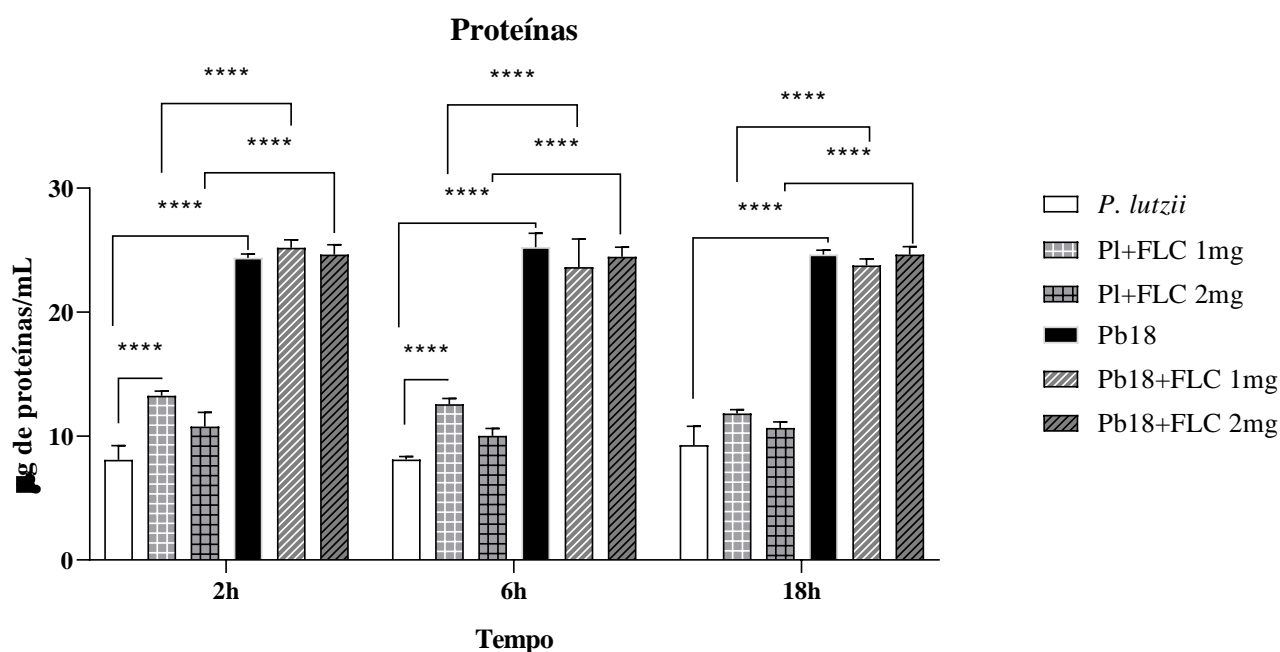
O mesmo comportamento é observado no número de colônias do material obtido da *air pouch* de camundongos infectados com Pb18 (Figura 14). Nesse sentido, as duas doses de Fluconazol testadas se mostraram eficazes contra a infecção causada por ambas as cepas de *Paracoccidioides* spp.

6.2.1 Ensaios bioquímicos em sobrenadantes de células oriundas das *air pouch*

Utilizando o sedimento e sobrenadante obtidos da cultura de células obtidas da *air pouch* foram realizados diversos testes bioquímicos. Esses testes tiveram o objetivo de avaliar o perfil de ativação celular e seus produtos no microambiente da *air pouch*. Com o sedimento foram dosadas as proteínas totais. Camundongos

infectados com *P. lutzii* e tratados com 1 mg/mL de Fluconazol demonstraram uma maior estimulação a síntese de proteínas pelas células do exsudato nos três tempos testados, em comparação a aqueles infectados e não tratados e ao grupo tratado com 2 mg/mL ($p<0,05$). Curiosamente, o grupo tratado com Fluconazol 2 mg/mL apresentou uma produção superior de proteínas em relação com grupo não tratado apenas no tempo de 2 horas ($p<0,05$), como aponta a Figura 15.

Figura 15 - Efeito do Fluconazol 1mg/mL e 2mg/mL em relação à síntese proteica total pelas células que afluíram à *air pouch* em animais infectados com *P. lutzii* ou Pb18.



Fonte: do autor (2024)

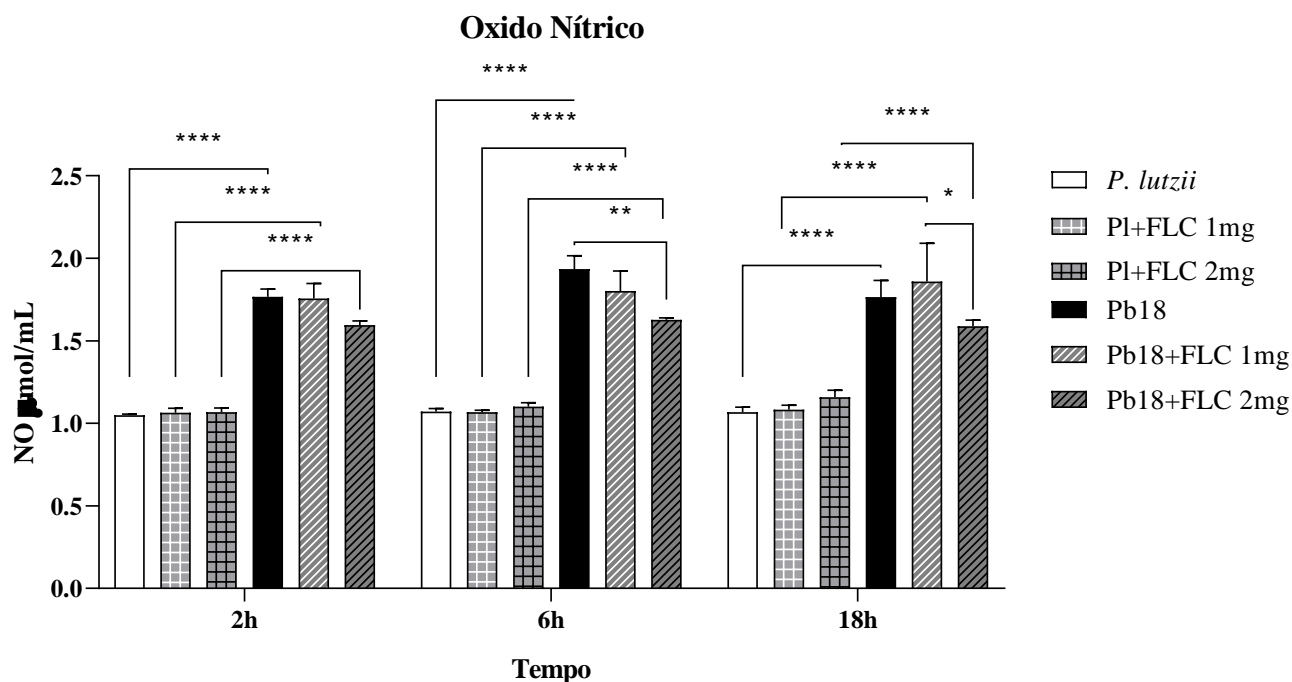
Legenda: Produção de proteínas pelas células do exsudato na *air pouch* de animais infectados por *P. lutzii* e *P. brasiliensis* tratados com Fluconazol 1mg/mL (PI+FLC 1mg), (Pb18+FLC 1mg) e 2 mg/mL (PI+FLC 2mg), (Pb18+FLC 2mg). Os resultados de cada grupo são representados como média \pm erro padrão da média. Os testes foram realizados em triplicata. Diferença estatística entre grupos (****) $p<0,0001$ entre PI e os diferentes tratamentos, e Pb18 e os seus respectivos tratamentos, teste de Kruskal Wallis. Distribuição não normal entre os dados.

Paralelamente, naqueles animais infectados com Pb18, não houve diferença estatística entre os valores encontrados na dosagem de proteínas totais, em nenhum dos tempos e em nenhuma das doses de Fluconazol testadas, como demonstra também a Figura 15.

Como o estresse oxidativo e nitrosativo tem importante papel no processo infeccioso e imunológico, os radicais livres liberados pelas células do exsudato presentes na *air pouch* foram avaliados em ambas as infecções.

Os sobrenadantes obtidos das culturas de células obtidas da coleta da *air pouch* dos animais infectados e tratados foram utilizados para dosagem de Óxido Nítrico (NO). As concentrações de NO encontradas se mantiveram estáveis durante os três tempos analisados, não havendo diferença significativa entre os grupos tratados com Fluconazol 1 mg/mL, 2 mg/mL e o grupo apenas infectado com *P. lutzii*. Curiosamente, houve apenas uma exceção no grupo tratado com 2 mg/mL em 18 horas, em que o valor de NO foi significativamente maior ($p < 0,05$) que o grupo tratado com 1 mg/mL e o grupo apenas infectado, como observa-se na Figura 16.

Figura 16 - Efeito do Fluconazol 1 mg/mL e 2 mg/mL na produção de óxido nítrico (NO) a partir de células obtidas da *air pouch* subcutânea em animais infectados com *P. lutzii* ou Pb18



Fonte: do autor (2024)

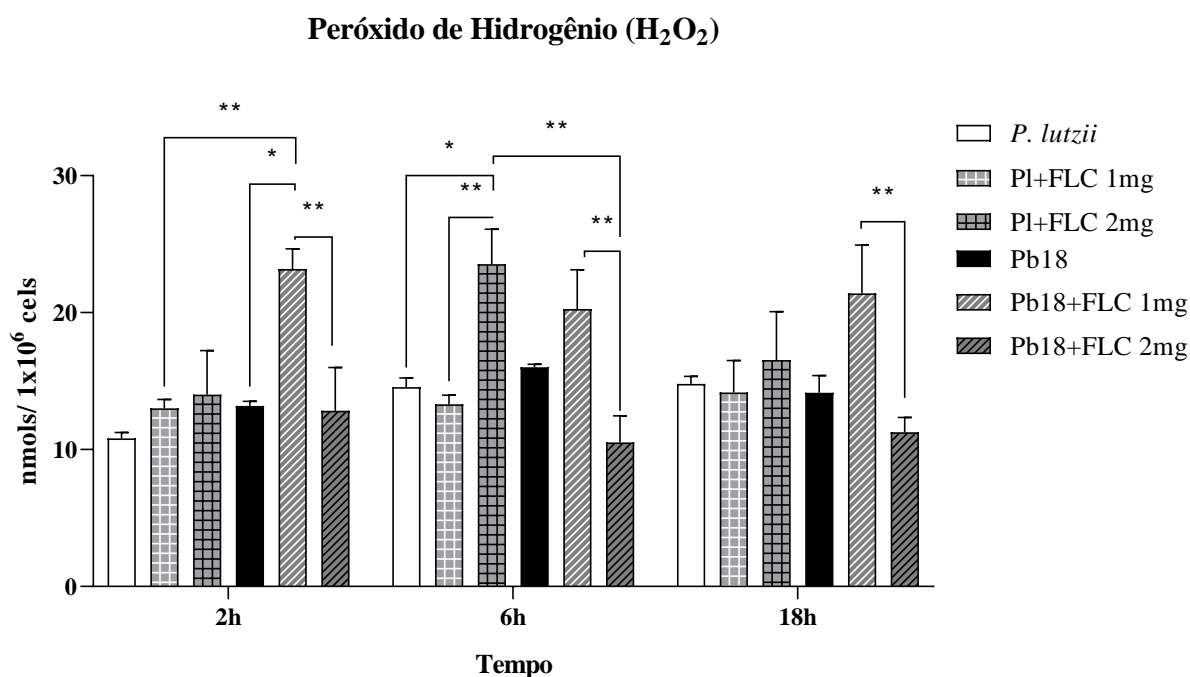
Legenda: Produção de óxido nítrico (NO) pelas células na *air pouch* de animais infectados por *P. lutzii* e Pb18 tratados com Fluconazol 1mg/mL (PI+FLC 1mg), (Pb18+FLC 1mg) e 2 mg/mL (PI+FLC 2mg), (Pb18+FLC 2mg). Os resultados de cada grupo são representados como média \pm erro padrão da média. Os testes foram realizados em triplicata. Distribuição normal entre os dados (Teste de Shapiro-Wilk). Diferença estatística entre grupos (*) $p = 0,05$, (**) $p = 0,01$, (****) $p = 0,0001$ entre os grupos controle e os tratamentos, teste Two Way ANOVA, pós-teste de Tukey.

Os animais infectados com Pb18 via subcutânea também não apresentaram diferença significativa na produção de NO entre si, apesar de haver uma produção significativamente mais expressiva que os grupos infectados com *P. lutzii*. Com

exceção novamente nos camundongos tratados com 2 mg/mL no tempo de 6 horas, no qual houve uma redução na quantidade de NO em relação ao grupo não tratado e tratado com 1 mg/mL. Com estes resultados, nota-se que o Fluconazol não estimula as células que afluíram para a *air pouch* através da via de estresse nitrosativo para combater ao *Paracoccidioides* spp.

Também utilizando o sobrenadante obtido das culturas de células do exsudato, foi realizada a dosagem de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produzido pelas células. A Figura 17 demonstra que houve aumento na produção de H_2O_2 no tempo de 6 horas pelo grupo tratado com Fluconazol 2 mg/mL em comparação ao controle. Por outro lado, a dose de 1mg/mL não afetou a produção. Nos outros tempos não houve diferença entre os grupos.

Figura 17 - Efeito do Fluconazol na produção de peróxido de hidrogênio a partir de células obtidas da *air pouch* em animais infectados com *P. lutzii* ou Pb18



Fonte: do autor (2024)

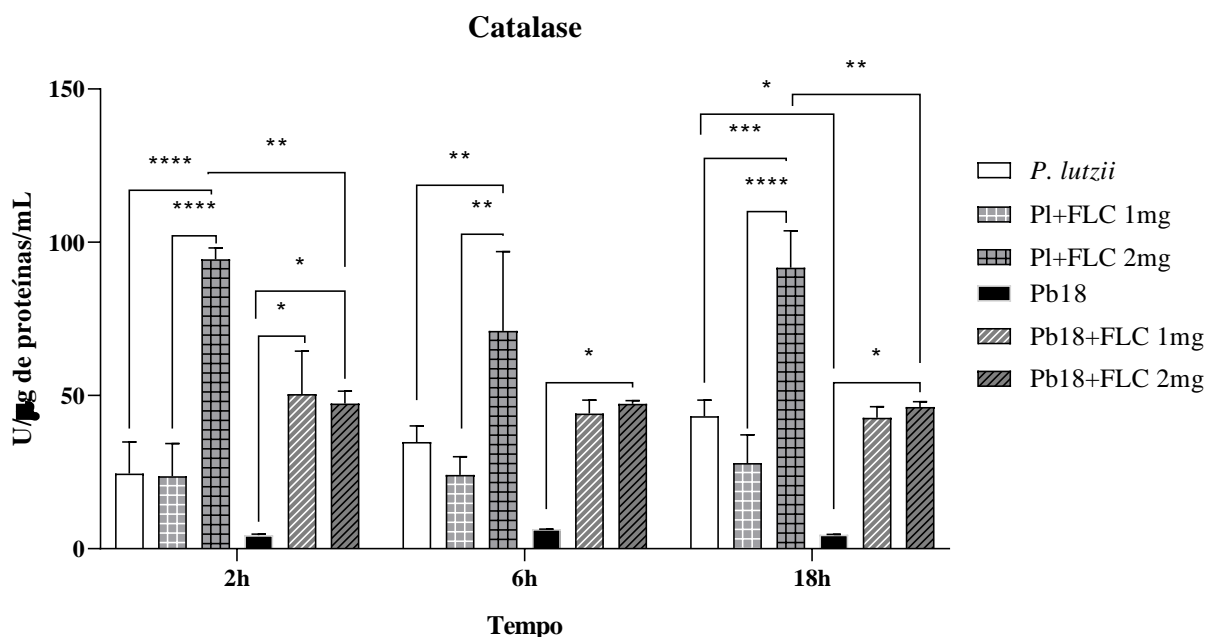
Legenda: Produção de peróxido de hidrogênio pelas células do exsudato na *air pouch* de animais infectados por *P. lutzii* e Pb18 tratados com Fluconazol 1mg/mL (PI+FLC 1mg), (Pb18+FLC 1mg) e 2 mg/mL (PI+FLC 2mg), (Pb18+FLC 2mg). Os resultados de cada grupo são representados como média \pm erro padrão da média. Distribuição normal entre os dados (Teste de Shapiro-Wilk). Os testes foram realizados em triplicata. Diferença estatística entre grupos (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,01$ entre os grupos controle e os diferentes tratamentos, teste Two Way ANOVA, pós teste de Tukey.

