

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**LAUANA APARECIDA SANTOS**

**INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM ANTIFÚNGICO E ANTIINFLAMATÓRIO  
NA RESPOSTA GRANULOMATOSA DA PARACOCCIDIOMICOSE  
EXPERIMENTAL MURINO: PESQUISA DE ANTICORPOS E CITOCINAS**

Alfenas/MG

2022

**LAUANA APARECIDA SANTOS**

**INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM ANTIFÚNGICO E ANTIINFLAMATÓRIO  
NA RESPOSTA GRANULOMATOSA DA PARACOCCIDIOMICOSE  
EXPERIMENTAL MURINO: PESQUISA DE ANTICORPOS E CITOCINAS**

Tese, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), como parte das exigências para defesa de Doutorado. Área de concentração: Atividade Biológica de Produtos de Interesse Farmacêutico.

Orientador: Profa. Dra. Eva Burger

Co-Orientador: Profa. Dra. Fernanda Borges de Araújo Paula

Alfenas/MG

2022

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas Biblioteca Central

Santos, Lauana Aparecida.

Influência do tratamento com antifúngico e antiinflamatório na resposta granulomatosa da paracoccidiodomicose experimental murino: pesquisa de anticorpos e citocinas / Lauana Aparecida Santos. - Alfenas, MG, 2022.

218 f. : il. -

Orientador(a): Eva Burger.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2022.

Bibliografia.

1. *Paracoccidioides brasiliensis*. 2. Itraconazol. 3. Celecoxibe. 4. Granulomas. I. Burger, Eva , orient. II. Título.

LAUANA APARECIDA SANTOS

**“INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM ANTIFÚNGICO E ANTIINFLAMATÓRIO NA RESPOSTA GRANULOMATOSA DA PARACOCCIDIOMICOSE EXPERIMENTAL MURINO: PESQUISA DE ANTICORPOS E CITOCINAS”**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Aprovada em: 29 de junho de 2022

Profa. Dra. Eva Burger  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Rinaldo Poncio Mendes  
Instituição: Universidade Estadual Paulista

Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Amanda Latercia Tranches Dias  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Tatiana Teixeira de Miranda  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Eva Burger, Professor do Magistério Superior**, em 29/06/2022, às 16:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Felipe Leomil Coelho, Professor do Magistério Superior**, em 29/06/2022, às 17:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tatiana Teixeira de Miranda, Professor do Magistério Superior**, em 30/06/2022, às 09:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Amanda Latércia Tranches Dias, Professor do Magistério Superior**, em 30/06/2022, às 09:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rinaldo Poncio Mendes, Usuário Externo**, em 01/07/2022, às 08:55, 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](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0763711** e o código CRC **597059FB**.



## ERRATA

SANTOS, Lauana Aparecida. **Influência do tratamento com antifúngico e antiinflamatório na resposta granulomatosa da paracoccidiodomicose experimental murino: pesquisa de anticorpos e citocinas.** 2022. 215 folhas. Tese de doutorado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas-MG, 29 de junho de 2022.

Dedico ao meu marido **Jean Paulo**  
(futuro pai dos meus filhos) e a  
**Roberto, Walquiria e Bruno**. Vocês  
sempre me estimularam e apoiaram  
nos momentos bons e ruins e  
ajudando a obter mais uma conquista.  
Está é para vocês

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, meu agradecimento maior, pela minha profissão, pela liberdade de pensar, querer, crescer e optar. Agradeço por não ter me livrado muitas vezes do perigo, mas por ter-me ensinado a enfrentá-lo sem temor.

A Nossa Senhora pela intercessão e por estar na frente em todos os caminhos.

Ao meu namorado/noivo/ marido, **Jean Paulo** pelo amor, apoio, confiança, incentivo e orações.

Aos meus pais, **Roberto e Walquiria**, ao meu irmão, **Bruno Roberto**, pelo amor, apoio, confiança, incentivo e orações.

À Universidade Federal de Alfenas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas por oferecer a oportunidade de adquirir novos conhecimentos.

A minha querida professora orientadora/orientatriz/mãe **Dra. Eva Burger** pela paciência, confiança, ensinamentos e disponibilidade em trocar informações essenciais para a realização deste trabalho, também na vida, ah na vida! Estes foram os maiores ensinamentos. Um dia conseguirei ser um pouquinho do que foi comigo com meus queridos futuros orientandos! Admiro pela profissional e notável pesquisadora que és... E agradeço-lhe pela oportunidade e privilégio de ter sido sua orientanda e ter realizado este trabalho.

A minha co-orientadora professora **Dra. Fernanda Borges de Araújo Paula** por sua disponibilidade em compartilhar informações e dedicar seu tempo na formação de novos profissionais.

Ao professor **Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias** por sua sempre disponibilidade em ensinar, compartilhar informações e dedicar seu tempo na formação de novos profissionais.

Ao querido professor **Dr. Kleber Chavasco** (in memória), você nos faz muita falta na microbiologia. Muito obrigada por me permitir trabalhar com você e aprender a ter o carisma ainda mais pela microbiologia.

Ao professor **Dr. Adriano Macedo de Oliveira** que sempre foi e será meu exemplo de profissional da patologia, com todo cuidado me guiou na patologia. E se hoje sei um pouquinho, foi você que me permitiu aprender. Um dia conseguirei ter esta expertise da patologia. OLHOS DE ÁGUIA.

Aos meus amigos do **Laboratório de Patologia SVO**, muito obrigado pela parceria de sempre. Vocês é minha segunda família que Deus me deu.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Imunopatologia das Micoses da UNIFAL **Julianne, Bruno, Nayara, Vitor, Enrico e Júlia** pelo amável convívio e ajuda na realização desta tese, ela também é de vocês!

Aos meus colegas de doutorado e mestrado por compartilharem suas experiências.

A todos os professores do **Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas** da UNIFAL-MG, muito obrigada por me ensinarem à arte de ensinar! Agradeço por todas as aulas ministradas e por todas as experiências compartilhadas, as quais acrescentaram muito na minha formação.

À **Coordenação e Secretaria do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas**, obrigada pela prontidão e eficiência com que sempre me atenderam. Obrigada por lutarem para o crescimento deste Programa de Pós-graduação.

Aos funcionários do **Laboratório de Microbiologia** da UNIFAL-MG agradeço pelo carinho e atenção com que sempre me trataram. Muito obrigada!

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (001)**, pela concessão da bolsa de estudo, permitindo-me dedicar com afinco ao doutorado e à realização deste trabalho.

Estendo os meus agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Esta conquista é nossa! E que venham novos sonhos...

“Aquilo que está escrito no coração não necessita de agendas porque a gente não esquece. O que a memória ama fica eterno”.

(Rubem Alves, 1992)

## RESUMO

O agente etiológico da paracoccidiodomicose (PCM) é o fungo termo-dimórfico *Paracoccidioides* spp. (Pb). A PCM é uma micose sistêmica de maior prevalência no Brasil. Acomete principalmente indivíduos do sexo masculino que podem estar ligados com o exercício de atividades rurais. Para compreender a interação deste fungo com o hospedeiro estudos utilizaram o modelo experimental murino e foi possível classificar diversas linhagens de camundongos infectados com Pb e os mecanismos que estão envolvidos na resposta imune inflamatória granulomatosa. Vale ressaltar que, a presença de granulomas caracteriza esta micose. A expressão de citocinas e presença de anticorpos de vários isótipos nos locais de lesões granulomatosas ainda são pouco estudadas. Portanto, neste estudo, visou verificar a influência do tratamento através do estudo estereológico, pesquisa de anticorpos específicos dos isótipos IgM, IgG, IgG1a, IgG2a, IgG2b, citocinas IL17, KC (IL8) e GM-CSF em granulomas paracoccidiodomicóticos presentes nos órgãos de camundongos infectados com *P. brasiliensis* e tratados e não tratados com Itraconazol (antifúngico) e Celecoxibe (anti-inflamatório). Para isto, foi considerado ainda que, os tratamentos disponíveis são limitados nos dias atuais e o estudo de novas alternativas pode auxiliar a compreensão dos mecanismos de defesa e os processos inflamatórios agudos ou crônicos atuantes na PCM. Sendo assim, foram utilizados camundongos suíços infectados com a cepa virulenta Pb18 do *P. brasiliensis*. Realizou-se a necropsia e coletados baço, omento, fígado e pulmões e realizaram-se análises histológicas para verificar a arquitetura, celularidade, presença de leveduras do *P. brasiliensis* nas lesões granulomatosas e o remodelamento morfológico pelo método estereológico. Além disso, fez a imunolocalização de IgM, IgG, IL-17 e GM-CSF por imuno-histoquímica no omento dos animais infectados e infectados e tratados. Os resultados demonstraram que os animais que receberam tratamentos combinados tiveram menores lesões histológicas e apresentaram melhores padrões histológicos, peso, sobrevida, hipersensibilidade, produção de anticorpos, citocinas e menor número de fungos viáveis. Além disso, os resultados de imunohistoquímica mostraram que houve uma forte marcação para a presença de IgM, IgG, IL-17 e GM-CSF em diferentes estágios da infecção. A partir destes resultados, pode concluir que o tratamento combinado apresentou resultados satisfatórios tanto na fase inicial quanto tardia desta doença. Sugerindo que esta combinação terapêutica reduz a resposta inflamatória intensa nos pacientes e poderá ser utilizada como uma possível estratégia nova de tratamento.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*; Itraconazol; Celecoxibe; Granulomas.

## ABSTRACT

The etiologic agent of paracoccidioidomycosis (PCM) is the thermo-dimorphic fungus *Paracoccidioides* spp. (Pb). PCM is a systemic mycosis with the highest prevalence in Brazil. It mainly affects male individuals who may be linked to the exercise of rural activities. To understand the interaction of this fungus with the host, studies used the murine experimental model and it was possible to classify several strains of mice infected with Pb and the mechanisms that are involved in the granulomatous inflammatory immune response. It is worth mentioning that the presence of granulomas characterizes this ringworm. The expression of cytokines and the presence of antibodies of various isotypes at the sites of granulomatous lesions is still poorly studied. Therefore, this study aimed to verify the influence of treatment through the stereological study, the search for specific antibodies of the IgM, IgG, IgG1a, IgG2a, IgG2b, cytokines IL17, KC (IL8) and GM-CSF in paracoccidioidomycotic granulomas present in the organs of mice infected with *P. brasiliensis* and treated and not treated with Itraconazole (antifungal) and Celecoxib (anti-inflammatory). For this, it was also considered that the treatments available are limited nowadays and the study of new alternatives can help the understanding of the defense mechanisms and the acute or chronic inflammatory processes acting in the PCM. Therefore, Swiss mice infected with the virulent strain Pb18 of *P. brasiliensis* were used. The necropsy was performed and the spleen, omentum, liver and lungs were collected and histological analyzes were performed to check the architecture, cellularity, presence of *P. brasiliensis* yeasts in granulomatous lesions and the morphological remodeling by the stereological method. The results showed that the animals that received combined treatments had smaller histological lesions and presented better histological patterns, weight, survival, hypersensitivity, production of antibodies, cytokines and fewer viable fungi. In addition, the results of immunohistochemistry the data show that there was a strong marking for the presence of IgM, IgG, IL-17 and GM-CSF in different stages of the infection. From these results, it can be concluded that the combined treatment showed satisfactory results both in the early and late stages of this disease. Suggesting that this therapeutic combination reduces the intense inflammatory response in patients, it could be used as a possible new treatment strategy.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*; Itraconazole; Celecoxib; Granulomas

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 - Forma leveduriforme de <i>P. brasiliensis</i> isolado Pb18.....  | 20 |
| Figura 2 - Mecanismos de invasão de <i>Paracoccidoides</i> spp.....   | 21 |
| Figura 3 - A resposta imune de <i>P. brasiliensis</i> .....   | 25 |
| Figura 4 - Foto representativa dos testes <i>in vitro</i> realizados com os fármacos Celecoxibe (6 mg/mL) e/ou Itraconazol (3 mg/mL) sobre a cepa Pb 18 de <i>P. brasiliensis</i> . ....  | 43 |
| Figura 5 - Foto representativa do modelo de infecção intraperitoneal realizados com os fármacos Celecoxibe (6 mg/mL) e/ou Itraconazol (3 mg/mL) sobre a cepa Pb 18 de <i>P. brasiliensis</i> . ....   | 19 |
| Figura 6 - Delineamento experimental das análises histopatológicas. ....  | 54 |
| Figura 7 - Cinética do número absoluto de células fúngicas viáveis e unidades formadoras de colônia (CFU) tratadas com Celecoxibe (6 mg/mL) (Pb 18 + C), Itraconazol (3 mg/mL) (Pb 18 + I) e Celecoxibe + Itraconazol (6 mg/mL) (3 mg/mL) (Pb 18 + C + I) respectivamente .....                     | 55 |
| Figura 8 - Cinética do número absoluto de células esplênicas e fúngicas viáveis tratadas com Celecoxibe (6 mg/mL) (Cells + C) (Cells+Pb 18+C), Itraconazol (3 mg/mL) (Cells + I) (Cells+Pb 18+I) e Celecoxibe + Itraconazol (6 mg/mL) (3 mg/mL) (Cells +C+I) (Cells+Pb 18+C+I) respectivamente..... | 56 |
| Figura 9 - Peso corporal dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento e 120 dias de infecção e tratamento. ....  | 57 |
| Figura 10 - Taxa de sobrevivência dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento e 120 dias de infecção e tratamento. ....   | 58 |
| Figura 11 - Teste de hipersensibilidade do tipo tardio dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento e 120 dias de infecção e tratamento. ....  | 59 |
| Figura 12 - Concentração do anticorpo IgM e IgG anti- <i>P. brasiliensis</i> dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento e 120 dias de infecção e tratamento. ....  | 60 |
| Figura 13 - Dosagem da concentração de anticorpos IgG1a, IgG2a e IgG2b anti- <i>P. brasiliensis</i> dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento e 120 dias de infecção e tratamento. ....   | 62 |
| Figura 14 - Perfil celular sanguíneo dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento e 120 dias de infecção e tratamento. ....  | 64 |



|  |    |
|--|----|
| Figura 15 - Concentração de óxido nítrico do sobrenadante de macerado de órgãos dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento e 120 dias de infecção e tratamento..... | 66 |
| Figura 16 - Concentração de IL-12 do sobrenadante de macerado de órgãos dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento e 120 dias de infecção e tratamento.....         | 68 |
| Figura 17 - Concentração de IL-17 do sobrenadante de macerado de órgãos dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento e 120 dias de infecção e tratamento.....         | 70 |
| Figura 18 - Concentração de GM-CSF do sobrenadante de macerado de órgãos dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento e 120 dias de infecção e tratamento.....        | 72 |
| Figura 19 - Concentração de IL-4 do sobrenadante de macerado de órgãos dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento e 120 dias de infecção e tratamento. ....         | 73 |
| Figura 20 - Concentração de KC do sobrenadante de macerado de órgãos dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento e 120 dias de infecção e tratamento. ....           | 75 |
| Figura 21 - Análise histopatológica das lesões granulomatosas em pulmões dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 aos 15 dias de infecção e tratamento .....   | 79 |
| Figura 22 - Análise quanto à presença de fungos em pulmões nos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento. ..   | 80 |
| Figura 23 - Análise histopatológica das lesões granulomatosas no fígado dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 aos 15 dias de infecção e tratamento .....  | 82 |
| Figura 24 - Análise quanto à presença de fungos no fígado nos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento.....   | 83 |
| Figura 25 - Análise histopatológica das lesões granulomatosas no baço dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 aos 15 dias de infecção e tratamento. ....  | 85 |
| Figura 26 - Análise quanto à presença de fungos no baço nos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento.....   | 86 |
| Figura 27 - Análise histopatológica das lesões granulomatosas no omento/pâncreas dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 aos 15 dias de infecção e tratamento.....  | 88 |
| Figura 28 - Análise quanto à presença de fungos no omento/pâncreas nos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento .....   | 89 |
| Figura 29 -Análise da presença das fibras de colágeno do baço dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento. ....  | 92 |

|   |     |
|---|-----|
| Figura 30 - Análise da presença das fibras de colágeno do fígado dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento. ....              | 93  |
| Figura 31 - Análise da presença das fibras de colágeno dos pulmões dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento. ....            | 94  |
| Figura 32 - Análise da presença das fibras de colágeno no omento/pâncreas dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento. ....     | 95  |
| Figura 33 - Análise histopatológica das lesões granulomatosas em pulmões dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 aos 120 dias de infecção e tratamento. ....         | 97  |
| Figura 34 - Análise quanto à presença de fungos nos pulmões nos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 120 dias de infecção e tratamento. ....                  | 98  |
| Figura 35 - Análise histopatológica das lesões granulomatosas no fígado dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 aos 120 dias de infecção e tratamento. ....          | 100 |
| Figura 36 - Análise quanto à presença de fungos no fígado nos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 120 dias de infecção e tratamento.....                     | 101 |
| Figura 37 - Análise histopatológica das lesões granulomatosas no baço dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 aos 120 dias de infecção e tratamento. ....            | 103 |
| Figura 38 - Análise quanto à presença de fungos no baço nos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 120 dias de infecção e tratamento.....                       | 104 |
| Figura 39 - Análise histopatológica das lesões granulomatosas no omento/pâncreas dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 aos 120 dias de infecção e tratamento. .... | 106 |
| Figura 40 - Análise quanto à presença de fungos no omento/pâncreas nos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 120 dias de infecção e tratamento. ....           | 107 |
| Figura 41 - Análise da presença das fibras de colágeno no baço dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 120 dias de infecção e tratamento. ....               | 110 |
| Figura 42 - Análise da presença das fibras de colágeno no fígado dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 120 dias de infecção e tratamento. ....             | 111 |
| Figura 43 - Análise da presença das fibras de colágeno nos pulmões dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 120 dias de infecção e tratamento. ....           | 112 |
| Figura 44 - Análise da presença das fibras de colágeno no omento/pâncreas dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 120 dias de infecção e tratamento. ....    | 113 |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 45 - Análise histológica dos rins dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento.....  | 114 |
| Figura 46 - Análise histológica dos rins dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 120 dias de infecção e tratamento.....   | 115 |
| Figura 47 - Análise quantitativa e imunolocalização da reação de imunohistoquímica para detecção da expressão de IgM no omento/pâncreas dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento. ....    | 117 |
| Figura 48 - Análise quantitativa e imunolocalização da reação de imunohistoquímica para detecção da expressão de IgM no omento/pâncreas dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 120 dias de infecção e tratamento. ....   | 119 |
| Figura 49 - Análise quantitativa e imunolocalização da reação de imunohistoquímica para detecção da expressão de IgG no epíplon/pâncreas dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento. ....   | 121 |
| Figura 50 - Análise quantitativa e imunolocalização da reação de imunohistoquímica para detecção da expressão de IgG no epíplon/pâncreas dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 120 dias de infecção e tratamento.....   | 123 |
| Figura 51 - Análise quantitativa e imunolocalização da reação de imunohistoquímica para detecção da expressão de IL-17 no epíplon/pâncreas dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento.....  | 125 |
| Figura 52 - Análise quantitativa e imunolocalização da reação de imunohistoquímica para detecção da expressão de IL-17 no epíplon/pâncreas dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 120 dias de infecção e tratamento..... | 127 |
| Figura 53 - Análise quantitativa e imunolocalização da reação de imunohistoquímica para detecção da expressão de GMCSF no epíplon/pâncreas dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento.....  | 129 |
| Figura 54 - Análise quantitativa e imunolocalização da reação de imunohistoquímica para detecção da expressão de GMCSF no epíplon/pâncreas dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 120 dias de infecção e tratamento..... | 131 |
| Figura 55 - Perfil inflamatório tecidual de órgãos dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento e 120 dias de infecção e tratamento.....  | 133 |
| Figura 56 - “score” de inflamação tecidual de órgãos dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento e 120 dias de infecção e tratamento.....  | 135 |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 57 - Quantidade de granulomas dos órgãos dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento e 120 dias de infecção e tratamento. ....                      | 137 |
| Figura 58 - Número de células fúngicas viáveis de macerado de órgãos dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento e 120 dias de infecção e tratamento. .... | 140 |

## **LISTA DE QUADROS**

|   |    |
|---|----|
| Quadro 1- Descrição dos grupos de tratamento..... | 35 |
|---|----|

## SUMÁRIO

|          |  |    |
|----------|--|----|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 18 |
| <b>2</b> | <b>RERENCIAL TEÓRICO</b> .....   | 19 |
| 2.1      | <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e Paracoccidioidomicose (PCM).....  | 19 |
| 2.2      | Epidemiologia da PCM e em especial no Brasil .....   | 22 |
| 2.3      | Imunopatologia da paracoccidioidomicose .....  | 22 |
| 2.4      | Participação dos polimornucleares na PCM.....  | 25 |
| 2.5      | Participação de prostaglandinas no processo infeccioso .....   | 26 |
| 2.6      | Mecanismos de evasão do sistema imune pelo o fungo .....   | 26 |
| 2.7      | Modelo experimental da Paracoccidioidomicose .....   | 30 |
| 2.8      | Tratamento utilizado na paracoccidioidomicose .....  | 32 |
| 2.9      | Itraconazol.....   | 33 |
| 2.10     | Celecoxibe.....  | 33 |
| 2.11     | Uso de associação medicamentosa no tratamento de doenças fúngicas.....   | 34 |
| 2.12     | Tratamento imunomodulador e combinação de fármacos na paracoccidioidomicose .....                                  | 36 |
| <b>3</b> | <b>OBJETIVOS</b> .....   | 39 |
| 3.1      | Objetivo geral.....  | 39 |
| 3.2      | Objetivos específicos.....   | 39 |
| <b>4</b> | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....   | 40 |
| 4.1      | Cultivo do fungo e obtenção do inóculo .....   | 40 |
| 4.2      | Celecoxibe e Itraconazol .....   | 40 |
| 4.3      | Atividade <i>in vitro</i> anti- <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .....   | 40 |
| 4.4      | Comitê de ética.....   | 41 |
| 4.5      | Efeito do Itraconazol e Celecoxibe <i>in vitro</i> sobre as culturas de <i>P. brasiliensis</i> e esplenócitos .... | 41 |
| 4.6      | Delineamento experimental dos ensaios <i>in vitro</i> .....  | 43 |
| 4.7      | Delineamento experimental da Infecção intraperitoneal.....   | 19 |
| 4.8      | Animais, inoculação de <i>P. brasiliensis</i> e tratamento.....  | 46 |
| 4.9      | Teste de hipersensibilidade do tipo tardio – HTT .....   | 40 |
| 4.10     | Pesagem corporal dos animais .....   | 40 |

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| 4.11         | Coleta de sangue periférico .....  | 40        |
| 4.12         | Necrópsia, coleta de material e processamento histológico para microscopia.....  | 40        |
| 4.13         | Quantificação de <i>P. brasiliensis</i> viáveis.....   | 41        |
| 4.14         | Dosagem de óxido nítrico .....   | 41        |
| 4.15         | Dosagem de IgG, IgG <sub>1a</sub> , IgG <sub>2a</sub> e IgG <sub>2b</sub> pela técnica de ELISA .....                      | 42        |
| 4.16         | Quantificação de citocinas .....   | 42        |
| 4.17         | Análise histológica das lesões granulomatosas e estereológica .....  | 43        |
| 4.18         | Quantificação do “score” de inflamação e celularidade nos tecidos.....   | 51        |
| 4.19         | Análise imuno-histoquímica para detecção de anticorpos e citocinas nas lesões granulomatosas .....                         | 52        |
| 4.20         | Quantificação da reação de imuno-histoquímica .....  | 53        |
| 4.21         | Análise estatística.....   | 53        |
| 4.22         | Locais de realização experimental e recursos utilizados.....   | 53        |
| 4.23         | Planejamento experimental das análises histológicas .....  | 54        |
| <b>5</b>     | <b>RESULTADOS</b> .....  | <b>55</b> |
| 5.1          | Ensaio <i>in vitro</i> da citotoxicidade dos fármacos Celecoxibe e Itraconazol sobre <i>P. brasiliensis</i> ..55           |           |
| 5.2          | Ensaio <i>in vitro</i> da citotoxicidade dos fármacos (Celecoxibe e Itraconazol) sobre cultura de células esplênicas ..... | 56        |
| 5.3          | Análise da sobrevivência e peso corporal.....  | 50        |
| 5.4          | Resposta imune celular e resposta imune humoral específicas ao <i>P. brasiliensis</i> .....                                | 51        |
| 5.5          | Análise do perfil celular sanguíneo.....   | 62        |
| 5.6          | Dosagem da concentração de óxido nítrico (NO) .....  | 65        |
| 5.7          | Concentração de citocinas.....   | 66        |
| <b>5.7.1</b> | <b>Concentração de IL-12</b> .....   | <b>60</b> |
| <b>5.7.2</b> | <b>Concentração de IL-17</b> .....   | <b>61</b> |
| <b>5.7.3</b> | <b>Concentração de GM-CSF</b> .....  | <b>62</b> |
| <b>5.7.4</b> | <b>Concentração de IL-4</b> .....  | <b>65</b> |
| <b>5.7.5</b> | <b>Concentração de KC (IL-8)</b> .....   | <b>66</b> |
| 5.8          | Análise histológica geral dos órgãos na infecção inicial (15 dias).....  | 68        |
| <b>5.8.1</b> | <b>Análise histopatológica geral dos pulmões dos animais infectados e infectados e tratados</b>                            | <b>68</b> |

|               |   |     |
|---------------|---|-----|
| <b>5.8.2</b>  | <b>Análise histopatológica geral do fígado dos animais infectados e infectados e tratados</b>                                       | 72  |
| <b>5.8.3</b>  | <b>Análise histopatológica geral do baço dos animais infectados e infectados e tratados .</b>                                       | 84  |
| 5.9           | Análise da presença de fibras de colágeno dos animais infectados e infectados e tratados por 15 dias .....                          | 81  |
| 5.10          | Análise histológica geral dos órgãos na infecção tardia (120 dias).....   | 96  |
| <b>5.10.1</b> | <b>Análise histopatológica geral dos pulmões dos animais infectados e infectados e tratados por 120 dias</b> .....                  | 96  |
| <b>5.10.2</b> | <b>Análise histopatológica geral do fígado dos animais infectados e infectados tratados por 120 dias</b> .....                      | 90  |
| <b>5.10.3</b> | <b>Análise histopatológica geral do baço dos animais infectados e infectados e tratados por 120 dias</b> .....                      | 93  |
| <b>5.10.4</b> | <b>Análise histopatológica geral do omento/pâncreas dos animais infectados e infectados e tratados por 120 dias</b> .....           | 96  |
| 5.11          | Análise da presença de fibras de colágeno dos animais infectados e infectados e tratados por 120 dias .....                         | 99  |
| 5.12          | Análise quantitativa e imunomarcção do epíplon/pâncreas dos animais infectados e infectados e tratados por 15 dias e 120 dias ..... | 116 |
| 5.13          | Análise do perfil inflamatório tecidual.....  | 132 |
| 5.14          | Número de granulomas .....  | 136 |
| 5.15          | Número de células fúngicas viáveis .....  | 138 |
| <b>6</b>      | <b>DISCUSSÃO</b> .....  | 142 |
| <b>7</b>      | <b>CONCLUSÕES</b> .....   | 134 |
|               | <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 157 |
|               | <b>MATERIAL SUPLEMENTAR</b> .....   | 162 |
|               | <b>ANEXOS</b> .....   | 169 |



## 1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas vêm apresentando ao longo dos anos elevada incidência. Acometendo indivíduos saudáveis e principalmente imunossuprimidos. Em destaque, a PCM é uma doença fúngica prevalente no Brasil (MARTINEZ, 2015). Esta micose quando estabelecida possui um tratamento longo. A presença de indivíduos assintomáticos pode ser explicada pelo quadro clínico apresentado por pacientes com PCM, pois quando uma resposta imune celular é bem estabelecida acaba se tornando protetora e não há manifestação de sintomas. No entanto, para que ocorra o estabelecimento desta doença vários fatores devem ser considerados como; a virulência do fungo, quimioterapia estabelecida, resposta imunológica do hospedeiro e susceptibilidade (BURGER, 2010). Um dos principais aspectos da fisiopatologia desta doença é o desenvolvimento frequente de resposta inflamatória crônica granulomatosa sendo caracterizada pela presença de diferentes tipos de células e citocinas.

A expressão de citocinas tem sido extensivamente estudada e definido o papel na resposta Th1 e 2. Porém, em relação as envolvidas na resposta Th17 há poucos estudos dedicados na sua compreensão que possa ser aplicado aos aspectos patológicos do granuloma. Assim como, presença de anticorpos nos locais de lesões provocadas pelo fungo. Uma vez que, a presença deles na via sistêmica é utilizada como diagnóstico, mas, no granuloma ainda não há relação com um possível fator de proteção (FORTES *et al.*, 2011; RESTREPO *et al.*, 2011). A evolução do granuloma está relacionada à resposta imune do hospedeiro e aos componentes da parede celular do fungo expressos (FORTES *et al.*, 2011). Considerando, que o tratamento antifúngico e a resposta imunológica do hospedeiro se interagem, qualquer mecanismo que interfira refletirá no sucesso terapêutico. Desse modo, conhecendo o modelo experimental e os aspectos do fungo é de suma relevância o estudo dos mecanismos de defesa contra este patógeno e o quanto influenciam nos processos inflamatórios agudos e crônicos. Além de avaliar se o tratamento estabelecido auxilia no combate deste fungo ou não.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

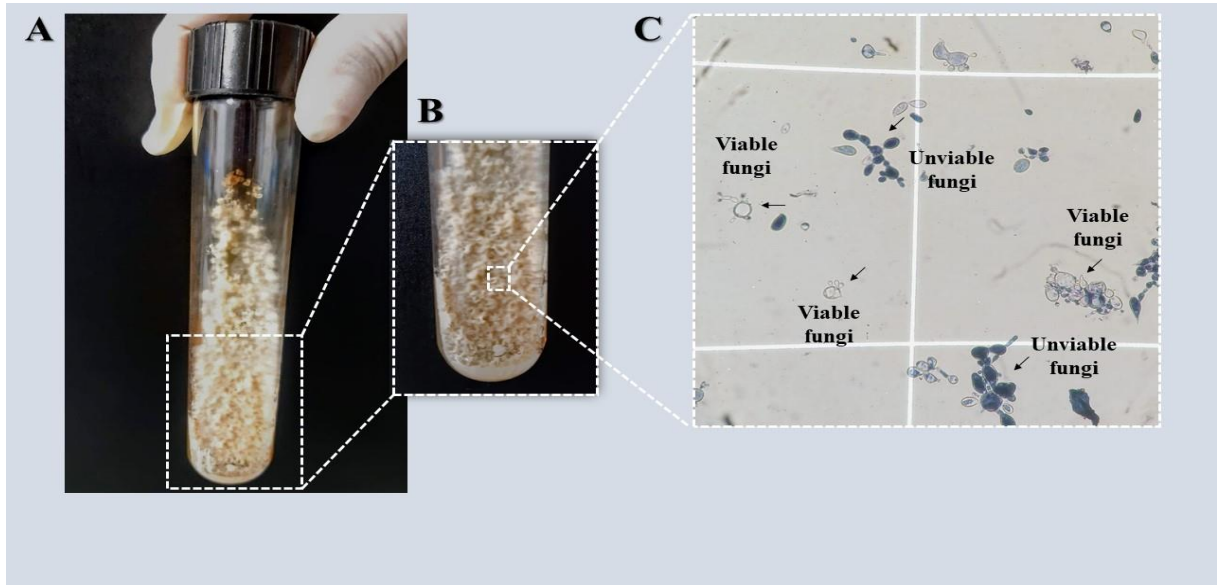
### 2.1 *Paracoccidioides brasiliensis* e Paracoccidioidomicose (PCM)

O fungo termo-dimórfico pertencente ao gênero *Paracoccidioides* spp. é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM). É uma micose sistêmica de alta prevalência na América Latina (WANKE; AIDÉ, 2009). No Brasil ocorrem predominantemente nas regiões sul, sudeste e centro-oeste, apresentando maior número de casos comparado a outros países latinos e pode ser considerada como a oitava causa de morte mais comum entre as doenças crônicas infecciosas e parasitárias (MARTINEZ, 2015). A PCM pode ser considerada como uma doença negligenciada em decorrência de poucas regiões não apresentarem programas de prevenção e notificação (SANTOS *et al.*, 2021).

Sabe-se que o gênero *Paracoccidioides* spp. é constituído por: *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*. A espécie *P. brasiliensis* compreende um complexo de pelo menos quatro espécies, sendo: S1 (encontrada no sudeste e centro-oeste do Brasil, além da Argentina), PS2 (encontrado no sudeste do Brasil e na Venezuela), PS3 (restrito à Colômbia) e PS4 (encontrado apenas na Venezuela) (TEIXEIRA *et al.*, 2014). A existência de linhagens evolutivas geneticamente distintas em *P. brasiliensis* foi demonstrada, por meio de análise de dados da sequência de DNA. Recentemente, as espécies PS2, PS3 e PS4 foram reclassificadas como *P. americana* (PS2), *P. restrepiensis* (PS3), e *P. venezuelensis* (PS4) (HRYCYK *et al.*, 2018).

Em particular, o fungo *P. brasiliensis* apresenta-se na forma leveduriforme à temperatura de 35-37°C e na forma micelial à temperatura ambiente (GEGEMBAUER *et al.*, 2014). Conforme pode ser observado na figura 1A e 1B observam-se as colônias na forma leveduriforme em meio de cultivo Fava Netto e na figura 1C as células leveduriformes em câmara de Neubauer com o corante realçando as células que estão viáveis (translúcidas) e não viáveis (coradas em azul).

Figura 1 - Forma leveduriforme de *P. brasiliensis* isolado Pb18.

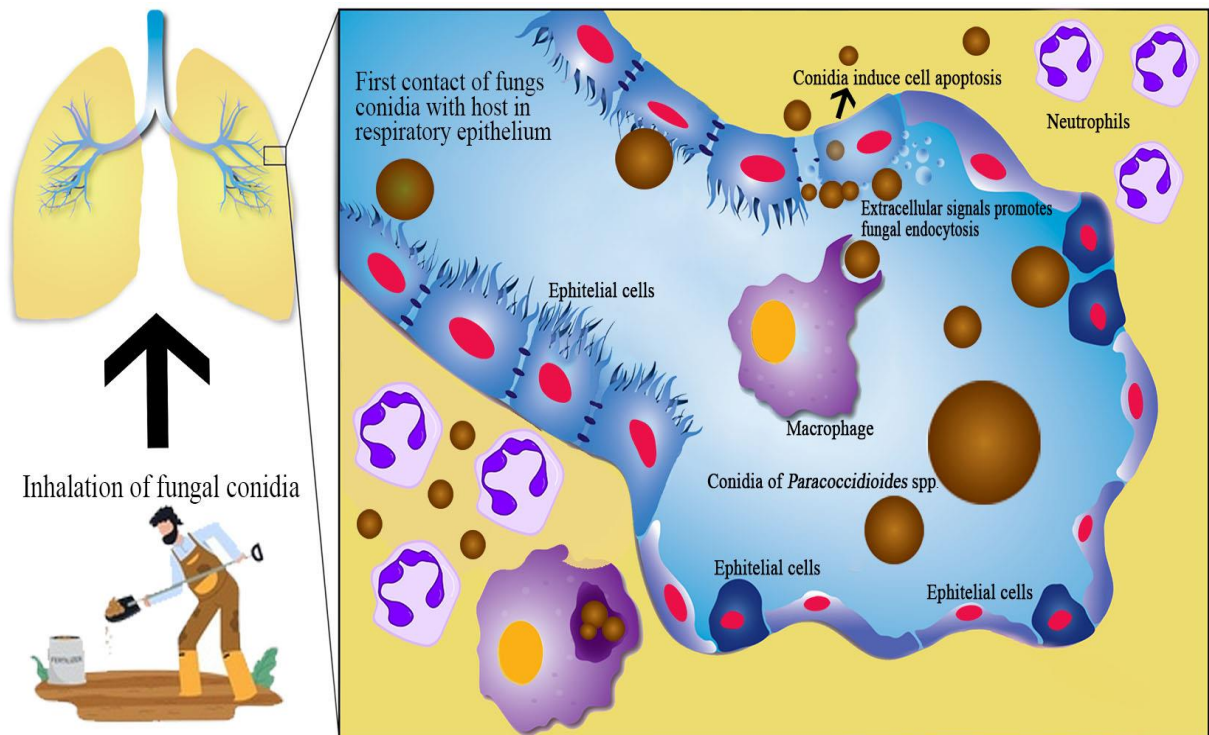


Fonte: Do autor (2022).

Legenda: A e B - Colônias na forma leveduriforme em meio de cultivo Fava Netto. C - Células leveduriformes em câmara de Neubauer com o corante realçando as células que estão viáveis (translúcidas) e não viáveis (coradas em azul).

A infecção por este fungo ocorre pela inalação de conídios e/ou fragmentos miceliais que estão presentes no solo (Figura 2). Esta micose sistêmica é muito frequente em trabalhadores rurais principalmente do sexo masculino. Estudos demonstraram que, o hormônio feminino estrogênio, inibe a transição da forma micelial para leveduriforme. Deste modo, conferi proteção ao desenvolvimento desta infecção no sexo feminino (MARTINEZ, 2015). Duas formas distintas desta doença podem ser observadas: A forma aguda ou juvenil (ocorre em jovens de ambos os sexos e pode evoluir rapidamente) e a forma crônica ou adulta (ocorre em indivíduos do sexo masculino, caracterizando um período prolongado de latência) (SHANKAR *et al.*, 2011).

Figura 2 - Mecanismos de invasão de *Paracoccidioides* spp.



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: O patógeno entra em contato com as células epiteliais e endoteliais do trato respiratório e promove sua endocitose, permitindo sua sobrevivência intracelular e assim permitindo o início do processo infeccioso.

Milhões de indivíduos podem estar infectados em todo o mundo, mas apenas uma pequena porcentagem realmente desenvolve a doença (ARMSTRONG-JAMES *et al.*, 2017). No Brasil, estima-se que varia de 10 a 30 casos por milhão de habitantes e a taxa média de mortalidade é de 1,4 mortes por milhão de habitantes (DE ALMEIDA *et al.*, 2017). Na Colômbia, há uma incidência que varia de ano para ano, mas em média 2,4 casos por milhão de habitantes (GIACOMAZZI *et al.*, 2016).

Pacientes com PCM podem apresentar outras doenças, incluindo tuberculose, câncer, enteroparasitoses, infecções pulmonares, AIDS, leishmaniose, hanseníase, doença de Chagas e outras micoses (TELES e MARTINS 2011). A faixa etária mais afetada está entre 30 aos 50 anos de idade. Os indivíduos afetados por esse fungo geralmente estão na fase mais produtiva da vida. Portanto, a doença pode levar a um impacto social e econômico revisado por MENDES *et al.*, (2017).

Os lugares exatos e as condições em que o fungo ocorre na natureza são ainda indeterminados. Há evidências que indicam que a forma sapróbica pode ocorrer em condições restritas de nutrientes no solo, produzindo propágulos infecciosos como artroconídios e aleuroconídios que podem causar lesões primárias na infecção pulmonar (MENDES *et al.*,

2017). A associação entre *P. brasiliensis* e o tatu *D. novemcinctus*, como seu reservatório natural, foi observado pela primeira vez em animais obtidos em uma região da Amazônia/Brasil. Uma descoberta que foi confirmada por vários outros grupos de pesquisa no Brasil (BAGAGLI *et al.*, 1998).

## 2.2 Epidemiologia da PCM e em especial no Brasil

No Brasil, a distribuição regional da PCM é heterogênea, sendo prevalente nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Amazônia. Houve um aumento de casos notificados no Centro-Oeste e Norte, sugerindo ser pelo avanço das atividades agrícolas na Amazônia e Centro-Oeste. A prevalência da PCM doença não está estabelecida, uma vez que a maioria dos casos não é notificada. Estudos epidemiológicos em regiões endêmicas utilizando o método intradérmico (paracoccidioidina) mostra uma prevalência entre 11,0 e 43,8% em ambos os sexos. Nos adultos, existe uma proporção de 5,4 a 10 homens para cada mulher, mas na população infantil, isso não ocorre. Usando o teste intradérmico (paracoccidioidina) na Colômbia, a prevalência de sensibilização foi de cerca de 77% da população em certas áreas rurais. Na Venezuela, a prevalência variou de 10,2 a 19,7%. Na Argentina, apresenta uma taxa de 1,6 a 10,2%. A taxa de mortalidade é cerca de 1,45: 1.000.000 de indivíduos. A taxa de letalidade está entre 2 e 23%, chegando a 30% se associado à AIDS (MARQUES 2012).

## 2.3 Imunopatologia da paracoccidioidomicose

O estabelecimento da doença e disseminação fúngica depende de características inerentes ao fungo, sendo elas; tempo de exposição dos indivíduos as partículas fúngicas, número de formas infectantes inaladas e estado imunológico do hospedeiro. *P. brasilienses* sintetizam antígenos (como a proteína gp 43) que são capazes de interagir com o sistema imune e induzir uma resposta complexa e multifatorial (BURGER, 2010). A infecção inicial pode ser exudativa ou granulomatosa, caracterizada por uma resposta inflamatória neutrofílica (FORTES *et al.*, 2011). A formação do granuloma se dá pela predominância de neutrófilos que são substituídos por macrófagos e diferenciando em células gigantes. A evolução do processo infeccioso no granuloma tem a presença de células epitelióides formando o halo linfoplasmocitário e presença fúngica. Portanto, o granuloma não só constitui uma estrutura

fechada, mas, dinâmica e rica em células imunológicas. Assim, sendo possível visualizar focos de fibrose e áreas de necrose que serão substituídas por tecido fibroso cicatricial (CANO, 2012). A presença de tecido fibroso cicatricial nos órgãos infectados principalmente nos pulmões leva a ocorrer uma limitação funcional do órgão e conseqüentemente pode levar até o óbito do hospedeiro. A presença de granulomas caracteriza a PCM (FORTES *et al.*, 2011).

Estudos mostram a participação das células imunes nos locais das lesões presentes no hospedeiro e descrevem os mecanismos desta resposta imunológica. Os mecanismos da imunidade inata como; sistema complemento e fagócitos combatem de forma significativa este fungo. A interação dos antígenos do fungo com os receptores dos fagócitos promove a modulação da fagocitose e ativação das células (PAGLIARI *et al.*, 2010). Já os receptores semelhantes à Toll (TLR 1,2,3,4,5,6 e 7) foram descritos por possuírem uma capacidade de reconhecerem uma variedade de estruturas patogênicas. Os TLRs têm capacidade de interagir com antígenos fúngicos e ativar as células fagocitárias, promovendo uma resposta imune antifúngica. Estudos sugerem que as células leveduriformes de *P. brasiliensis* penetram nos macrófagos por meio dos receptores TLR2 e 4. Além disso, os receptores de lectina do tipo C (dectina 1 e 2) estão envolvidos nos mecanismos de defesa do hospedeiro contra infecções fúngicas, conduzindo a respostas inflamatórias. A dectina-1 é um receptor de reconhecimento de padrões predominantemente envolvido na imunidade antifúngica e expresso principalmente por células mielóides (DRUMMOND *et al.*, 2011). A participação dos receptores TLR 2 e 4 e dectina-1 no reconhecimento e internalização de *P. brasiliensis* conseqüentemente ativam neutrófilos. O receptor de dectina-1 possui a capacidade de reconhecer  $\beta$ -glucanos presentes na parede celular fúngica, sendo crucial para a imunidade protetora contra fungos, conforme é representada na Figura 3 (FERIOTTI *et al.*, 2015).

As células polimorfonucleares (PMN) podem ser encontradas nos tecidos em grande quantidade apresentando atividade fungicida contra *P. brasiliensis* por meio de mecanismos dos metabólitos de oxigênio ( $H_2O_2$  e ânion superóxido) e por estimulação das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF e IL-15 (RODRIGUES *et al.*, 2007). Os PMNs podem secretar citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento contribuindo para o combate deste fungo. Desta forma, sendo importantes na resposta imune inata, mas, podendo interagir, com os linfócitos B e T dendríticas atuando na resposta adaptativa. Estudos descrevem que os PMNs quando estimulados com *P. brasiliensis in vitro* possuem a capacidade de produzir IL-8, contribuindo para um processo anti-apoptótico dos neutrófilos favorecendo a sobrevivência deste fungo. Já estudos relatam que IL-1 $\beta$ , IL-8 e TNF- $\alpha$  podem estar relacionadas com os distúrbios

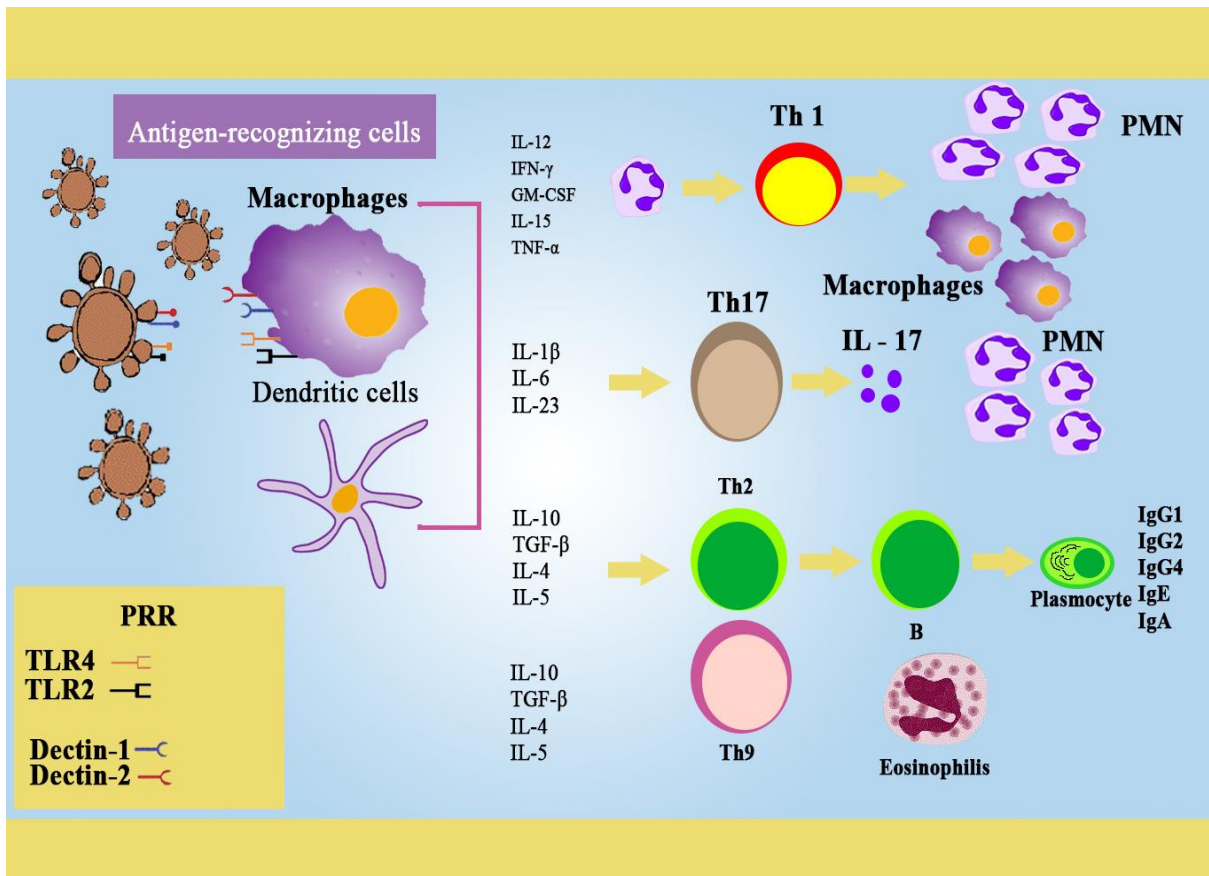
metabólicos como; estados febris e elevação da proteína C. IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- $\alpha$  podem ser capazes de promover uma resposta inflamatória sistêmica, conforme representada na Figura 3 (FORTES *et al.*, 2011).

Subpopulações de células TCD4<sup>+</sup> têm sido descritas como sendo capazes de atuar nas respostas imunes contra fungos tais como; células T helper 9, 17 e 22. As prostaglandinas produzidas por monócitos ativam as células Th17 secretando citocinas como IL-22; IL-23; IL-17, TNF- $\alpha$ , IL-12; IL-6; IL-10 e IL-1 $\beta$ . Algumas citocinas imunorreguladoras atuam nesta resposta Th17 como; IL-10, TGF- $\beta$  e IL-4 (CAVASSANI *et al.*, 2011). As células produtoras de IL-17 promovem um processo inflamatório intenso mediado por neutrófilos e levando resistência ao processo infeccioso contra *P. brasiliensis* (TIND *et al.*, 2015). A resposta imune humoral não é protetora, porém, importante para diagnóstico principalmente nas formas graves da PCM. As formas graves possuem como característica a presença de altos títulos de anticorpos IgG4, IgA e IgE, associado com a presença de citocinas supressoras do granuloma como IL-4; IL-5 e TGF- $\beta$  (TIND *et al.*, 2015) (FIGURA 3).

A resposta imune do tipo Th1 desempenha uma função de proteção tornando o hospedeiro resistente ao *P. brasiliensis*. Esta resistência tem sido atribuída às citocinas IFN- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$  e nos aspectos histológicos apresentam granulomas densos (CARNEIRO *et al.*, 2015). O TNF- $\alpha$  atua sobre a função macrofágica na PCM humana, desse modo, contribuindo para a formação do granuloma. A resposta do tipo Th2 desempenha um papel contrário. No qual, o hospedeiro torna-se susceptível, com atuação das citocinas IL-4; IL-5 e IL-10. Neste padrão de resposta imune os aspectos histológicos apresentam granulomas mal organizados (FIGURA 3) (THIND *et al.*, 2015).

O padrão de resposta imunológica celular mediada por células TCD4<sup>+</sup> determina a resistência ou susceptibilidade durante o processo infeccioso. Os padrões de resposta imunes regulados por células do tipo Th1, Th2, Th9 e T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Treg) colaboram com a imunorregulação na PCM (THIND *et al.*, 2015).



Figura 3: A resposta imune de *P. brasiliensis*.

Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Os receptores TLR2, TLR4, dectina-1 e dectina-2 reconhecem antígenos de *P. brasiliensis* (Pb), que por sua vez ativa a imunidade inata, que por meio da secreção de citocinas induz o desenvolvimento de células Th1, Th2, Th9 e Th17 e o recrutamento de células da imunidade inata, como neutrófilos e macrófagos.

## 2.4 Participação dos polimornucleares na PCM

Sabe-se que durante o processo infeccioso as células fagocíticas participam da atividade fungicida e modulam a resposta inflamatória. As células polimorfonucleares (PMNs) são as primeiras células a serem recrutadas para o local da infecção revisado por Romani em (2011). Classicamente, foi demonstrado que a função dos neutrófilos de pacientes paracoccidioidomicóticos está comprometida (YARZÁBAL, 1971).

Alguns autores elucidam o papel dos PMNs na PCM, como Brummer *et al.*, (1986). Estes autores sugerem que essas células têm uma atividade fúngica contra *P. brasiliensis*. Coelho *et al.*, (1994) descreve que o fungo é atraído direta ou indiretamente por quimiotaxia pelos PMNs e sendo fagocitado por essas células. As células fúngicas que escapam a essa ação dos PNM são possivelmente responsáveis pela fase crônica da doença, mais adiante será abordado quais mecanismos estão envolvidos no processo de escape do fungo.



PMNs apresentam a função de modulação e efetora e pode ser iniciada a partir da ativação pelo reconhecimento de microrganismos por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) (KURITA *et al.*, 2000). Os receptores Toll-like são PRRs que reconhecem o fungo e sinalizam uma resposta imune pró ou anti-inflamatória. Essa sinalização pode ser influenciada por fatores liberados por neutrófilos, como citocinas IL-12, IL-10, prostaglandinas (PGs), eicosanóides e leucotrienos. Estudos demonstraram que a IL-12 durante os estágios iniciais da infecção nesta micose modula positivamente a resposta imune inata contra o fungo. E ainda tem a capacidade de induzir uma resposta imune específica do tipo Th1, que é protetora. No entanto, a IL-10 pode modular negativamente a resposta imune inata contra este fungo e promovendo um tipo de resposta Th2 não protetora (BALDERRAMAS *et al.*, 2014).

## 2.5 Participação de prostaglandinas no processo infeccioso

Em relação às prostaglandinas, esses compostos são prostanóides, que são produtos da via da ciclooxigenase (COX) do metabolismo do ácido araquidônico (JAKOBSSON *et al.*, 1999). As COXs existem em duas isoformas: COX-1 e COX-2. A COX-1 é a enzima responsável pela síntese basal e constitutiva da prostaglandina, e a COX-2 é importante em várias respostas inflamatórias (SMITH *et al.*, 1994). A via de síntese das prostaglandinas em algumas doenças de mamíferos e sua função na resposta imune é bem conhecida, mas nas doenças fúngicas ainda não foram totalmente esclarecidas (BIONDO *et al.*, 2010).

As prostaglandinas agem nos clones Th0 induzindo a síntese de citocinas da resposta do tipo Th2 e consequente inibição da resposta Th1, produção de quimiocinas, proliferação de linfócitos e efeito inibidor da ação nos fagócitos e células dendríticas (BORDON, 2007). Essa inibição pode ocorrer através da produção de PGE2 que inibe autocrinamente a atividade fungicida exercida pelos neutrófilos, diminui a produção de TNF- $\alpha$  e consequentemente reduz os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (metabólito envolvido na destruição do fungo por monócitos humanos) (BORDON *et al.*, 2012).

## 2.6 Mecanismos de evasão do sistema imune pelo o fungo

A imunidade compreende as células do sistema imunológico inato e adaptativo, permitindo que o hospedeiro combata infecções, e em particular doenças fúngicas sistêmicas. A imunidade mediada por células pode ser prejudicada em alguns indivíduos, como síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), pacientes com câncer, diabéticos ou idosos que

dificulta o controle da infecção. No caso de indivíduos imunocompetentes, o controle da infecção pode ocorrer, uma vez, que a resposta imune adaptativa pode ser ativada (GAUTHIER *et al.*, 2010). Nos estágios iniciais desse processo, geralmente macrófagos, células dendríticas e neutrófilos apresentam os antígenos aos linfócitos T. A resposta imune adaptativa sendo eficaz, envolve a geração de citocinas do tipo Th1, como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . As quais, por sua vez, ativam macrófagos para produzir espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, matando o fungo ou inibindo o crescimento (ROMANI, 2011).

Os fungos dimórficos apresentam várias estratégias para escapar da imunidade inata e adaptativa. Ao entrar nos pulmões, os conídios encontram células do sistema imunológico inato do hospedeiro; como neutrófilos, macrófagos e monócitos (NEMECEK *et al.*, 2006). Essas células têm pouco efeito no processo de combate aos conídios inalados, a menos que sejam ativadas por citocinas do tipo Th1. Nas células que não são ativadas, os conídios de *P. brasiliensis* se convertem em leveduras e podem usar essas células para se espalhar por todo o organismo (BRUMMER *et al.*, 1993).

Quando ocorre a conversão de conídios em leveduras há expressão de genes específicos na fase leveduriforme, com alterações na composição da parede celular e permitindo que o fungo escape do sistema imunológico (GAUTHIER *et al.*, 2010). As proteínas e carboidratos mudam durante a transição de fase contribuindo para a virulência e o desenvolvimento de mecanismos de evasão. O  $\alpha$ -(1,3)-glucano aumenta, enquanto o  $\beta$ -(1,3)-glucano diminui, essa alteração na parede celular da levedura está correlacionada com a patogenicidade de fungos dimórficos como *Histoplasma* spp., *Blastomyces* spp. e *Paracoccidioides* spp. (RAPPEYE *et al.*, 2006). Sabe-se que o  $\alpha$ -(1,3)-glucano pode desempenhar um papel na virulência de *H. capsulatum*, *B. dermatitidis* e *P. brasiliensis*. Portanto, servir como alvo no desenvolvimento de novos medicamentos (GAUTHIER *et al.*, 2010). O  $\alpha$ -(1,3)-glucano está presente na camada mais externa da parede celular de *P. brasiliensis* e pode estar protegendo o  $\beta$ -(1,3)-glucano dos receptores de reconhecimento de padrões (PRR) encontrados nas células do sistema imunológico inato, permitindo que o fungo se espalhe pelo hospedeiro (SAN-BLAS *et al.*, 1977).

Estudos descrevem que os macrófagos têm um ambiente com baixa concentração de glicose, portanto *Paracoccidioides* spp. desenvolveu mecanismos de sobrevivência sob privação de nutrientes nessas células, após, serem fagocitados (CAMACHO e NIÑO-VEGA, 2017). Com base nesse princípio, Lima *et al.*, 2014, usando abordagens de transcriptômica e proteômica mostrou que as células de levedura de *P. lutzii* sob estresse, devido à falta de carbono aumentaram a abundância de transportadores específicos, como cobre, hexoses e

monossacarídeos. Indicando que os processos de captação de carboidratos, aminoácidos e metais são necessários para a sobrevivência. Eles também mostraram a capacidade de responder ao estresse oxidativo na ausência de carbono, revelando que houve um aumento nas proteínas associadas ao metabolismo e uma redução naquelas relacionadas aos processos celulares centrais, como a biossíntese de ácidos graxos. Estudos de Almeida *et al.*, (2009) também demonstraram que *P. brasiliensis* tem a capacidade de escapar do sistema imunológico através da regulação da morfogênese, sendo possível através da Rho GTPase fúngica. A Rho GTPase fúngica está envolvida no controle do crescimento desse fungo e na inibição das células de serem fagocitados por macrófagos, sendo considerado um mecanismo de escape para esse microrganismo.

O fungo é capaz de se espalhar pelo trato respiratório e, conseqüentemente, avançar o processo infeccioso, *Paracoccidioides* spp. é obrigado a se adaptar aos tecidos do hospedeiro para garantir sua persistência e induzir sua própria fagocitose por células endoteliais e epiteliais (CAMACHO e NIÑO-VEGA, 2017). As adesinas nesse processo têm papel fundamental no estabelecimento da infecção, pois, permitem a interação com as células do hospedeiro e promovem a colonização e disseminação desse fungo (LOPES *et al.*, 1994). A glicoproteína de superfície de 43 kDa (gp 43) demonstrou a capacidade de adesão à laminina e fibronectina em estudos, sendo descrita como a primeira adesina responsável pela patogênese desse fungo. Estudos descrevem que a gp43 inibe a fagocitose e a morte intracelular do fungo (POPI *et al.*, 2002). Outra adesina responsável por permitir a invasão e modular a resposta imune inata é a fosfolipase B (PLB), pois, está envolvida na interação inicial fungo-macrófago. Os mecanismos de sobrevivência intracelular e disseminação de *Paracoccidioides* spp. ocorre a partir da modulação da morte celular programada de macrófagos e células epiteliais (SOARES *et al.*, 2010). Isso é possível através da expressão da caspase-2, caspase-3 e caspase-8, fortemente influenciada pelas adesinas de 30 kDa, 14-3-3 kDa e gp43 (VERICIMO *et al.*, 2006).

Estudos realizados em fungos dimórficos como *Aspergillus* spp., *Lacazia* spp., *Histoplasma* spp, *Sporothrix* spp. e em particular em *Paracoccidioides* spp. descreveram a presença de corpos asteróides na parede celular dos fungos. Os corpos de asteróides foram descritos como camadas concêntricas e espigões formados ao redor de uma levedura central, na qual, após, um processo de cristalização por precipitação de sais de cálcio resulta em uma estrutura visível ao redor da célula de levedura. Foi descrito que esses corpos de asteróides protegem a célula leveduriforme da ação de anticorpos como IgGs e IgMs (DA ROSA *et al.*,

2008), sugerindo que essa estrutura possa atuar como uma forma de resistência e permitir a sobrevivência do microrganismo no hospedeiro (HERNÁNDEZ-CHÁVEZ *et al.*, 2017).

Quando o processo de invasão tecidual no organismo do hospedeiro ocorre por *Paracoccidioides* spp., é necessário que esse fungo se adapte e evite a ação do sistema imunológico e um ambiente rico em moléculas de estresse oxidativo. *P. brasiliensis* tem sido descrito como tendo pigmentos de melanina e sendo considerado um fator de virulência neste fungo (DA ROSA *et al.*, 2008). A melanina está presente nas células de levedura de *P. brasiliensis*, podendo inibir parcialmente a fagocitose e reduzir os efeitos fungicidas e fungistáticos dos macrófagos. Estudos *in vitro* também mostraram que as células melanizadas são menos suscetíveis ao óxido nítrico e ao peróxido de hidrogênio gerado (GOMEZ *et al.*, 2001). Assim, pode-se concluir que a melanina promove a virulência fúngica, inibe a fagocitose e neutraliza os radicais oxidativos gerados pelas células efectoras do hospedeiro (CAMACHO e NIÑO-VEGA, 2017).

Outro mecanismo de escape usado por *P. brasiliensis* é a presença de vesículas extracelulares. Sabe-se, que as vesículas extracelulares fúngicas são semelhantes aos exossomos de mamíferos e têm o papel de adquirir nutrientes, participar da defesa celular e modular a resposta imune (RODRIGUES *et al.*, 2011). No gênero *Paracoccidioides* spp. estudos caracterizaram as vesículas extracelulares e mostraram que elas carregam componentes antigênicos desse fungo (VALLEJO *et al.*, 2011). Da Silva *et al.*, (2016), descreveram que as vesículas afetam a interação do fungo com as células do hospedeiro e modulam a resposta imune. Outra forma de adaptação e evasão do sistema imunológico do hospedeiro por microrganismos foi descrita por Csermely *et al.*, 1998 onde a molécula HSP90, desempenha um papel importante na regulação da sinalização celular. Estudos de Tamayo *et al.*, 2013 descobriram que *P. brasiliensis* possui HSP90 e essa molécula permite que o fungo possua mecanismos de adaptação em ambientes hostis, como em locais com pH ácido, e também promove a sobrevivência do fungo quando há interações com as células hospedeiras.

Quando ocorre a fagocitose de *P. brasiliensis* por macrófagos, ocorre uma explosão oxidativa, caracterizada pelo aumento da captação de oxigênio e produção de EROs. Esse mecanismo oxidativo visa matar o patógeno. Outra molécula que também tem essa função é o óxido nítrico produzido pelos macrófagos, que é fungicida para *Paracoccidioides* spp. (GONZALEZ *et al.*, 2000). Diante de todos esses mecanismos oxidativos para conter a disseminação de *Paracoccidioides* spp., esse fungo desenvolveu mecanismos de escape para tolerar esse ambiente dentro dessas células. *Paracoccidioides* spp. ativa enzimas antioxidantes

e induz uma alteração metabólica, a fim de fugir dos mecanismos oxidativos realizados pelos macrófagos (ARRUDA *et al.*, 2013). Estudos também mostraram que *Paracoccidioides* spp. tem a capacidade de reduzir os níveis de óxido nítrico a partir da secreção de gp43 e estimular a liberação de IL-10, reduzindo a expressão de iNOS e sua atividade enzimática (POPI *et al.*, 2002).

Uma alternativa do organismo do hospedeiro para conter o avanço do processo infeccioso é restringir o acesso a micronutrientes como ferro e zinco (PARENTE *et al.*, 2011). No entanto, estudos de revisão descreveram que as células de levedura de *Paracoccidioides* spp. quando fagocitados por macrófagos, têm a capacidade de ativar vias de captação de ferro e zinco altamente eficientes, a fim de persistir nas condições microambientais das células fagocíticas, tornando-o um mecanismo de escape eficiente (CAMACHO e NIÑO-VEGA, 2017).

A formação do biofilme fúngico é um fator importante para a persistência do processo infeccioso e foi descrita principalmente em *Candida albicans*, pois é caracterizada por uma densa rede de células de leveduras que expressam genes que codificam adesinas e enzimas hidrolíticas (aspartil proteinase) (RAMAGE *et al.*, 2012). Estudos demonstraram que *P. brasiliensis* pode colonizar superfícies e formar biofilmes na fase de levedura, isso é possível graças à presença de adesina gp43, GAPDH e proteinase aspartil (PbSap) (SARDI *et al.*, 2015). Essa estratégia deste fungo permite impedir a ação dos antifúngicos e inibir a ação das células fagocíticas. A formação de biofilmes por *P. brasiliensis* também foi demonstrada em estudos para induzir a produção de IL-18 (DIAS-MELICIO *et al.*, 2015). Outra estratégia para evadir do sistema imunológico por *P. brasiliensis* é a capacidade de alterar o perfil das células T. Como a diferenciação e a maturação dessas células ocorrem no timo em estudos realizados com um modelo murino, eles descobriram que na paracoccidioidomicose aguda, a infecção por esse fungo promove atrofia do timo e aumenta a expressão de mediadores da inflamação (BRITO *et al.*, 2003). Nesta situação, sugere-se que esse fungo promova a imunossupressão no hospedeiro, favorecendo sua disseminação por todo o organismo (DI GANGI *et al.*, 2016).

## 2.7 Modelo experimental da Paracoccidioidomicose

O uso de modelos animais em pesquisa auxilia compreender a interação patógeno-hospedeiro, a patogênese, tratamento e os aspectos imunológicos. Considera-se importante o tipo de animal, idade, sexo e vias de inoculação. Os primeiros modelos experimentais de

estudo da PCM foram em cobaias, hamsters e coelho, porém, só desenvolviam a doença um tempo depois da infecção (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015). O modelo de estudo mais empregado é o murino. Os camundongos foram classificados em linhagens como; muito resistente (A/Sn), resistente (C3h/He), intermediário (C3H/HeB, C57B1/10, CBA, BALB/c) e susceptível (B10.A, B10D2/oSn e B10D2/nSn) (CALICH, 1985; DE OLIVEIRA *et al.*, 2015). Estudos descrevem que independente da via de inoculação a produção de anticorpos totais por animais susceptíveis é mais precoce e de elevados títulos quando comparados com linhagens resistentes. Diante disso, acredita-se que o modelo murino da PCM é instrumento de auxílio na elucidação dos mecanismos imunológicos que envolvem esta micose sistêmica (NISHIKAKU *et al.*, 2009).

O envolvimento do omento/epiploon é frequente no modelo intraperitoneal na PCM. Este órgão é alvo na recuperação de células fúngicas viáveis. Esta recuperação foi observada em estudos para determinar a gravidade da doença (SINGER-VERMES *et al.*, 1993; XIDIEH *et al.*, 1999). A expressão “*in situ*” de citocinas em granulomas na PCM tem sido pouco estudada. Uma vez que, se faz importante em decorrência da interação do *P. brasiliensis* com o sistema imune ocorrer nestes locais. Estudos feitos por Burger *et al.*, (2013) compararam a morfologia dos granulomas com a presença de citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  demonstrando que camundongos resistentes desenvolvem uma resposta do tipo Th1. Desta forma, tendo o envolvimento de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Em contrapartida, camundongos susceptíveis respondem com uma resposta Th2 e com envolvimento de TGF- $\beta$ . Estudos de metaloproteínas (MMP) 2 e 9 em PCM experimental também foi realizados por Nishikaku *et al.*, (2009) e demonstrou que MMP-2 possui fraca atividade, do contrário a MMP-9 possui alta atividade sugerindo influência sobre o granuloma e a disseminação fúngica.

Estudos descrevem que a resposta humoral embora não seja tão determinante, mas é importante para montagem de proteção imunológica (SAN-BLAS e BURGER, 2011). Bussia-Filho *et al.*, (2008), demonstra os efeitos de anticorpos monoclonais contra *P. brasiliensis* utilizando modelos “*in vivo*” e “*in vitro*”. No qual, verificaram que estes anticorpos reduziu a carga fúngica bem como diminuição da inflamação pulmonar. No entanto, estudos demonstrando a presença de anticorpos e IL-17 e GM-CSF em granulomas ainda é pouco estudado. Assim como, pouco se sabe sobre o real papel no envolvimento do processo inflamatório desta doença.

## 2.8 Tratamento utilizado na paracoccidioidomicose

O tratamento aplicado na PCM consiste em fármacos com mecanismos de ação antifúngico em especial contra *P. brasiliensis*. A escolha do fármaco a ser administrado depende de algumas circunstâncias como: gravidade do estado clínico, resistência ao fármaco, capacidade de absorção gastrointestinal, associação com coinfeções ou outras comorbidades como o câncer, adesão ao tratamento e reações de hipersensibilidade aos compostos presentes nos medicamentos. O tratamento pode ocorrer, por meio da administração de fármacos como Anfotericina B (AmB) pertencente a classe dos polienos; sulfadiazinas (antifúngicos derivados de Sulfamídicos) ou Cetoconazol, Fluconazol, Posaconazol, Voriconazol e Itraconazol (derivados dos azólicos) e terbinafina (AMBRÓSIO *et al.*, 2014).

As sulfas foram os primeiros medicamentos empregados no tratamento desta micose e continua sendo utilizado até em dias atuais; incluindo nas formas graves que acometem crianças. O tratamento nas formas graves infantil empregado é a combinação de Sulfametoxazol e Trimetropim (AMBRÓSIO *et al.*, 2014). A Anfotericina B é outra opção terapêutica utilizada em formas graves da doença tanto em adultos, crianças e adolescentes. Este fármaco tem efeitos colaterais como nefrotoxicidade e deve ser utilizado com cautela (SALDANHA *et al.*, 2016). A descoberta dos derivados de imidazol e triazol revolucionou o tratamento desta doença. Estes fármacos apresentam formulações orais, com atividade excelente contra *P. brasiliensis* e possuem poucos efeitos colaterais. Alguns países apresentam Fluconazol, Voriconazol e Itraconazol na forma intravenosa. Para esta micose, em formas moderadas o tratamento de escolha é o Itraconazol por via oral com administração de 6 a 9 meses. Já, em formas menos graves o tratamento perdura por 12 a 18 meses. As sulfadiazinas são distribuídas gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (AMBRÓSIO *et al.*, 2014).

Os anti-inflamatórios têm sido empregados como terapia adjuvante há muito tempo no tratamento de doenças infecciosas. A utilização se deve a necessidade de diminuir a resposta inflamatória do hospedeiro. Em pacientes com hanseníase esta conduta terapêutica é utilizada, pois, se desenvolvem estados reacionais que devem ser tratados imediatamente com fármacos como prednisona. Portanto, evitando danos permanentes provocadas pelo processo inflamatório exacerbado (BENARD *et al.*, 2012). Nas micoses sistêmicas como a PCM raramente é recomendada a utilização de fármacos anti-inflamatórios no tratamento. No entanto, estudos mostraram que a utilização destes fármacos concomitantes aos antifúngicos mostrou ser efetivo no controle da resposta inflamatória e consequentemente no dano

provocado e não levando a perda de função daquele órgão afetado. Esta combinação terapêutica mostrou em estudos ser utilizada principalmente nas formas neurológicas (PEREIRA *et al.*, 2013).

Abordando os aspectos imunopatológicos na PCM, estudos descrevem que os neutrófilos produzem prostaglandinas E2 e leucotrienos. COX-1 e 2 geram prostaglandinas que exercem várias funções. Em destaque, a PGE2 que possui efeito imunossupressor e inibi a ativação de linfócitos, reduz a síntese de citocinas Th1 e aumenta a síntese de citocinas Th2. Na PCM favorece a permanência do fungo. A inibição de COX-2 por fármacos como Celecoxibe é muito usado no tratamento de distúrbios inflamatórios. Este fármaco atua inibindo COX-2, reduzindo dor e inflamação (NAGANO *et al.*, 2017). Estudos demonstraram que em infecções por *Histoplasma capsulatum* o tratamento com Celecoxibe reduziu significativamente a carga fúngica e aumentou à produção de óxido nítrico e IFN- $\gamma$  e também o índice fagocitário e ativação de macrófagos (PEREIRA *et al.*, 2013). Portanto, se faz necessário estudar a utilização combinada deste fármaco na PCM, sugerindo, que a inibição de COX-2 poderia ser uma terapêutica adjuvante no tratamento.

## 2.9 Itraconazol

O Itraconazol possui características químicas de bis-triazólico. Esta característica resulta da substituição do anel imidazólico por triazólico que favorece o amplo espectro de ação e seletividade pelo citocromo P450 das células fúngicas. O mecanismo de ação desta droga se baseia na capacidade de inibir a síntese de ergosterol, componente vital na membrana do fungo. O bloqueio da síntese do ergosterol aumenta a permeabilidade da membrana celular. O que desencadeia alterações na morfologia resultando em necrose celular. O Itraconazol é altamente lipofílico, possui baixa solubilidade em soluções aquosas e por via oral é de rápida absorção (CAZEDEY *et al.*, 2007).

## 2.10 Celecoxibe

Os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) estão entre os medicamentos mais amplamente prescritos em todo o mundo. Indicado para artrite, dores de cabeça e condições como lesões de tecidos moles e fraturas (ALTMAN *et al.*, 1995). Os AINEs são inibidores seletivos da COX e inibem as isoformas da COX-1 e COX-2. Os inibidores da COX-2 têm efeitos analgésicos e anti-inflamatórios equivalentes e têm poucos efeitos adversos no sistema



gastrointestinal e nos rins (BROOKS, 1998). O meloxicam e os dois primeiros coxibs (Celecoxibe e Rofecoxibe) são agentes anti-COX-2 (MCANULTY *et al.*, 2007).

Em particular, o Celecoxibe é usado para tratar uma série de distúrbios associados à dor e inflamação (WARDEN *et al.*, 2005). Estudos relataram a eficácia do Celecoxibe combinado com drogas antineoplásicas no tratamento de alguns tipos de câncer, como mama (ESBONA *et al.*, 2016) e fígado (CERVELLO *et al.*, 2013) e até como agente quimiopreventivo em populações com adenomas colorretais pré-malignos (BERTAGNOLLI *et al.*, 2006). Estudos realizados descreveram que o Celecoxibe foi capaz de inibir a replicação do vírus *Zika in vitro* e *in vivo* (CHAN *et al.*, 2018). Além disso, estudos realizaram a combinação de Celecoxibe com Ciprofloxacina e mostraram que foi capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* (DEY *et al.*, 2017).

## 2.11 Uso de associação medicamentosa no tratamento de doenças fúngicas

Em uma situação ideal, os agentes antifúngicos têm a função de destruir seletivamente fungos e causar efeitos colaterais mínimos ao hospedeiro. As principais classes de medicamentos antifúngicos usados no tratamento humano são os triazóis representados por Cetoconazol, Fluconazol, Voriconazol, Isavuconazol, Itraconazol, polienos como Anfotericina B, equinocandinas (Caspofungina, Micafungina e Anidulafungina) (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2017).

O aumento no número de casos de infecções fúngicas é preocupante, pois há poucas classes de medicamentos antifúngicos que estão disponíveis para o tratamento. Além disso, vale ressaltar à dificuldade no desenvolvimento de novos agentes antifúngicos. A ocorrência de mecanismos de mutações intrínsecas ou extrínsecas, o tratamento prolongado com presença de reações adversas e conseqüentemente o abandono de tratamento e o aumento do número de indivíduos imunodeprimidos, têm sido preconizados a busca de novas alternativas terapêuticas e re-definições de protocolos e tratamentos (FREITAS *et al.*, 2006).

A célula fúngica apresenta algumas semelhanças com os eucariotos de mamíferos. Sendo assim, tornando um desafio para o desenvolvimento de novos protocolos terapêuticos. No entanto, a interação entre hospedeiro e célula fúngica, conseqüentemente, levou à exploração de novas abordagens imunoterapêuticas (SALAZAR *et al.*, 2018). A associação medicamentosa como nova estratégia no tratamento de micoses pode ser utilizada. Compostos como; frações protéicas, microrganismos mortos, imunoterapia celular, lipídios, vitaminas, derivados sintéticos ou naturais, podem ser usados como novas estratégias de tratamento.

Estes compostos podem apresentar boas perspectivas na modulação da resposta imune. A fim, de restaurar a imunodeficiência em humanos e animais. Estudos têm sido realizados como proposta o uso de combinação de medicamentos (FREITAS *et al.*, 2006).

No início, protocolos terapêuticos focados no uso de citocinas, como o fator estimulador de colônia (GM-CSF e G-CSF), foi utilizado com sucesso para aumentar o número de células mieloides e, conseqüentemente, ativar PMNs. O IFN- $\gamma$  também foi utilizado como terapia adjuvante, pois possui a capacidade de ativar células fagocíticas e restaurar defeitos na resposta Th1; esse tratamento foi eficiente em pacientes com doença granulomatosa crônica por meningite criptocócica (SALAZAR *et al.*, 2018).

Combinações de fármacos também têm sido utilizadas para potencializar a ação terapêutica. A combinação de Itraconazol e Flucitosina no tratamento da cromoblastomicose mostrou-se eficaz mesmo em formas graves e subcutâneas. Neste estudo, foi observando um efeito aditivo contra o fungo. Justamente porque apresentou inibição da síntese de ergosterol e supressão da síntese de DNA (ANTONELLO *et al.*, 2011). Outra alternativa terapêutica tem sido estudada é o uso de fármacos anti-inflamatórios, como o Meloxicam, no tratamento da PCM. No qual, notou a redução do número de granulomas em um modelo murino (MICHELIN *et al.*, 2002). O Celecoxibe foi utilizado no tratamento da histoplasmose. Os resultados mostraram aumento das células T CD4 + e reduziu a produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas, concomitantemente com a preservação do parênquima pulmonar (PEREIRA *et al.*, 2013). Um antagonista da IL-4 foi utilizado em combinação com o agente antifúngico Anfotericina B e Fluconazol no tratamento de *C. albicans*. Os resultados mostraram que houve um efeito sinérgico com o antifúngico utilizado; sugerindo que a inibição da IL-4 permite a expansão de linfócitos T CD4 + e a presença de IL-12 (CENCI *et al.*, 1997).

O uso da vitamina D também tem sido objeto de pesquisa devido à capacidade de estimular a imunidade inata, além, de apresentar benefícios endócrinos. Recentemente, foi demonstrado que o calcitrol é capaz de regular a resposta imune pelas células Th1 e Th17. Outra atividade apresentada pela vitamina D é modular positivamente a resposta imune em infecções bacterianas. A vitamina D foi utilizada em associação com a Anfotericina B no tratamento da aspergilose e observou que era capaz de diminuir a toxicidade do medicamento, melhorando o quadro de infecção (SIRIVORANANKUL *et al.*, 2014).

Na imunoterapia, também foram observados que anticorpos monoclonais contra *C. neoformans*, foram benéficos no tratamento. Os resultados mostraram que induz a opsonização e dificulta o crescimento e metabolismo fúngico. Em pacientes com AIDS e

meningite por criptococose, tratados com anticorpo monoclonal, a imunoterapia mostrou que teve a capacidade de reduzir os títulos séricos de antígeno fúngico (SALAZAR *et al.*, 2018). Outra alternativa para a criptococose contra a cepa *Cryptococcus gattii* foi o uso do pCramoll em combinação com o Itraconazol. Das sementes de *Cratylia mollis*, uma espécie nativa do Brasil o pCramoll foi purificado e caracterizado como isolectinas. No estudo observaram efeitos satisfatórios no uso com terapêutica combinada. Os resultados demonstraram que houve uma diminuição na carga de fungos no pulmão e no cérebro, juntamente com o efeito modulador de citocinas de IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10 e IL-17 em camundongos tratados (JANDÚ *et al.*, 2017).

A imunoterapia celular também apresentou resultados satisfatórios principalmente, em pacientes transplantados. Efeitos satisfatórios foram mostrados no tratamento de Epstein-Barr e citomegalovírus. Com base nesses resultados, foi levantada a hipótese do uso em doenças fúngicas, justamente por envolver a reconstituição da imunidade antifúngica, pela transferência de células T específicas. Experimentos realizados em camundongos infectados com *Aspergillus fumigatus* demonstraram maior resistência à infecção, induzindo maior produção de células de memória (GONZALEZ *et al.*, 2017).

As vacinas antifúngicas também se tornaram uma estratégia de tratamento para doenças fúngicas. Vacinas baseadas em moléculas de gluc-glucana, uma classe de antígenos extracelulares de carboidratos (expressas em células fúngicas), têm sido usadas em estudos experimentais em camundongos. No qual, o uso das vacinas provocou a produção de anticorpos do tipo IgG e é eficaz no tratamento contra a infecção por *C. albicans*. Em outro estudo usando o tratamento combinado com Fluconazol em camundongos com criptococose, demonstrou um efeito modulador e pode ser usado como uma alternativa terapêutica (LIAOA *et al.*, 2016).

## 2.12 Tratamento imunomodulador e combinação de fármacos na paracoccidioidomicose

No desenvolvimento do tratamento terapêutico ou profilático em doenças fúngicas, duas características são apresentadas; a capacidade de reduzir a carga de fungos e reduzir os efeitos colaterais.

Na PCM, alguns estudos foram realizados com o objetivo de reduzir o tempo de tratamento e conseqüentemente reduzir os danos causados pela resposta imune induzida pelo fungo. Os agentes antifúngicos rotineiramente utilizados no tratamento da PCM possuem protocolos com duração de 2 a 6 meses. A duração do tratamento deve-se às médias de

frequência de recidiva da doença (RUAS *et al.*, 2012). Portanto, é necessária a busca de novas alternativas terapêuticas para imunomodular a resposta imune e reduzir este tempo de tratamento.

Um estudo realizado com os medicamentos Sulfametoxazol/Trimetropim combinado com o composto derivado da planta *Allium sativum* (tem sido descrita como atividade antifúngica) apresentaram resultados satisfatórios no tratamento da PCM em modelo animal. Os animais tratados com a combinação de drogas desenvolveram uma resposta imune Th1 produzindo altos níveis de IFN- $\gamma$  e IL-12 e baixos níveis de IL-10 (THOMAZ *et al.*, 2008).

Alguns efeitos adversos podem ser observados quando o Itraconazol é usado no tratamento da PCM, como a presença de fibrose tecidual em pacientes com a forma crônica da doença. Um estudo sobre o uso combinado deste antifúngico com anticorpo monoclonal específico (mAb-anti-Ly6G) durante a fase crônica da doença reduziu o número de fungos, a resposta inflamatória e a redução dos focos de fibrose. Os resultados sugerem um controle de infecção e redução de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3, GATA-3, RORc, Ahr, MMP-1 $\alpha$ . Esses resultados foram explicados pelo fato que a combinação de drogas regula negativamente os genes inflamatórios e pró-inflamatórios (ARIAS *et al.*, 2018).

Outro estudo associando o Itraconazol à Pentoxifilina (medicamento com propriedades imunomoduladoras e antifibróticas) mostrou que os ratos tratados tiveram uma redução mais rápida do processo inflamatório granulomatoso e focos de fibrose pulmonar. Esses resultados foram satisfatórios quando comparados à Itraconazol em monoterapia (NARANJO *et al.*, 2011).

A estimulação por citocinas da resposta Th1 geralmente aumenta a eficácia dos agentes antifúngicos. No entanto, quando a imunidade do tipo Th2 não é desejada, esse tipo de resposta é prejudicial ao paciente, favorecendo o estabelecimento do processo infeccioso. Assim, a eficácia do tratamento depende da resposta imune do hospedeiro e da estratégia usada no tratamento. A imunização com o peptídeo 10, observou que apresentou produção de IL-12 e IFN- $\gamma$  e redução de IL-4 e IL-10. Sugerindo proteção, mesmo usando a imunização com p10 sem associação à quimioterapia, resultados efetivos foram observados na PCM (TRAVASSOS *et al.*, 2012).

A Rifampicina e a Anfotericina B também foram usadas em combinação no tratamento da PCM. Os resultados demonstraram um potente efeito antifúngico em menor tempo de tratamento e casos reduzidos de recidiva da doença, após, o término da administração dos fármacos. Estes resultados sugerem que foi possível melhorar a resposta imune de indivíduos que receberam o tratamento combinado (WANKE *et al.*, 1984).

Usando um estimulante adjuvante  $\beta$ -glucano em combinação com Itraconazol em pacientes confirmados por PCM, eles observaram que esse protocolo reduzia o tempo de tratamento. A explicação da eficácia do tratamento combinado é que o  $\beta$ -glucano induz uma modulação positiva da resposta imune. No entanto, os mecanismos como realmente acontecem ainda não estão bem estabelecidos. Portanto, sugere-se que induz monócitos humanos a produzir TNF- $\alpha$  e IL1 $\beta$ . A regressão das lesões observadas pode estar associada a uma melhora na resposta imune celular (GARCIA *et al.*, 2015).

O uso da laserterapia de baixa intensidade (LLLT) tem sido utilizado como alternativa no tratamento de doenças fúngicas, principalmente na PCM. (MESTER E JASZSAGI-NAG, 1973). Seus efeitos têm ação anti-inflamatória aumentando a cicatrização de feridas; podendo atuar em processos intracelulares, onde a luz pode ser absorvida por componentes da cadeia respiratória mitocondrial, o que pode resultar em aumento da produção de EROs (KITCHEN, 2003). Estudos demonstraram que o LLLT é eficaz como anti-inflamatório e é utilizado no tratamento da PCM, nos quais camundongos infectados com *P. brasiliensis* e irradiados tiveram uma redução do edema da pata e também apresentaram uma cicatrização mais rápida. Camundongos infectados por *P. brasiliensis* foram capazes de causar um aumento na capacidade fungicida e também permitiram o recrutamento de PMNs mais ativos, capazes de combater a doença (BURGER *et al.*, 2015).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Investigar a influência do tratamento antifúngico, pesquisa de anticorpos e citocinas em granulomas dos órgãos de camundongos infectados com *P. brasiliensis* e tratados e não tratados com Itraconazol e/ou Celecoxibe na fase inicial e tardia (15 e 120 dias) da infecção.

#### 3.2 Objetivos específicos

Os objetivos são:

- a) estudo *in vitro* para avaliar a atividade dos fármacos combinados sobre o isolado Pb 18;
- b) a taxa de sobrevivência, ganho de peso e teste cutâneo com a paracoccidiodina dos camundongos;
- c) a morfologia histológica das lesões;
- d) a presença de *P. brasiliensis* viáveis para determinar o grau de disseminação fúngica;
- e) a presença de óxido nítrico nos macerados de órgãos de camundongos infectados tratados e não tratados;
- f) a presença de proteínas totais nos macerados de órgãos de camundongos infectados tratados e não tratados;
- g) a concentração da citocina IL-12 no macerado de órgãos de camundongos infectados tratados e não tratados;
- h) a imunolocalização e concentração da citocina IL-17 nos granulomas e macerado de órgãos de camundongos infectados tratados e não tratados;
- i) a concentração da citocina IL-4 no macerado de órgãos de camundongos infectados tratados e não tratados;
- j) a concentração de KC (IL8) e GM-CSF nos macerados de órgãos de camundongos infectados tratados e não tratados e a imunolocalização de GM-CSF nos granulomas de camundongos infectados tratados e não tratados;
- k) a concentração de anticorpos IgM, IgG total, IgG<sub>1a</sub>, IgG<sub>2a</sub> e IgG<sub>2b</sub> nos soros dos camundongos e imunolocalização de IgM e IgG nos granulomas presentes de camundongos infectados tratados e não tratados.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Cultivo do fungo e obtenção do inóculo

Foi utilizado o isolado virulento *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18), mantido no Laboratório de Imunopatologia das Micoses da UNIFAL. O fungo foi cultivado em meio de cultura semi-sólido Fava Netto em tubo inclinado, mantido em estufa a 35°C, repicado decorrido 7 dias (FAVA NETTO, 1955). Após, o período de cultivo, os fungos foram lavados em solução salina com tampão fosfato (PBS) estéril por meio de centrifugação a 3000 rpm durante 5 minutos em temperatura de 5°C por 3 vezes. Em seguida, as células leveduriformes decantadas foram ressuspensas em PBS estéril. Uma suspensão com concentração de  $5 \times 10^6$  células leveduriformes/mL viáveis foi preparada baseado na contagem em câmara de Neubauer a viabilidade das células foi determinada pela coloração de *Janus Green B vital dye* (BERLINER; RECA, 1966).

### 4.2 Celecoxibe e Itraconazol

O Celecoxibe utilizado no presente estudo é um produto da empresa Neolpharma com o nome comercial Celebra® e nome genérico Celecoxibe. A formulação encontrou-se em cápsulas de 200 mg e foi diluído em solução estéril de PBS. Uma solução mãe foi preparada na concentração de 10 mg/mL de estoque.

O Itraconazol utilizado no presente estudo é um produto da empresa Prati, Donaduzzi com nome comercial e genérico Itraconazol®. A formulação encontrou-se em cápsulas de 100 mg em pó e apresentou melhor diluição em solução de dimetilsulfóxido (DMSO). Uma solução mãe foi preparada na concentração de 10 mg/mL.

### 4.3 Atividade *in vitro* anti-*Paracoccidioides brasiliensis*

Para o teste de susceptibilidade antifúngica, foi utilizado o isolado virulento *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18). O inóculo fúngico foi preparado a partir de colônias leveduriformes, 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 concentrações dos fármacos Itraconazol e/ou Celecoxibe foram testadas (3 e 6 mg/mL respectivamente), e suas diluições foram realizadas em série no caldo Fava Netto.

Os tubos foram agitados durante 72 horas e avaliados todos os dias a cultura nos tempos de 24, 48 e 72 horas. A viabilidade das células fúngicas foi determinada pela coloração do corante *Vital Janus Green B*. Após, o período de 72 horas, a suspensão fúngica foi centrifugada a 1780g (Centrifuge 5810R, Eppendorf, NY, EUA). Os pellets foram ressuspensos em 100 µL de PBS e dispersos em placas de Petri com o auxílio de uma alça de Drigalski estéril. O crescimento fúngico da placa foi acompanhado ao longo de um período de 12 dias, quando foi utilizado um marcador de pincel para marcar as colônias. O meio de cultura utilizado neste procedimento foi o ágar BHI (HiMedia Laboratories, Índia) suplementado com glicose a 1% e com fator de crescimento a 30% produzida pelo próprio fungo e FBS a 10%, como descrito por Singer-Vermes *et al.*, 1992.

#### 4.4 Comitê de ética

Esta pesquisa foi aprovada e realizada em conformidade com os princípios éticos exigidos na experimentação animal e aprovada pelo Comitê de Ética em pesquisa com animais (CEUA) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL – MG) sob o número de protocolo 23/2018.

#### 4.5 Efeito do Itraconazol e Celecoxibe *in vitro* sobre as culturas de *P. brasiliensis* e esplenócitos

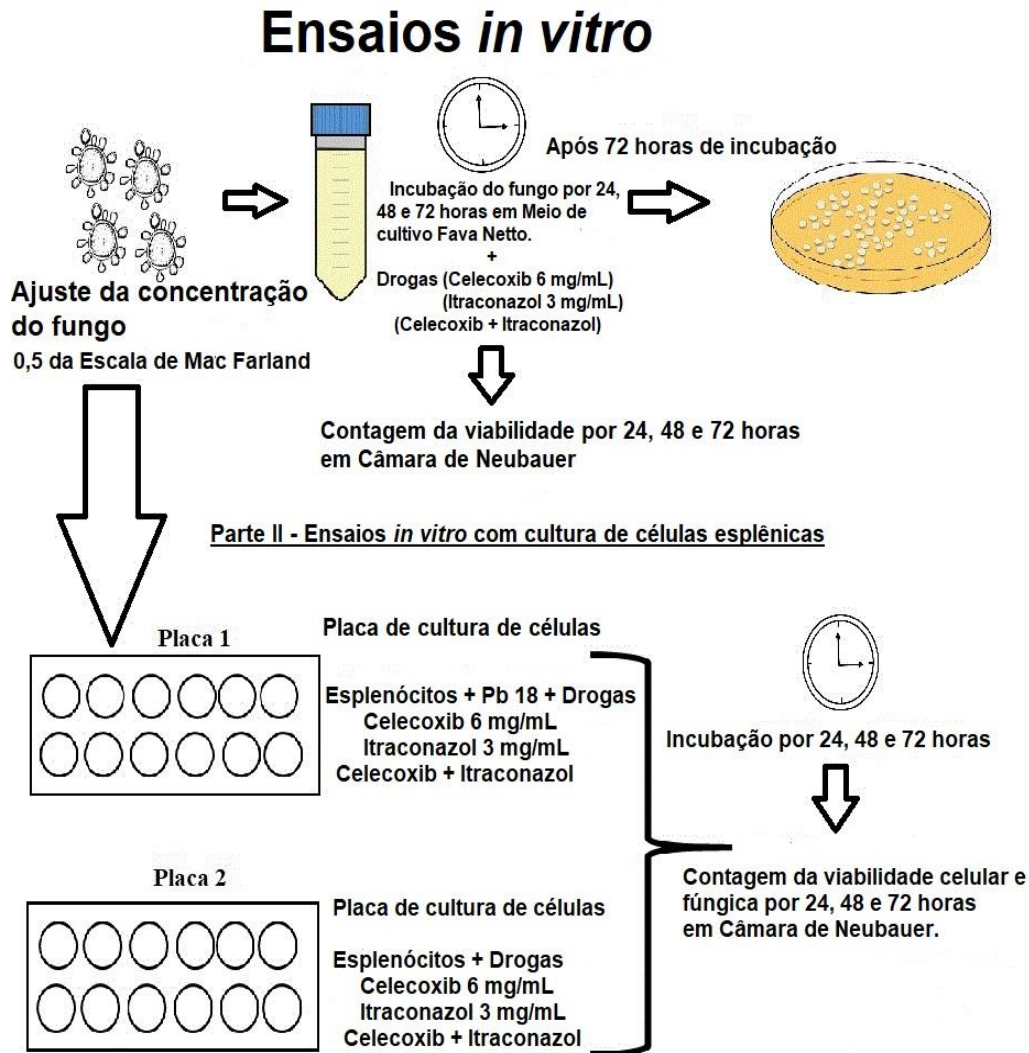
Foram utilizados neste experimento 10 camundongos suíços fêmeas com 6 semanas de idade e peso aproximado de 25g. Todos provenientes do Biotério Central da UNIFAL. Os animais foram anestesiados com uma dose letal (0,5 mL de cloridrato de quetamina a 10% e solução de xilazina a 2%); e coletou-se o baço. As células do baço de 10 animais foram preparadas por maceração usando uma pinça e 5 mL de meio RPMI 1640 com L-glutamina (Sigma Aldrich, EUA). Depois, isoladas via centrifugação (500g). O sedimento de células foi incubado durante 4 min 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). As células foram novamente lavadas e suspensas a uma concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL em meio RPMI 1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino e antibióticos (100 mg/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina). As células foram cultivadas em placas de fundo plano de 24 poços a  $2 \times 10^5$  células/poço com meio RPMI durante 24, 48 e 72 horas a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%. Após, as células esplênicas foram tratadas com as concentrações dos fármacos



Itraconazol e/ou Celecoxibe (3 e 6 mg/mL respectivamente) e células não tratadas. Em outra placa as células do baço foram infectadas com 10  $\mu$ L de isolado virulento do Pb18 e tratadas com Itraconazol (3mg/mL), Celecoxibe (6mg/mL) e combinação de Itraconazol e Celecoxibe e como controle apenas células. A viabilidade de células esplênicas tratadas com as concentrações dos fármacos Itraconazol e Celecoxibe e infectadas com Pb 18 e tratadas com a combinação de Itraconazol e Celecoxibe foi avaliada por 24, 48 e 72 horas de incubação utilizando o corante azul de tripano. Também foi avaliada a viabilidade do fungo Pb 18 exposto as células esplênicas e tratados com os fármacos Itraconazol e/ou Celecoxibe utilizando o corante *vital Janus Green B*. Na figura 4 mostra o delineamento experimental desta técnica.

#### 4.6 Delineamento experimental dos ensaios *in vitro*

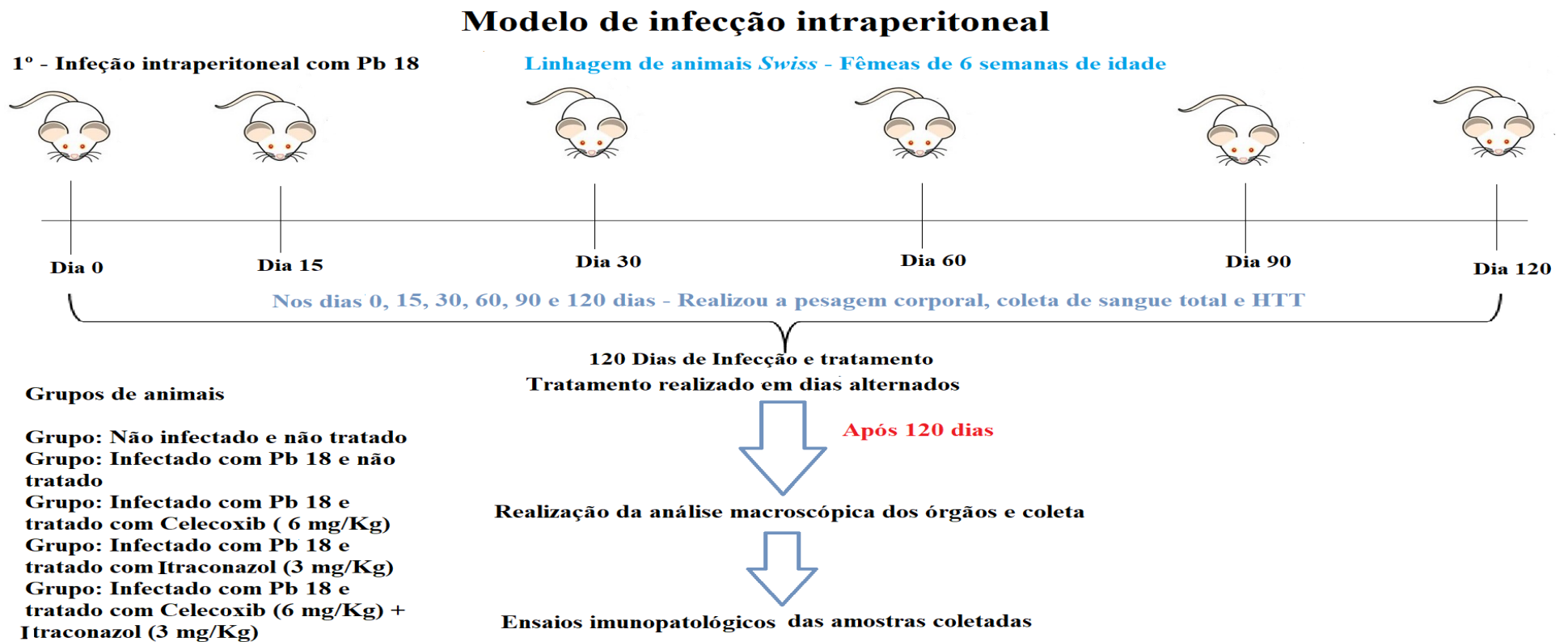
Figura 4 - Foto representativa dos testes *in vitro* realizados com os fármacos Celecoxibe (6 mg/mL) e/ou Itraconazol (3 mg/mL) sobre a cepa Pb 18 de *P. brasiliensis*.



Fonte: Do autor (2022).

#### 4.7 Delineamento experimental da Infecção intraperitoneal

Figura 5 - Foto representativa do modelo de infecção intraperitoneal realizados com os fármacos Celecoxibe (6 mg/mL) e/ou Itraconazol (3 mg/mL) sobre a cepa Pb 18 de *P. brasiliensis*.



Fonte: Do autor (2022).

Lengeda: HTT: Teste de hipersensibilidade do tipo tardio.

#### 4.8 Animais, inoculação de *P. brasiliensis* e tratamento

Para a realização do trabalho foram utilizados 25 camundongos suíços fêmeas com 6 semanas de idade e peso de aproximado de 25g provenientes do Biotério Central da UNIFAL. Foram mantidos em biotério de experimentação com controle de temperatura, luminosidade e alimentados com ração comercial e água “*ad libitum*”. Foram constituídos 5 grupos experimentais, com 5 animais cada e foram feitos os experimentos.

Quadro 1- Descrição dos grupos de tratamento.

| <b>Tratamento realizado por 15 dias</b>  |
|--|
| <b>Grupo 1: Infectado com Pb 18 + Itraconazol (3 mg/Kg) – Pb 18+I</b>                            |
| <b>Grupo 2: Infectado com Pb 18 + Celecoxibe (6 mg/Kg) – Pb 18+C</b>                             |
| <b>Grupo 3: Infectado com Pb 18 + Itraconazol (3 mg/Kg) + Celecoxibe (6 mg/Kg) - Pb 18 + I+C</b> |
| <b>Grupo 4: Infectado com Pb18 e não tratado – Pb 18</b>   |
| <b>Grupo 5: Não infectado e não tratado - NINT</b>   |
| <b>Tratamento realizado por 120 dias</b>   |
| <b>Grupo 1: Infectado com Pb 18 + Itraconazol (3 mg/Kg) – Pb 18+I</b>                            |
| <b>Grupo 2: Infectado com Pb 18 + Celecoxibe (6 mg/Kg) – Pb 18+C</b>                             |
| <b>Grupo 3: Infectado com Pb 18 + Itraconazol (3 mg/Kg) + Celecoxibe (6 mg/Kg) - Pb 18 + I+C</b> |
| <b>Grupo 4: Infectado com Pb18 e não tratado – Pb 18</b>   |
| <b>Grupo 5: Não infectado e não tratado - NINT</b>   |

Fonte: Do autor (2022).

Os grupos de animais foram inoculados por via intraperitoneal com 0,5 mL de suspensão fúngica de Pb18 na concentração de  $5 \times 10^6$  células leveduriforme. O tratamento foi realizado após 3 dias de inoculação utilizando o Itraconazol e/ou Celecoxibe. O tratamento foi administrado diariamente por gavagem durante 15 dias de infecção por *P. brasiliensis*. Por fim, O tratamento foi administrado em dias alternados por gavagem durante 120 dias de infecção por *P. brasiliensis* (NISHIKAKU *et al.*, 2009). Na figura 5 mostra o delineamento experimental desta técnica.

#### 4.9 Teste de hipersensibilidade do tipo tardio – HTT

Foi realizado o teste de hipersensibilidade do tipo tardio com paracoccidiodina nos animais. No preparo da paracoccidiodina, para uso intradérmico, a concentração proteica foi ajustada a 60 µg/mL (estéril e apirogênica), de modo a se usar 6 µg/100 µL para o teste. O

preparo da paracoccidina foi realizado conforme Saraiva et al., (1996) e a amostra utilizada é oriunda de uma cepa *P. brasiliensis* B-339, que é uma amostra padrão utilizada para produção de antígenos em toda a América Latina. Esta paracoccidina foi cedida pelo Prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo da UNESP.

Resumidamente, foi inoculado nas patas direita dos animais 0,1 mL de paracoccidina e 0,1 mL de solução salina estéril na pata esquerda. Após, 48 horas o teste foi medido com o auxílio de um paquímetro e anotado as medidas. Este teste foi realizado no 7º e 15º dia de infecção e tratamento. Também, foi realizado no 7º, 15º, 30º, 60º, 90º e 120º dia de infecção e tratamento.

#### 4.10 Pesagem corporal dos animais

No 1º, 7º e 15º dia foi realizado a pesagem de todos os animais. O peso dos animais foi anotado para realização de uma curva de ganho de peso corporal.

No 1º, 7º, 15º, 30º, 60º, 90º e 120º dia foi realizado a pesagem de todos os animais. O peso dos animais também foi anotado para realização de uma curva de ganho de peso corporal.

#### 4.11 Coleta de sangue periférico

Os animais foram anestesiados com xilazina/ketamina. Após anestesia a coleta de sangue total foi realizada via submandibular nos dias 1º, 7º e 15º dia de infecção. Na infecção tardia os animais foram anestesiados com xilazina/ketamina. Após anestesia a coleta de sangue total foi realizada via submandibular nos dias 1º, 7º, 15º, 30º, 60º, 90º e 120º dia de infecção. Após, a coleta de sangue, este foi centrifugado a 10 min por 2500 RPM e foi separado o soro. O soro foi coletado e armazenado em eppendorfs a uma temperatura de 20°C.

#### 4.12 Necrópsia, coleta de material e processamento histológico para microscopia

Ao final do período de tratamento, tanto da infecção inicial quanto tardia (15 dias e 120 dias) os animais foram anestesiados com xilazina/ketamina e após anestesia foram exsanguinados pelo plexo retro-orbital e sacrificados por deslocamento cervical. Foram coletados o baço, omento/pâncreas, fígado e pulmão. Após a coleta, os órgãos foram pesados

e o peso relativo foi calculado por meio da divisão do peso do órgão pelo peso corporal. Parte do órgão foi macerado em meio RPMI RPMI 1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino e antibióticos (100 mg/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina) e centrifugado a 500g por 10 minutos. Foi coletado o sobrenadante e armazenado a -20°C. A outra metade do órgão foi destinado para histologia. Os fragmentos de cada órgão foram fixados em solução de paraformaldeído tamponado a 10% por 48 horas. Os órgãos coletados fixados foram desidratados, diafanizados e incluídos em parafina. Posteriormente, foram obtidos cortes teciduais de 5 µm de espessura montados em lâmina previamente cobertas com poli-lisina para avaliação histológica e imunohistoquímica. Os cortes do baço, omento/pâncreas, fígado e pulmão foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para análise histológica geral e impregnação pela prata de Grocott (tricrômico de gomori) para identificação fúngica (morfologia e presença de brotamentos) (GROCOTT, 1955). Os cortes foram visualizados em microscópio de luz convencional. As imagens digitais foram realizadas em câmera fotográfica acoplada ao microscópio de luz convencional (Axioscope A1, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Imagens digitalizadas foram obtidas a partir de cada corte histológico utilizando-se o software de captura e análise de imagens Axion Vision LE (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

#### 4.13 Quantificação de *P. brasiliensis* viáveis

Resumidamente o baço, omento, fígado e pulmão de todos os grupos de animais infectados com Pb18 e tratados das infecções de 15 e 120 dias de tratamento foram transferidos para frascos estéreis e pesados. Os órgãos coletados foram macerados em homogeneizadores (“potters”) contendo 5 mL de PBS estéril e conservados em gelo. Após, foram centrifugados a 500 g por 5 minutos. Os sedimentos (“pellet”) obtidos foram ressuspensos em 1 mL de PBS estéril e 100 µL semeados em placas de Petri contendo ágar Brain Heart Infusion (BHI) (com 5% de fator de crescimento e 1% de solução antibiótica). Posteriormente foram incubados a 35-37°C por 14 dias de crescimento. A contagem de fungos viáveis foi feita e os resultados foram expressos como média ± erro padrão da contagem de UFC por grama de órgão pesado (log na base de 10) (SINGER-VERMES *et al.*, 1993).

#### 4.14 Dosagem de óxido nítrico

A avaliação das concentrações de NO foi realizada pela medida de nitritos ( $\text{NO}^-_2$ ) em sobrenadantes de macerados de órgãos obtidos das infecções de 15 e 120 dias. Foram pipetados 100  $\mu\text{L}$  dos sobrenadantes de cultura e 100  $\mu\text{L}$  do reagente de Griess em placas de 96 poços, em duplicata e incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos. A seguir foi determinada a absorbância a 540 nm em leitor de ELISA. Os resultados expressos em  $\mu\text{M}$  foi determinado após extrapolação de valores obtidos de uma curva padrão realizada com nitrito de sódio nas concentrações de 100 a 78  $\mu\text{M}$  para cada placa. O reagente de Griess foi preparado na hora do uso, homogeneizado em partes iguais da solução A-sulfanilamida a 1% em  $\text{H}_3\text{PO}_4$  a 2,5% e da solução B-naftilenodiamina 0,1% em água destilada.

#### 4.15 Concentração de IgG, IgG<sub>1a</sub>, IgG<sub>2a</sub> e IgG<sub>2b</sub> pela técnica de ELISA

Anticorpos IgG, IgG<sub>1a</sub>, IgG<sub>2a</sub> e IgG<sub>2b</sub> anti-antígenos foram dosados no soro dos camundongos infectados e tratados por 15 e 120 dias de infecção. Resumidamente, foi feito placas de 96 poços de fundo chato (Nunc) e sensibilizadas com 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  do antígeno bruto diluído em tampão carbonado-bicarbonato 0,1M (pH 9,6) a 4°C por 15 horas. A seguir, as placas para cada teste foram lavadas em PBS-Tween 0,05% (PBS-T) e bloqueadas com 150  $\mu\text{L}$  de leite em pó desnatado a 3% em PBST. 100  $\mu\text{L}$  da diluição dos soros (1/200) foram adicionados nos poços por 1 hora a 37°C. Após incubação e nova lavagem com PBST, foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de conjugado peroxidase anti-IgG de camundongo diluído 1:2000 (Sigma-Aldrich) contendo 0,3% de gelatina. Anti-IgG<sub>1a</sub> de camundongo diluído 1:1000 (Sigma-Aldrich) contendo 0,3% de gelatina. Anti-IgG<sub>2a</sub> de camundongo diluído 1:2500 (Sigma-Aldrich) contendo 0,3% de gelatina. Anti-IgG<sub>2b</sub> de camundongo diluído 1:2500 (Sigma-Aldrich) contendo 0,3% de gelatina. Anti-IgM de camundongo diluído 1:2500 (Sigma-Aldrich) contendo 0,3% de gelatina. As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C, após lavagem com PBST, foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  a 0,4 ng/mL do substrato OPD + 0,1% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30 volumes em tampão citrato pH 5,0 (Sigma-Aldrich). Após 10 minutos, a reação foi paralisada com adição de 30  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N. A leitura colorimétrica foi feita no comprimento de onda de 490 nm em leitor de ELISA (Zenith200rt). Os soros foram testados em triplicatas.

#### 4.16 Quantificação de citocinas

Os sobrenadantes do macerado dos órgãos coletados foram armazenados à temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ , e estes foram utilizados para dosagem de citocinas que foram feitas através de kits de ELISA disponíveis comercialmente para GM-CSF, IL-4, IL-12, IL-17, IFN- $\gamma$  e KC realizados conforme instrução do fabricante (PEPROTECH/ ELISA Development Kit/ Manufacturer of Quality Cytokine Products). A concentração das citocinas foram determinadas por testes de ELISA de captura, baseados na utilização de pares de anticorpos monoclonais específicos para cada citocina, um dos quais marcados por biotina. O uso dos complexos biotina-avidina e  $\text{H}_2\text{O}_2$ -peroxidase permitiu a determinação da concentração da citocina presente através de medidas de densidade óptica. A sensibilização das placas de 96 poços foi feita com anticorpo de captura diluído colocado em cada orifício e as placas foram incubadas por no mínimo 18 horas. Após esse tempo os sítios livres foram bloqueados, e após a incubação pelo tempo adequado foram adicionados os padrões com concentrações conhecidas de cada citocina, e também os sobrenadantes dos macerados dos órgãos em triplicata. Após 2 horas, foram adicionados os conjugados avidina-peroxidase. A placa foi incubada pelo tempo e foram adicionados o substrato cromogênico, o ABTS. As placas foram mantidas ao abrigo da luz e o desenvolvimento da cor foi monitorado até que a curva padrão fosse visualizada (aproximadamente 10 minutos). A cada adição de reagente mencionado acima, as placas foram 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 com os dados referentes às curvas-padrão. Os resultados foram expressos em picogramas por 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante de macerado de órgão.

#### 4.17 Análise histológica das lesões granulomatosas e estereológica

Os cortes histológicos corados com HE e por impregnação pela prata foram analisados para avaliação da área de lesão granulomatosa presentes nos tecidos e presença de células fúngicas de Pb18; evidência de necrose, padrão de organização e a distribuição de células do parênquima e estroma conjuntivo, morfologia e distribuição de células do interstício. Por fim, foi investigado foco de processo inflamatório e áreas de fibrose.

Análise semi-quantitativa foi realizada para calcular a área real no campo de observação ocupada por lesão e que contém o fungo. Foi empregada uma ocular com retículo de contagem e um aumento total de 125x (objetiva de 10x e ocular de 12,5x). Os resultados



foram expressos como média das análises semi-quantitativas e observados 10 campos por  $\mu\text{m}^2$  (NOVAES *et al.*, 2013; NOVAES *et al.*, 2015).

A intensidade do processo inflamatório, quantidade de granulomas, quantidade de hepatócitos binucleados, uninucleados e totais, tipo de granuloma e presença do fungo Pb18 no baço, omento/pâncreas, fígado e pulmão foram investigados pelo método estereológico por meio da contagem do número de células no interstício. Para isso, foi utilizada a fórmula:  $QA_{\text{inf}}/\text{presença do fungo} = \Sigma_{\text{inf}}/\text{presença do fungo}/At$ , onde  $\Sigma_{\text{inf}}/\text{presença do fungo}$  representa somatório do número de perfis de núcleos de células do interstício (inflamatórias [inf]) ou presença do fungo Pb18 e  $At$  corresponde a dimensão da área de teste usada ( $25 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ ). Os parâmetros foram avaliados em 10 campos histológicos aleatórios por animal utilizando objetiva de  $40\times$  numa área total de  $12,9 \times 10^5 \mu\text{m}^2$  para cada grupo (NOVAES *et al.*, 2013). Todas as análises estereológicas foram realizadas utilizando o software de análise de imagens Image ProPlus 4.5 (NOVAES *et al.*, 2013). A figura 6 representa o delineamento experimental.

QA = Quantidade

$\Sigma_{\text{inf}}$  = Somatório de células inflamatórias

At = Área teste

#### 4.18 Quantificação do “score” de inflamação e celularidade nos tecidos

Os tecidos foram avaliados observando a intensidade de inflamação e celularidade (neutrófilos, linfócitos e eosinófilos). As secções de tecido foram analisadas e contadas as células inflamatórias classificando-as. Após, foram pontuados a gravidade da lesão utilizando a seguinte escala: 0, nenhuma (sem inflamação); 1, mínimo, com inflamação envolvendo 5% de tecido; 2, moderada, com áreas de inflamação focalmente extensas (5% a 25% dos tecidos e envolvendo um ou mais tecidos); 3, moderada a grave, com áreas de inflamação focalmente extensas (~ 25% a 50% de tecido e envolvendo múltiplos tecidos e distensão leve de tecidos); 4, grave, com grandes áreas confluentes de inflamação (50% do tecido).

#### 4.19 Análise imuno-histoquímica para detecção de anticorpos e citocinas nas lesões granulomatosas

A presença *in situ* de IgM, IgG, IL-17 e GM-CSF em granulomas de omento/pâncreas de camundongos infectados não tratados e infectados e tratados com diferentes tratamentos foi avaliado por método imunohistoquímico.

Os cortes histológicos contendo o omento dos camundongos foram desparafinizados em xilol por duas vezes de 20 minutos, seguido da hidratação em gradiente decrescente de etanol absoluto, 95°C, 85°C, 80°C e 70°C e água destilada, por cinco minutos. Após hidratação, os cortes foram submetidos à reação de imunohistoquímica para detecção da presença de IgM, IgG, IL-17 e GM-CSF da seguinte maneira:

- a. Lavagem dos cortes com PBS (Phosphate buffer saline) 0,05 M pH 7.4 por 3 vezes;
- b. Incubação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 vols.) 1% em PBS 0,05M durante 30 minutos;
- c. Lavagem com PBS 0,05M pH 7,4 por 3 vezes; 44
- d. Incubação com PBS/BSA (Albumina de Soro Bovino) 1% durante 30 minutos;
- e. Incubação com anticorpo primário, anti-IgM feito em coelho (Sigma Chemical Co. USA) diluído na proporção de 1:100 em PBS/BSA 1% pH 6,8, overnight, a 4° C em câmara úmida;

Para detecção de IgG - Incubação com anticorpo primário, anti-IgG feito em coelho (Sigma Chemical Co. China) diluído na proporção de 1:100 em PBS/BSA 1% pH 6,8, overnight, a 4° C em câmara úmida;

Para detecção de IL-17 - Incubação com anticorpo primário, anti-IL-17 feito em coelho (Fine test. China) diluído na proporção de 1:100 em PBS/BSA 1% pH 6,8, overnight, a 4° C em câmara úmida;

Para detecção de GM-CSF - Incubação com anticorpo primário, anti-GM-CSF feito em coelho (Fine test. China) diluído na proporção de 1:150 em PBS/BSA 1% pH 6,8, overnight, a 4° C em câmara úmida;

- f. Lavagem com PBS 0,05 M pH 7,4 por 3 vezes;
- g. Incubação com anticorpo secundário, anti-habbit feito em cabra (Fine test. China), diluído na proporção de 1:250 em PBS/BSA 1% pH 7,4, por 1 hora em temperatura ambiente;
- h. Incubação com o complexo streptoavidina-peroxidase (Sigma Chemical Co. – USA) em PBS 0.05M na proporção de 1:150 por 1 hora;
- i. Lavagem com PBS 0,05M pH 7,4 por 3 vezes;

j. Incubação DAB (3-3 Diaminobenzidina) (Sigma Chemical Co. – USA) (250 $\mu$ L) + PBS 0,05M pH 7,4 (2250  $\mu$ L) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 vols. (20  $\mu$ L);

k. Lavagem com água destilada;

l. Contra-coloração com Hematoxilina durante 30 segundos, lavagem em água destilada;

m. Os cortes foram desidratados em gradientes crescentes de etanol e diafanizados em xilol, e montados em meio permanente para observação ao microscópio fotônico (Níkon Eclipse 80i/Japan) com câmera digital acoplada (Digital Sighth-Fi1/Nikon/Japan) e software de análise de imagens (NIS-Elements/Nikon/Japan).

Lâminas com cortes de tecido (omento/pâncreas) sem anticorpo primário foram empregadas para avaliar a especificidade da reação.

#### 4.20 Quantificação da reação de imuno-histoquímica

Para a quantificação da reação de imuno-histoquímica de IgM, IgG, IL-17 e GM-CSF foram estabelecidos critérios de análise de marcação positiva. Foi empregando uma ocular com retículo de contagem (total de 100 quadrados), com o aumento total de 500 x (objetiva de 40x e ocular de 12,5x) e resultando na contagem dos campos com área total de 280  $\mu$ m<sup>2</sup>. Todos os resultados foram expressos com a média das análises quantitativas (10 campos de observação quando possível).

#### 4.21 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média e  $\pm$  erro padrão da média. A variância dos dados foi avaliada por meio de análise Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey a análise One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Os resultados com valor de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos (NISHIKAKU et al., 2009).

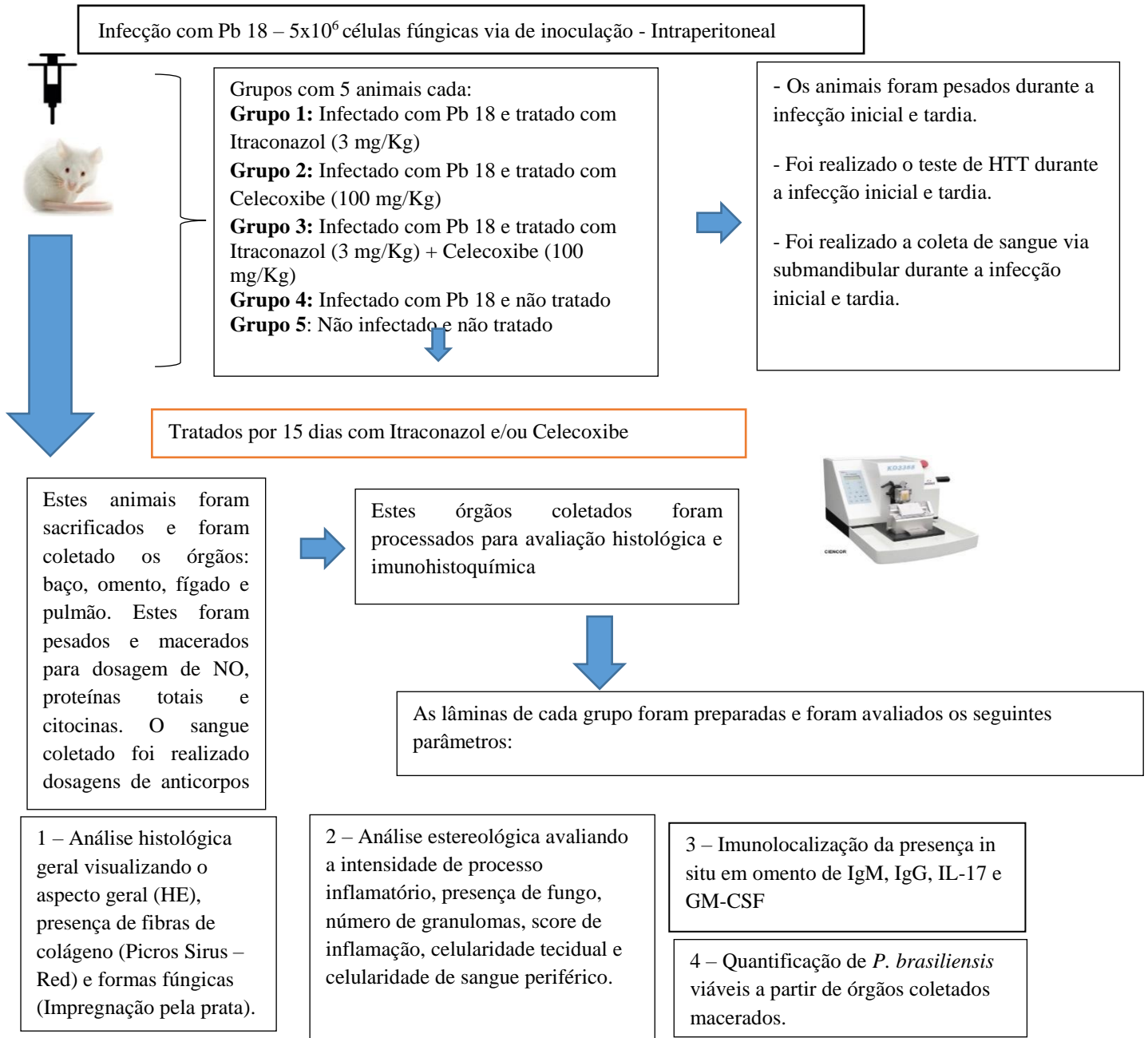
#### 4.22 Locais de realização experimental e recursos utilizados

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Imunopatologia das Micoses da Universidade Federal de Alfnas e no Laboratório de Patologia do Hospital Universitário

Alzira Velano – SVO sob cooperação com o médico patologista Dr. Adriano Macedo de Oliveira. Os materiais e reagentes utilizados nos experimentos foram adquiridos com o recurso do Projeto: FAPEMIG\_APQ\_012941-16.

#### 4.23 Planejamento experimental das análises histológicas

Figura 6 - Delineamento experimental das análises histopatológicas.



Fonte: Do autor (2022).

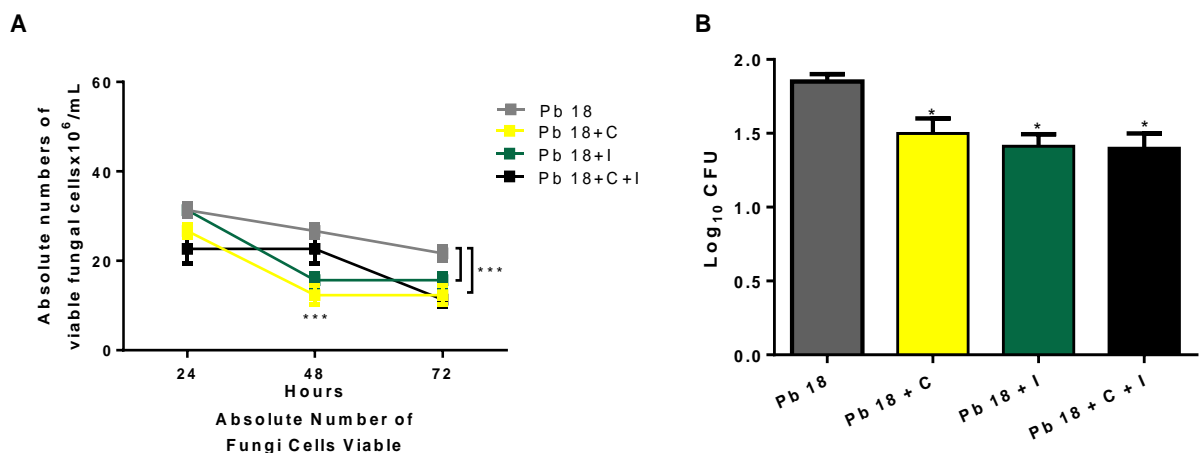
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Ensaios *in vitro* da citotoxicidade dos fármacos Celecoxibe e Itraconazol sobre *P. brasiliensis*

Através dos experimentos *in vitro* foi possível avaliar a citotoxicidade de cada fármaco e de forma combinada sobre as células fúngicas de *P. brasiliensis*. A figura 7A mostra a cinética de viabilidade do fungo frente aos diferentes tratamentos. No tempo de 24 horas não observou diferença entre os diferentes grupos. Em contrapartida no tempo de 48 horas as células fúngicas tratadas somente com Celecoxibe e somente com Itraconazol foi menor em relação a Pb 18. Interessantemente, percebe que após 72 horas o número de fungos viáveis que foram tratados somente com Celecoxibe e somente com Itraconazol e a combinação dos dois fármacos foram significativamente menores ( $p < 0,001$ ) em relação ao Pb 18.

Após, 72 horas avaliou se, os fármacos são fungistáticos ou fungicidas nas concentrações testadas e combinadas; conforme mostra a figura 7B. Os resultados mostram que o número de fungos viáveis após 72 horas de tratamento é significativamente menor ( $p < 0,01$ ) em relação ao Pb 18. Sugerindo uma atividade fungistática mesmo quando há a combinação dos dois fármacos.

Figura 7 - Cinética do número absoluto de células fúngicas viáveis e unidades formadoras de colônia (CFU) tratadas com Celecoxibe (6 mg/mL) (Pb 18 + C), Itraconazol (3 mg/mL) (Pb 18 + I) e Celecoxibe + Itraconazol (6 mg/mL) (3 mg/mL) (Pb 18 + C + I) respectivamente .



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: A - Número de células fúngicas viáveis durante os diferentes tempos e tipos de tratamento. B - Atividade antifúngica dos diferentes tratamentos, unidades formadoras de colônias (CFU) de Pb18 na avaliação após 72 horas. Os resultados para cada grupo estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média. Os testes foram realizados em triplicata. A - Diferença estatística entre os grupos (\*\*\*)  $p < 0,001$  entre Pb 18 vs os diferentes tratamentos, teste *Two Way* ANOVA, pós

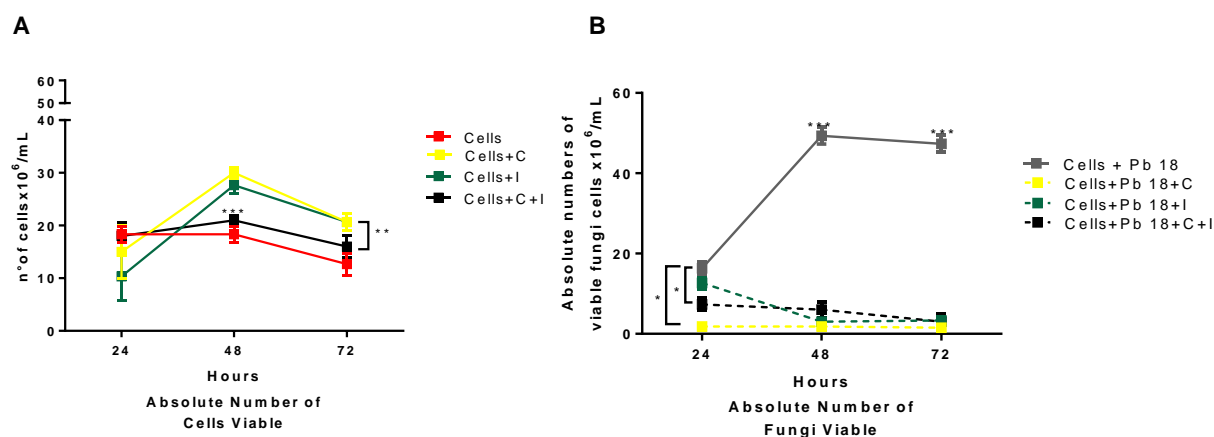
teste de *Tukey*. B - Diferença estatística entre os grupos,  $p < 0,01$  (\*), entre Pb 18 vs os diferentes tratamentos, teste *One Way ANOVA*, pós teste de *Tukey*.

## 5.2 Ensaio *in vitro* da citotoxicidade dos fármacos (Celecoxibe e Itraconazol) sobre cultura de células esplênicas

Os testes *in vitro* com cultura de células esplênicas de camundongos foram realizados para avaliar se a combinação dos dois fármacos apresenta toxicidade na concentração testada para as células (Figura 8A). Os resultados revelam que a combinação com os dois fármacos na concentração utilizada não alterou a viabilidade destas células. Sugerindo não apresentar toxicidade.

Na figura 8B são os resultados *in vitro* avaliando se o tratamento combinado melhora a capacidade das células em eliminar o fungo. Os resultados mostraram que no decorrer dos diferentes tempos de tratamento; as células somente infectadas e não tratadas não alteraram a viabilidade do fungo. Entretanto, quando as células infectadas receberam os diferentes tratamentos e em especial a combinação dos dois fármacos, a viabilidade fúngica é significativamente menor ( $p < 0,001$ ) em relação as células infectadas (Cells + Pb 18). Tais dados sugerem que; tanto o tratamento combinado quanto os fármacos de forma isolada foram efetivos na eliminação do fungo, mostrando que o fármaco Celecoxibe, consegue melhorar os mecanismos celulares na eliminação do Pb 18.

Figura 8 - Cinética do número absoluto de células esplênicas e fúngicas viáveis tratadas com Celecoxibe (6 mg/mL) (Cells + C) (Cells+Pb 18+C), Itraconazol (3 mg/mL) (Cells + I) (Cells+Pb 18+I) e Celecoxibe + Itraconazol (6 mg/mL) (3 mg/mL) (Cells +C+I) (Cells+Pb 18+C+I) respectivamente.



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: A - Número de células esplênicas viáveis durante os diferentes tempos e tipos de tratamento. B - Número de células fúngicas viáveis durante os diferentes tempos e tipos de tratamento. Os resultados para cada grupo estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média. Os testes foram realizados em triplicata. A diferença estatística entre os grupos (\*\*\*)  $p < 0,001$  entre Pb 18 vs os diferentes tratamentos, teste *Two Way ANOVA*, pós teste de *Tukey*.

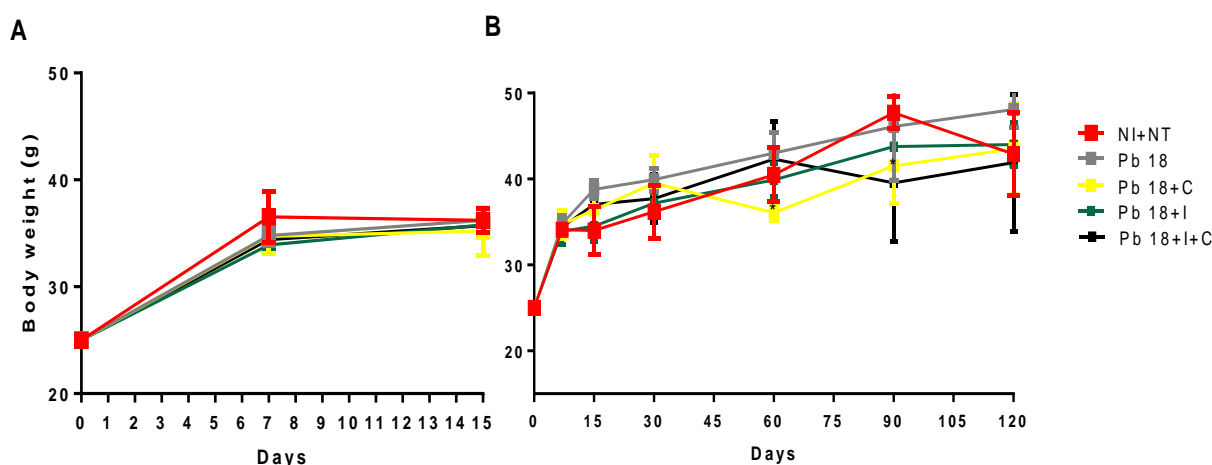
### 5.3 Análise da sobrevivência e peso corporal

Após os testes *in vitro* apresentarem promissores; os experimentos *in vivo* foram conduzidos utilizando o modelo de infecção intraperitoneal para avaliar se o tratamento combinado apresenta efetividade sobre *P. brasiliensis* e se promove imunomodulação nos camundongos tratados.

Acompanhou o peso corporal destes animais durante a infecção e tratamento por 15 e 120 dias. Os animais foram pesados e foi realizada uma curva de peso corporal conforme mostra a figura 9A e 9B. Nota-se que não houve diferença estatística no peso corporal dos animais em todos os grupos experimentais testados na fase aguda da doença (Figura 9A).

Na infecção por 120 dias os animais foram pesados conforme mostra a figura 9B. Foi observado que não houve diferença estatística no peso corporal dos animais em todos os grupos experimentais testados na fase crônica da doença.

Figura 9 - Peso corporal dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento e 120 dias de infecção e tratamento.

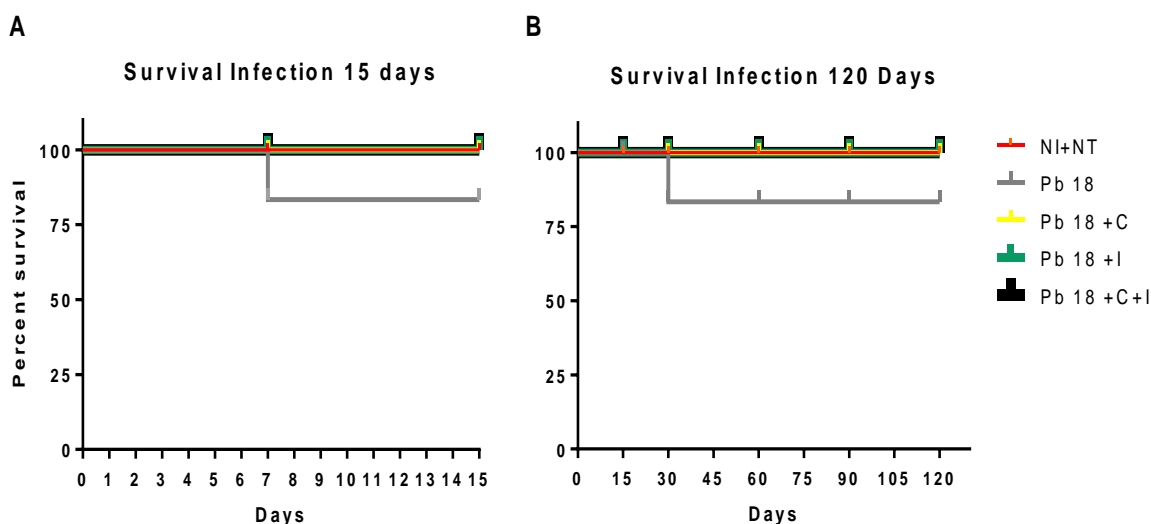


Fonte: Do autor (2022).

Legenda: A cor vermelho representa grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Cinza grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Amarelo grupo infectado e tratado com Celecoxib (6 mg/Kg). Verde o grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I) (3 mg/Kg). Preto representa o grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (6 mg/Kg) (3 mg/Kg), respectivamente. Os resultados para cada grupo estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média. Os testes foram realizados em triplicata. Teste *Two Way ANOVA*, pós teste de *Tukey*.

Também, foi avaliado a taxa de sobrevivência dos animais tanto na infecção aguda quanto crônica (Figura 10A e 10B). Os resultados mostraram que durante 15 e 120 dias de tratamento os animais que receberam somente Celecoxibe e somente Itraconazol e a combinação dos dois fármacos, mantiveram uma sobrevivência de 100%. Em contrapartida, os animais infectados e não tratados tiveram uma sobrevivência na taxa de 90%.

Figura 10 - Taxa de sobrevivência dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento e 120 dias de infecção e tratamento.



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Na cor vermelho representa grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Cinza grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Amarelo grupo infectado e tratado com Celecoxibe (6 mg/Kg). Verde o grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I) (3 mg/Kg). Preto representa o grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (6 mg/Kg) (3 mg/Kg), respectivamente. Os testes foram realizados em triplicata.

#### 5.4 Resposta imune celular e resposta imune humoral específicas ao *P. brasiliensis*

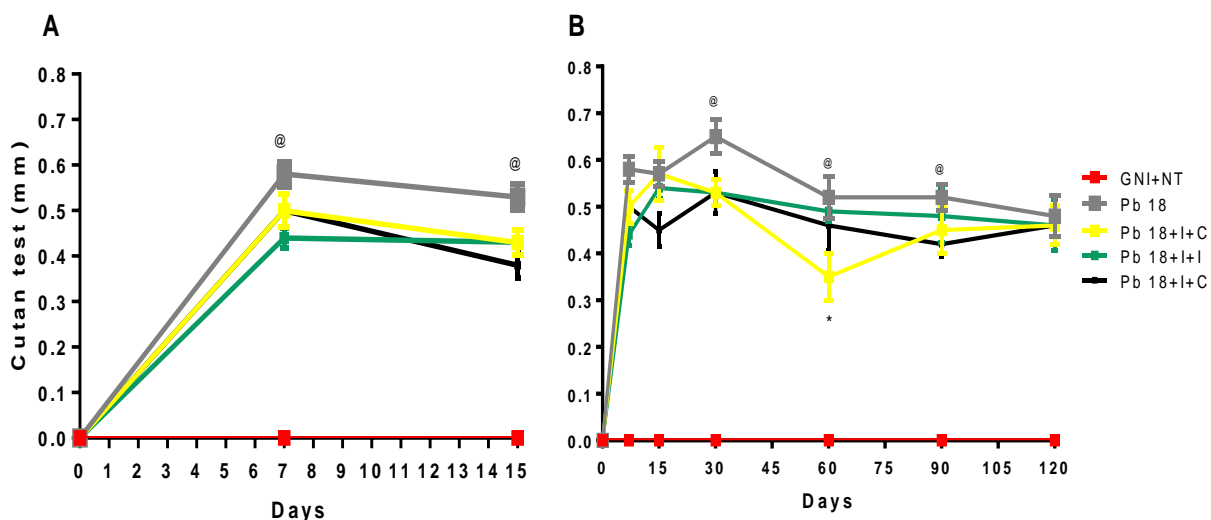
Foi estudada a correlação da higidez do animal com sua resposta imune específica ao *P. brasiliensis*. Para tanto, o desenvolvimento e manutenção de resposta imune específica a este fungo foi verificada conforme mostra as figuras 11, 12 e 13.

A figura 11A são apresentados os resultados do teste de hipersensibilidade de tempos curtos. Foi observado que no 7º dia de infecção o grupo infectado e não tratado apresentou maior reatividade em relação aos demais grupos estudados. Já, no 15º dia de infecção é possível notar que o grupo infectado não tratado ainda teve maior reatividade quando comparado com os demais grupos, com significância estatística de  $p < 0,05$ .

A figura 11B são apresentados os resultados do teste de hipersensibilidade de tempos longos. Nos resultados encontrados foi possível notar que os animais infectados apresentaram maior reatividade principalmente no trigésimo dia de infecção em relação aos animais com os diferentes tratamentos. Também notou que os animais que receberam o tratamento com Celecoxibe tiveram a menor reatividade do que em relação aos demais no sexagésimo dia (Figura 11B). Ao decorrer dos tempos de tratamento os resultados mostram que a reatividade tende a diminuir até mesmo nos animais infectados e não tratados.



Figura 11 - Teste de hipersensibilidade do tipo tardio dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento e 120 dias de infecção e tratamento.



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: A cor vermelha representa grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Cinza grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Amarelo grupo infectado e tratado com Celecoxib (6 mg/Kg). Verde o grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I) (3 mg/Kg). Preto representa o grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (6 mg/Kg) (3 mg/Kg), respectivamente. Os resultados para cada grupo estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média. Diferença estatística entre os grupos (@)  $p < 0,05$  entre Pb 18 vs os diferentes tratamentos e (\*)  $p < 0,01$  entre os diferentes tratamentos, teste *Two Way ANOVA*, pós teste de *Tukey*. Os testes foram realizados em triplicata.

A figura 12 demonstra a concentração de anticorpos no grupo infectado e não tratado e no grupo de animais que receberam os diferentes tratamentos, tanto na infecção inicial (15 dias) quanto tardia (120 dias).

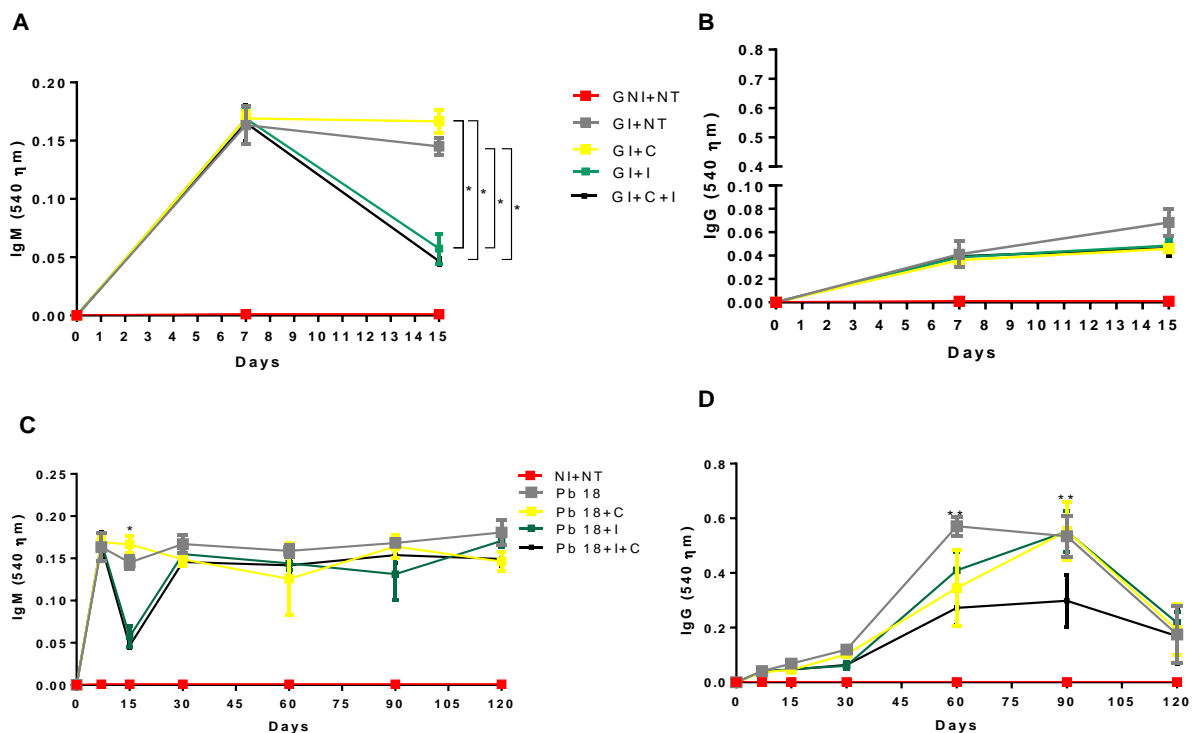
A figura 12A mostra que na infecção de 15 dias houve um pico de produção de IgM no sétimo dia de infecção. Ainda, é possível perceber que no décimo quinto dia os animais que receberam o tratamento somente com Itraconazol e tratamento combinado tiveram um declínio na produção de IgM em relação aos animais infectados e não tratados e tratados somente com Celecoxibe. Na infecção tardia (120 dias) o mesmo se repete no décimo quinto dia de infecção, mas a produção de IgM se mantém constante durante os 120 dias. Não observando diferenças significativas (Figura 12C).

Ainda na figura 12 mostra a concentração de anticorpos no grupo infectado e não tratado e no grupo de animais que receberam os diferentes tratamentos, tanto na infecção inicial (15 dias) quanto tardia (120 dias).

Para o anticorpo IgG (Figura 12B) na infecção de 15 dias todos os animais não apresentaram níveis significativos de produção deste anticorpo. Em contrapartida, na infecção e tratamento por 120 dias (Figura 13B) observou que os animais infectados e não tratados apresentaram um pico de produção deste anticorpo com 60 dias de infecção e o mesmo se

repete aos demais grupos que receberam os diferentes tipos de tratamento ( $p < 0,05$ ). Ao decorrer dos dias de tratamento nota-se que tende a diminuir a concentração deste anticorpo e principalmente no grupo de animais que receberam o tratamento combinado ( $p < 0,05$ ). No 120º dia de infecção todos os grupos não apresentam significância estatística na produção deste anticorpo.

Figura 12 - Concentração do anticorpo IgM e IgG anti-P brasiliensis dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento e 120 dias de infecção e tratamento.



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: A cor vermelha representa grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Cinza grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Amarelo grupo infectado e tratado com Celecoxibe (6 mg/Kg). Verde o grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I) (3 mg/Kg). Preto representa o grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (6 mg/Kg) (3 mg/Kg), respectivamente. Os resultados para cada grupo estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média. Diferença estatística entre os grupos (\*)  $p < 0,01$  e (\*\*)  $p < 0,05$  entre Pb 18 vs os diferentes tratamentos e (\*)  $p < 0,01$  entre os diferentes tratamentos, teste *Two Way* ANOVA, pós teste de *Tukey*. Os testes foram realizados em triplicata.

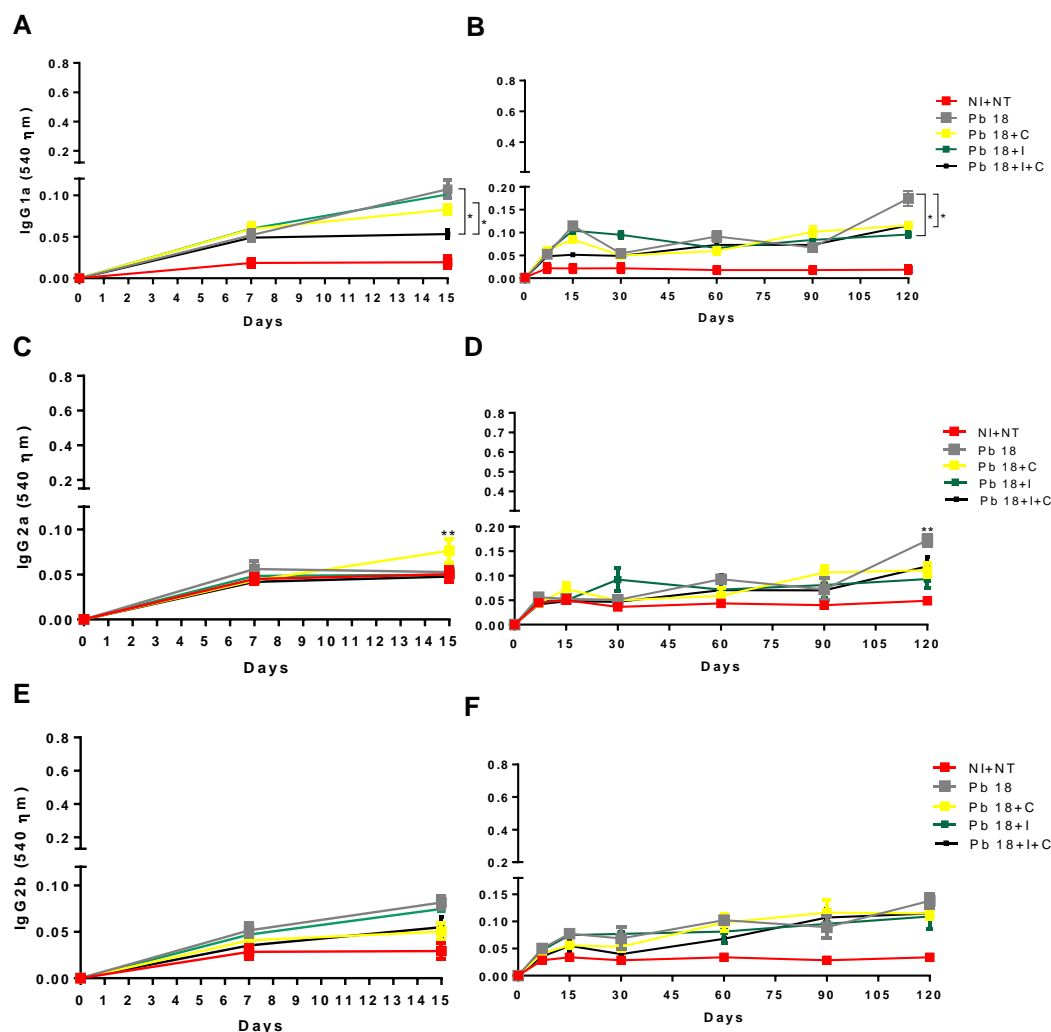
Interessantemente a concentração do anticorpo IgG1a na infecção e tratamento com 15 dias (Figura 13A) os resultados mostram que no décimo quinto dia de infecção os animais do grupo Pb18 e tratados somente com Itraconazol tiveram um pico de produção desta imunoglobulina. No período de infecção e tratamento com 120 dias (Figura 13B) observou que os animais infectados e não tratados tiveram um pico de produção deste anticorpo aos 120 dias de infecção. Ao comparar os grupos que receberam os diferentes tipos de tratamento, uns com os outros, verificou que não houve significância estatística.

Em relação a IgG2a os animais com 15 dias de infecção somente no décimo quinto dia o grupo de animais tratados somente com Celecoxibe tiveram um pico de produção deste anticorpo em relação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ) (Figura 13C). Ao analisar os resultados da infecção por 120 dias somente ao final do tratamento; os animais infectados e não tratados tiveram um pico de produção maior deste anticorpo em relação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ) (Figura 13D).

Por fim, em relação a produção do anticorpo IgG2b os resultados mostram que tanto na infecção inicial e tardia não houve significância estatística na produção deste anticorpo apresentando resultados semelhantes aos animais sadios (NI+NT) (Figura 13E e 13F).

Ao confrontarmos os resultados da produção dos diferentes tipos de anticorpos, observou que o anticorpo IgG apresentou maiores concentrações em relação aos demais e foi possível perceber que o mesmo se repete para IgG1a. Ao analisar, os animais que receberam os diferentes tratamentos se notou uma produção baixa destes anticorpos ao decorrer dos dias de tratamento. Também, pode ser observado na infecção tardia.