Por outro lado, nos grupos infectados com Pb18 e tratados com 2 mg/mL de

Fluconazol a produção de peróxido de hidrogênio foi significativamente inferior ($p<0,05$) ao grupo tratado com 1 mg/mL, como aponta a Figura 17. Apesar disso não houve diferença entre os tratamentos, nem entre os grupos tratados e não tratado nos outros tempos analisados. Esse resultado sugere que o Fluconazol pode estimular de maneira alternativa as vias de estresse oxidativo das células na *air pouch*, principalmente na infecção por Pb18, mas este não parece o principal mecanismo celular estimulado pelo Fluconazol.

Também utilizando o sobrenadante obtido nas culturas de células da *air pouch*, foi realizada a dosagem da enzima catalase, com o objetivo de entender a influência das doses do fármaco Fluconazol em sua produção. Em todos os tempos avaliados, a produção de catalase pelo grupo infectado com *P. lutzii* e tratado com Fluconazol 2mg/mL (PI+FLC 2mg) foi significativamente superior ($p<0,001$) em relação ao grupo tratado com 1 mg/mL e ao grupo apenas infectado, como demonstra a Figura 18.

Figura 18 - Efeito do Fluconazol na produção de catalase a partir de células obtidas da *air pouch* em animais infectados com *P. lutzii* ou Pb18.



Fonte: do autor (2024)

Legenda: Produção de catalase pelas células do exsudato na *air pouch* e animais infectados por *P. lutzii* tratados com Fluconazol 1mg/mL (PI+FLC 1mg) e 2 mg/mL (PI+FLC 2mg), e posteriormente em animais infectados com Pb18 e tratados com Fluconazol 1mg/mL (Pb18+FLC 1mg) e 2mg/mL (Pb18+FLC 2mg). Os resultados de cada grupo são representados como média \pm erro padrão da média. Os testes foram realizados em triplicata. Distribuição normal entre os dados (Teste de Shapiro-Wilk). Diferença estatística entre grupos controle e os diferentes tratamentos (*) $p<0,05$, (**) $p<0,01$, (***) $p<0,001$ e $p<0,0001$. Teste

Two Way ANOVA, pós-teste de Tukey.

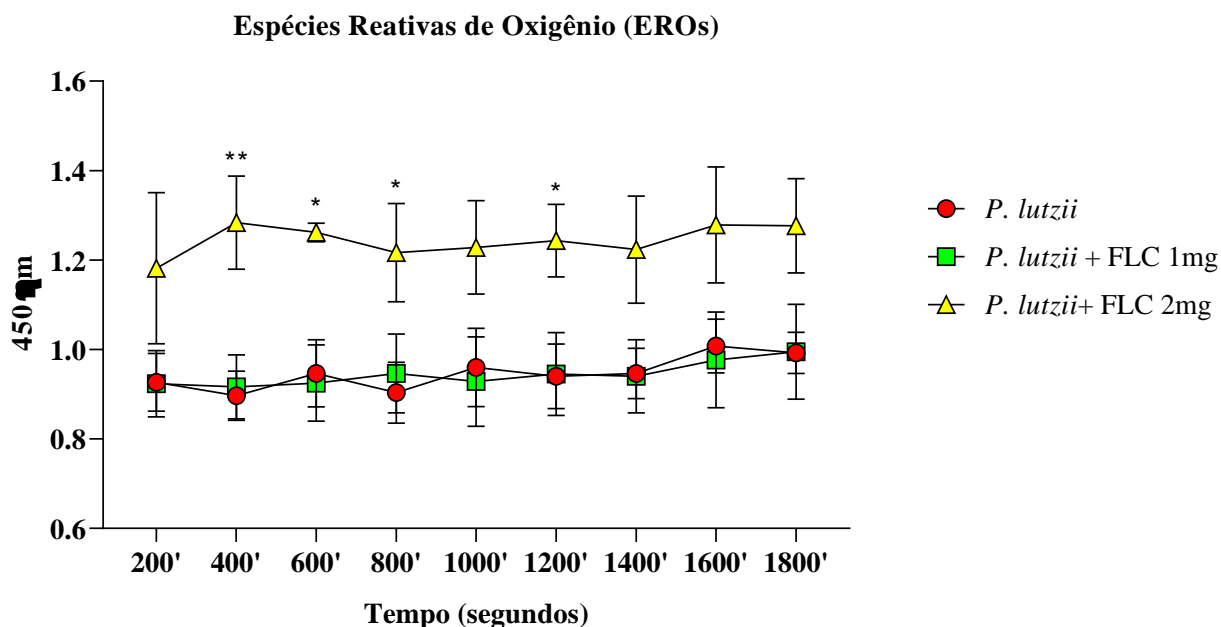
Paralelamente, no sobrenadante das células obtidas na *air pouch* dos camundongos infectados com Pb18, a produção de catalase foi significativamente maior ($p < 0,01$) no grupo tratado com 1mg/mL no tempo de 2 horas. Por outro lado, no tempo de 6 horas, a produção de catalase dos grupos tratados com 1 mg/mL e 2 mg/mL de Fluconazol foi menor em relação ao grupo infectado e não tratado, como apontado pela Figura 18. Estes resultados são curiosos e demonstram que o Fluconazol estimulou a produção de catalase pelas células, enzima responsável pela degradação do peróxido de hidrogênio formado durante a infecção.

Através do sobrenadante das células obtidas na *air pouch* também foram dosadas as espécies reativas de oxigênio (EROS) formadas nos grupos tratados e não tratados. Como demonstrado pela Figura 19, no grupo infectado com *P. lutzii* e tratado com 2 mg/mL de Fluconazol houve maior produção de EROS pelas células da bolsa, em relação ao grupo não tratado e tratado com 1 mg/mL. Como o resultado é expresso em uma curva, foram plotados diferentes gráficos para as amostras obtidas nos tempos de 2, 6 e 18h, sendo que, os gráficos referentes aos tempos de 6 e 18 horas encontram-se no material suplementar.

Opostamente, dentre os grupos infectados com Pb18, o grupo tratado com Fluconazol 1 mg/mL foi capaz de realizar maior produção de EROS em relação ao grupo não tratado e tratado com 2 mg/mL, como demonstra a Figura 20.

Esse resultado revela que as diferentes doses de Fluconazol podem ter uma interação modificada com *Paracoccidioides* spp., a depender da cepa fúngica analisada e seu grau de virulência, estimulando vias alternativas em cada um dos casos.

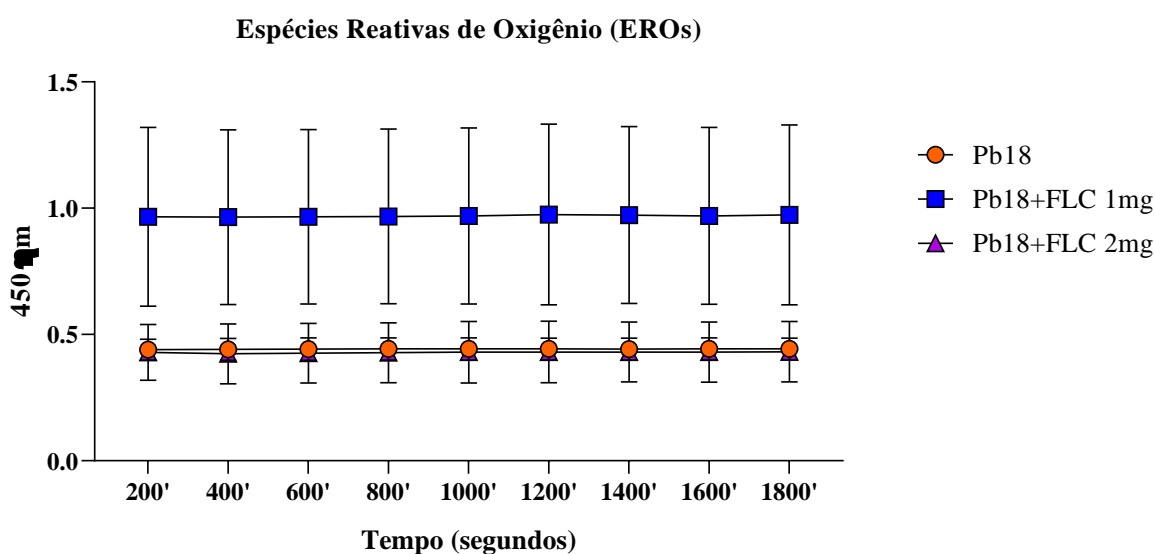
Figura 19 - Efeito do Fluconazol na produção de espécies reativas de oxigênio a partir de células obtidas da *air pouch* em animais infectados com *P. lutzii* em duas horas.



Fonte: do autor (2024)

Legenda: Produção de espécies reativas de oxigênio pelas células do exsudato na *air pouch* de animais infectados por *P. lutzii* tratados com Fluconazol 1mg/mL (*P. lutzii*+FLC 1mg) e 2 mg/mL (*P. lutzii*+FLC 2mg). Os resultados de cada grupo são representados como média \pm erro padrão da média. Os testes foram realizados em triplicata. Distribuição normal entre os dados (Teste de Shapiro-Wilk). Diferença estatística entre o grupo controle e os diferentes tratamentos (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,01$. Teste Two Way ANOVA, pós-teste de Tukey.

Figura 20 - Efeito do Fluconazol na produção de espécies reativas de oxigênio a partir de células obtidas da *air pouch* subcutânea em animais infectados com Pb18 no tempo de 2 horas.



Fonte: do autor (2024)

Legenda: Produção de espécies reativas de oxigênio pelas células do exsudato na *air pouch* de animais

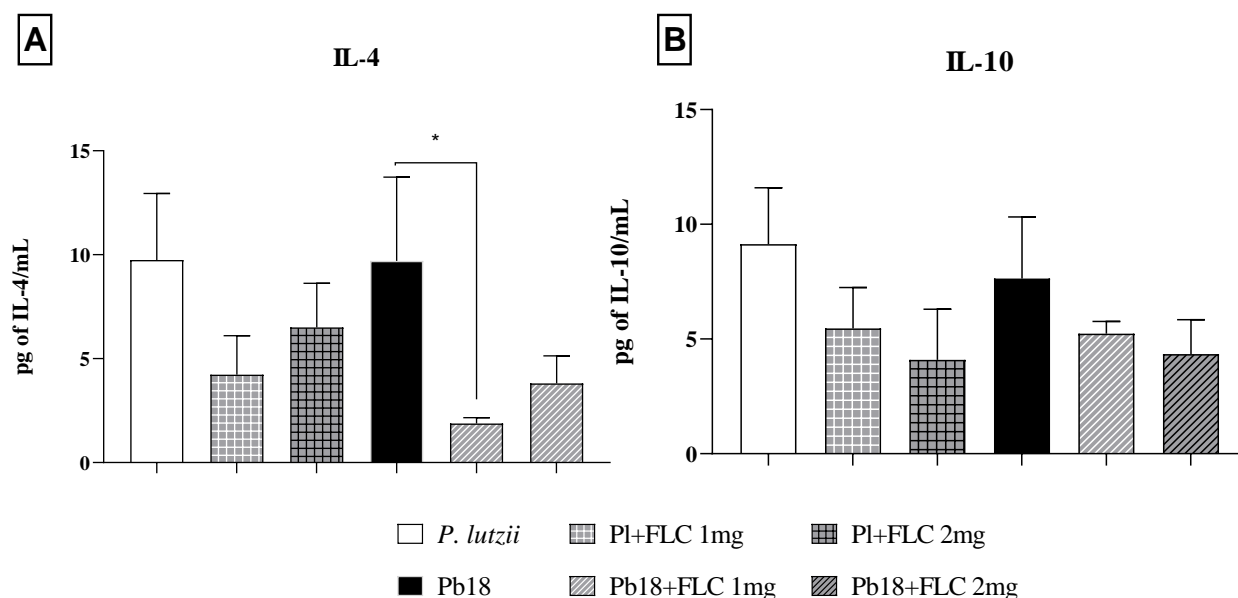
infectados com Pb18 tratados com Fluconazol 1mg/mL (Pb18+FLC 1mg) e 2 mg/mL (Pb18+FLC 2mg). Os resultados de cada grupo são representados como média \pm erro padrão da média. Os testes foram realizados em triplicata. Distribuição normal entre os dados (Teste de Shapiro-Wilk)

6.2.2 Teor das citocinas produzidas pelas células do exsudato obtidos nas bolsas de ar subcutâneas

As citocinas e quimiocinas são proteínas com papel de sinalização, e, portanto, são responsáveis por estimular, inibir ou imunomodular as células do sistema imunológico. Através do sobrenadante coletado das culturas de células do exsudato obtidos nas *air pouch* foram realizadas as dosagens do teor das citocinas presentes no microambiente. O perfil de produção das citocinas influencia diretamente o estabelecimento de uma resposta imune protetora contra PCM.

Aquelas células obtidas de camundongos infectados com *P. lutzii* e tratados com as duas doses de Fluconazol, não apresentaram diferença na secreção das citocinas consideradas inibitórias, IL-4 e IL-10 (Figura 21A, B).

Figura 21 - Efeito do Fluconazol no teor das citocinas IL-4 e IL-10 secretadas pelas células que afluíram a *air pouch* em animais infectados com *P. lutzii* ou Pb18.

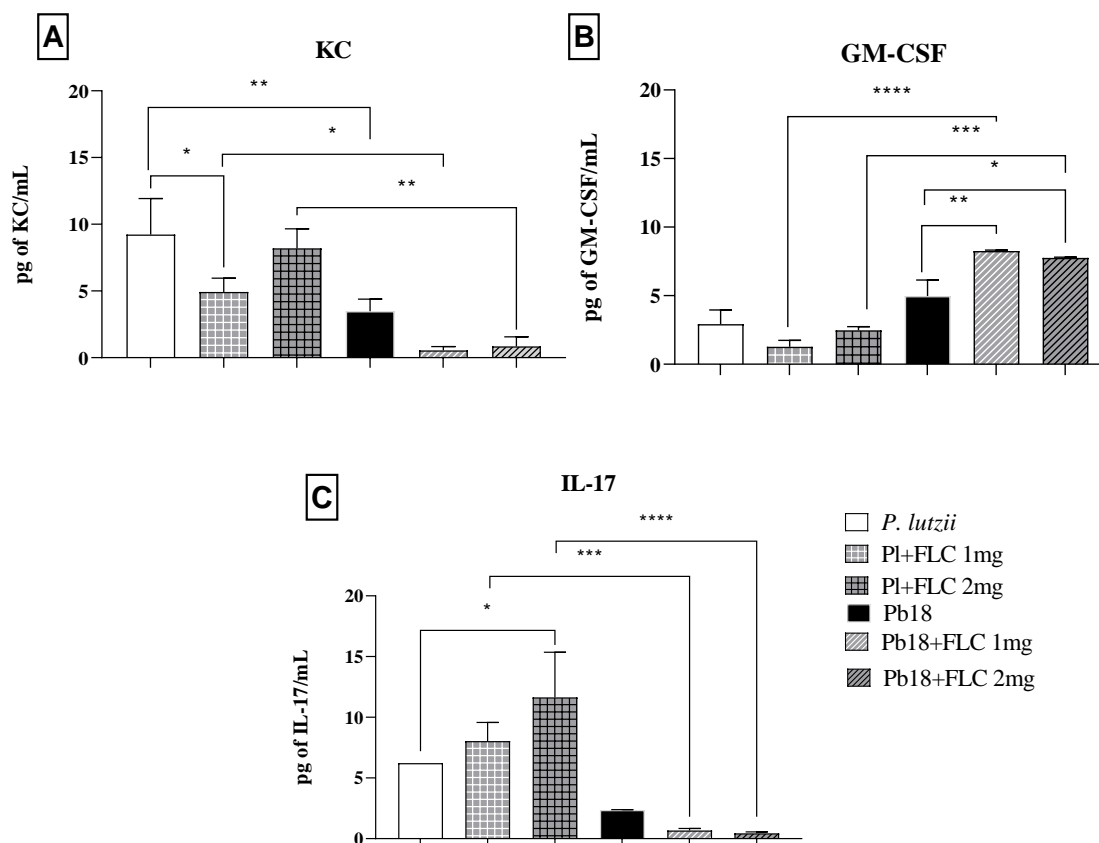


Fonte: do autor (2024)

Legenda: A- Produção de IL-4 pelas células que afluíram; B- Produção de IL-10 pelas células que afluíram. Os resultados de cada grupo são representados como média \pm erro padrão da média. Os testes foram realizados em triplicata. Distribuição normal entre os dados (Teste de Shapiro-Wilk). Diferença estatística entre grupos (*) $p < 0,05$ entre os grupos controle e os diferentes tratamentos. Teste Two Way ANOVA, pós-teste de Tukey.

Por outro lado, na infecção por Pb18, houve redução significativa ($p < 0,05$) no teor da citocina IL-4 (Figura 21A). O aumento de IL-4 está associado com infecções por *Paracoccidioides* spp. não controladas, e, portanto, um mau prognóstico.

Figura 22 - Efeito do Fluconazol no teor das citocinas KC, GM-CSF e IL-17 secretadas pelas células que afluíram à *air pouch* em animais infectados com *P. lutzii* ou Pb18.



Fonte: do autor (2024)

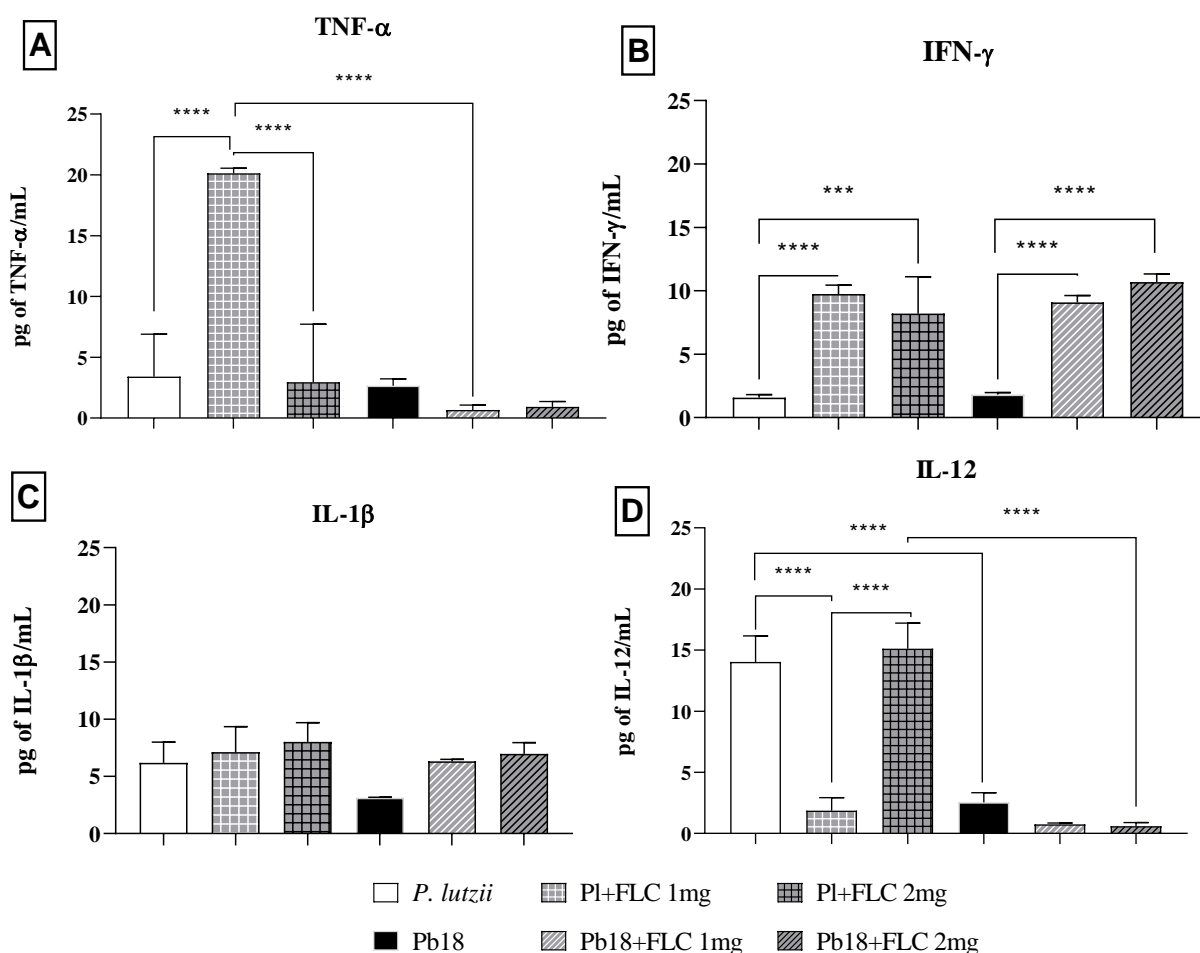
Legenda: A- Produção de KC pelas células do afluxo; B- Produção de GM-CSF pelas células do afluxo; C- Produção de IL-17 pelas células do afluxo. Os resultados de cada grupo são representados como média \pm erro padrão da média. Os testes foram realizados em triplicata. Distribuição normal entre os dados (Teste de Shapiro-Wilk). Diferença estatística entre grupos (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$ e (****) $p < 0,0001$ entre os grupos controle e os diferentes tratamentos. Teste Two Way ANOVA, pós-teste de Tukey.

A citocina IL-17 está associada à população de células Th17, que apresentam um papel regulatório e ligado a imunidade protetora anti-infecciosa das micoses. Na infecção por PI, a dose de 2mg/mL de Fluconazol estimulou a produção de IL-17 (Figura 22C). Por outro lado, na infecção por Pb18, os grupos tratados com ambas doses apresentaram redução do teor de IL-17 (Figura 22C). Ainda em relação a infecção por Pb18, as duas doses de Fluconazol desestimularam a produção de KC,

em comparação ao controle (Figura 22A).

A literatura traz que a secreção de TNF- α e IFN- γ está associada ao controle da infecção por *Paracoccidioides* spp. pelo hospedeiro. Nos resultados apresentados na Figura 23B, é possível notar que na infecção por *P. lutzii*, os grupos tratados com as duas doses de Fluconazol apresentaram aumento do teor de IFN- γ . Curiosamente, apenas o grupo tratado com a dose de 1mg/mL de Fluconazol apresentou aumento no teor de TNF- α . Além disso, a dose de 2mg/mL foi capaz de estimular a produção de IL-12, outra citocina com papel estimulante na imunologia da PCM (Figura 23D).

Figura 23 - Efeito do Fluconazol no teor das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-1 β e IL-12 secretadas pelas células que afluíram à *air pouch* em animais infectados com *P. lutzii* ou Pb18.



Fonte: do autor (2024)

Legenda: A- Produção de TNF- α pelas células do afluxo; B- Produção de IFN- γ pelas células do afluxo; C- Produção de IL-1 β pelas células do afluxo; D- Produção de IL-12 pelas células do afluxo. Os resultados de cada grupo são representados como média \pm erro padrão da média. Os testes foram realizados em triplicata. Distribuição normal entre os dados (Teste de Shapiro-Wilk). Diferença estatística entre grupos (****) $p < 0,0001$ entre os grupos controle e os

diferentes tratamentos. Teste Two Way ANOVA, pós-teste de Tukey.

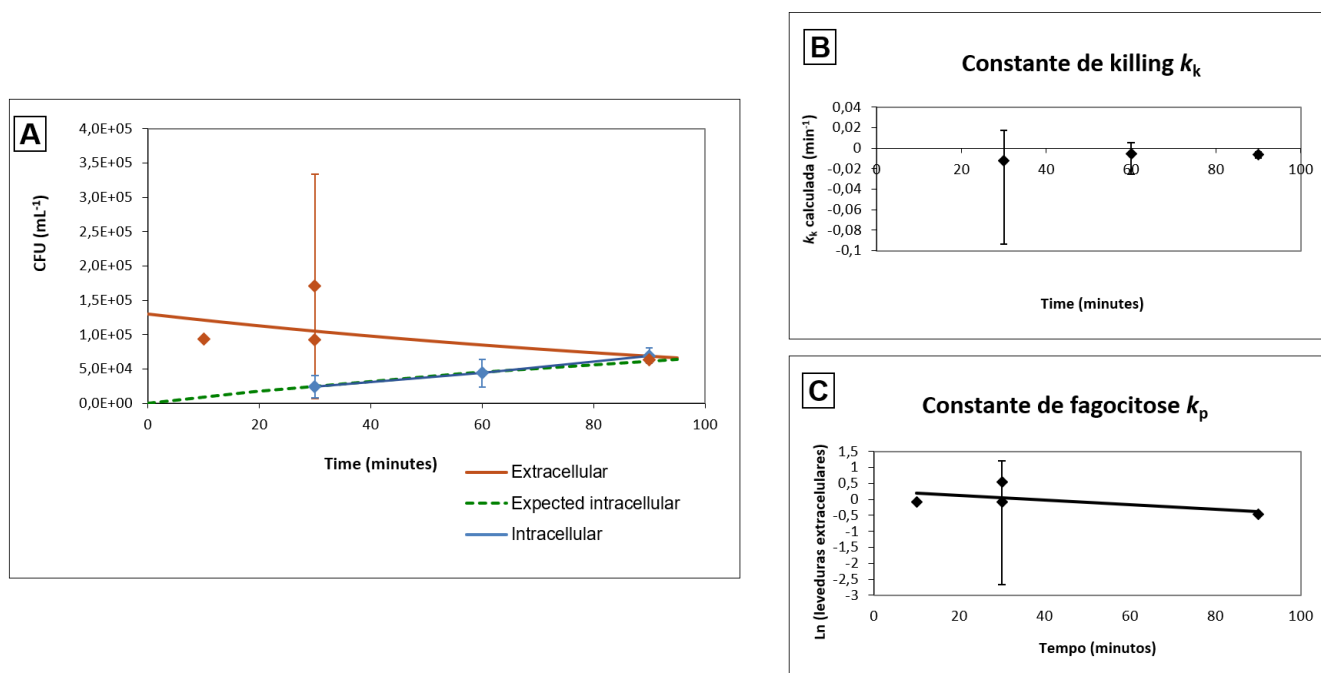
Paralelamente, na infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*, as duas doses de Fluconazol reduziram significativamente ($p < 0,05$) o teor de TNF- α (Figura 23A). Contudo, ambas doses estimularam o aumento do teor de IFN- γ e IL-1 β (Figura 23B, C). A citocina IL-1 β é sintetizada pelos fagócitos quando expostos aos microrganismos e está associada a resistência a infecção fúngica e ativação do inflamassoma na PCM. Interessantemente, os grupos tratados com ambas doses de Fluconazol tiveram redução do teor de IL-12 na infecção por Pb18 (Figura 23D).

6.2.3 Capacidade microbicida dos fagócitos

Para avaliar a capacidade antifúngica das células do exsudato, para ambas as cepas, foi realizado o cálculo da constante de *killing* (K_k), que mede a capacidade dos fagócitos em promover a morte celular das leveduras. Também foi realizada a constante de fagocitose (K_p), para avaliar a atividade fagocítica das células, nos tempos de 30, 60 e 90 minutos.

Com relação a cepa de PI, é possível observar na Figura 24A que PI extracelular (curva laranja) decresce ao passar do tempo, e o número de fungos intracelular aumenta (curva azul). Contudo, mesmo havendo aumento, o número de leveduras intracelulares do grupo tratado não ultrapassa do grupo controle (curva verde) e nem o número de leveduras extracelulares. Interessantemente, o tratamento não altera a atividade dos fagócitos, o que é evidenciado pela constante de *killing* (Figura 24B) na qual há morte dos fungos apenas em 30 minutos, assim como na constante de fagocitose. Esse fenômeno está relacionado pela redução do número relativo de neutrófilos e baixo número de monócitos, que seriam as células responsáveis pela fagocitose (Figura 12C).

Figura 24 - Atividade dos fagócitos após tratamento com FLC 2mg/mL na infecção por *P. lutzii*



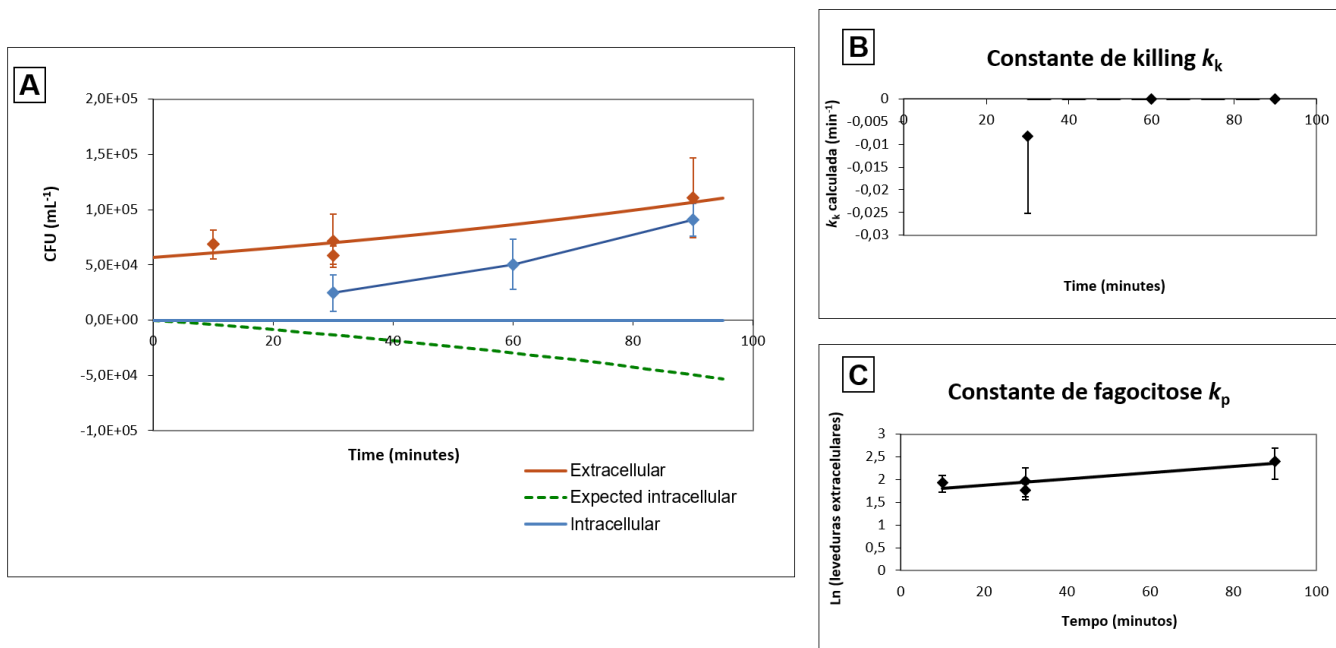
Fonte: do autor (2024)

Legenda: A- Sumário dos resultados dos testes de capacidade de fagocitose e *killing* dos fagócitos.