Figura 13 - Dosagem da concentração de anticorpos IgG1a, IgG2a e IgG2b anti-*P. brasiliensis* dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento e 120 dias de infecção e tratamento.



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Na cor vermelho representa grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Cinza grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Amarelo grupo infectado e tratado com Celecoxibe (6 mg/Kg). Verde o grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I) (3 mg/Kg). Preto representa o grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (6 mg/Kg) (3 mg/Kg), respectivamente. Os resultados para cada grupo estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média. Diferença estatística entre os grupos (\*)  $p < 0,01$  e (\*\*)  $p < 0,05$  entre Pb 18 vs os diferentes tratamentos e (\*)  $p < 0,01$  entre os diferentes tratamentos, teste *Two Way ANOVA*, pós teste de *Tukey*. Os testes foram realizados em triplicata.

### 5.5 Análise do perfil celular sanguíneo

O perfil de células sanguíneas foi analisado em esfregaços sanguíneos dos diferentes grupos de animais das infecções inicial (15 dias) e tardia (120 dias), conforme mostra a figura 14. Analisando o perfil de células neutrofílicas na infecção inicial os animais infectados apresentam um maior número destas células em relação ao demais grupos ( $p < 0,05$ ). Ao analisar os diferentes tratamentos notou que os animais tratados com a combinação de

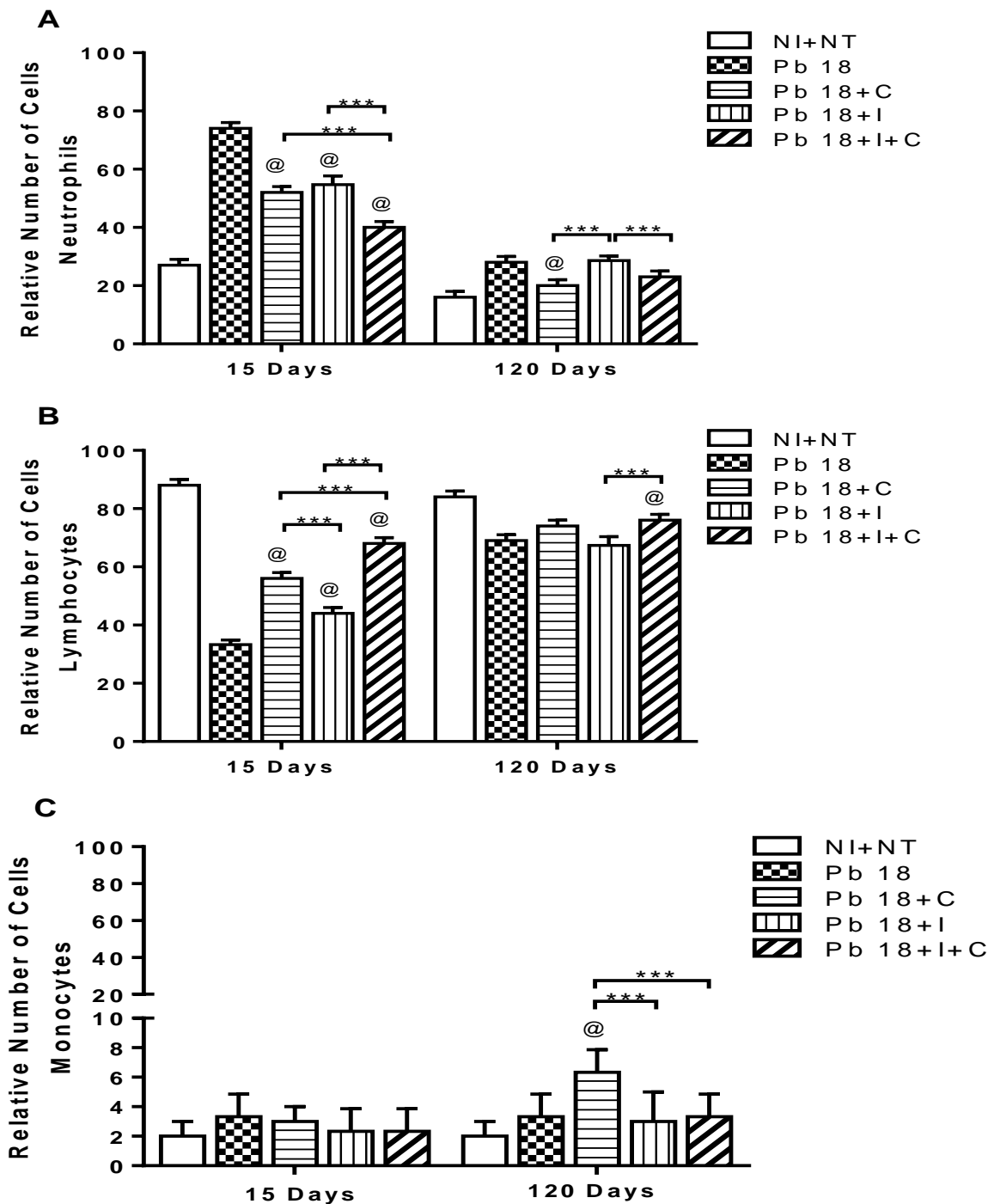
fármacos tiveram um menor número destas células em relação aos demais grupos ( $p < 0,001$ ) (Figura 14A). Na infecção tardia mostra que o percentual destas células é menor em relação a infecção com 15 dias. Ainda, os animais infectados e não tratados e animais tratados somente com Itraconazol apresentam um número maior destas células em relação aos demais grupos.

No perfil de células linfocitárias na infecção inicial os animais infectados e não tratados apresentaram um número menor em relação aos demais grupos. No grupo de animais que receberam o tratamento combinado o número destas células é maior em relação aos demais grupos que receberam os diferentes tratamentos. Na infecção tardia o número de linfócitos nos animais infectados e não tratados é maior em relação a infecção inicial. Em relação aos grupos Pb 18, Pb 18 + C e Pb 18 +I da infecção tardia o perfil destas células é significativamente menor em relação aos animais que receberam o tratamento combinado (Figura 14B).

Em relação ao perfil de células monocitárias na infecção inicial não há significância estatística. Já na infecção tardia há um aumento do número destas células nos animais que receberam somente o tratamento com Celecoxibe e este resultado apresenta significância estatística em relação aos demais grupos (Figura 14C).

Estes resultados de perfil celular sanguíneo mostram que a infecção inicial os animais infectados e não tratados apresentam um número significativo de neutrófilos, mas, na infecção tardia este perfil de células tende a diminuir o que pode sugerir uma melhora clínica. Os animais com tratamento combinado o perfil de células tanto de neutrófilos, linfócitos e monócitos se assemelham aos animais sem infecção. Desta forma, sugerindo que o tratamento tem sido efetivo no controle da infecção. Interessantemente tais resultados podem ser observados na infecção inicial e tardia.

Figura 14 - Perfil celular sanguíneo dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento e 120 dias de infecção e tratamento.



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (6 mg/Kg). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I) (3 mg/Kg). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (6 mg/Kg) (3 mg/Kg), respectivamente. Os resultados para cada grupo estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média. Diferença estatística entre os grupos (@)  $p < 0,05$  entre Pb 18 vs os diferentes tratamentos e (\*\*\*)  $p < 0,001$  entre os diferentes tratamentos, teste *Two Way ANOVA*, pós teste de *Tukey*. Os testes foram realizados em triplicata.

## 5.6 Dosagem da concentração de óxido nítrico (NO)

Através da reação de Griess foi possível mensurar a produção de NO<sub>2</sub> em cada grupo tanto na infecção inicial quanto tardia. A figura 15 representa graficamente os dados obtidos neste experimento.

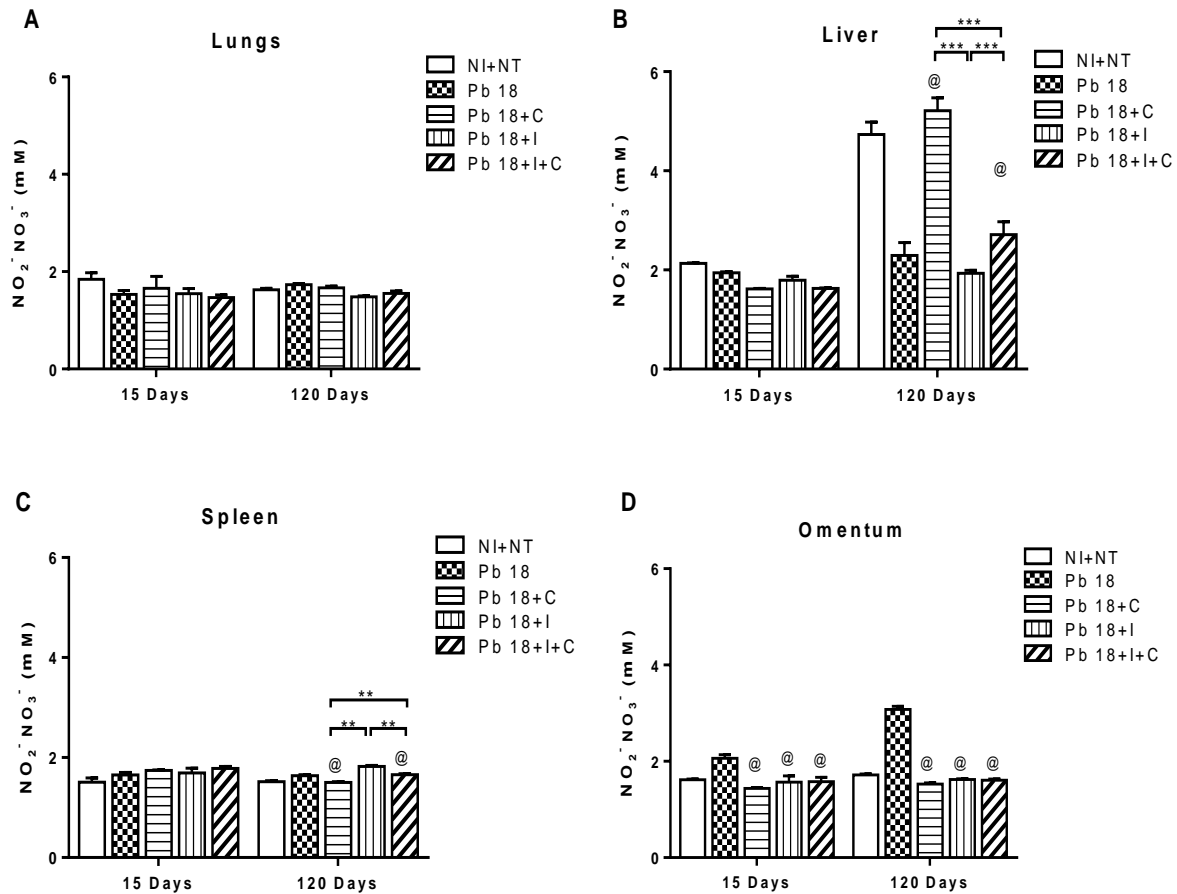
A concentração de óxido nítrico nos pulmões não houve significância estatística tanto na infecção inicial quanto tardia para todos os grupos (Figura 15A). Na infecção inicial, no fígado também não houve níveis significativos da produção de óxido nítrico para todos os grupos (Figura 15B). Em contra partida na infecção tardia os grupos que receberam o tratamento somente com Celecoxibe e tratamento combinado tiveram níveis significativos maiores da concentração de óxido nítrico em relação aos animais infectados e não tratados e em relação ao grupo tratado somente com Itraconazol (Figura 15B).

Na infecção inicial no baço não houve níveis significativos da concentração de óxido nítrico para todos os grupos (Figura 15C). Entretanto, na infecção inicial percebe que há uma redução da concentração de NO<sub>2</sub> nos animais tratados somente com Celecoxibe em relação aos animais infectados, tratados com Itraconazol e com o tratamento combinado (Figura 15C).

Interessantemente no omento/pâncreas na infecção inicial observa que os animais infectados e não tratados apresentaram níveis significativamente maiores de NO em relação aos demais grupos (Figura 15D). O mesmo evento ocorre na infecção tardia (Figura 15D). Os resultados mostraram que não houve significância estatística ao comparar somente os animais que receberam os diferentes tratamentos tanto na infecção inicial quanto tardia.

Os resultados apresentados sugerem que na fase inicial da infecção há uma baixa concentração da produção de óxido nítrico nos seguintes órgãos pulmão, fígado e baço, mas no omento/pâncreas há uma produção significativa maior. O omento/pâncreas é órgão de choque neste modelo de infecção, portanto sugerindo que nos animais infectados e não tratados as células tentam controlar o processo infeccioso. Já nos animais que receberam os diferentes tratamentos e em especial o tratamento combinado sugere que a infecção já está controlada mesmo sendo na infecção inicial. Podendo inferir que o tratamento está atuando de forma efetiva nesta fase inicial da infecção.

Figura 15 - Concentração de óxido nítrico do sobrenadante de macerado de órgãos dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento e 120 dias de infecção e tratamento.



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (6 mg/Kg). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I) (3 mg/Kg). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (6 mg/Kg) (3 mg/Kg), respectivamente. Os resultados para cada grupo estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média. Diferença estatística entre os grupos (@)  $p < 0,05$  entre Pb 18 vs os diferentes tratamentos e (\*\*\*)  $p < 0,05$  entre os diferentes tratamentos, teste *Two Way ANOVA*, pós teste de *Tukey*. Os testes foram realizados em triplicata.

### 5.7 Concentração de citocinas

O perfil de citocinas produzidas após infecção por *P. brasiliensis* seguido ou não dos tratamentos foi analisado a partir de dosagens de sua concentração em sobrenadantes de macerados de órgãos, conforme mostra as figuras 16 a 21.



### 5.7.1 Concentração de IL-12

A figura 16 mostra os resultados encontrados através da dosagem da citocina IL-12 em diferentes órgãos. Ao analisar os dados da infecção inicial (15 dias), percebemos que nos pulmões os animais que receberam tratamento somente com Celecoxibe tiveram menores concentrações de IL-12 em relação aos demais grupos. Os resultados de infecção tardia mostraram que os animais tratados somente com Celecoxibe e Itraconazol apresentaram altas concentrações de IL-12 em relação aos demais grupos. Os animais que recebeu o tratamento combinado apresentaram menores concentrações de IL-12 em relação aos animais que receberam os diferentes tratamentos (Figura 16A).

Analisando os dados da infecção inicial no fígado os animais tratados somente com Itraconazol apresentaram maiores concentrações de IL-12 em relação aos demais. Já, na infecção tardia os animais que recebeu o tratamento combinado apresentaram menores concentrações de IL-12 em relação aos demais (Figura 16B).

Analisando os resultados da dosagem da citocina IL-12 no baço todos os animais que receberam os diferentes tratamentos apresentaram menores concentrações desta citocina na infecção inicial. Na infecção tardia os animais que recebeu o tratamento combinado apresentaram menores concentrações de IL-12 em relação aos demais grupos (Figura 16C).

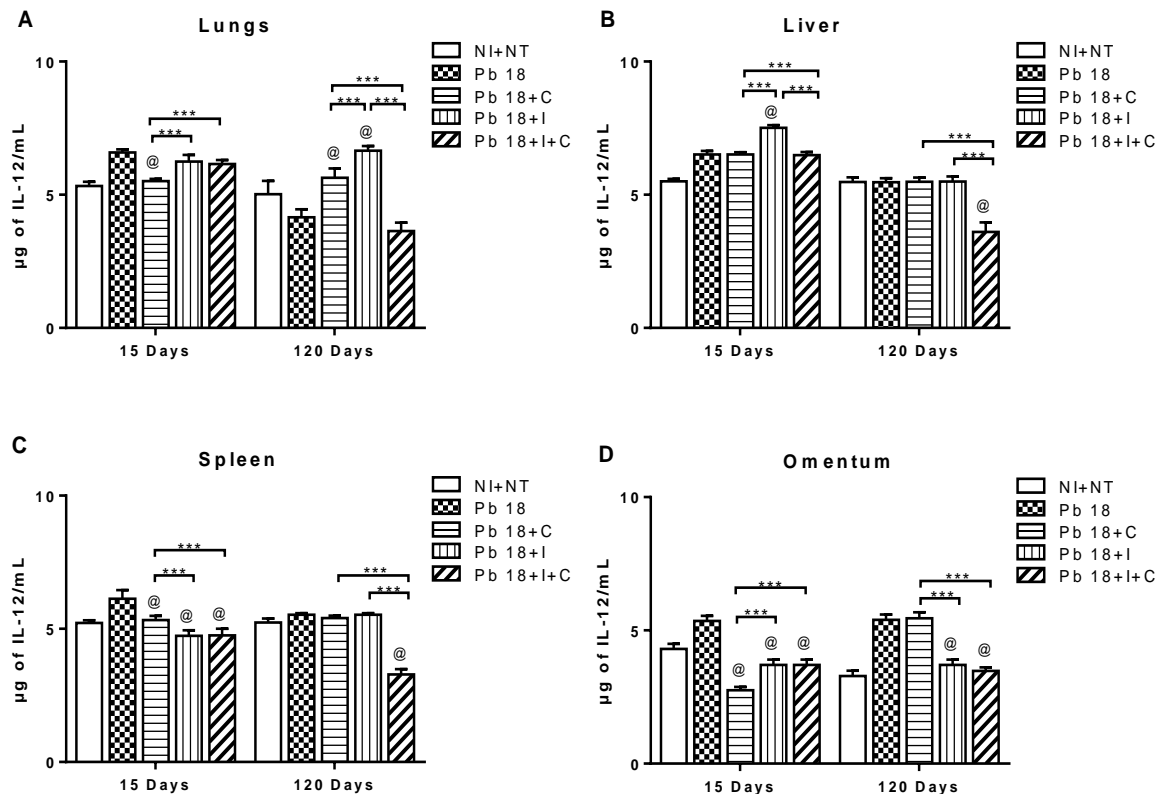
Na infecção inicial no omento/pâncreas foi possível perceber que todos os animais que receberam os diferentes tratamentos apresentaram menores concentrações de IL-12 em relação aos animais infectados e não tratados. Os animais tratados somente com Celecoxibe apresentou menores concentrações desta citocina em relação aos diferentes grupos que receberam os tratamentos. Por fim, na infecção tardia os animais tratados somente com Itraconazol e com tratamento combinado apresentaram menores concentrações desta citocina em relação aos demais (Figura 16D).

Estes resultados demonstraram que todos os órgãos dos animais infectados e não tratados na infecção inicial tiveram altas concentrações de IL-12. Desta forma, sugerindo um efeito imunomodulatório desta citocina. Já na fase tardia de infecção, os resultados mostraram que somente no pulmão os animais infectados e não tratados apresentaram menores concentrações desta citocina. Tal resultado pode sugerir que o fungo pode estar influenciado na secreção desta citocina na fase tardia nos pulmões e permitindo a sua disseminação, o que de fato poderia estar agravando o quadro infeccioso.

Em contrapartida os animais com tratamento combinado apresentaram também menores concentrações desta citocina na fase inicial e também na fase tardia de infecção. Nesta situação, pode sugerir que o tratamento combinado foi capaz de modular a produção

desta citocina em todos os órgãos. Sendo assim, inferindo que houve uma redução de células fúngicas teciduais. A contagem do número de células fúngicas viáveis (CFU), pode reforçar esta hipótese.

Figura 16 - Concentração de IL-12 do sobrenadante de macerado de órgãos dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento e 120 dias de infecção e tratamento.



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (6 mg/Kg). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I) (3 mg/Kg). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (6 mg/Kg) (3 mg/Kg), respectivamente. Os resultados para cada grupo estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média. Diferença estatística entre os grupos (@)  $p < 0,05$  entre Pb 18 vs os diferentes tratamentos e (\*\*\*)  $p < 0,001$  entre os diferentes tratamentos, teste *Two Way ANOVA*, pós teste de *Tukey*. Os testes foram realizados em triplicata.

### 5.7.2 Concentração de IL-17

Em relação à concentração da citocina IL-17, os resultados são apresentados na figura 17. Na fase inicial da infecção nos pulmões os animais tratados somente Itraconazol e tratamento combinado apresentaram altas concentrações desta citocina. Portanto, sendo significativamente estatístico em relação aos animais infectados e não tratados e aos diferentes tratamentos ( $p < 0,05$ ) ( $p < 0,001$ ) respectivamente. Na infecção tardia os animais

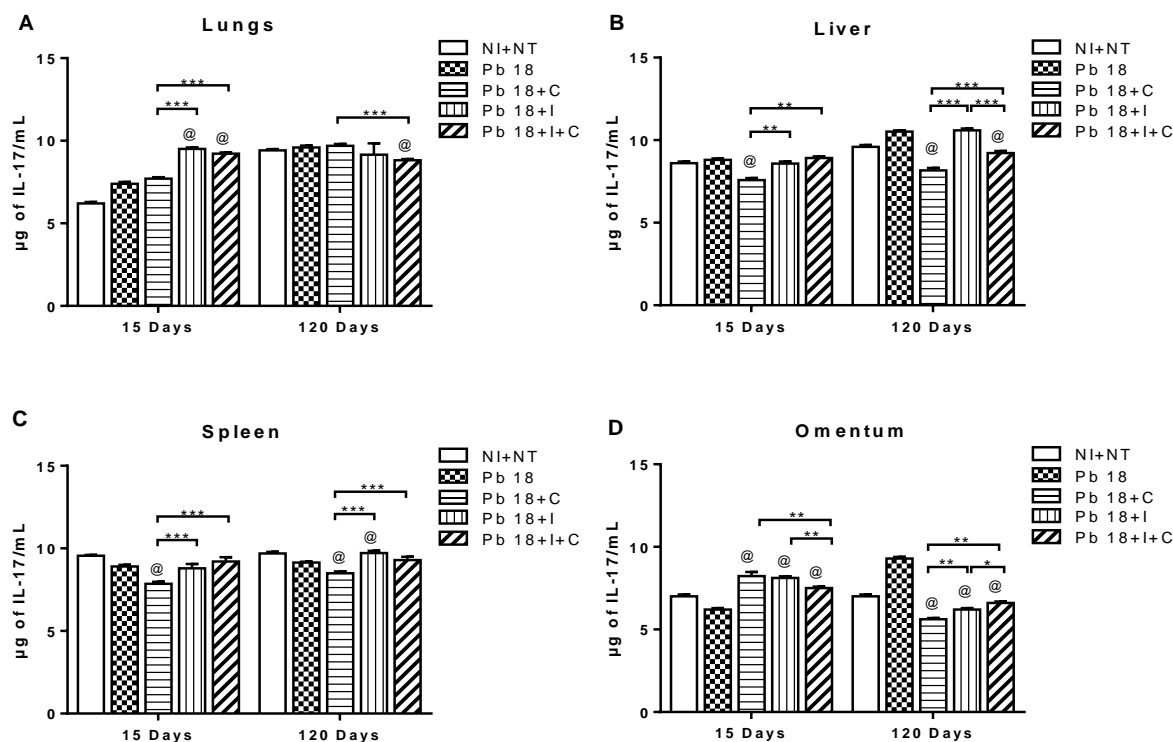
com tratamento combinado apresentaram menores concentrações de IL-17 em relação aos animais infectados e não tratados e somente com Celecoxibe (Figura 17A).

No fígado somente os animais tratados com Celecoxibe apresentaram menores concentrações desta citocina em relação aos demais na fase inicial da infecção. Já na fase tardia também percebeu este mesmo resultado. Também, houve um aumento significativo na concentração desta citocina nos animais tratados somente com Itraconazol em relação aos demais com tratamentos distintos (Figura 17B).

Na infecção inicial no baço os animais tratados somente com Celecoxibe apresentaram menores concentrações de IL-17 em relação aos animais infectados e não tratados e aos que receberam diferentes tratamentos. Na fase tardia também é possível perceber este mesmo resultado. Houve um aumento significativo de IL-17 nos animais que recebeu somente o tratamento com Itraconazol em relação aos animais infectados e não tratados (Figura 17C).

Ao analisar os resultados da dosagem de IL-17 no omento/pâncreas na fase inicial todos os animais que receberam tratamentos distintos apresentaram maiores concentrações desta citocina em relação aos animais infectados e não tratados. Analisando os diferentes tratamentos, os animais que receberam o tratamento combinado apresentaram menores concentrações desta citocina em relação aos demais. Na fase tardia da infecção curiosamente houve uma redução significativa desta citocina em todos os grupos de animais que receberam os distintos tratamentos em relação aos animais infectados e não tratados (Figura 17D).

Figura 17 - Concentração de IL-17 do sobrenadante de macerado de órgãos dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento e 120 dias de infecção e tratamento.



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (6 mg/Kg). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I) (3 mg/Kg). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (6 mg/Kg) (3 mg/Kg), respectivamente. Os resultados para cada grupo estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média. Diferença estatística entre os grupos (@)  $p < 0,05$  entre Pb 18 vs os diferentes tratamentos e (\*\*\*)  $p < 0,001$  entre os diferentes tratamentos, teste *Two Way ANOVA*, pós teste de *Tukey*. Os testes foram realizados em triplicata.

### 5.7.3 Concentração de GM-CSF

Os resultados da concentração da citocina GM-CSF são mostrados na figura 18. Foi observado nos pulmões na infecção inicial que os animais tratados somente com Itraconazol e com o tratamento combinado apresentaram concentrações significativamente maiores em relação aos demais grupos. Ao analisar a infecção tardia, houve uma redução significativa nos animais que foram tratados com a combinação de fármacos em relação aos animais infectados e não tratados (Figura 18A).

No fígado, na infecção inicial houve uma redução significativa da concentração de GM-CSF nos animais tratados somente com Celecoxibe ao comparar com os demais.

Analisando a infecção tardia também há uma redução desta citocina nos animais tratados somente com Celecoxibe, em relação aos demais. Os animais que recebeu o tratamento combinado também foram significativamente menores a concentração desta citocina em relação aos demais grupos (Figura 18B).

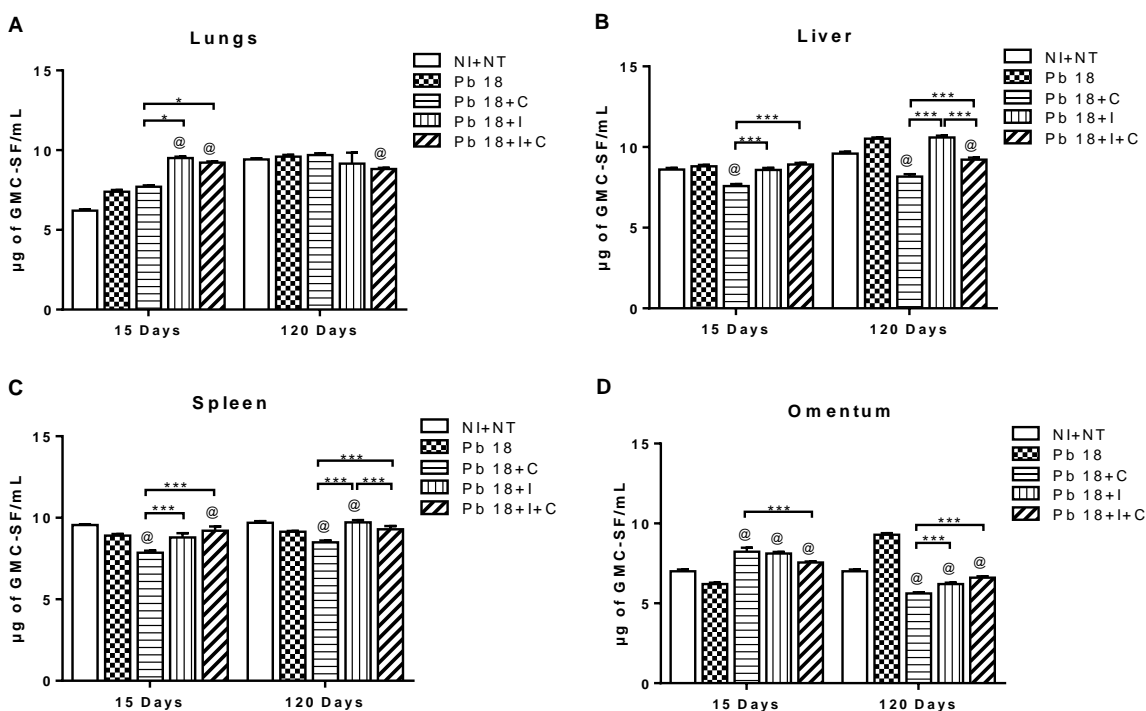
Observando os resultados apresentados pela dosagem desta citocina no baço na fase inicial há uma redução nos animais tratados somente com Celecoxibe e um aumento nos animais que receberam o tratamento combinado. Observando os resultados apresentados na fase tardia da infecção houve uma redução significativa desta citocina nos animais somente tratados com Celecoxibe e um aumento significativo nos animais tratados somente com Itraconazol em relação aos demais (Figura 18C).

Na fase inicial no omento/pâncreas há um aumento significativo da concentração de GM-CSF em todos os grupos que receberam distintos tratamentos em relação aos animais infectados e não tratados. Na fase tardia foi possível perceber que ocorreu o contrário (Figura 18D).

Os resultados apresentados na dosagem da concentração desta citocina em todos os órgãos o tratamento foi capaz de imunomodular a concentração de GM-CSF. Na fase inicial da infecção os animais infectados e não tratados a concentração desta citocina em todos os órgãos foi menor do que em relação a fase tardia. Isto, sugere que esta citocina tem uma maior participação na resposta imune quando a infecção é crônica. Os animais que receberam o tratamento combinado na fase inicial há uma maior concentração de GM-CSF com exceção do fígado.

Em contrapartida na fase tardia há uma redução, sendo, muito semelhante aos resultados apresentados pelos animais sadios. Tal fato, pode sugerir que neste momento da infecção pode estar ocorrendo um controle do processo infeccioso e conseqüentemente da resposta imune, no órgão de choque (omento/pâncreas).

Figura 18 - Concentração de GM-CSF do sobrenadante de macerado de órgãos dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento e 120 dias de infecção e tratamento.



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (6 mg/Kg). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I) (3 mg/Kg). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (6 mg/Kg) (3 mg/Kg), respectivamente. Os resultados para cada grupo estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média. Diferença estatística entre os grupos (@)  $p < 0,05$  entre Pb 18 vs os diferentes tratamentos e (\*\*\*)  $p < 0,001$  entre os diferentes tratamentos, teste *Two Way ANOVA*, pós teste de *Tukey*. Os testes foram realizados em triplicata.

### 5.7.4 Concentração de IL-4

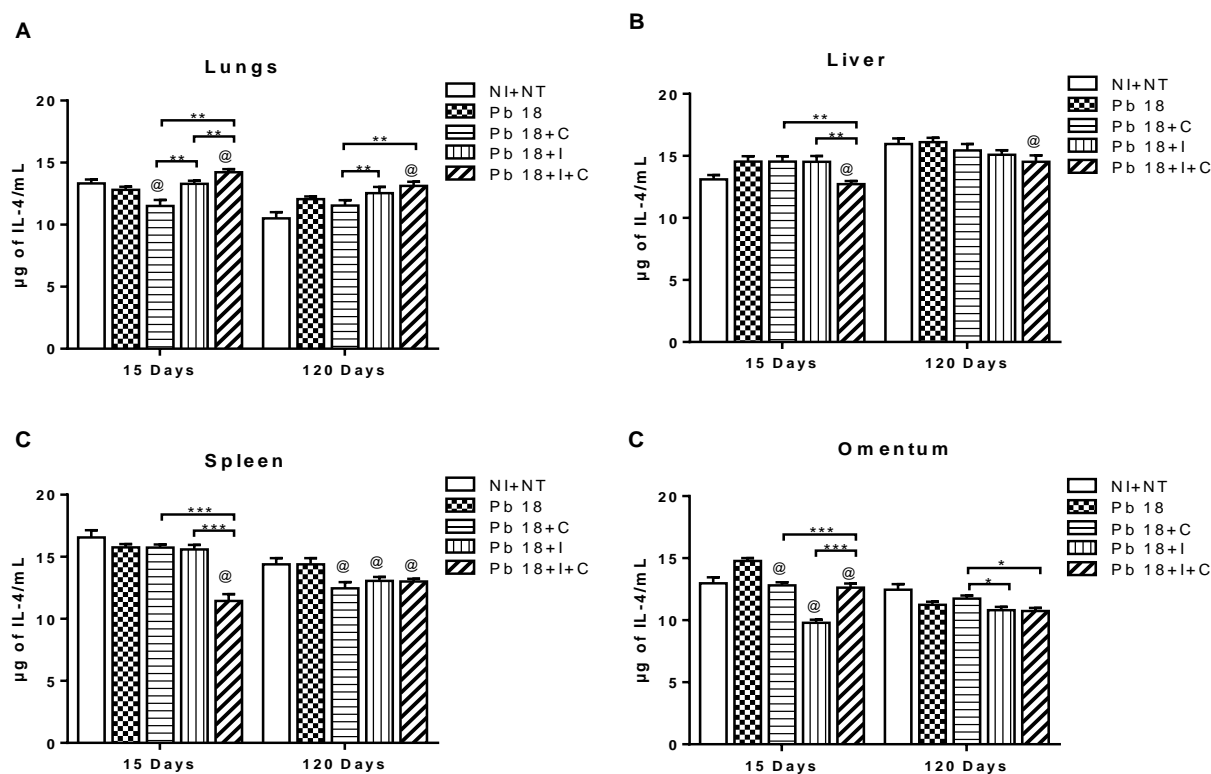
A citocina IL-4 foi dosada em diferentes órgãos como mostra os resultados da figura 19. Na fase inicial da infecção os pulmões os resultados mostraram que houve uma redução significativa desta citocina nos animais que receberam somente o tratamento com Celecoxibe. Notou que houve um aumento significativo desta citocina nos animais que receberam o tratamento combinado. Na fase tardia também observou este aumento em relação aos animais infectados e não tratados (Figura 19A).

Os resultados encontrados no fígado mostraram que houve uma redução significativa de IL-4 nos animais com tratamento combinado na fase inicial da infecção em relação aos demais. Tais resultados também podem ser observados na fase tardia da infecção (Figura 19B).

No baço os animais com o tratamento combinado também foram capazes de reduzir a concentração de IL-4 na fase inicial da infecção ao comparar com os demais. Na fase tardia os diferentes tratamentos também reduziram a concentração desta citocina ao comparar com os animais infectados e não tratados (Figura 19C).

Curiosamente no omento/pâncreas na fase inicial da infecção houve uma redução significativa em relação aos animais infectados e não tratados. Na fase tardia não houve significância estatística entre os diferentes tratamentos em relação aos animais infectados e não tratados (Figura 19D).

Figura 19: Concentração de IL-4 do sobrenadante de macerado de órgãos dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento e 120 dias de infecção e tratamento.



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxib (6 mg/Kg). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I) (3 mg/Kg). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (6 mg/Kg) (3 mg/Kg), respectivamente. Os resultados para cada grupo estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média. Diferença estatística entre os grupos (@)  $p < 0,05$  entre Pb 18 vs os diferentes tratamentos e (\*\*\*)  $p < 0,001$  entre os diferentes tratamentos, teste *Two Way ANOVA*, pós teste de *Tukey*. Os testes foram realizados em triplicata.

### 5.7.5 Concentração de KC (IL-8)

A citocina KC (IL-8) foi dosada em diferentes órgãos conforme mostra a figura 20. Na fase inicial da infecção, nos pulmões, houve uma redução significativa da concentração desta citocina nos animais tratados com Celecoxibe em relação aos demais. Na fase tardia também foi observada esta redução neste grupo de animais e também nos animais infectados e não tratados. Os animais tratados somente com Itraconazol e com o tratamento combinado na fase tardia houve um aumento significativo da concentração desta citocina em relação aos demais. A concentração desta citocina foi menor em todos os animais na fase tardia da infecção (Figura 20A).

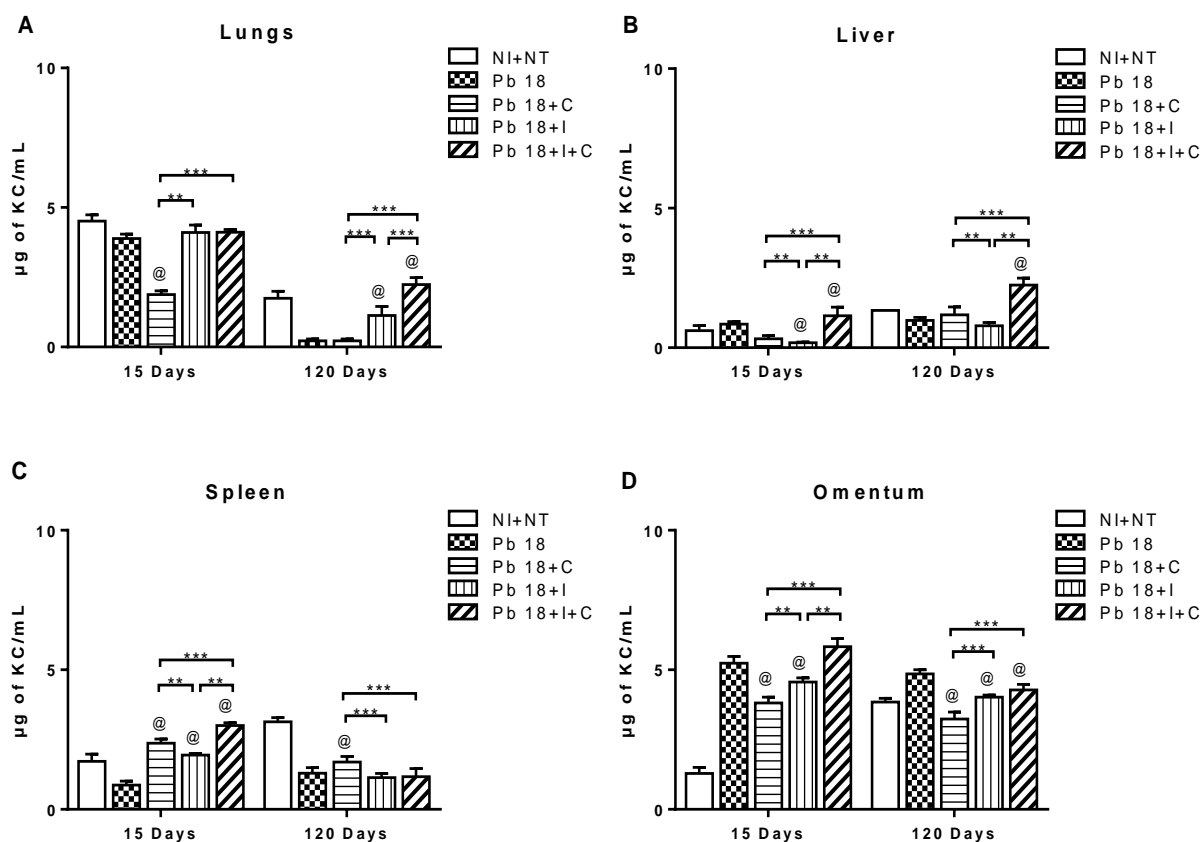
No fígado observa-se que há um aumento significativo da concentração de KC (IL-8) nos animais tratados com a combinação de fármacos, tanto na fase inicial quanto tardia da infecção. Uma redução da concentração de KC (IL-8) nos animais tratados somente com Itraconazol também na fase inicial da infecção (Figura 20B).

No baço houve um aumento da concentração desta citocina em todos os animais que receberam os diferentes tratamentos na fase inicial da infecção. Ao analisar os resultados da fase tardia houve uma redução da concentração desta citocina em todos os animais tratados com os diferentes tratamentos em relação aos animais infectados e não tratados. Na fase tardia observou um aumento significativo da concentração de KC (IL-8) e nos animais tratados somente com Celecoxibe em relação aos demais (Figura 20C).

Já no omento/pâncreas na fase inicial há uma redução da concentração desta citocina nos animais tratados com Celecoxibe e somente com Itraconazol em relação aos demais. Na fase tardia curiosamente foi observado uma redução significativa da concentração de KC (IL-8) em todos os animais que receberam os diferentes tipos de tratamento comparado com os animais infectados e não tratados (Figura 20D).



Figura 20 - Concentração de KC do sobrenadante de macerado de órgãos dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento e 120 dias de infecção e tratamento.



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxib (6 mg/Kg). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I) (3 mg/Kg). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (6 mg/Kg) (3 mg/Kg), respectivamente. Os resultados para cada grupo estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média. Diferença estatística entre os grupos (@)  $p < 0,05$  entre Pb 18 vs os diferentes tratamentos e (\*\*\*)  $p < 0,001$  entre os diferentes tratamentos, teste *Two Way ANOVA*, pós teste de *Tukey*. Os testes foram realizados em triplicata.

### 5.7.6 Concentração de IFN- $\gamma$

A figura 21 mostra os resultados encontrados através da dosagem da citocina IFN- $\gamma$  em diferentes órgãos. Ao analisar os dados da infecção inicial (15 dias), percebemos que nos pulmões os animais que receberam tratamento somente com Celecoxibe tiveram menores concentrações de IFN- $\gamma$  em relação aos demais grupos. Os resultados de infecção tardia mostraram que os animais tratados somente com Celecoxibe e Itraconazol apresentaram altas concentrações de IFN- $\gamma$  em relação aos demais grupos. Os animais que recebeu o tratamento combinado apresentaram menores concentrações de IFN- $\gamma$  em relação aos animais que receberam os diferentes tratamentos (Figura 21A).

Analisando os dados da infecção inicial no fígado os animais tratados somente com Itraconazol apresentaram maiores concentrações de IFN- $\gamma$  em relação aos demais. Já, na infecção tardia os animais que recebeu o tratamento combinado apresentaram menores concentrações de IFN- $\gamma$  em relação aos demais (Figura 21B).

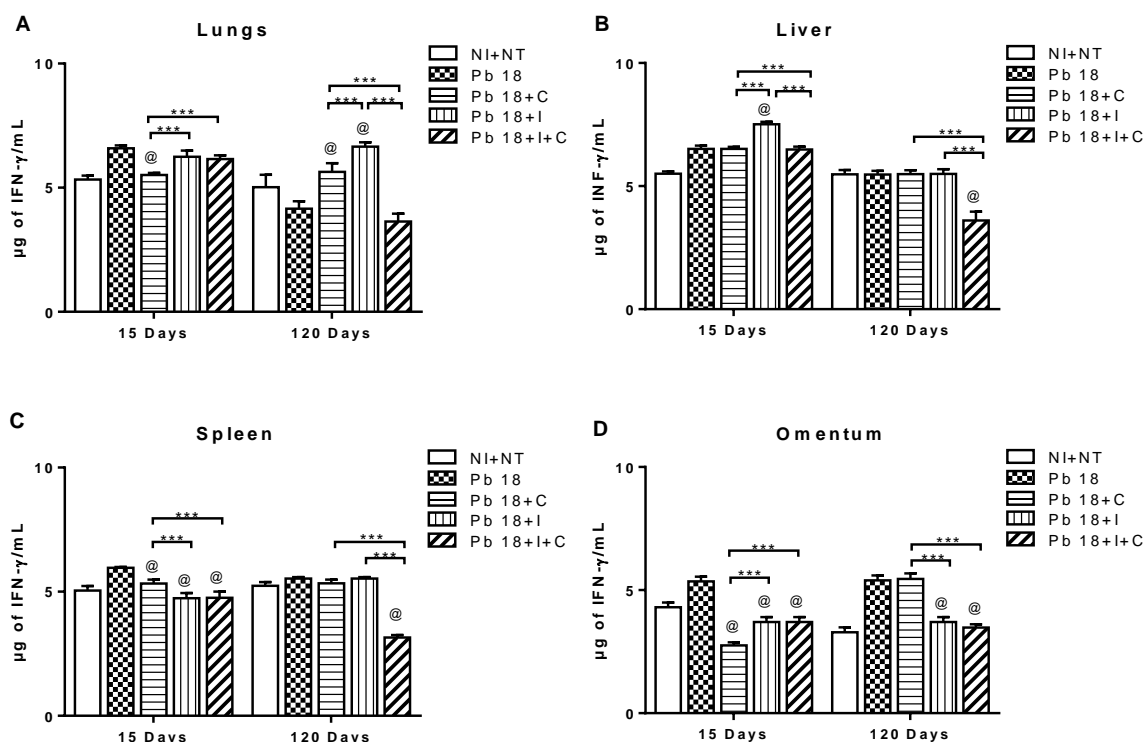
Analisando os resultados da dosagem da citocina IFN- $\gamma$  no baço todos os animais que receberam os diferentes tratamentos apresentaram menores concentrações desta citocina na infecção inicial. Na infecção tardia os animais que recebeu o tratamento combinado apresentaram menores concentrações de IFN- $\gamma$  em relação aos demais grupos (Figura 21C).

Na infecção inicial no omento/pâncreas foi possível perceber que todos os animais que receberam os diferentes tratamentos apresentaram menores concentrações de IFN- $\gamma$  em relação aos animais infectados e não tratados. Os animais tratados somente com Celecoxibe apresentou menores concentrações desta citocina em relação aos diferentes grupos que receberam os tratamentos. Por fim, na infecção tardia os animais tratados somente com Itraconazol e com tratamento combinado apresentaram menores concentrações desta citocina em relação aos demais (Figura 21D).

Estes resultados demonstraram que todos os órgãos dos animais infectados e não tratados na infecção inicial tiveram altas concentrações de IFN- $\gamma$ . Desta forma, sugerindo um efeito imunomodulatório desta citocina. Já na fase tardia de infecção, os resultados mostraram que somente no pulmão os animais infectados e não tratados apresentaram menores concentrações desta citocina. Tal resultado pode sugerir que o fungo pode estar influenciado na secreção desta citocina na fase tardia nos pulmões e permitindo a sua disseminação, o que de fato poderia estar agravando o quadro infeccioso.

Em contrapartida os animais com tratamento combinado apresentaram também menores concentrações desta citocina na fase inicial e também na fase tardia de infecção. Nesta situação, pode sugerir que o tratamento combinado foi capaz de modular a produção desta citocina em todos os órgãos. Sendo assim, inferindo que houve uma redução de células fúngicas teciduais. A contagem do número de células fúngicas viáveis (CFU), pode reforçar esta hipótese.

Figura 21 - Concentração de IFN- $\gamma$  do sobrenadante de macerado de órgãos dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento e 120 dias de infecção e tratamento.



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (6 mg/Kg). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I) (3 mg/Kg). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (6 mg/Kg) (3 mg/Kg), respectivamente. Os resultados para cada grupo estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média. Diferença estatística entre os grupos (@)  $p < 0,05$  entre Pb 18 vs os diferentes tratamentos e (\*\*\*)  $p < 0,001$  entre os diferentes tratamentos, teste *Two Way ANOVA*, pós teste de *Tukey*. Os testes foram realizados em triplicata.

## 5.8 Análise histológica geral dos órgãos na infecção inicial (15 dias)

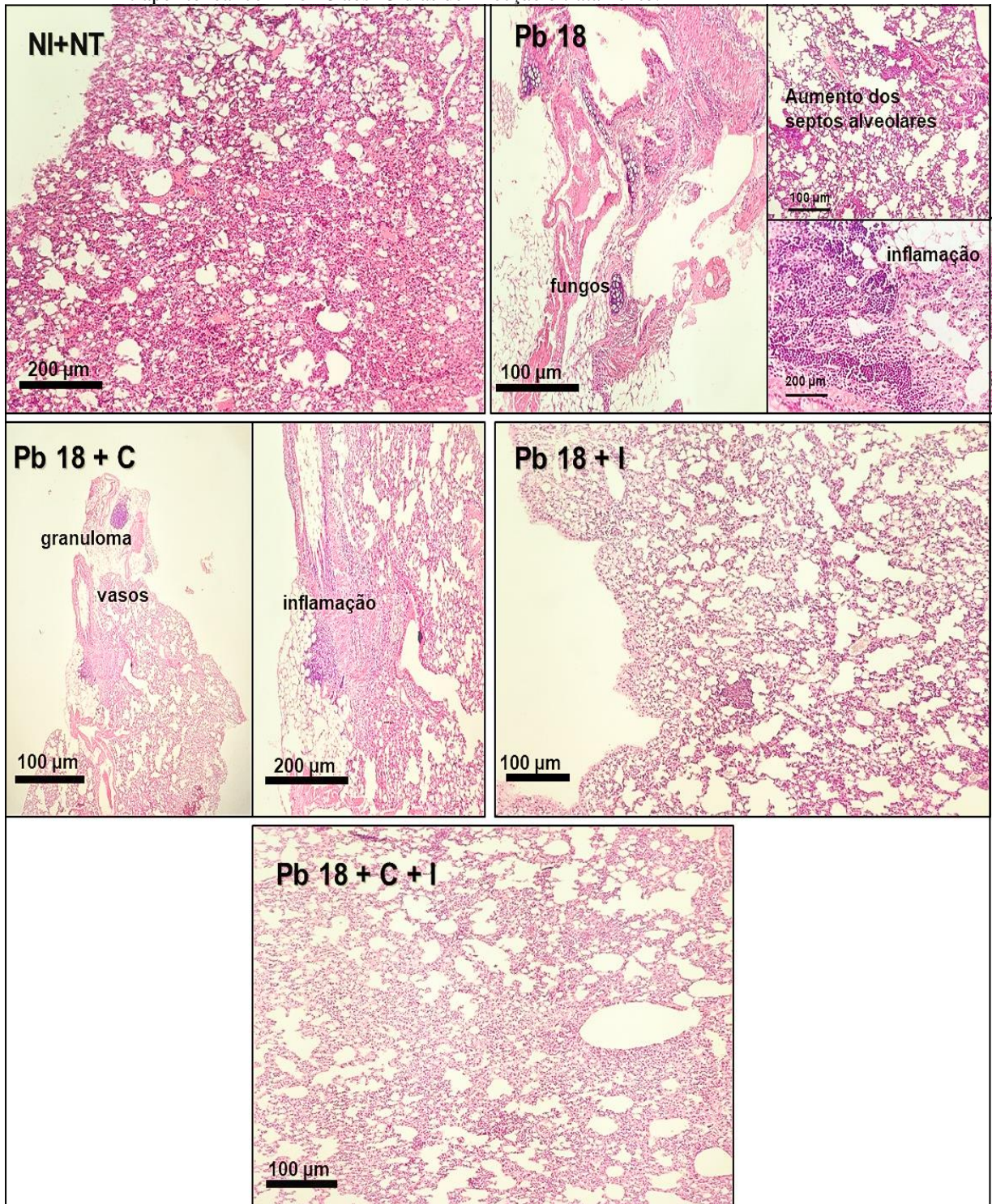
### 5.8.1 Análise histopatológica geral dos pulmões dos animais infectados e infectados e tratados

Os aspectos histológicos foram analisados com o intuito de avaliar as características das lesões e verificar se os tratamentos foram capazes de minimizá-las (Figura 22). Através da análise histopatológica dos pulmões os animais não infectados e não tratados (NI+NT), apresentaram aspectos morfológicos dentro da normalidade.

Ao analisar as lâminas obtidas de material coletado de animais apenas infectados com Pb 18 notou intenso processo inflamatório. Há espaçamento dos septos alveolares e

colapso alveolar. Observou acúmulo de leucócitos mononucleares e polimorfonucleares no espaço alveolar. Também há presença de vasos distribuídos pelo tecido, com presença de granulomas e formas fúngicas. No grupo tratado com Celecoxibe (Pb18 + C) observou moderado processo inflamatório. Há espaçamento de septos e colapso alveolar. Ainda há, acúmulo de leucócitos mononucleares e polimorfonucleares no espaço alveolar e alguns granulomas e fungos. No grupo tratado com Itraconazol (Pb18 + I) a histologia mostrou pouco processo inflamatório, com poucas áreas de espaçamento alveolar e dos septos. Verifica-se pouca quantidade de granulomas e fungos (Figura 23). Já no grupo com tratamento combinado (Pb 18 + I + C) há pouco processo inflamatório, granuloma e fungos (Figura 23). Não há espaçamento de septos alveolares e colapso alveolar (Figura 22).

Figura 21 - Análise histopatológica das lesões granulomatosas em pulmões dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 aos 15 dias de infecção e tratamento.

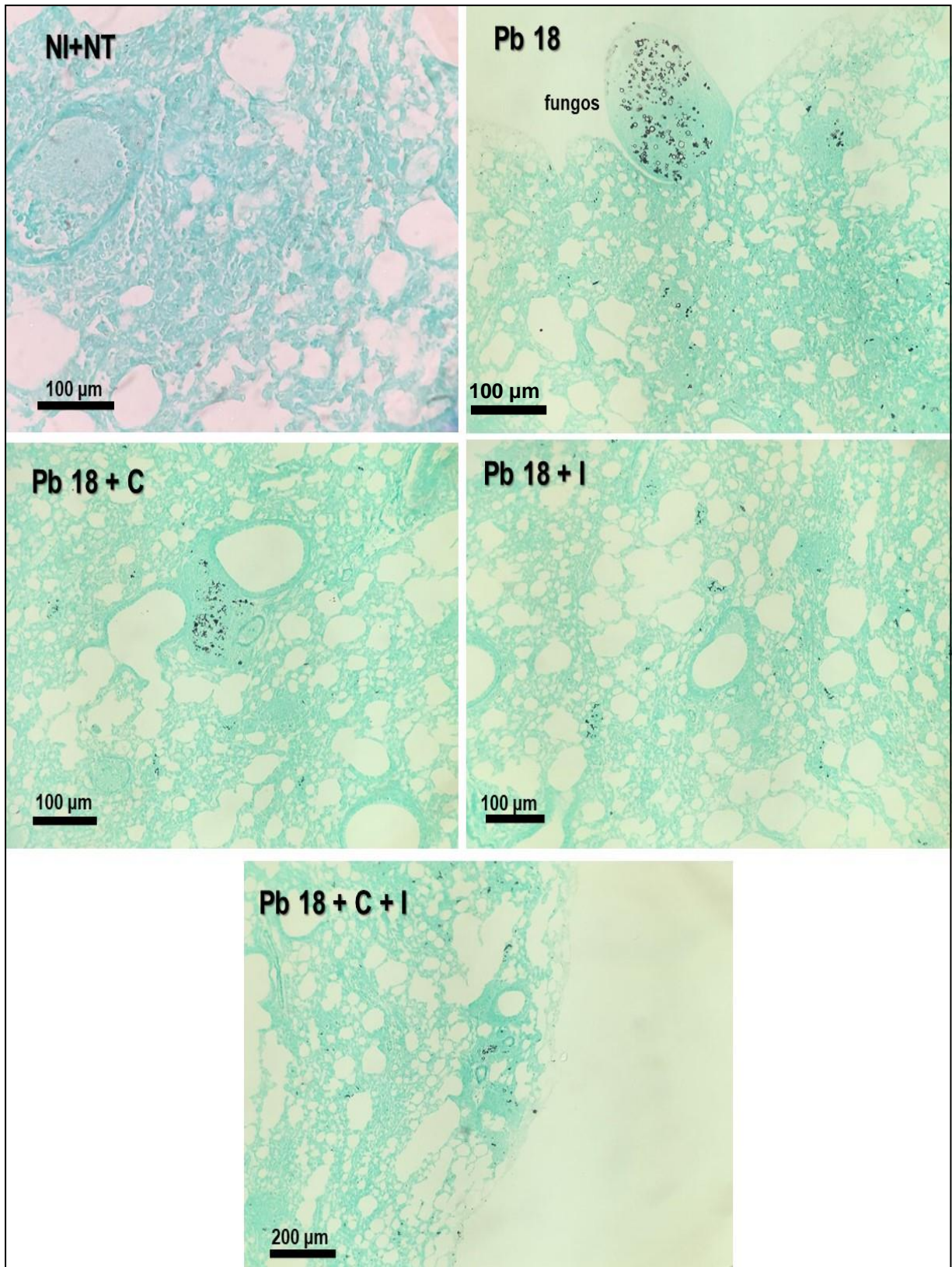


Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (Pb 18 + C). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (Pb 18 + C + I), respectivamente. Microscopia de campo claro (coloração: hematoxilina-eosina/HE). Aumento: NI+NT, 200  $\mu\text{m}$  = 400X; Pb18, 100  $\mu\text{m}$  = 100X e 200  $\mu\text{m}$  = 400X; Pb18 + C 100  $\mu\text{m}$  = 100X e 200  $\mu\text{m}$  = 400X; Pb18 + I, 100  $\mu\text{m}$  = 100X; Pb18 + C + I, 100  $\mu\text{m}$  = 100X.



Figura 22 - Análise quanto à presença de fungos em pulmões nos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento.



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (Pb 18 + C). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (Pb 18 + C + I), respectivamente.

Microscopia de campo claro (coloração: tricrômico de gomori). Aumento: NI+NT, 100  $\mu\text{m}$  = 1 00X; Pb18, 100  $\mu\text{m}$  = 100X; Pb18 + C 100  $\mu\text{m}$  = 100X; Pb18 + I, 100  $\mu\text{m}$  = 100X; Pb18 + C + I, 200  $\mu\text{m}$  = 400X.

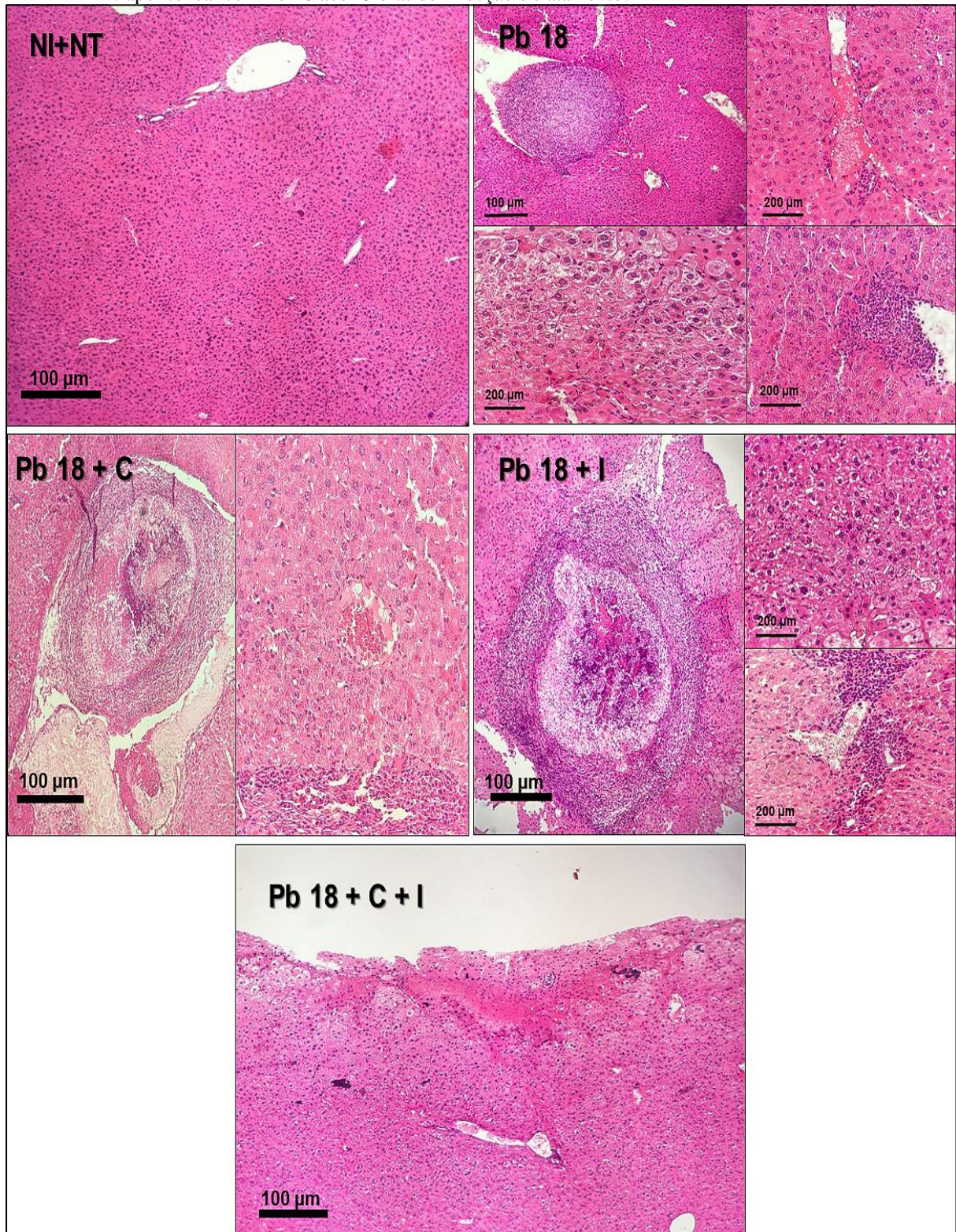
### **5.8.2 Análise histopatológica geral do fígado dos animais infectados e infectados e tratados**

Os aspectos histológicos do fígado dos animais não infectados e não tratados (NI+NT), mostraram dentro da normalidade. Já os animais infectados com Pb18 há hipertrofia de hepatócitos e com cordões celulares bem espaçados e dilatação do espaço sinusal. Também há presença de vários focos de processo inflamatório e com algumas áreas de necrose e congestão vascular. As células inflamatórias presentes são neutrófilos em sua maioria, podendo ser encontradas ao redor do granuloma e em vários pontos distribuídos pelo tecido. Verificou-se intensa quantidade de fungos (Figura 24) e (Figura 25).

Os animais tratados com Celecoxibe (Pb18 + C) percebeu poucas áreas de hipertrofia, cordões celulares bem espaçados e dilatação do espaço sinusal. Há focos de inflamação e presença de fungos (Figura 25). Em algumas áreas há presença de granuloma. Já os animais tratados com Itraconazol (Pb 18 + I) ainda há algumas áreas de hipertrofia de hepatócitos e com cordões celulares bem espaçados e dilatação do espaço sinusal. Pode ser observado em algumas áreas do tecido processo inflamatório. As células inflamatórias podem ser encontradas ao redor dos granulomas e também presença de necrose e moderada quantidade de células fúngicas (Figura 25). Por fim, os animais com tratamento combinado (Pb 18 + I + C) há poucas áreas com hipertrofia de hepatócitos. Os cordões celulares não estão espaçados e pouca dilatação do espaço sinusal. Há poucos focos de inflamação, granulomas, fungos (Figura 25) e vasos (Figura 24).



Figura 23 - Análise histopatológica das lesões granulomatosas no fígado dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 aos 15 dias de infecção e tratamento.

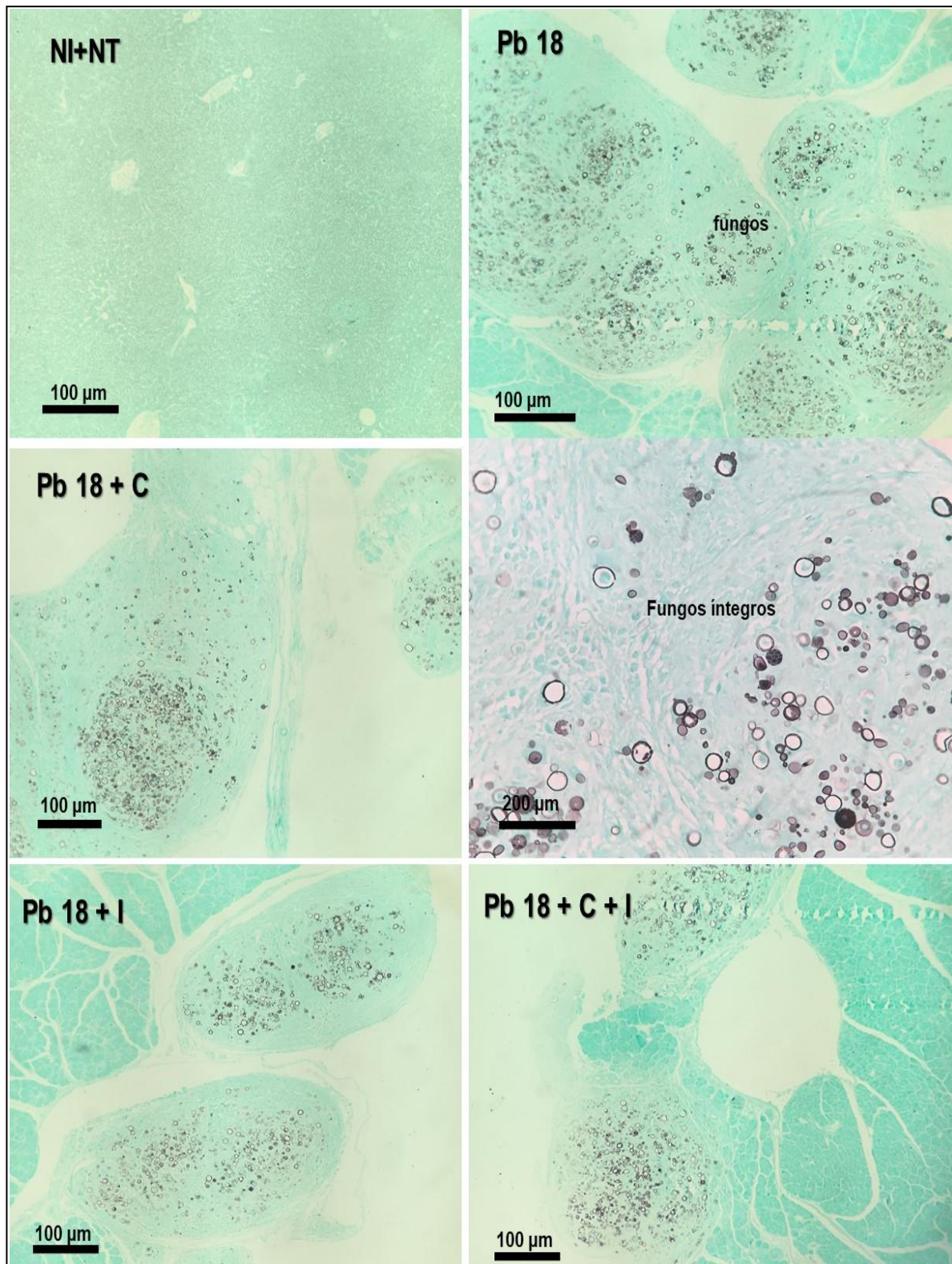


Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (Pb 18 + C). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (Pb 18 + C + I), respectivamente. Microscopia de campo claro (coloração: hematoxilina-eosina/HE). Aumento: NI+NT, 100 µm = 100X; Pb18, 100 µm = 100X e 200 µm = 400X; Pb18 + C 100 µm = 100X; Pb18 + I, 100 µm = 100X e 200 µm = 400X; Pb18 + C + I, 100 µm = 100X.



Figura 24 - Análise quanto à presença de fungos no fígado nos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento.



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (Pb 18 + C). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (Pb 18 + C + I), respectivamente. Microscopia de campo claro (coloração: tricrômico de gomori). Aumento: NI+NT, 100 µm = 100X; Pb18, 100 µm = 100X e 200 µm = 400X; Pb18 + C 100 µm = 100X; Pb18 + I, 100 µm = 100X; Pb18 + C + I, 100 µm = 100X.

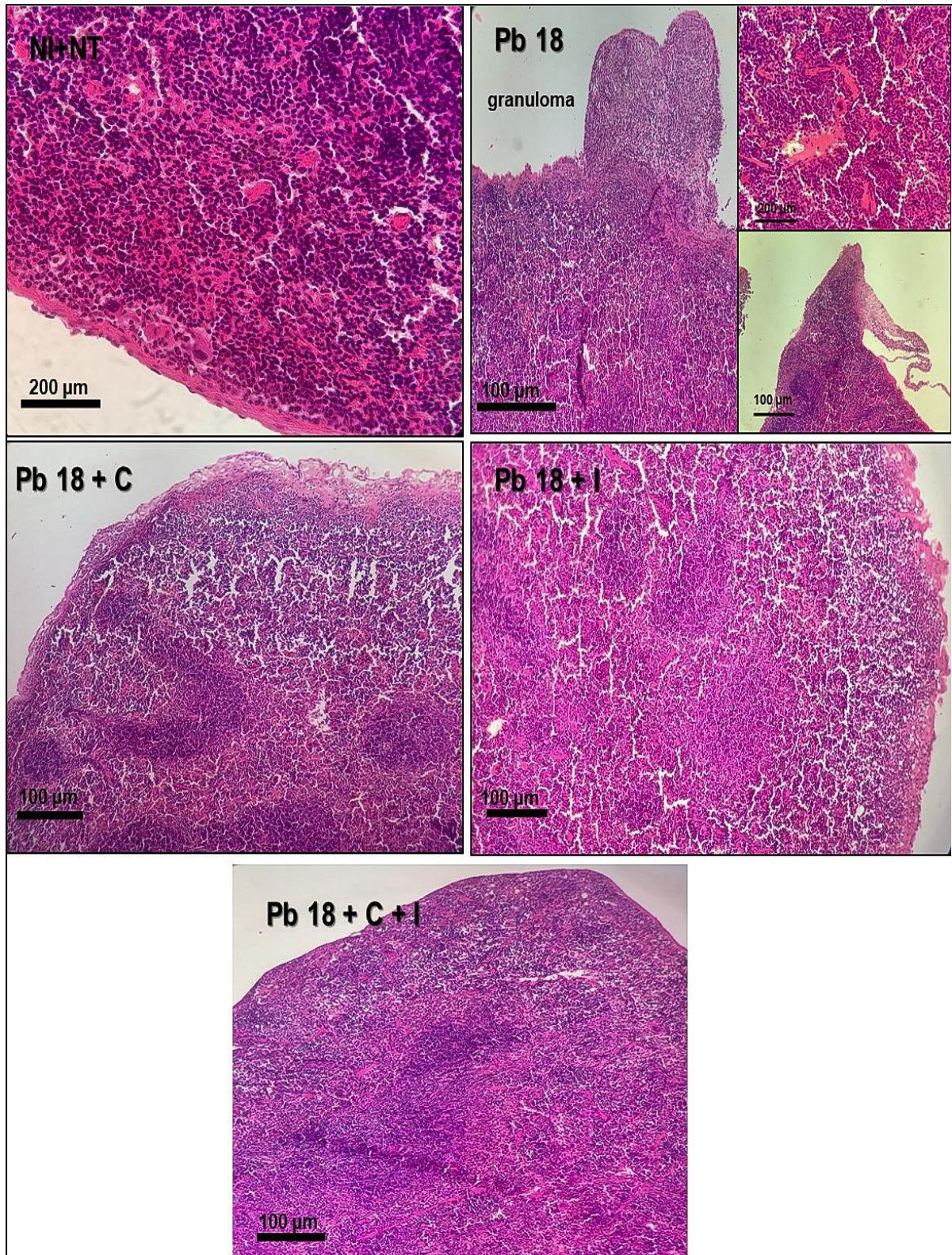
### **5.8.3 Análise histopatológica geral do baço dos animais infectados e infectados e tratados**

Os aspectos histológicos do baço nos animais não infectados e não tratados (NI+NT), mostraram dentro da normalidade. Os animais infectados e não tratados (Pb18) há presença de granulomas com intenso número de fungos (Figura 27), necrose e perda da integridade da cápsula esplênica. Há também perda da integridade das trabéculas e da rede interligada de sinusóides esplênicos. Nota-se presença de congestão vascular neste órgão. Os animais tratados com Celecoxibe (Pb 18 + C) os padrões histológicos se assemelham aos dos animais infectados e não tratados (Figura 26).

Os animais tratados com Itraconazol (Pb18 + I) há pouca quantidade de granulomas e fungos (Figura 27). A integridade da cápsula esplênica está um pouco preservada e as trabéculas e rede normais, com algumas áreas de congestão vascular. Já os animais com tratamento combinado (Pb18 + I + C) os padrões histológicos são de pouca quantidade de granulomas e de fungos com morfologia preservada (Figura 27), há integridade da cápsula esplênica e poucas áreas com necrose e congestão vascular (Figura 26).



Figura 25 - Análise histopatológica das lesões granulomatosas no baço dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 aos 15 dias de infecção e tratamento.



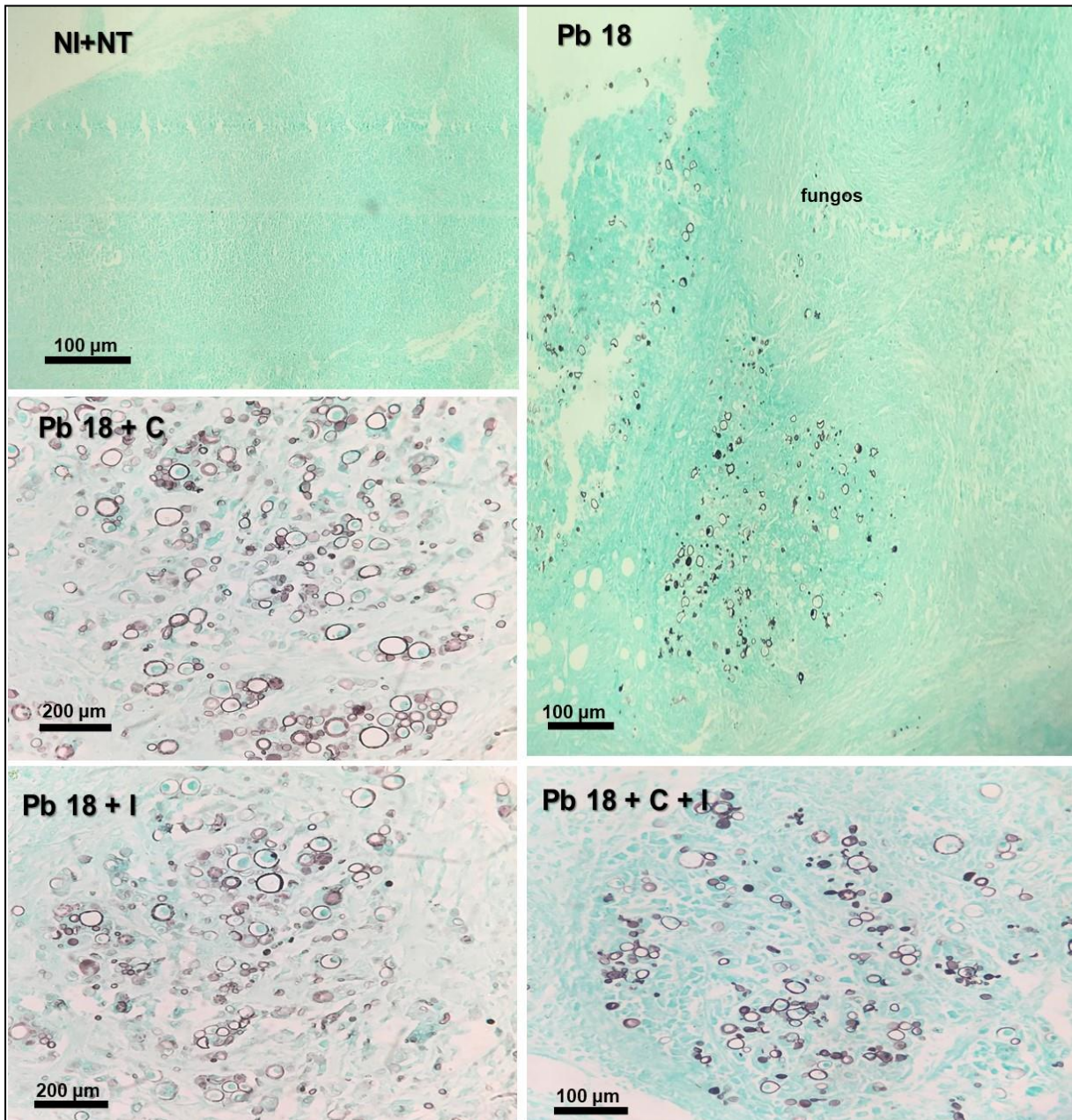
Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (Pb 18 + C). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (Pb 18 + C + I), respectivamente. Microscopia de campo claro (coloração: hematoxilina-eosina/HE). Aumento: NI+NT, 200 µm =



400X; Pb18, 100  $\mu\text{m}$  = 100X e 200  $\mu\text{m}$  = 400X; Pb18 + C 100  $\mu\text{m}$  = 100X; Pb18 + I, 100  $\mu\text{m}$  = 100X; Pb18 + C + I, 100  $\mu\text{m}$  = 100X.