Linha verde tracejada representa a concentração de leveduras do grupo controle PI, que não foi tratado com Fluconazol 2mg/mL; linha laranja corresponde a concentração de leveduras extracelulares do grupo tratado com Fluconazol 2mg/mL; e a linha azul a quantidade de leveduras intracelulares deste grupo. B- Gráfico da Constante de *Killing* (k_k), mede a capacidade de eliminação de leveduras pelos fagócitos, é um gráfico semi-logarítmico de levedura extracelulares vs. tempo. C- Gráfico da Constante de fagocitose (k_p), afere o índice de leveduras fagocitadas pelos fagócitos, o cálculo para cada ponto de tempo é traçado, as barras de erro representam os desvios padrão para leveduras intracelulares.

Na infecção com Pb18 não houve redução do número de fungos extracelulares em nenhum dos tempos (curva laranja). Apesar disso há uma pequena elevação no número de leveduras intracelulares (curva azul). A dose de 2mg/mL de Fluconazol também não influenciou na capacidade de *killing* dos fagócitos (Figura 25B), com curioso aumento da constante de fagocitose em 30 e 90 minutos. Portanto, mesmo estimulando a fagocitose, não há morte dessas leveduras intracelularmente.

Figura 25 - Atividade dos fagócitos após tratamento com FLC 2mg/mL na infecção por Pb18



Fonte: do autor (2024)

Legenda: A- Sumário dos resultados dos testes de capacidade de fagocitose e *killing* dos fagócitos.

Linha verde tracejada representa a concentração de leveduras do grupo controle Pb18, que não foi tratado com Fluconazol 2mg/mL; linha laranja corresponde a concentração de leveduras extracelulares do grupo tratado com Fluconazol 2mg/mL; e a linha azul a quantidade de leveduras extracelulares deste grupo. B- Gráfico da Constante de Killing (k_k), mede a capacidade de eliminação de leveduras pelos fagócitos, é um gráfico semi-logarítmico de levedura extracelulares vs. tempo. C- Gráfico da Constante de fagocitose (k_p), afere o índice de leveduras fagocitadas pelos fagócitos, o cálculo para cada ponto de tempo é traçado, as barras de erro representam os desvios padrão para leveduras intracelulares.

7 DISCUSSÃO

A PCM é uma infecção fúngica com alta prevalência no Brasil, acometendo anualmente diversos indivíduos (Martinez, 2015). Há um número pequeno de fármacos utilizados no tratamento da PCM, que geralmente é longo e com efeitos colaterais que fazem com que haja abandono por parte do paciente (Saldanha *et al.*, 2016). Nesse sentido, buscaram-se alternativas terapêuticas que facilitem o processo de cura. Apesar da disponibilidade do Fluconazol no Sistema Único de Saúde (SUS), seu uso no tratamento da PCM é restrito a casos onde o paciente apresenta acometimento neurológico ou impossibilidade de utilizar os fármacos tradicionalmente empregados (Hahn *et al.*, 2022). Apesar disso, ainda não está esclarecido na literatura a eficácia do Fluconazol frente às cepas de *Paracoccidioides* spp., e sua interação com o sistema imunológico.

O uso do Fluconazol é relatado na literatura para o tratamento de outras micoses sistêmicas, como aquelas causadas por *Cryptococcus* spp. (Menichelli *et al.*, 1996), *Histoplasma* spp. (Wheat *et al.*, 1997) e *Coccidioides* spp. (Galgiani *et al.*, 2016). São relacionadas doses diárias de uso clínico em humanos entre 400 mg e 800 mg, e 1.200 mg como dose de ataque. Tendo isso em vista, utilizando como referência o peso dos camundongos que seriam utilizados nos experimentos *ex vivo* (25g), foram definidas as doses de 1, 2 e 3 mg/mL.

O modelo experimental de infecção através da *air pouch* foi o método desenvolvido no estudo, devido a sua capacidade de assimilação do microambiente infeccioso. Durante o processo infeccioso, há migração de células do sistema imunológico à bolsa subcutânea e conseqüentemente, ativação de suas vias metabólicas. Além disso, o modelo é desenvolvido em 7 dias, representando de maneira muito eficaz e breve, o curso da infecção.

Inicialmente, para compreender o comportamento do fármaco frente às cepas de *Paracoccidioides* spp. foram realizados testes *in vitro* com as doses selecionadas. Nessa etapa, também foi testado o comportamento de três diferentes diluentes recomendados pelo fabricante do Fluconazol. O diluente álcool metílico foi capaz de reduzir o número absoluto de fungos viáveis, isoladamente e na presença do Fluconazol. Além disso, não apresentou efeito citotóxico frente às células esplênicas e nem mesmo afetou sua atividade mitocondrial. Esses resultados podem ser explicados pelos achados de Bhesaniya, Nandha e Baluja (2014), nos quais a

solubilidade máxima do Fluconazol foi atingida com o álcool metílico, em comparação com diversos outros diluentes, demonstrando ser o melhor. A solubilidade do Fluconazol aumenta com a diminuição dos grupos CH₂ nos compostos alcoólicos (Bhesaniya; Nandha; Baluja, 2014).

Os resultados *in vitro* demonstraram que o Fluconazol foi eficaz sobre as cepas de *Paracoccidioides* spp. (Figura 5, 6 e 7). Evidencia-se que houve redução no número de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* viáveis quando tratados com Fluconazol. De forma muito similar, um ensaio de microdiluição com diversos antifúngicos realizado por Cruz e colaboradores (2013), demonstrou que a concentração inibitória mínima (CIM₉₀) do Fluconazol sobre *Paracoccidioides* spp. em meio de cultura MMH a 37°C ficou entre 0.5mg/L e 1.0mg/L, além demonstrar um comportamento fungistático. Hahn e Hamdan (2000) encontraram o CIM de 0.5µg/mL do Fluconazol frente a *P. brasiliensis*. Esses dados evidenciam e confirmam a atividade do Fluconazol sobre os diferentes isolados de *Paracoccidioides* spp.

Ainda nos experimentos *in vitro*, células esplênicas foram submetidas às doses de Fluconazol para elucidar seu efeito citotóxico. Nos resultados pode-se concluir que não houve alteração na viabilidade e nem na atividade mitocondrial das células (Figura 8 e 9). Os resultados encontrados condizem com os encontrados por Abruzzo *et al.* (1987), nos quais Fluconazol não resultou morte celular significativa quando testado em concentrações entre 1 mg/L e 25 mg/L também sobre células esplênicas de camundongos BALB/cBY.

No modelo de infecção *ex vivo*, Fluconazol provocou mudanças quantitativas e qualitativas nas células do exsudato na *air pouch* durante a infecção por *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. Curiosamente, nos grupos tratados com as diferentes doses houve aumento no número de linfócitos de maneira a compensar a diminuição dos neutrófilos. Sabe-se que os neutrófilos têm papel importante na imunologia antifúngica, sendo as primeiras células a migrar para o local da infecção (Goihman-Yahr *et al.*, 1989), além de ativar adequadamente a imunidade adquirida (Yarzabal, 1971). Por outro lado, resultados anteriores do grupo de pesquisa demonstraram uma sutil alteração no perfil celular ao empregar própolis vermelha brasileira no tratamento da PCM (Santos *et al.*, 2021). A diminuição dos neutrófilos, compensada pelo aumento dos linfócitos, pode sugerir um efeito anti-inflamatório do Fluconazol.

Uma alta taxa de mortalidade foi demonstrada em camundongos com

paracoccidiodomicose experimental atímicos, incapazes de maturar células T (Burger *et al.*, 1996), assim como nos animais com ausência de linfócitos B (Tristão *et al.*, 2013), o que demonstra a importância dessas células para o bom curso da doença. Liu, Mengel e Friedberg (1996) encontraram em seus experimentos *in vivo* com camundongos BALB/c, que Fluconazol não apresentou efeitos supressores ou alterações na distribuição de timócitos imaturos duplo-positivos CD4⁺ CD8⁺.

Ainda em relação às células que afluíram à *air pouch*, em ambas as infecções houve redução do número absoluto de células no tratamento com a dose de 1 mg/mL, enquanto 2 mg/mL o número de células é igual ao controle (Figura 12 e 13). Curiosamente na infecção por *P. lutzii* as células se mostraram mais ativadas metabolicamente. Esse fato vai em encontro ao descrito por Zervos *et al.* (1996), no qual neutrófilos tiveram marcante aumento na atividade bactericida *in vitro* quando cultivadas com Fluconazol. Sabe-se que houve aumento no número de linfócitos, e, portanto, levanta-se a hipótese da dose de 2 mg/mL de Fluconazol ter estimulado uma rápida alteração para o perfil celular de imunidade adquirida. Os linfócitos migram para o local da infecção para secretar citocinas. Nos experimentos realizados por Vuddhakul *et al.* (1990) com Fluconazol nas concentrações de 10, 20 e 50 µL/mL, o fármaco não afetou a mobilidade e quimiotaxia dos neutrófilos. Outros estudos demonstraram a ausência de efeitos do Fluconazol sobre a atividade dessas células (Senior; Shaw, 1996). Portanto, pode-se sugerir que o efeito gerado pelo antifúngico não foi a supressão dos neutrófilos, mas sim, a estimulação dos linfócitos.

Interessantemente, nos experimentos realizados com os sobrenadantes das células obtidas das bolsas de ar, foi possível observar que o fármaco afetou diferentes vias bioquímicas nas infecções pelas diferentes cepas. Na infecção por *P. lutzii*, na presença do tratamento houve aumento de proteínas, catalase e ERO. Por outro lado, na infecção por *P. brasiliensis*, houve um sutil aumento de peróxido de hidrogênio e ERO. A resposta imune celular específica demonstrada na infecção por PI, tem como característica a expressão gênica e secreção de proteínas (Siqueira *et al.*, 2015). Em contrapartida, a resposta imune celular contra Pb18 tem característica reações inflamatórias granulomatosas e altos índices de anticorpos (Silva Neto *et al.*, 2014).

Tanto a produção de H₂O₂, como a de catalase podem induzir a morte celular de *Paracoccidioides* spp. (Carmo *et al.*, 2006). Nesse sentido podemos sugerir que Fluconazol estimulou as células do exsudato por vias alternativas nas infecções pelas

diferentes cepas. Esses resultados vão em sentido contrário aos achados de Vargas-Maya *et al.* (2022), que demonstraram que o aumento de catalase está relacionado a produção de peróxido de hidrogênio na infecção por *Sporothrix schenckii*.

Foi demonstrado que Fluconazol aumenta a produção de ERO gerando danos ao material genético por *C. neoformans in vitro* (Peng *et al.*, 2018), e também em *C. glabrata* (Mahl *et al.*, 2015). Curiosamente, em nossos achados, na infecção por *P. lutzii* houve maior produção de ERO nos grupos tratados com 2 mg/mL, e na infecção por *P. brasiliensis* houve maior produção na dose de 1 mg/mL. Peng e colaboradores (2018) demonstraram que o Fluconazol se liga a metais, como o ferro e o cobre. O dano ao DNA foi potencializado pela ligação ao cobre, e em sua presença com o peróxido de hidrogênio, o Fluconazol exhibe este dano. Tendo em vista que a síntese de H₂O₂ foi sutilmente aumentada na dose de 1 mg/mL de Fluconazol na infecção por Pb18 (Figura 17), levanta-se a hipótese de que devido a maior presença dos fungos, houve maior estresse oxidativo, em comparação a 2 mg/mL. Dessa mesma maneira, na infecção por PI, a dose de 2 mg/mL estimulou a produção de H₂O₂ e ERO.

Como as proteínas adesinas podem estar envolvidas na modulação da resposta imune, essas diferenças na ativação celular apresentadas nas infecções pelas duas cepas podem ser geradas pela concentração da proteína Gp43, presente em menor concentração na parede celular de *P. lutzii*, além de outros fatores de virulência (Vicentini *et al.*, 1994). Apesar de também serem produzidas por linfócitos, as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são produzidas principalmente pelos PMNs (Romani, 2011), e inatividade de algumas vias de estresse oxidativo e nitrosativo podem ser devido à alteração no perfil celular.

Nas infecções por ambas cepas não houve alteração na síntese de óxido nítrico (Figuras 16). De forma contraditória, Baltch *et al.* (2001) demonstraram o incremento de NO significativo por monócitos tratados com Fluconazol na infecção por *C. albicans*. Portanto, a baixa atividade nas vias de síntese de NO durante o tratamento com Fluconazol, pode estar associada intrinsecamente a infecção por *Paracoccidioides* spp. Além disso, tendo em vista o aumento de catalase, pode-se sugerir um microambiente menos agressivo, se tratando de estresse nitrosativo e oxidativo.

Em relação à produção de citocinas, na infecção por PI houve aumento na síntese de IL-17, TNF- α , IFN- γ e redução de IL-12 (Figuras 22 e 23). A produção de citocinas do tipo Th1, indicam uma resposta imune eficiente das células T. Como

ressaltado anteriormente, TNF- α e IFN- γ está associada ao controle da infecção por *Paracoccidioides* spp. pelo hospedeiro (Silva; Figueiredo, 1991). Em consonância com isto, monócitos incubados com Fluconazol e IFN- γ , tiveram aumento da morte intracelular de *C. albicans* (Baltch *et al.*, 2001). O aumento da síntese de IL-17 durante a paracoccidioidomicose está envolvido na modulação da resposta imune (Jannuzzi *et al.*, 2019), e sua deficiência prejudica a formação do granuloma compacto (Tristão *et al.*, 2017)

No modelo de infecção por Pb18, houve aumento na expressão de IFN- γ , IL-1 β e diminuição de IL-4, IL-17, IL-12, KC e TNF- α (Figuras 21, 22 e 23). Ambas doses de Fluconazol estimularam a síntese de IL-1 β , citocina associada a ativação do inflamossomo e resistência a infecção por *Paracoccidioides* spp. (Tavares *et al.*, 2013). Heng, Jiang e Chu (2021) contrariamente demonstraram que o Fluconazol reduziu a síntese de IL-1 β em camundongos saudáveis. Em contraste com a infecção por PI, a síntese de IL-17 foi reduzida pelas duas doses do tratamento. É importante destacar que a produção de IL-17 no grupo controle de Pb18 não foi tão acentuada quanto no grupo controle de PI, demonstrando uma diferença no perfil de citocinas intrínsecos de cada cepa. KC é uma quimiocina considerada pró-inflamatória, relacionada com a resposta exacerbada e aumento na migração de neutrófilos (Arango *et al.*, 2017). De forma interessante, Friccius *et al.* (1992) notaram a supressão de TNF- α por diversas concentrações de Itraconazol, mas não por Fluconazol.

O emprego de IL-12 estimulou neutrófilos humanos desafiados com *P. brasiliensis* a produzirem IFN- γ (RODRIGUES *et al.*, 2014). Contudo, apesar de apresentar um papel protetor, essa citocina também pode gerar resposta inflamatória excessiva e fibrose (Burger, 2021). Curiosamente, em nossos achados, o tratamento com Fluconazol reduziu a secreção de IL-12 na infecção por ambas cepas, podendo indicar um papel regulatório sobre a inflamação excessiva.

Fluconazol não apresentou interação com atividade microbicida dos fagócitos contra *Paracoccidioides* spp. (Figura 24 e 25). De forma parecida, Senior e Shaw (1988), em seus experimentos com Fluconazol frente à *Candida albicans*, não notaram alterações na ingestão e dano celular causado por PMNs, em comparação ao controle sem tratamento. Por outro lado, Zervos e colaboradores (1996), encontraram que PMNs incubados com Fluconazol tiveram a atividade microbicida aumentada contra a bactéria *Escherichia coli*. Sabe-se que embora os neutrófilos

sejam as primeiras células a migrar para o local da infecção na PCM, nos pacientes acometidos essas células são menos eficientes (Kurita *et al.*, 1999). Outro fator que afetou as constantes de *killing* e fagocitose é a alteração no perfil celular nas células que afluíram para a *air pouch* (Figura 12 e 13). Tendo em vista a diminuição dos neutrófilos, compensada pelo aumento dos linfócitos, conseqüentemente não houve aumento da fagocitose em comparação ao controle.