Figura 26 - Análise quanto à presença de fungos no baço nos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento.



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (Pb 18 + C). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (Pb 18 + C + I), respectivamente. Microscopia de campo claro (coloração: tricrômico de gomori). Aumento: NI+NT, 100  $\mu\text{m}$  = 100X; Pb18, 100  $\mu\text{m}$  = 100X; Pb18 + C 200  $\mu\text{m}$  = 400X; Pb18 + I, 200  $\mu\text{m}$  = 400X; Pb18 + C + I, 100  $\mu\text{m}$  = 100X.

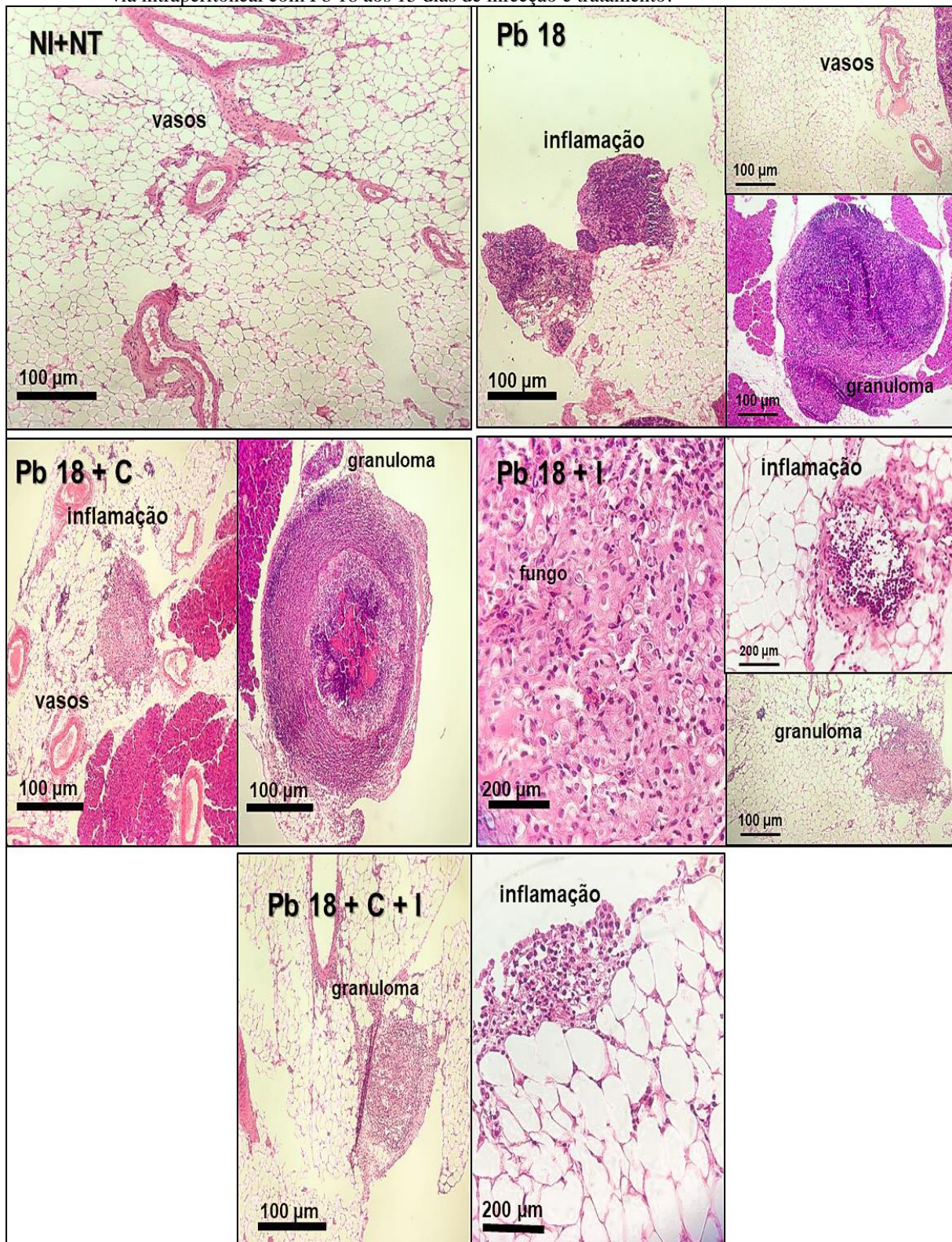
#### **5.8.4 Análise histopatológica geral do omento/pâncreas dos animais infectados e infectados e tratados**

Os aspectos histológicos do baço nos animais não infectados e não tratados (NI+NT), mostraram dentro da normalidade. Nos animais infectados e não tratados (Pb18) verificou intensa quantidade de células fúngicas com morfologia preservada. Entremeio aos adipócitos presença de congestão vascular e as células mesoteliais se apresentam em cordões bem espaçados, presença de intensa quantidade de vasos distribuídos pelo tecido e com presença de granulomas (Figura 28).

Os animais tratados com Celecoxibe (Pb 18 + C) verificou vários focos de processo inflamatório. Notou presença de células fúngicas. Entremeio aos adipócitos presença de várias áreas de congestão vascular. As células mesoteliais apresentaram em cordões bem espaçados. Há grande quantidade de capilares distribuídos e presença de granulomas. Os animais tratados com Itraconazol (Pb 18 + I) observou alguns focos de inflamação e pouca quantidade de fungos (Figura 29). Também notou presença de adipócitos com morfologia normais, áreas de congestão vascular e as células mesoteliais apresentaram cordões com pouco espaçamento e moderada quantidade de capilares distribuídos entre os cordões celulares, com poucos granulomas. Por fim, os animais com tratamento combinado (Pb 18 + I + C) há pouco processo inflamatório, fungos (Figura 29) e granulomas. As células mesoteliais apresentaram em padrões celulares bem definidos e adipócitos com morfologia normais. Os capilares apresentaram aspectos regulares distribuídos entre os cordões celulares (Figura 28).



Figura 27 - Análise histopatológica das lesões granulomatosas no omento/pâncreas dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 aos 15 dias de infecção e tratamento.

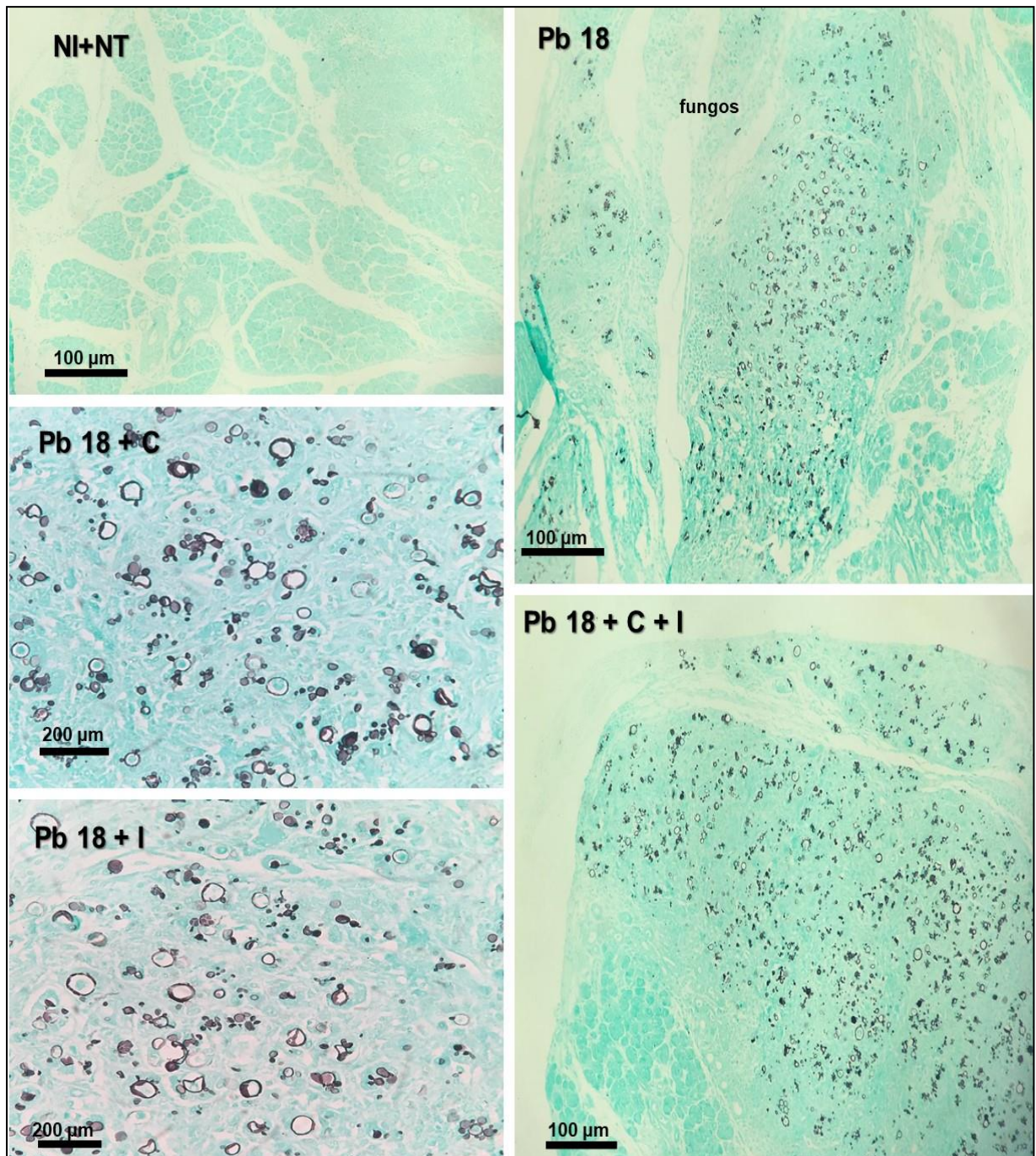


Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (Pb 18 + C). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (Pb 18 + C + I), respectivamente. Microscopia de campo claro (coloração: hematoxilina-eosina/HE). Aumento: NI+NT, 100 µm = 100X; Pb18, 100 µm = 100X; Pb18 + C 100 µm = 100X; Pb18 + I, 100 µm = 100X e 200 µm = 400X; Pb18 + C + I, 100 µm = 100X e 200 µm = 400X.



Figura 28 - Análise quanto à presença de fungos no omento/pâncreas nos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (Pb 18 + C). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (Pb 18 + C + I), respectivamente. Microscopia de campo claro (coloração: tricrômico de gomori). Aumento: NI+NT, 100 µm = 100X; Pb18, 100 µm = 100X; Pb18 + C 200 µm = 400X; Pb18 + I, 200 µm = 400X; Pb18 + C + I, 100 µm = 100X.

### 5.9 Análise da presença de fibras de colágeno dos animais infectados e infectados e tratados por 15 dias

A presença de fibras de colágeno tecidual foi avaliada nos animais com 15 dias de infecção e tratamento. Os animais não infectados e não tratados (NI+NT) apresentaram baixa densidade de fibras de colágeno no tecido de todos os órgãos e com maior predominância na região perivascular (Figuras 30, 31, 32 e 33).

Os animais infectados e não tratados (Pb18) mostraram que no baço há um aumento da cápsula esplênica pela presença de fibras de colágeno e também uma maior predominância ao redor do granuloma (Figura 30). No fígado há baixa densidade de fibras de colágeno, com maior predominância e organização perivascular e ao redor do granuloma (Figura 31). Nos pulmões pouca quantidade de fibras de colágeno entremeio aos pneumócitos (Figura 32) e no omento/pâncreas, notou uma moderada quantidade de fibras de colágeno e com maior predominância também ao redor do granuloma (Figura 33).

Os animais infectados e tratados com Celecoxibe (Pb18 + C) o baço apresentou aumento também da cápsula esplênica pelas fibras de colágeno e maior predominância ao redor do granuloma (Figura 30). No fígado observou baixa densidade de fibras de colágeno e com maior predominância e organização ao redor do granuloma e perivascular (Figura 31). Nos pulmões foi observado pouca quantidade de fibras de colágeno ao redor dos pneumócitos e maior predominância perivascular (Figura 32). No omento/pâncreas notou moderada quantidade de fibras entremeio ao tecido e com maior predominância ao redor também do granuloma (Figura 33).

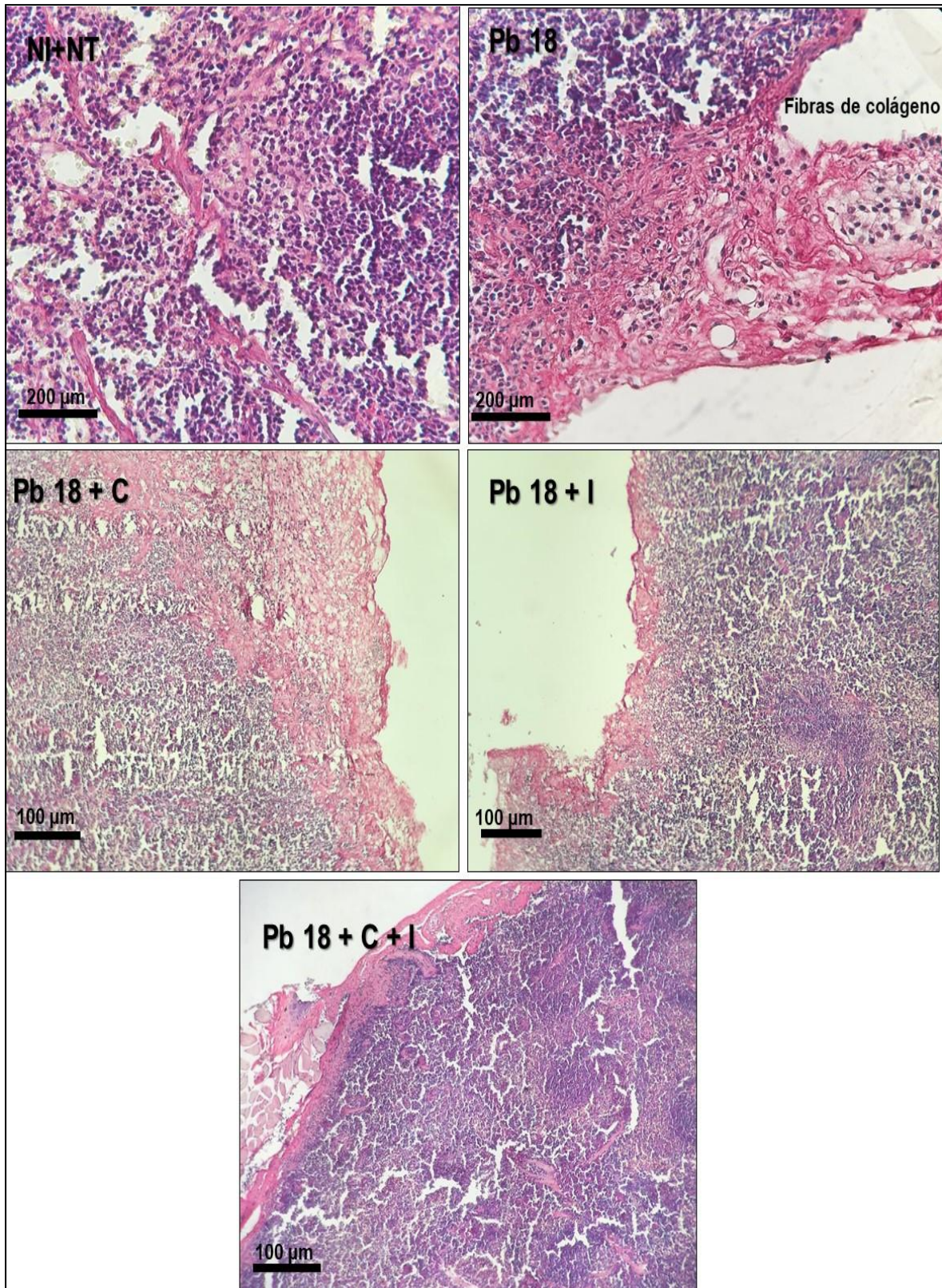
Os animais infectados e tratados com Itraconazol (Pb18 + I) o baço apresentou aumento também da cápsula esplênica pela presença de fibras de colágeno e há uma maior predominância delas ao redor dos granulomas (Figura 30). No fígado notou baixa densidade de fibras de colágeno e com maior predominância e organização perivascular e ao redor do granuloma (Figura 31). Nos pulmões observou pouca quantidade de fibras de colágeno entremeio aos pneumócitos e com maior predominância perivascular (Figura 32). No omento/pâncreas há uma moderada quantidade de fibras de colágeno entremeio ao tecido e com maior predominância ao redor do granuloma (Figura 33).

Os animais infectados e tratados com Celecoxibe + Itraconazol (Pb18 + C+ I) o baço apresentou pouca quantidade de fibras de colágeno na cápsula esplênica e baixa densidade no tecido (Figura 30). No fígado também observou baixa densidade de fibras sendo estas finas entremeio ao tecido e com distribuição predominantemente perivascular (Figura 31). Nos



pulmões há pouca quantidade de fibras de colágeno e com maior predominância perivascular (Figura 32). No omento/pâncreas também há pouca quantidade de fibras de colágeno no tecido e com maior predominância ao redor do granuloma (Figura 33).

Figura 29 -Análise da presença das fibras de colágeno do baço dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento.

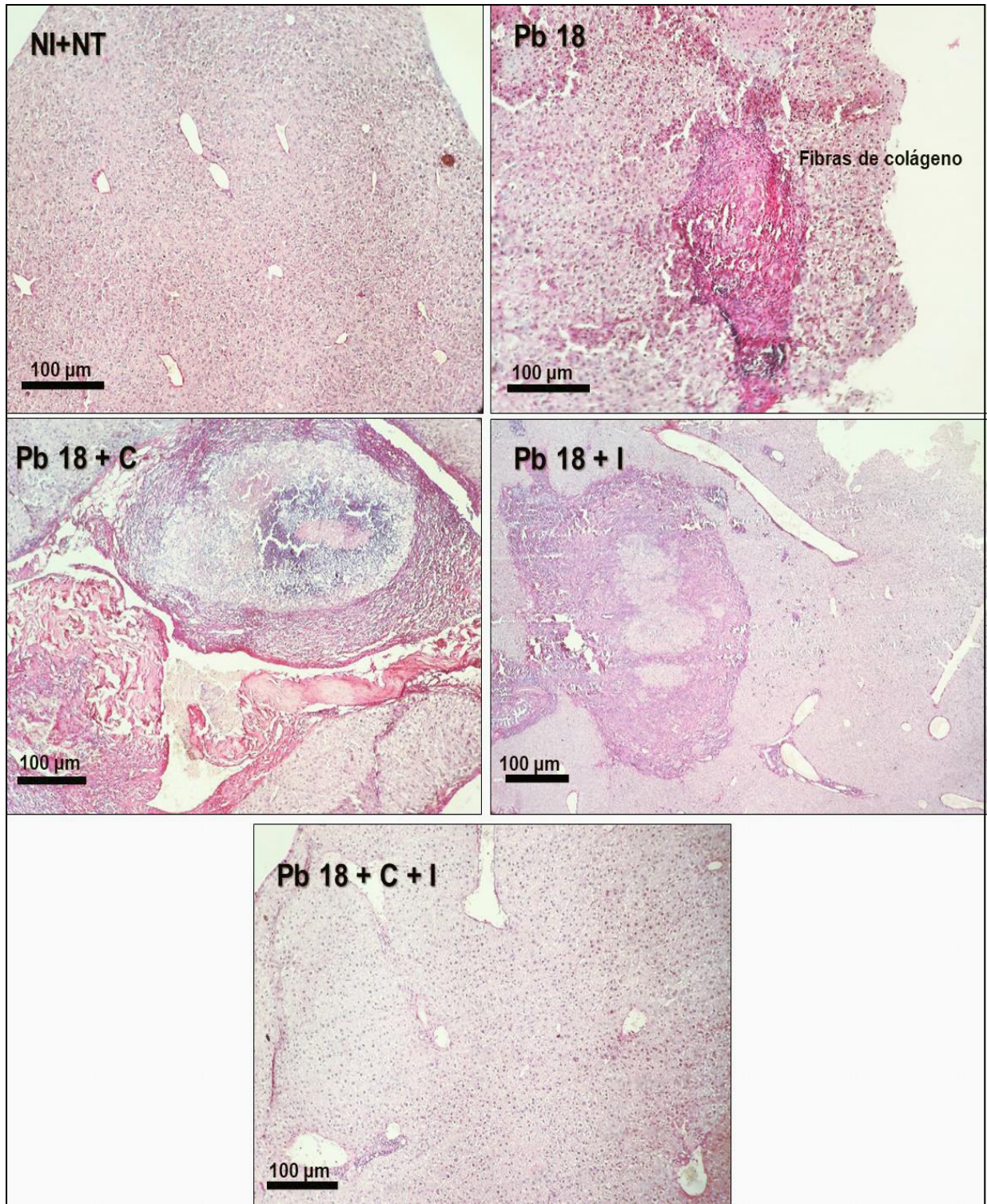


Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (Pb 18 + C). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (Pb 18 + C + I), respectivamente. Microscopia de campo claro (coloração: picros sirius red). Aumento: NI+NT, 200 µm = 400X; Pb18, 200 µm = 400X; Pb18 + C 100 µm = 100X; Pb18 + I, 100 µm = 100X; Pb18 + C + I, 100 µm = 100X.



Figura 30 - Análise da presença das fibras de colágeno do fígado dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento.

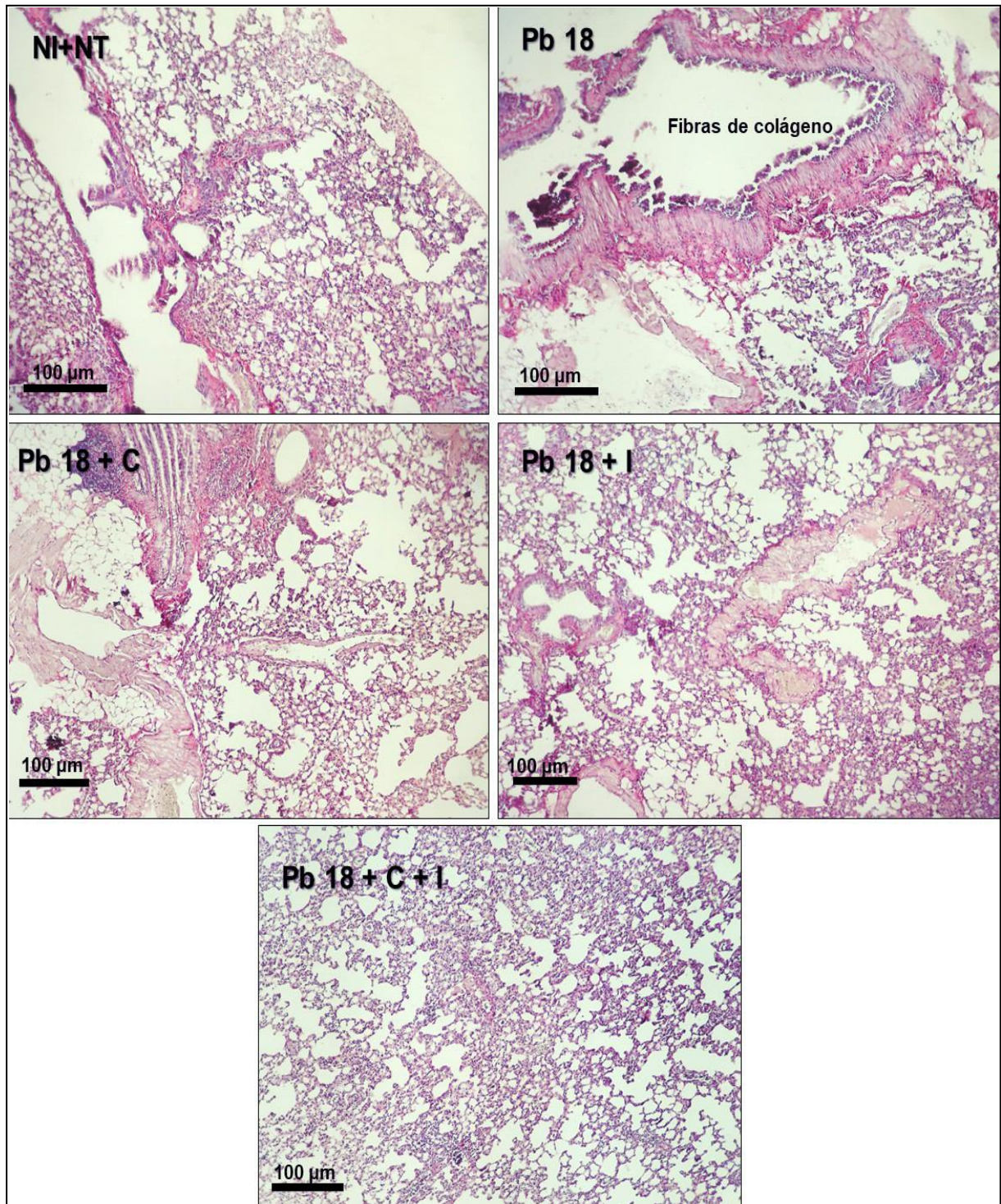


Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (Pb 18 + C). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (Pb 18 + C + I), respectivamente. Microscopia de campo claro (coloração: picos sirius red). Aumento: NI+NT, 100 µm = 100X; Pb18, 100 µm = 100X; Pb18 + C 100 µm = 100X; Pb18 + I, 100 µm = 100X; Pb18 + C + I, 100 µm = 100X.



Figura 31 - Análise da presença das fibras de colágeno dos pulmões dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento.

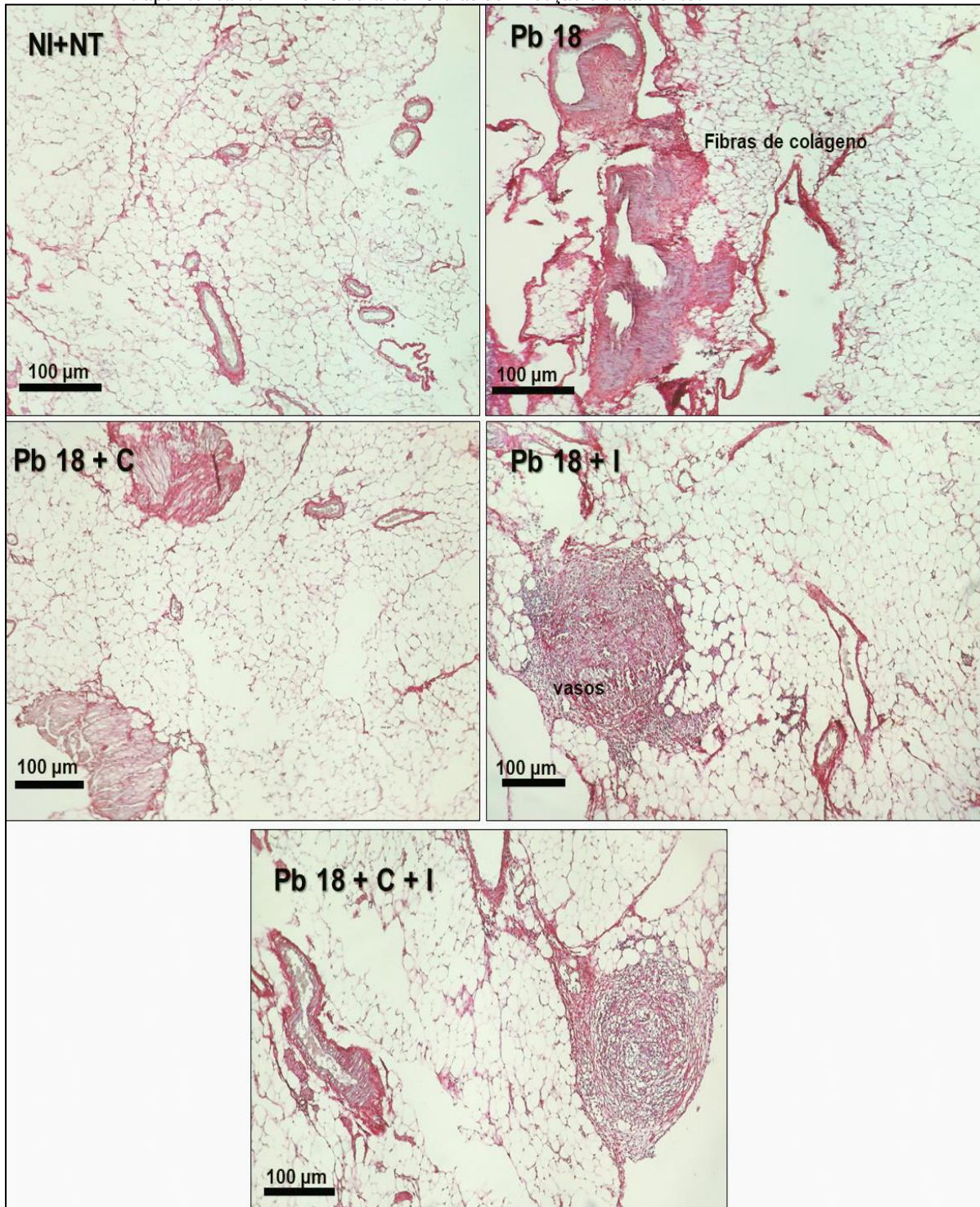


Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (Pb 18 + C). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (Pb 18 + C + I), respectivamente. Microscopia de campo claro (coloração: picrosirius red). Aumento: NI+NT, 100 µm = 100X; Pb18, 100 µm = 100X; Pb18 + C 100 µm = 100X; Pb18 + I, 100 µm = 100X; Pb18 + C + I, 100 µm = 100X.



Figura 32 - Análise da presença das fibras de colágeno no omento/pâncreas dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento.



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (Pb 18 + C). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (Pb 18 + C + I), respectivamente. Microscopia de campo claro (coloração: picos sirius red). Aumento: NI+NT, 100 µm = 100X; Pb18, 100 µm = 100X; Pb18 + C 100 µm = 100X; Pb18 + I, 100 µm = 100X; Pb18 + C + I, 100 µm = 100X.

## 5.10 Análise histológica geral dos órgãos na infecção tardia (120 dias)

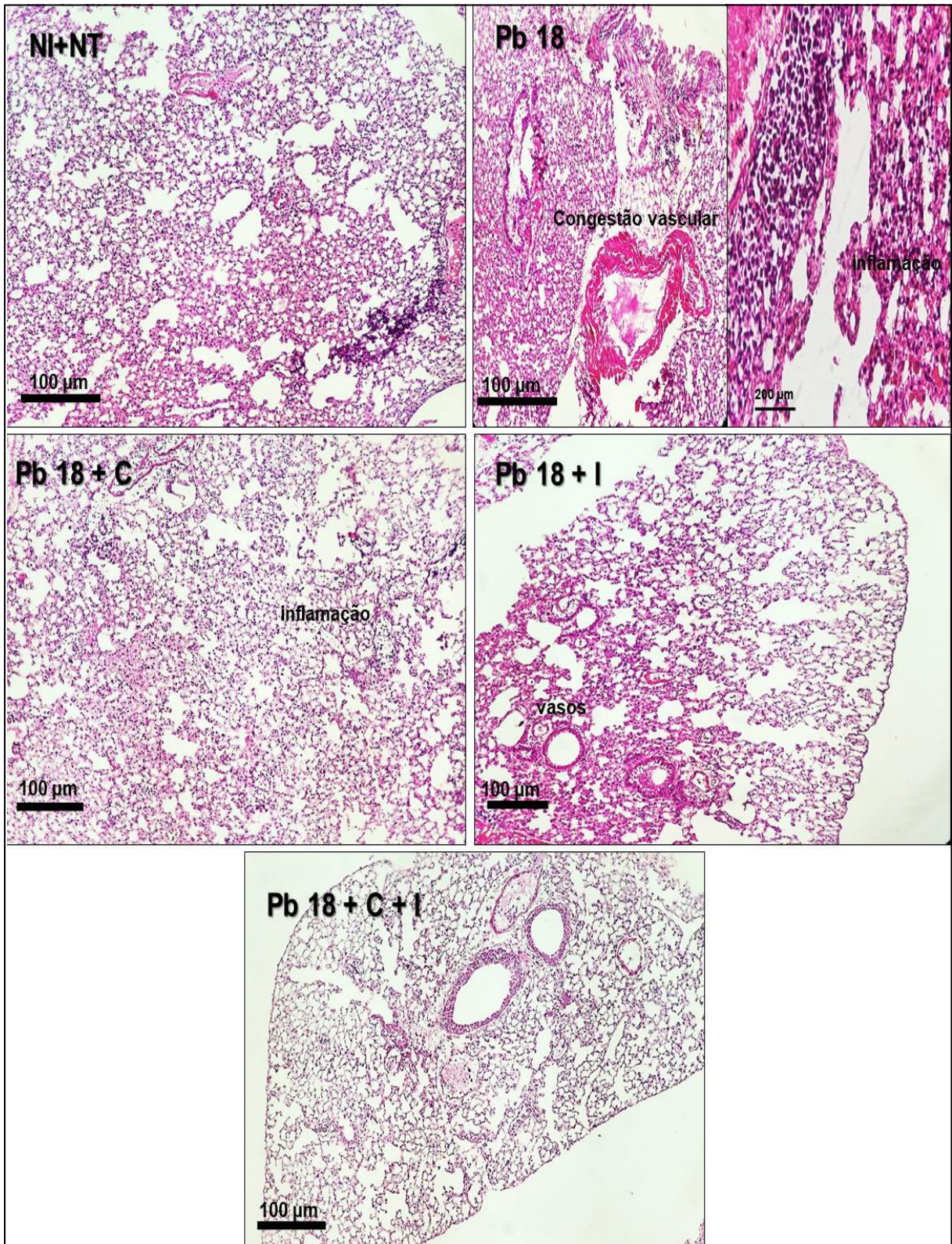
### **5.10.1 Análise histopatológica geral dos pulmões dos animais infectados e infectados e tratados por 120 dias**

Os aspectos histológicos foram analisados com o intuito de avaliar as características das lesões e de verificar se os tratamentos foram capazes de minimizá-las. Os aspectos histológicos dos pulmões nos animais não infectados e não tratados (NI+NT), mostraram dentro da normalidade (Figura 34).

Os animais infectados e não tratados (Pb18) há intenso processo inflamatório, com espessamento dos septos alveolares e com congestão vascular. Há acúmulo de polimorfonucleares no espaço alveolar e presença de granuloma e pouca quantidade de fungos (Figura 35). Os animais tratados com Celecoxibe (Pb18 + C) verificou moderada quantidade de processo inflamatório, poucas áreas de espessamento de septos alveolares e de congestão vascular. Há pouca presença de granulomas, fungos (Figura 35) e moderada quantidade de polimorfonucleares no espaço alveolar. Os animais tratados com Itraconazol (Pb18 + I) há pouca quantidade de processo inflamatório, áreas de espessamento de septos alveolares e de congestão vascular. Também há pouca presença de granulomas, fungos (Figura 35) e de polimorfonucleares no espaço alveolar. Por fim, os animais tratados com Celecoxibe e Itraconazol (Pb18 + C + I) também há pouca quantidade de processo inflamatório e áreas de espessamento de septos alveolares. Há pouca presença de granulomas e fungos (Figura 35) pelo tecido (Figura 34).



Figura 33 - Análise histopatológica das lesões granulomatosas em pulmões dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 aos 120 dias de infecção e tratamento.



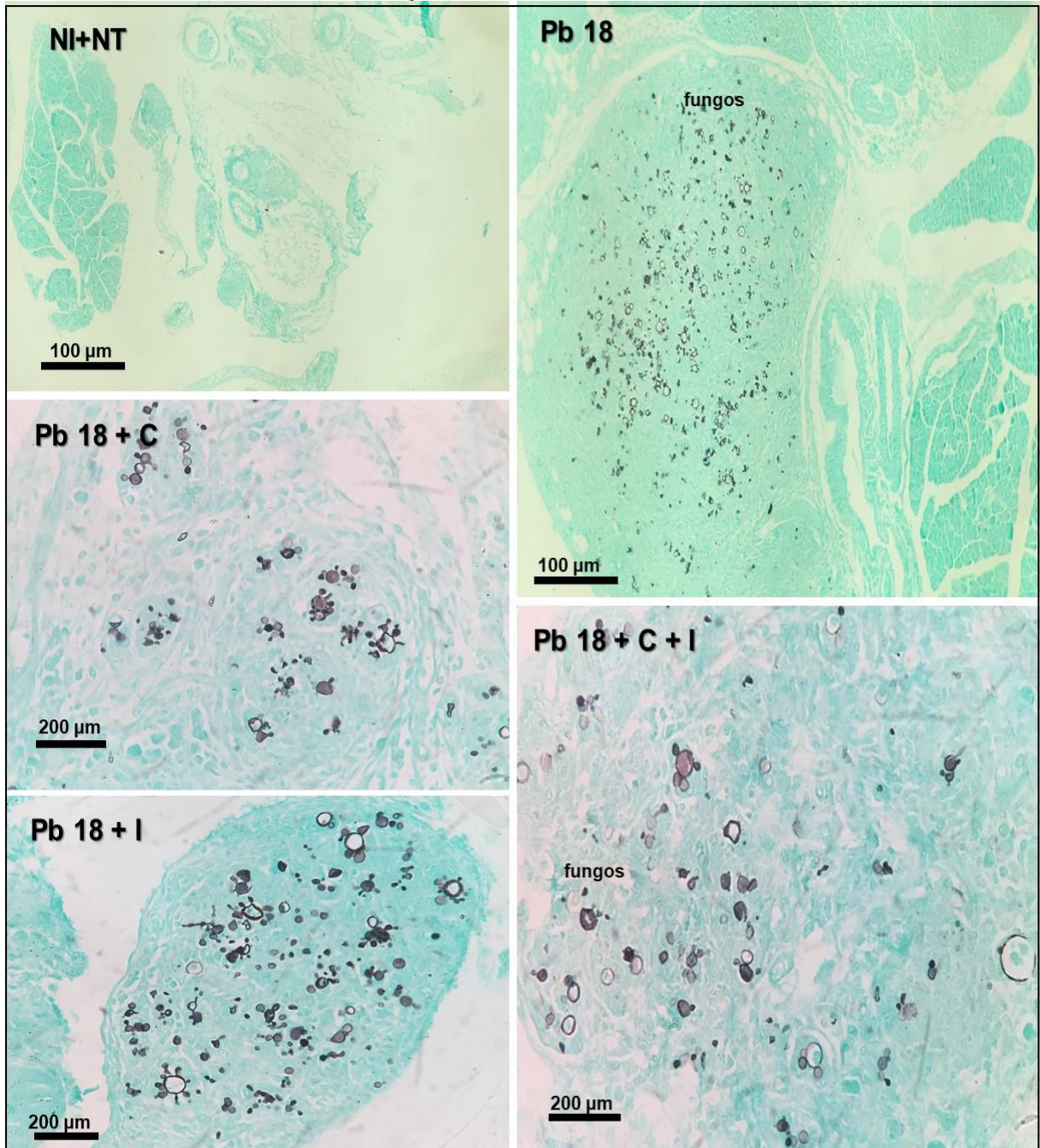
Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (Pb 18 + C). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (Pb 18 + C + I), respectivamente. Microscopia de campo claro (coloração: hematoxilina-eosina/HE). Aumento: NI+NT, 100 µm =



100X; Pb18, 100  $\mu\text{m}$  = 100X e 200  $\mu\text{m}$  = 400X; Pb18 + C 100  $\mu\text{m}$  = 100X; Pb18 + I, 100  $\mu\text{m}$  = 100X; Pb18 + C + I, 100  $\mu\text{m}$  = 100X.

Figura 34 - Análise quanto à presença de fungos nos pulmões nos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 120 dias de infecção e tratamento.



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (Pb 18 + C). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (Pb 18 + C + I), respectivamente. Microscopia de campo claro (coloração: tricrômico de gomori). Aumento: NI+NT, 100  $\mu\text{m}$  = 100X; Pb18, 100  $\mu\text{m}$  = 100X; Pb18 + C, 200  $\mu\text{m}$  = 400X; Pb18 + I, 200  $\mu\text{m}$  = 400X; Pb18 + C + I, 200  $\mu\text{m}$  = 400X.

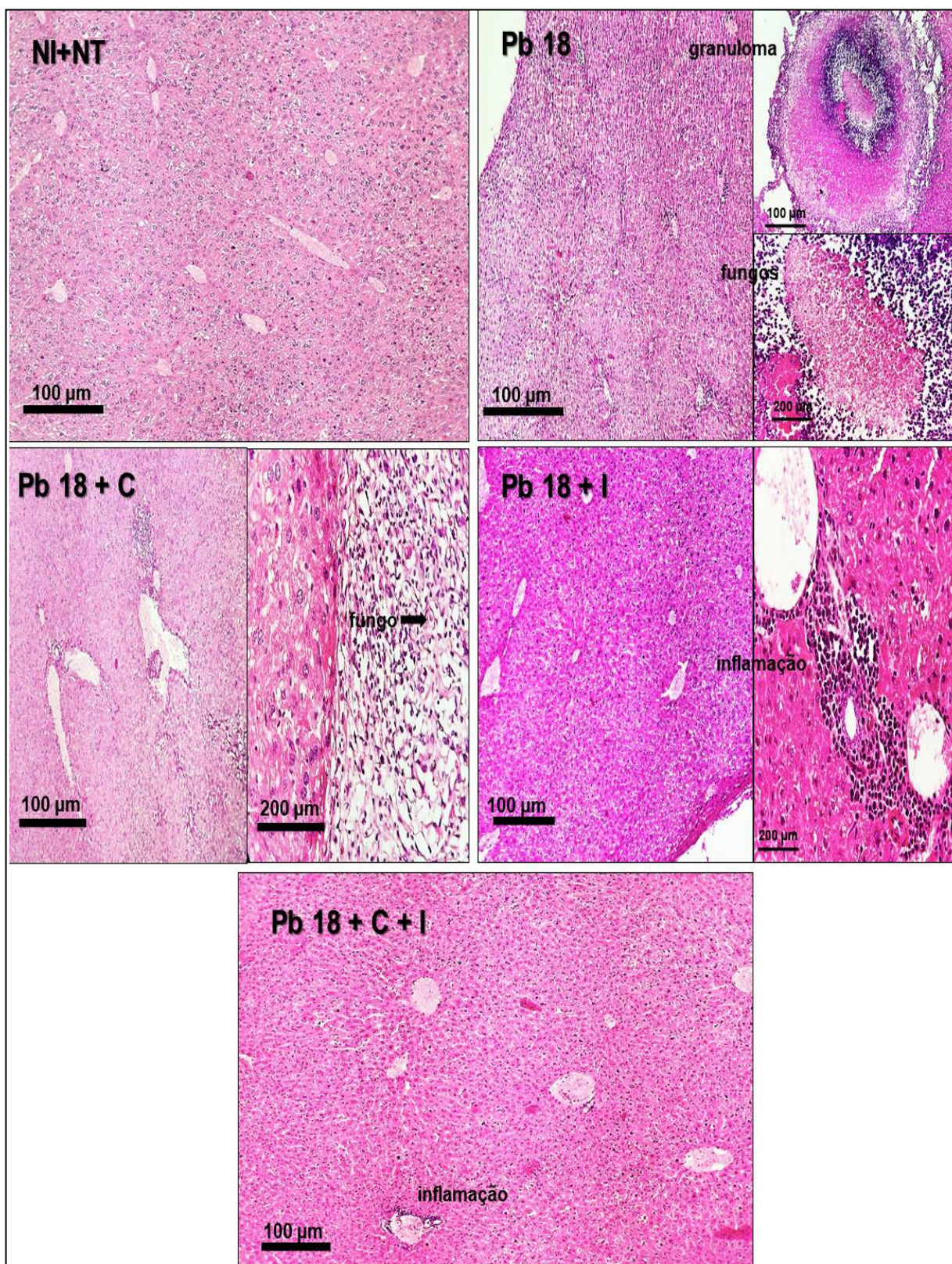


### **5.10.2 Análise histopatológica geral do fígado dos animais infectados e infectados tratados por 120 dias**

Os aspectos histológicos do fígado os animais não infectados e não tratados (NI+NT), mostraram dentro da normalidade (Figura 36). A análise histológica do fígado os animais infectados e não tratados (Pb18) mostram áreas de hipertrofia de hepatócitos, com cordões espaçados. Há várias áreas com processo inflamatório e congestão vascular. As células inflamatórias presentes podem ser encontradas ao redor do granuloma e em vários pontos do tecido. As células fúngicas podem ser encontradas com maior frequência dentro do granuloma. Os granulomas apresentam uma estrutura fechada. As células inflamatórias em sua maioria são polimorfonucleares (Figura 36).

Analisando os aspectos histológicos do fígado dos animais infectados e tratados com Celecoxibe (Pb18 + C) há poucas áreas de hipertrofia e cordões celulares espaçados. Há poucos focos de inflamação pelo tecido e áreas de congestão vascular. As células inflamatórias são constituídas em sua maioria por polimorfonucleares. Há pouca quantidade de granulomas e de fungos (Figura 37). Os granulomas se apresentam como uma estrutura fechada. Os animais infectados e tratados com Itraconazol (Pb18 + I) também há poucas áreas de hipertrofia de hepatócitos, com cordões celulares espaçados e dilatação do espaço sinusal. Há poucas áreas com processo inflamatório e em sua maioria são formados por polimorfonucleares. As células inflamatórias podem ser encontradas ao redor do granuloma. Há pouca quantidade de granulomas e fungos (Figura 37). Os fungos podem ser encontrados dentro dos granulomas que se apresentam em estrutura fechada. Por fim, os animais com tratamento combinado (Pb18 + C + I) também há poucas áreas de hipertrofia, cordões espaçados e dilatação. Há pouco foco de inflamação e granulomas que se apresentam também como estruturas fechadas. Há pouca quantidade de fungos pelo tecido (Figura 37) e dentro dos granulomas (Figura 36).

Figura 35 - Análise histopatológica das lesões granulomatosas no fígado dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 aos 120 dias de infecção e tratamento.



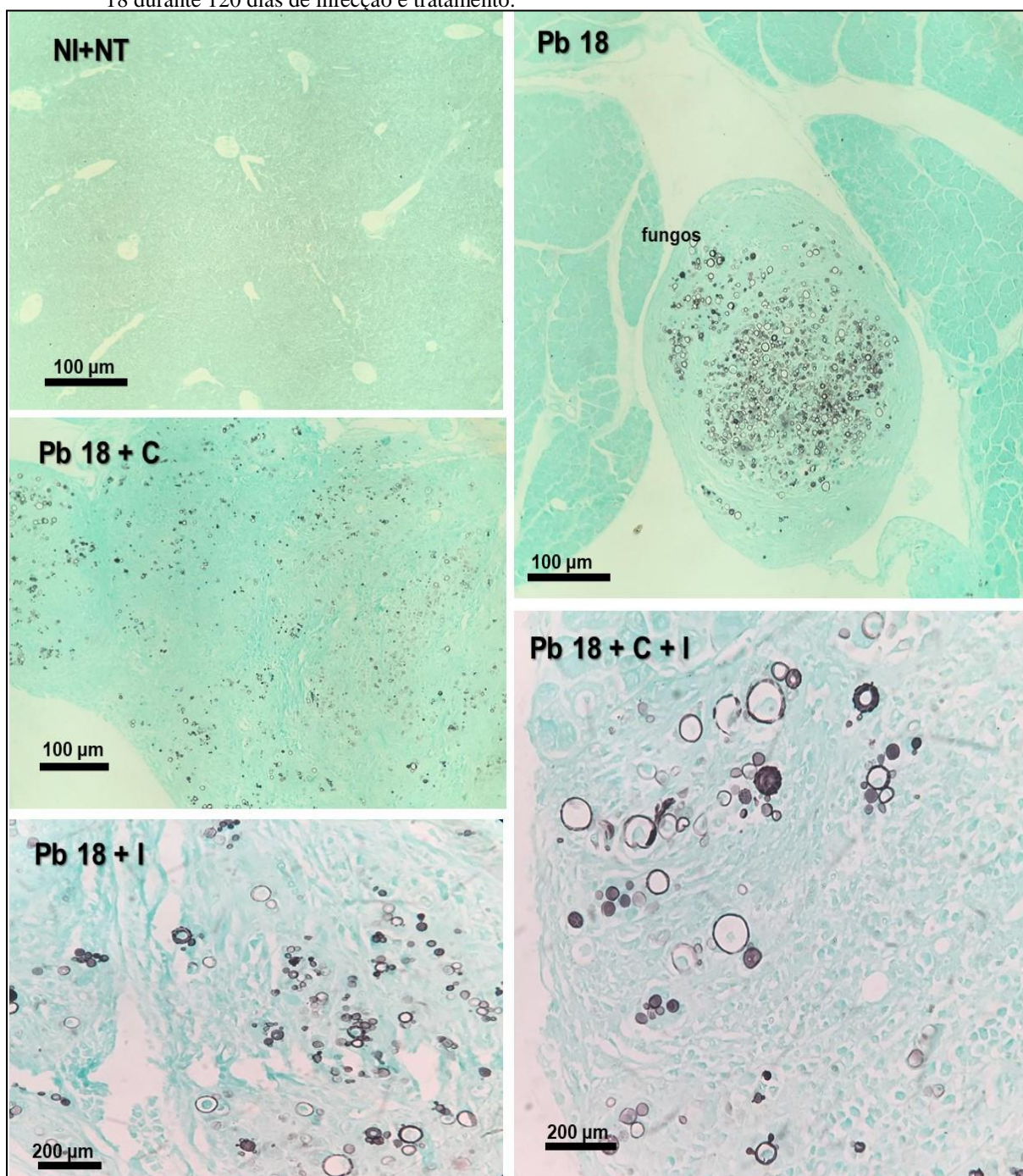
Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Grupo não infectado e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (Pb 18 + C). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (Pb 18 + C + I), respectivamente. Microscopia de campo claro (coloração: hematoxilina-eosina/HE). Aumento: NI+NT, 100 µm =



100X; Pb18, 100  $\mu\text{m}$  = 100X e 200  $\mu\text{m}$  = 400X; Pb18 + C, 100  $\mu\text{m}$  = 100X e 200  $\mu\text{m}$  = 400X; Pb18 + I, 100  $\mu\text{m}$  = 100X e 200  $\mu\text{m}$  = 400X; Pb18 + C + I, 100  $\mu\text{m}$  = 100X.

Figura 36 - Análise quanto à presença de fungos no fígado nos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 120 dias de infecção e tratamento.



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (Pb 18 + C). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (Pb 18 + C + I), respectivamente. Microscopia de campo claro (coloração: tricrômico de gomori). Aumento: NI+NT, 100  $\mu\text{m}$  = 100X; Pb18, 100  $\mu\text{m}$  = 100X; Pb18 + C, 100  $\mu\text{m}$  = 100X; Pb18 + I, 200  $\mu\text{m}$  = 400X; Pb18 + C + I, 200  $\mu\text{m}$  = 400X.

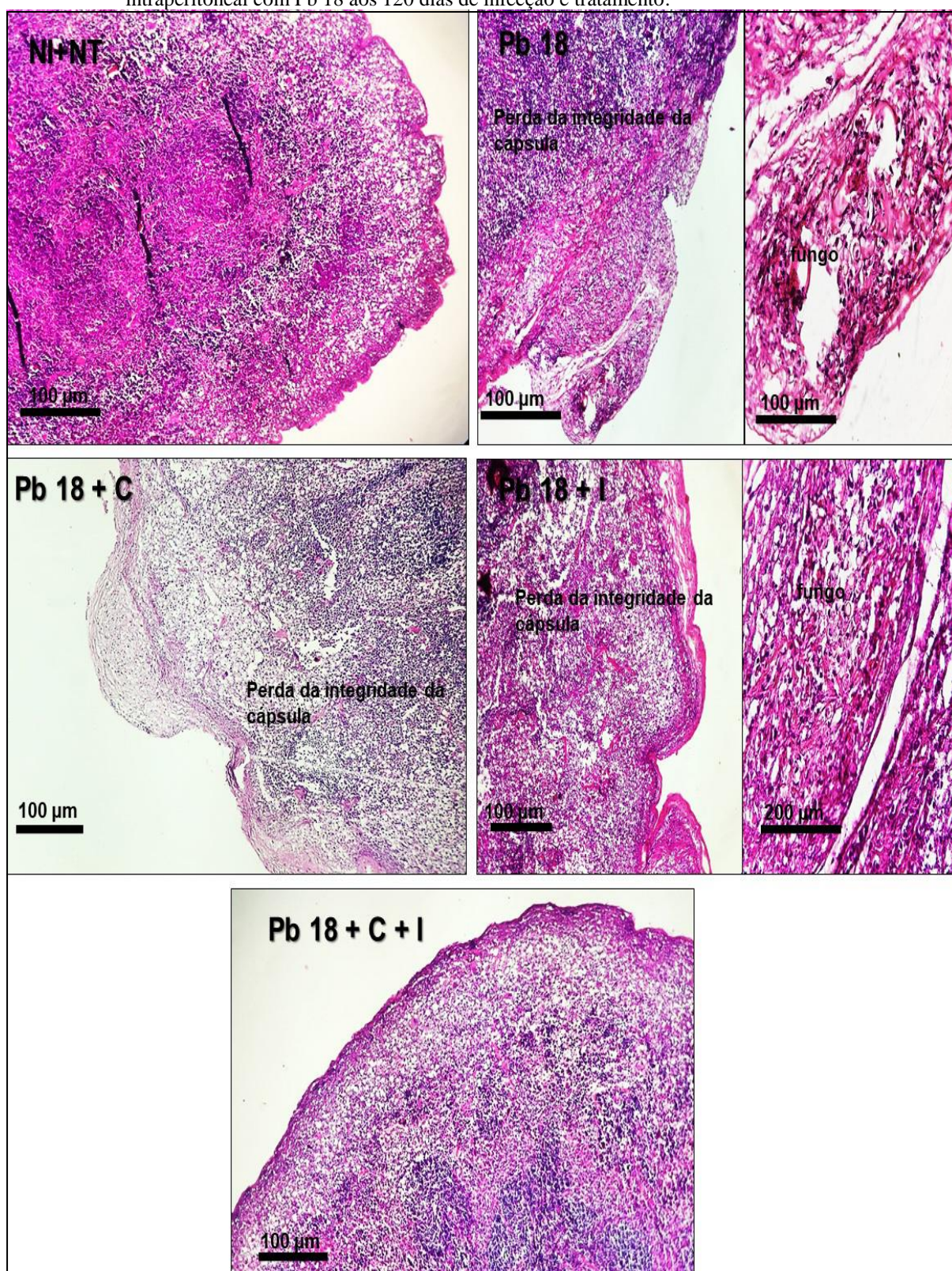
### **5.10.3 Análise histopatológica geral do baço dos animais infectados e infectados e tratados por 120 dias**

Os aspectos histológicos do baço nos animais não infectados e não tratados (NI+NT), mostraram dentro da normalidade (Figura 38). Analisando o tecido do baço dos animais infectados e não tratados (Pb18) há presença de granulomas e com intenso número de fungos (Figura 39). Verificou áreas de fibrose, há perda da integridade da cápsula esplênica, trabéculas e da rede interligada de sinusóides (Figura 38).

Os animais infectados e tratados com Celecoxibe (Pb 18 + C) ainda há presença de granulomas e com intenso número de fungos (Figura 39) e áreas de fibrose. Há perda da integridade da cápsula esplênica, trabéculas e rede interligada de sinusóides esplênicos. Os aspectos histológicos dos animais infectados e tratados com Itraconazol (Pb18 + I) há pouca quantidade de granulomas e células fúngicas. A integridade da cápsula esplênica em alguns pontos do tecido não está preservada. Há algumas áreas de fibrose tecidual. As trabéculas e rede esplênica estão normais. Por fim, os animais com tratamento combinado (Pb18 + C + I) há pouca quantidade de granulomas e presença de fungos (Figura 39). A integridade da cápsula esplênica está dentro dos padrões de normalidade. As trabéculas e rede esplênica também estão normais. Há poucas áreas de fibrose tecidual (Figura 38).



Figura 37 - Análise histopatológica das lesões granulomatosas no baço dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 aos 120 dias de infecção e tratamento.

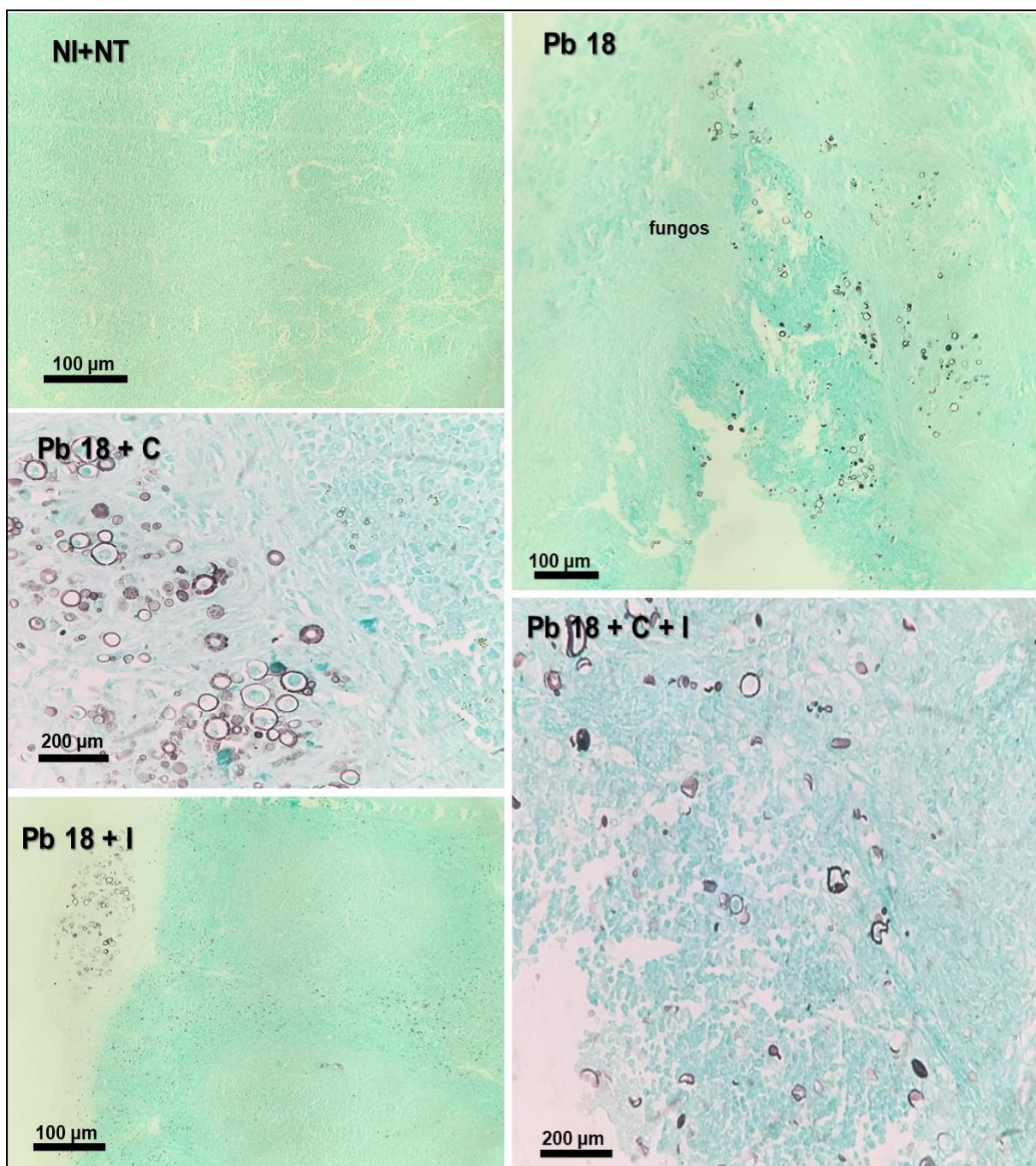


Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (Pb 18 + C). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (Pb 18 + C + I), respectivamente. Microscopia de campo claro (coloração: hematoxilina-eosina/HE). Aumento: NI+NT, 100 µm = 100X; Pb18, 100 µm = 100X; Pb18 + C, 100 µm = 100X; Pb18 + I, 100 µm = 100X e 200 µm = 400X; Pb18 + C + I, 100 µm = 100X.



Figura 38 - Análise quanto à presença de fungos no baço nos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 120 dias de infecção e tratamento.



Fonte: Do autor (2022).

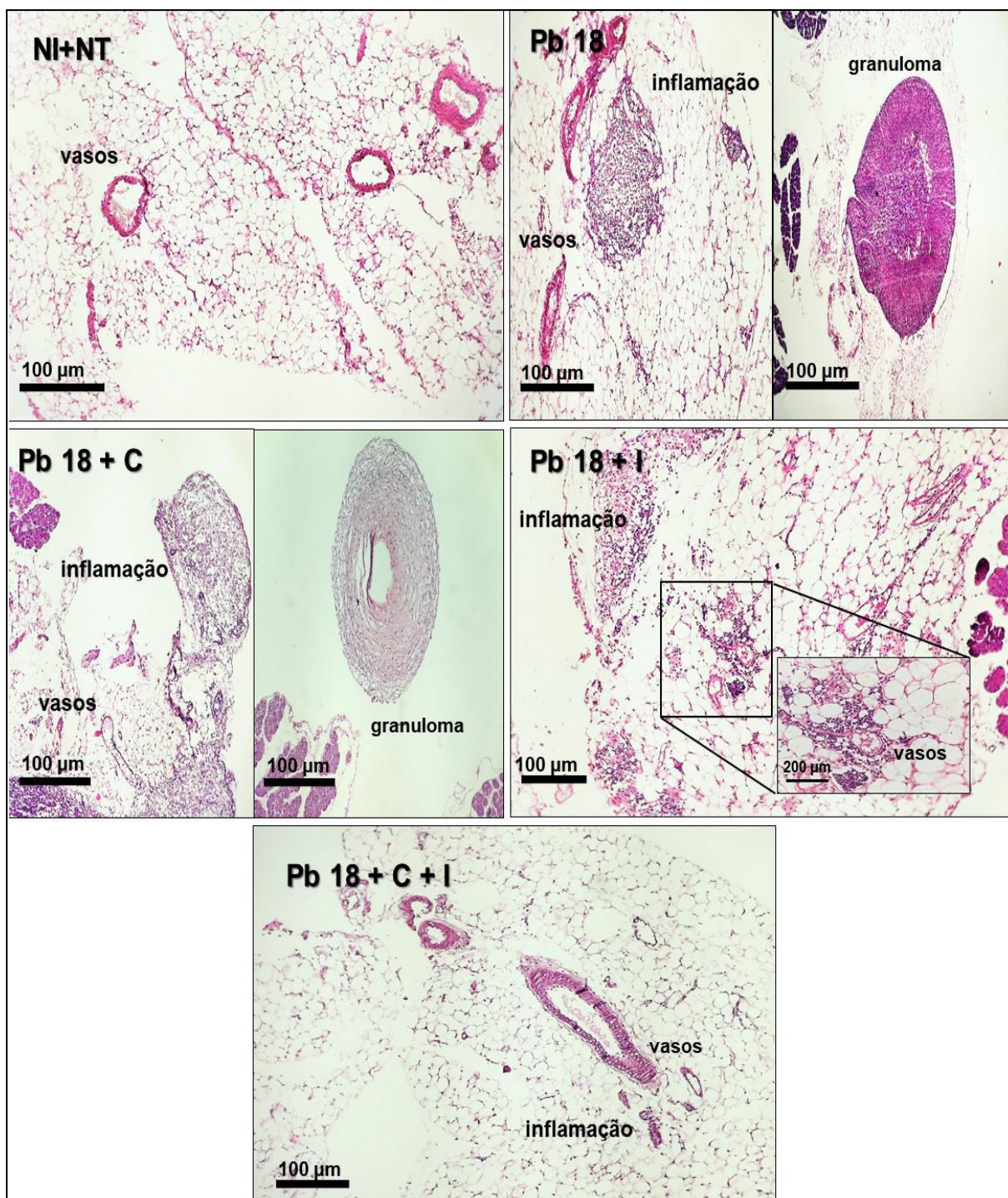
Legenda: Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (Pb 18 + C). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (Pb 18 + C + I), respectivamente. Microscopia de campo claro (coloração: tricrômico de gomori). Aumento: NI+NT, 100 µm = 100X; Pb18, 100 µm = 100X; Pb18 + C, 200 µm = 400X; Pb18 + I, 100 µm = 100X; Pb18 + C + I, 200 µm = 400X.

#### **5.10.4 Análise histopatológica geral do omento/pâncreas dos animais infectados e infectados e tratados por 120 dias**

Os aspectos histológicos do omento/pâncreas dos animais não infectados e não tratados (NI+NT), mostraram dentro da normalidade (Figura 40). Os animais infectados e não tratados (Pb18) ainda há vários focos de processo inflamatório e moderada quantidade de fungos (Figura 41). As células mesoteliais apresentaram cordões espaçados. Há vários distribuídos pelo tecido e há granulomas. Os animais infectados e tratados com Celecoxibe (Pb18 + C) há moderada quantidade de células fúngicas (Figura 41) e inflamação. Notou células mesoteliais em cordões poucos espaçados. Moderada quantidade de vasos e granulomas. Não foi evidenciado tecido fibroso. Os animais tratados com Itraconazol (Pb18 + I) também há moderada quantidade de células fúngicas (Figura 41) e focos de inflamação. As células mesoteliais apresentaram cordões pouco espaçados. Há moderada quantidade de vasos e não foi evidenciado focos de fibrose. Por fim, os animais com tratamento combinado (Pb18 + C + I) há presença de algumas células inflamatórias. Notou pouca quantidade de células fúngicas. Os adipócitos estão com morfologia normais. As células mesoteliais apresentaram cordões bem definidos. Os vasos com aspectos normais e distribuídos entre os cordões celulares. Há pouca quantidade de granulomas e não foi evidenciado tecido fibroso (Figura 40).



Figura 39: Análise histopatológica das lesões granulomatosas no omento/pâncreas dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 aos 120 dias de infecção e tratamento.

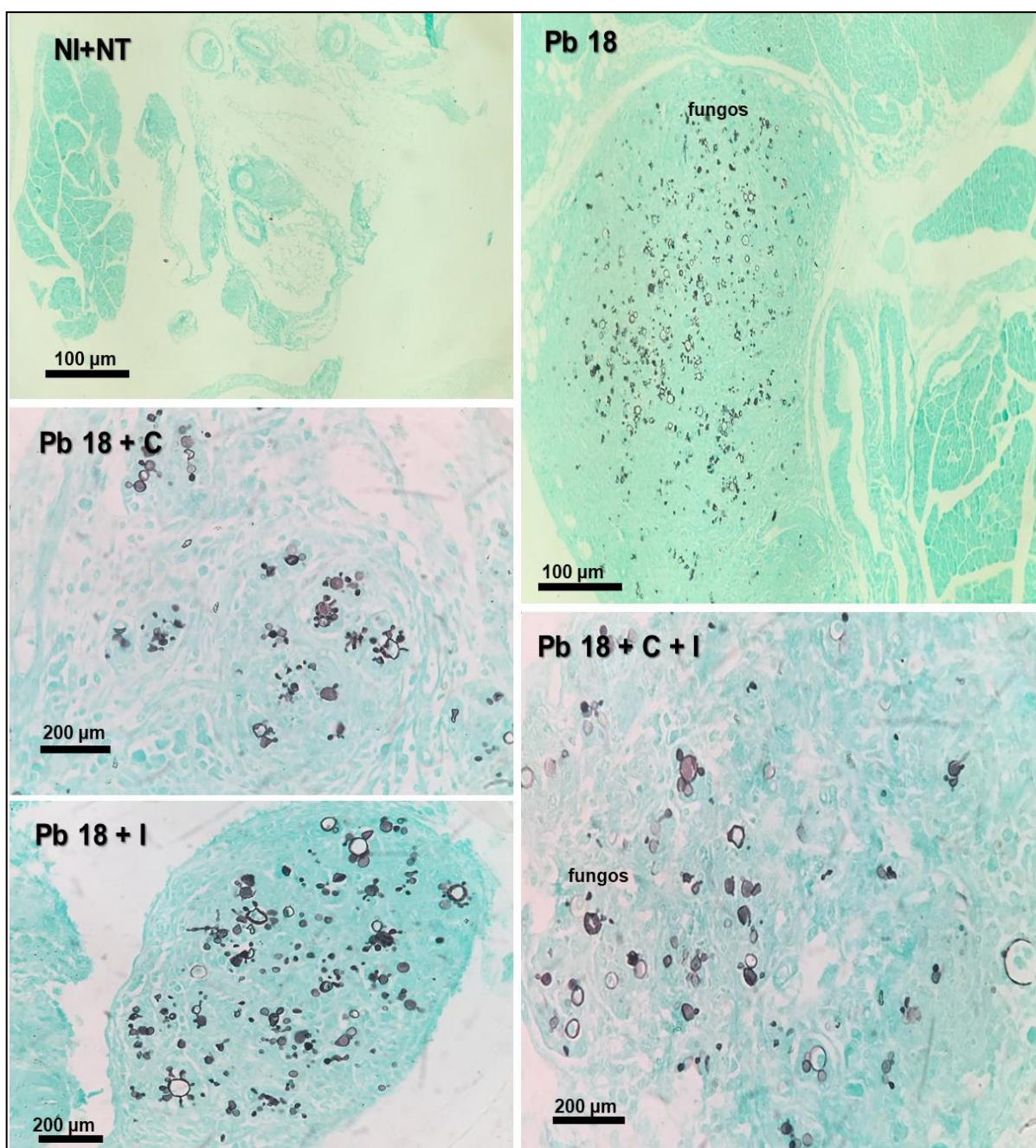


Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (Pb 18 + C). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (Pb 18 + C + I), respectivamente. Microscopia de campo claro (coloração: hematoxilina-eosina/HE). Aumento: NI+NT, 100 µm = 100X; Pb18, 100 µm = 100X; Pb18 + C, 100 µm = 100X; Pb18 + I, 100 µm = 100X e 200 µm = 400X; Pb18 + C + I, 100 µm = 100X.



Figura 40: Análise quanto à presença de fungos no omento/pâncreas nos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 120 dias de infecção e tratamento.



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (Pb 18 + C). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (Pb 18 + C + I), respectivamente. Microscopia de campo claro (coloração: tricrômico de gomori). Aumento: NI+NT, 100 µm = 100X; Pb18, 100 µm = 100X; Pb18 + C, 200 µm = 400X; Pb18 + I, 200 µm = 400X; Pb18 + C + I, 200 µm = 400X.

### 5.11 Análise da presença de fibras de colágeno dos animais infectados e infectados e tratados por 120 dias

A presença de fibras de colágeno tecidual foi avaliada nos animais com 120 dias de infecção e tratamento. Os animais não infectados e não tratados (NI + NT) apresentaram dentro dos padrões de normalidade no tecido de todos os órgãos (Figuras 42, 43, 44 e 45).

Os animais infectados e não tratados (Pb18) no baço observou um aumento da cápsula esplênica causado pelas fibras de colágeno. Há uma maior predominância entremeio ao tecido e ao redor do granuloma (Figura 42). No fígado os animais apresentaram um aumento da densidade de fibras de colágeno intersticial e distribuído ao redor dos hepatócitos e há uma maior concentração ao redor do granuloma. Em alguns pontos do tecido se apresentam mais espessas (Figura 43). Nos pulmões houve um aumento de fibras de colágeno intersticial entremeio aos alvéolos pulmonares. Ao redor do granuloma há uma maior predominância de fibras de colágeno (Figura 44). No omento/pâncreas há alta densidade de fibras de colágeno entremeio ao tecido. Há uma maior predominância ao redor do granuloma (Figura 45).

Os animais infectados e tratados com Celecoxibe (Pb18 + C) no baço há um aumento da quantidade de fibras de colágeno entremeio ao tecido e ao redor do granuloma. A cápsula esplênica se apresenta dentro dos padrões de normalidade. A densidade das fibras é fina (Figura 42). No fígado há pouca quantidade de fibras de colágeno no interstício do tecido e estas se apresentam finas. Ao redor do granuloma estão em maior predominância e organização (Figura 43). Nos pulmões também há um aumento de fibras de colágeno intersticial. Ao redor dos granulomas há uma maior organização e na região perivascular (Figura 44). No omento/pâncreas há uma moderada quantidade de fibras de colágeno entremeio ao tecido. Há uma maior predominância ao redor do granuloma (Figura 45).

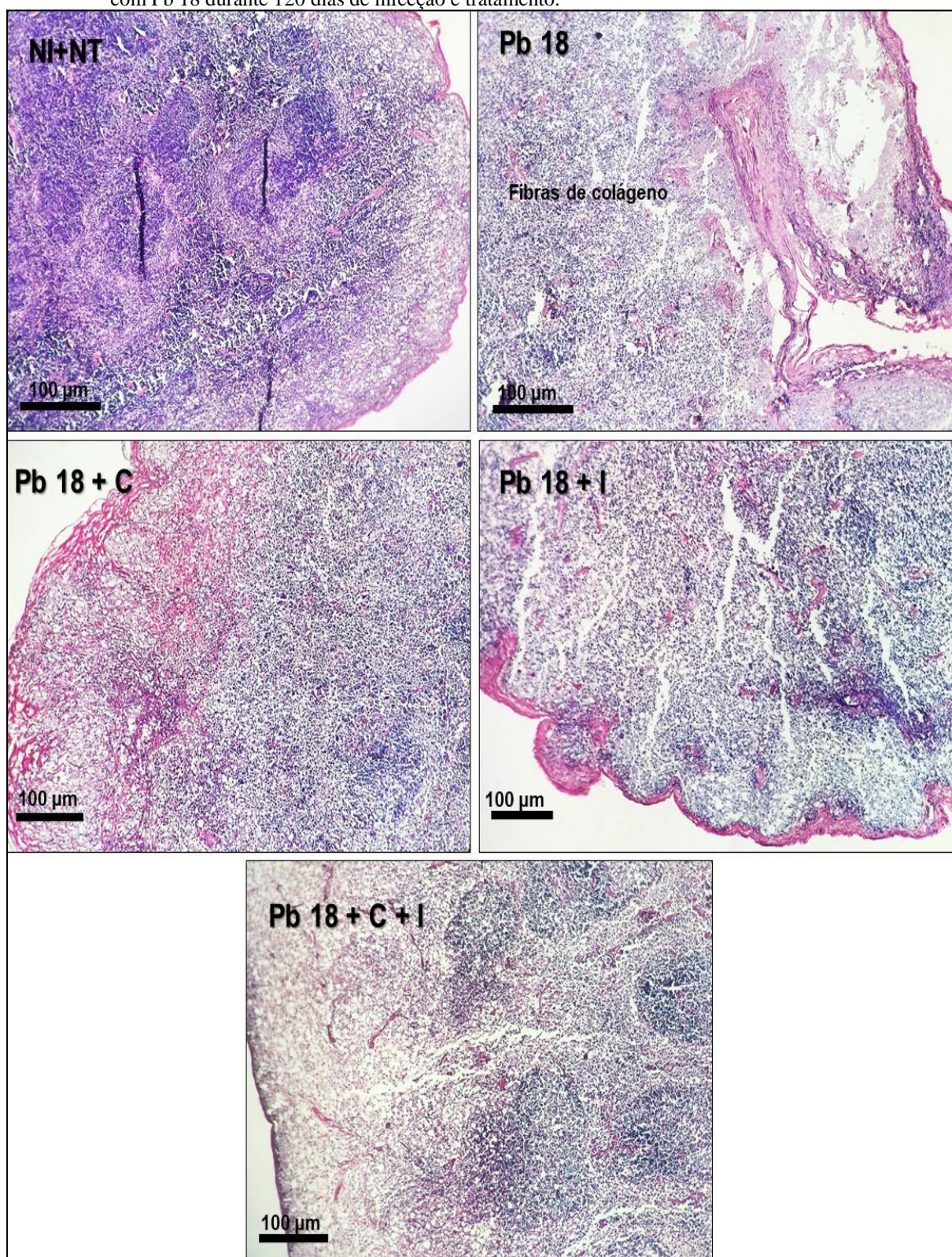
Os animais infectados e tratados com Itraconazol (Pb 18 + I) no baço, há um aumento da quantidade de fibras de colágeno entremeio ao tecido e maior predominância ao redor do granuloma. A cápsula esplênica apresentou dentro dos padrões de normalidade (Figura 42). No fígado há moderada quantidade de fibras de colágeno intersticial. Ao redor do granuloma notou maior organização de fibras de colágeno (Figura 43). Nos pulmões há moderada quantidade de fibras de colágeno intersticial e perivascular (Figura 44). No omento/pâncreas há moderada quantidade de fibras de colágeno entremeio ao tecido. Há maior predominância e organização ao redor do granuloma (Figura 45).

Os animais infectados e tratados com Celecoxibe + Itraconazol (Pb 18 + C + I) no

baço há pouca quantidade de fibras de colágeno entre meio ao tecido. Há maior predominância e organização ao redor do granuloma. A cápsula esplênica se apresenta dentro dos padrões de normalidade e a densidade das fibras de colágeno são finas (Figura 42). No fígado há baixa densidade de fibras finas de colágeno no tecido e com maior predominância perivascular e ao redor de alguns granulomas (Figura 43). Nos pulmões há moderada quantidade de fibras de colágeno entre meio aos alvéolos pulmonares e perivascular (Figura 44). No omento/pâncreas há pouca quantidade de fibras de colágeno entre meio ao tecido. Há uma maior predominância ao redor dos granulomas e perivascular (Figura 45).



Figura 41 - Análise da presença das fibras de colágeno no baço dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 120 dias de infecção e tratamento.

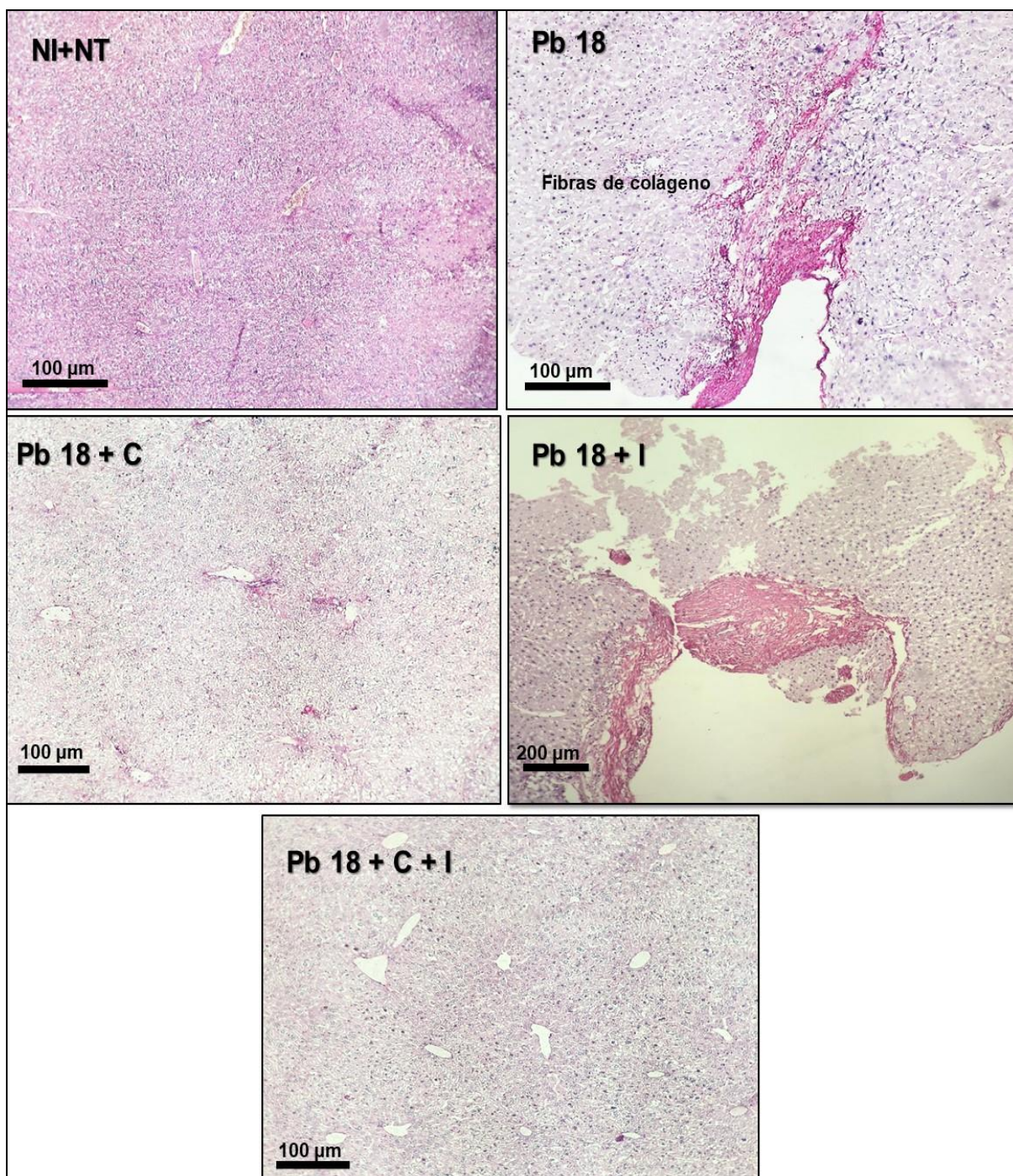


Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (Pb 18 + C). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (Pb 18 + C + I), respectivamente. Microscopia de campo claro (coloração: picros sirius red). Aumento: NI+NT, 100 µm = 100X; Pb18, 100 µm = 100X; Pb18 + C, 100 µm = 100X; Pb18 + I, 100 µm = 100X; Pb18 + C + I, 100 µm = 100X.



Figura 42 - Análise da presença das fibras de colágeno no fígado dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 120 dias de infecção e tratamento.

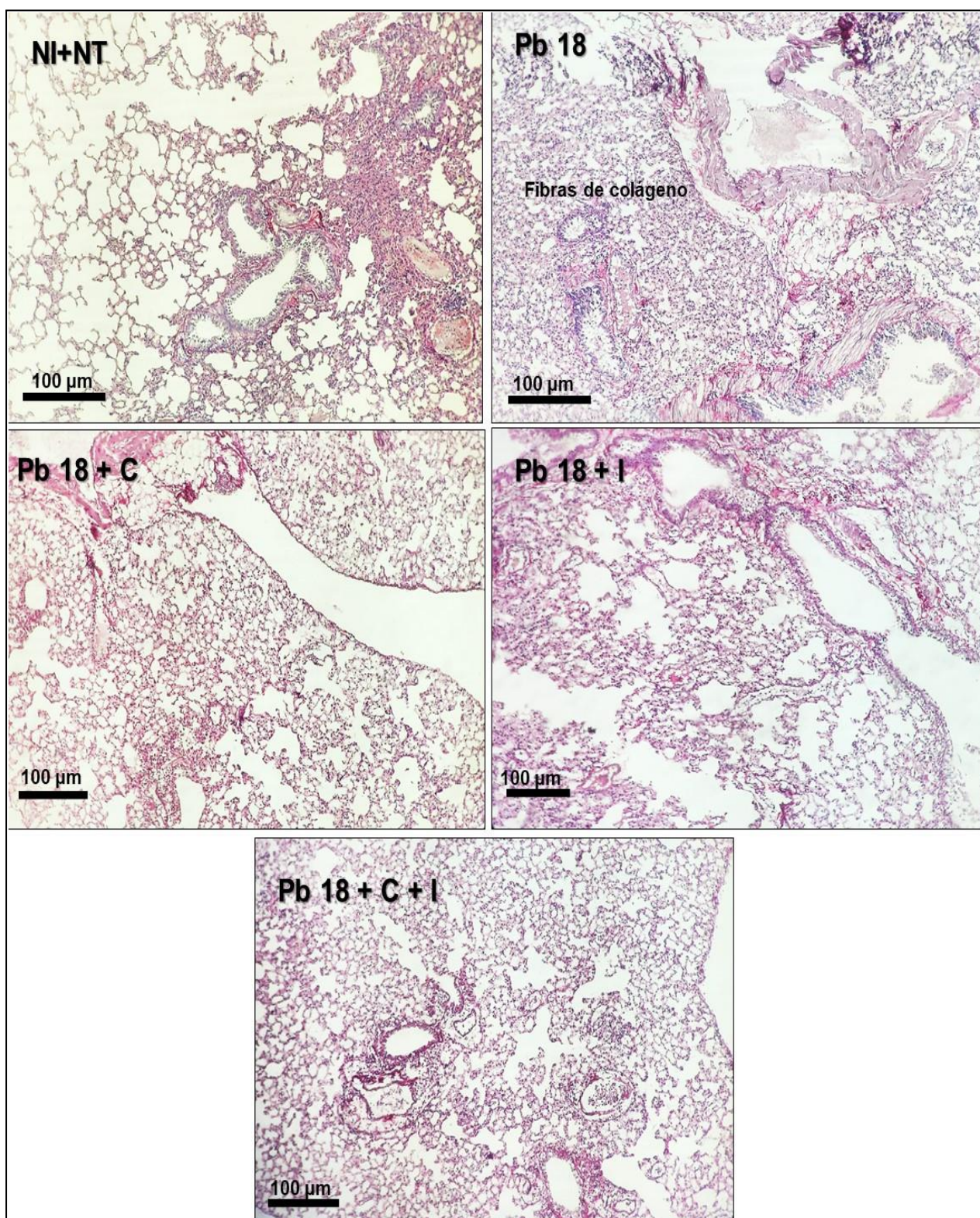


Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (Pb 18 + C). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (Pb 18 + C + I), respectivamente. Microscopia de campo claro (coloração: picros sirius red). Aumento: NI+NT, 100 μm = 100X; Pb18, 100 μm = 100X; Pb18 + C, 100 μm = 100X; Pb18 + I, 100 μm = 100X; Pb18 + C + I, 100 μm = 100X.



Figura 43 - Análise da presença das fibras de colágeno nos pulmões dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 120 dias de infecção e tratamento.

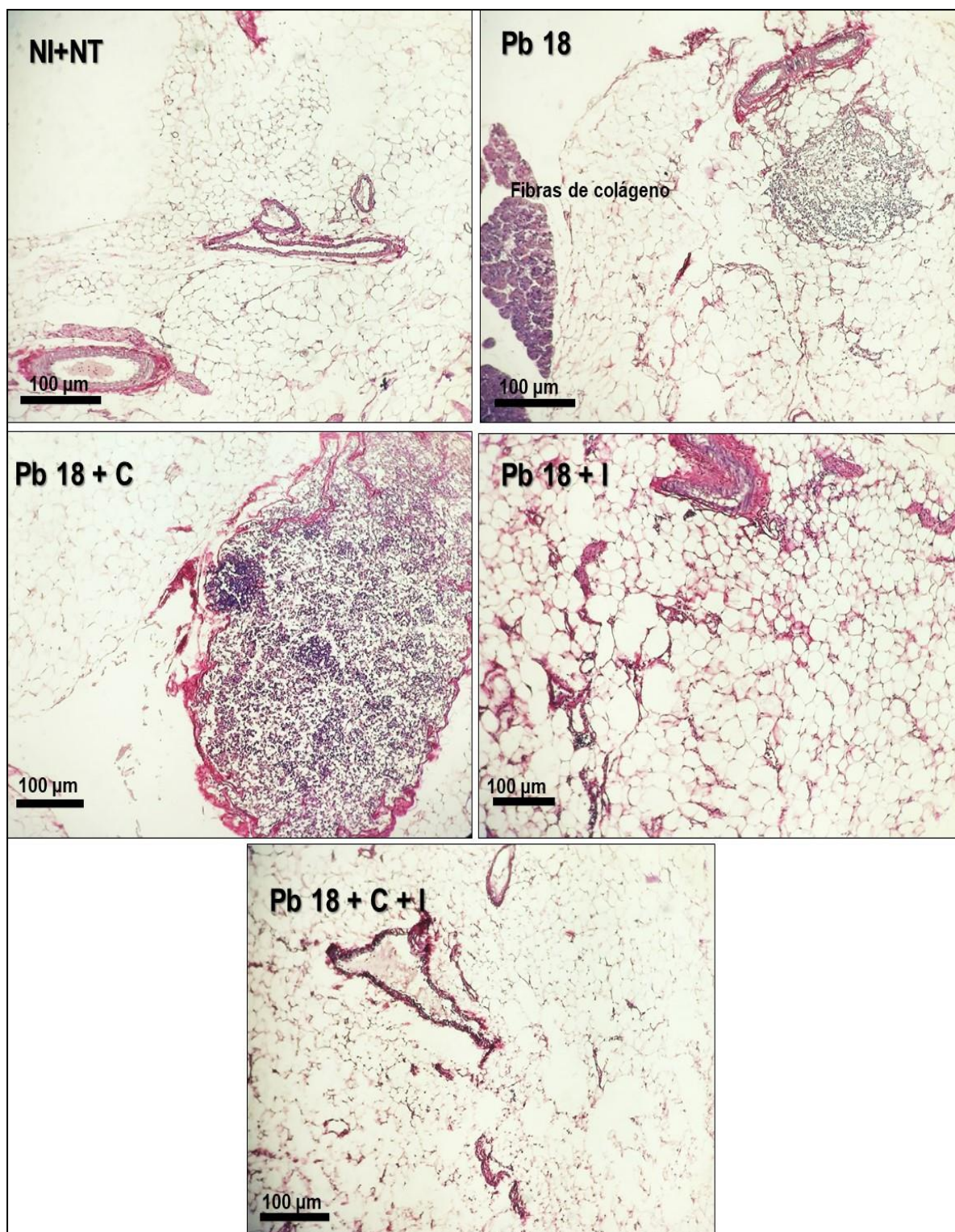


Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (Pb 18 + C). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (Pb 18 + C + I), respectivamente. Microscopia de campo claro (coloração: picrosirius red). Aumento: NI+NT, 100 µm = 100X; Pb18, 100 µm = 100X; Pb18 + C, 100 µm = 100X; Pb18 + I, 100 µm = 100X; Pb18 + C + I, 100 µm = 100X.



Figura 44 - Análise da presença das fibras de colágeno no omento/pâncreas dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 120 dias de infecção e tratamento.



Fonte: Do autor (2022).

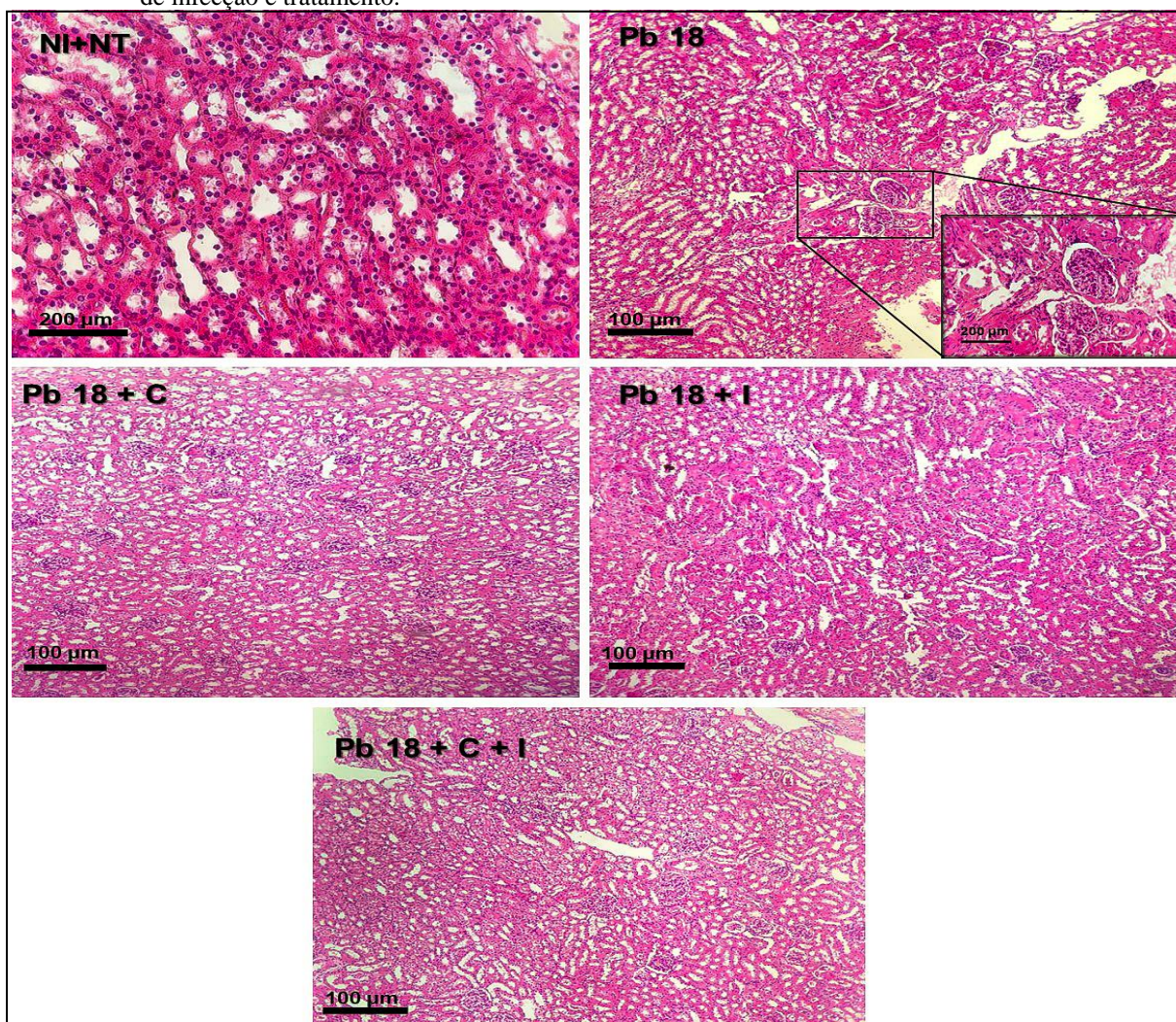
Legenda: Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (Pb 18 + C). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (Pb 18 + C + I), respectivamente. Microscopia de campo claro (coloração: picos sirius red). Aumento: NI+NT, 100 µm = 100X; Pb18, 100 µm = 100X; Pb18 + C, 100 µm = 100X; Pb18 + I, 100 µm = 100X; Pb18 + C + I, 100 µm = 100X.



## 5.12 Análise histológica geral dos rins dos animais infectados e infectados e tratados por 15 dias e 120 dias

Ao realizar a análise histológica de todos os animais infectados e infectados e tratados com 15 dias, notou que os aspectos histológicos estão dentro da normalidade ao se comparar com os animais não infectados (NI + NT) (Figura 46).

Figura 45 - Análise histológica dos rins dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento.



Fonte: Do autor (2022).

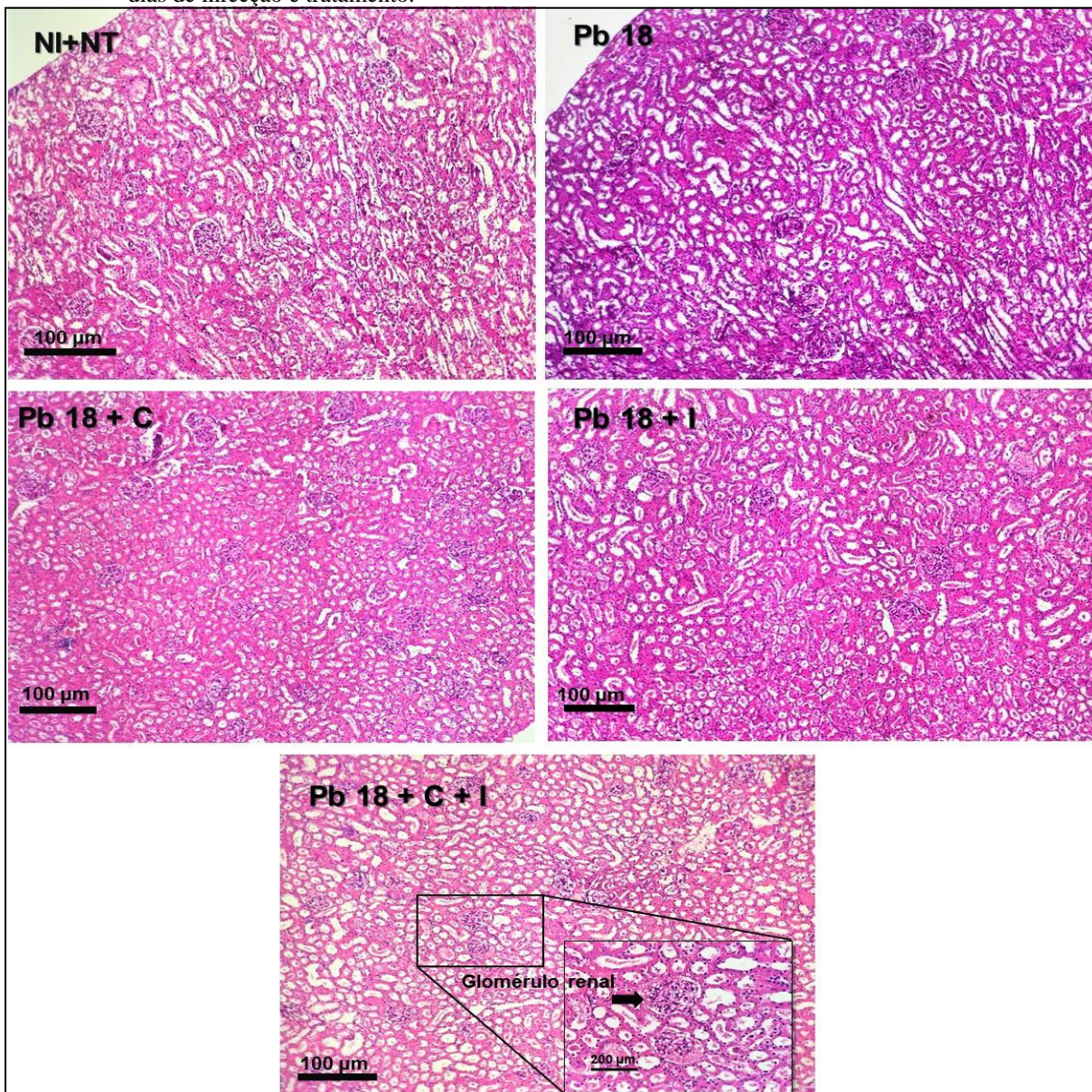
Legenda: Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (Pb 18 + C). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (Pb 18 + C + I), respectivamente. Microscopia de campo claro (coloração: hematoxilina-eosina/HE). Nota-se que os aspectos histológicos estão dentro da normalidade para todos os grupos de animais. Imagem em destaque mostra os corpúsculos renais. Aumento: NI+NT, 200 µm = 400X; Pb18, 100 µm = 100X e 200 µm = 400X; Pb18 + C, 100 µm = 100X; Pb18 + I, 100 µm = 100X; Pb18 + C + I, 100 µm = 100X.

Ao realizar a análise histológica de todos os animais infectados e infectados e tratados com 120 dias, notou que os aspectos histológicos estão dentro da normalidade ao se



comparar com os animais não infectados (NI + NT) (Figura 47).

Figura 46 - Análise histológica dos rins dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 120 dias de infecção e tratamento.



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (Pb 18 + C). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (Pb 18 + C + I), respectivamente. Microscopia de campo claro (coloração: hematoxilina-eosina). Nota-se que os aspectos histológicos estão dentro da normalidade para todos os grupos de animais. Imagem em destaque mostra os corpúsculos renais. Aumento: NI+NT, 200 µm = 400X; Pb18, 100 µm = 100X; Pb18 + C, 100 µm = 100X; Pb18 + I, 100 µm = 100X; Pb18 + C + I, 100 µm = 100X e 200 µm = 400X.

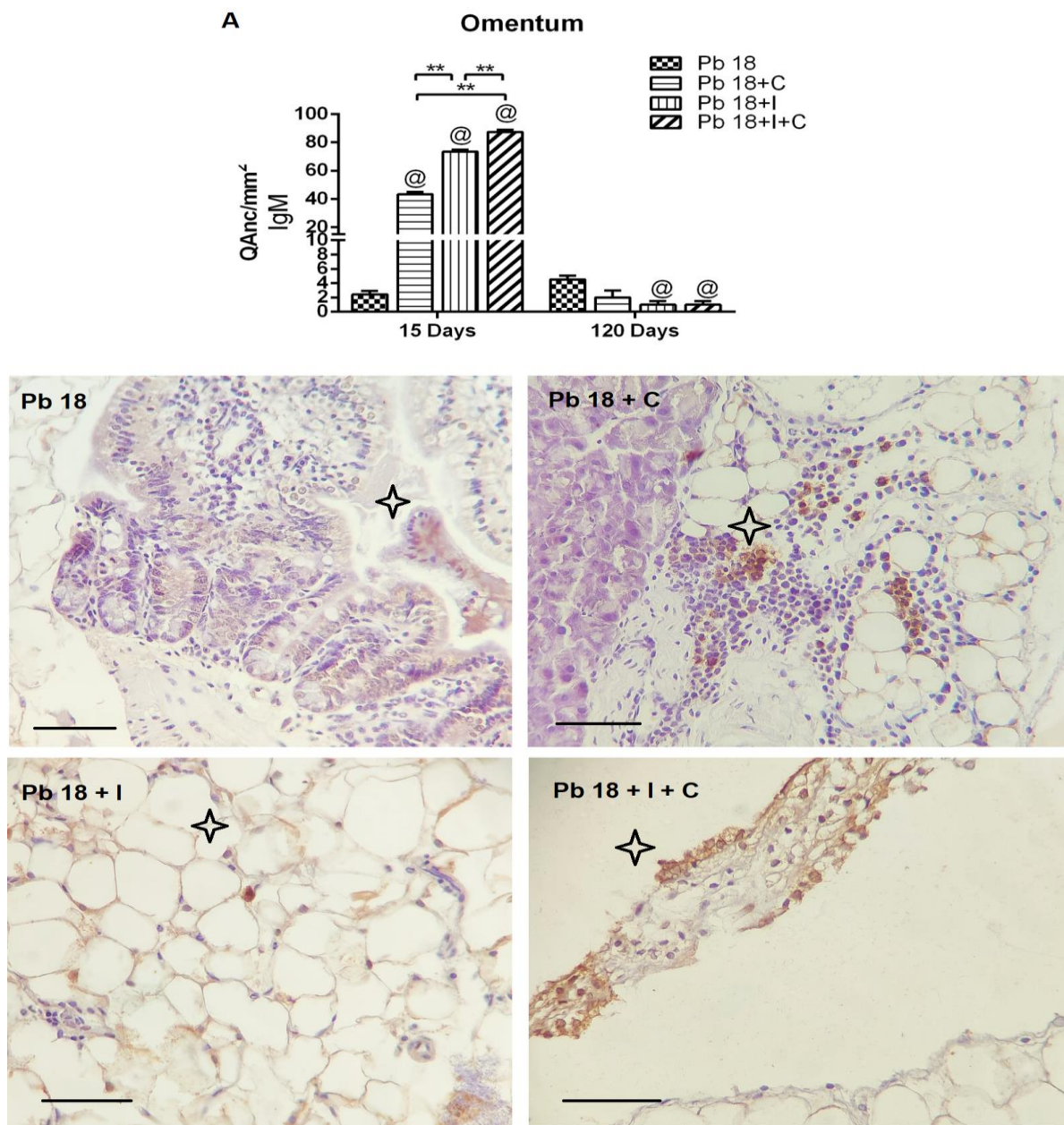
### 5.12 Análise quantitativa e imunomarcção do omento/pâncreas dos animais infectados e infectados e tratados por 15 dias e 120 dias

A expressão de IgM em omento/pâncreas de animais infectados e tratados por 15 dias pode ser observado na Figura 48A. Os resultados mostraram que os animais infectados e não tratados apresentam um número menor de células positivas para marcação com IgM em relação aos diferentes tratamentos. Os animais que receberam o tratamento combinado apresentaram um número maior de células positivas para a marcação com IgM e com significância estatística.

Ao realizar as análises de imunolocalização das células marcadas com IgM nos diferentes grupos de animais, os resultados mostraram que nos animais infectados e não tratados (Pb 18) as marcações positivas para IgM se mostraram mais distantes dos granulomas e com uma fraca positividade. Ao observar os animais tratados com Celecoxibe (Pb 18 + C) nota que as células marcadas se apresentam ao redor das lesões e são mais prevalentes nas células inflamatórias. Há uma marcação positiva mais intensa perinuclear nos polimorfonucleares. Nos animais tratados com Itraconazol (Pb 18 + I) também observa as células marcadas ao redor das lesões. No entanto há uma imunoreatividade mais intensa neste grupo de animais em relação aos animais infectados e não tratados e aos tratados somente com Celecoxibe. Já nos animais tratados com Itraconazol e Celecoxibe (Pb 18 + I + C) apresenta um número maior de área tecidual imunorreativa. Além disso, a imunolocalização destas células também são encontradas ao redor das lesões (Figura 48).



Figura 47 - Análise quantitativa e imunolocalização da reação de imunohistoquímica para detecção da expressão de IgM no omento/pâncreas dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento.



Fonte: do autor

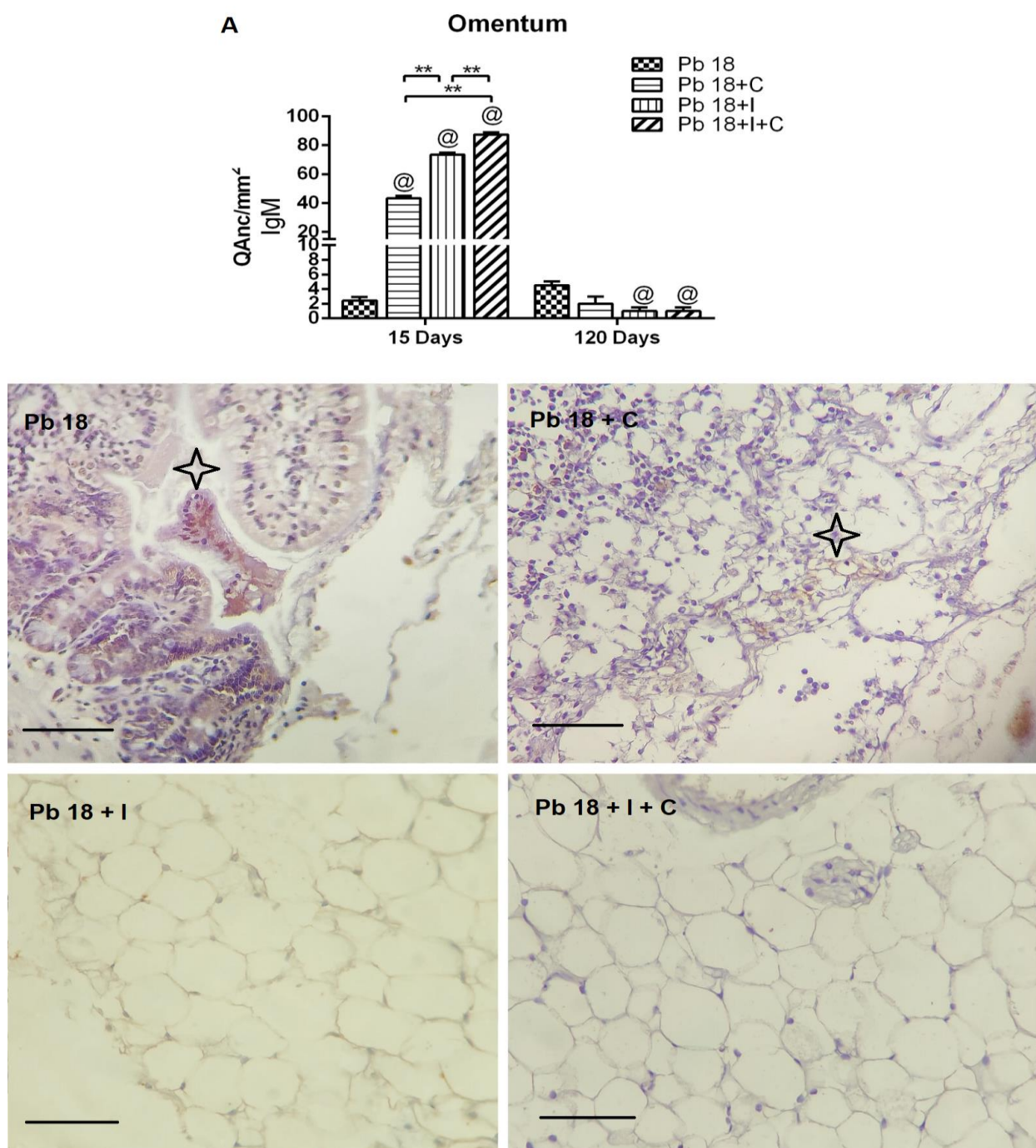
Legenda: A – Os resultados para cada grupo estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média. Diferença estatística entre os grupos (@)  $p < 0,05$  entre Pb 18 vs os diferentes tratamentos e (\*\*\*)  $p < 0,001$  entre os diferentes tratamentos, teste *Two Way ANOVA*, pós teste de *Tukey*. Os testes foram realizados em triplicata. Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (Pb 18 + C). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (Pb 18 + C + I), respectivamente. Aumento: Pb18, 200  $\mu\text{m}$  = 400X; Pb18 + C, 200  $\mu\text{m}$  = 400X; Pb18 + I, 200  $\mu\text{m}$  = 400X; Pb18 + C + I, 200  $\mu\text{m}$  = 400X.

A expressão de IgM no omento/pâncreas aos 120 dias de infecção pode ser observado na figura 49A. Os resultados mostraram que nos animais infectados e não tratados apresentaram um maior número de células marcadas em relação aos demais grupos. Ao observar os dados dos animais que receberam os diferentes tratamentos não houve significância estatística entre eles.

Em relação a imunolocalização das células marcadas com IgM, conforme pode ser observado na Figura 49, os animais infectados e não tratados há uma maior predominância de células com marcações positivas fracas próximas as lesões. Em relação aos animais que receberam os diferentes tratamentos pode-se observar que nos animais tratados somente com Celecoxibe as células marcadas mais prevalentes são as células inflamatórias. Além disso, observou que há uma marcação perinuclear nestas células. Já nos animais que foram tratados com Itraconazol e a combinação de Itraconazol e Celecoxibe há poucas células imunomarcadas e com fraca positividade (Figura 49).



Figura 48 - Análise quantitativa e imunolocalização da reação de imunohistoquímica para detecção da expressão de IgM no omento/pâncreas dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 120 dias de infecção e tratamento.



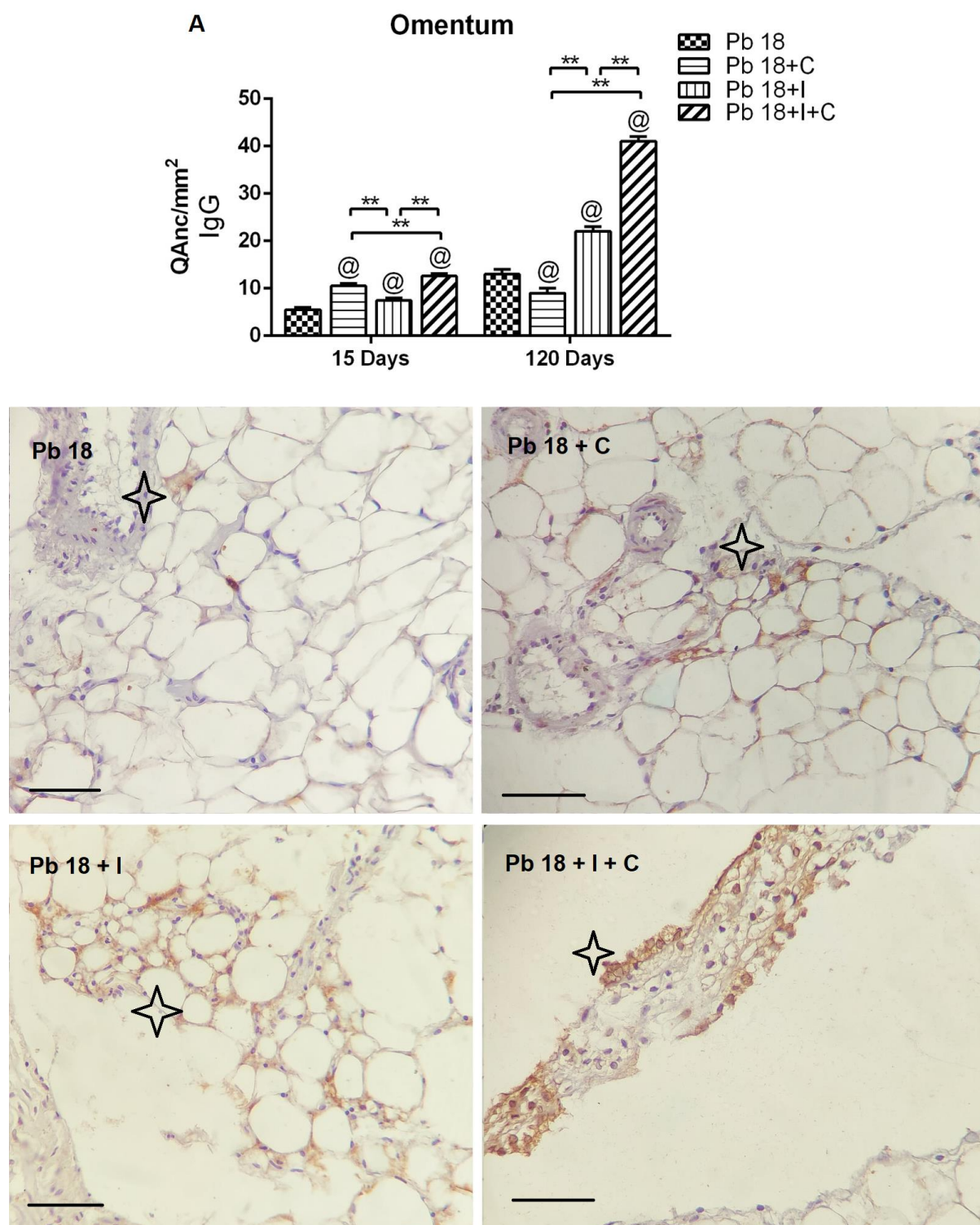
Fonte: Do autor (2022).

Legenda: A – Os resultados para cada grupo estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média. Diferença estatística entre os grupos (@)  $p < 0,05$  entre Pb 18 vs os diferentes tratamentos e (\*\*\*)  $p < 0,001$  entre os diferentes tratamentos, teste *Two Way* ANOVA, pós teste de *Tukey*. Os testes foram realizados em triplicata. Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (Pb 18 + C). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (Pb 18 + C + I), respectivamente. Aumento: Pb18, 200  $\mu$ m = 400X; Pb18 + C, 200  $\mu$ m = 400X; Pb18 + I, 200  $\mu$ m = 400X; Pb18 + C + I, 200  $\mu$ m = 400X.

A expressão de IgG em omento/pâncreas de animais infectados e tratados por 15 dias pode ser observado na Figura 50A. Os dados mostram que os animais infectados e tratados com somente Celecoxibe e infectados e tratados com a combinação de fármacos tiveram um maior número de células positivas para marcação com IgG em relação aos demais grupos. Em relação aos animais tratados somente com Itraconazol os dados mostram que há um número significativamente maior de células positivas para marcação com IgG em relação aos animais infectados e não tratados. Ao observar os resultados obtidos pelos animais que receberam o tratamento combinado estes tiveram um número significativamente maior de células positivas para IgG em relação a todos os grupos de animais.

Ao observar a imunolocalização das células imunomarcadas com IgG nos diferentes grupos de animais, os resultados mostraram que os animais infectados e não tratados tiveram uma fraca positividade das células marcadas e estando distantes do granuloma. Já nos animais que receberam o tratamento com Celecoxib (Pb 18 + C) há um número maior de células imunomarcadas em relação aos animais infectados e não tratados. As células marcadas se apresentam ao redor das lesões e em sua maioria são polimorfonucleares e a marcação é mais prevalente perinuclear. Nos animais com tratamento com Itraconazol (Pb 18 + I) há um número significativo de células imunomarcadas e estas também estão localizadas próximas as lesões. Por fim, nos animais com tratamento combinado (Pb 18 + C + I) há um intenso número de células imunomarcadas e a marcação destas células é prevalente na região perinuclear das células (Figura 50).

Figura 49 - Análise quantitativa e imunolocalização da reação de imunohistoquímica para detecção da expressão de IgG no epíplon/pâncreas dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento.



Fonte: Do autor (2022)

Legenda: A – Os resultados para cada grupo estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média. Diferença estatística entre os grupos (@)  $p < 0,05$  entre Pb 18 vs os diferentes tratamentos e (\*\*\*)  $p < 0,001$  entre os diferentes tratamentos, teste *Two Way ANOVA*, pós teste de *Tukey*. Os testes foram realizados em triplicata. Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (Pb 18 + C). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (Pb

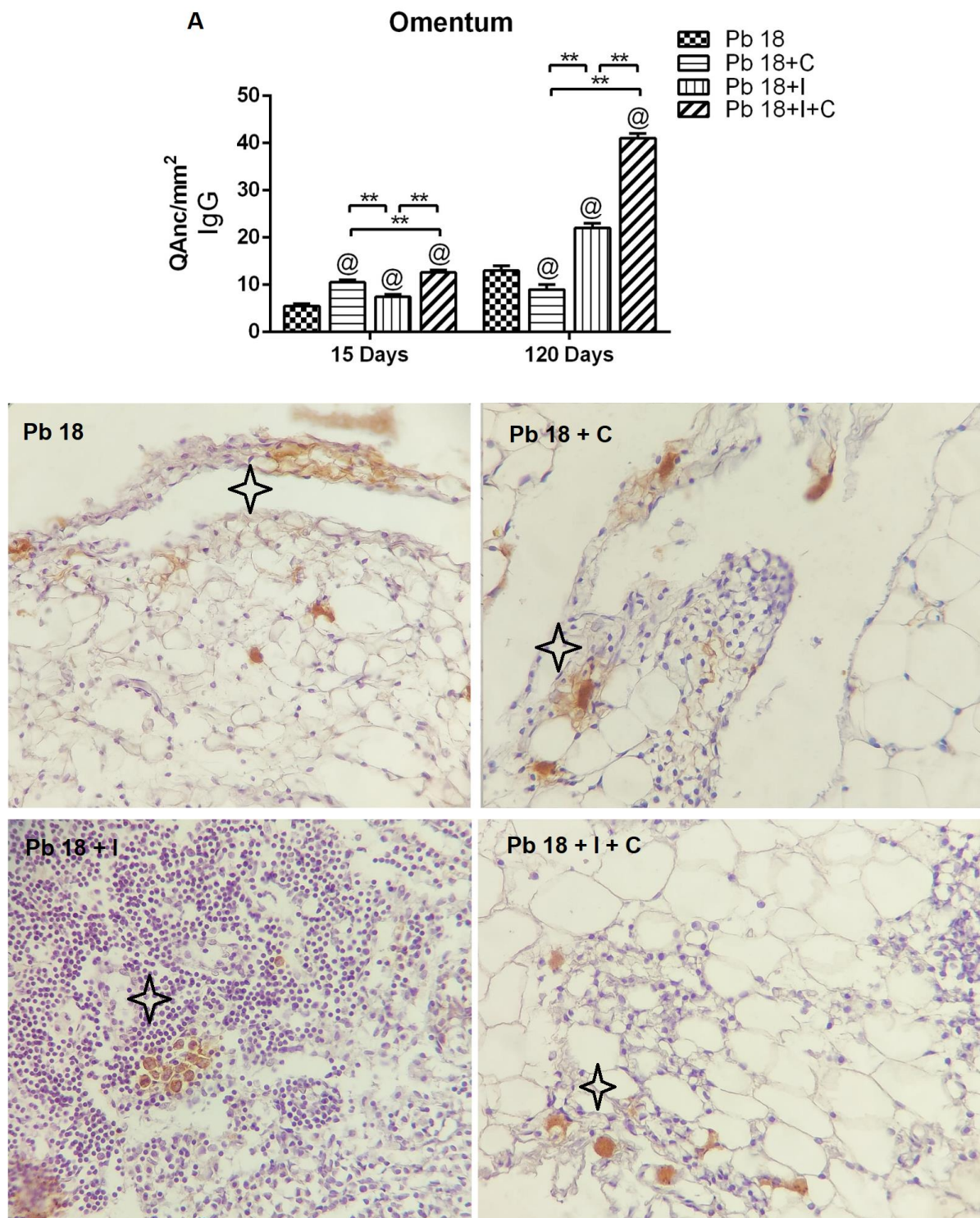
18 + C + I), respectivamente. Aumento: Pb18, 200  $\mu\text{m}$  = 400X; Pb18 + C, 200  $\mu\text{m}$  = 400X; Pb18 + I, 200  $\mu\text{m}$  = 400X; Pb18 + C + I, 200  $\mu\text{m}$  = 400X.

Na figura 51A mostra a análise quantitativa das células imunomarcadas no omento/pâncreas com 120 dias de infecção. Os resultados mostraram que há um número menor de células imunomarcadas nos animais infectados e não tratados em relação animais com diferentes tratamentos com 120 dias de infecção. Ao realizar a análise comparativa entre os diferentes grupos de animais que foram tratados com 120 dias nota que os animais que foram tratados somente com Itraconazol e com o tratamento combinado tiveram um número significativo maior em relação aos animais infectados e não tratados e os animais que receberam somente o tratamento com Celecoxibe.

Ao realizar as análises de imunolocalização das células marcadas no omento/pâncreas com IgG nos animais com 120 dias de infecção; os resultados mostraram que os animais infectados e não tratados as marcações são fracas e distantes dos granulomas e sendo prevalente na região perinuclear das células. Nos animais tratados com Celecoxibe (Pb 18 +C) também há uma fraca positividade, também as marcações estão mais distantes dos granulomas, sendo mais prevalentes as células polimorfonucleares. Já nos animais tratados com Itraconazol (Pb 18 +I) e nos animais com o tratamento combinado (Pb 18 + I + C) há um número maior de células imunorreativas e uma forte positividade nas imunomarcações. As células imunomarcadas são polimorfonucleares e as marcações podem ser observadas na região perinuclear (Figura 51).



Figura 50 - Análise quantitativa e imunolocalização da reação de imunohistoquímica para detecção da expressão de IgG no epíplon/pâncreas dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 120 dias de infecção e tratamento.



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: A – Os resultados para cada grupo estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média. Diferença estatística entre os grupos (@)  $p < 0,05$  entre Pb 18 vs os diferentes tratamentos e (\*\*\*)  $p < 0,001$  entre os diferentes tratamentos, teste *Two Way ANOVA*, pós teste de *Tukey*. Os testes foram realizados em triplicata. Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (Pb 18 + C). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (Pb

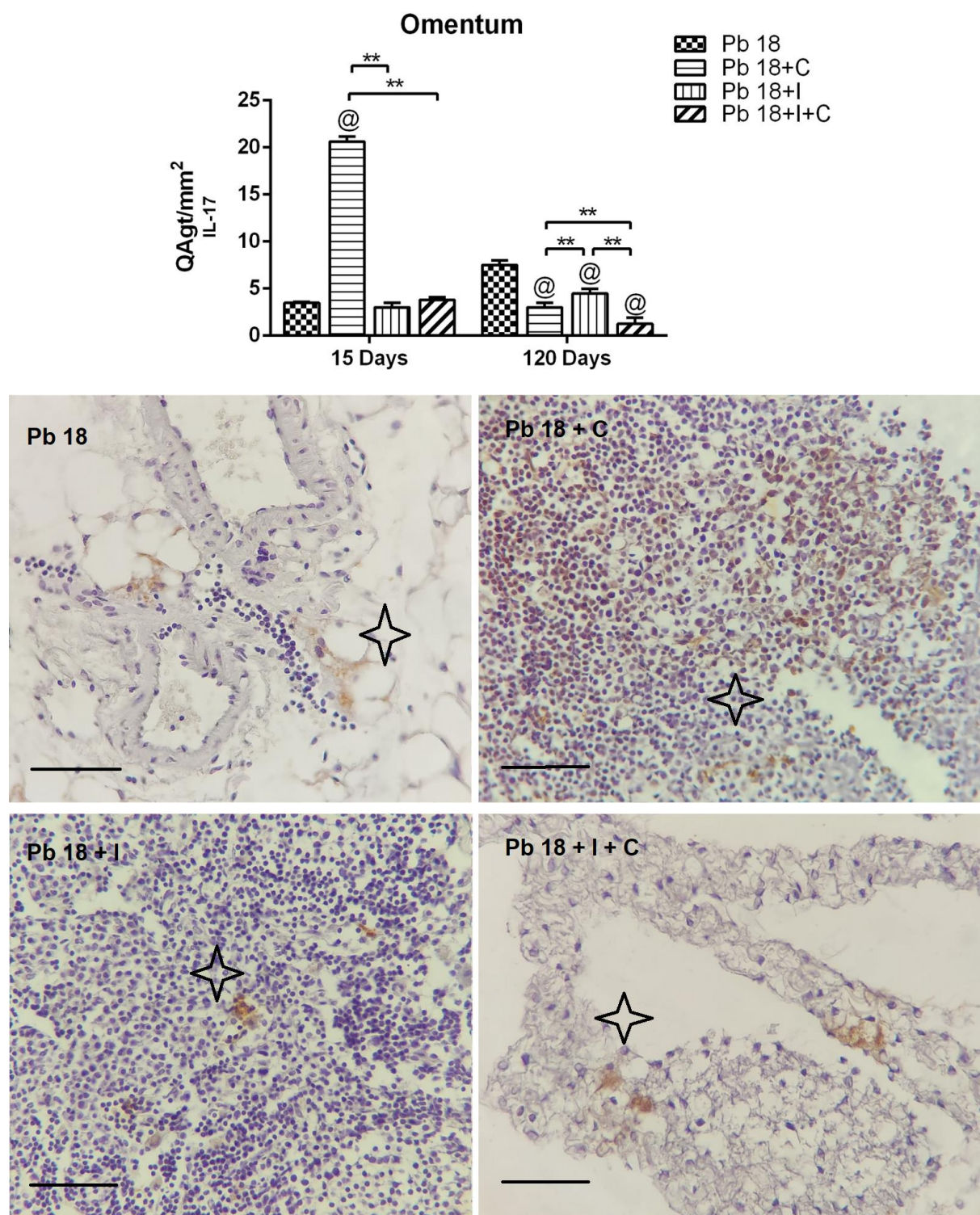
18 + C + I), respectivamente. Aumento: Pb18, 200  $\mu\text{m}$  = 400X; Pb18 + C, 200  $\mu\text{m}$  = 400X; Pb18 + I, 200  $\mu\text{m}$  = 400X; Pb18 + C + I, 200  $\mu\text{m}$  = 400X.

A expressão de IL-17 em omento/pâncreas de animais infectados e tratados por 15 dias pode ser observado na Figura 52A. Os dados mostram que os animais infectados e tratados com somente Celecoxibe tiveram um maior número de células positivas para marcação com IL-17 em relação aos diferentes tratamentos.

Ao observar a imunolocalização das células imunomarcadas com IL-17 nos diferentes grupos de animais, os resultados mostraram que os animais infectados e não tratados tiveram uma fraca positividade das células marcadas e estando distantes do granuloma. Já nos animais que receberam o tratamento com Celecoxib (Pb 18 + C) há um número maior de células imunomarcadas em relação aos animais infectados e não tratados. As células marcadas se apresentam ao redor das lesões e em sua maioria são polimorfonucleares e a marcação é mais prevalente perinuclear. Já nos animais com tratamento com Itraconazol (Pb 18 + I) e tratados com Celecoxibe e Itraconazol (Pb 18 + C + I) há um número menor de células imunomarcadas (Figura 52).



Figura 51 - Análise quantitativa e imunolocalização da reação de imunohistoquímica para detecção da expressão de IL-17 no epíplon/pâncreas dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento.



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: A – Os resultados para cada grupo estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média. Diferença estatística entre os grupos (@)  $p < 0,05$  entre Pb 18 vs os diferentes tratamentos e (\*\*\*)  $p < 0,001$  entre os diferentes tratamentos, teste *Two Way ANOVA*, pós teste de *Tukey*. Os testes foram realizados em triplicata. Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (Pb 18 + C). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (Pb

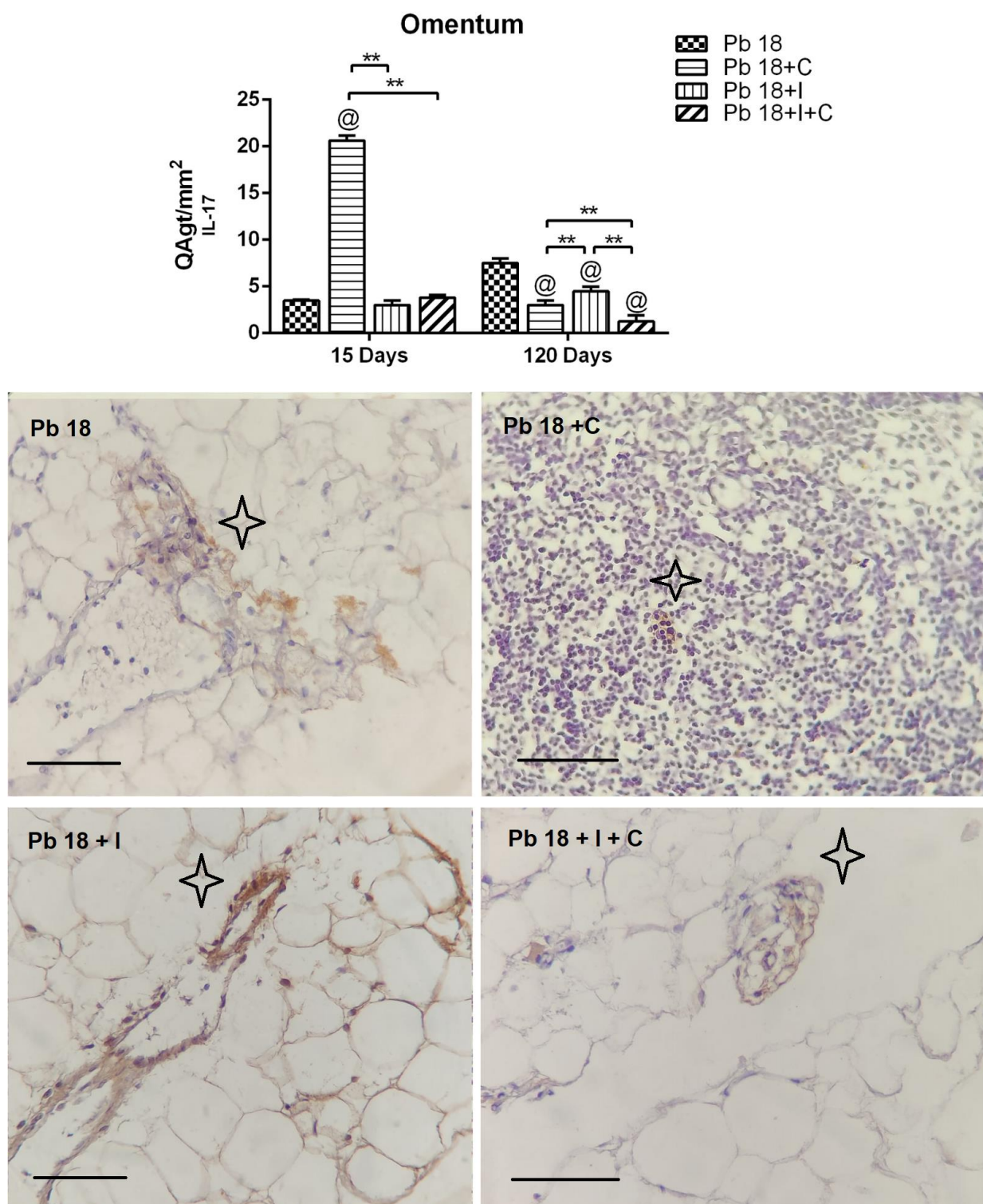
18 + C + I), respectivamente. Aumento: Pb18, 200  $\mu\text{m}$  = 400X; Pb18 + C, 200  $\mu\text{m}$  = 400X; Pb18 + I, 200  $\mu\text{m}$  = 400X; Pb18 + C + I, 200  $\mu\text{m}$  = 400X.

A expressão de IL-17 em omento/pâncreas de animais infectados e tratados por 120 dias pode ser observado na Figura 53A. Os dados mostram que os animais infectados e não tratados tiveram um número maior de células imunomarcadas em relação aos diferentes tratamentos. Ao observar os dados, os animais tratados somente com Itraconazol tiveram um número significativo maior em relação aos demais animais que receberam os diferentes tratamentos. Os animais com tratamento combinado apresentaram o menor número de células imunomarcadas em relação a todos os grupos de animais.

Ao observar a imunolocalização das células imunomarcadas com IL-17 nos diferentes grupos de animais, os resultados mostraram que os animais infectados e não tratados tiveram uma fraca positividade das células marcadas e também estando distantes do granuloma. Já nos animais que receberam o tratamento com Celecoxibe (Pb 18 + C) há um número menor de células imunomarcadas em relação aos animais infectados e não tratados. As células marcadas se apresentam ao redor das lesões e em sua maioria são polimorfonucleares e a marcação é mais prevalente perinuclear. Já nos animais com tratamento com Itraconazol (Pb 18 + I) há um número significativo de células imunomarcadas os animais tratados com Celecoxibe e Itraconazol (Pb 18 + C + I) há um número menor de células imunomarcadas em relação aos demais animais (Figura 53).



Figura 52 - Análise quantitativa e imunolocalização da reação de imunohistoquímica para detecção da expressão de IL-17 no epíplon/pâncreas dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 120 dias de infecção e tratamento.



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: A – Os resultados para cada grupo estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média. Diferença estatística entre os grupos (@)  $p < 0,05$  entre Pb 18 vs os diferentes tratamentos e (\*\*\*)  $p < 0,001$  entre os diferentes tratamentos, teste *Two Way ANOVA*, pós teste de *Tukey*. Os testes foram realizados em triplicata. Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (Pb 18 + C). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (Pb

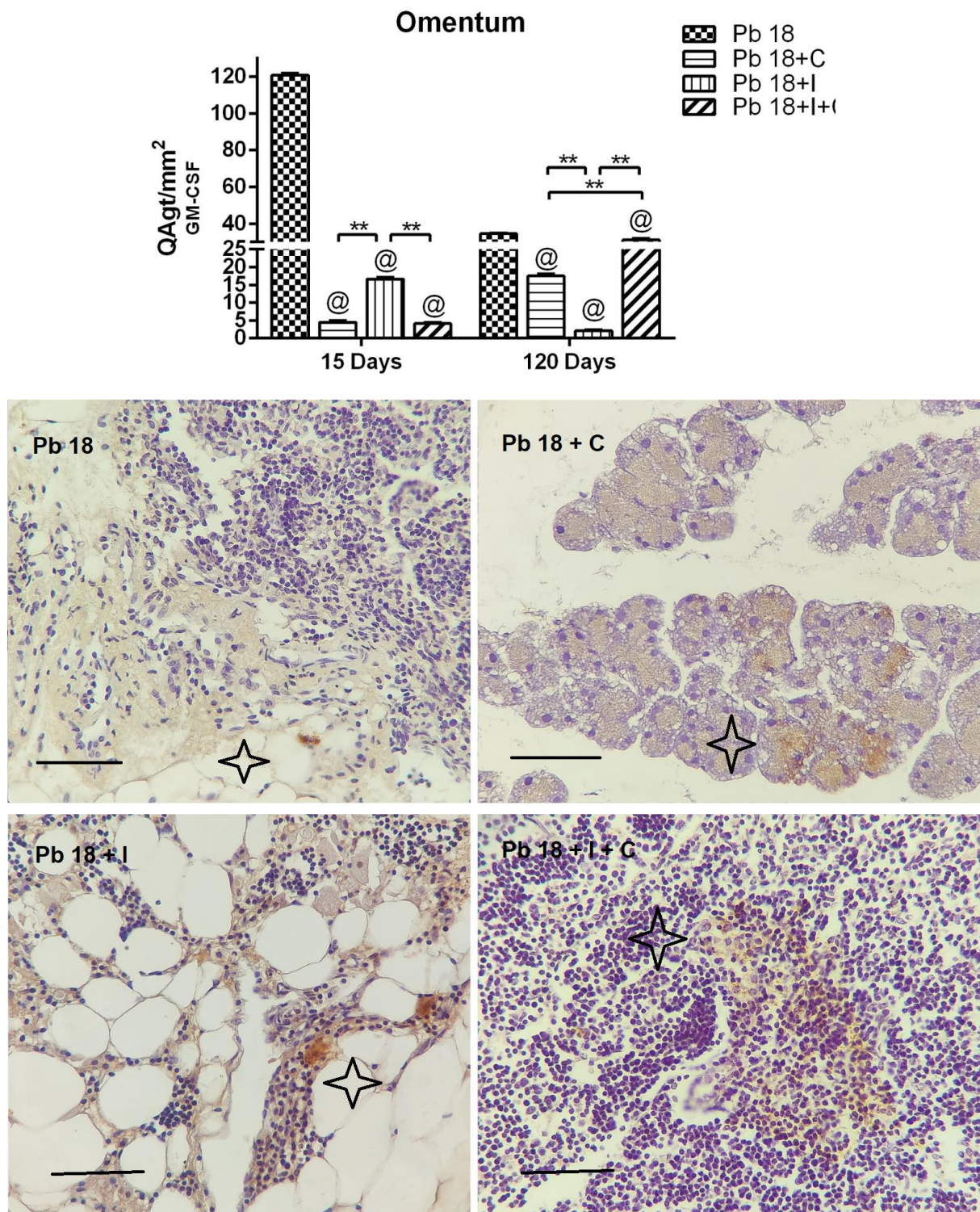
18 + C + I), respectivamente. Aumento: Pb18, 200  $\mu\text{m}$  = 400X; Pb18 + C, 200  $\mu\text{m}$  = 400X; Pb18 + I, 200  $\mu\text{m}$  = 400X; Pb18 + C + I, 200  $\mu\text{m}$  = 400X.

A expressão de GM-CSF em omento/pâncreas de animais infectados e tratados por 15 dias pode ser observado na Figura 54A. Os dados mostram que os animais infectados e não tratados apresentaram um número significativamente maior de células marcadas em relação aos diferentes tratamentos. Ao comparar os diferentes tratamentos os animais tratados somente com Itraconazol (Pb 18 + I) tiveram um maior número de células positivas para marcação com IL-17 em relação aos diferentes tratamentos.

Ao observar a imunolocalização das células imunomarcadas com GM-CSF nos diferentes grupos de animais, os resultados mostraram que os animais infectados e não tratados tiveram uma forte positividade das células marcadas e estas estão próximas ao granuloma. Já nos animais que receberam o tratamento com Celecoxibe (Pb 18 + C) há um número menor de células imunomarcadas em relação aos animais infectados e não tratados. As células marcadas se apresentam ao redor das lesões e em sua maioria são polimorfonucleares e a marcação é mais prevalente perinuclear. Já nos animais com tratamento com Itraconazol (Pb 18 + I) há uma forte positividade das células marcadas e estas estão ao redor da lesão e em relação aos animais tratados com Celecoxibe e Itraconazol (Pb 18 + C + I) há um número menor de células imunomarcadas, no entanto estas células são em sua maior prevalência polimorfonuclear (Figura 54).



Figura 53 - Análise quantitativa e imunolocalização da reação de imunohistoquímica para detecção da expressão de GM-CSF no epíplon/pâncreas dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento.



Fonte: Do autor (2022).

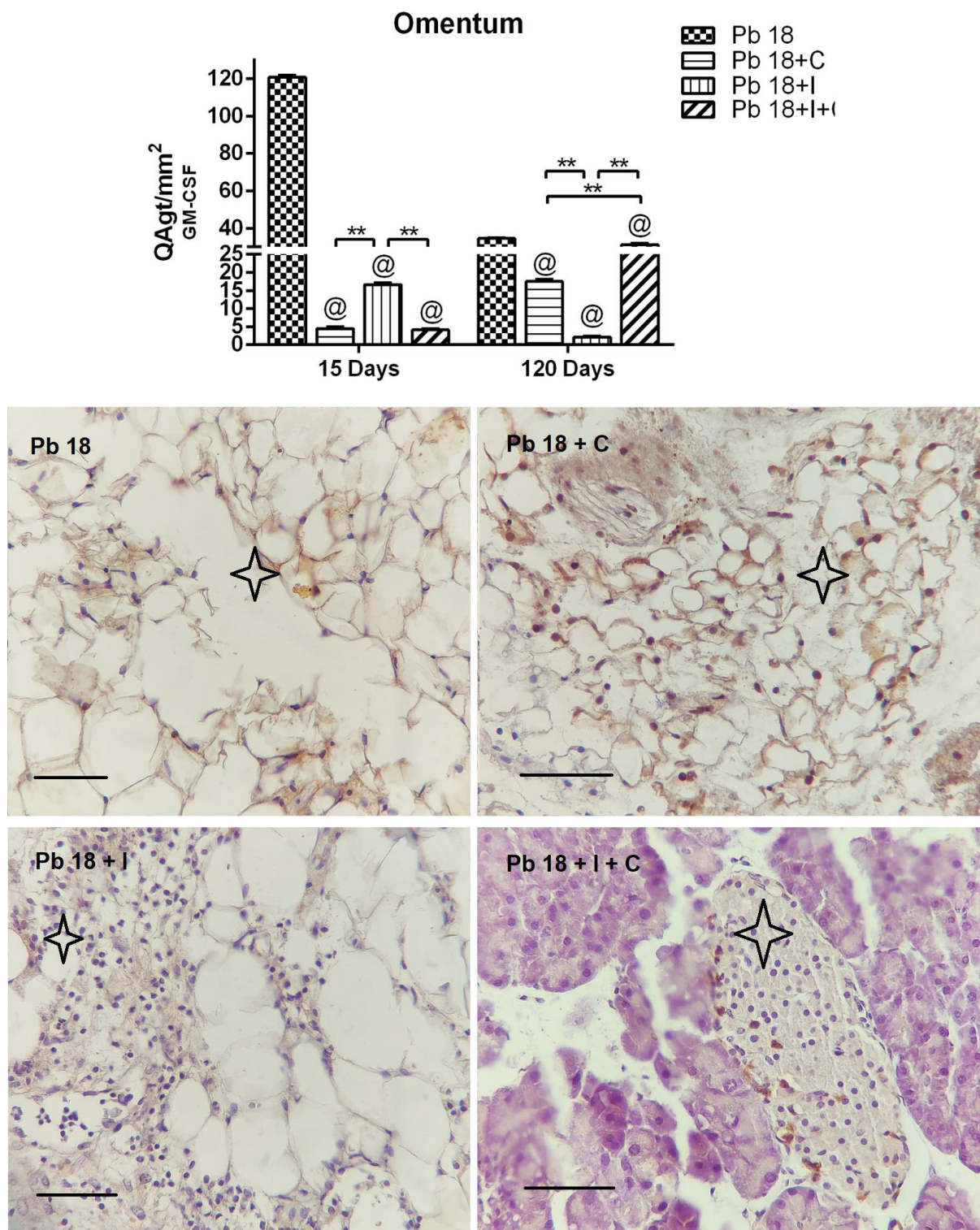
Legenda: A – Os resultados para cada grupo estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média. Diferença estatística entre os grupos (@)  $p < 0,05$  entre Pb 18 vs os diferentes tratamentos e (\*\*\*)  $p < 0,001$  entre os diferentes tratamentos, teste *Two Way ANOVA*, pós teste de *Tukey*. Os testes foram realizados em triplicata. Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (Pb 18 + C). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (Pb 18 + C + I), respectivamente. Aumento: Pb18, 200  $\mu\text{m}$  = 400X; Pb18 + C, 200  $\mu\text{m}$  = 400X; Pb18 + I, 200  $\mu\text{m}$  = 400X; Pb18 + C + I, 200  $\mu\text{m}$  = 400X.

A expressão de GM-CSF em omento/pâncreas de animais infectados e tratados por 120 dias pode ser observado na Figura 55A. Os dados mostraram que os animais infectados e não tratados tiveram um número maior de células imunomarcadas em relação aos diferentes tratamentos. Ao observar os dados, os animais com tratamento combinado tiveram um número significativo maior em relação aos demais animais que receberam os diferentes tratamentos. Os animais com tratamento com Itraconazol apresentaram o menor número de células imunomarcadas em relação a todos os grupos de animais.

Ao observar a imunolocalização das células imunomarcadas com GM-CSF nos diferentes grupos de animais, os resultados mostraram que os animais infectados e não tratados tiveram uma forte positividade das células marcadas e estando próximas dos granulomas. Já nos animais que receberam o tratamento com Celecoxibe (Pb 18 + C) há um número menor de células imunomarcadas em relação aos animais infectados e não tratados. As células marcadas se apresentam ao redor das lesões e em sua maioria são polimorfonucleares e a marcação é mais prevalente também perinuclear. Já nos animais com tratamento com Itraconazol (Pb 18 + I) há um número reduzido de células imunomarcadas e os animais tratados com Celecoxibe e Itraconazol (Pb 18 + C + I) há um número significativo de células imunomarcadas em relação aos demais animais que receberam os diferentes tratamentos (Figura 55).



Figura 54 - Análise quantitativa e imunolocalização da reação de imunohistoquímica para detecção da expressão de GM-CSF no epíplon/pâncreas dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 120 dias de infecção e tratamento.



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: A – Os resultados para cada grupo estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média. Diferença estatística entre os grupos (@)  $p < 0,05$  entre Pb 18 vs os diferentes tratamentos e (\*\*\*)  $p < 0,001$  entre os diferentes tratamentos, teste *Two Way* ANOVA, pós teste de *Tukey*. Os testes foram realizados em triplicata. Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (Pb 18 + C). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (Pb

18 + C + I), respectivamente. Aumento: Pb18, 200  $\mu\text{m}$  = 400X; Pb18 + C, 200  $\mu\text{m}$  = 400X; Pb18 + I, 200  $\mu\text{m}$  = 400X; Pb18 + C + I, 200  $\mu\text{m}$  = 400X.

#### 5.14 Análise do perfil inflamatório tecidual

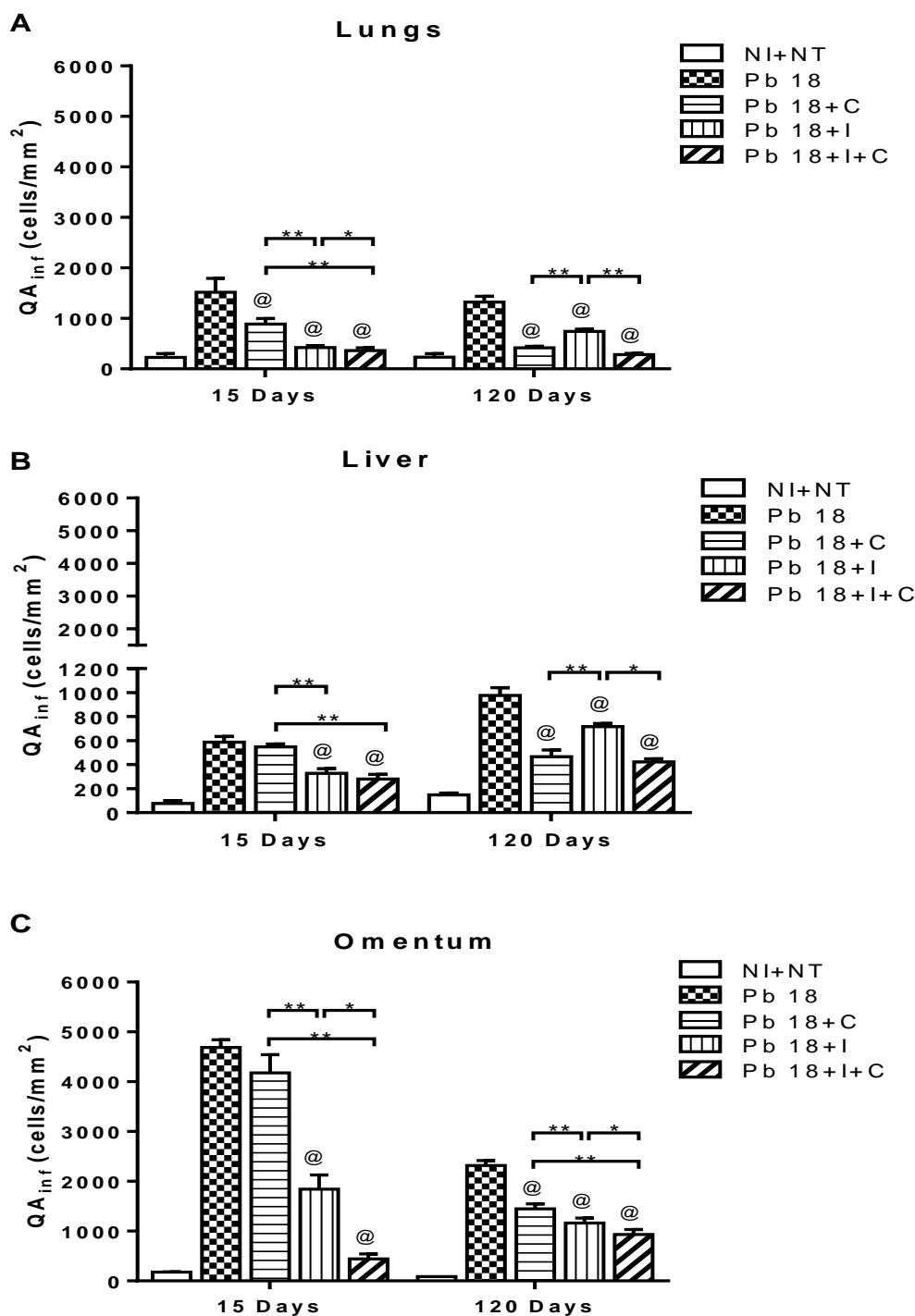
A figura 56 mostra a análise do perfil inflamatório tecidual que foi realizado por análises estereológicas. Na fase inicial da infecção nos pulmões dos animais infectados e não tratados (Pb18) há um aumento de células inflamatórias teciduais. Nos animais que receberam os diferentes tratamentos é possível perceber que houve uma diminuição significativa do número destas células e em especial no grupo que recebeu o tratamento combinado. Já fase tardia o mesmo se repete para este órgão (Figura 56A).