Dessa forma, os resultados encontrados com as doses testadas de Fluconazol foram promissores na PCM experimental. É importante que sejam dosados outros componentes das vias respiratórias das células imunes, para finalmente elucidar sua interação com o fármaco. Além disso, os resultados evidenciaram as diferenças particulares entre *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, mas apesar disso, Fluconazol foi eficaz contra ambos. Sendo assim, posterior a teste *in vivo*, o fármaco Fluconazol pode representar uma opção terapêutica viável para a PCM.

8 CONCLUSÕES

- *P. brasiliensis* e *P. lutzii* são susceptíveis ao antifúngico Fluconazol *in vitro*;
- Fluconazol não alterou a viabilidade e atividade mitocondrial das células esplênicas em nenhuma das doses testadas, portanto, não apresenta citotoxicidade *in vitro*; pelo contrário, estimulando-as no controle dos fungos *in vitro*;
- Através do tratamento com Fluconazol no modelo de infecção subcutânea, foi possível avaliar que o antifúngico estimula diferentes vias bioquímicas na infecção por *P. lutzii* ou Pb18, sendo o principal achado a produção de espécies reativas de oxigênio;
- Fluconazol foi responsável por mudanças no perfil celular do exsudato do modelo de tratamento na *air pouch* na infecção com ambas cepas, além de imunomodular a produção de citocinas por essas células, demonstrando sua interação com a imunidade inata e adquirida.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados apresentados no presente trabalho pode-se concluir que Fluconazol foi capaz de reduzir o número de fungos viáveis nos experimentos *in vitro*, e, portanto, apresenta atividade antifúngica frente *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. Também foi possível concluir que Fluconazol não apresenta toxicidade para células esplênicas. Através do modelo de infecção *air pouch*, foi possível perceber a capacidade do Fluconazol imunomodular as células presentes no exsudato. Apesar de um modelo de infecção rápido, os experimentos possibilitaram observar os efeitos do Fluconazol sobre o perfil celular presente na bolsa. O aumento de linfócitos de forma compensatória a redução de neutrófilos na infecção pelas duas cepas, pode indicar um papel anti-inflamatório do Fluconazol. Apesar das diferenças nas atividades oxidativas e nitrosativa apresentada pelas células do exsudato em cada infecção, notoriamente as diferentes doses de Fluconazol influenciam a ativação ou supressão das mesmas. Dessa mesma forma, mesmo havendo a estimulação de diferentes citocinas na infecção por cada cepa de *Paracoccidoides* spp., é possível observar que após o tratamento com Fluconazol houve produção principalmente de citocinas associadas ao perfil Th1 e supressão de citocinas Th2. Para conferir a ação do

fármaco sistemicamente e estabelecer as doses do antifúngico Fluconazol como tratamento da PCM ainda se faz necessário experimentos com modelos de infecção longos *in vivo*. Apesar disso, é possível concluir que o Fluconazol influencia positivamente na PCM experimental, e se trata de uma opção promissora de tratamento.

.

REFERÊNCIAS

- ABRUZZO, George K; FROMTLING, Robert A; TURNBULL, Tracy A; *et al.* Effects of bifonazole, fluconazole, itraconazole, and terbinafine on the chemiluminescence response of immune cells. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.l.], v. 20, n. 1, p. 61–68, 1987.
- AEBI, Hugo. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, Switzerland, v. 105, p. 121–126, 1984.
- AMBRÓSIO, Alexandre Vasconcellos Alvim; CAMELO, Camila Cristiane Silva; BARBOSA, Carolina Venâncio; *et al.* Paracoccidioidomicose (doença de Lutz-Splendore-Almeida): propedêutica complementar, diagnóstico diferencial, controle de cura. **rmmg.org**, Belo Horizonte, Brasil, v. 24, n. 1, p. 81–92, 2014. Disponível em: <http://rmmg.org/artigo/detalhes/606>. Acesso em: 18 nov. 2023.
- ARANGO, Julián Camilo; PUERTA-ARIAS, Juan David; PINO-TAMAYO, Paula Andrea; *et al.* Bone marrow–derived mesenchymal stem cells transplantation alters the course of experimental paracoccidioidomycosis by exacerbating the chronic pulmonary inflammatory response. **Medical Mycology**, Medellín, Colômbia, v. 56, n. 7, p. 884–895, 2017.
- BALTCH, A L; SMITH, R P; FRANKE, M A; *et al.* Effects of Cytokines and Fluconazole on the Activity of Human Monocytes against *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, New York, United States of America, v. 45, n. 1, p. 96–104, 2001.
- BERLINER, M. D.; RECA, M. E. Vital staining of *Histoplasma capsulatum* with Janus Green B. **Sabouraudia**, USA, v. 5, n. 1, p. 26–29, 1966.
- BHESANIYA, Kapil; NANDHA, Kajal; BALUJA, Shipra. Thermodynamics of Fluconazole Solubility in Various Solvents at Different Temperatures. **Journal of Chemical & Engineering Data**, Gujarat, Índia, v. 59, n. 3, p. 649–652, 2014.
- BRAMMER, K. W.; FARROW, P. R.; FAULKNER, J. K. Pharmacokinetics and tissue penetration of fluconazole in humans. **Reviews of infectious diseases**, United Kingdom, v. 12, n. Supplement_3, p. S318-S326, 1990.
- BRITO, Marcelly Maria dos Santos. **Morfologia, virulência e perfil genético de *Paracoccidioides brasiliensis*: avaliação pré e pós-passagem em modelo murino de isolados provenientes de forma clínica crônica humana da paracoccidioidomicose**. www.arca.fiocruz.br. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/8049>. Acesso em: 17 jun. 2023
- BRUMMER, E; CASTANEDA, E; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clinical Microbiology Reviews**, United States, Washington, D.C., v. 6, n. 2, p. 89–117, 1993.
- BUENO, Renata A; THOMAZ, Luciana; MUÑOZ, Julian E; *et al.* Antibodies Against Glycolipids Enhance Antifungal Activity of Macrophages and Reduce Fungal Burden

After Infection with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Frontiers in Microbiology**, Switzerland, Lausanne, v. 7, 2016.

BURGER, Eva. Paracoccidioidomycosis Protective Immunity. **Journal of Fungi**, Switzerland, Basel, v. 7, n. 2, p. 137, 2021.

BURGER, Eva; VAZ, Cláudia; SANO, Ayako; *et al.* *Paracoccidioides Brasiliensis* Infection in Nude Mice: Studies with Isolates Differing in Virulence and Definition of their T Cell-Dependent and T Cell-Independent Components. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, United States, Northbrook, IL, v. 55, n. 4, p. 391–398, 1996.

CALICH, V L; COPPI VAZ, C A; BURGER, E. PMN chemotactic factor produced by glass-adherent cells in the acute inflammation caused by *Paracoccidioides brasiliensis*. **British journal of experimental pathology**, United Kingdom, London, v. 66, n. 1, p. 57–65, 1985.

CARMO, J P M; DIAS-MELICIO, L A; CALVI, S A; *et al.* TNF- α activates human monocytes for *Paracoccidioides brasiliensis* killing by an H₂O₂-dependent mechanism. **Medical Mycology**, United Kingdom, Oxford, v. 44, n. 4, p. 363–368, 2006.

CARRERO, Lilia Lisbeth; NIÑO-VEGA, Gustavo; TEIXEIRA, Marcus Zulian; *et al.* New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal Genetics and Biology**, United States, New York, v. 45, n. 5, p. 605–612, 2008.

CERDEIRA, Cláudio Daniel; RIBEIRO, Maísa; CARLI, Marina Lara; *et al.* Low-level laser therapy stimulates the oxidative burst in human neutrophils and increases their fungicidal capacity. **Journal of Biophotonics**, Germany, Weinheim, v. 9, n. 11-12, p. 1180–1188, 2016.

CLSI, Clinical and Laboratory Institute. **M27-A3 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Third Edition**, United States, Wayne, PA, [s.l.: s.n.], 2008.

CRUZ, R. C.; WERNECK, S. M. C.; OLIVEIRA, C. S.; *et al.* Influence of Different Media, Incubation Times, and Temperatures for Determining the MICs of Seven Antifungal Agents against *Paracoccidioides brasiliensis* by Microdilution. **Journal of Clinical Microbiology**, United States, Washington, D.C., v. 51, n. 2, p. 436–443, 2013.

DE ALMEIDA, Sandro R.; DE MORAES, Jane Z.; DE CAMARGO, Zoilo P.; *et al.* Pattern of Immune Response to GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* in Susceptible and Resistant Mice Is Influenced by Antigen-Presenting Cells. **Cellular Immunology**, United States, New York, v. 190, n. 1, p. 68–76, 1998.

DEBRUYNE, Danièle. Clinical pharmacokinetics of fluconazole in superficial and systemic mycoses. **Clinical pharmacokinetics**, New Zealand, Auckland, v. 33, p. 52-77, 1997.

DE OLIVEIRA, Haroldo C.; DA SILVA, Julhianny de FÃtima; SCORZONI, Liliana; *et al.* Importance of adhesins in virulence of *Paracoccidioides* spp. **Frontiers in Microbiology**, Switzerland, Lausanne, v. 6, 2015.

DEL NEGRO, Gilda Maria; PEREIRA, Pereira; FRANCO, Heitor; *et al.* Evaluation of tests for antibody response in the follow-up of patients with acute and chronic forms of paracoccidioidomycosis. **Journal of Medical Microbiology**, United Kingdom, London, v. 49, n. 1, p. 37–46, 2000.

DO VALLE, Antonio Carlos; SKACEL, Michael; LANA, Regina; *et al.* A CASE REPORT OF INTRASPINAL PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, Brazil, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 203–207, 1998.

FAVA-NETO. Estudos quantitativos sobre a fixacao do complemento na blastomicose sulamericana com antigenos polissacaridicos. **Arq.Cir.Clin.Exp.**, Brazil, Rio de Janeiro, v. 18, p. 197–254, 1955.

FERREIRA, Karen Spadari *et al.* Interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and pulmonary dendritic cells induces Interleukin-10 production and Toll-Like Receptor–2 expression: possible mechanisms of susceptibility. **The Journal of infectious diseases**, United States, Oxford, v. 196, n. 7, p. 1108–1115, 2007.

FERREIRA, Marcelo Simão. Paracoccidioidomycosis. **Pediatric Respiratory Reviews**, United Kingdom, London, v. 10, n. 4, p. 161–165, 2009.

FIORILLO, Adhemar Mário; MARTINEZ, Roberto. Natureza de anticorpos precipitantes especifcos da paracoccidioidomicose (blastomicose Sul-Americana), revelados por contra-imunoeletoforese. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, Brazil, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 25–30, 1984.

FORTES, Maria Rita Parise; MIOT, Hélio Amante; KUROKAWA, Cilmery Suemi; *et al.* Imunologia da paracoccidioidomicose. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Brazil, Rio de Janeiro, v. 86, n. 3, p. 516–524, 2011.

FRANCESCONI, Fabio; SILVA, Marcus Tullius Teixeira da; COSTA, Regina Lana Braga; *et al.* Long-term outcome of neuroparacoccidioidomycosis treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brazil, Belo Horizonte, v. 44, n. 1, p. 22–25, 2011.

FRICCIUS, H.; POHLA, H.; ADIBZADEH, M.; *et al.* The effects of the antifungal azoles itraconazole, fluconazole, ketoconazole and miconazole on cytokine gene expression in human lymphoid cells. **International Journal of Immunopharmacology**, United Kingdom, Oxford, v. 14, n. 5, p. 791–799, 1992.

GALGANI, John N.; AMPEL, Neil M.; BLAIR, Janis E.; *et al.* 2016 Infectious Diseases Society of America (IDSA) Clinical Practice Guideline for the Treatment of Coccidioidomycosis. **Clinical Infectious Diseases**, United States, Arlington, VA, v. 63, n. 6, p. e112–e146, 2016.

GEGEMBAUER, Gregory; ARAUJO, Leticia Mendes; PEREIRA, Edy Firmina; *et al.* Serology of Paracoccidioidomycosis Due to *Paracoccidioides lutzii*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, United States, San Francisco, CA v. 8, n. 7, p. e2986, 2014.

GOA, Karen L.; BARRADELL, Lee B. Fluconazole. **Drugs**, New Zealand, Auckland, v. 50, n. 4, p. 658–690, 1995.

GOIHMAN-YAHR, Mauricio; ROTHENBERG, Alex; BRETANA, Antonio; *et al.* Digestion of killed *Paracoccidioides brasiliensis* by neutrophils. **Mycopathologia**, Netherlands, Dordrecht, v. 106, n. 1, p. 53–58, 1989.

GOODMAN, Jesse L.; WINSTON, Drew J.; GREENFIELD, Ronald A.; *et al.* A Controlled Trial of Fluconazole to Prevent Fungal Infections in Patients Undergoing Bone Marrow Transplantation. **New England Journal of Medicine**, USA, Waltham, MA, v. 326, n. 13, p. 845–851, 1992.

GRANZOTO, DS; VITALI, LH; MARTINEZ, R. Efficacy of voriconazole in experimental rat paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brazil, Uberaba, MG, v. 46, n. 1, 2020.

GRAYBILL, John R; PALOU, Elsa; AHRENS, Joan. Treatment of murine histoplasmosis with UK 49,858 (fluconazole). **PubMed**, USA, Washington, DC, v. 134, n. 4, p. 768–70, 1986.

GREEN, Jessie N; WINTERBOURN, Christine C; HAMPTON, Mark B. Analysis of Neutrophil Bactericidal Activity. **Methods in molecular biology**, USA, Totowa, NJ, p. 319–332, 2007.

HAHN, Rosane Christine; HAGEN, Ferry; MENDES, Rinaldo Poncio; *et al.* Paracoccidioidomycosis: Current Status and Future Trends. **Clinical Microbiology Reviews**, USA, Washington, D.C., v. 35, n. 4, 2022.

HAHN, Rosane Christine; HAMDAN, Junia Soares. In vitro susceptibilities of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form to antifungal drugs. **Mycoses**, Germany, Berlin, v. 43, n. 11-12, p. 403–407, 2000.

HAMPTON, Mark B.; VISSERS, Margret C. M.; WINTERBOURN, Christine C. A single assay for measuring the rates of phagocytosis and bacterial killing by neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, USA, Bethesda, MD, v. 55, n. 2, p. 147–152, 1994.

HENG, Xing; JIANG, Yuanhe; CHU, Weihua. Influence of Fluconazole Administration on Gut Microbiome, Intestinal Barrier, and Immune Response in Mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 65, n. 6, p. e02552-20, 2021. USA. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33722893/>. Acesso em: 17 ago. 2023

JANNUZZI, Grasielle Pereira; FOGAÇA, Roberto; AMARANTE-MENDES, Gustavo P; *et al.* TLR3 Is a Negative Regulator of Immune Responses Against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**,

Switzerland, Lausanne, v. 8, 2019.

KASHINO, S S; FAZIOLI, R A; CAFALLI-FAVATI, C; *et al.* Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* Infection Is Linked to a Preferential Th1 Immune Response, Whereas Susceptibility Is Associated with Absence of IFN-gamma Production. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, USA, New Rochelle, NY, v. 20, n. 1, p. 89–97, 2000.

KURITA, N; OARADA, M.; ITO, E; *et al.* Antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medical Mycology**, United Kingdom, Oxford, v. 37, n. 4, p. 261–267, 1999.