Ao analisar o tecido do fígado notou que na fase inicial da infecção há uma redução do número de células inflamatórias nos grupos que receberam o tratamento com Itraconazol e com o tratamento combinado. Em contrapartida na infecção tardia é possível perceber que houve uma redução significativa do número de células nos grupos tratados com Celecoxibe e no tratamento combinado (Figura 56B).

Por fim, no omento/pâncreas na fase inicial da infecção há uma redução do número de células inflamatórias no grupo tratado somente com Itraconazol e com o tratamento combinando. Na fase tardia da infecção há uma redução significativa do número de células inflamatórias em todos os grupos que receberam os diferentes tratamentos e em especial no grupo tratado com a combinação de fármacos (Figura 56C).

A análise do número de células inflamatórias permitiu avaliar o grau de lesão tecidual que poderia estar ocorrendo nos diferentes órgãos neste modelo de infecção. A partir destes resultados foi possível perceber que o tratamento foi capaz de reduzir a inflamação tecidual principalmente no omento/pâncreas na fase tardia da doença. Desta maneira, pode sugerir que há um controle do processo infeccioso, no qual, pode estar também diminuindo o número de células fúngicas no tecido. A diminuição do número de células inflamatórias teciduais também pode estar mudando o perfil de citocinas que pode ser encontrado tanto na fase inicial quanto tardia da doença.

Figura 55 - Perfil inflamatório tecidual de órgãos dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento e 120 dias de infecção e tratamento.



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (6 mg/Kg). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I) (3 mg/Kg). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (6 mg/Kg) (3 mg/Kg), respectivamente. Os resultados para cada grupo estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média. Diferença estatística entre os grupos (@)  $p < 0,05$  entre Pb 18 vs os diferentes tratamentos e (\*\*\*)  $p < 0,001$  entre os diferentes tratamentos, teste *Two Way ANOVA*, pós teste de *Tukey*. Os testes foram realizados em triplicata.

O “score” de inflamação foi analisado conforme mostra a figura 57. A partir da análise estereológica do número de células inflamatórias foi possível estabelecer o “score” de inflamação. Nesta análise realizou a comparação do “score” da fase inicial com a fase tardia de infecção.

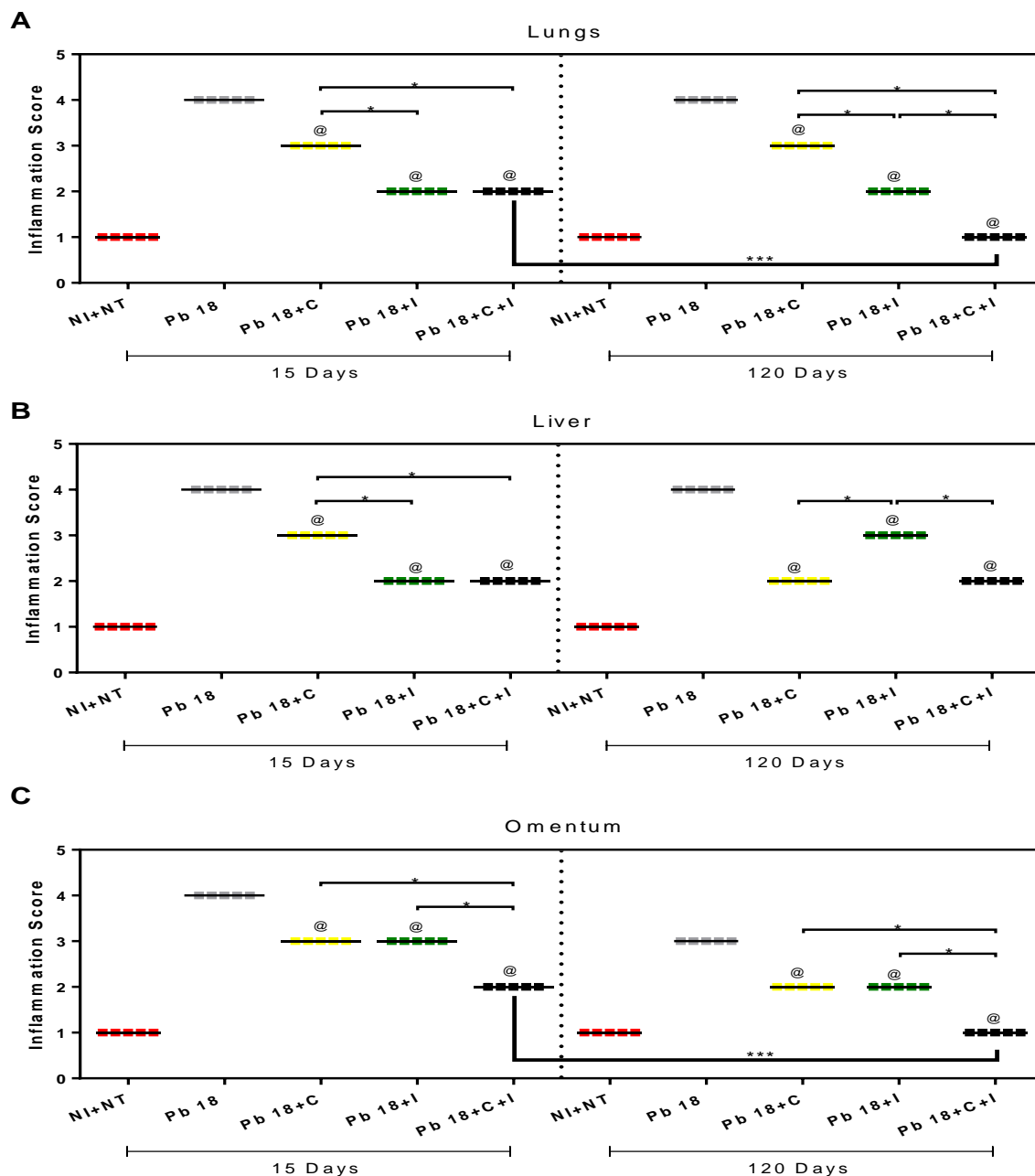
Na fase inicial da infecção os pulmões dos animais infectados e não tratados há um “score” de inflamação significativamente maior em relação aos demais animais, o mesmo pode ser observado na fase tardia da infecção. Nos animais infectados e tratados somente com Celecoxibe e Itraconazol tanto na fase inicial quanto tardia o comprometimento do órgão são semelhantes. Os resultados apresentados pelos animais com o tratamento combinado há uma diminuição significativa do “score” de inflamação em relação aos demais grupos na fase inicial da infecção. Curiosamente esta diminuição neste grupo de animais é ainda maior na fase tardia da infecção (Figura 57A).

No fígado e omento/pâncreas na fase inicial da infecção o “score” de inflamação são semelhantes em todos os animais analisados. Os animais infectados e não tratados apresentam maior “score” do que em relação aos demais. Em especial observou que os animais com tratamento combinado apresentaram diminuição do comprometimento tecidual (Figura 57B). Ao analisar estes dois órgãos na fase tardia percebeu que no fígado há “score” de inflamação moderado nos animais que receberam o tratamento combinado. No omento/pâncreas os animais com tratamento combinado apresentam um “score” de inflamação semelhante ao encontrado nos animais sadios (Figura 57C).

A partir destes resultados é possível sugerir que o tratamento combinado melhora o grau de lesão tecidual. Tais resultados são interessantes na fase tardia da infecção. Este tipo de tratamento foi capaz de realizar uma modulação tecidual, diminuindo áreas de lesão e isto pode ser em decorrência da diminuição de fungos no tecido. O órgão de choque na fase tardia de infecção nos animais que receberam o tratamento combinado apresentou com o mínimo de inflamação envolvendo o tecido.



Figura 56 - “score” de inflamação tecidual de órgãos dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento e 120 dias de infecção e tratamento.



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (6 mg/Kg). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I) (3 mg/Kg). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (6 mg/Kg) (3 mg/Kg), respectivamente. Os resultados para cada grupo estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média. As seções de tecido foram analisadas e contadas as células inflamatórias classificando-as, após, foram pontuados a gravidade da lesão utilizando a seguinte escala: 0, nenhuma (sem inflamação); 1, mínimo, com inflamação envolvendo 5% de tecido; 2, moderada, com áreas de inflamação focalmente extensas (5% a 25% dos tecidos e envolvendo um ou mais tecidos); 3, moderada a grave, com áreas de inflamação focalmente extensas (~ 25% a 50% de tecido e envolvendo múltiplos tecidos e distensão leve de tecidos); 4, grave, com grandes áreas confluentes de inflamação ( 50% do tecido). Diferença estatística entre os grupos (@)  $p < 0,05$  entre Pb 18 vs os diferentes tratamentos e (\*\*\*)  $p < 0,001$  entre os diferentes tratamentos, teste *Two Way ANOVA*, pós teste de *Tukey*. Os testes foram realizados em triplicata.

### 5.15 Número de granulomas

O número total de granulomas foi analisado conforme mostra a figura 58. Nos pulmões na fase inicial da infecção foi possível perceber que os animais infectados e não tratados (Pb 18) apresentam um número significativamente maior de granulomas em relação aos demais. Ao observar o grupo de animais que recebeu o tratamento combinado notou que apresentou um número menor de granulomas em relação aos animais infectados e não tratados (Pb 18). Ao analisar os resultados de fase tardia de infecção para este órgão notou que há um número menor em relação a fase inicial da infecção. Em contrapartida não houve significância estatística entre os grupos na fase tardia de infecção (Figura 58A).

No fígado na fase inicial de infecção notou que nos animais infectados e não tratados e tratado com Celecoxibe apresentaram um número significativamente maior de granulomas em relação aos demais. Entre os tratamentos não houve significância estatística. Já na fase tardia de infecção notou que o mesmo se repete para os dois grupos mencionados anteriormente. Vale ressaltar que os animais que receberam o tratamento combinado apresentaram número de granulomas significativamente maior em relação aos animais infectados e tratados somente com Itraconazol (Figura 58B).

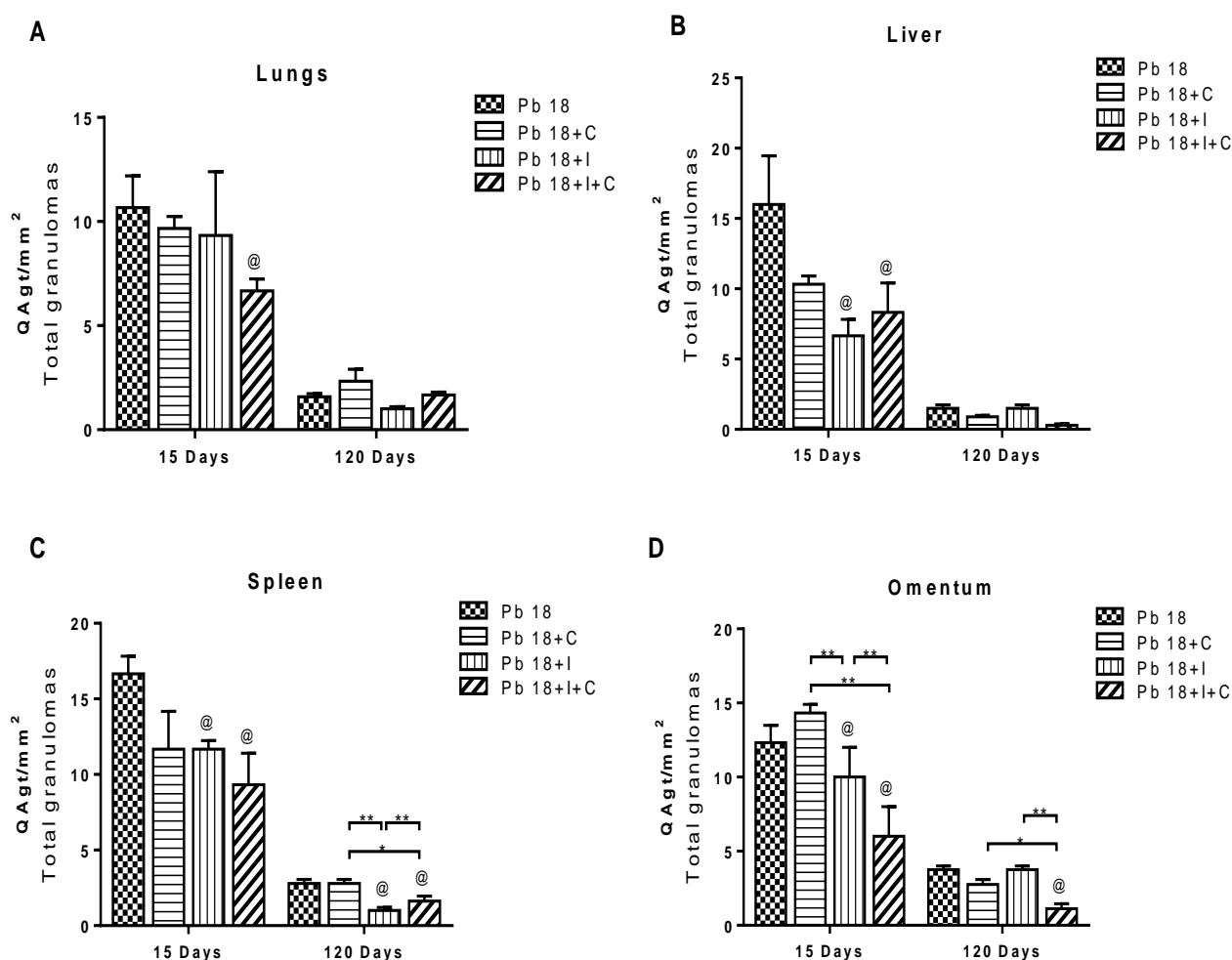
Em relação ao baço os resultados da fase inicial da infecção mostram que nos animais infectados e não tratados apresentaram um número significativamente maior de granulomas em relação aos demais. Entre os tratamentos não houve diferença estatística. Já na fase tardia de infecção os grupos infectados e não tratados e tratado somente com Celecoxibe apresentaram um número significativamente maior de granulomas em relação aos demais. Curiosamente os animais que receberam o tratamento somente com Itraconazol apresentaram um número de granulomas significativamente menor em relação aos demais grupos que receberam os diferentes tratamentos (Figura 58C).

No omento/pâncreas na fase inicial que os animais infectados e não tratados e tratado somente com Celecoxibe apresentaram número de granulomas maior em relação aos demais grupos. Interessantemente os animais que receberam o tratamento combinado apresentaram um número significativamente menor de granulomas em relação aos demais grupos. Por fim, ao analisar os resultados de fase tardia os animais com tratamento combinado tiveram um menor número de granulomas (Figura 58D).

Ao confrontar estes resultados é possível perceber que o tratamento combinado apresentou resultados satisfatórios já na infecção inicial. A combinação de fármacos foi capaz de reduzir a quantidade de granulomas no omento/pâncreas e na fase tardia o mesmo se repete.

Vale ressaltar que na fase tardia de infecção mesmo nos animais infectados e não tratados apresentarem um número reduzido de granulomas em relação a fase inicial de infecção, tal fato justifica-se que pelo organismo do hospedeiro promover uma resposta imune eficiente que conseqüentemente diminui as áreas de lesão. O tratamento combinado se mostrou eficiente em reduzir números de granulomas o que pode inferir que houve uma redução de fungos no tecido dos diferentes órgãos.

Figura 57 - Quantidade de granulomas dos órgãos dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento e 120 dias de infecção e tratamento.



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (6 mg/Kg). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I) (3 mg/Kg). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (6 mg/Kg) (3 mg/Kg), respectivamente. Os resultados para cada grupo estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média. Diferença estatística entre os grupos (@)  $p < 0,05$  entre Pb 18 vs os diferentes tratamentos e (\*\*\*)  $p < 0,001$  entre os diferentes tratamentos, teste *Two Way ANOVA*, pós teste de *Tukey*. Os testes foram realizados em triplicata.

### 5.15 Número de células fúngicas viáveis

A figura 59 mostra os resultados do número de fungos viáveis encontrados nos órgãos tanto na infecção inicial quanto tardia.

Analisando os resultados apresentados na fase inicial da infecção é possível perceber que nos animais infectados e não tratados há uma presença significativamente maior de células fúngicas viáveis em relação aos demais grupos nos pulmões. Em relação aos animais que receberam os diferentes tratamentos é possível perceber os animais que receberam o tratamento somente com Celecoxibe e Itraconazol apresentou menores números de células fúngicas viáveis em relação ao grupo com o tratamento combinado (Figura 59A). Na fase tardia da infecção os animais infectados e não tratados também apresentaram um número maior de células fúngicas viáveis em relação aos demais nos pulmões. Os animais que receberam os diferentes tratamentos e os animais que receberam o tratamento somente o Celecoxibe apresentaram menores números de células fúngicas viáveis em relação aos demais (Figura 59B).

No fígado também é possível perceber que tanto na fase inicial quanto tardia de infecção os animais infectados e não tratados mostraram uma presença significativamente maior de células fúngicas viáveis em relação aos demais. Entre os tratamentos tanto na fase inicial quanto tardia de infecção não houve diferença estatística (Figura 59C E 59D).

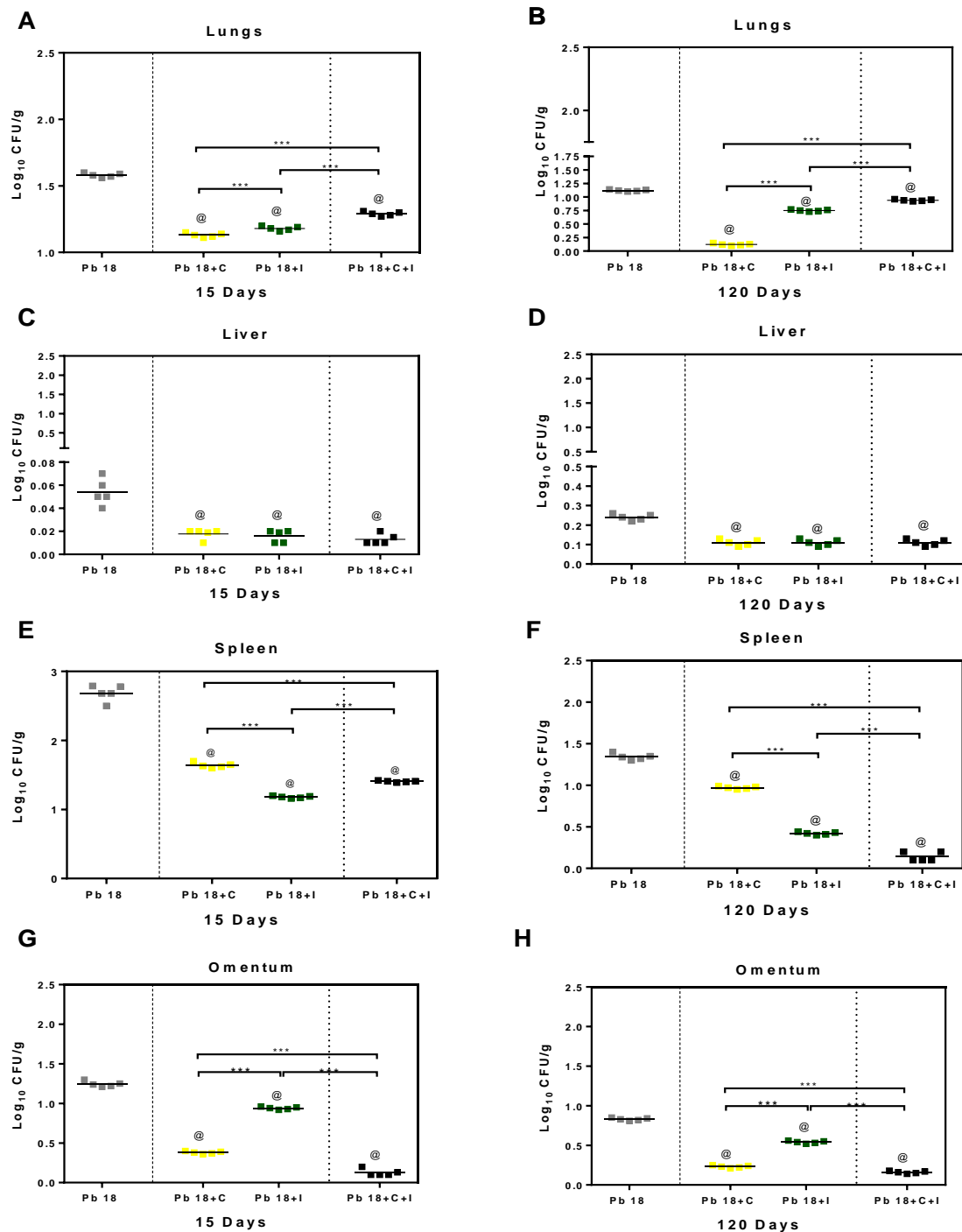
Em relação aos resultados apresentados notou uma redução significativa do número de fungos viáveis no baço nos animais que receberam os diferentes tratamentos em relação ao grupo de animais infectados e não tratados na fase aguda. Ainda é possível perceber que há uma redução do número de fungos viáveis principalmente nos animais tratados somente com Itraconazol em relação aos demais tratamentos (Figura 59E). Na fase tardia os animais infectados e não tratados há uma presença significativamente maior de células fúngicas viáveis em relação aos demais. Interessantemente os animais que receberam o tratamento combinado apresentaram o menor número de células fúngicas viáveis em relação aos demais (Figura 59F). O omento/pâncreas os animais que receberam o tratamento combinado apresentaram o menor número de células fúngicas viáveis em relação aos demais (Figura 59H).

A partir destes resultados é possível inferir que o tratamento combinado foi capaz de reduzir a carga fúngica e em especial na fase tardia de infecção. O órgão de choque apresentou o menor número de fungos viáveis em relação aos demais. Vale ressaltar que mesmo com o tratamento combinado este não foi capaz de reduzir completamente a quantidade



de fungos no organismo do hospedeiro. Ao levar em consideração os demais resultados infere-se que houve uma melhora na intensidade de lesões encontradas nos animais tratados, o perfil de anticorpos e citocinas cursou para uma resposta do tipo Th1 que poderia estar atuando de forma sinérgica com o tratamento, no intuito, de reduzir a quantidade de fungos no tecido.

Figura 58 - Número de células fúngicas viáveis de macerado de órgãos dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento e 120 dias de infecção e tratamento.



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (6 mg/Kg). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I) (3 mg/Kg). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (6 mg/Kg) (3 mg/Kg), respectivamente. Os resultados para cada grupo estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média. Diferença estatística entre os grupos (@)  $p < 0,05$  entre Pb 18 vs os diferentes tratamentos e (\*\*\*)  $p < 0,001$  entre os diferentes tratamentos, teste *Two Way ANOVA*, pós teste de *Tukey*. Os testes foram realizados em triplicata.

## 6 DISCUSSÃO

A resposta imune na PCM é fundamental para a defesa do hospedeiro. No entanto, o excesso desta resposta imunológica pode resultar em danos teciduais. A literatura descreve como uma das características da PCM uma resposta inflamatória intensa (KUROKAWA *et al.*, 2007). Quando o fungo interage com as células imunológicas induz uma produção de citocinas que atuam estimulando os mecanismos de defesa e tentando eliminar o fungo revisado por Burger, 2021. Por outro lado, estes mecanismos podem promover o crescimento do fungo e levar ao agravamento da doença. Sendo assim, é necessário que ocorra um equilíbrio entre mecanismos pró e anti-inflamatórios da resposta imune contra *P. brasiliensis* (SIQUEIRA *et al.*, 2009). É importante levar em consideração o controle dessa resposta inflamatória excessiva juntamente com o estabelecimento de um protocolo terapêutico com o menor tempo de tratamento e efeitos colaterais.

O reposicionamento de fármacos pode ser uma alternativa terapêutica eficiente. Uma vez que, os estudos iniciais de química, biodisponibilidade, farmacocinética já foram estudados (CHONG e SULLIVAN, 2007). Os tratamentos que tem hoje na PCM são longos e podem ter efeitos colaterais ao paciente (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017). Os protocolos já estabelecidos não fazem combinações com outros fármacos como por exemplo da classe de anti-inflamatórios. O uso de anti-inflamatórios no tratamento de doenças infecciosas já vem sendo utilizado. Como por exemplo; Celecoxibe apresentou bons resultados no tratamento de tuberculose como mostra o estudo de An *et al.*, (2020).

Para isso, inicialmente foi investigado *in vitro* se a combinação dos fármacos Celecoxibe e Itraconazol apresentam efeitos sobre o fungo, toxicidade celular e melhora a atividade das células esplênicas co-cultivadas com Pb 18. Os resultados mostraram que a combinação dos dois fármacos foi capaz de reduzir o número de fungos viáveis, porém não eliminando completamente. Já nos testes de cultura celular esplênica os dois fármacos combinados não apresentaram toxicidade na dose testada e foram capazes de melhorar os mecanismos celulares na eliminação do Pb 18.

Vale resaltar que a dose testada de Itraconazol já é utilizada no tratamento da PCM e só foi ajustada a sua concentração para o peso do animal. O mesmo foi feito para o Celecoxibe que tem como dose padronizada no tratamento de artrite reumatoide (BNF, 2002) e também só foi ajustada a concentração ao peso do animal.

Compreendendo os efeitos do Celecoxibe utilizado em doenças infecciosas por outros autores. Pereira *et al.*, (2013) mostrou que o uso do Celecoxibe no tratamento da

histoplasmosose também foi capaz de melhorar a capacidade fagocítica das células pulmonares de camundongos infectados com *Histoplasma capsulatum*. Nossos resultados, *in vitro*, podem elucidar os efeitos do quanto à ativação da resposta imune antifúngica e ação do Celecoxibe combinado com Itraconazol no local da infecção podem ser benéficos para o hospedeiro.

O segundo passo deste trabalho foi avaliar se a combinação terapêutica se mostrou eficiente no modelo de infecção intraperitoneal tanto na fase aguda quanto crônica. A partir dos resultados sugere que o tratamento tanto na fase aguda quanto crônica não influenciaram no peso corporal dos animais e também na sobrevivência. Já nos animais infectados houve uma morte com tempo de infecção maior (120 dias). Estudos de Da Costa *et al.*, (2016) objetivaram compreender as alterações severas no modelo experimental de infecção crônica da PCM. Os resultados deste estudo revelaram que as alterações tímicas na infecção prolongada com Pb 18 promovem alterações do estado imunológico. Estes autores observaram que células inflamatórias infiltrantes formam granulomas em resposta à invasão maciça de leveduras. Ainda, observaram que as células CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> dos timócitos foram reduzidas nos camundongos infectados e as células remanescentes apresentaram maior taxa de apoptose em comparação aos não infectados. Estes autores discutem que uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias causam um ambiente estressante para as células tímicas, e isto pode explicar o menor número de timócitos e células epiteliais tímicas encontrados no grupo infectado. Confrontando estes dados descritos na literatura na infecção crônica, há uma imunossupressão nestes animais o que poderia ter levado a morte dos animais infectados em nosso estudo.

Burger, (2021) e Cesar - Dos - Santos *et al.*, (2020) revisou os aspectos de susceptibilidade encontrados na PCM. Estes autores descrevem que os fatores de virulência fúngica e moléculas de adesão são determinantes para entrada, latência, escape imunológico, invasão e disseminação no hospedeiro. Ainda, enfatizam que neutrófilos e macrófagos desempenham um papel fundamental na defesa de primeira linha contra o fungo. O desfecho clínico da PCM está fortemente associado à variabilidade de citocinas e imunoglobulinas produzidas pelas células T e B (Burger, 2021). Já os mecanismos que medeiam a suscetibilidade ou resistência à infecção são ditados pelo sistema imunológico.

No teste de HTT observa a higidez dos animais. Na infecção aguda nos animais infectados e não tratados apresentaram maior reatividade a paracoccidiodina e nos animais que receberam o tratamento foram capazes de reduzir esta reatividade. Já na infecção crônica mostra os animais que receberam os diferentes tratamentos apresentaram uma menor reatividade a paracoccidiodina. Desta maneira, sugerindo que o tratamento na fase inicial e



tardia da infecção está sendo eficaz e que a combinação de fármacos pode estar reduzindo esta reatividade.

Estudos epidemiológicos utilizam a paracoccidioidina (polissacarídeo extraído de diferentes cepas de *P. brasiliensis*) (MARQUES, 2012). Magalhães *et al.*, (2014) discute em seu estudo epidemiológico que o teste intradérmico com a paracoccidioidina pode ser uma forma de identificar se pacientes estavam ou não sensibilizados pelo antígeno. Por fim, Magalhães *et al.*, (2014) enfatiza que isso facilitaria o acompanhamento clínico do paciente. Já autores como Cacere *et al.*, (2008) relata que na PCM humana quando os linfócitos T estão hiporresponsivos há uma anergia em reações de HTT e que isto pode estar correlacionando com uma disseminação do fungo. Portanto, em nosso trabalho foi possível realizar o acompanhamento da reatividade pela paracoccidioidina principalmente dos animais que receberam ambos tratamentos. Os dados encontrados mostraram que houve uma redução da reatividade, sugerindo que os animais com tratamento combinado poderiam estar respondendo de forma positiva ao esquema terapêutico.

Em relação a presença de anticorpos foi possível verificar a partir de qual momento da infecção são produzidos e se o tratamento é capaz de modular a produção. Na fase aguda e crônica da infecção para todos os grupos houve um pico de produção de IgM no sétimo dia e um declínio do décimo quinto dia de infecção. No entanto, após este período na infecção crônica a concentração deste anticorpo se manteve estável até o final do experimento. Para os demais anticorpos (IgG, IgG1a, IgG2a e IgG2b) os animais com tratamento combinado tiveram uma menor concentração destas imunoglobulinas no soro.

É sabido que na PCM uma resposta de imunidade celular preservada é determinante na proteção (PAGLIARI *et al.*, 2010). No entanto, o papel da imunidade humoral é mais controverso, pois inicialmente se achava que representava apenas uma possibilidade de diagnóstico, pois altos títulos de anticorpos específicos eram indicação de mau prognóstico (CASTRO *et al.*, 2013).

O presente estudo mostra que os animais dos diferentes grupos apresentam ao 7º dia de infecção como uma resposta primária; a produção de anticorpo do sorotipo IgM e IgG. Entretanto nos animais que iniciam o tratamento tanto com Celecoxibe e/ou Itraconazol há uma redução na produção destas imunoglobulinas. Tal redução pode estar associada a uma melhor resposta imune. O que, conseqüentemente pode haver menores áreas de lesão tecidual, que poderiam estar sendo desenvolvidas ao decorrer do tratamento se caso não estivesse sendo eficiente.

Estudos feitos por Gegembauer *et al.*, (2014) verificaram que a sorologia de pacientes

diagnosticados com PCM e infectados por *P. lutzi* e que estavam em tratamento; a princípio os pacientes apresentaram altos títulos de IgM e IgG1 e ao decorrer do tratamento percebeu que os títulos de IgG1 aumentavam. Por fim, com 5 meses de tratamento e com melhora clínica os títulos destes anticorpos diminuíram. Estes autores sugerem que o anticorpo IgG1 tem um papel importante na PCM. Uma vez que, pode estar envolvido na depuração fúngica. Ainda, segundo os autores *P. brasiliensis* pode ser revestido pelo IgG1 que ao ligar-se aos receptores Fcγ presentes na membrana de fagócitos são capazes de removê-lo. Em nosso estudo encontrou resultados semelhantes ao apresentados por Gegembauer *et al.*, (2014), sugerindo boas perspectivas em relação ao tratamento combinado.

Nossos resultados mostraram que na fase inicial da doença há altos títulos de anticorpos IgM e IgG principalmente no 7º e 15º dia de infecção respectivamente nos animais infectados e não tratados, confirmando os dados descritos na literatura por MORETO *et al.*, (2011). Ao observar nos animais que receberam os diferentes tratamentos pode perceber que houve redução na produção em todas as imunoglobulinas. Desta maneira, podendo inferir que a resposta imune humoral não está sendo mal prognóstico principalmente nos animais que foram tratados com a combinação de fármacos.

O perfil celular sanguíneo foi observado e os resultados foram promissores. O grupo com tratamento combinado apresentou um perfil celular semelhante aos animais hígidos, isto foi observado tanto na fase aguda quanto crônica da infecção. No início da infecção deste modelo experimental há um número maior de neutrófilos. À medida que o tempo passava de infecção principalmente nos animais infectados e não tratados o perfil celular tendeu a mudar. Discutindo estes dados de acordo com a literatura. Os neutrófilos podem desempenhar um papel na modulação da resposta imune contra *P. brasiliensis*. Isso se baseia no fato de que os neutrófilos secretam citocinas e outras moléculas, permitindo essa função de modulação (KURITA *et al.*, 2010). O que nos faz pensar que no presente estudo houve uma modulação da resposta imune nos animais com tratamento combinado. A mudança de perfil celular observado nos animais infectados pode inferir que esta linhagem utilizada se comporta como animais resistentes para a infecção por Pb 18.

Autores como Bruneri, (1995) descreve que em animais suscetíveis e resistentes não apresentam diferenças na contagem de células sanguíneas, principalmente no número de eosinófilos. A presença de eosinofilia pode sugerir um perfil de resposta imune do tipo Th2, o que não foi observado nos resultados aqui apresentados por nosso grupo de pesquisa.

Em relação ao óxido nítrico (NO), uma molécula antimicrobiana importante, gerada pela oxidação de um dos nitrogênios no aminoácido L-arginina. A produção de NO é

responsável pela sintase induzida do óxido nítrico (iNOS) (NASCIMENTO *et al.*, 2002). Em modelos experimentais foi possível verificar que NO é responsável pelo efeito citotóxico sobre alguns microrganismos (*Schistosoma mansoni*, amastigotas de *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi*, e *Plasmodium falciparum* e *P. chaubaudii* e fungos, como *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*). Na PCM o NO *in vivo* desempenha um papel protetor, pois, pode ocorrer a inibição de *P. brasiliensis* por esta molécula (GONZALEZ *et al.*, 2000).

Nossos resultados revelaram que nos animais que receberam os diferentes tratamentos tiveram uma redução dos níveis de NO nos pulmões, fígado e baço. No omento/pâncreas houve um aumento significativo na fase aguda uma vez que, este órgão é descrito como órgão de choque neste modelo de infecção. Os resultados de CFU demonstraram que houve uma redução do número de fungos viáveis e desta maneira pode explicar que nos animais que receberam os tratamentos está molécula encontrou em menores proporções quando comparado com os animais infectados e não tratados. A diminuição de NO nestes animais também pode sugerir uma resistência a infecção uma vez que o tratamento tem auxiliado no combate deste fungo.

Estudos realizados por Pizzan *et al.*, (2010), descrevem que uma maior resposta dos macrófagos de animais fêmeas pode estar atribuída a expressão de glicanos, e que a glicolisação celular pode ser regulada por hormônios. Os resultados feitos Pizzan *et al.*, (2010) mostraram que os macrófagos, por expressarem receptores estrogênicos pode ocorrer uma interação estrogênio/receptor contribuindo para alterar a expressão de glicanos destas células, tornando-as mais ativas. Consequentemente pode ocorrer altas quantidades de óxido nítrico sendo produzidas e tornando estes animais mais resistentes a está infecção. Nossos resultados mostraram que no baço houve um aumento significativo de NO, tal fato poderia ser explicado por esta regulação do hormônio estradiol, conforme o estudo de Pizzan *et al.*, (2010).

Entender quais citocinas estão sendo secretadas pode ajudar a determinar qual é o perfil de resposta imune dominante. Para isto algumas citocinas foram dosadas as suas concentrações nos macerados de órgãos. Sendo assim, nos fez compreender quais citocinas são mais participantes nos órgãos que poderiam estar comprometidos. A IL-12 na infecção inicial para todos os órgãos em todos os animais e em especial nos animais com tratamento combinado na fase tardia da infecção tiveram uma baixa concentração e o mesmo foi observado para IFN- $\gamma$ . Desta forma, sugerindo que estas citocinas tem um papel modulador na fase mais tardia da infecção nos animais com tratamento combinado. Nos animais que receberam o tratamento combinado, pode inferir que a associação medicamentosa possibilitou

uma melhora no quadro infeccioso que conseqüentemente está associado com está baixa concentração de IL-12 e IFN- $\gamma$ .

Relacionando nossos dados com a literatura Loures *et al.*, (2011) descreve a participação de IL-12 na resposta imune contra *P. brasiliensis*. Este autor discute que uma carga fúngica aumentada está associada com o aumento da secreção desta citocina pró-inflamatória. Já em uma infecção grave observou que houve uma redução desta citocina. Ainda segundo estes autores essa citocina pró-inflamatória medeia a ativação de fagócitos da imunidade inata e está envolvida na indução respostas imunes Th1 e Th17. Confrontando estes dados com o que foi encontrado em nosso estudo, nos animais que receberam o tratamento combinado tiveram uma menor intensidade de resposta inflamatória, isto foi confirmado pelo estudo histológico de todos os órgãos. Sendo assim, estaria associado a uma menor secreção desta citocina e não com o agravamento da infecção como mostra o estudo de Loures *et al.*, (2011).

Os resultados da dosagem de IL-17 mostraram que na fase inicial da infecção houve um aumento da secreção desta citocina e na fase tardia houve uma redução nos animais que receberam o tratamento combinado. Ao confrontar os resultados obtidos neste experimento sugere-se que IL-17 está exercendo um papel imunoregulatório principalmente na fase inicial da infecção. Este papel pode ser observado principalmente nos pulmões e omento/pâncreas dos grupos de animais que receberam os diferentes tratamentos. Curiosamente nota-se que IL-17 no omento/pâncreas na fase inicial da infecção nos animais infectados e não tratados apresentam menores concentrações do que na fase tardia. Interessantemente nos animais que receberam os distintos tratamentos na fase inicial apresentou maiores concentrações e na fase tardia houve o inverso. Tais resultados podem sugerir que os diferentes tratamentos na fase inicial podem estar influenciando em uma maior concentração de IL-17 principalmente no órgão de choque (omento/pâncreas). Já na fase tardia, ocorre o inverso. Sendo assim, sugerindo que houve um controle da disseminação do fungo e maior controle do processo inflamatório. Esta suposição pode ser confirmada pelos resultados apresentados pelos animais infectados e não tratados, no qual, na infecção inicial há pouca concentração desta citocina e na fase tardia notou alta concentração. Sabe-se que células que secretam IL-17 induz um processo inflamatório intenso mediado por neutrófilos. Portanto, pode relacionar que aumentando IL-17 conseqüentemente aumenta a ação de neutrófilos na tentativa de diminuir carga fúngica (TIND *et al.*, 2015), conforme observamos em nossos resultados.

Verificando dados da literatura sobre a participação da IL-17 na PCM. Estudos clínicos mostraram que na PCM humana na forma crônica os pacientes desenvolvem uma resposta



imune predominantemente Th17/Th22 e com alta produção de IL-17 e IL-22 e anticorpos IgG1 (DE CASTRO *et al.*, 2013). Em nossos resultados percebeu-se na fase crônica no grupo com tratamento combinado foi uma redução da secreção de IL-17. Isto poderia estar associado a uma redução de resposta inflamatória em decorrência de uma menor presença de células fúngicas. Calich *et al.*, (2019) discute que as células Th17 geram uma resposta imune mais eficiente e ajustada, sendo capaz de inibir o crescimento do fungo e processo inflamatório intenso. Shikanai-Yasuda *et al.*, (2017) destaca a importância de uma resposta inflamatória controlada. Tal efeito de melhora clínica pode ser observado quando é adotada uma terapêutica antifúngica e associada com anti-inflamatórios.

Ao observar os resultados da dosagem de GM-CSF na fase inicial há uma baixa concentração desta citocina em todos os órgãos dos animais infectados e não tratados. No tratamento combinado notou-se que houve um aumento da secreção de GM-CSF. Já na fase tardia o grupo com tratamento combinado apresentou menores concentrações de GM-CSF.

Dados da literatura descrevem que GM-CSF é conhecido por ativar monócitos e promover a atividade microbicida (O'Mahony *et al.*, 2008); desta forma, GM-CSF pode ser importante para aumentar a atividade fungicida de células da resposta imune. Conforme observado em nossos experimentos houve uma maior concentração desta citocina na fase inicial da infecção e isto pode estar atribuído a função desta citocina estar apresentando uma atividade microbicida sob *P. brasiliensis*. O estudo de Nascimento *et al.*, (2011) mostrou que GM-CSF reverte os efeitos inibitórios de IL-10 e TGF- $\beta$ 1 na formação de células gigantes multinucleadas (MGC). Além disso, descreve que GM-CSF desempenha um papel importante na formação de MGC estimulada por antígenos de Pb 18 e aumenta a atividade fungicida dessas células. Os efeitos positivos de GM-CSF sobre a atividade fungicida, sugerem um efeito modulador na formação de MGC e na atividade fungicida contra o Pb 18. Os dados de Nascimento *et al.*, (2011) pode nos ajudar a compreender as características histológicas encontradas principalmente nos animais tratados com a combinação terapêutica. As MGC são células presentes em inflamação granulomatosa e sabe que uma das características da PCM é a presença de granulomas (NISHIKAKU *et al.*, 2009). Os resultados histopatológicos mostraram que principalmente na fase crônica dos animais com tratamento combinado tiveram menores quantidades destas lesões e ainda menor presença de fibras de colágeno. Desta forma, pode-se atribuir que estes resultados podem ser em consequência da participação de GM-CSF lá no local da lesão.

A produção de prostaglandina durante o processo infeccioso pode ser um fator para suprimir a resposta imune protetora (BORDON *et al.*, 2007). A PGE<sub>2</sub> desempenha um papel

importante na modulação da resposta imune (KALINSKI, 2012), uma vez que inibe as funções dos granulócitos (SMITH, 1977). Outro aspecto importante que vale mencionar que PGE<sub>2</sub> também é um supressor durante a resposta imune adaptativa (WALKER *et al.*, 1983). Resultados interessantes encontrados no estudo de Fernandes *et al.*, (2015) mostrou que células dendríticas humanas derivadas da diferenciação de monócitos cultivados com GM-CSF e IL-4 liberam concentrações substanciais de PGE<sub>2</sub>. Diferentemente quando DCs infectadas com *P. brasiliensis* inibem a sua liberação (PGE<sub>2</sub>). Correlacionando a literatura com nossos dados se percebeu que o Celecoxibe teve um papel importante na redução destes eventos inflamatórios. Os efeitos foram mais intensos quando combinado com o Itraconazol. O controle da secreção de PGE<sub>2</sub> pode inibir uma maior participação da resposta Th2 que na PCM não é benéfica. Desta forma, o controle da secreção de GM-CSF e IL-4 pode ajudar nestes eventos inflamatórios que ocorrem na PCM.

Nos resultados obtidos na dosagem de IL-4, notou que tanto na fase inicial e tardia da infecção houve um aumento significativo nos pulmões dos animais que receberam o tratamento combinado. Tal resultado pode sugerir que o processo infeccioso nesta situação está imunomodulando positivamente a secreção desta citocina neste órgão. Já nos demais órgãos tanto na fase inicial quanto na fase tardia houve uma redução significativa. O que sugere, que o tratamento combinado está atuando na resposta imune e conseqüentemente na secreção de IL-4.

Estes resultados são promissores uma vez que; órgãos como o fígado, baço e omento/pâncreas são muito acometidos neste modelo de infecção, conforme pode ser observado no histopatológico (FIGURAS 22, 23, 24, 30, 31 e 32). A redução de IL-4 pode estar associada com uma menor secreção de PGE<sub>2</sub>, conforme Fernandes *et al.*, (2015). Soares *et al.*, (2001) mostrou que inibindo PGE<sub>2</sub> utilizando indometacina resultou em produção de peróxido de hidrogênio e atividade fungicida melhorada. Corroborando os resultados de Soares *et al.*, (2001) com os encontrados em nosso estudo com a utilização do Celecoxibe também poderia estar atuando principalmente em uma melhor atividade fungicida. Gardizani *et al.*, (2019) descreve que *P. brasiliensis* pode aproveitar a produção de PGE<sub>2</sub> para sua sobrevivência, bem como, para a modulação da resposta imune.

Altas concentrações de IL-4 fornecem sinais de perfil de resposta do tipo Th2. Isto pode estar ligado a diminuição da proteção de respostas de células Th1 e favorecendo infecções fúngicas e recidiva da doença (BOZZI *et al.*, 2007). Em nosso estudo mostrou que o tratamento combinado na fase crônica não houve o agravamento da doença. O número de fungos viáveis e presença de lesões teciduais foram menores no grupo com o tratamento

combinado.

Já na dosagem de KC (IL-8) os resultados obtidos mostraram que na fase inicial da infecção há uma maior concentração desta citocina em todos os órgãos e para todos os animais. Tal fato, pode justificar que, no início da infecção o fungo tende a utilizar mecanismos de escape para driblar a resposta imune do hospedeiro e tentar estabelecer o processo infeccioso. Já na fase tardia principalmente no omento/pâncreas houve uma redução da secreção desta citocina nos animais que receberam o tratamento o combinado. Fortes *et al.*, (2011) dizem que IL-8 pode ser capaz de promover uma resposta inflamatória intensa e promover a sobrevivência do fungo. O que percebeu em nosso estudo que a redução de KC (IL-8) é um resultado promissor e que o tratamento combinado promoveu uma melhora clínica nesta resposta inflamatória.

Considerando a ocorrência da interação da resposta imune com o *P. brasiliensis*, o presente trabalho investigou a influência do tratamento nas lesões granulomatosas e principalmente se há ocorrência de modulação tecidual. Os resultados mostraram que neste modelo experimental estes animais desenvolveram as manifestações patológicas granulomatosas em todos os órgãos; principalmente no omento/pâncreas, pois este é considerado órgão de choque neste modelo de infecção. Os animais que receberam os diferentes tratamentos modificaram as características patológicas, sugerindo que houve uma modulação da resposta imune nestes animais tratados. A combinação das drogas surpreendentemente mostrou uma influência positiva nestas lesões.

A partir da histopatologia foi possível inferir que as alterações celulares vão reduzindo à medida que realiza a combinação de medicamentos. Os aspectos histológicos melhoram em todos os órgãos e principalmente no órgão de choque. As características macroscópicas ajudaram na avaliação microscópica dos tecidos. As características histopatológicas mostraram granulomas densos já na fase inicial da doença. Tal reação granulomatosa presente na PCM pode ser caracterizada como uma resposta mais específica e eficaz, no intuito de bloquear e restringir a disseminação do fungo.

Os resultados das análises estereológicas foram realizados após a avaliação da histologia geral. O número de células inflamatórias e “score” de inflamação se encontra apresentado na figura 40 e 41. A resposta inflamatória intensa tem sido associada com maiores danos teciduais na PCM, o que pode até comprometer a função do órgão (CAMARGO *et al.*, 2000). O que foi observado em nosso estudo nos animais infectados e não tratados é que estes tiveram este padrão histológico tanto na fase crônica quanto aguda da infecção. No entanto, nos animais que receberam os diferentes tratamentos verificou que o

processo inflamatório reduziu principalmente nos animais tratados com Celecoxibe. Este fármaco foi capaz de diminuir as lesões ocasionadas pelo fungo, sugerindo que foi capaz de atuar sobre a migração de células inflamatórias teciduais.

Ao considerar que controlando o dano tecidual principalmente na fase crônica da doença, pode estar diretamente relacionado com a instalação de uma resposta imune regulatória. Nossos resultados de dosagem de IL-17 mostra uma alta concentração desta citocina. Desta forma, pode inferir uma forte participação desta citocina na formação de granulomas assim como também redução de carga fúngica tecidual. Tristão *et al.*, (2017) mostrou em seu estudo que citocinas indutoras de uma resposta Th17 promovem a formação de granulomas compactos inibindo assim a disseminação de *P. brasiliensis*. Portanto, a combinação terapêutica pode estar contribuindo para uma modulação da resposta imune e assim melhorando os aspectos histológicos.

Quando se avalia a celularidade nos grupos experimentais é possível perceber que no sangue periférico dos animais infectados há uma população maior de neutrófilos. Dados da literatura sugerem um papel importante desta célula na PCM. Uma vez que estas são atraídas por gradientes inflamatórios sendo que, ativadas atuam na cascata de liberação de peróxido de hidrogênio, óxido nítrico, citocinas e até mesmo participação de armadilhas extra-celulares para tentar conter o antígeno (CRUVINEL *et al.*, 2010). O que foi observado no tecido que este mesmo padrão celular foi encontrado, mas, nos animais que receberam o tratamento houveram uma modificação no perfil celular tecidual, podendo sugerir que os fármacos estão atuando na modulação da resposta imune. No presente estudo os animais que receberam somente o tratamento com Celecoxibe não tiveram modulação, mas, nos animais tratados somente com Itraconazol e combinação de Celecoxibe + Itraconazol foi evidente está mudança de perfil celular. Uma justificativa para esta proposição pode ser que o Itraconazol e Celecoxibe esteja atuando sobre o fungo matando-o; conforme pode ser confirmado pelos resultados de CFUs. O Celecoxibe também pode estar atuando sobre a ativação destas células, tornando-as mais eficazes na eliminação do fungo.

A presença de granulomas foi analisada a fim de verificar a influência do tratamento sobre o número e evolução destes. Nos animais infectados e não tratados notou um maior número de granulomas já na fase inicial da infecção em todos os órgãos analisados, com prevalência de granulomas exudativos produtivos, sendo justificado por uma maior quantidade de fungos conforme pode ser observado nos dados de CFUs. A presença deste tipo de granuloma nesta fase inicial da doença pode ser justificada pelo fato de que ainda está sendo montada uma resposta imune efetiva no intuito de controlar a disseminação do fungo

pelo organismo do hospedeiro. Em contrapartida, nos animais que receberam a combinação de fármacos verificou uma redução do número de granulomas, mas ainda são encontrados do tipo exudativos produtivos. Fato contrário pode ser observado no fígado que há uma mudança no tipo de granulomas, pois estes já estão mais organizados. O tratamento neste caso, pode estar atuando no sentido de reduzir o número de fungos, diminuindo o número de células e consequentemente a formação do granuloma.

Utilizando este mesmo modelo experimental foi observado na infecção experimental por *P. brasiliensis* que os camundongos susceptíveis apresentaram um granuloma disseminado e os animais resistentes granuloma fechado com lesões encapsuladas. Estudos de metaloproteínas (MMP) 2 e 9 em PCM experimental também foram realizados demonstrando que MMP-2 possui fraca atividade, ao contrário da MMP-9 que possui alta atividade sugerindo sua influência sobre o granuloma e a disseminação fúngica (NISHIKAKU *et al.*, 2009).

A formação de granulomas na PCM tem sido atribuída pela atuação de células produtoras de IL17 uma citocina inflamatória (TORRADO *et al.*, 2010). Dados na literatura descreveram o papel desta citocina na tuberculose primária, na qual as células produtoras de IL17 aumenta a expressão de quimiocinas que promove o recrutamento de células e possibilitando a organização do granuloma. Desta maneira, pode inferir que está citocina esteja atuando e contribuindo para a formação destes granulomas mais organizados, fato este pode ser explicado pela presença de granulomas organizados-fibróticos no fígado dos animais que receberam os diferentes tratamentos (TRISTÃO *et al.*, 2017).

Ainda sobre o estudo histopatológico de todos os órgãos. Ao analisar os rins destes animais tanto na fase aguda quando crônica a infecção, o aspecto tecidual se manteve dentro da normalidade principalmente para os animais que receberam o tratamento combinado. Além disso o número de hepatócitos uni e binucleados (resultados em material suplementar) também se mostraram dentro da normalidade em comparação com os animais saudáveis. Outro resultado relevante é que a concentração de fibras de colágeno reduziu na fase crônica da doença. Sendo assim, podendo inferir que de fato o tratamento combinado promoveu uma resposta tecidual benéfica nestes animais.

Estudos mostraram que pacientes com PCM apresentam fibrose pulmonar e a deposição de fibras de colágeno é encontrada ao redor dos granulomas que são formados (TOBÓN *et al.*, 2003). Os nossos resultados encontrados nos animais infectados e não tratados corroboram com os de Tobón *et al.*, (2003). Os efeitos encontrados na redução de fibras de colágeno pelo Celecoxibe são inéditos e importantíssimos para o tratamento da PCM.



A complexidade do processo fibrótico e o desenvolvimento de terapias tem sido desafiador no tratamento da PCM. Estudos mostraram que a utilização de Pentoxifilina, Azitromicina e Talidomida, combinados com Itraconazol e Clotrimazol foram capazes de reduzir a intensidade de processo fibrótico na PCM em modelo experimental murino (FINATO *et al.*, 2020). Estes resultados corroboram com os encontrados em nosso estudo. A utilização de imunoterapia com anticorpos monoclonais também foram capazes de reduzir a intensidade de processo fibrótico como mostra o estudo de Puerta-Arias *et al.*, (2016). Sendo assim, a utilização de anti-inflamatórios como tratamento adjuvante em doenças fúngicas é promissor e principalmente na PCM.

Neste estudo também foi analisado a presença *in situ* de anticorpos (IgM e IgG) e citocinas (IL-17 e GM-CSF) na resposta granulomatosa no omento dos animais infectados e tratados. O teste de imuno-histoquímica permitiu analisar a presença de IgM, IgG, IL-17 e GM-CSF nas células polimorfonucleares. Os resultados mostraram que as células imunocoradas se localizavam ao redor do granuloma tanto na periferia quanto dentro da própria lesão. Autores como Nishikaku, (2011) e Burger (2013), analisaram a presença de citocinas *in situ* em animais infectados com Pb 18 e conseguiram correlacionar a resposta imune do hospedeiro com a presença de granulomas organizados e diminuição de áreas de lesão. O nosso estudo é inédito em mostrar a presença de IgM, IgG, IL-17 e GMC-SF *in situ* nos locais de lesões em animais infectados e não tratados como em animais tratados com antifúngico e anti-inflamatório. Os resultados se mostraram promissores em relação a presença destes componentes da imunidade celular e humoral nos locais da lesão.

Aos 15 dias de infecção e tratamento para o anticorpo IgM os resultados mostraram um número significativo de células imunomarcadas, principalmente nos animais que receberam o tratamento combinado. Já aos 120 dias há um número reduzido de células imunomarcadas nos locais da lesão principalmente nos animais que receberam o tratamento combinado. Corroborando estes dados com a concentração de anticorpos o que mostra que há um pico de produção deste anticorpo no início da infecção e que lá no granuloma este anticorpo também é muito participativo na tentativa de controlar a infecção. Estes resultados podem sugerir que o tratamento apresentou resultados positivos no controle da disseminação do fungo.

Em relação a presença *in situ* de IgG aos 15 dias de infecção e tratamento há uma presença significativa de células imunomarcadas e em especial nos animais que receberam o tratamento combinado. Ao decorrer do curso da infecção e tratamento neste mesmo grupo de animais há uma presença expressiva de células imunocoradas. Ao confrontar os resultados com a dosagem deste anticorpo no sangue destes animais o que se nota também um pico de

presença deste anticorpo na infecção crônica. Portanto, tanto os resultados de IgM e IgG pode sugerir uma forte participação destes anticorpos principalmente no local da lesão. A utilização do tratamento combinado foi capaz de imunomodular a presença destes dois anticorpos. Conforme já mencionado anteriormente a literatura descreve que altos títulos de anticorpos é um prognóstico ruim em pacientes com PCM. No entanto, nossos resultados de imunohistoquímica mostram que o tratamento combinado, associando com outros resultados como redução do número de fungos viáveis nos órgãos coletados a presença de anticorpos não mostra um desfecho ruim para o controle do processo infeccioso.

Correlacionando a presença dos anticorpos IgM e IgG circulantes aos encontrados *in situ* no omento/pâncreas, nota que há uma participação ativa destes componentes da imunidade humoral no tecido. A presença de anticorpos *in situ* mostra que houve uma resposta positiva no controle da infecção principalmente nos animais que receberam o tratamento combinado. Desta forma, a combinação terapêutica mostrou ser capaz de imunomodular a presença de IgM na infecção aguda e IgG na infecção tardia.

Em relação a presença das citocinas IL-17 e GM-CSF também é possível notar que o tratamento combinado foi capaz de imunomodular a presença destas citocinas *in situ* no omento/pâncreas. O tratamento somente com Celecoxibe nos animais infectados com 15 dias mostrou uma presença significativa de células imunocoradas. Este fármaco favoreceu a presença desta citocina nos locais de lesão, podendo sugerir que esta citocina esteja participando na formação do granuloma. Autores como Tristão *et al.*, (2017) descreve que a secreção da citocina IL-6 é capaz de diferenciar células Th17 e assim contribuindo para a formação do granuloma e modulação da resposta imune. Neste estudo o Celecoxibe foi um fármaco capaz de aumentar a concentração desta citocina no local da lesão.

Já em relação a presença de GM-CSF os resultados mostraram que o tratamento combinado principalmente na fase tardia da infecção foi capaz de reduzir o número de células imunocoradas no omento/pâncreas. Na infecção inicial nos animais infectados e não tratados há um número significativo de células imunocoradas. Correlacionando estes dados com demais experimentos realizados como a presença de fungos viáveis é possível perceber que a associação medicamentosa atuou de forma positiva no controle da disseminação fúngica e conseqüentemente não é necessária uma participação ativa desta citocina *in situ* no omento/pâncreas, pois o número de fungos viáveis é baixo. Corroborando todos estes resultados de imunohistoquímica, o que se pode concluir que houve uma redução da resposta inflamatória local, principalmente nos animais que receberam o tratamento combinado na fase tardia de infecção.

Foi avaliado a presença de fungos viáveis nos órgãos dos animais infectados e infectados e tratados, com a finalidade de verificar se o tratamento tem reduzido o número de fungos viáveis nos órgãos. Para isto, o número de fungos viáveis dos animais que foram infectados e aqueles infectados e tratados foram realizadas a contagem de CFUs do pulmão, fígado, baço e epíplon/pâncreas conforme mostrado na figura 43.

Os resultados mostrados podem sugerir que o Celecoxibe tem contribuído para reduzir o número de fungos. Desta forma, foi necessário avaliar se o fármaco atuava na ativação de células do sistema imunológico ou se tem propriedades fungicidas ou fungistática sobre o *P. brasiliensis*, uma vez que já foi demonstrado atividade antitumoral, antifúngica e antiviral (KOSELYNY *et al.*, 2016). A combinação dos dois medicamentos foi capaz de diminuir significativamente no número de fungos, podendo sugerir que o Celecoxibe foi capaz de melhorar ainda mais a atividade do Itraconazol frente a este fungo. Estudos feitos por Pereira *et al.*, (2013) mostraram que o Celecoxibe administrados nos animais infectados por *Histoplasma capsulatum* também foi capaz de reduzir o número de fungos viáveis, sugerindo uma maior ativação de células e aumentando os níveis de NO e algumas citocinas como IFN- $\gamma$ .

Considerando todos os resultados em conjunto pode sugerir uma interação complexa entre *P. brasiliensis*, resposta imune do hospedeiro e a influência do tratamento. Os mecanismos desta interação nos animais tratados modificaram alguns aspectos apresentados nos animais com infecção e não tratados. Estas modificações podem ser verificadas através dos resultados obtidos por meio, do teste de HTT, produção de anticorpos específicos, características histológicas, produção de citocinas e óxido nítrico, estudo histológico e CFU. A combinação de fármacos mostrou benéfica na fase inicial e crônica da doença, representando um resultado bastante promissor.

## 7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, pode concluir que:

Os testes *in vitro* mostraram que o Celecoxibe foi capaz de reduzir o número de fungos viáveis e quando combinado com Itraconazol houve uma melhor redução. Ainda nos testes *in vitro* o uso de Celecoxibe combinado com Itraconazol mostrou melhorar a atividade fungicida das células esplênicas e conseqüentemente reduzir o número de fungos viáveis.

Os testes *in vivo* mostraram que a taxa de sobrevivência e o peso dos animais que receberam os diferentes tipos de tratamento não tiveram significância estatística em relação aos animais infectados e não tratados.

Os resultados mostraram uma produção significativa de anticorpos como IgM, IgG, IgG1a e IgG2b principalmente na fase crônica da doença. Os animais que receberam o tratamento combinado tiveram menores concentrações destes anticorpos em relação aos demais grupos. A presença destes anticorpos *in situ* no omento/pâncreas mostrou uma presença significativa de IgM nos animais infectados e com tratamento combinado na infecção inicial e uma presença significativa de IgG nos animais infectados e com tratamento combinado na infecção tardia. A produção de anticorpos controlada indica uma importante contribuição da imunidade humoral para o controle da infecção. Sendo assim, pode sugerir que a estratégia de tratamento combinado tem se mostrado uma boa alternativa.

As citocinas IL12, IL4 e KC apresentaram concentrações significativas nos órgãos testados. Estes dados indicam que inicialmente a resposta inflamatória exerce um papel importante no controle do processo infeccioso. À medida que ocorre o curso da infecção a concentração destas citocinas tendem a diminuir principalmente nos animais que receberam o tratamento combinado.

A IL-17 e GM-CSF apresentam concentrações menores nos animais com tratamento combinado. Estes dados podem sugerir uma infecção controlada principalmente neste grupo de animais. Os resultados de imuno-histoquímica mostraram um número reduzido de células imunocoradas para estas citocinas.

As lesões apresentadas na paracoccidiodomicose tendem a serem minimizadas quando os animais recebem o tratamento com Celecoxibe. As lesões são ainda menos intensas nos animais que receberam ambos os tratamentos (Celecoxibe e Itraconazol). Podemos concluir também que diversos parâmetros indicam gravidade do processo infeccioso. No entanto, nos animais que receberam o tratamento combinado estes parâmetros passaram a se

aproximar dos resultados de animais hígidos. Tais resultados foram notados na fase inicial da doença e tardia da doença, porém e para melhor compreender, correlacionar os tratamentos e os parâmetros fisiopatológicos apresentados nos animais com paracoccidiodomicose foi necessário verificar *in situ* a presença de citocinas e anticorpos.

Estes resultados em conjunto sugerem que a combinação de Celecoxibe e Itraconazol influencia positivamente na redução do desenvolvimento da resposta granulomatosa. Há uma imunomodulação positiva que sugere o controle da infecção e melhora de todos os parâmetros, principalmente na redução do número de fungos viáveis. Deste modo, pode-se inferir que esta combinação de fármacos pode ser uma estratégia inovadora no tratamento da PCM.



## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. J. *et al.*, Cdc42p controls yeast-cell shape and virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genet Biol.**, v. 46, n. 12, p. 919–926, 2009.
- ALTMAN, R.D. *et al.*, Effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs on fracture healing: a laboratory study in rats. **J Orthop Trauma.**, v. 9, p. 392-400, 1995.
- ALVES DA COSTA T. *et al.*, Severe Changes in Thymic Microenvironment in a Chronic Experimental Model of Paracoccidioidomycosis. **PLoS One.**, v.13, n. 11(10), p. e0164745, 2016.
- AMBRÓSIO, A.V.A. *et al.*, Paracoccidioidomicose (doença de Lutz-Splendore-Almeida): propedêutica complementar, diagnóstico diferencial, controle de cura. **Rev Med Minas Gerais.**, v.24, n.1, p.81-92, 2014.
- AN, Q. *et al.*, Repurposed drug candidates for antituberculosis therapy. **Eur J Med Chem.**, v. 15, n. 192, p. 112175, 2020.
- ANTONELLO, V.S. *et al.*, Treatment of severe chromoblastomycosis with itraconazole and 5- flucytosine association. **Rev. Inst. Med.**, Trop. n. 52, p. 329–331, 2011.
- ARIAS, J.D.P. *et al.*, Itraconazole in combination with neutrophil depletion reduces the expression of genes related to pulmonary fibrosis in an experimental model of paracoccidioidomycosis. **Medical Mycology.**, v. 56, n. 5, p. 579–590, 2018.
- ARMSTRONG-JAMES, D. *et al.*, Immunotherapeutic approaches to treatment of fungal diseases. **Lancet Infect Dis.**, v. 17, p. e393–e402, 2017.
- ARRUDA, G. D. DE, *et al.*, Response to oxidative stress in *Paracoccidioides* yeast cells as determined by proteomic analysis. **Microbes Infect.**, v. 15, n. 5, p. 347–364, 2013.
- BAGAGLI, E. *et al.*, Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Am J Trop Med Hyg.** 58:505–512,1998.
- BALDERRAMAS, H.A. *et al.*, Human neutrophils produce IL-12, IL-10, PGE2 and LTB4 in response to *Paracoccidioides brasiliensis*. Involvement of TLR2, mannose receptor and dectin-1. **Cytokine [Internet].**, v. 67, n. 1, p. 36–43, 2014.
- BENARD, G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia [Internet].**, v. 165, n. (4–5), p. 209–21, 2008.
- BENARD, G.I.L. *et al.*, Treatment of severe forms of paracoccidioidomycosis: is there a role for corticosteroids? **Medical Mycology.**, v.50, p.641–648, 2012.
- BERLINER, M. D. *et al.*, Vital staining of *Histoplasma capsulatum* with Janus Green B. **Sabouraudia.**, v. 5, p.25-29, 1966.
- BERTAGNOLLI, M.M. *et al.*, Celecoxib for the prevention of sporadic colorectal adenomas. **N Engl J Med.**, v. 355, n. 9, p. 873-84, 2006.

- BIONDO, G.A. *et al.*, *Paracoccidioides brasiliensis* Uses Endogenous and Exogenous Arachidonic Acid for PGEx Production. **Mycopathologia [Internet]**, v. 170, n. 2, p. 123–30, 2010.
- BORDON, A.P. *et al.*, Prostaglandin E2 production by high and low virulent strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathologia**, v. 163, n. 3, p. 129–35, 2007.
- BORDON-GRACIANI, A.P. *et al.*, Inhibitory effect of PGE 2 on the killing of *Paracoccidioides brasiliensis* by human monocytes can be reversed by cellular activation with cytokines. **Med Mycol**, v. 50, n. 7, p. 726–34, 2012.
- BOZZI, A. *et al.*, Analysis of memory T cells in the human paracoccidioidomycosis before and during chemotherapy treatment. **Immunol. Lett.**, v.114, p. 23–30, 2007.
- BRITO, V.N. *et al.*, Thymus invasion and atrophy induced by *Paracoccidioides brasiliensis* in BALB/c mice. **Med Mycol**, v.41, n. 2, p. 83–87, 2003.
- BROOKS, P. Use and benefits of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Am J Med**, v. 104, p. 9-13, 1998.
- BRUMMER, E. *et al.*, Fungicidal activity of murine inflammatory polymorphonuclear neutrophils: comparison with murine peripheral blood PMN. **Clin. exp. Immunol.**, v. 66, p. 681-690, 1986.
- BRUMMER, E. *et al.*, Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin. Microbiol.**, v. 6, n. 2, p. 89-117, 1993.
- BRUNERI, L.M. Produção e mobilização de células sanguíneas, estado de ativação e capacidade fungicida de neutrófilos em paracoccidioidomicose murina experimental [Tese de Doutorado em Imunologia]. São Paulo/BR. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, p.1-195, 1995.
- BURGER, E. Imunologia das micoses. In. ZAITZ, C *et al.*, (Org.). *Compêndio de micologia médica*. 2 ed. São Paulo: Guanabara Koogan. p.108-22, 2010.
- BURGER, E. *et al.*, Cytokines Expressed in the Granulomatous Lesions in Experimental Paracoccidioidomycosis: Role in Host Protective Immunity and as Fungal Virulence Factor. **J Clin Cell Immunol**, v.51, p.1-7, 2013.
- BURGER, E. *et al.*, Low-level laser therapy to the mouse femur enhances the fungicidal response of neutrophils against *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 9, p. 1–19, 2015.
- CACERE, C.R. *et al.*, Altered expression. Of the costimulatory molecules CD80, CD 86, CD152, PD-1 and ICOS on t-cells from paracoccidioidomycosis patients: lack of correlation with T-cell hyporesponsiveness. **Clin Immunol**, v. 129, n. 2, p. 341-49, 2008.
- CALICH, V.L.G. *et al.*, Suceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Braz J Exp Pathol**, v. 66, n. 5, p. 585-94, 1985.

- CALICH, V.L.G. *et al.*, Regulatory T cells in paracoccidioidomycosis. **Virulence.**, V.10, n. 1, p. 810-821, 2019.
- CAMACHO, E.; NIÑO-VEGA, G. A. *Paracoccidioides* spp.: Virulence Factors and Immune-Evasion Strategies. **Mediators Inflamm.**, 2017, p. 5313691, 2017.
- CANO, L. E. *et al.*, Pulmonary Paracoccidioidomycosis: Clinical, Immunological and Histopathological Aspects. In: Irusen, E. M. (edit.). Lung diseases - selected state of the art reviews. [S.I]: InTech. cap. 16, p. 359-391. 2012.
- CARLI, M.L. DE. *et al.*, Serum antibody levels correlate with oral fungal cell numbers and influence the patients' response to chronic paracoccidioidomycosis. **Mycoses.**, v.58, p.356–361, 2015.
- CARNEIRO, N.K. *et al.*, IL-18 Triggered by the Nlrp3 Inflammasome Induces Host Innate Resistance in a Pulmonary Model of Fungal Infection. **J Immunol.**, v.194, p.4507-4517, 2015.
- CASTRO, L.F. *et al.*, Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. **J Infect.**, v.67, n.5, p.470-85, 2013.
- CAVASSANI, K.A. *et al.*, et al., Cell-Free Antigens from *Paracoccidioides brasiliensis* Drive IL-4 Production and Increase the Severity of Paracoccidioidomycosis. **PLoS ONE.**, v. 6, n.6, p.214-23, 2011.
- CAZEDEY, E.C.L. *et al.*, Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de itraconazol em produtos farmacêuticos por CLAE. **Quim Nova.**, v. 30, n. 4, p. 774-776, 2007.
- CHAN, J.F.W. *et al.*, The celecoxib derivative kinase inhibitor AR-12 (OSU-03012) inhibits Zika virus via down-regulation of the PI3K/Akt pathway and protects Zika virus-infected A129 mice: A host-targeting treatment strategy. **Antiviral Research.**, v.160, p. 38-47, 2018.
- CHONG, C. R. *et al.*, New uses for old drugs. **Nature.**, v.448, p. 645–646, 2007.
- CENCI, E. *et al.*, Induction of protective Th1 responses to *Candida albicans* by antifungal therapy alone or in combination with an interleukin-4 antagonist. **The Journal of Infectious Diseases.**, 176, 217–26, 1997.
- CERVELLO, M. *et al.*, Novel Combination of Sorafenib and Celecoxib Provides Synergistic Anti-Proliferative and Pro-Apoptotic Effects in Human Liver Cancer Cells. Vinciguerra M, editor. **PLoS One.**, v. 8, n. 6, p. e65569, 2013.
- CEZAR-DOS-SANTOS ,F. *et al.*, Unraveling the susceptibility of paracoccidioidomycosis: Insights towards the pathogen-immune interplay and immunogenetics. **Infect Genet Evol.**, v. 86, p. 104586, 2020.
- COELHO, K.I.R.; *et al.*, Experimental paracoccidioidomycosis in hamster: transmission electron microscopy of inoculation site lesion. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 36, n. 3, p. 217-223, 1994.

CSERMEL, Y. P. *et al.*, The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. **Pharmacol. Ther.**, v.79, n.2, p. 129-168, 1998.

CRUVINEL, W.DE.M. *et al.*, Immune system - part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Rev Bras Reumatol.**, v.50,n.4, p.434-61, 2010.

DANIEL, DA ROSA W. *et al.*, Asteroid body in sporotrichosis. Yeast viability and biological significance within the host immune response. **Med. Mycol.**, v. 46, n. 5, p. 443–448, 2008.

DA SILVA, T. A. *et al.*, Extracellular vesicles from *Paracoccidioides brasiliensis* induced M1 polarization *in vitro*. **Sc Rep.**, v. 24, n. 6, p. 35867, 2016.

DE ALMEIDA, F.A. *et al.*, Paracoccidioidomycosis in Brazilian patients with and without human immunodeficiency virus infection. **Am J Trop Med Hyg.**, 96:368–372, 2017.

DE ARRUDA, G.D. *et al.*, Response to oxidative stress in *Paracoccidioides* yeast cells as determined by proteomic analysis. **Microbes Infect.**, v. 15, n. 5, p. 347–364, 2013.

DE CASTRO, L.F. *et al.*, Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. **J Infect.** v.67, n. 5, p. 470–485, 2013.

DE LIMA, S. P. *et al.*, Transcriptional and proteomic responses to carbon starvation in *Paracoccidioides*. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 8, n. 5, p. e2855, 2014.

DE OLIVEIRA, H.C. *et al.*, *Paracoccidioides*-host Interaction: An Overview on Recent Advances in the Paracoccidioidomycosis. **Front Microbiol.**, v.6, p.1319, 2015.

DEY, R. *et al.*, Combination treatment of celecoxib and ciprofloxacin attenuates live *S. aureus* induced oxidative damage and inflammation in murine microglia via regulation of cytokine balance. **J Neuroimmunol.**, v. 316, p. 23–39, 2018.

DI GANGI, R. *et al.*, *Paracoccidioides brasiliensis* infection promotes thymic disarrangement and premature egress of mature lymphocytes expressing prohibitive TCRs. **BMC Infect Dis.**, v. 16, p. 209, 2016.

DIAS-MELICIO, L.A. *et al.*, Interleukin-18 increases TLR4 and mannose receptor expression and modulates cytokine production in human monocytes. **Mediators Inflamm.**, p. 236839, 2015.

DA ROSA, D.W. *et al.*, Asteroid body in sporotrichosis. Yeast viability and biological significance within the host immune response. **Med. Mycol.** v. 46, n. 5, p. 443–448, 2008.

DRUMMOND, R.A. *et al.*, The role of Syk/CARD9 coupled C-type lectins in antifungal immunity. **Eur J Immunol.**, v.41, p. 276–281, 2011.

- ESBONA K. *et al.*, COX-2 modulates mammary tumor progression in response to collagen density. **Breast Cancer Res.**, v. 18, n. 1, p. 35, 2016.
- FAVA NETTO, C. Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na blastomicose sul-americana, com antígeno polissacarídico. **Arq Cir Clin Exp.**, v. 18, p.1997-254, 1955.
- FERIOTTI, C. *et al.*, Expression of dectin 1 nadenhanced activation of NALP3 inflammasome associated with resistance to paracoccidioidomycosis. **Frontiers in Microbiology.**, v. 6, n. 913, 2015.
- FERNANDES, R.K *et al.*, *Paracoccidioides brasiliensis* interferes on dendritic cells maturation by inhibiting PGE2 production. **PLoS One.**, v. 20, n.10(3), p.e0120948, 2015.
- FDA. Briefing Document. Advisory Committee Briefing Document: Review of Celecoxib Long-Term Arthritis Safety Study (CLASS) [Access verified August 2002].
- FINATO, A.C. *et al.*, Evaluation of antifibrotic and antifungal combined therapies in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. **Med Mycol.**, v.1, n.58(5), p. 667-678, 2020.
- FORTES, M. R. P. *et al.*, Immunology of paracoccidioidomycosis. **An Bras Dermatol.**, v.86, n.3, p. 516-25, 2011.
- FREITAS, J.C.; *et al.*, Proteção pela glucana em modelo experimental de sepse. **Acta Cir. Bras.**, v. 19, p. 296–307, 2006.
- GARCIA, N.G. *et al.*, Extensive cutaneous lesions in paracoccidioidomycosis successfully treated with itraconazole and  $\beta$ -glucan. **Int. J. Dermatol.**, v. 53, p. 2013–2015, 2014.
- GARDIZANI, T.P. *et al.*, 43 kDa Glycoprotein (gp43) from *Paracoccidioides brasiliensis* Induced IL-17A and PGE2 Production by Human Polymorphonuclear Neutrophils: Involvement of TLR2 and TLR4. **J Immunol Res.**, v. 26, 2019, p. 1790908, 2019.
- GAUTHIER, G *et al.*, Insights into Fungal Morphogenesis and Immune Evasion: Fungal conidia, when situated in mammalian lungs, may switch from mold to pathogenic yeasts or spore-forming spherules. **Microbe Wash DC.**, 3, 9, 416–23, 2010.
- GEGEMBAUER, G. *et al.*, Serology of Paracoccidioidomycosis Due to *Paracoccidioides lutzii*. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 8, n.7, p. 2986, 2014.
- GIACOMAZZI, J. *et al.*, The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses.**, v. 59, p. 145–150, 2016.
- GOMEZ, B.L. *et al.*, Detection of melanin-like pigments in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* *in vitro* and during infection. **Infect and Immun.**, v. 69, n. 9, p. 5760–5767, 2001.
- GONZALEZ, A. *et al.*, Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Infect Immun.**, v.68, n.5, p.2546-52, 2000.



GONZALEZ, G.C. *et al.*, Prospects for adoptive T-cell therapy for invasive fungal disease. **Curr Opin Infect Dis.**, v. 30, p. 518–527, 2017.

GROCOTT, R. G. A stain for fungi in tissue sections and smears, using Gomori's methenamine-silver nitrate technic. **Am J. Clin Pathol.**, V. 25, p.975-979, 1955.

HERNÁNDEZ-CHÁVEZ, M. *et al.*, Fungal Strategies to Evade the Host Immune Recognition. **J Fungi.**, v.3, n. 4, p. 51, 2017.

HRYCYK, M.F. *et al.*, Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*, *P. lutzii* and related species: infection in armadillos, soil occurrence and mycological aspects. **Med Mycol.** 56:950–962, 2018.

JAKOBSSON, P.J. *et al.*, Identification of human prostaglandin E synthase: amicrosomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v.96, p. 7220–5, 1999.

JANDÚ, J.J. *et al.*, Treatment with pCramoll alone and in combination with fluconazole provides therapeutic benefits in *C. gattii* infected mice. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v.7, p. 1–11, 2017.

KALINSKI, P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. **J Immunol.**, v.188, p. 21–8, 2012.

KITCHEN, S.; *et al.*, Eletroterapia: prática baseada em evidências. 2003.

KOSELNY, K. *et al.*, Antitumor/Antifungal Celecoxib Derivative AR-12 is a Non-Nucleoside Inhibitor of the ANL-Family Adenylating Enzyme Acetyl CoA Synthetase. **ACS Infect Dis.**, v.2, n.4, p.268-280, 2016.

KUROKAWA, C.S. *et al.*, Pro- and anti-inflammatory cytokines produced by human monocytes challenged *in vitro* with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbiol Immunol.**, v. 51, p. 421-8, 2007.

KURITA, N. *et al.*, Effect of cytokines on antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol.**, v.38, n. 2, p. 177–82, 2000.

LIAOA, G. *et al.*, 6-O-Branched oligo- $\beta$ -glucan-based antifungal glycoconjugate Vaccines. **ACS Infect Dis.**, v. 2, n. 2, p. 123–131, 2016.

LOPES, J.D. *et al.*, Characterization of glycoprotein gp43, the major laminin-binding protein of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Braz J Med Biol Res.**, v. 27, n. 9, p. 2309 –2313, 1994.

LOURES, F.V. *et al.*, MyD88 signaling is required for efficient innate and adaptive immune responses to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Infect Immun.**, v.79, n.6, p.2470-80, 2011.

MAGALHÃES, E. M. *et al.*, Prevalence of paracoccidioidomycosis infection by intradermal reaction in rural areas in Alfenas, Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo.** v. 56, n. 4, p. 281–285, 2014.

- MARQUES, S.A. Paracoccidioidomycosis. **Clin Dermatol.**, 30:610–615, 2012.
- MARTINEZ, R. Epidemiology of Paracoccidioidomycosis. **Rev. Inst. Med. Trop.**, Sao Paulo, 57, p.11-20, 2015.
- MCANULTY, S. *et al.*, Effect of NSAID on Muscle Injury and Oxidative Stress. **Int J Sports Med.**, v. 28, n.11, p. 909–15, 2007.
- MENDES, R.P. *et al.*, Paracoccidioidomycosis: current perspectives from Brazil. **Open Microbiol J.**, 11:224–282, 2017.
- MESTER, A.F. *et al.*,. The effect of laser radiation on wound healing and collagen synthesis. **Studia Biophys.**, v. 35, p. 227-30, 1973.
- MICHELIN, M.A. *et al.*,. Involvement of prostaglandins in the immunosuppression occurring during experimental infection by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Experimental Parasitology.**, v. 102, n. 3-4, p. 170–177, 2002.
- MORETO, T.C. *et al.*,. Accuracy of routine diagnostic tests used in paracoccidioidomycosis patients at a university hospital. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v.105, p.473-8, 2011.
- NAGANO, A. *et al.*, Celecoxib inhibits osteoblast maturation by suppressing the expression of Wnt target genes. **Journal of Pharmacological Sciences.**, v.133, n. 18 e 24, 2017.
- NARANJO, T.W. *et al.*, Combined itraconazole-pentoxifylline treatment promptly reduces lung fibrosis induced by chronic pulmonary paracoccidioidomycosis in mice. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics.**, v. 24, n. 1, p. 81-91, 2011.
- NASCIMENTO, F.R.F.; *et al.*, Role for Nitric Oxide in Paracoccidioidomycosis: Essential for Resistance, but Overproduction Associated with Susceptibility. **J Immunol.**, v.168, n.9, p.4593-4600, 2002.
- NASCIMENTO, M.P. *et al.*, Granulocyte macrophage colony-stimulating factor enhances the modulatory effect of cytokines on monocyte-derived multinucleated giant cell formation and fungicidal activity against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v.106, n. 6, p.735-41, 2011.
- NISHIKAKU, A.S. *et al.*, Matrix metalloproteinases with gelatinolytic activity induced by *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Experimental Pathology.**, v. 90, n. 5., p. 527–53, 2009.
- NEMECEK, J.C. *et al.*, Global control of dimorphism and virulence in fungi. **Science.**, v. 312, n. 5773, p. 583-588, 2006.
- NOVAES, R. D. *et al.*, *Trypanosoma cruzi* infection induces morphological reorganization of the myocardium parenchyma and stroma, and modifies the mechanical properties of atrial and ventricular cardiomyocytes in rats. **Cardiovasc Pathol.**, v. 22, n. 4, p. 270–279, 2013.

- NOVAES, R. D. *et al.*, *Trypanosoma cruzi* infection and benznidazole therapy independently stimulate oxidative status and structural pathological remodeling of the liver tissue in mice. **Parasitol Res.**, v. 114, n. 8, p. 2873-2881, 2015.
- PAGLIARI, C. *et al.*, Characterization of cytotoxic immune response in skin and mucosal lesions of paracoccidioidomycosis. **J Cutan Pathol.** v. 37, p.565-70, 2010.
- PARENTE, A.F. *et al.*, Proteomic analysis reveals that iron availability alters the metabolic status of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLoS One.**, v. 6, n. 7, p. e22810, 2011.
- PEREIRA, P.A.T. *et al.*, Celecoxib Improves Host Defense through Prostaglandin Inhibition during *Histoplasma capsulatum* Infection. **Mediators of Inflammation.**, p. 11, 2013, Article ID 950981.
- PINZAN, C.F. *et al.*, Immunological Basis for the Gender Differences in Murine *Paracoccidioides brasiliensis* Infection. **PLoS ONE.**, v.5, n.5, p. e10757, 2010.
- POPI, F.A. *et al.*, GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. **Cell Immunol.**, v. 218, n.1-2, p. 87–94, 2002.
- PUERTA-ARIAS, J.D. *et al.*, Depletion of Neutrophils Promotes the Resolution of Pulmonary Inflammation and Fibrosis in Mice Infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLoS One.**, v.30, n.11(9), p. e0163985, 2016.
- RAMAGE, G. *et al.*, *In vitro* *Candida albicans* biofilm induced proteinase activity and SAP8 expression correlates with in vivo denture stomatitis severity. **Mycopathologia.**, v. 174, n.1, p. 11–19, 2012.
- RAPPLEYE, C. A. *et al.*, Defining virulence genes in the dimorphic fungi. **Annu Rev Microbiol.**, n. 60, p. 281–303, 2006.
- RESTREPO, A. *et al.*, Paracoccidioidomycosis. In:KAUFFMAN, C. A *et al.*, (edit.). **Essentials of Clinicals Mycology.**, 2 ed. Springer: New York. p. 367-85, 2011.
- RODRIGUES, D.R. *et al.*, *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN-gamma, TNF-alpha and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. **Med Mycol.**, v.45, p. 27-33, 2007.
- RODRIGUES, M. L. *et al.*, Vesicular transport systems in fungi. **Future Microbiol.**, v. 6, n. 11, p. 1371–1381, 2011.
- ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nat Rev Immunol.**, 11, 4, 275–288, 2011.
- RUAS, L.P. *et al.*, ArtinM offers new perspectives in the development of antifungal therapy. **Front. Microbiol.**, v. 3, p. 1–6, 2012.
- SALAZAR, F. *et al.*, Antifungal innate immunity: a perspective from the last 10 years. **J Innate Immun.**, v. 10, p. 1-25, 2018.

- SALDANHA, C.A.; *et al.*, Antifungal Activity of Amphotericin B Conjugated to Nanosized Magnetite in the Treatment of Paracoccidioidomycosis. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 10, n.6, 2016.
- SAN-BLAS, G. *et al.*, *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. A review. **Mycopathologia.**, v. 62, n. 2, p. 77-86, 1977.
- SAN-BLAS, G. *et al.*, Experimental medical mycological research in Latin America - a 2000-2009 overview. **Rev Iberoam Micol.**, v.28, n.1, p.1–25, 2011.
- SARDI, C. J. DE. *et al.*, *In vitro Paracoccidioides brasiliensis* biofilm and gene expression of adhesins and hydrolytic enzymes. **Virulence.**, v. 6, n. 6, p. 642–651, 2015.
- SHANKAR, J. *et al.*, Hormones and the Resistance of Women to Paracoccidioidomycosis. **Clinical Microbiology Reviews.**, v. 24, n. 2 p. 296–313, 2011.
- SHIKANAI-YASUDA, M.A *et al.*, Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 2017, 50, 715–740.
- SEYEDMOUSAVI, S. *et al.*, Systemic antifungal agents: current status and projected future developments. **Methods Mol Biol.**, v.1508, p. 107–139, 2017.
- SIQUEIRA, K.Z. *et al.*, Interleukin-6 treatment enhances human monocyte permissiveness for *Paracoccidioides brasiliensis* growth by modulating cytokine production. **Med Mycol.**, v.47, p. 259-67, 2009.
- SMITH, W.L. *et al.*,. Pharmacology of prostaglandin endoperoxide synthase isozymes-1 and -2,” **Annals of the New York Academy of Sciences.**, v. 714, p. 136-142, 1994.
- SMITH, R.J. Modulation of phagocytosis by and lysosomal enzyme secretion from guinea-pig neutrophils: effect of nonsteroid anti-inflammatory agents and prostaglandins. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 200, p. 647–657, 1977.
- SINGER-VERMES, L.M. *et al.*,. Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *P. brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. **Journal of Medical and Veterinary Mycology.**, 27:71-82, 1989.
- SIRIVORANANKUL, C. *et al.*, Vitamin D and experimental invasive aspergillosis. **Med. Mycol.**, v. 52, p. 847–852, 2014.
- SOARES, D.A. *et al.*,. Extracellular *Paracoccidioides brasiliensis* phospholipase B involvement in alveolar macrophage interaction. **BMC Microbiol.**, v.10, n. 1, p. 241 2010.
- SOARES, M. *et al.*,. Modulatory effect of prostaglandins on human monocyte activation for killing of high- and low-virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Immunology.**, V. 102, n. 4, p. 480–485, 2001.
- TAMAYO, D. *et al.*,. Involvement of the 90kDa heat shock protein during adaptation of *Paracoccidioides brasiliensis* to different environmental conditions. **Fungal Genet Biol.**, v. 51, p. 34–41, 2013.

- TEIXEIRA, M.M. *et al.*, Paracoccidioides species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. **PLoS Pathog.**, n. 10, p. 4–7, 2014.
- TELES, F.R.R. *et al.*, Laboratorial diagnosis of paracoccidioidomycosis and new insights for the future of fungal diagnosis. **Talanta.**, 85:2254–2264, 2011.
- THIND, S.K. *et al.*, Dendritic cell interactions with *Histoplasma* and *Paracoccidioides*. **Virulence.**, v. 6, n.5, p.424-432, 2015.
- THOMAZ, L. *et al.*, Experimental paracoccidioidomycosis: Alternative therapy with ajoene, compound from *Allium sativum*, associated with sulfamethoxazole/trimethoprim. **Med. Mycol.**, v. 46, p. 113 – 118, 2008.
- TORRADO, E. *et al.*, IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v.21, n.6, p.455–62, 2010.
- TRAVASSOS, L.R. *et al.*, Paracoccidioidomycosis vaccine. **Hum. Vaccines Immunother.**, v. 8, p. 1450–1453, 2012.
- TRISTÃO, F.S.M. *et al.*, Th17-Inducing Cytokines IL-6 and IL-23 are Crucial for Granuloma Formation during Experimental Paracoccidioidomycosis. **Front Immunol.**, v.8, n.949, 2017.
- VALLEJO, M. C. *et al.*, The pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* exports extracellular vesicles containing highly immunogenic alpha-galactosyl epitopes. **Eukaryotic Cell.**, v.10, p. 3 343–351, 2011.
- VERICIMO, M.A. *et al.*, Increased apoptosis during the early phase of experimental paracoccidioidomycosis as a phenotypic marker of resistance. **Microbes and Infect.**, v. 8, n. 2-13, p. 2811–2820, 2006.
- WALKER, C. *et al.*, Lymphokine regulation of activated (G1) lymphocytes, I: Prostaglandin E2-induced inhibition of interleukin 2 production. **J Immunol.**, v. 130, p. 1770–1773, 1983.
- WANKE, B. *et al.*, Associação da rifampicina à anfotericina B no tratamento da paracoccidioidomycose. **Rev Inst Med Trop.**, v.26, n. 4, p. 205-211, 1984.
- WANKE, B. *et al.*, Curso de Atualização. Micose. Paracoccidioidomycose. **J Bras Pneumol.**, v. 35, n. 9, p. 1245-1249, 2009.
- WARDEN, S.J. Cyclo-Oxygenase-2 Inhibitors. **Sport Med.**, v. 35, n. 4, p. 271–83, 2005.
- YARZÁBAL, L.A. Anticuerpos precipitantes específicos de la blastomicosis sudamericana revelados por inmunoelectroforesis. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 13, n. 5, p. 320–327, 1971.
- XIDIEH, C.F. *et al.*, Influence of the genetic background in the pattern of the lesions developed by susceptible and resistant mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medical Microbiology and Immunology.**, 188 (1):41-49, 1999.



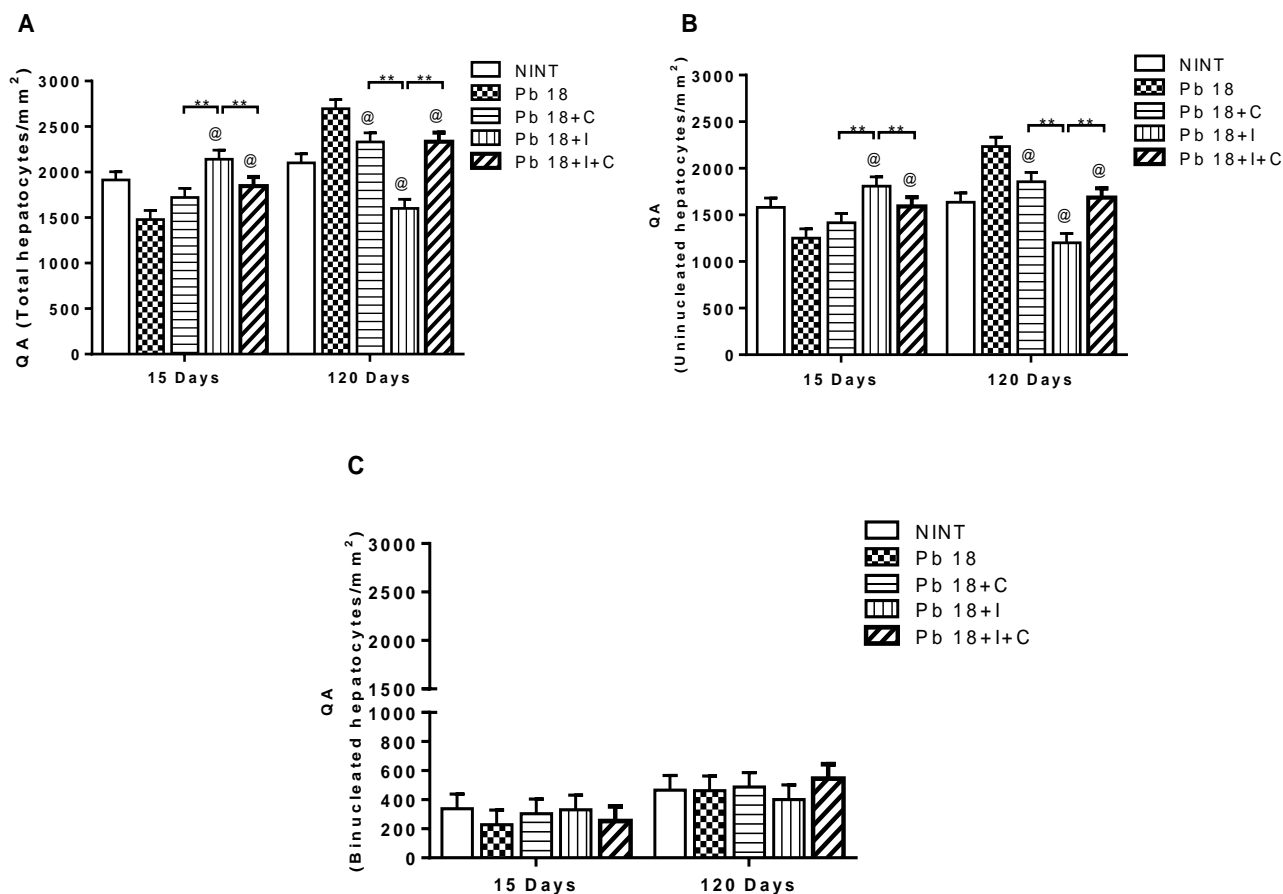
## MATERIAL SUPLEMENTAR

### Análise da quantidade de hepatócitos totais, uni e binucleados

O número de hepatócitos totais, uni e binucleados foram analisados conforme mostra abaixo. Em relação ao número de hepatócitos totais na fase inicial da infecção, foi possível perceber que nos animais infectados e não tratados há uma redução significativa destas células em relação aos demais grupos. Já no grupo que recebeu o tratamento somente com Itraconazol houve um aumento e curiosamente nos animais que receberam o tratamento combinado notou que apresenta resultados semelhantes ao dos animais saudáveis. Na fase tardia nos animais infectados e não tratados o número de hepatócitos totais é significativamente maior em relação aos demais grupos. Também os animais tratados somente com Itraconazol houve uma redução significativa destas células em relação aos demais grupos. Vale ressaltar que nos animais com tratamento combinado houve uma redução destas células e os resultados são semelhantes aos animais saudáveis.

Em relação aos hepatócitos uninucleados é possível perceber que na fase inicial da infecção há uma redução significativa destas células nos animais infectados e não tratados e nos animais tratados somente com Celecoxibe. Em especial, nos animais que receberam o tratamento combinado notou que o número destas células é semelhante aos encontrados no grupo de animais saudáveis. Na fase tardia os animais infectados e não tratados houve um aumento significativo destas células em relação aos demais grupos. Curiosamente no grupo tratado somente com Itraconazol houve uma redução significativa em relação aos demais grupos. Em relação ao número de hepatócitos binucleados não houve diferença estatística tanto na fase inicial quanto tardia da infecção.

Estes resultados podem sugerir que no grupo de animais infectados e não tratados o fungo causa uma lesão inicial neste órgão e que na fase inicial quase não há um comprometimento do número destas células. Tal fato pode ser explicado por trabalhar com a linhagem de camundongos *swiss*, que se comportam como modelo animal resistente para este fungo e também pode sugerir que o fungo está mais concentrado dentro dos granulomas e não de forma disseminada no órgão. Também pode sugerir que o tratamento mesmo sendo combinado não alterou o número destas células, ou seja apresentando resultados semelhantes ou muito próximos dos apresentados pelos animais saudáveis. Ainda é possível inferir que o tratamento combinado está agindo em sinergismo e induzindo uma melhora no quadro infeccioso desde o início da infecção.



Número de hepatócitos totais, uni e binucleados dos animais infectados por via intraperitoneal com Pb 18 durante 15 dias de infecção e tratamento e 120 dias de infecção e tratamento.

Legenda: Grupo não infectados e não tratados (NI+NT). Grupo infectado com Pb 18 e não tratado (Pb 18). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe (6 mg/Kg). Grupo infectado e tratado com Itraconazol (Pb 18 + I) (3 mg/Kg). Grupo infectado e tratado com Celecoxibe + Itraconazol (6 mg/Kg) (3 mg/Kg), respectivamente. Os resultados para cada grupo estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média. Diferença estatística entre os grupos (@)  $p < 0,05$  entre Pb 18 vs os diferentes tratamentos e (\*\*\*)  $p < 0,001$  entre os diferentes tratamentos, teste *Two Way ANOVA*, pós teste de *Tukey*. Os testes foram realizados em triplicata.

Fonte: do autor

**ANEXO A**  
**CRONOGRAMA INICIAL, ATUAL E FUTURO**

| <b><u>Atividades para o ano de 2018, 2019 e 2020</u></b><br><b><u>respectivamente.</u></b>  | <b><u>Meses</u></b>                           |
|---|---|
| Submissão do projeto ao Comitê de Ética no uso Animal da UNIFAL, planejamento experimental, aquisição de materiais e reagentes de consumo durante os experimentos, treinamento das técnicas utilizadas. | <b>1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12</b> |

|  |   |
|--|---|
| Infeção dos animais e tratamento por 15 dias. Coleta dos órgãos e realização do CFU. Preparação das lâminas e análise histológica geral. Realização de imunohistoquímica e análise das lâminas.  | <b>1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12</b> |
| Obtenção das imagens histológicas, análise estereológica e análise estatística. Elaboração de resumos e artigos para apresentação em eventos científicos. Posteriormente, submissão em periódicos, elaboração e entrega do trabalho de qualificação. | <b>1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12</b> |
| Infeção dos animais e tratamento por 120 dias. Coleta dos órgãos e realização do CFU. Preparação das lâminas e análise histológica geral. Realização de imunohistoquímica e análise das lâminas.   | <b>1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12</b> |

| <b><u>Atividades para o ano de 2021</u></b>   | <b><u>Meses</u></b>      |
|---|--------------------------|
| Obtenção das imagens histológicas, análise estereológica e análise estatística. Será feita a produção de gráficos e pranchas histológicas, redação de relatório final, elaboração de resumos e artigos para submissão em eventos e periódicos. Por fim, elaboração e entrega da tese para defesa. | <b>1, 2, 3, 4, 5 e 6</b> |

## ANEXO B

## CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
 Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG  
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 - Alfenas/MG - CEP 13127-000  
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Influência do tratamento com antifúngico na resposta granulomatosa da Paracoccidioidomicose experimental murino: Pesquisa de anticorpos e citocinas", registrada com o nº 23/2018, 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 (ou ensino) - 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.

|                         |                                    |
|-------------------------|------------------------------------|
| Finalidade              | ( ) Ensino (X) Pesquisa científica |
| Vigência da autorização | De 11/07/2018 a 30/04/2021         |
| Espécie/linhagem/raça   | Camundongo Swiss / heterogênico    |
| Nº de animais           | 100                                |
| Sexo                    | Fêmeas                             |
| Origem                  | Biotério Central da UNIFAL         |

Alfenas, 11 de Julho de 2018.

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida  
 Coordenador do CEUA/UNIFAL-MG

## ANEXO C

## PRODUÇÕES CIENTÍFICAS

Journal of Ethnopharmacology 277 (2021) 114181



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jethpharm](http://www.elsevier.com/locate/jethpharm)

## Brazilian Red Propolis shows antifungal and immunomodulatory activities against *Paracoccidioides brasiliensis*

Lauana Aparecida Santos<sup>a</sup>, Pedro Luiz Rosalen<sup>a</sup>, Nayara Andrade Dias<sup>a</sup>,  
Julianne Caravita Grisolia<sup>a</sup>, Bruno José Nascimento Gomes<sup>a</sup>, Lucas Blossfeld-Lopes<sup>a</sup>,  
Masaharu Ikegaki<sup>a</sup>, Severino Matias de Alencar<sup>b</sup>, Eva Burger<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Federal University of Alfenas - UNIFAL, Alfenas, MG, Brazil

<sup>b</sup> Department of Agri-Food Industry, Food and Nutrition, Luis de Queiroz College of Agriculture, University of São Paulo - USP, Piracicaba, SP, Brazil

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Paracoccidioidomycosis  
Antifungal activity  
Anti-inflammatory activity  
Neutrophils activation  
Natural products

## ABSTRACT

**Ethnopharmacological relevance:** Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis with high prevalence in South America and especially in Brazil with severe clinical consequences that need broadened therapeutic options.

Propolis is a natural resin from bees used in folk medicine for centuries with the first report in the ancient history of Egypt by *Eberly papyrus*, in Middle-Ages used to wash the newborn's umbilical cord and World War II as antiseptic or antibiotics. Nowadays it is a natural product worldwide consumed as food and traditionally used for oral and systemic diseases as an anti-inflammatory, antimicrobial, antifungal, and other diseases. Brazilian red propolis (BRP) is a new type of propolis with a distinguished chemical profile and biological activities from propolis (green) with pharmacological properties such as antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant, and others.

**Aim of study:** Thus, the main purpose of this study was to investigate the direct *in vitro* and *ex vivo* effect of BRP on *Paracoccidioides brasiliensis*.

**Material and methods:** Antifungal activity of different concentrations of BRP on a virulent *P. brasiliensis* isolate (Pb18) was evaluated using the microdilution technique. Also, mice splenic cells co-cultured with Pb18 were treated with BRP at different times and concentrations (only Pb18 = negative control). Mice were inoculated with Pb18 and treated with different concentrations of BRP (50–500 mg/mL) in a subcutaneous air pouch. In this later experimental model, macroscopic characteristics of the air pouch were evaluated, and cellular exudate was collected and analyzed for cellular composition, mitochondrial activity, total protein reactive oxygen specimens (ROS), and nitric oxide production, as well as the number of viable fungal cells.

**Results:** The *in vitro* experiments showed remarkable direct antifungal activity of BRP, mainly with the highest concentration employed (500 mg/mL), reducing the number of viable cells to 10% of the original inoculum after 72 h incubation. The splenocytes co-cultivation assays showed that BRP had no cytotoxic effect on these cells, on the contrary, exerted a stimulatory effect. This stimulation was also observed on the PMNs at the air pouch, as verified by production of ROS and total proteins and mitochondrial activity. This activation resulted in enhanced fungicidal activity, mainly with the 500 mg/mL concentration of BRP. An anti-inflammatory effect was also detected, as verified by the smaller volume of the BRP-treated air pouch as well as by an earlier shift from neutrophils to mononuclear cells present in the infection site.

**Conclusion:** Our results strongly suggest, for the first time in the literature, that Brazilian Red propolis has four protective mechanisms in experimental paracoccidioidomycosis: activating neutrophils, exerting a direct anti-fungal effect, preventing fungal dissemination, and controlling excessive inflammation process.

\* Corresponding author. Universidade Federal de Alfenas, Instituto de Ciências Biomédicas, Rua Gabriel Monteiro Silva 700, 37130-001, Alfenas; MG; Brazil.

E-mail addresses: [lauanasantos20@gmail.com](mailto:lauanasantos20@gmail.com) (L.A. Santos), [pedro.rosalen@unifal-mg.edu.br](mailto:pedro.rosalen@unifal-mg.edu.br) (P.L. Rosalen), [nay.andradedias@gmail.com](mailto:nay.andradedias@gmail.com) (N.A. Dias), [juliecgc@uol.com.br](mailto:juliecgc@uol.com.br) (J.C. Grisolia), [nascimento.bj@gmail.com](mailto:nascimento.bj@gmail.com) (B.J. Nascimento Gomes), [meagende@gmail.com](mailto:meagende@gmail.com) (L. Blossfeld-Lopes), [masaharu.ikegaki@unifal-mg.edu.br](mailto:masaharu.ikegaki@unifal-mg.edu.br) (M. Ikegaki), [smalencar@usp.br](mailto:smalencar@usp.br) (S.M. Alencar), [eva.burger@unifal-mg.edu.br](mailto:eva.burger@unifal-mg.edu.br) (E. Burger).

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114181>

Received 1 March 2021; Received in revised form 21 April 2021; Accepted 29 April 2021

Available online 12 May 2021

0378-8741/Published by Elsevier B.V.



## 1. Introduction

Mycotic infections and population susceptibility are increasing worldwide due to multifactorial causes (Santos et al., 2020a,b) and new therapeutic approaches are thought-provoking and relevant. Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by *Paracoccidioides*, a complex of thermo-dimorphic fungal species comprising *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* (Teixeira et al., 2014), prevalent in Central and South America, (Martinez, 2015). Among Latin American countries, Brazil has the highest number of PCM cases (Martinez, 2017). This systemic mycosis is considered a public health problem and neglected disease (Martinez, 2010) that affects a large economically vulnerable population causing symptoms that threaten and compromise quality of life (Martinez, 2015). The infection risk factor is related to rural occupational activities (Shikanai-Yasuda, 2015).

Infection for *P. brasiliensis* occurs through the inhalation of conidia and mycelia fragments from the soil. The progression, symptomatology and the host immune response, as well as age, sex, nutritional status and fungal virulence should be taken into account in studying the gamut of clinical forms observed in PCM (Mendes et al., 2017). Studies about mechanisms involving phagocytic cells are essential to understand the pathogen-host relationship (Robinson et al., 2006). Polymorphonuclear cells (PMNs) are the first cells to be recruited to the site of fungal infection (Romani, 2004, 2011). It is now well documented in the literature that this cell population is able to perform phagocytosis of *P. brasiliensis*, but also play a role in modulating the immune response against this pathogen.

Some of the problems of PCM are an intense inflammatory response and the difficulty to provide an adequate therapy. The treatment is prolonged and often has adverse effects which lead to the interruption of therapy, which renders the discovery and development of new therapeutic alternatives urgent (Santos et al., 2020a,b). The antifungal drugs available for PCM are mostly fungistatic, and there is only one fungicidal drug, discovered more than 50 years ago. This can be partially explained by the difficulties arising from the similarity of fungi with eukaryotic organisms (Salazar et al., 2018). The main categories of antifungals for PCM are azoles, ergosterol inhibitors and polyenes (Mohr et al., 2008).

Brazil is the country with the highest biodiversity in the world (Bennet, 2001), and this wealth reflects in the extensive use of many natural products for a large range of diseases (Valli and Bolzani, 2019). Thus, natural products are very promising sources for identifying new antifungal agents and especially for treating PCM (Newman et al., 2016). The traditional use of propolis has been reported since circa 300 BC in mummification rituals, in the Middle-Ages to wash the newborn's umbilical cord, and in World War II for the treatment of wounds. Currently, it is used in the food and beverage industries, as well as in cosmetics, mouthwashes and toothpastes (Wagh, 2013). Propolis is particularly well accepted and traditionally employed for the treatment of many diseases due to its antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities, among others (Sforzin et al., 2016) and generally recognized as safe (GRAS) (El-Guendouz et al., 2018). Propolis is a resinous substance collected from different species of plants by *Apis mellifera* bees to seal and protect the hive against the adversities of weather and invasive agents such as microorganisms and insects (Sforzin et al., 2016).

Propolis is chemically composed by a variety of polyphenols such as flavonoids, phenolic acids and their esters (Banskota et al., 2000). However, this chemical composition varies according to local vegetation and biome in Brazil (Alencar et al., 2007). Our group classified 13 types of Brazilian propolis by physicochemical and biological activity methods (Park et al., 2000; Alencar et al., 2007) showing antibacterial, anti-cancer, antioxidant, anti-inflammatory and antifungal pharmacological activities (Sforzin, 2016).

Brazilian red propolis (BRP) is the last type (13) discovered by our group (Alencar et al., 2007). It is produced in the mangrove areas in the

northeastern region of Brazil from *Dalbergia ecastophyllum* plant resin (Silva et al., 2008). This type of propolis presents a unique chemical composition constituted by different kinds of isoflavonoids (such as vestitol, neovestitol, and others) and other compounds that present various biological activities such as antimicrobial, anti-cariogenic, anti-inflammatory, anti-angiogenic, anti-atherogenic, antioxidant, immunomodulatory and antiproliferative (Alencar et al., 2007; Franchin et al., 2016; Nani et al., 2018).

Although propolis is used in folk or traditional medicine as an antifungal for oral thrush or oral moniliasis, literature on its effects is scarce, being reported mainly against *Candida* spp. (Freires et al., 2016a,b; Nani et al., 2018). Antimycotic effect of propolis against isolates of the fungus *Malassezia pachydermatis* was described by Deegan et al. (2019), suggesting that this natural product, used in popular medicine, can potentially be used as a therapeutic agent. There is only one report in the literature that *P. brasiliensis* was affected by unspecific Propolis (Murad et al., 2002). The literature has no record of the action of Propolis on PCM or whether it acts stimulating the host's immune system or direct antifungal effect on *P. brasiliensis*. It also does not know which chemical compounds would be responsible for these actions.

Thus, we investigated *in vitro* the direct effect of Brazilian red propolis on *P. brasiliensis* and also the combined effect of BRP and the host's mechanisms of innate immunity using an *ex vivo* experimental model of paracoccidioidomycosis.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Brazilian red propolis obtention

BRP was collected under a georeferenced system by scraping the inside of the beehives of *Apis mellifera* bees located in the Maceio city, Alagoas State, Northeast of Brazil (9° 40' S, 35° 41' W). For access to the propolis sample, this research was registered under the number A305815, in the Brazilian National System Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (SisGen), according to Brazilian Law n° 13,123/2015.

### 2.2. Obtention of propolis extract and preparation of samples

The BRP sample (100 g) was extracted with ethanol 80% (v/v) (450 mL) in a water bath, at 70 °C, for 30 min. After extraction, the mixture was filtered and the ethanol evaporated under low pressure to obtain (58.5 g) the ethanolic extract of BRP (Alencar et al., 2007). The BRP extract was obtained into three concentrations: 50, 100 and 500 mg/mL, using DMSO (dimethylsulphoxide) 1:10 in culture media or PBS.

### 2.3. Reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)

The chemical composition of propolis extract was performed by RP-HPLC instrument equipped with a Shimadzu ODS-A column (RP-18, column size 4.6 × 250 mm; particle size 5 mm) and a photodiode array detector (SPD-M10AVp, Shimadzu Co.). The extract was filtered through a 0.22 µm filter (Millipore) prior to injecting 20-µL aliquots into the HPLC system. The column was eluted using a linear gradient of water (solvent A) and methanol (solvent B), starting with 40% and increasing to the concentration of 60% (45 min). The concentration was then held at 90% (45–75 min) before decreasing to 30% for solvent B (75–85 min), using a solvent flow rate of 1 mL/min and a diode array detector. Chromatograms were recorded at 260 nm, as described by Silva et al. (2008). The following authentic standards of phenolic acids and flavonoids (Extrasynthese Co.) were examined: formononetin, daidzein, biochanin A, neovestitol, vestitol, catechin, epicatechin, rutin, propyl gallate, ferulic acid and p-coumaric acid (de Sousa et al., 2007).

#### 2.4. Cultivation of *P. brasiliensis* and obtention of the inoculum for infection

Isolates of the highly virulent *P. brasiliensis* (Pb18) strain (Singer-Vermes et al., 1989) were used in all experiments. Leveduriform yeasts were grown at 35 °C in semi-solid Fava-Netto culture media (Fava-Netto, 1955), with subcultures made every 7 days. The fungal cells were washed with 0.9% sterile saline and centrifuged at 1300×g three times (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, NY, USA) and suspensions were prepared for inoculations. The viability of Pb18 cells was determined using the vital stain Janus Green B (Berliner and Reça, 1966). For inoculation, the yeast suspensions were adjusted to contain  $5 \times 10^6$  viable cells/mL.

#### 2.5. Animals and ethics

Female Swiss outbred mice were obtained from Federal University of Alfenas animal facilities. The animals were maintained in a controlled environment with 60–70% humidity, temperature at  $21 \pm 2$  °C, and 12/12 h light/dark cycles. Rodent chow and water were provided *ad libitum*. All experimental protocols were approved by the institutional Ethics Committee for Animals Use in Research (protocol 25/2018). The research was conducted in accordance with the internationally accepted principles for laboratory animal use and care. A total of 138 female Swiss mice, 6 weeks of age, and weighing approximately 25 g were used. In the *in vitro* experiment 4 groups with 6 mice each were used to obtain splenocytes cells. In the *ex vivo* experiments 4 groups were formed with 10 mice each. The *in vitro* assays were done in triplicate of two independent experiments and the *ex vivo* studies were done in triplicates.

#### 2.6. BRP antifungal activity - *In vitro* assay

In this assay the culture medium broth macrodilution technique was performed. For the antifungal susceptibility test, the fungal inoculum was prepared from colonies, adjusted according to the scale 0.5 of Macfarland in Falcon tubes ( $1.5 \times 10^8$  cells/mL) and cultured in Fava-Netto liquid medium, supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) for 72 h at 35 °C. The different concentrations of BRP (50, 100 and 500 mg/mL) were obtained by serial dilutions in Fava-Netto broth and were tested. The different concentrations of BRP were added to each Falcon tube containing Pb18 (only Pb18 = negative control). The tubes were cultivated at 35 °C, in a (Thoth 6420 B) shaker, under constant agitation for 72 h. At each incubation time (24, 48 and 72 h) a sample was taken and the viability of the fungal cells was determined by staining with Janus Green B vital dye. After the 72 h period the fungal suspension was centrifuged at 1780×g (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, NY, USA). The pellets were resuspended in PBS and seeded with a Dri-galski dispenser in Petri dishes containing BHI agar (HiMedia Laboratories, India) supplemented with 1% glucose, 30% growth factor mixture produced by other *P. brasiliensis* strain (Pb192) and 10% FBS, as described by Singer-Vermes et al. (1992). Fungal growth was allowed over a period of 12 days when individual colonies were counted to define CFU/mL (Colonies-Forming Units/mL).

#### 2.7. BRP antifungal activity - splenocytes culture assay

Six mice were anesthetized with a lethal dose of anesthetics (10% Ketamine Hydrochloride and 2% Xylazine solution) and the spleens were collected. The spleen cells were prepared by gently disrupting spleens using forceps in 5 mL of RPMI 1640 medium with L-glutamine (Sigma Aldrich, USA) and then isolated by centrifugation (500×g). The cell pellet was incubated for 4 min with red blood cells lysis buffer (one part of 0.17 mol/L Tris and one part of 0.16 mol/L ammonium chloride). The cells were washed again and suspended to a concentration of  $2 \times 10^6$  cells/mL in RPMI 1640 supplemented with 5% FBS and antibiotics (100 µg/mL Penicillin and 100 µg/mL Streptomycin). The cells were cultured in flat-bottomed 24-well plates (Corning) at  $2 \times 10^5$  cells/well

with medium for 24, 48 and 72 h, at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, and the incubator was humidified. The absolute number of cells in the Neubauer chamber was counted using Trypan Blue dye by 24, 48 and 72 h. After 72 h the cell culture was used for determination of effect analysis of the different concentrations of BRP (50, 100 and 500 mg/mL) using colorimetric MTT (tetrazolium) assay. On another plate the spleen cells were infected with 10 µL virulent isolate Pb18 at a concentration of  $5 \times 10^6$  yeast cells/ml and treated with the different concentrations of propolis (50, 100 and 500 mg/mL) and as negative control only cells without infection. The viability of splenic cells treated with the different concentrations of BRP and those infected with Pb18 and treated with propolis was assessed by performing a kinetics study for 24, 48 and 72 h of incubation using Trypan Blue dye. Also, the viability of the Pb18 fungus exposed to splenic cells and treated with different concentrations of propolis were also evaluated daily using the Janus Green B vital dye.

#### 2.8. Propolis antifungal activity - *ex vivo* assay

##### 2.8.1. Subcutaneous air pouch infection with *P. brasiliensis* (Pb18)

Mice were used to the subcutaneous air pouch infection model as described by Harmsen and Havell (1990) and modified by Meloni-Bruneri et al. (1996). An air pouch was produced in the dorsal region of mice by subcutaneous injection of 2 mL of sterile air, then 0.1 mL of the *P. brasiliensis* suspension ( $5 \times 10^6$  viable cells/mL). It was previously shown by our group that *P. brasiliensis* elicits a marked PMN recruitment *in vivo* after air pouch inoculation of the virulent Pb18 isolate in mice (Burger et al., 2015).

##### 2.8.2. *Ex vivo* experimental groups and treatment with BRP

The mice were divided into four groups (n = 10): group 1: mice infected with Pb18 (negative control); group 2: mice infected with Pb18 and treated with 50 mg/mL BRP; group 3: mice infected with Pb18 and treated with 100 mg/mL BRP; and group 4: mice infected with Pb18 and treated with 500 mg/mL BRP. The different BRP concentrations (50, 100 and 500 mg/mL) were administered subcutaneously in the air pouch formed by infection of a single dose at 0<sup>o</sup>, 9<sup>o</sup> and 10<sup>o</sup> days post-infection.

##### 2.8.3. Macroscopic analysis of air pouch

After the treatment period, immediately before the mice were sacrificed the macroscopic characteristics (diameter and volume) of the air pouches were analyzed, using a pachymeter to measure its length, width and height.

##### 2.8.4. Collection of samples: cells and supernatants

PMN were collected 10 days after the infection of the mice and were sacrificed as proposed by Burger et al. (2015). After a skin flap procedure was performed, the cells were collected and placed in sterile tubes with the help of a sterile glass Pasteur pipette and were subsequently dissociated by pipetting. The cells were then transferred and stored in Falcon tubes containing RPMI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) with 10% FBS (Sigma) and were kept refrigerated (2–6 °C) to be used for the subsequent experiments described below. The cells were quantified using a hemocytometer and their viability was assessed with 0.2% Trypan blue (Sigma). Following, the concentration was adjusted to  $1 \times 10^6$  cells/well. The cells were distributed in 24-well culture plates and incubated for 4, 6 and 18 h in a CO<sub>2</sub> incubator at 35 °C. After each incubation time the cells were collected and centrifuged for the collection of supernatant and pellet. The supernatants were used to determine the concentration of nitric oxide. The sediments were used to quantify viable Pb numbers, ROS quantification and stored at –80 °C for total protein concentration determination, according to Burger et al. (2015).

##### 2.8.5. Oxygen metabolites production analysis

The quantification of ROS (oxygen-reactive species) was carried out by chemiluminescence assays using the Luminol reagent. ROS capture was done by determining the integrated light emission for seconds. In



these assays, the cells were adjusted to  $5 \times 10^6$  cells/mL. Reading was performed using a luminometer (Promega-Glomag 20/20 Luminometer) and the chemiluminescent intensity was measured for 30 min (de Castro et al., 2020).

#### 2.3.6. Mitochondrial activity determination

PMN-rich suspension ( $5 \times 10^6$  cells/mL) was pipetted in a 96-well plate (Corning) and 20  $\mu$ L of 20% MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (Sigma)) was added. The plates were kept in a 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37 °C for 4 h. Thereafter supernatant was removed and 200  $\mu$ L of DMSO was added, and readings were taken at 540 nm (Smith et al., 1985).

#### 2.3.7. Quantification of nitric oxide (NO)

The concentration of nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) in cell culture supernatants was measured using the Griess reaction to determine the NO production (Griess, 1879).

#### 2.3.8. Metabolic activity of cells by protein quantification

Quantification of stored sediment proteins (2, 6 and 18 h) was performed using bicinchoninic acid (BCA) (Sigma). All samples were pipetted in triplicate and the results corresponding to the mean of the values obtained after blank (RPMI medium) subtraction from the values obtained with PMN cultured *ex vivo* with Pb18. The optical density readings were measured using an ELISA micro reader (Anthos Zenyth 200 rt) at a wavelength of 560 nm (Smith et al., 1985) and the results were expressed in  $\mu$ g protein/mL.

#### 2.3.9. Differential cell counts

In order to carry out the cellular differential count of the cells present in the air pouch, cell smears were done with the collected cellular exudates, fixed in air, and stained with May Ground Giemsa reagent.

#### 2.3.10. Quantification of viable *P. brasiliensis*

The material collected from the subcutaneous air pouches was immediately centrifuged at 1780 $\times$ g (5810 R Centrifuge, Eppendorf, NY, USA). The pellets were resuspended in 100  $\mu$ L PBS, and spread on Petri dishes. The experiments were performed in triplicate. The culture medium used in this procedure was BHI agar (HiMedia Laboratories, India) supplemented with 1% glucose, 30% growth factor as already described

(Singer-Vermees et al., 1992). The fungal growth on plates was allowed to take place over a period of 10 days, when a marker was used to highlight the colonies (CFU) which were quantified (Burger et al., 2015).

#### 2.9. Statistical analysis

Results were expressed as mean and standard deviation. The data variance was evaluated by ANOVA two-way analysis, followed by the Tukey post-test and ANOVA One-way analysis followed by the Tukey test for multiple comparisons. The results with p value < 0.05 will be considered statistically significant.

### 3. Results

#### 3.1. Chemical profile of BRP by RP-HPLC

The results of the RP-HPLC spectroscopy show the chemical composition of the BRP extract used (Fig. 1). The following constituents were identified: formononetin, vestitol, neovestitol, biochanin A, quercetin, liquiritigenin, isoliquiritigenin and daidzein. Among all these constituents, formononetin showed a higher concentration in this extract.

#### 3.2. *In vitro* direct effect of propolis on *P. brasiliensis* cultures

The effect of BRP at different concentrations was evaluated in *P. brasiliensis* cultures in order to analyze the effect of this extract as an antifungal agent. Fig. 2 shows three different parameters (2I, 2II, and 2III), and the analysis of each of them demonstrated that BRP at any concentration and time-point significantly affects Pb18 growth, as compared to the control group (p < 0.001).

Fig. 2I shows the kinetics of fungal growth in Fava-Netto medium at 24, 48 and 72 h in culture when no BRP was added. Although the absolute number of viable Pb18 fungal cells decays from 24 to 48 h,  $25 \times 10^6$  viable fungal cells still remain at 72 h, revealing high fungal viability even after this time of cultivation. However, when BRP was present in the culture (50–100 mg/mL), there was a significant reduction in the number of viable Pb18 in all time-points and with all concentrations in comparison to the culture without addition of BRP, that had only Pb18 (p < 0.001). When comparing the effect of different BRP concentrations

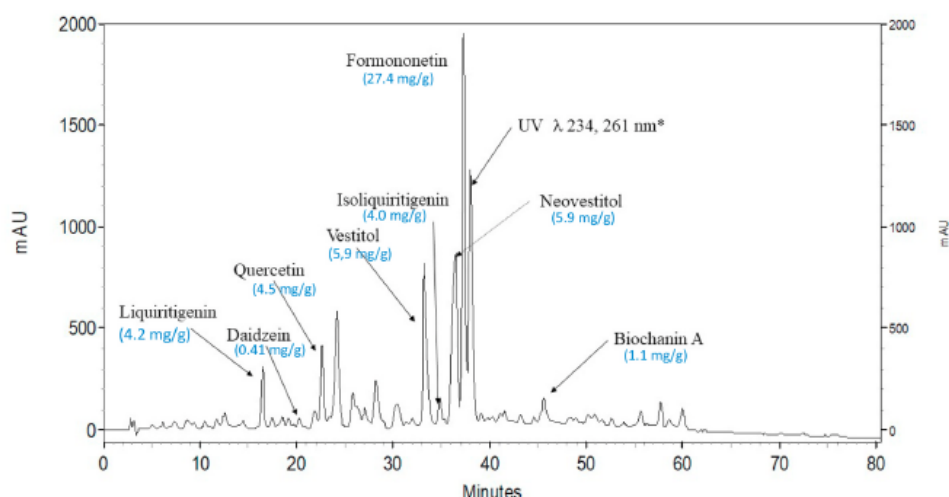


Fig. 1. HPLC chromatograms of ethanolic extract of the BRP. Formononetin, vestitol, neovestitol, biochanin A, quercetin, liquiritigenin, isoliquiritigenin and daidzein were the compounds identified. \*Major unidentified compounds represent only UV spectral absorption maximum (See Supplementary Fig. 1S).

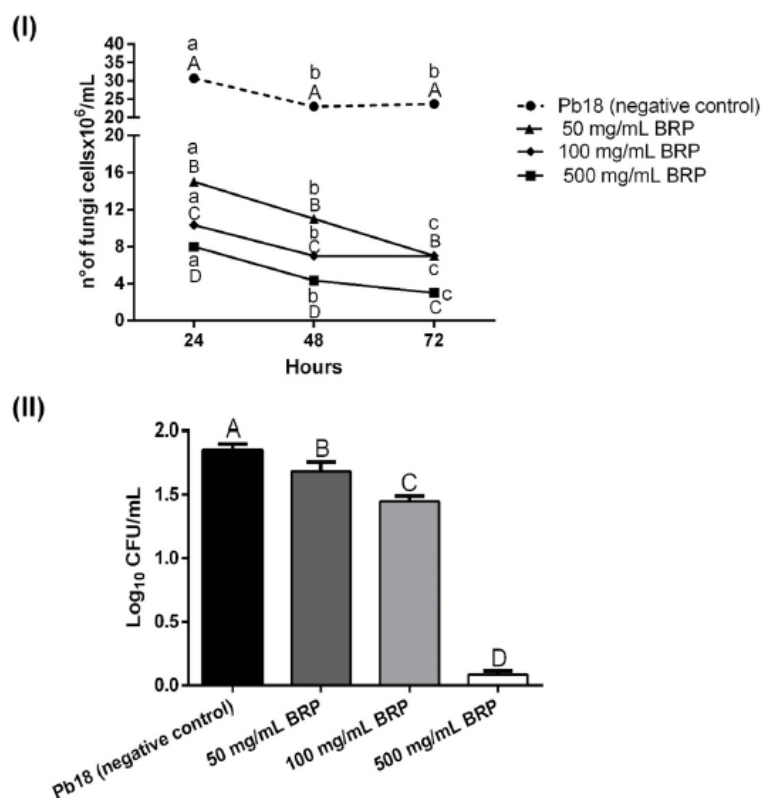


Fig. 2. *In vitro* effect of BRP on *P. brasiliensis* cultures. (I) - Kinetics of the absolute number of viable fungal cells treated with different concentrations of BRP *in vitro*. Different capital letters refer to vertical statistical analysis (different Treatments in a single Time) to values significantly different from each other ( $p < 0.01$ ). Different lower-case letters refer to the horizontal statistical analysis (different Times in a Single Treatment) to values significantly different from each other ( $p < 0.01$ ). (II) - Logarithm of colony-forming units (CFU)/mL of viable Pb18 in the evaluation after 72 h at concentrations of 50, 100, and 500 mg/mL BRP. Different capital letters refer to values significantly different from each other ( $p < 0.01$ ). Statistical analysis was performed using one-way and two-way analysis of variance, with Tukey's post-test.

and time-points, a clear dose-effect response was observed and the concentration of 500 mg/mL resulted in an extremely low number of viable *P. brasiliensis* ( $p < 0.05$ ) all time-points. The dose of 500 mg/mL presented higher antifungal activity at all analyzed times when compared to the other BRP concentrations and also to only Pb18.

The recovery of viable fungi after 72 h of cultivation was lower when 500 mg/mL was used ( $p < 0.001$ ) as shown quantitatively in Fig. 2III, and again, all test concentrations of BRP significantly differed from the Pb18 control group ( $p < 0.001$ ). Fig. 2III shows the dose/response effect of BRP on the number of viable Pb18, and almost negligible numbers of viable fungi at 72 h in culture, exposed to the 500 mg/mL BRP concentration ( $p < 0.001$ ).

The overall analysis of the results presented in Fig. 2 show very clearly that propolis has a direct antifungal effect on a virulent strain of *Paracoccidioides brasiliensis*.

### 3.3. BRP effect on splenocytes cultures

An eventual cytotoxic effect of BRP on splenocytes was analyzed and it was found that viability was not negatively affected and mitochondrial activity was enhanced.

In Fig. 3I, it can be seen that the percentage of splenocyte viability was not reduced; on the contrary the groups treated with BRP showed increased cell viability. Even after 72 h of cultivation, cell viability remained above 50% viable cells. The results show that the presence of BRP had no deleterious effect on viability of splenocytes.

The kinetics of the mitochondrial activity of these cells treated with the different concentrations of BRP was evaluated and is shown in

Fig. 3II. Surprisingly, we verified that BRP in the splenocytes culture exerted a remarked effect on enhancing mitochondrial activity and that the cells treated with the highest concentrations (100 and 500 mg/mL) of BRP presented the highest mitochondrial activity at different times of treatment ( $p < 0.001$ ). At 72 h, all concentrations of BRP (50–500 mg/mL) showed the same mitochondrial activity, which did not differ between them ( $p > 0.657$ ).

In order to verify the effect of splenocytes on *P. brasiliensis* yeast cells in the presence or absence of BRP, we performed a kinetics of culturing these cells with Pb18 and treated it with different concentrations of BRP. In Fig. 4 shows that spleen cells co-cultivated with Pb18 were unable to reduce the number of viable fungi at different culture times. However, when splenocytes were co-cultured with Pb18 in the presence of different concentrations of the BRP extract, the number of viable fungi decreased in a dose-dependent way, and the concentration of 500 mg/mL resulted in the lowest number of viable fungi when compared to the other groups from 24 to 72 h ( $p < 0.05$ ). BRP at 500 mg/mL reduced the viability of the fungus in 75% (at 24 h) and up to 92% (at 72 h) when compared with the control group.

### 3.4. Effect of propolis on *P. brasiliensis* using an *ex vivo* model

This set of experiments was designed to establish if BRP exerted a direct antifungal effect on *P. brasiliensis* as well as an activating effect on the cells of the immune system present in the subcutaneous air pouch in which BRP was added after mice subcutaneous infection with Pb18 following injection of sterile air. These experiments were performed only with groups of mice infected with Pb18 and treated with different

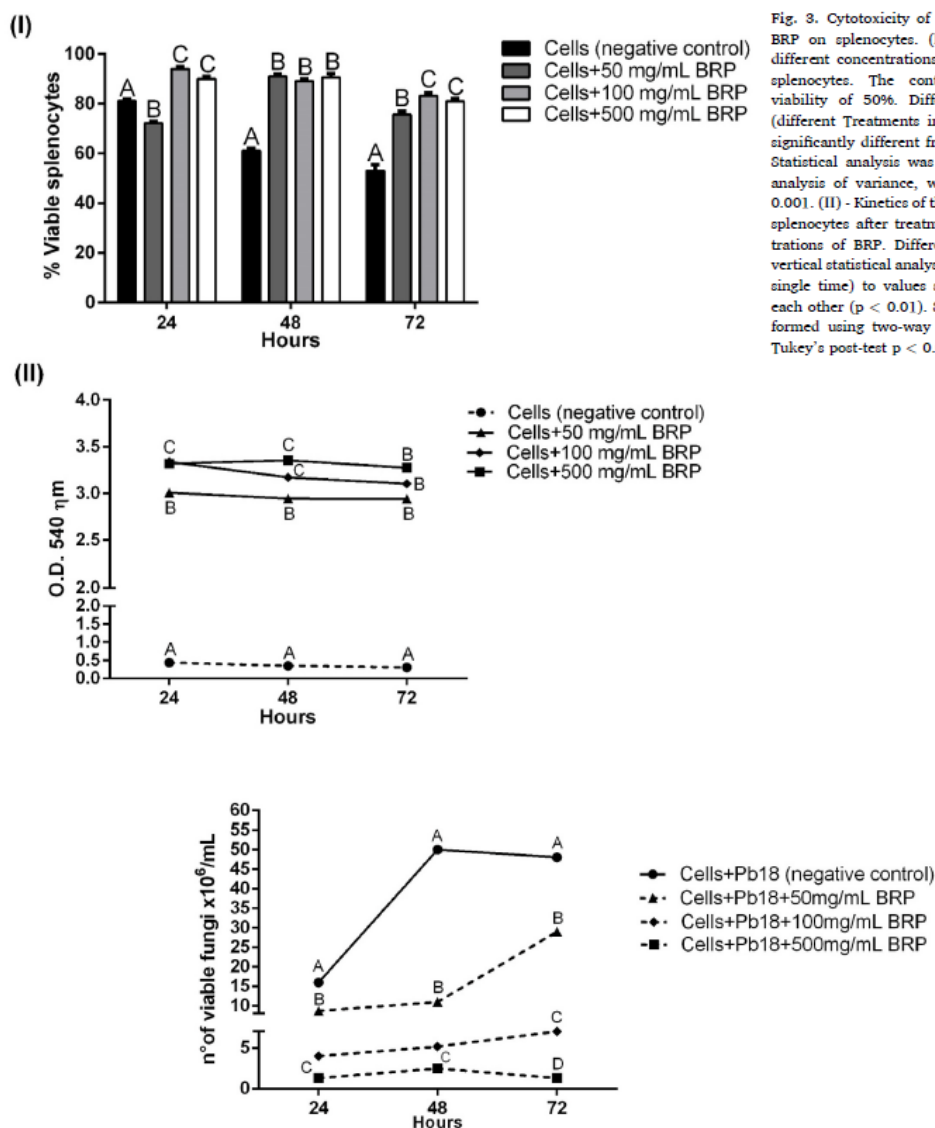


Fig. 3. Cytotoxicity of different concentrations of BRP on splenocytes. (I) - Cytotoxicity index of different concentrations of BRP on the culture of splenocytes. The continuous line indicates a viability of 50%. Different capital letters refer (different Treatments in a single Time) to values significantly different from each other ( $p < 0.01$ ). Statistical analysis was performed using two-way analysis of variance, with Tukey's post-test  $p < 0.001$ . (II) - Kinetics of the mitochondrial activity of splenocytes after treatment with different concentrations of BRP. Different capital letters refer to vertical statistical analysis (different treatments in a single time) to values significantly different from each other ( $p < 0.01$ ). Statistical analysis was performed using two-way analysis of variance, with Tukey's post-test  $p < 0.001$ .

Fig. 4. Cytotoxicity of different concentrations of BRP on splenocytes co-cultivated with Pb18. Kinetics of the number of viable Pb18 at different culture times and BRP concentrations. Different capital letters refer (different treatments in a single time) to values significantly different from each other ( $p < 0.01$ ). Statistical analysis was performed using two-way analysis of variance, with Tukey's post-test.  $p < 0.001$ .

concentrations of BRP, because the injection of sterile PBS without fungi into the air pouch resulted in no inflow of PMNs into the site.

Before collecting the air pouch cells the macroscopic aspects such as diameter and volume alterations were recorded and could be correlated with the presence of a larger cellular infiltrate, vascularization and edema. According to Fig. 5I the diameter of the air pouch was not influenced by the treatments with BRP extract as compared to those of the infected untreated mice. However, the highest concentration of BRP (500 mg/mL) significantly reduced the volume of air pouch, as shown in Fig. 5II ( $p < 0.001$ ).

We also collected and counted the cells present at the subcutaneous

air pouch in all experimental groups and evaluated if the BRP extract affected their composition and viability. That constituted the exudate present in the air pouch.

Fig. 6I shows that only mice that received the BRP at concentration of 500 mg/mL had a lower influx of cells than the Pb18 group ( $p < 0.001$ ). By evaluating the viability of the incoming cells to the air pouch (Fig. 6II), we showed that BRP had no deleterious effect at any used concentration, as cell viability remained always higher than 60% in all groups. ( $p > 0.49$ ). Differential counts data (Fig. 6III) show that the most abundant cell population present in the site of the subcutaneous infection are PMNs in all groups. The influx of PMNs in the control group and



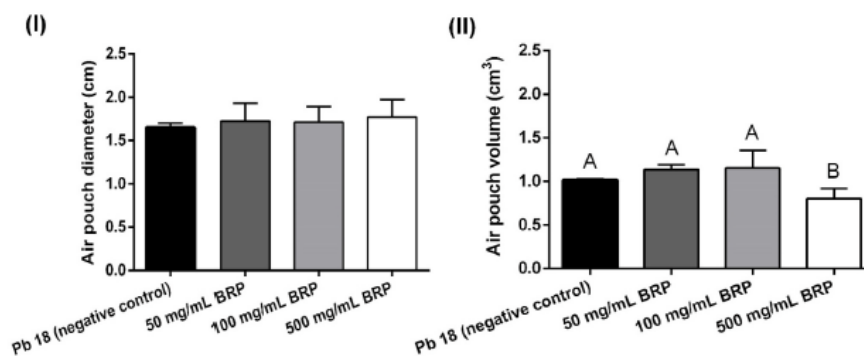


Fig. 5. Effect of BRP on the macroscopic characteristics of air-pouch infected with. (I) - Diameter of air-pouch infected with Pb18 and treated with different BRP concentrations. Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance with Tukey's post-test. (II) - Volume of air pouch infected with Pb18 and treated with different BRP concentrations. Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance with Tukey's post-test. Different capital letters refer to values significantly different from each other ( $p < 0.01$ ).

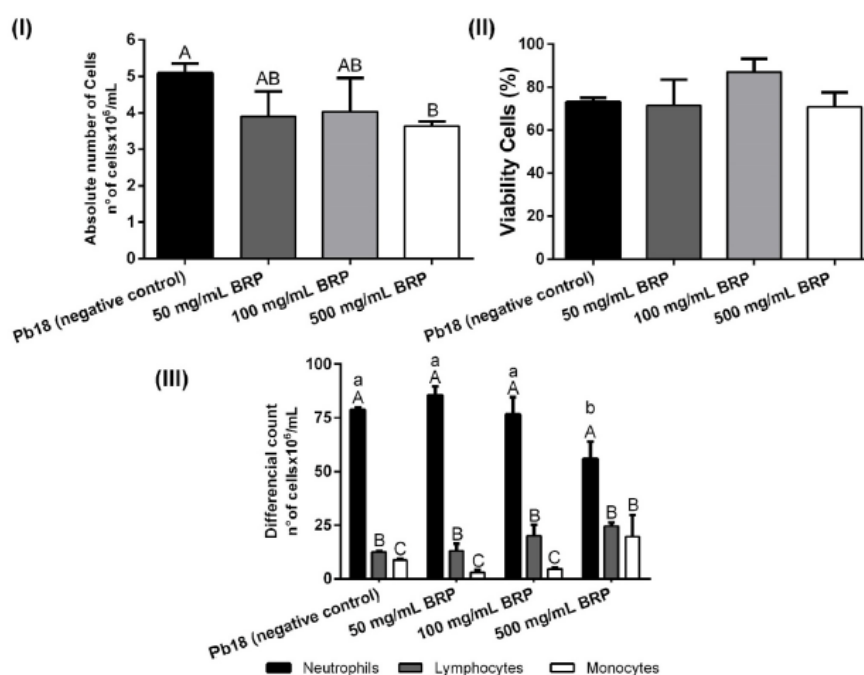


Fig. 6. Effect of different concentrations of BRP on the cellular exudate after subcutaneous infection by *P. brasiliensis*. (I) - Absolute Number of Cells. Different capital letters show statistical differences. Statistical analysis was performed using one-way and two-way analysis of variance with Tukey's post-test. (II) - Viability cells. No statistical difference was observed between the groups. Statistical analysis was performed using one-way and two-way analysis of variance with Tukey's post-test. (III) - Differential count of the cells present in the exudate. Different capital letters show statistical differences in intra-group (in the same treatment). Different lowercase letters show only statistical differences of neutrophils counting in between the experimental groups. Statistical analysis was performed using one-way and two-way analysis of variance with Tukey's post-test.

in those who received concentrations of 50 and 100 mg/mL BRP did not show any significant difference ( $p > 0.99$ ). The group receiving the concentration of 500 mg/mL had a significantly lower number of neutrophils in relation to the Pb18 group and also compared to the groups receiving concentrations of 50 and 100 mg/mL BRP.

An interesting observation was that although the number of neutrophils decreased in (in the 500 mg/mL BRP group), there was an

increase in the absolute number of monocytes and lymphocytes, but without statistical differences between the groups. This subtle change in the cellular profile with the decrease in neutrophils being compensated by an increase in the monocytes and lymphocytes present at the site of infection may suggest an anti-inflammatory effect of propolis.

We studied the release production of oxygen and nitrogen oxidative metabolism products in the presence or absence of BRP (Fig. 7 and

Fig. 2S in Supplementary material).

The groups treated with 100 or 500 mg/mL BRP at (Fig. 7) showed lower ROS production than the BRP group treated with 50 mg/mL and the control group ( $p < 0.01$ ). Fig. 2S (Supplementary material) shows the results of quantification of nitric oxide (NO) production in the air pouch PMN culture supernatant. There was no significant alteration in the NO production in infected mice as compared with those treated with different BRP concentrations ( $p > 0.59$ ).

The kinetics of total protein concentration after 2, 6- and 18-h of the air pouch PMN cultures sediments is shown in Fig. 3I. It is noted that the mice infected with Pb18 and not receiving BRP treatment had a stable total protein production during the different culture times. Those treated with 500 mg/mL BRP show a maximum peak of protein production at 2-h of cultivation as compared to the other times. Our results also show that protein production over 18 h was consistently higher for the groups that received BRP ( $p < 0.05$ ). The groups treated with 50 and 100 mg/mL BRP only had a higher concentration of protein than the control group after 6- and 18-h, respectively ( $p < 0.05$ ).

Regarding mitochondrial activity of air pouch cells present in the exudate according to Fig. 3II it can be observed that in the group of mice treated with 500 mg/mL BRP the cells had a higher mitochondrial activity in relation to those from mice only infected with Pb18 or treated with 50 and 100 mg/mL BRP ( $p < 0.01$ ).

Taken together, the results presented in Figs. 7 and 8 show that propolis was able to activate PMN.

Fig. 9 shows that this activation resulted in a striking increase of the antifungal effect on *P. brasiliensis*. The results show a remarkable antifungal activity in the subcutaneous air pouches in which BRP was present. It is noteworthy that significant antifungal activity was found in all concentrations tested. It is also remarkable that there is a very marked dose-response effect. Finally, it must be brought to attention that especially the highest concentration of BRP (500 mg/mL) strikingly reduces the numbers of viable *P. brasiliensis* in an order of at least  $7 \log_{10}$  CFU/g in relation to the control group - Pb18 ( $p < 0.001$ ). Whether this effect is due to a direct effect of BRP on *P. brasiliensis* or it is a result of the activation of PMNs by propolis or even if this antifungal activity is the result of the combined effects of these two phenomena will be discussed next.

#### 4. Discussion

Immune response plays an important role in controlling the infectious process and the exacerbated inflammatory response that occur in

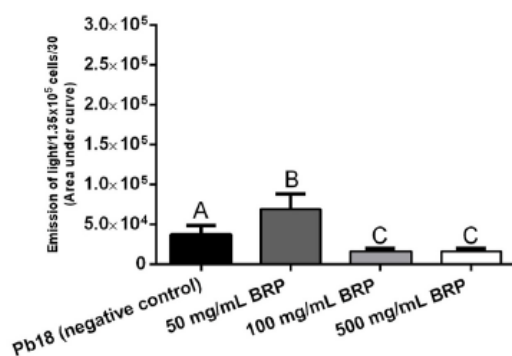


Fig. 7. Quantification of oxygen metabolites after infection with Pb18 in the subcutaneous air-pouch and treated with different concentrations of BRP. Production of oxygen-reactive species (ROS) of the cells obtained from air-pouches. Different capital letters show statistical differences. Statistical analysis was performed using one-way and two-way analysis of variance, with Tukey's post-test.

paracoccidioidomycosis. Neutrophils recruitment produces an initial inflammatory reaction, as well as the first wave of fungicidal cells during the innate immune response (Benard, 2005). Recently it was shown that this cell population is also responsible for the adequate activation of the acquired immunity, by the involvement of the right subset of T lymphocytes and their cytokine products in order to develop an effective protective response (Yarzabal, 1971).

PMN plays an important role in antifungal activity through the production of oxygen metabolites when these cells are stimulated by inflammatory cytokines (Brummer and Stevens, 1984). In experimental models it was shown that neutrophils from resistant mice are more effective than those of susceptible mice in terms of activation status and antifungal activity (Meloni-Bruneri et al., 1996). However, in PCM patients, PMN function was shown to be impaired (Goihman-Yahr et al., 1980), and studies aiming to reverse this PMN malfunctioning are incipient (Dahlgren et al., 2007). Our group has proposed Low-level LASER therapy (LLLT) to revert these inadequate neutrophils activity, using the same subcutaneous air pouch model of *P. brasiliensis* infection as here described. LLLT was able to improve the activation of these neutrophils cells and to reduce the number of viable fungi (Burger et al., 2015).

As already mentioned in introduction, there are studies that report the anti-inflammatory (Barros et al., 2007), immunomodulatory (Sartori et al., 2012) and antimicrobial (Sforzin et al., 2000; Silva et al., 2013) properties of Brazilian propolis. A new variety of Brazilian propolis, red propolis (Park et al., 2002), has isoflavonoids in its composition (Alencar et al., 2007) as well as vestitol and neovestitol, which revealed antioxidant potential and anti-inflammatory activity (Bueno-Silva et al., 2013) in acute and chronic inflammation models (Franchin et al., 2016) can be a potential therapeutic resource in the treatment of PCM.

The present study showed a chemical profile of BRP similar to others already described in the literature with the same georeferencing and having isoflavones such as formononetin, vestitol, neovestitol and isoliquiritigenin as biomarkers for biological activities (Fig. 1).

Considering the chemical profile of BRP, that shows that formononetin is present in the highest concentrations in our sample, we may consider the possibility that this compound is responsible for some of the biological effects that we identified in the present work. We showed remarkable antimicrobial and anti-inflammatory activities of BRP, as shown by the results of absolute number of cells and viable fungi. This compound is a member of the 7-hydroxyisoflavone class which has phytoestrogen function. Paracoccidioidomycosis is 11 times more prevalent in men than in women (Shankar et al., 2011) and this can be explained by the fact that hormone estrogen inhibits the transition from mycelial to yeast-like form (Restrepo et al., 1997). Therefore, it is intriguing that one of the main components of BRP belongs to this family, although the present investigation was done using the yeast-like form of *P. brasiliensis*, and not the mycelial form that has to undergo mycelia to yeast transformation (Restrepo A., et al., 1984).

On the other hand, shown to be able to decrease the concentration of proteoglycans and reduce the expression of enzymes, such as matrix metalloproteinase (MMP-13, MMP-1 and MMP-3 in an experimental model of osteoarthritis (Cho et al., 2019). Nishikaku et al. (2009) demonstrated induction of MMPs, mainly MMP-9 but also of MMP-2 in experimental murine paracoccidioidomycosis. Employing immunohistochemical techniques, they found MMP-9 expressed in the fungi as well as in various host cells (macrophages, multinucleated giant cells, lymphocytes) present at granulomatous lesions. The induction of these proteases by *P. brasiliensis* infection would favor the dissemination of the fungus. If formononetin, a major component of propolis, has the property of reducing the expression of MMP, it is strongly suggestive that BRP could hamper fungal dissemination and therefore add another protective mechanism to its array of actions. In the present study, we confirmed the data of Meloni-Bruneri et al. (1996) that the most abundant cell population in the inflammatory process within air pouches are PMNs (Fig. 6III). The present study is the first one in the literature

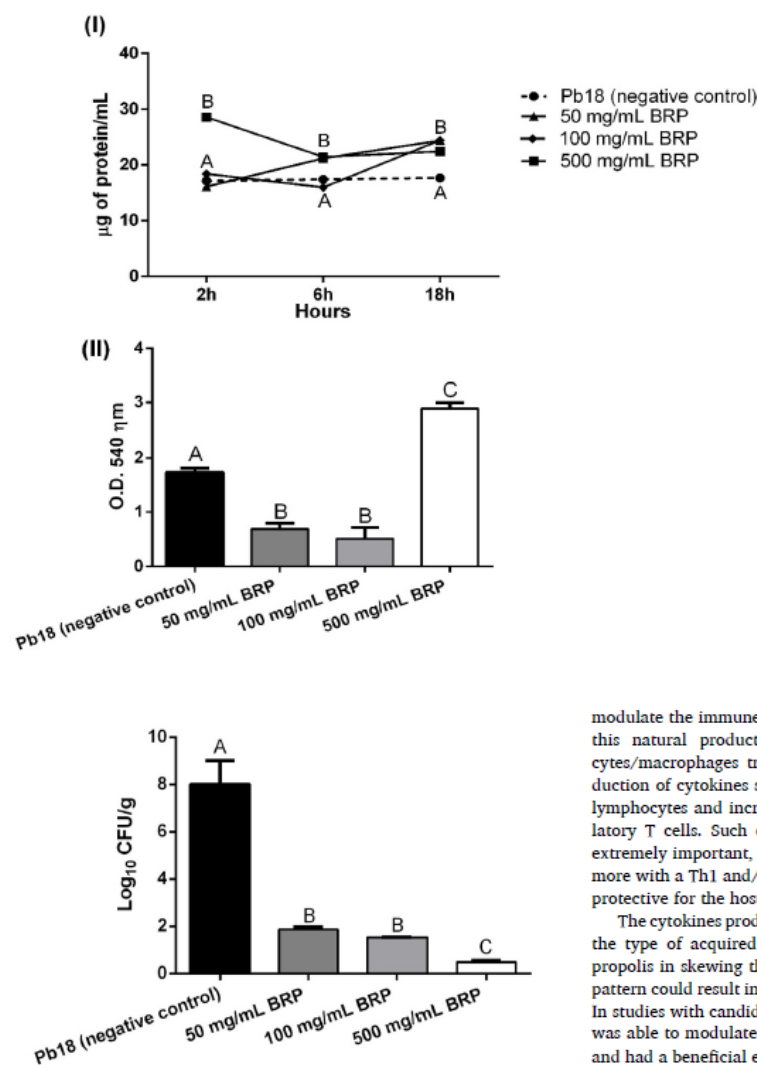


Fig. 9. Antifungal effect of the cells presents in the exudate in the subcutaneous air pouch after infection with Pb18 in and treatment with different concentrations of BRP. Viable cells were counted for a period of 7 and 12 days. Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance, with Tukey's post-test. Different capital letters refer to values significantly different from each other ( $p < 0.05$ ).

showing that the host's defense cellular profile in the acute inflammation due to *Paracoccidioides* local inoculation in the air pouches in the presence of BRP is also constituted predominantly by PMN the is reported in the literature for the first time. Interestingly, although still being the most abundant cell, fewer PMNs were recruited to the injury site (Fig. 6) when the highest dose of BRP was employed, thus suggesting an interesting anti-inflammatory effect.