LIU, J; MENGEL, K; FRIEDBERG, K.D. In vivo effects of fluconazole on lymphocyte subpopulations of the thymus and spleen in mice: Flow cytometry analysis. **International Journal of Immunopharmacology**, United Kingdom, Oxford, v. 18, n. 8-9, p. 449–457, 1996.

LOURES, Flávio V. *et al.* TLR-4 cooperates with Dectin-1 and mannose receptor to expand Th17 and Tc17 cells induced by *Paracoccidioides brasiliensis* stimulated dendritic cells. **Frontiers in microbiology**, Switzerland, Lausanne, v. 6, p. 261, 2015.

LUTZ, Adolpho. Uma micose pseudococídica localizada na boca e observada no Brasil: contribuição ao conhecimento das hifoblastomicoses americanas. **Brasil Med**, Brazil, Rio de Janeiro, v. 22, p. 121–4, 1908.

MAGON, Nicholas J; PARKER, Heather A; ASHBY, Louisa V; *et al.* Analysis of Neutrophil Bactericidal Activity. **Methods in molecular biology**, USA, New York, NY, p. 149–164, 2019.

MAHL, Camila Donato; BEHLING, Camile Saul; HACKENHAAR, Fernanda S.; *et al.* Induction of ROS generation by fluconazole in *Candida glabrata*: activation of antioxidant enzymes and oxidative DNA damage. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, USA, New York, NY, v. 82, n. 3, p. 203–208, 2015.

MARTINEZ, Roberto. EPIDEMIOLOGY OF PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, Brazil, São Paulo, v. 57, n. suppl 19, p. 11–20, 2015.

MARTINEZ, Roberto. New Trends in Paracoccidioidomycosis Epidemiology. **Journal of Fungi**, Switzerland, Basel, v. 3, n. 1, p. 1, 2017.

MARTINEZ, Roberto; MALTA, Maria Helena Borges; VERCEZE, Adalberto Valadas; *et al.* Comparative efficacy of fluconazole and amphotericin B in the parenteral treatment of experimental paracoccidioidomycosis in the rat. **Mycopathologia**, Netherlands, Dordrecht, v. 146, n. 3, p. 131–134, 1999.

MARTINEZ, Roberto; MOYA, Maria Janete. Complexo primário da paracoccidioidomicose e hipereosinofilia. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brazil, Brasília, v. 35, n. 12, p. 1259–1262, 2009.

MCEWEN, J G; GARCIA, A M; ORTIZ, B L. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Archives of medical research**, Mexico, v. 26, n. 3, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8580685/>. Acesso em: 17 ago. 2023.

MELONI-BRUNERI, L. H.; ASTOLFI, C. S.; VAZ, C. a. C.; *et al.* Myelopoiesis and presence of *P. brasiliensis* in bone-marrow of susceptible and resistant mice. **Abstracts**, Australia, 1994. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/000871249>. Acesso em: 20 maio 2023.

MELONI-BRUNERI, Lucia Helena; CAMPA, Ana; ABDALLA, Dulcineia S P; *et al.* Neutrophil oxidative metabolism and killing of *P. brasiliensis* after air pouch infection of susceptible and resistant mice. **Journal of Leukocyte Biology**, USA, Bethesda, MD, v. 59, n. 4, p. 526–533, 1996.

MENDES, Rinaldo Poncio; CAVALCANTE, Ricardo de Souza; MARQUES, Sílvio Alencar; *et al.* Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. **The Open Microbiology Journal**, USA, Foster City, CA, v. 11, n. 1, 2017.

MENEZES, Valfredo da Mota; SOARES, Bernardo GO; FONTES, Cor Jesus Fernandes. Drugs for treating paracoccidioidomycosis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, USA, Hoboken, NJ, 2006.

MENICHETTI, F; FIORIO, M; TOSTI, A; *et al.* High-Dose Fluconazole Therapy for Cryptococcal Meningitis in Patients with AIDS. **Clinical infectious diseases/Clinical infectious diseases (Online. University of Chicago. Press)**, USA, Chicago, IL, v. 22, n. 5, p. 838–840, 1996.

MING, Damien; HARRISON, Thomas S. Cryptococcal meningitis. **British journal of hospital medicine**, USA, London, v. 78, n. 8, p. C125–C127, 2017.

MOURA, Leandro Pajuaba de; RAFFIN, Cesar Noronha; DEL NEGRO, Gilda M.B.; *et al.* Paracoccidioidomycose evidenciando comprometimento medular tratada com sucesso por fluconazol. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, USA, New York, NY, v. 52, n. 1, p. 82–86, 1994.

NISHIKAKU, Angela Satie; LUCIANA CRISTINA, Ribeiro; FAGNANI, Raphael; *et al.* Matrix metalloproteinases with gelatinolytic activity induced by *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **International Journal of Experimental Pathology**, USA, Hoboken, NJ, v. 90, n. 5, p. 527–537, 2009.

PENG, Congyue Annie; GAERTNER, Andrea A. E.; HENRIQUEZ, Sarah Ana; *et al.* Fluconazole induces ROS in *Cryptococcus neoformans* and contributes to DNA damage in vitro. **PLOS ONE**, USA, San Francisco, CA, v. 13, n. 12, p. e0208471, 2018.

PEREIRO JR, M; PEREIRO, M; GARCÍA; *et al.* Immunological features of chronic adult paracoccidioidomycosis: report of a case treated with fluconazole. **Acta Dermato Venereologica**, USA, New York, NY, v. 76, n. 1, p. 84–85, 1996.

PERON, Gabriela et al. Paracoccidioides brasiliensis infection increases regulatory T cell counts in female C57BL/6 mice infected via two distinct routes. **Immunobiology**, USA, New York, NY, v. 225, n. 4, p. 151963, 2020.

PICK, E; MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **Journal of Immunological Methods**, USA, New York, NY, v. 46, n. 2, p. 211–226, 1981.

PICK, Edgar; KEISARI, Yona. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **Journal of Immunological Methods**, USA, New York, NY, v. 38, n. 1-2, p. 161–170, 1980.

PINA, Adriana; SALDIVA, Paulo; ELENA, Luz; *et al.* Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts. **Journal of Leukocyte Biology**, USA, Bethesda, MD, v. 79, n. 6, p. 1202–1213, 2006.

PINHEIRO, Breno Gonçalves; HAHN, Rosane Christine; CAMARGO, Zoilo Pires de; *et al.* Molecular Tools for Detection and Identification of *Paracoccidioides* Species: Current Status and Future Perspectives. **Journal of Fungi**, USA, Basel, v. 6, n. 4, p. 293, 2020.

RESTREPO, Angela; MCEWEN, Jason D; CASTAÑEDA, Elizabeth. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle. **Medical Mycology**, USA, Cary, NC, v. 39, n. 3, p. 233–241, 2001.

RODRIGUES, Anderson Messias; HAGEN, Ferry; PUCCIA, Rosana; *et al.* *Paracoccidioides* and Paracoccidioidomycosis in the 21st Century. **Mycopathologia**, USA, New York, NY, v. 188, n. 1-2, p. 129–133, 2023.

RODRIGUES, Daniela Ramos; FERNANDES, Reginaldo Keller; BALDERRAMAS, Helanderson de Almeida; *et al.* Interferon-gamma production by human neutrophils upon stimulation by IL-12, IL-15 and IL-18 and challenge with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Cytokine**, USA, New York, NY, v. 69, n. 1, p. 102–109, 2014.

ROMAGNOLO, Alexandre Giannecchini et al. Role of Dectin-1 receptor on cytokine production by human monocytes challenged with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycoses**, USA, Hoboken, NJ, v. 61, n. 4, p. 222-230, 2018.

ROMANI, Luigina. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, USA, New York, NY, v. 11, n. 4, p. 275–288, 2011.

ROSALES, Carlos. Neutrophil: a Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? **Frontiers in Physiology**, Switzerland, Lausanne, v. 9, n. 113, 2018.

SAAG, Michael S.; POWDERLY, William G.; CLOUD, Gretchen A.; *et al.* Comparison of Amphotericin B with Fluconazole in the Treatment of Acute AIDS-Associated Cryptococcal Meningitis. **New England Journal of Medicine**, USA, Waltham, MA, v. 326, n. 2, p. 83–89, 1992.

SALDANHA, Camila Teixeira; GARCIA, Mônica Pereira; IOCCA, Diêgo Cesar; *et al.* Antifungal Activity of Amphotericin B Conjugated to Nanosized Magnetite in the Treatment of Paracoccidioidomycosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, USA, San Francisco, CA, v. 10, n. 6, p. e0004754–e0004754, 2016.

SANTOS, Lauana Aparecida; ROSALEN, Pedro Luiz; DIAS, Nayara Andrade; *et al.* Brazilian Red Propolis shows antifungal and immunomodulatory activities against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, Brazil, v. 277, n. 114181, p. 114181, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33991639/>. Acesso em: 18 de maio 2023

SELYE, Hans. Induction of Topical Resistance to Acute Tissue Injury: An Experimental Study with the “Granuloma Pouch Technique”. **Surgical Clinics of North America**, USA, Philadelphia, PA, v. 33, n. 5, p. 1417-1446, 1953.

SENIOR, D S; SHAW, J T. In vitro effects of fluconazole (UK-49, 858) and ketoconazole on mouse lymphocyte proliferation and on *Candida* blastospore destruction by human polymorphonuclear leukocytes. **International Journal of Immunopharmacology**, USA, New York, NY, v. 10, n. 2, p. 169–173, 1988.

SHANI, W. Krol, J.; CZUBA, Z.; SCHELLER, S. Modulating Luminol-Dependent Chemiluminescence Of Neutrophils By Flavones. **Zeitschrift für Naturforschung C**, Germany, Berlin, v. 47, n. 11-12, p. 889–892, 1992.

SHANKAR, J.; RESTREPO, A.; CLEMONS, K. V.; *et al.* Hormones and the Resistance of Women to Paracoccidioidomycosis. **Clinical Microbiology Reviews**, USA, Washington, DC, v. 24, n. 2, p. 296–313, 2011.

SHIKANAI-YASUDA, Maria Aparecida. PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS TREATMENT. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, USA, Philadelphia, PA, v. 57, n. suppl 19, p. 31–37, 2015.

SHIKANAI-YASUDA, Maria Aparecida; MENDES, Rinaldo Pôncio; COLOMBO, Arnaldo Lopes; *et al.* II Consenso Brasileiro em Paracoccidioidomicose - 2017*. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brazil, v. 27, n. esp, 2018. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/ress/v27nspe/2237-9622-ress-27-esp-e0500001.pdf>. Acesso em: 30 de mar. 2023

SILVA NETO, Benedito Rodrigues; ZAMBUZZI, Fernanda; BAILÃO, Alexandre Melo; *et al.* Transcriptional profile of *Paracoccidioides* spp. in response to itraconazole. **BMC Genomics**, UK, London, v. 15, n. 1, 2014.

SILVA, C L; FIGUEIREDO, F. Tumor Necrosis Factor in Paracoccidioidomycosis Patients. **The Journal of Infectious Diseases**, USA, Chicago, IL, v. 164, n. 5, p. 1033–1034, 1991.

SIQUEIRA, Isaque Medeiros; FRAGA, Falcomer; AMARAL, André Correa; *et al.* Distinct patterns of yeast cell morphology and host responses induced by representative strains of *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) and *Paracoccidioides*

lutzii (Pb01). **Medical Mycology**, USA, Cary, NC, v. 54, n. 2, p. 177–188, 2015.

STEVENS, David A; BRUMMER, Elmer; MCEWEN, Juan G; *et al.* Comparison of Fluconazole and Ketoconazole in Experimental Murine Blastomycosis. **Clinical Infectious Diseases**, USA, Chicago, IL, v. 12, n. Supplement_3, p. S304–S306, 1990.

STOVER, E P; SCHÄR, G; CLEMONS, K V; *et al.* Estradiol-binding proteins from mycelial and yeast-form cultures of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infection and Immunity**, USA, Washington, DC, v. 51, n. 1, p. 199–203, 1986.

SZLISZKA, Ewelina; MERTAS, Anna; CZUBA, Zenon P.; *et al.* Inhibition of Inflammatory Response by Artepillin C in Activated RAW264.7 Macrophages. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, USA, New York, NY, v. 2013, p. 1–11, 2013.

TAVARES, Aldo Henrique; MAGALHÃES, Kelly Grace; ALMEIDA, Raquel Das Neves; *et al.* NLRP3 Inflammasome Activation by *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, USA, San Francisco, CA, v. 7, n. 12, p. e2595, 2013.

TEIXEIRA, Marcus de Melo; THEODORO, Raquel Cordeiro; OLIVEIRA, Fabiana Freire Mendes de; *et al.* *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. **Medical Mycology**, Brazil, v. 52, n. 1, p. 19–28, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23768243/>. Acesso em: 28 de jan. 2024

TEIXEIRA, Marcus Zulian; THEODORO, Raquel Cordeiro; HELENA, Maria; *et al.* Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, USA, New York, NY, v. 52, n. 2, p. 273–283, 2009.

TEIXEIRA, Marcus Zulian; THEODORO, Raquel Cordeiro; NIÑO-VEGA, Gustavo; *et al.* *Paracoccidioides* Species Complex: Ecology, Phylogeny, Sexual Reproduction, and Virulence. **PLoS Pathogens**, USA, San Francisco, CA, v. 10, n. 10, p. e1004397–e1004397, 2014.

THEODORO, Raquel Cordeiro; TEIXEIRA, Marcus de Melo; FELIPE, Maria Sueli Soares; *et al.* Genus *Paracoccidioides*: Species Recognition and Biogeographic Aspects. **PLoS ONE**, USA, San Francisco, CA, v. 7, n. 5, p. e37694, 2012.

TOLEDO, Gustavo Lopes; MARZOLA, Clóvis; TOLEDO FILHO, João Lopes; *et al.* Blastomicose sul americana – apresentação de caso clínico tratado com associação de inidazóis sistêmico e tópico. **Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial**, USA, New York, NY, v. 52, n. 2, p. 83–88, 2011.

TRINDADE, Janeusa; FIGUEIREDO, Florêncio; FURLANETTO, Alexandra; *et al.* Interferon- γ and Tumor Necrosis Factor- α Determine Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in Mice. **The American Journal of Pathology**, USA, New York, NY, v. 156, n. 5, p. 1811–1820, 2000.

TRISTÃO, F. S. M.; PANAGIO, L A; ROCHA, F A; *et al.* B Cell-Deficient Mice Display Enhanced Susceptibility to *Paracoccidioides brasiliensis* Infection. **Mycopathologia**, USA, New York, NY, v. 176, n. 1-2, p. 1–10, 2013.

TRISTÃO, Fabrine; ROCHA, Fernanda Agostini; CARLOS, Daniela; *et al.* Th17-Inducing Cytokines IL-6 and IL-23 Are Crucial for Granuloma Formation during Experimental Paracoccidioidomycosis. **Frontiers in Immunology**, USA, New York, NY, v. 8, 2017.

TROKE, Peter F.; ANDREWS, Richard J.; MARRIOTT, Michael S.; *et al.* Efficacy of fluconazole (UK-49,858) against experimental aspergillosis and cryptococcosis in mice. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, UK, Oxford, v. 19, n. 5, p. 663–670, 1987.

TURISSINI, David A.; GOMEZ, Oscar M.; TEIXEIRA, Marcus M.; *et al.* Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. **Fungal Genetics and Biology**, USA, New York, NY, v. 106, p. 9–25, 2017.

VARGAS-MAYA, Naurú Idalia; OLMEDO-MONFIL, Vianey; RAMÍREZ-PRADO, Jorge Humberto; *et al.* Catalases in the pathogenesis of *Sporothrix schenckii* research. **PeerJ**, USA, Corte Madera, CA, v. 10, p. e14478, 2022.

VICENTINI, A. P.; GESZTESI, J. L.; FRANCO, M. F.; *et al.* Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infection and Immunity**, USA, v. 62, n. 4, p. 1465–1469, 1994. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8132354/>. Acesso em: 29 out. 2023.

VUDDHAKUL, V.; MAI, G.T; MCCORMACK, J.G; *et al.* Suppression of neutrophil and lymphoproliferative responses *In vitro* by itraconazole but not fluconazole. **International journal of immunopharmacology**, USA, New York, NY, v. 12, n. 6, p. 639–645, 1990.

WHEAT, J; MARICHAL, P; VANDEN BOSSCHE, H; *et al.* Hypothesis on the mechanism of resistance to fluconazole in *Histoplasma capsulatum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, USA, Washington, DC, v. 41, n. 2, p. 410–414, 1997.

YARZÁBAL, L.A. Anticuerpos precipitantes específicos de la blastomicosis sudamericana revelados por inmunoelectroforesis. **Rev. Inst. Med. Trop.**, USA, Philadelphia, PA, v. 13, n. 5, 1971.

ZERVOS, E E; FINK, G W; NORMAN, J G; *et al.* Fluconazole Increases Bactericidal Activity of Neutrophils through Non-Cytokine-Mediated Pathway. **Journal of Trauma and Acute Care Surgery**, USA, Philadelphia, PA, v. 41, n. 3, p. 465–470, 1996.

ZERVOS, Mark; MEUNIER, Françoise. Fluconazole (Diflucan®): a review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, USA, New York, NY, v. 3, n. 3, p. 147–170, 1993.

ANEXOS

Nesta seção, será anexado documentos relacionados a regularização do uso de animais na pesquisa, por meio do Comitê de Ética no Uso de Animais, da Universidade Federal de Alfenas. Além disso, a apresentação de materiais suplementares do projeto.

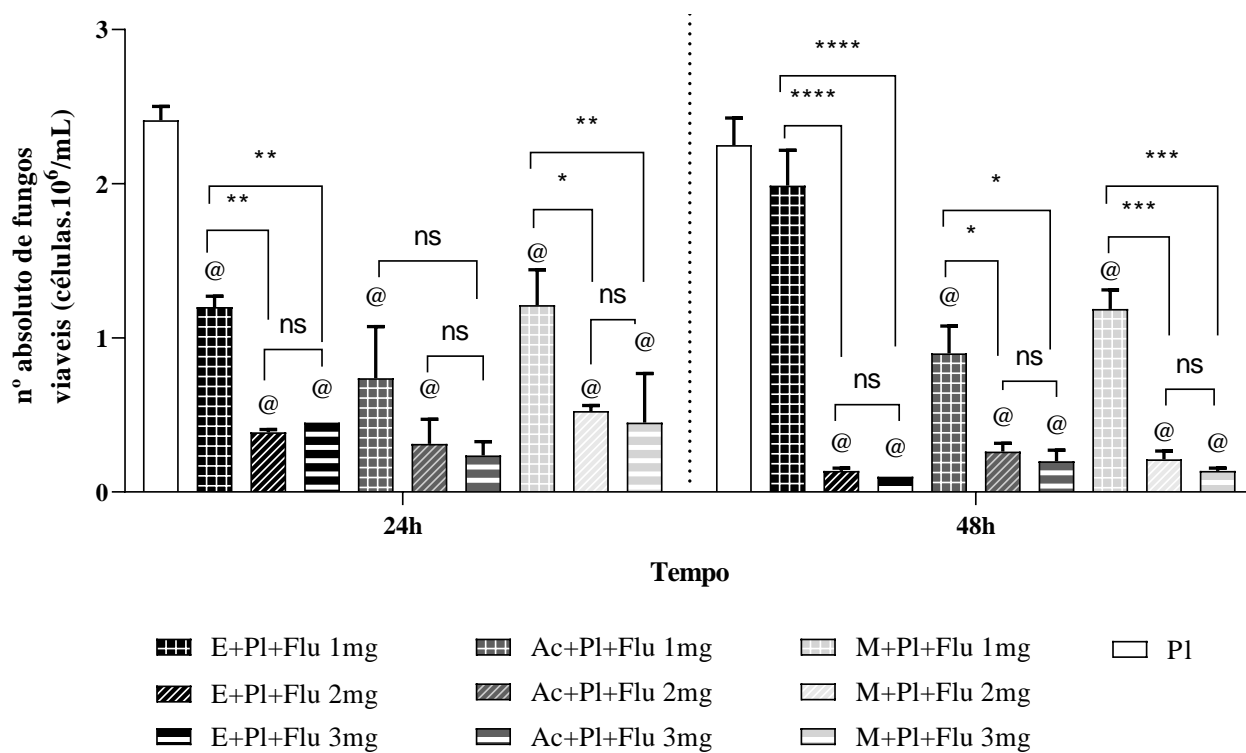
10 Certificado de Aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais da UNIFAL (CEUA)

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG <small>Lei nº 11.154, de 29 de julho de 2005</small>														
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIFAL-MG														
<h1>Certificado</h1>														
<p>Certificamos que a proposta intitulada Determinação do efeito antifúngico do fluconazol utilizando o modelo experimental murino da paracoccidiodomicose, registrada com o nº 0029/2023, sob a responsabilidade de Eva Burger, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, com vigência de 29/09/2023 a 30/04/2025, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.</p>														
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Espécie/linhagem/raça</th> <th>Total de animais</th> <th>Total de machos</th> <th>Total de fêmeas</th> <th>Origem</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Camundongo / Swiss</td> <td>50</td> <td>0</td> <td>50</td> <td>Biotério central da universidade federal de alfenas</td> </tr> </tbody> </table>	Espécie/linhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem	Camundongo / Swiss	50	0	50	Biotério central da universidade federal de alfenas				
Espécie/linhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem										
Camundongo / Swiss	50	0	50	Biotério central da universidade federal de alfenas										
Alfenas, 18 de Setembro de 2023														
Prof(a). Dr(a). Lisandra Brandino de Oliveira Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG														
<small>Para verificar autenticidade acesse: http://sistemas.unifal-mg.edu.br/pp/ceua/autenticidadecertificado/ e digite a chave: 61981523540800154444707175851</small>														

11 Material suplementar

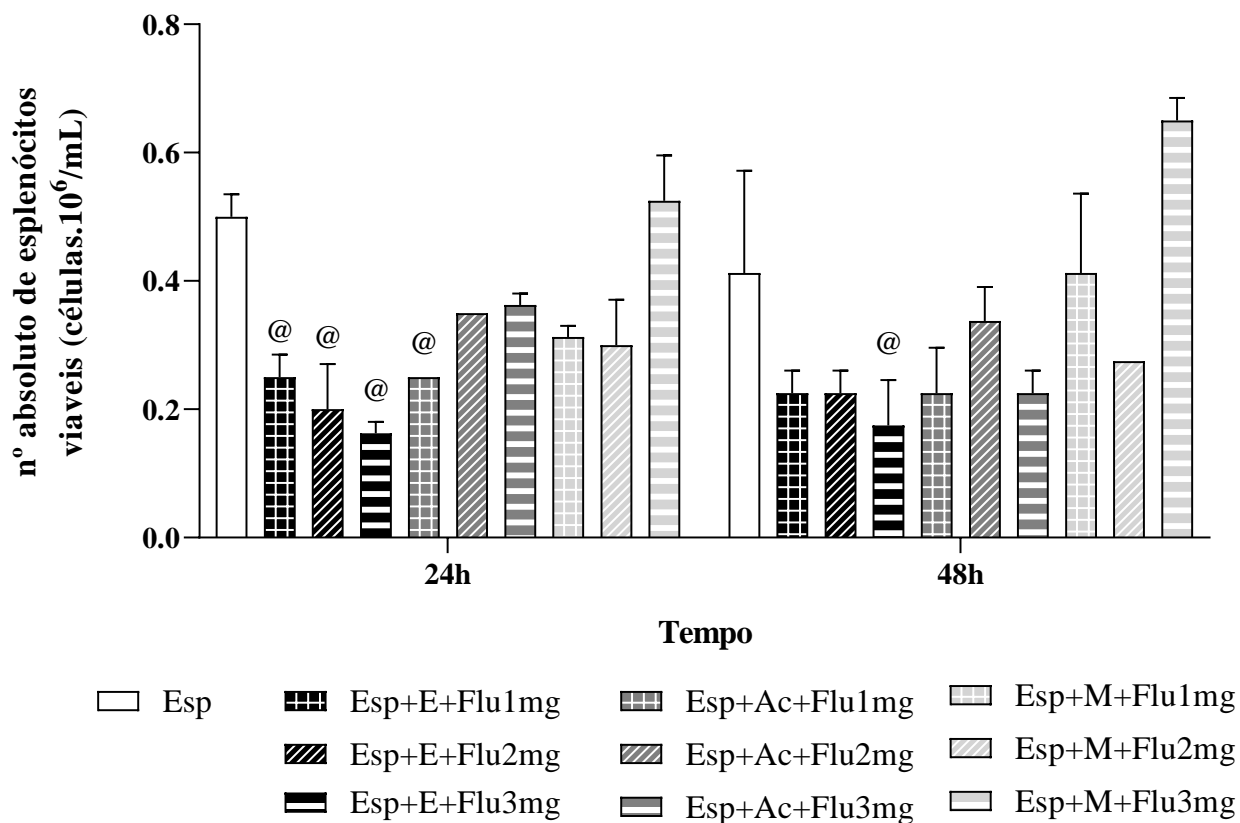
Para determinação do melhor diluente para o antifúngico Fluconazol, nos experimentos *in vitro*, as três doses testadas foram diluídas nos três diluentes recomendados pelo fabricante do fármaco. Dessa maneira os testes de citotoxicidade frente *Paracoccidoides lutzii* e células esplênicas foram realizados com as concentrações em cada diluente.

Figura 26: Cinética do número absoluto de células fúngicas viáveis tratadas com Fluconazol diluído em álcool etílico (PI+E+FLC 1mg/mL) (PI+E+FLC 2mg/mL) (PI+E+FLC 3mg/mL), propanona (PI+Ac+FLC 1mg/mL) (PI+Ac+FLC 2mg/mL) (PI+Ac+FLC 3mg/mL) e álcool metílico (PI+Met+FLC 1mg/mL) (PI+Met+FLC 2mg/mL) (PI+Met+FLC 3mg/mL), respectivamente.



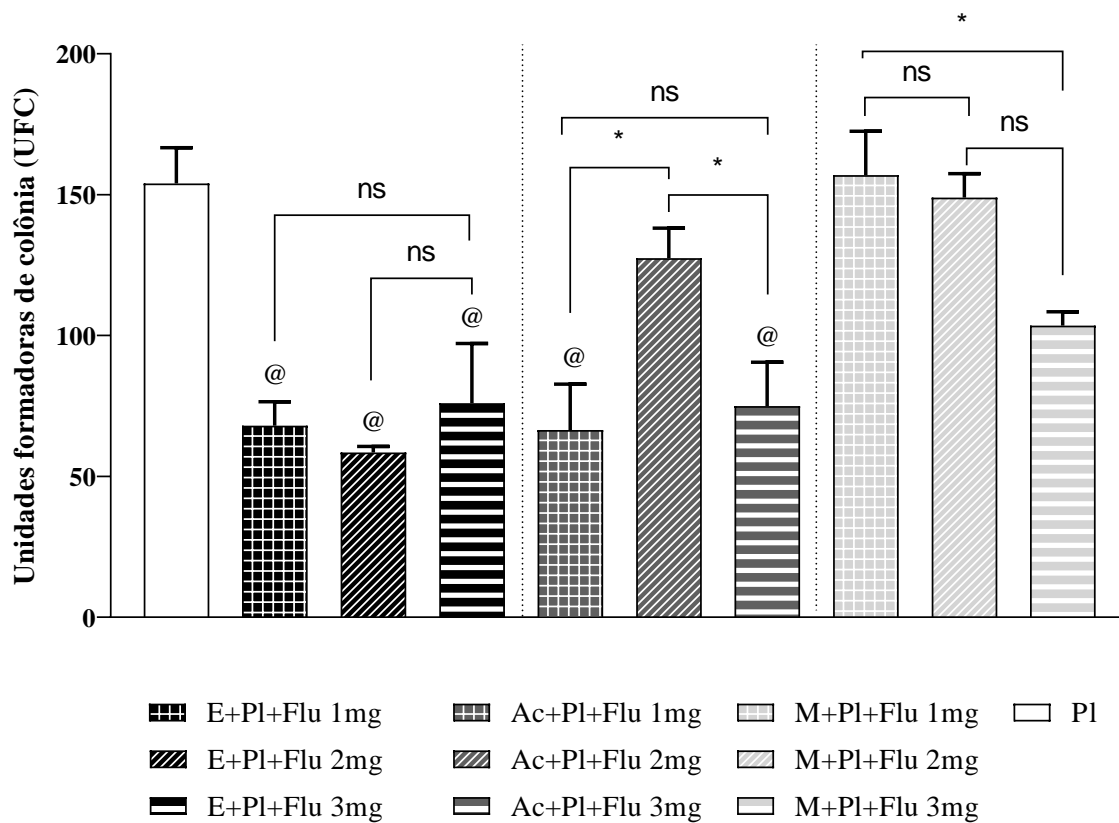
Fonte: do autor (2024)

Figura 27: Número de esplenócitos viáveis após tratamento com Fluconazol diluído em álcool etílico (PI+E+FLC 1mg/mL) (PI+E+FLC 2mg/mL) (PI+E+FLC 3mg/mL), propanona (PI+Ac+FLC 1mg/mL) (PI+Ac+FLC 2mg/mL) (PI+Ac+FLC 3mg/mL) e álcool metílico (PI+Met+FLC 1mg/mL) (PI+ Met+FLC 2mg/mL) (PI+Met+FLC 3mg/mL), respectivamente.



Fonte: do autor (2024)

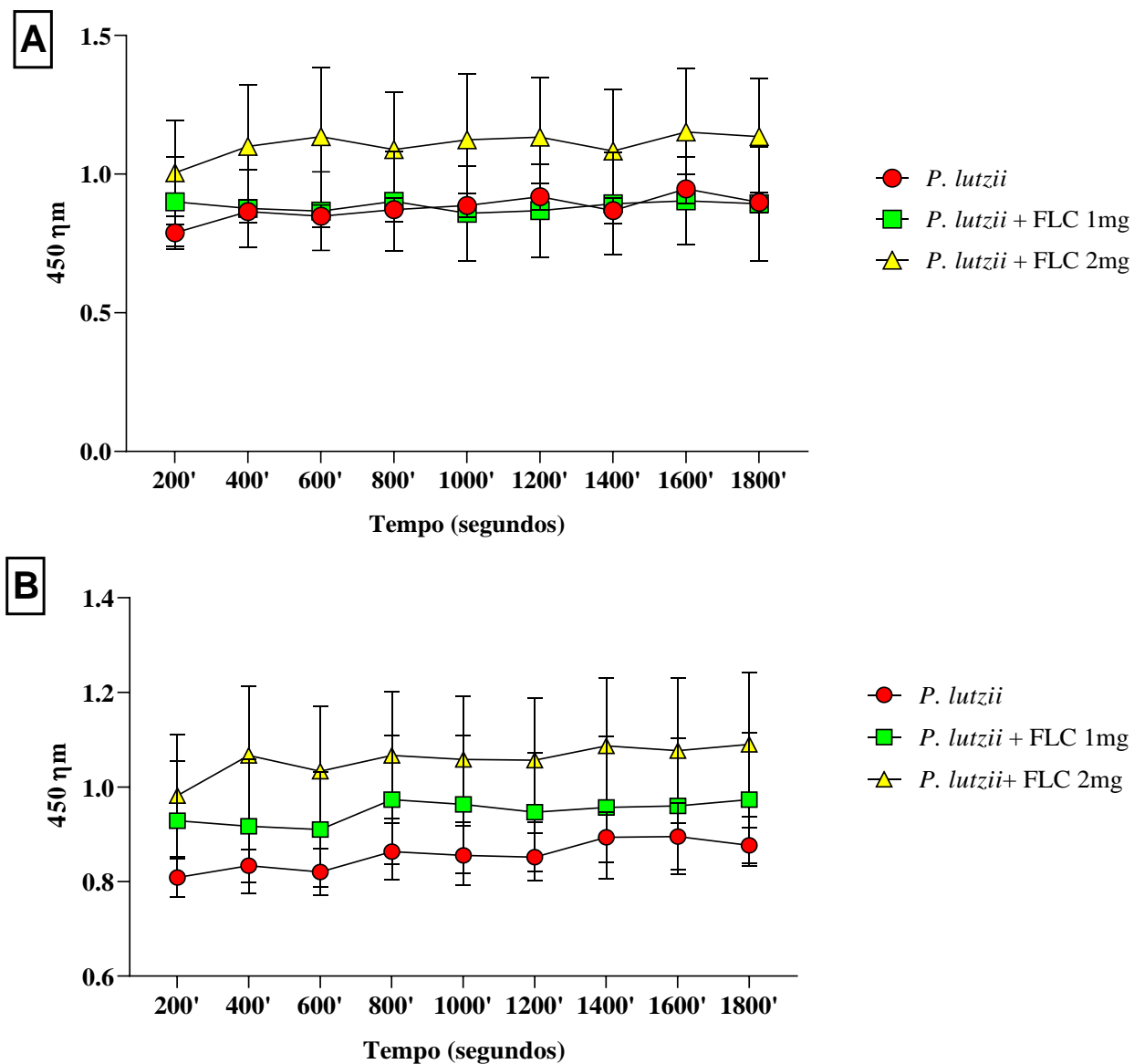
Figura 28: Unidades formadoras de colônias (UFC) de *P. lutzii* após tratamento com Fluconazol diluído em álcool etílico (PI+E+FLC 1mg/mL) (PI+E+FLC 2mg/mL) (PI+E+FLC 3mg/mL), propanona (PI+Ac+FLC 1mg/mL) (PI+Ac+FLC 2mg/mL) (PI+Ac+FLC 3mg/mL) e álcool metílico (PI+Met+FLC 1mg/mL) (PI+Met+FLC 2mg/mL) (PI+Met+FLC 3mg/mL), respectivamente.



Fonte: do autor (2024)

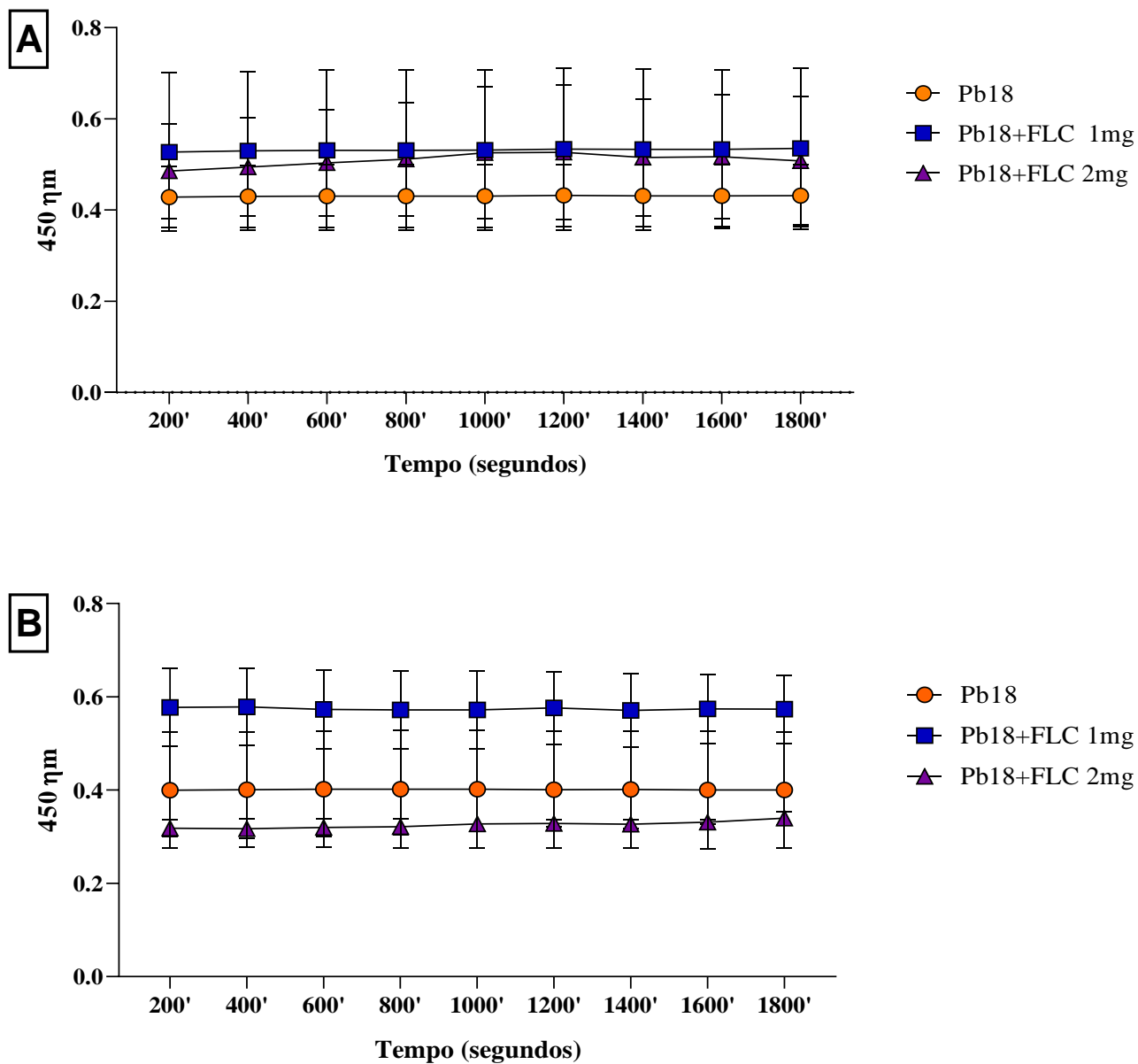
Tendo vista que as espécies reativas de oxigênio (EROs) são representadas como uma curva, foram plotados gráficos para cada um dos tempos analisados nas células obtidas na air pouch: 2, 6 e 18h

Figura 29: Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) pelas células obtidas da *air pouch* de animais infectados com *P. lutzii* e tratados com as doses de Fluconazol no tempo de 6 horas (A) e 18 horas (B).



Fonte: do autor (2024)

Figura 30: Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) pelas células obtidas da *air pouch* de animais infectados com Pb18 e tratados com as doses de Fluconazol no tempo de 6 horas (A) e 18 horas (B).



Fonte: do autor (2024)

12 Certificados de participação em eventos



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG
PRÓ-REITORIA DE EXTENSÃO E CULTURA
CNPJ 17.879.859/0001-15



Certificado

Certificamos que o trabalho **ATIVIDADE DO FLUCONAZOL IN VITRO SOBRE ESLENÓCITOS E PARACOCCIDIOIDES LUTZII**, de autoria de THAYANA DUTRA DE ANDRADE, JULIA PRADO BORELLI, LAUANA APARECIDA SANTOS, JÚLIA DE CASTRO DUTRA, CLEYDSON FINOTTI CORDEIRO, DIOGO TEIXEIRA CARVALHO e EVA BURGER, foi apresentado na forma de pôster, no I **Simpósio Integrado PPGCF e PPGASFAR/UNIFAL-MG - Responsabilidade social da pós-graduação**, realizado no período de 22 a 24 de fevereiro de 2024.

Alfenas, 12 de abril de 2024



PRÓ-REITORIA DE EXTENSÃO E CULTURA

Certificado número
20240000006831000163
<https://sistemas.unifal-mg.edu.br/app/caex/certificados/>



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG
PRÓ-REITORIA DE EXTENSÃO E CULTURA
CNPJ 17.879.859/0001-15



Certificado

Certificamos que o Trabalho **AVALIAÇÃO IN VITRO DO EFEITO DE FLUCONAZOL SOBRE CÉLULAS ESPLÊNICAS E PARACOCCIDIOIDES LUTZII**, de autoria de THAYANA DUTRA DE ANDRADE, LAUANA APARECIDA SANTOS, JÚLIA DE CASTRO DUTRA, ENRICO PICOLI MARINHO, OTAVIO AUGUSTO CARLETTO, CLEYDSON FINOTTI CORDEIRO, DIOGO TEIXEIRA CARVALHO e EVA BURGER, foi apresentado na forma de painel, no(a) **VIII Jornada da Biologia (JOBIO) e VIII Workshop do PPGCB**, realizado(a) no período de 28 a 30 de novembro de 2023.

Alfenas, 14 de março de 2024.



PRÓ-REITORIA DE EXTENSÃO E CULTURA

Certificado número
202300000006779000288
<https://sistemas.unifal-mg.edu.br/app/caex/certificados/>



Universidade do Oeste de Santa Catarina^{UNO}

(Credenciada Decreto Presidencial de 14/09/1996 (DOU 18/09/1996); Reconhecida Portaria n. 1.304 de 19/12/2018 (DOU 20/12/2018, seção 1, pág. 128))
(Reconhecida para oferta de cursos na modalidade a distância pelo Portaria n. 1.096 de 17/12/2001 (DOU: 05/12/2001, seção 1, página 176))

DECLARAÇÃO

Declaramos, para os devidos fins, que **Thayana Dutra de Andrade, Lauana Aparecida Santos, Julia de Castro Dutra, Otávio Augusto Carletto, Cleudson F. Cordeiro, Diogo Teixeira Carvalho e Eva Burger** apresentaram o trabalho intitulado: "EFEITO DO ANTIFÚNGICO FLUCONAZOL in vitro SOBRE *Paracoccidioides lutzi*" no **II Congresso Brasileiro em Biociências Aplicadas à Saúde - II CBBAS**, promovido pela Área das Ciências da Vida e Saúde da Universidade do Oeste de Santa Catarina - Unoesc, Campus de Joaçaba, de 26 a 27 de outubro de 2023.

Por ser verdade, firmamos a presente declaração.

Joaçaba, 09 de fevereiro de 2024.

KURT
SCHNEIDER:0188290
5911

Assinado de forma digital por
KURT SCHNEIDER:01882905911
Dados: 2024.02.27 10:06:52
-03'00"

Kurt Schneider
Pró-Reitor de Pesquisa, Pós-graduação, Extensão
e Inovação



22 a 25
setembro 2024

Certificamos que o trabalho intitulado

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DO FLUCONAZOL SOBRE NEUTRÓFILOS POLIMORFONUCLEARES NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE

de autoria de **Thayana Dutra de Andrade, Lauana Aparecida Santos, Julia Castro Dutra, Otavio Augusto Carletto, Diogo Teixeira de Carvalho, Cleydson Finotti Cordeiro, Eva Burger** foi apresentado por **Thayana Dutra de Andrade, Lauana Aparecida Santos, Eva Burger** no **59º MEDTROP - Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, realizado no Centro de Convenções Rebouças, de 22 a 25 de setembro de 2024, na forma de apresentação **E-pôster**.

São Paulo, 25 de setembro de 2024.

Para verificar a autenticidade deste certificado acesse: validacertificados.iweventos.com.br e use o código: a8f6247216


Prof. Dr. Marcus Vinicius Lacerda
Coordenador da Comissão Científica


Profa. Dra. Hiro Goto
Presidente da MEDTROP 2024


Rosália Moraes Torres
Presidente SBMT

Reuniões Satélites



Realização



22 a 25
setembro 2024

Certificamos que o trabalho intitulado

FLUCONAZOL NA TERAPÊUTICA PARA PCM: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA IN VITRO E CITOTOXICIDADE SOBRE ESPLÊNOCITOS

de autoria de **Thayana Dutra de Andrade, Julia Castro Dutra, Otavio Augusto Carletto, Diogo Teixeira de Carvalho, Cleydson Finotti Cordeiro, Eva Burger** foi apresentado por **Thayana Dutra de Andrade, Eva Burger** no **59º MEDTROP - Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, realizado no Centro de Convenções Rebouças, de 22 a 25 de setembro de 2024, na forma de apresentação **E-pôster**.

São Paulo, 25 de setembro de 2024.

Para verificar a autenticidade deste certificado acesse: validacertificados.iweventos.com.br e use o código: bd1f6815ab


Prof. Dr. Marcus Vinicius Lacerda
Coordenador da Comissão Científica


Profa. Dra. Hiro Goto
Presidente da MEDTROP 2024


Rosália Moraes Torres
Presidente SBMT

Reuniões Satélites



Realização



CERTIFICADO

CERTIFICADO



ALACI
LATIN AMERICAN AND CARIBBEAN
ASSOCIATION OF IMMUNOLOGY



14th Latin American and Caribbean Congress of Immunology

This certifies that the work entitled

Changes in cellular profile and in IL-4 and IFN-gamma levels induced by different doses of fluconazole in a murine model of paracoccidioidomycosis

EVA BURGER (University Federal of Aifenas), Thayana Dutra de Andrade (University Federal of Aifenas), Lauana Aparecida Santos (University Federal of Aifenas), Clejdon Finotti Cordeiro (University Federal of Aifenas), Dilog Teixeira Carvalho (University Federal of Aifenas)

has been presented in poster format at the 14th Latin American and Caribbean Congress of Immunology, held in Buenos Aires, Argentina, from November 4-8, 2024.

Martin Rumbo
SAI President

Emilio Malchiodi
ALACI President

Liliana Bezrodnik
AINCA President



Certificado

Certificamos que EVA BURGER (CPF nº 861.227.548-20) apresentou, na modalidade banner, o trabalho intitulado "*DIFFERENT TYPES OF PROPOLIS IMMUNOMODULATE NEUTROPHILRESPONSES AND HAVE ANTIMICROBIAL EFFECTS ON Paracoccidioides brasiliensis*", elaborado com a participação de Lauana Aparecida Santos, Julia de Castro Dutra, Thayana Dutra de Andrade, Enrico Picoli Marinho, Masaharu Ikegaki, Rinaldo Poncio Mendes, na Ação de Extensão **International Conference on Paracoccidioidomycosis: Challenges & Milestones in the 21st Century**, realizada pelo/a Faculdade de Medicina da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, no período de 10/12/2024 a 13/12/2024.

James Venturini
Coordenador da Ação

Marcelo Luiz Brandao Vilela
Diretor - Faculdade de Medicina



Certificado assinado eletronicamente. A autenticidade pode ser conferida em <https://certificados.ufms.br/validar> informando o código: **8807b0f5-0a6d-48af-ae7b-28318f932a3**

Emitted em: 23/12/2024 10:11:45



Certificado

Certificamos que EVA BURGER (CPF nº 861.227.548-20) apresentou, na modalidade banner, o trabalho intitulado "*IMMUNOMODULATORY AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF FLUCONAZOLE IN P. lutzii AND P. brasiliensis INFECTIONS*", elaborado com a participação de Thayana Dutra de Andrade, Lauana Aparecida Santos, Diogo Teixeira Carvalho, Cleydson Finotti Cordeiro, Eva Burger, na Ação de Extensão **International Conference on Paracoccidioidomycosis: Challenges & Milestones in the 21st Century**, realizada pelo/a Faculdade de Medicina da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, no período de 10/12/2024 a 13/12/2024.

James Venturini
Coordenador da Ação

Marcelo Luiz Brandao Vilela
Diretor - Faculdade de Medicina



Certificado assinado eletronicamente. A autenticidade pode ser conferida em <https://certificados.ufms.br/validar> informando o código: **a670e3a6-e140-461d-b80d-c837223c20ba**

Emitted em: 23/12/2024 10:27:15