The study with these cells allows us to understand the immunological aspects of PCM. In patients affected by this mycosis, they have these immunocompetent cells and a Th2 immune response profile (Almeida et al., 2017). Other authors have demonstrated the ability of BRP to

Fig. 8. Quantification of protein and mitochondrial activity of the cells present in the exudate after infection with Pb18 by subcutaneous air-pouch method and treated with different concentrations of BRP. (I) - Determination of protein of cells obtained from air-pouch. Different capital letters refer (different Treatments in a single Time) to values significantly different from each other ( $p < 0.05$ ). Statistical analysis was performed using one-way and two-way analysis of variance, with Tukey's post-test. (II) - Quantification of mitochondrial activity of the PMN obtained from air-pouch. Different capital letters refer to values significantly different from each other ( $p < 0.01$ ). Statistical analysis was performed using one-way and two-way analysis of variance, with Tukey's post-test.

modulate the immune response in other types of cell lines treated with this natural product. Anorge et al. (2003) showed that monocytes/macrophages treated with BRP were able to suppress the production of cytokines secreted by Th1 (IL-1 $\beta$  and IL-12) and Th2 (IL-4) lymphocytes and increased the production of TGF- $\beta$  secreted by regulatory T cells. Such effects of modulating the immune response are extremely important, as they would be conferring an immune response more with a Th1 and/or Th17 profile and not Th2, which in PCM is not protective for the host (Calich and Kashino, 1998).

The cytokines produced during the innate immunity deeply influence the type of acquired immune response that develops. The effect of propolis in skewing the immune response towards a TGF- $\beta$  dominated pattern could result in impaired immune response (Anorge et al., 2003). In studies with candidiasis Fatahnia et al. (2012) showed that propolis was able to modulate levels of cytokines such as TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL2 and had a beneficial effect on the pathogenesis of systemic candidiasis. In the studies by Amarante et al. (2012) propolis showed anti-inflammatory activity in human mononuclear cells of patients with leishmaniasis. In which, propolis was able to modulate the expression of CCL5 and IFN- $\gamma$ .

Employing two different experimental designs, we were able to demonstrate the absence of cytotoxicity towards host cells (spleen cells and neutrophils at the subcutaneous air pouch) as shown in Fig. 3I and Fig. 6II). On the contrary, BRP elicited high mitochondrial activity in the splenocytes, suggesting that it has a booster effect on the metabolism of PMNs present in this organ (Fig. 8II). We also found that BRP promoted activation of PMN at the subcutaneous injection site (Fig. 8I and Fig. 8II). Therefore, exposure to BRP activates PMNs and consequent enhancement of fungal elimination by the host. The results presented here are unprecedented, as the literature describes studies carried out only with macrophages (Murad et al., 2002) and not with PMNs.

Classical studies have shown that although PMN is able to ingest *P. brasiliensis*, the functioning of this cell population is impaired in paracoccidioidomycotic patients (Dias et al., 2008). As the initial participation of an effective PMN population is important to the



favorable outcome after *P. brasiliensis* infection (as it has been shown that the PMN from resistant mice are more effective than PMN from susceptible mice (Meloni-Bruneri et al., 1996) it is of the uttermost importance to revert this PMN impairment. There is very scarce data in the literature regarding this. Burger et al. (2015) were able to activate PMN in experimental PCM using LLLT. But this is the first report in the literature of reversion of this impairment by compounds present in natural substances such as BRP.

Regarding the antifungal properties of BRP, by means of *in vitro* tests we evaluated its activity on *P. brasiliensis* and found that BRP has strong antifungal activity against *P. brasiliensis* (Fig. 4), especially at the highest concentration (500 mg/mL). BRP demonstrated a remarkably increased antifungal activity of the PMN in the subcutaneous exudate in the air pouch infected with *P. brasiliensis* (Fig. 9). The BRP in all tested concentrations reduced the number of viable fungal cells recovered, and it was much lower than those recovered from the non-treated infected controls (Fig. 2I). Moreover, the BRP exerted a dose-response effect on *P. brasiliensis* (Fig. 2I). According to Silva et al. (2013) the neovestitol and vestitol compounds that are present in our present BRP study, showed antimicrobial and anti-inflammatory activity at even lower concentrations than those of our experimental conditions. Therefore, the results of antifungal activity that we found could be attributed to the presence of these constituents in BRP.

The antimicrobial and anti-inflammatory activities could be due to either an activating effect of BRP on the cells present at the site of the infection or to a direct effect of the BRP on *P. brasiliensis* yeast cells (Fig. 9). In addition, the direct antifungal effect of the BRP extract was observed both *in vitro* and *ex vivo* experiments (Fig. 2II and Fig. 9). Also, the marked mitochondrial activation achieved with the 500 mg/mL concentration of BRP extract (Fig. 8II) speaks in favor of both, direct antimicrobial effect and host immunomodulatory defense. There is only one previous report on activation of cells from the immune response with propolis. Murad (2002) found indication of enhanced antifungal activity of peritoneal macrophages stimulated with propolis and co-cultivated with *P. brasiliensis*.

Recent studies evaluating propolis antimicrobial and anti-inflammatory activity Berretta et al. (2020) describes the promising results of the use of propolis in the treatment of COVID-19. Such authors describe that propolis can interfere with the invasion of the host cell by SARS-CoV-2 and block pro-inflammatory PAK1, a kinase highly expressed in patients with COVID19 (Silveira et al., 2021). Thammasit et al. (2018), also, showed unprecedented results on the effects of propolis on *Cryptococcus neoformans*, which causes an infection similar to PCM. Propolis showed potent inhibition of the cell viability of *C. neoformans* and decreased expression of virulence factors. The research group by das Das-Neves et al. (2016) also showed the antifungal activity of propolis on *Candida albicans*. Such results demonstrate that formononetin compounds isolated in higher concentration in propolis inhibited the growth of 12 strains of *C. albicans*. All of these results of antimicrobial and anti-inflammatory activity corroborate the results of this study.

We can argue that treatment with 500 mg/mL BRP resulted in a low EROS production by neutrophils because the propolis probably killed the fungus directly, rendering further EROS production unnecessary. The BRP, also, acted as an antioxidant activity protecting PMN cells, because propolis alone had EROS reduction activity (Freires et al., 2016a,b). In addition, the compound isolated in this BRP such as formononetin, neovestitol, vestitol, biochanin A, quercetin, liquiritigenin, isoliquiritigenin, and daidzein where are very strong antioxidants associated with an anti-inflammatory activity that can improve the PMN cell protective effect (Park et al., 2016; Bueno-Silva et al., 2015; Lee et al., 2009). As observed in Supplementary Fig. 2S, BRP showed protection from cellular homeostasis, since the production of nitric oxide was not significant, since some compounds such as isoliquiritigenin can inhibit proinflammatory activity and induction of inducible nitric oxide (iNOS) (Kim et al., 2008). As observed in our results, this compound is

present in the BRP used in this study.

BRP elicited quantitative and qualitative changes in cell inflow kinetics (PMN) at the site of infection (Fig. 6III) lymphocytes and monocytes incoming are accelerated by BRP, signaling an earlier activation of the acquired immune response, thus favoring the mounting of an efficient response mediated by cellular immunity. The tendency change in the cell profile could suggest that there was a controlled inflammatory response when BRP is present. This is very important for a favorable outcome of infection by *Paracoccidioides*, as it is known that some of the immunopathological aspects of this mycoses an oversized inflammatory response (Bernard, 2008). Franchin et al. (2016) showed that the neovestitol present in BRP was able to diminish acute and chronic inflammation in LPS-stimulated peritonitis reducing the neutrophils migration and release of CXCL1/KC and CXCL2 *in vivo*. Thus, it can be suggested that this constituent of the extract could be acting in the control of inflammation. Therefore, BRP both controls the excessive inflammatory response which is many times the responsibility of severe clinical manifestations of paracoccidioidomycosis.

Therefore, our data strongly suggests that BRP extract, at a concentration of 500 mg/mL has four concomitant beneficial effects at the site of infection: to activate neutrophils which are essential cells in the innate immunity, thus leading towards an effective protective immunity; to exert effective direct antifungal activity, to downregulate the excessive inflammatory reaction developed after *P. brasiliensis* infection and to hinder fungal dissemination.

This is the first description of the *ex vivo* interaction of propolis, cells from the immune system and *P. brasiliensis* during subcutaneous infection and also the first suggestion of the components responsible for each one of the above-mentioned positive effects regarding the outcome of experimental paracoccidioidomycosis.

## 5. Conclusion

Our data strongly suggests that BRP extract, mainly at a concentration of 500 mg/mL has four concomitant beneficial effects in experimental paracoccidioidomycosis: to exert direct antifungal activity on *P. brasiliensis*, to activate neutrophils which are essential cells in the innate immunity, thus leading towards an effective acquired immunity, to hamper fungal dissemination reducing matrix metalloprotease expression and to control excessive inflammatory reaction. Our results may suggest that the active components of BRP involved in those activities would be formononetin in reducing the expression of MMP and vestitol and neovestitol as antifungal compounds.

These combined four important activities of Brazilian red propolis, added to its non-toxicity to the host cells, suggest a promising potential for use in the treatment of PCM. We propose in the future, clinical studies of BRP therapy concomitantly with traditional therapy for this systemic mycosis and, further in the future, the synthesis of compounds present in BRP to enrich the arsenal of chemical compounds to treat this severe mycosis.

## Declaration of competing interest

All authors declare that they have no conflict of interest.

## Acknowledgements

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (APQ 012941-16), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Process 2019/11248-0), and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (for Burger, E. 309917/2020-4, for Rosalen, P.L. 306673/2019-3, and for Alencar S.M. 307893/2016-2). Grisolia, J.C. was and Santos, L.A. is recipient of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES, Finance Code 001) scholarships. Nascimento, B.J.G. is recipient of Fundação de Amparo à Pesquisa do

Estado de Minas Gerais scholarship (FAPEMIG). The authors would like to thank the beekeeper Reginaldo Lira for supplying the red propolis.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114181>.

#### Authors' contributions

(For each author the contribution to the publication should be mentioned).

1. Authors: Santos, L.A.; Dias, N.A.; Grisolia, J.C.; Gomes, B.J.N. and Blossfeld-Lopes, L. They were responsible for the laboratory work involving all the aspects of *Paracoccidioides* and propolis interaction and for compiling the data so obtained.
2. Author: Rosalen, P.L. He was responsible for the overall analysis of the data as well as collaborated with the final redaction, helped by Santos, L.A. His experience with propolis and his participation were essential for the completion of the manuscript.
3. Author: Alencar, S.M. He was responsible for the characterization of the chemical profile of Brazilian red propolis.
4. Author: Ikegaki, M. He was responsible for the obtention, purification and characterization of the Brazilian red propolis samples used throughout the experiments as well as for the acquisition of competence to deal with this product during the experiments.
5. Author: Burger, E. She was the responsible for the original project as well as for obtention of the financing for its execution. She is or was the supervisor of Santos, L.A.; Dias, N.A.; Grisolia, J.C.; Gomes, B.J. N. and Blossfeld-Lopes, L. She was involved in all the phases that led to the completion of the manuscript.

#### References

- Alencar, S.M., Oldoni, T.L.C., Castro, M.L., Cabral, I.S., Costa-Neto, C.M., Cury, J.A., Rosalen, P.L., Ikegaki, M., 2007. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *J. Ethnopharmacol.* 113, 278–283. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.06.005>.
- Almeida, F.A., Neves, F.F., Mora, D.J., Reis, T.A., Sotini, D.M., Ribeiro, B.M., Andrade-Silva, L.E., Nascences, G.N., Ferreira-Paim, K., Silva-Vergara, M.L., 2017. Paracoccidioidomycosis in Brazilian patients with and without human immunodeficiency virus infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 96, 368–372. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0254>.
- Amarante, M.K., Watanabe, M.A., Conchon-Costa, I., Fiori, L.L., Oda, J.M., Bufalo, M.C., Sforzini, J.M., 2012. The effect of propolis on CCL5 and IFN- $\gamma$  expression by peripheral blood mononuclear cells from leishmaniasis patients. *J. Pharm. Pharmacol.* 64 (1), 154–160. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2011.01385.x>.
- Ansoorge, S., Reinhold, D., Lendeckel, U., 2003. Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF- $\beta$ 1 production of human immune cells. *Zeitschrift für Naturforschung C* 58 (7–8), 590–599. <https://doi.org/10.1515/znc-2003-7-823>.
- Banskota, A.H., Tezuka, Y., Adnyana, I.K., Midorikawa, K., Matsushige, K., Message, D., Huertas, A.A.G., Kadota, S., 2000. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, The Netherlands and China. *J. Ethnopharmacol.* 72, 239–246. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(00\)00252-x](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(00)00252-x).
- Barros, M.P.de, Sousa, J.P.B., Bastos, J.K., de Andrade, S.F., 2007. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. *J. Ethnopharmacol.* 110 (3), 567–571. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.10.022>.
- Benard, G., 2008. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 165 (4–5), 209–221. <https://doi.org/10.1007/s11046-007-9065-0>.
- Bennet, J.E., 2001. Antimicrobial agents: antifungal agents. In: Hardman, J.G., Limbird, L.E. (Eds.), Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, tenth ed. McGraw-Hill, New York.
- Berliner, M.D., Recca, M.E., 1966. Vital staining of *Histoplasma capsulatum* with Janus green B. *Sabouraudia* 5, 25–29.
- Berretta, A.A., Silveira, M.A.D., Córdor Capcha, J.M., De Jong, D., 2020. Propolis and its potential against SARS-CoV-2 infection mechanisms and COVID-19 disease: running title: propolis against SARS-CoV-2 infection and COVID-19. *Biomed. Pharmacother.* 131, 110622. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110622>.
- Brummer, E., Stevens, D.A., 1984. Activation of murine polymorphonuclear neutrophils for fungicidal activity with supernatants from antigen-stimulated immune spleen cell cultures. *Infect. Immun.* 45 (2), 447–452. <https://doi.org/10.1128/IAI.45.2.447-452.1984>.
- Bueno-Silva, B., Alencar, S.M., Koo, H., Ikegaki, M., Silva, G.V., Napimoga, M.H., Rosalen, P.L., 2013. Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from Brazilian red propolis. *J. Agric. Food Chem.* 15 (19), 61, 4546–50. <https://doi.org/10.1021/jf305468f>.
- Bueno-Silva, B., Kawamoto, D., Ando-Sugimoto, E.S., Alencar, S.M., Rosalen, P.L., Mayer, M.P., 2015. Brazilian red propolis attenuates inflammatory signaling cascade in LPS-activated macrophages. *PLoS One* 10 (12), e0144954. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144954>.
- Burger, E., Mendes, A.C.S.C., Bani, G.M.A.C., Brigagão, M.R., Santos, G.B., Malaquias, L. C., Chavasco, J.K., Verinaud, L.M., de Camargo, Z.P., Hamblin, M.R., Sperandio, F.F., 2015. Low-level laser therapy to the mouse femur enhances the fungicidal response of neutrophils against *Paracoccidioides brasiliensis*. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 9 (2), e0003541. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003541>.
- Calich, V.L.G., Kashino, S.S., 1998. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31 (5), 615–623. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x1998000500003>.
- Cho, I.A., Kim, T.H., Lim, H., Park, J.H., Kang, K.R., Lee, S.Y., Kim, C.S., Kim, D.K., Kim, H.J., Yu, S.K., Kim, S.G., Kim, J.S., 2019. Formononetin antagonizes the interleukin- $\beta$ -induced catabolic effects through suppressing inflammation in primary rat chondrocytes. *Inflammation* 42 (4), 1426–1440. <https://doi.org/10.1007/s10753-019-01005-1>.
- Dahlgren, C., Karlsson, A., Bylund, J., 2007. Measurement of respiratory burst products generated by professional phagocytes. *Methods Mol. Biol.* 412, 349–363. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-467-4\\_23](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-467-4_23).
- Das-Neves, M.V., da Silva, T.M., Lima, E. de O., da Cunha, E.V., Oliveira, E. de J., 2016. Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida* sp. *Braz. J. Microbiol.* 47 (1), 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.009>.
- de Castro, M.S., Miyazawa, M., Nogueira, E.S.C., Chavasco, J.K., Brancaglion, G.A., Cerdeira, C.D., Nogueira, D.A., Ionta, M., Hanemann, J.A.C., Brigagão, M.R.P.L., Sperandio, F.F., 2020. Photobiomodulation enhances the Th1 immune response of human monocytes. *Laser Med. Sci.* 6. <https://doi.org/10.1007/s10103-020-03179-9>.
- de Sousa, J.P., Bueno, P.C., Gregório, L.E., da Silva Filho, A.A., Furtado, N.A., de Sousa, M.L., Bastos, J.K., 2007. A reliable quantitative method for the analysis of phenolic compounds in Brazilian propolis by reverse phase high performance liquid chromatography. *J. Separ. Sci.* 30 (16), 2656–2665. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700228>.
- Deegan, K.R., Fonseca, M.S., Oliveira, D.C.P., Santos, L.M., Fernandez, C.C., Hanna, S.A., Machado, B.A.S., Umza-Guez, M.A., Meyer, R., Portela, R.W., 2019. Susceptibility of *Malassezia pachydermatis* clinical isolates to allopathic antifungals and Brazilian Red, Green, and Brown Propolis extracts. *Front Vet Sci* 13 (6), 460. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00460>.
- Dias, M.F., Mesquita, J., Filgueira, A.L., De Souza, W., 2008. Human neutrophils susceptibility to *Paracoccidioides brasiliensis*: an ultrastructural and cytochemical assay. *Med. Mycol.* 46 (3), 241–249. <https://doi.org/10.1080/13693780701824411>.
- El-Guendouz, S., Aazza, S., Lyoussi, B., Majdoub, N., Bankova, V., Popova, M., Raposo, S., Antunes, M.D., Miguel, M.G., 2018. Effect of poplar-type propolis on oxidative stability and rheological properties of O/W emulsions. *Gaudi Pharmaceut. J.* 26 (8), 1073–1082. <https://doi.org/10.1016/j.gsjps.2018.05.017>.
- Fatahnia, M., Khosravi, A.R., Shokri, H., 2012. Propolis efficacy on TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL2 cytokines production in old mice with and without systemic candidiasis. *J. Mycol. Med.* 22 (3), 237–242. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2012.05.004>.
- Fava-Netto, C., 1955. Estudos quantitativos sobre a fixação do complexo na blastomicose sul-americana, com antígeno polissacarídico. *Arq. Cir. Clin. Exp.* 18, 1997–254.
- Franchin, M., Colón, D.F., da Cunha, M.G., Castanheira, F.V., Saraiva, A.L., Bueno-Silva, B., Alencar, S.M., Cunha, T.M., Rosalen, P.L., 2016. Neovestitol, an isoflavonoid isolated from Brazilian red propolis, reduces acute and chronic inflammation: involvement of nitric oxide and IL-6. *Sci. Rep.* 6, 36401. <https://doi.org/10.1038/srep36401>.
- Freires, I.A., Queiroz, V.C.P.P., Furlletti, V.F., Ikegaki, M., de Alencar, S.M., Duarte, M.C. T., Rosalen, P.L., 2016a. Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against *Candida* spp. *J. Mycol. Med.* 26 (2), 122–132. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.01.003>.
- Freires, I.A., de Alencar, S.M., Rosalen, P.L., 2016b. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. *Eur. J. Med. Chem.* 3 (110), 267–279. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.01.033>.
- Gothman-Yahr, M., Pine, L., Albornoz, M.C., Yarzabal, L., de Gomez, M.H., San Martín, B., Oceano, A., Molina, T., Convit, J., 1980. Studies on plating efficiency and estimation of viability of suspensions of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. *Mycopathologia* 71 (2), 73–83. <https://doi.org/10.1007/BF00440612>.
- Griess, J.P., 1879. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 12, 426.
- Harmen, A.G., Havell, E.A., 1990. Roles of tumor necrosis factor and macrophages in lipopolysaccharide-induced accumulation of neutrophils in cutaneous air pouches. *Infect. Immun.* 58, 297–302. <https://doi.org/10.1128/IAI58.2.297-302.1990>.
- Kim, J.Y., Park, S.J., Yun, K.J., Cho, Y.W., Park, H.J., Lee, K.T., 2008. Isoiquiritigenin isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* inhibits LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the attenuation of NF- $\kappa$ B in RAW 264.7 macrophages. *Eur. J. Pharmacol.* 584, 175–184. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.01.032>.
- Lee, S.H., Kim, J.Y., Seo, G.S., Kim, Y.C., Sohn, D.H., 2009. Isoiquiritigenin, from *Dalbergia odorifera*, up-regulates anti-inflammatory heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages. *Inflamm. Res.* 58 (5), 257–262. <https://doi.org/10.1007/s0011-008-8183-6>.



- Martinez, R., 2010. Paracoccidiodomycosis: the dimension of the problem of a neglected disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 43 (4), 480. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822010000400034>.
- Martinez, R., 2015. Epidemiology of paracoccidiodomycosis. *Rev. Inst. Med. Trop.* 57, 11–20. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000700004>.
- Martinez, R., 2017. New trends in paracoccidiodomycosis epidemiology. *J. Fungi* 3, 1–13. <https://doi.org/10.3390/jof3010001>.
- Meloni-Brumeri, L.H., Campa, A., Abdalla, D.S., Calich, V.L., Lenzi, H.L., Burger, E., 1996. Neutrophil oxidative metabolism and killing of *P. brasiliensis* after air pouch infection of susceptible and resistant mice. *J. Leukoc. Biol.* 59, 526–533. <https://doi.org/10.1002/jlb.59.4.526>.
- Mendes, R.P., Cavalcante, R.de S., Marques, S.A., Marques, M.E.A., Venturini, J., Sylvestre, T.F., Paniago, A.M.M., Pereira, A.C., da Silva, J.de F., Fabro, A.T., Bosco, S.de M.G., Bagagli, E., Hahn, R.C., Levorato, A.D., 2017. Paracoccidiodomycosis: current perspectives from Brazil. *Open Microbiol. J.* 11 (1), 224–282. <https://doi.org/10.2174/1874285801711010224>.
- Mohr, J., Johnson, M., Cooper, T., Lewis, J.S., Ostrosky-Zeichner, L., 2008. Current options in antifungal pharmacotherapy. *Pharmacotherapy* 28 (5), 614–645. <https://doi.org/10.1592/phco.28.5.614>.
- Murad, J.M., Calvi, S.A., Soares, A.M.V.C., Bankova, V.S., Sforzin, J.M., 2002. Effects of Propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidiodomycosis brasiliensis*. *J. Ethnopharmacol.* 79, 331–334.
- Nani, B.D., Franchin, M., Lazarini, J.G., Freires, I.A., da Cunha, M.G., Bueno-Silva, B., de Alencar, S.M., Murata, R.M., Rosalen, P.L., 2018. Isoflavonoids from Brazilian red propolis down-regulate the expression of cancer-related target proteins: a pharmacogenomic analysis. *Phytother. Res.* 32 (4), 750–754. <https://doi.org/10.1002/ptr.6016>.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., 2016. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* 25 (79), 629–661. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>.
- Park, Y.K., Ikegaki, M., Alencar, S.M., Moura, F.F., 2000. Honeybee Sci. 21, 85.
- Park, Y.K., Alencar, S.M., Aguiar, C.L., 2002. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J. Agric. Food Chem.* 24 (50), 2502–2506. <https://doi.org/10.1021/jf011432b>.
- Park, S.M., Lee, J.R., Ku, S.K., Cho, L.J., Byun, S.H., Kim, S.C., Park, S.J., Kim, Y.W., 2016. Isoliquiritigenin in licorice functions as a hepatic protectant by induction of antioxidant genes through extracellular signal-regulated kinase mediated NF-E2-related factor-2 signaling pathway. *Eur. J. Nutr.* 55 (8), 2431–2444. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-1051-6>.
- Restrepo, A., Salazar, M.E., Cano, L.E., Stover, E.P., Feldman, D., Stevens, D.A., 1984. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidiodomycosis brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidiodomycosis. *Infect. Immun.* 46, 346–353. <https://doi.org/10.1128/IAI.46.2.346-353.1984>.
- Restrepo, A., Salazar, M.E., Clemons, K.V., Feldman, D., Stevens, D.A., 1997. Hormonal influences in the host-interplay with *Paracoccidiodomycosis brasiliensis*. 125–133. In: Stevens, D.A., Vanden-Bosche, H., Odds, F. (Eds.), *Topics in Fungal Infections*. National Foundation for Infectious Diseases, Bethesda, MD.
- Robinson, M.J., Sanchez, D., Slack, E.C., LeibundGut-Landmann, S., Reis e Sousa, C., 2006. Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nat. Immunol.* 7, 1258–1265. <https://doi.org/10.1038/ni1417>.
- Romani, L., 2004. Immunity to fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 1–23. <https://doi.org/10.1038/nri1255>.
- Salazar, F., Brown, G.D., 2018. Antifungal innate immunity: a perspective from the last 10 years. *J. Innate Immun.* 10, 1–25. <https://doi.org/10.1159/000488539>.
- Santos, L.A., Grisolia, J.C., Burger, E., de Araujo Paula, F.B., Dias, A.L.T., Malaquias, L.C.C., 2020a. Virulence factors of *Paracoccidiodomycosis brasiliensis* as therapeutic targets: a review. *Antonie Leeuwenhoek*. <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01382-5>.
- Santos, L.A., Grisolia, J.C., Malaquias, L.C.C., Paula, F.B.A., Dias, A.L.T., Burger, E., 2020b. Medication association and immunomodulation: an approach in fungal diseases and in particular in the treatment of paracoccidiodomycosis. *Acta Trop.* 206, 105412. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105412>.
- Sartori, G., Pesarico, A.P., Pinton, S., Dobrachinski, F., Roman, S.S., Pauletto, F., Rodrigues Jr., L.C., Prigol, M., 2012. Protective effect of brown Brazilian propolis against acute vaginal lesions caused by herpes simplex virus type 2 in mice: involvement of antioxidant and anti-inflammatory mechanisms. *Cell Biochem. Funct.* 30 (1), 1–10. <https://doi.org/10.1002/cbf.1810>.
- Sforzin, J.M., 2016. Biological properties and therapeutic applications of propolis. *Phytother. Res.* 30 (6), 894–905. <https://doi.org/10.1002/ptr.5605>.
- Sforzin, J.M., Fernandes Jr., A., Lopes, C.A.M., Bankova, V., Funari, S.R.C., 2000. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.* 73 (1–2), 243–249. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00320-2](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00320-2).
- Shankar, J., Restrepo, A., Clemons, K.V., Stevens, D.A., 2011. Hormones and the resistance of women to paracoccidiodomycosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 24 (2), 296–313. <https://doi.org/10.1128/CMR.00062-10>.
- Shikanai-Yaruda, M.A., 2015. Paracoccidiodomycosis treatment. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 57, 31–37. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000700007>.
- Silva, B.B., Rosalen, P.L., Cury, J.A., Ikegaki, M., Souza, V.C., Esteves, A., Alencar, S.M., 2008. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. *Evid. base Compl. Alternative Med.: eCAM* 5 (3), 313–316. <https://doi.org/10.1093/ecam/nem059>.
- Silva, B.B., Alencar, S.M., Koo, H., Ikegaki, M., Silva, G.V., Napimoga, M.H., Rosalen, P.L., 2013. Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from Brazilian red propolis. *J. Agric. Food Chem.* 15 (19), 41546–50. <https://doi.org/10.1021/jf305468f>.
- Silveira, M.A.D., De Jong, D., Berretta, A.A., Galvão, E.B.D.S., Ribeiro, J.C., Cequeira-Silva, T., Amorim, T.C., Conceição, L.F.M.R.D., Gomes, M.M.D., Teixeira, M.B., Souza, S.P.D., Santos, M.H.C.A.D., San Martin, R.L.A., Silva, M.D.O., Lirio, M., Moreno, L., Sampaio, J.C.M., Mendonça, R., Uitchak, S.S., Amorim, F.S., Ramos, J.G.R., Batista, P.B.P., Guarda, S.N.F.D., Mendes, A.V.A., Passos, R.D.H., 2021. Efficacy of Brazilian green propolis (EPP-AF®) as an adjunct treatment for hospitalized COVID-19 patients: a randomized, controlled clinical trial. *Biomed. Pharmacother.* 138, 111526. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111526>.
- Singer-Vermes, L.M., Ciavaglia, M.C., Kashino, S.S., Burger, E., Calich, V.L., 1992. The source of the growth-promoting factor(s) affects the plating efficiency of *Paracoccidiodomycosis brasiliensis*. *J. Med. Vet. Mycol.* 30, 261–264. <https://doi.org/10.1080/02681219200000331>.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenn, D.C., 1985. *Anal. Biochem.* 150 (1), 76–85.
- Teixeira, M.M., Theodoro, R.C., Nino-Vega, G., Bagagli, E., Felipe, M.S., 2014. *Paracoccidiodomycosis* species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. *PLoS Pathog.* 10 (10), e1004397. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004397>.
- Thammasit, P., Iadnut, A., Mamoon, K., Khacha-Ananda, S., Chupradit, K., Tayapiwatana, C., Kasinreuk, W., Tragoolpua, Y., Tragoolpua, K., 2018. A potential of propolis on major virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. *Microb. Pathog.* 123, 296–303. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.07.028>.
- Valli, M., Bolzani, V.S., 2019. Natural products: perspectives and challenges for use of Brazilian plant species in the bioeconomy. *An Acad. Bras. Ciências* 91 (Suppl. 3).
- Wagh, V.D., 2013. Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. *Advances in Pharmacological Sciences* 308249. <https://doi.org/10.1155/2013/308249>.
- Yarzabal, L.A., 1971. Anticuerpos precipitantes específicos de la blastomycosis sudamericana revelados por inmunoelectroforesis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 13 (5), 320–327.



## Virulence factors of *Paracoccidioides brasiliensis* as therapeutic targets: a review

Lauana Aparecida Santos · Julianne Caravita Grisolia · Eva Burger ·  
 Fernanda Borges de Araujo Paula · Amanda Latércia Tranches Dias ·  
 Luiz Cosme Cotta Malaquias

Received: 17 September 2019 / Accepted: 26 December 2019  
 © Springer Nature Switzerland AG 2020

**Abstract** Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*. The disease requires long and complicated treatment. The aim of this review is to address the fungal virulence factors that could be the target of the development of new drugs for PCM treatment. Virulence factors favoring the process of fungal infection and pathogenicity are considered as a microbial attribute associated with host susceptibility. *P. brasiliensis* has some known virulence factors which are 43 kDa glycoprotein (gp 43) which is an important fungal antigen, 70 kDa glycoprotein (gp 70), the carbohydrates constituting the fungal cell wall  $\alpha$ -1,3, glucan and  $\beta$ -1,3-glucan, cell adhesion molecules and the presence of melanin pigments. The discovery and development of drugs that interact with these factors, such as inhibitors of  $\beta$ -1,3-glucan, reduced synthesis of gp 43, inhibitors of melanin production, is of great importance for the treatment of PCM. The study of virulence factors favors the understanding of pathogen–host relationships, aiming to evaluate the possibility of developing new therapeutic targets and mechanisms that these molecules play in the infectious process, favoring the design of a more specific treatment for this disease.

**Keywords** *Paracoccidioides brasiliensis* · Virulence factors · Therapeutics targets

### Paracoccidioidomycosis

Fungal infections have increased dramatically in the past decades. The systemic dimorphic fungi represent a family of several phylogenetically related ascomycetes: *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Penicillium* spp., *Sporothrix* spp. and *Paracoccidioides* spp. (Klein and Tebbets 2007; Oliveira et al. 2014; Zhou et al. 2014; Rousseaux 2017; Hrycyk et al. 2018). An endemic systemic mycosis of great interest to Latin America, paracoccidioidomycosis (PCM), is caused by the thermo-dimorphic fungus species of the *Paracoccidioides* complex. To date, the genus *Paracoccidioides* have been reported as constituted by two species: *Paracoccidioides lutzii*, compose of a single monophyletic population so far found in Central West of Brazil and present in Ecuador, and *Paracoccidioides brasiliensis*, which comprises a complex of at least four cryptic species, namely, S1 (present in Southeast and Central West of Brazil, as well as Argentina), PS2 (found in Southeast Brazil and Venezuela), PS3 (restricted to Colombia), and PS4 (only found in Venezuela) (Teixeira et al. 2014). The existence of genetically distinct evolutionary lineages within *P.*

L. A. Santos · J. C. Grisolia · E. Burger ·  
 F. B. de Araujo Paula · A. L. T. Dias ·  
 L. C. C. Malaquias (✉)  
 Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Brazil  
 e-mail: luizcosme@hotmail.com



## Virulence factors of *Paracoccidioides brasiliensis* as therapeutic targets: a review

Lauana Aparecida Santos · Julianne Caravita Grisolia · Eva Burger ·  
 Fernanda Borges de Araujo Paula · Amanda Latércia Tranches Dias ·  
 Luiz Cosme Cotta Malaquias

Received: 17 September 2019 / Accepted: 26 December 2019  
 © Springer Nature Switzerland AG 2020

**Abstract** Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*. The disease requires long and complicated treatment. The aim of this review is to address the fungal virulence factors that could be the target of the development of new drugs for PCM treatment. Virulence factors favoring the process of fungal infection and pathogenicity are considered as a microbial attribute associated with host susceptibility. *P. brasiliensis* has some known virulence factors which are 43 kDa glycoprotein (gp 43) which is an important fungal antigen, 70 kDa glycoprotein (gp 70), the carbohydrates constituting the fungal cell wall  $\alpha$ -1,3, glucan and  $\beta$ -1,3-glucan, cell adhesion molecules and the presence of melanin pigments. The discovery and development of drugs that interact with these factors, such as inhibitors of  $\beta$ -1,3-glucan, reduced synthesis of gp 43, inhibitors of melanin production, is of great importance for the treatment of PCM. The study of virulence factors favors the understanding of pathogen–host relationships, aiming to evaluate the possibility of developing new therapeutic targets and mechanisms that these molecules play in the infectious process, favoring the design of a more specific treatment for this disease.

**Keywords** *Paracoccidioides brasiliensis* · Virulence factors · Therapeutics targets

### Paracoccidioidomycosis

Fungal infections have increased dramatically in the past decades. The systemic dimorphic fungi represent a family of several phylogenetically related ascomycetes: *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Penicillium* spp., *Sporothrix* spp. and *Paracoccidioides* spp. (Klein and Tebbets 2007; Oliveira et al. 2014; Zhou et al. 2014; Rousseaux 2017; Hrycyk et al. 2018). An endemic systemic mycosis of great interest to Latin America, paracoccidioidomycosis (PCM), is caused by the thermo-dimorphic fungus species of the *Paracoccidioides* complex. To date, the genus *Paracoccidioides* have been reported as constituted by two species: *Paracoccidioides lutzii*, compose of a single monophyletic population so far found in Central West of Brazil and present in Ecuador, and *Paracoccidioides brasiliensis*, which comprises a complex of at least four cryptic species, namely, S1 (present in Southeast and Central West of Brazil, as well as Argentina), PS2 (found in Southeast Brazil and Venezuela), PS3 (restricted to Colombia), and PS4 (only found in Venezuela) (Teixeira et al. 2014). The existence of genetically distinct evolutionary lineages within *P.*

L. A. Santos · J. C. Grisolia · E. Burger ·  
 F. B. de Araujo Paula · A. L. T. Dias ·  
 L. C. C. Malaquias (✉)  
 Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Brazil  
 e-mail: luizcosme@hotmail.com



*brasiliensis* was demonstrated through analysis of DNA sequence data for multiple genes. Recently, the species PS2, PS3, and PS4 are reclassified being known as *P. americana* (PS2), *P. restrepiensis* (PS3), and *P. venezuelensis* (PS4) (Hrycyk et al. 2018).

Commonly found in South and Central America, is a common cause of disease in Brazil, Venezuela, Colombia, Ecuador, Peru and Paraguay (Martinez 2015). Brazil presents the highest number of PCM cases among the Latin American countries, with PCM predominantly occurring in the southern, southeastern and midwestern regions (Martinez 2017). Infection occurs through the inhalation of conidia and mycelia fragments from the soil and is predominant in rural workers. Once inhaled, the conidia advance to the pulmonary alveoli, where they settle, convert into the yeast phase and constitute the primary complex. By lymphohematogenous dissemination the fungus can spread to any site in the organism (Martinez 2017). Two distinct forms of PCM disease can be observed: an acute or juvenile form that occurs in young people of either sex and seems to evolve more rapidly once the primary infection occurs, and a chronic or adult form, that occurs mainly in male individuals, with a characteristic prolonged period of latency, that in some well documented cases, can reach as long as 30–40 years (Mendes et al. 2017). Millions of individuals may be infected worldwide, but only a small percentage actually develops the disease (Armstrong-James et al. 2017). In Brazil, it is estimated that it ranges from 10 to 30 cases per million inhabitants and the average mortality rate is 1.4 deaths per million inhabitants (De Almeida et al. 2017). In Colombia, there is a lower incidence that varies from year to year, but on average 2.4 cases per million inhabitants (Calle et al. 2001; Martinez 2015, 2017; Giacomazzi et al. 2016).

The effects of climate as well as rapid and significant socio demographic and economic changes currently taking place in Brazil and the intense immigration flows may lead to the emergence of PCM as a problem of public health in the receptor regions (Martinez 2015). In addition, PCM patients frequently exhibit other diseases, including tuberculosis, carcinomas, enteroparasitosis, pulmonary infections, AIDS, leishmaniosis, leprosy, Chagas disease and other mycosis (Teles and Martins 2011). The most affected age group is located between 30 and 50 years of age and over 90% of cases are males. Individuals

affected by this fungus usually are in the most productive period of life, therefore the disease leads to social and economic impact (Mendes et al. 2017). As PCM is much more common in men than in women, it was suggestive that the hormonal milieu of the host might have an influence on *P. brasiliensis* and somehow affect its pathogenicity. The female hormone 17-beta-estradiol is related to the inhibition of transition from the mycelial fungus for yeast. Studies have been conducted to understand the effects of this hormone on growth and budding fashion *P. brasiliensis* yeast. It is known that there is no evidence that this hormone acts on the growth of the yeasts, but affects their replication process. The binding of hormone to the receptor is unknown, but studies suggest that estradiol binding protein (EBP) may be involved in this process (Aristizábal et al. 2002). The exact places and conditions where the fungus occurs in nature are also not yet determined. Several indirect evidences indicate that the saprobic form may occur in restricted soil conditions, producing infective propagule such as arthroconidia and aleuroconidia that cause primary infection in the lung by the airborne route (Mendes et al. 2017). The association between *P. brasiliensis* and the nine-banded armadillo (*D. novemcinctus*) was first observed in animals obtained from the Amazon region; a finding that has been confirmed by several other research groups in Brazil (Bagagli et al. 1998).

The gold standard for diagnosing PCM is either the direct visualisation of characteristic multiple-budding cells in biological fluids and tissue sections, or fungus isolation from clinical specimens. Serological tests are useful for diagnosis, severity assessment and follow-up, especially the double agar gel immunodiffusion test (DID) (Sylvestre et al. 2014). The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) test has been the subject of a number of publications in regard to the detection of circulating antibodies in PCM patients, although it has not been included in most clinical laboratories (De Camargo 2008). Molecular methods allow for confirming the etiology of disease through the identification of DNA fragments specific to *P. brasiliensis*, with no need to culture the fungus (Gomes et al. 2000). Nested PCR was employed to detect *P. brasiliensis* DNA fragments through the use of primers derived from the gene that encodes gp43 and detection of a 196-base pair (bp) sequence (Bialek et al. 2000). The use of 5.8S and 28S ribosomal genes and intergenic regions of *P. brasiliensis* (Pb01) were

amplified and sequenced; these products were able to distinguish *P. brasiliensis* from other pathogenic fungi on PCR (Motoyama et al. 2000). A PCR assay that employed primers derived from the gene that encodes gp43 was able to detect *P. brasiliensis* DNA in sputum 366 and in the sputum and CSF of patients (San-Blas et al. 2005). By the other hand, study assessed sera from patients with suspected PCM by means of conventional PCR using primers for the ITS1 ribosomal DNA of *P. brasiliensis* showed that this technique was not effective for detecting *P. brasiliensis* DNA in serum (Dias et al. 2012). Rocha-Silva et al. (2018) use quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) through target amplification of the gene encoding the recombinant protein Pb27, a common protein to the both species *P. brasiliensis* and *P. lutzii*, showed sensitivity of 94%, specificity of 100% and accuracy 97%, demonstrating that it is feasible to develop a new fast and safe diagnostic PCM.

With regard to treatment, the pharmacological measures consist in administration of antifungals with effect on *P. brasiliensis* (Shikanai-Yasuda et al. 2017). The choice of drug to be administered depends on various conditions, as clinical severity, prior history of therapeutic resistance, ability to gastrointestinal absorption, the drug association with comorbidities and adherence to treatment. *P. brasiliensis* is susceptible to the most antifungal agents including sulfonamides, azoles (ketoconazole, fluconazole, itraconazole, posaconazole, voriconazole) and amphotericin B, however the treatment is many months long and often requires hospitalization as will be described later. *P. brasiliensis* may reactivate despite of an effective treatment because a quiescent focus could be reactivated leading to the disease relapse (Menezes et al. 2006; Shikanai-Yasuda et al. 2017; Mendes et al. 2017).

### Epidemiology

PCM has a restricted geographic distribution, being prevalent in Central America and from South of Mexico to Argentina. In this way, the endemicity areas are in the tropics of Cancer and Capricorn. Epidemiology studies have been applied to elucidate the prevalence of infection in Brazil and in other Latin American countries. Literature reports say that the distribution of PCM is not homogeneous within a given country, but focuses on areas in which

environmental conditions favor the survival and growth of this fungus, thus facilitating human exposure (Martinez 2015). Selective environmental conditions favor the expression of virulence factors (e.g.: polysaccharide capsule, melanin production, and phospholipase, etc). Such virulence factors favor both survival in the host and in the external environment (Casadevall 2007; Camacho and Niño-Vega 2017). A high rate of endemicity of PCM in an area may be related to the geological and climatic conditions that favor the adaptation of the fungus beyond the agricultural activities that facilitate the exposure to the fungus (Mendes et al. 2017). Precipitation also favors keeping the soil moist for several months of the year, which should stimulate the growth of this microorganism (Rodrigues-Vendramini et al. 2018). In Brazil, it is estimated that it ranges from 10 to 30 cases per million inhabitants and the average mortality rate is 1.4 deaths per million inhabitants (Marques 2012). In Colombia, there is a lower incidence that varies from year to year, but on average 2.4 cases per million inhabitants (Calle et al. 2001).

In Brazil, the regional distribution of PCM is heterogeneous. Prevalent in the states of Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso and Amazônia. There has been an increase in recent years in reported cases in the Midwest and North, suggesting that this is due to the advance of agricultural activities in the Amazon. The prevalence of PCM-disease is not established, since most of the Brazilian states the disease is not notified. Epidemiological studies in endemic regions using the intradermal test with paracoccidioidin shows a prevalence between 11.0 and 43.8% similar in both sexes. In adults, there is a ratio of 5.4 to 10 men for each woman, but in the child population, this does not occur. Using the intradermal test with paracoccidioidin in Colombia, the prevalence of sensitization was around 77% of the population in certain rural areas. In Venezuela, prevalence ranged from 10.2 to 19.7%. In Argentina, it presents a rate of 1.6 to 10.2%. The mortality rate is about 1.45: 1,000,000 individuals, making it the eighth leading cause of mortality among chronic infectious and parasitic diseases. The lethality rate is between 2 and 23%, reaching 30% if associated with AIDS. The social and economic costs are high. Paracoccidioidomycosis affects individuals in the productive phase and secondary consequences may prevent



patients from returning to their original work permanently (Marques 2012).

### Treatment

Described by Adolfo Lutz in 1908 the treatment of PCM until the 1940s did not have appropriate therapeutic agents, in this way was considered as a fatal disease. From 1940 some therapeutic agents have been used and presenting promising results. Drugs available today are sulfonamides (including cotrimoxazole), amphotericin B deoxycholate, ketoconazole, and triazole derivatives (itraconazole, fluconazole, voriconazole). The first to be used in the treatment were the sulfanilamides being used until the present day. The combination sulfamethoxazole-trimethoprim (cotrimoxazole) is used in severe forms in children. Another option is amphotericin B used in severe forms in adults, children and adolescents, but presenting side effects to treatment. This drug is used in the intravenous formulation until remission of the disease (Shikanai-Yasuda et al. 2017; Mendes et al. 2017).

Imidazoles and triazoles were discovered in the mid-1970s, showing therapeutic success. It can be found in oral formulations and easy administration. They have few side effects. Oral itraconazole is recommended in mild or moderate forms of this mycosis. Itraconazole in studies has proved to be 100 times more active in vitro against *P. brasiliensis* than ketoconazole. Voriconazole also a second-generation triazole derivative in studies has proven to be as effective as itraconazole but has been reported to be less safe. Another alternative is fluconazole, which is used when liver enzymes are high and when there is hypersensitivity to sulfas or amphotericin B and in cases of neuro-PCM. Some countries have fluconazole, voriconazole and itraconazole in the intravenous form (Shikanai-Yasuda et al. 2017).

Usually the treatment is long lasting and cure is obtained through the patient remaining in treatment and monitoring using clinical parameters such as radiological and serological. Early diagnosis and appropriate therapy are determinants for a good prognosis. It is worth noting that nutritional monitoring, non-consumption of alcoholic beverages and smoking are important non-pharmacological measures that aid in the treatment (Shikanai-Yasuda et al. 2017; Mendes et al. 2017).

Although chemotherapy stands as the basic treatment of PCM, therapeutic vaccination with fungal antigens or passive transfer of specific monoclonal antibodies may boost the cell immune response and add to the protective effect of chemotherapy, eventually counteracting relapsing disease and reducing fibrotic sequels. Antigens of *P. brasiliensis*, such as gp43 or P10, depend on IFN- $\gamma$  for their protective activity (Travassos and Taborda 2012). Tests were conducted in order to evaluate its capacity to induce a protective response against the antigen; they have shown that aid in clinical improvement of the patient. The chemotherapy and the vaccination may prevent the disease from worsening.

### Virulence factors

Understanding the complex concept of virulence is imperative. The early pathogen-centered view of virulence states that it is an intrinsic and invariable microbial characteristic. Experimental evidence has shown the importance of the host immune response in the outcome of host–pathogen interactions (Casadevall and Pirofski 2003). Virulence is considered a microbial attribute strongly associated to the host susceptibility. The factors associated with virulence can be maintained by an evolutionary selective pressure of fungi. A number of potential virulence factors and events are considered important for invasive fungi, including dimorphism, growth at elevated temperatures, adherence to host cells, cell wall components, enzyme production, i.e., proteinases, lipases, phospholipases, and others (van Burik and Magee 2001).

### Virulence factors related to *P. brasiliensis*

Many of the virulence factors of medically-important pathogenic fungi are related to extracellular proteins. It is clear that extracellular proteins play an essential role in fungal-infection strategies, acting on the molecular dialogue with the host cells, enabling survival, multiplication, pathogen dissemination, as well as in modulation of host defenses (Ranganathan and Garg 2009). For the dimorphic fungi, a virulence factor has been functionally defined as a gene product that has an effect on the survival and growth of the

organism in its mammalian host but is not essential for growth of the parasitic phase in vitro (Mendes-Giannini et al. 2008). Some *Paracoccidioides* spp. proteins that play an important role in the virulence of the fungus against the host have been identified in extracellular environments. In this context, adhesion can mediate host-fungi interactions during infection. Enolase, 14-3-3 protein, fructose-1,6-bisphosphate aldolase, triose phosphate isomerase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and glycoprotein gp43 have been described as *Paracoccidioides* adhesins (Barbosa et al. 2006; Pereira et al. 2007; Donofrio et al. 2009; Nogueira et al. 2010; Chaves et al. 2015; De Oliveira et al. 2015). Genomic and transcriptome sequencing efforts, coupled to sophisticated molecular biological tools, have made it possible to find direct proven evidence if a given factor is required for fungal virulence. The standard protocol for molecular pathogenesis studies in fungi has been the use of site-directed mutagenesis (gene-disruption), followed by the study of these specific null mutants and the respective reconstituted strains in a relevant animal model. For a gene to be considered part of the virulence composition, the infection caused by the null mutant must be attenuated when compared to that caused by the wild-type and reconstituted strains (Casadevall and Pirofski 2003).

The expression of some genes was identified as virulence factors of *P. brasiliensis*. Heat shock proteins (HSPs) are ubiquitously present in cells. These highly conserved biomolecules are constitutively expressed and generally upregulated in response to various stress conditions. The major roles of HSPs involve cell cycle progression and transcriptional and posttranslational processes, such as protein folding, stability, transportation, and degradation, and they are also involved in the activation of diverse key signal transducers in fungi (Kregel 2002). HSPs are expressed in large amounts by fungal cells in response to rapid increases in temperature and other types of environmental stress (Izacc et al. 2001). These proteins are implicated in several biological processes, where the dimorphic transition is of particular interest, being important in the process infectious (Cleare et al. 2017). Another gene discovered to be associated with the dimorphism of this fungus was the expression of SCNC, observing that it acts on the metabolism of the inorganic sulfur and influencing the virulence (Menino et al. 2013). The genes coding of

glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was discovered and associated with fungus adherence in host cells. The role of some genes in the early stages of infection was also discovered (Barbosa et al. 2006). GAPDH has shown interaction with various *P. lutzii* proteins and may be involved in the regulation of some metabolic pathways and even stabilization of the conformation of the multiprotein complex with HSPs and regulation of mitochondrial and nuclear proteins, thus being a potential therapeutic target (Silva et al. 2019). *P. brasiliensis* *pld* gene was found to be expressed in micellar cells, but in vitro studies showed high expression of the gene. This fact was also similar with the *plb1* and *plc* genes, concluding that they are important in fungal pathogenesis. More information on the genetic profile of the fungus will allow new ways to identify mechanisms of infection control (Soares et al. 2013).

As a thermo-dimorphic fungus, *Paracoccidioides* spp. is characterised by a distinct structure and chemical composition in its cell wall depending on the morphological phase in which it stands in a given moment. While the mycelial phase cell wall has  $\beta$ -1,3-glucan as the main neutral glucose polymer, the yeast like phase reduces this polysaccharide to a minimum and substitutes it by  $\alpha$ -1,3-glucan (Kanetsuna and Carbonell 1970), a change that has been correlated with pathogenicity, since spontaneous loss of the polysaccharide correlated with decreased virulence (San-Blas et al. 1977). Disturbance of the  $\alpha$ -(1,3)-glucan synthesis by depletion of the  $\alpha$ -(1,4)-amylase (AMY1) transcript, which is involved in priming the oligosaccharide synthesis, reduces cell wall  $\alpha$ -(1,3)-glucan content and fungal virulence (Marion et al. 2006; Camacho et al. 2012). Changes in the content of these structural polysaccharides with consequent attenuation in strain virulence may be influenced by the long culture period, in which may be restored by the passage in animals or cell cultures or supplementation with growth factor-enriched culture media (San-Blas and Vernet 1977; San-Blas et al. 1977; Andreotti et al. 2005). The presence of  $\alpha$ -(1,3)-glucan in the outermost layer of the cell wall yeast masks  $\beta$ -(1,3)-glucan, an immunogenic component of fungal cell walls, avoiding its recognition from pattern recognition receptors (PRR) found on host phagocytic cells (Kanetsuna and Carbonell 1970; Rappleye et al. 2007). Cell wall turnover during infection after morphological switching is a survival strategy used



by dimorphic fungi to avoid recognition by the PRRs of the host phagocytic cells. Dectin-1, a PRR present on the surface of host phagocytic cells, recognizes fungal cell wall  $\beta$ -(1,3)-glucan and triggers phagocytosis, respiratory burst, and release of cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-12, and other interleukins that plays critical functions in anti-fungal immunity (San-Blas and Vernet 1977; Rappleye et al. 2007; Dambuja and Brown 2015).

Molecules of adherence are fundamental in the pathogen–host interaction. These are usually exposed surface structures that facilitate adherence to host cells. Cell surface proteins called adhesins, responsible for the first contact with host cells, contribute to host colonization and invasion by mediating this process (De Oliveira et al. 2015). The knowledge of the *P. brasiliensis* cell-surface structures and the basic mechanisms underlying their interaction with host receptor molecules has increased dramatically, through molecular and structural analysis of adherence molecules. Successful host tissue colonisation by a fungus is a complex event, generally involving a ligand (adhesin) encoded by the pathogen and a cell receptor (Barbosa et al. 2006). Usually microorganism of interact with three types of host component: secreted cell products, host cell surfaces, or extracellular matrix proteins, such as collagen types I and IV, fibronectin, fibrinogen, and laminin. The adhesion process can represent a mechanism of fungal dissemination. It's very hard to observe *P. brasiliensis* in the act of adhering to an endothelial cell monolayer, when examined periodically, suggesting that migration of the fungus across the endothelial layer is very fast, and cannot normally be observed in cell culture in vitro (de Oliveira et al. 2018).

The strongest candidate as a virulence factor in *P. brasiliensis* is the glycoprotein of 43KDa (gp 43). It is a cell surface and exocellular glycoprotein with proteinase activity at acidic pH that is recognised by 100% of patient sera tested by immunoblotting. Gp43 acts as a laminin receptor and may be responsible for the adhesion of *P. brasiliensis* yeasts to the basement membrane (Puccia and Travassos 1991). Intracellularly, gp43 is stored inside large cytoplasmic vacuoles and lomasomes, while secretion seems to take place at specific regions of the cell wall, where antigen aggregates can be visualised in immunogold labeled yeasts. Cell wall gp43 is at least partially responsible for yeast cell adhesion to components of the

extracellular matrix. The results suggested that cell wall gp43 might help mediate cell–cell interaction in lung alveoli by binding to laminin and fibronectin. Penetration of the fungus in the tissues, however, would depend on the action of proteases degrading extracellular matrix-associated extracellular. In this sense, the extracellular thiol-dependent serine protease that preferentially cleaves extracellular matrix might act as a virulence factor when associated with gp43 (Torres et al. 2013). Different levels of gp43 demonstrate that the fungus can be more or less virulent. The reduction of gp43 favors the phagocytosis of fungus by activated macrophages because there is an increase of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , causing a reduction in fungal burden that is probably due to more efficient immune response (Puccia et al. 1998). Another glycoprotein expressed by the fungus is gp70KDa. It was demonstrated that only the fraction-bound extract to fConA was reactive with sera of patients with PCM, and gp70 was one of its components (Puccia et al. 1986). It was found that gp70 is recognized by 96% of the sera from the same patients, and during chemotherapy of 72 patients, 55 (76%) showed a much-reduced reaction. Studies have shown that gp70 inhibited phagocytosis of opsonized sheep red blood cells, although not in a dose-dependent manner. This result supports the notion that gp70 inhibits the activity of phagocytic macrophages not only through the mannose receptor but also through the Fc receptor, in which it differs from gp43, which does not have the latter effect (Popi et al. 2002).

Other virulence factors such as Aldolase proteins of 1,6-bisphosphate (Chaves et al. 2015) and enolase (Nogueira et al. 2010), have been described in conferring capacity to the fungus to penetrate the deeper tissues of the host. Authors describe that proteins with more than one function are called clandestins. Some proteins have been described in possessing this capacity being they; aconitase, aldolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, isocitrate lyase, malate synthase, triose phosphate isomerase, fumarase and enolase, acting on the virulence of this fungus (Castilho et al. 2014). A protein called the Tu-elongation factor (EF-Tu) has been described in other microorganisms attributing different functions as contributing to the adhesion, invasion and modulation of the immune system (Dallo et al. 2002). In *P. brasiliensis* it has been identified and characterized by discovering that proteins are capable

of binding to fibronectin and plasminogen by participating in the fungal interaction (binding/invasion) with lung cells and being present on the surface of the fungus (Marcos et al. 2016). It has also been described that extracellular proteases are important in pathogenic fungi during infection (Castilho et al. 2018). Aspartyl proteases are proteolytic enzymes that favor host invasion. There are a set of ten segregated aspartic proteases (Saps) cleaved numerous peptides and proteins contributing to biochemical host dysregulation in infections of *Candida* spp. (Silva et al. 2014). In *P. brasiliensis*, segregated aspartyl protease (PbSap) was characterized and identified revealing that there was an increase in the expression of genes responsive to aspartyl proteinase when biofilm formed by this fungus, thus being also attributed as a virulence factor (Tacco et al. 2009; Sardi et al. 2015).

Antioxidant enzymes can also be considered as virulence factors (Castilho et al. 2018). It is known that several genes and proteins participate in the mechanism of oxidative stress of this fungus. Peroxiredoxin mitochondrial and vacuolar A protease have been described as potential virulence regulators. The catalase and superoxide dismutase (SOD) enzymes were also described to be associated with virulence of the fungus (Castilho et al. 2014).

The ability of *P. brasiliensis* to make melanin pigments was first described by Gómez et al. (2001). The authors recovered pigmented particles after chemical and enzymatic treatment of conidia and yeasts grown in vitro (on water agar for conidia and in the presence of L-DOPA for the yeasts). They also recovered yeast shaped melanin-like particles from infected mouse tissue after chemical and enzymatic treatment. Particles collected from cells in vitro and in vivo were reactive with antibody to melanin. A laccase-like activity was detected in protein extracts of *P. brasiliensis* that was implicated in the enzymatic synthesis of melanin in yeast cells. Relatively, little is known about the localization of melanin in human pathogenic fungi but it has been described in intracellular and/or extracellular (e.g., outside cell membrane) spaces. The ability of melanin to protect microbes from host defense is relevant to antimicrobial therapy because the clinical efficacies of some antimicrobial drugs are complemented by host immune defense mechanism (Ikeda et al. 2003). Melanized *P. brasiliensis* yeast cells showed increased resistance to phagocytosis. Additionally, melanin can stimulate

humoral immune responses. Melanin may be considered an antifungal resistance factor, given its ability to reduce the susceptibilities of melanised cells to antifungal drugs (Taborda et al. 2008). Notably, there is no evidence for the involvement of melanin in drug efflux pumps or in alterations in the synthesis of ergosterol or glucans in the fungal cell wall or cell membrane structures. Melanization of *P. brasiliensis* yeast cells does not affect the cytotoxicity of amphotericin B, ketoconazole, fluconazole, itraconazole, sulfamethoxazole as measured by standard CLSI broth macrodilution procedures for assessing the susceptibility of yeast cells to antifungal drugs. Laccase is an important virulence factor in many pathogenic fungi. Two different methods have been used to demonstrate that *P. brasiliensis* produces a laccase-like enzyme (Da Silva et al. 2006). In spite of considerable efforts by several investigators, many aspects of the nature of laccase remain unclear. In *C. neoformans*, the ability of laccase to produce melanin pigments and prevention of iron-dependent Fenton reaction products results in enhanced dissemination of yeast forms to the brain, thus strongly correlating the enzyme with virulence (Waterman et al. 2007). It is not known whether *P. brasiliensis* laccase contributes to virulence by mechanisms other than the production of melanin (Da Silva et al. 2006).

#### Future therapeutic targets of *P. brasiliensis*

The search for new therapeutic targets and the development of new drugs are necessary, because the high incidence of fungal infections and gravity of them (Rodrigues-Vendramini et al. 2018). The increase of immunosuppressed patients has also contributed to this scenario. The challenge is the developing of drugs to treat fungal infections, principally because the similarities between these microorganisms with the humans. In consequence, the antifungal drugs can cause serious side effects during treatment (Amaral et al. 2005).

The importance of identifying virulence factors of *P. brasiliensis* or other fungi is of utmost importance. Since virulence factors can understand the pathogenesis and interaction of this fungus with the host. From this knowledge virulence factors can be used as targets in the development of therapies against this fungus. Thus, anti-virulence factor therapies have been a new



strategy for developing new targets not to kill or stop the growth of the microorganism, but to “disarm” the pathogen by directly targeting virulence (Allen et al. 2014). The design and development of new drugs that act on these targets specifically in pathogenic fungi without presenting collateral damage to the host is challenging. Several studies describe different molecules discovered and defining their importance in the survival of this fungus inside and outside the host. Some of them have important features that may be strong candidates as future therapeutic targets (Rodrigues-Vendramini et al. 2018).

The 1,3- $\beta$ -glucan in *P. brasiliensis* may be strong candidates as future therapeutic targets. The synthesis of 1,3- $\beta$ -glucan in *P. brasiliensis* requires uridine diphosphate (UDP)-glucose as the preferred nucleotide precursor to the in vitro synthesis of  $\beta$ -glucan. The 1,3- $\beta$ -glucan synthase is regulated by the Rho GTPases, which is a multifunctional regulator related to numerous proteins (Amaral et al. 2005). The echinocandins disturb the membrane and cause a loss of the enzymatic activity of 1,3- $\beta$ -glucan synthase without any direct binding to the catalytic site, thus compromising the structure and osmolarity of the cell wall. The discovery of new inhibitors of the synthesis of 1,3- $\beta$ -glucan, can enhance the drug's action. New generations of synthetic and/or semi-synthetic drugs would assist in an effective treatment (Klepser 2001).

The Ags2 gene promotes the synthesis of  $\alpha$ -1,3-glucan. Inhibitors that act in this process have not yet been identified. The discovery of these inhibitors is important because in the yeast phase the proportion of  $\alpha$ -1,3-glucan reaches 95% in the plasma membrane (Bernard and Latgé 2001). This molecule is a promising therapeutic target because it reduces the incidence of fungal strains resistant to drugs that act at this site of action.

Studies have demonstrated the capability of *P. brasiliensis* for adhesion and invasion. Some types of adhesins that interact with receptors seem to exist in a number of different fungi, and host extracellular matrix-associated proteins (ECM) components are of great importance in the modulation of the migration, invasion, differentiation and fungal proliferation. Such surface molecules that bind to host cell receptors during adhesion and invasion may be of interest for developing vaccines and receptor-blocking therapies (Andreotti et al. 2005).

Cell wall gp43 is at least partially responsible for yeast cell adhesion to components of the extracellular matrix. The cell wall gp43 might help mediate cell-cell interaction in lung alveoli by binding to laminin and fibronectin. Penetration of the fungus in the tissues, however, would depend on the action of proteases degrading ECM (Vicentini et al. 1994). Besides being highly antigenic for antibody production, gp43 elicits T-CD4+ protective response mediated by intense IFN- $\gamma$  production in mice immunized with the protein or its gene. An internal sequence of 15 amino acids (P10) does not elicit antibody production, thus avoiding interference of a Th2 unwanted response. The P10 peptide or its gene can efficiently be used both as vaccine and immunotherapy, especially if associated with anti-fungal agents. The reduction of expression of gp43 can decrease the adherence of the microorganism to the host cell. The comprehension of the properties of this molecule may allow the development of a vaccine that can be used as a therapeutic tool in the treatment of juvenile forms of the disease (Magalhães et al. 2012).

EF-Tu was identified and characterized in *P. brasiliensis* as a protein present in the fungal cell surface, participating in the fungal interaction with pneumocytes (Marcos et al. 2016). Adhesins have a special role in pathogen and host interaction, precisely because adhesion is the first stage of infection and colonization (Dallo et al. 2002). Inhibition of EF-Tu using a polyclonal anti-EF-Tu antibody inhibited interaction with pneumocytes. This may be a future candidate as a target for the development of anti-*P. brasiliensis* immunotherapies (Marcos et al. 2016).

de Oliveira et al. (2016) using phage display methodology, identified four peptides that strongly bind to the *Paracoccidioides* cell wall and inhibit up to 64% of the adhesion of *Paracoccidioides* to pneumocytes in vitro and inhibited up to 57% the adhesion to the extracellular matrix components (laminin, fibronectin, and type I and type IV collagen), suggesting that the anti-adhesion therapy could be an outstanding strategy against PCM.

Studies describe paracocin (PCN) as a possible therapeutic target, being described with a fungus virulence factor. PCN is a protein that has enzymatic activities that can bind *N*-acetylglucosamine and chitin and can act as an *N*-acetylglucosaminidase and can also participate in fungal morphogenesis (dos Reis et al. 2010). Silencing this protein inhibited the



transition from yeast phase fungus to mycelium and also increased susceptibility to macrophage fungicidal activity (Alegre et al. 2014). A study by Fernandes et al. (2017) showed that recombinant PCN administered prophylactically to mice was able to induce a protective immune response associated with decreased fungal burden and reduced granulomas. As a treatment strategy, virulence factors, such as vaccine antigens, may be successful because the potentiated immune response may more effectively combat this pathogen.

Inhibition of targets present in pathogens but absent in humans was a strategy used for the development of a new anti-microbial therapy. Thus, using this strategy, the shikimate pathway was described as a potential therapeutic target. This pathway is present in parasites, bacteria, plants, fungi and absent in mammals. The shikimate pathway has seven enzymes that are responsible for the synthesis of corismato, which is important for being responsible for the biosynthesis of molecules such as; aromatic amino acids, folate, naphthoquinones and menaquinones. In *P. brasiliensis*, the corismato pathway has not been fully described, but it is known that 67.9% of this pathway is homologous with *Saccharomyces cerevisiae*. A new compound identified as CPI showed antifungal activity, reducing the number of fungi and lung lesions in infected mice (Rodrigues-Vendramini et al. 2018).

Aspartyl protease protein (PbSap) has been shown to be a possible therapeutic target. Studies have been able to identify that the temperature changes to which the fungus *P. brasiliensis* may be may cause stress in this pathogen and allowing a greater expression of PbSap, allowing a greater adaptation to the host environment (Goldman et al. 2003). Therapy that regulates PbSap expression may have promising results in inhibiting mycelial to yeast phase transition (Castilho et al. 2018). Another important feature attributed to PbSap is the possibility of being used as a new antigen as a serodiagnostic tool, since in patients with candidemia anti-SAP antibodies were identified in sera (De Bernardis et al. 1997).

As previously stated, melanin is an antifungal resistance factor, given its ability to reduce the susceptibilities of melanized cells to antifungal drugs. The mechanism of increased survival of pigmented *P. brasiliensis* yeast cells is in part due to the fact that melanization protects *P. brasiliensis* against injury mediated by nitrogen- or oxygen-derived free radicals and also enhances resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and hypochlorite

as has similarly been shown in *C. neoformans*, *Aspergillus* spp., and *S. schenckii*. Laccase is responsible for the production of melanin pigment. This ability can be observed in the fungus *C. neoformans*. Therefore, this enzyme can be correlated with the virulence of the microorganism (Taborda et al. 2008). Investigations on laccase inhibitory molecules may lead to the inhibition of melanin production, rendering *P. brasiliensis* susceptible to anti-fungal agents.

### Final considerations

The high incidence of infections caused by *P. brasiliensis* and crescent increase of immunocompromised patients leads to the necessity of developing alternative therapies against this fungus. Our review describes the virulence factors described in the literature, many molecules can still be discovered and associated with the pathogenicity of *Paracoccidioides sp.* The research of virulence factors allows us to understand the relationship between pathogen and host. However, not all virulence factors may be future therapeutic targets, precisely because they have molecules that may be similar to mammalian and fungal cells. An ideal new therapeutic target is one that is only present in the pathogen and thus can be used as a strategy for the development of new antifungal therapies. Therefore, from this review we suggest some molecules described as virulence factors of *P. brasiliensis* and which may be future therapeutic targets in order to develop a more specific, effective antifungal, with less side effects and a shorter treatment time or immunotherapies and antifungal vaccines.

**Acknowledgements** This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (APQ 012941-16), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (305216/2016-3) and Santos, LA and Grisolia, JC are recipient of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) scholarships.

**Author contributions** ALTD and LAS established the main idea of the manuscript. LAS and JCG wrote the manuscript. EB, FBAP and LCCM contributed with new ideas, references and correction of the manuscript.

### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** All authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethical approval** The article does not contain any studies related to human participants or animals and it is not necessary compliance with Ethical Standards.

### References

- Alegre ACP, Oliveira AF, Dos Reis Almeida FB et al (2014) Recombinant paracoccin reproduces the biological properties of the native protein and induces protective Th1 immunity against *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *PLoS Negl Trop Dis* 8:e2788. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002788>
- Allen RC, Papat R, Diggle SP, Brown SP (2014) Targeting virulence: Can we make evolution-proof drugs? *Nat Rev Microbiol* 12:300–308. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3232>
- Amaral AC, Fernandes L, Galdino AS et al (2005) Therapeutic targets in *Paracoccidioides brasiliensis*: post-transcriptome perspectives. *Genet Mol Res* 4:430–449
- Andreotti PF, Monteiro Da Silva JL, Bailão AM et al (2005) Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect* 7:875–881. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.02.005>
- Aristizábal BH, Clemons KV, Cock AM et al (2002) Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice: influence of the hormonal status of the host on tissue responses. *Med Mycol* 40:169–178. <https://doi.org/10.1080/mmy.40.2.169.178>
- Armstrong-James D, Brown GD, Netea MG et al (2017) Immunotherapeutic approaches to treatment of fungal diseases. *Lancet Infect Dis* 17:e393–e402. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30442-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30442-5)
- Bagagli E, Sano A, Coelho KI et al (1998) Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* 58:505–512. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.58.505>
- Barbosa MS, Bão SN, Andreotti PF et al (2006) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infect Immun* 74:382–389. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.1.382-389.2006>
- Bernard M, Latgé JP (2001) *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis. *Med Mycol* 39:9–17
- Bialek R, Ibricevic A, Aepinus C et al (2000) Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a nested PCR assay. *J Clin Microbiol* 38:2940–2942
- Calle D, Rosero DS, Orozco LC et al (2001) Paracoccidioidomycosis in Columbia: an ecological study. *Epidemiol Infect* 126:309–315. <https://doi.org/10.1017/S0950268801005052>
- Camacho E, Niño-Vega GA (2017) *Paracoccidioides* spp.: virulence factors and immune-evasion strategies. *Mediat Inflamm*. <https://doi.org/10.1155/2017/5313691>
- Camacho E, Sepulveda VE, Goldman WE et al (2012) Expression of *Paracoccidioides brasiliensis* AMY1 in a *Histoplasma capsulatum* amy1 mutant, relates an  $\alpha$ -(1,4)-amylase to cell wall  $\alpha$ -(1,3)-glucan synthesis. *PLoS ONE* 7:1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050201>
- Casadevall A (2007) Determinants of virulence in the pathogenic fungi. *Fungal Biol Rev* 21:130–132. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.02.007>
- Casadevall A, Pirofski LA (2003) The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 1:17–24. <https://doi.org/10.1038/nrmicro732>
- Castilho Daniele G, Chaves Alison FA, Xander Patricia, Zelanis André, Kitano Eduardo S, Serrano Solange MT, Tashima Alexandre K, Batista WL (2014) Exploring potential virulence regulators in *Paracoccidioides brasiliensis* isolates of varying virulence through quantitative proteomics. *J Proteome Res* 13:4259–4271
- Castilho DG, Chaves AFA, Navarro MV et al (2018) Secreted aspartyl proteinase (PbSap) contributes to the virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *PLoS Negl Trop Dis* 12:1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006806>
- Chaves EGA, Weber SS, Bão SN et al (2015) Analysis of *Paracoccidioides* secreted proteins reveals fructose 1,6-bisphosphate aldolase as a plasminogen-binding protein. *BMC Microbiol* 15:1–14. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0393-9>
- Cleare LG, Zamith-Miranda D, Nosanchuk JD (2017) Heat shock proteins in histoplasma and paracoccidioides. *Clin Vaccine Immunol* 24:1–8. <https://doi.org/10.1128/CVI.00221-17>
- Da Silva MB, Marques AF, Nosanchuk JD et al (2006) Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. *Microbes Infect* 8:197–205. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.06.018>
- Dallo SF, Kannan TR, Blaylock MW, Baseman JB (2002) Elongation factor Tu and E1  $\beta$  subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol Microbiol* 46:1041–1051. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03207.x>
- Dambuza IM, Brown GD (2015) C-type lectins in immunity: recent developments. *Curr Opin Immunol* 32:21–27. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.12.002>
- De Almeida FA, Freitas Neves F, Jose Mora D et al (2017) Paracoccidioidomycosis in Brazilian patients with and without human immunodeficiency virus infection. *Am J Trop Med Hyg* 96:368–372. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0254>
- De Bernardis F, Boccanera M, Adriani D et al (1997) Protective role of antimannan and anti-aspartyl proteinase antibodies in an experimental model of *Candida albicans* vaginitis in rats. *Infect Immun* 65:3399–3405
- De Camargo ZP (2008) Serology of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 165:289–302. <https://doi.org/10.1007/s11046-007-9060-5>
- De Oliveira HC, Assato PA, Marcos CM et al (2015) Paracoccidioides-host interaction: an overview on recent advances



- in the paracoccidioidomycosis. *Front Microbiol* 6:1–20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01319>
- de Oliveira HC, Michalowski JS, da Silva JF et al (2016) Peptides derived from a phage display library inhibit adhesion and protect the host against infection by *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*. *Front Pharmacol* 7:1–11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00509>
- de Oliveira AR, Oliveira LN, Chaves EGA et al (2018) Characterization of extracellular proteins in members of the *Paracoccidioides* complex. *Fungal Biol* 122:738–751. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.04.001>
- Dias L, de Carvalho LF, Romano CC (2012) Application of PCR in serum samples for diagnosis of paracoccidioidomycosis in the southern Bahia-Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 6:2–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001909>
- Donofrio FC, Calil ACA, Miranda ET et al (2009) Enolase from *Paracoccidioides brasiliensis*: isolation and identification as a fibronectin-binding protein. *J Med Microbiol* 58:706–713. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.003830-0>
- dos Reis AF, de Oliveira L, Valle de Sousa M et al (2010) Paracoccin from *Paracoccidioides brasiliensis*; purification through affinity with chitin and identification of N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase activity. *Yeast* 27:67–76. <https://doi.org/10.1002/yea.1731>
- Fernandes F, Oliveira A, Landgraf T et al (2017) Impact of paracoccin gene silencing on *Paracoccidioides brasiliensis* virulence. *MBio* 8:1–12
- Giacomazzi J, Baethgen L, Carneiro LC et al (2016) The burden of serious human fungal infections in Brazil. *Mycoses* 59:145–150. <https://doi.org/10.1111/myc.12427>
- Goldman GH, Savoldi M, Semighini CP et al (2003) Expressed sequence tag analysis of the human pathogen. *Society* 2:34–48. <https://doi.org/10.1128/EC.2.1.34>
- Gomes GM, Cisalpino PS, Tabora CP, De Camargo ZP (2000) PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* 38:3478–3480
- Gómez BL, Nosanchuk JD, Di S et al (2001) Detection of melanin-like pigments in the dimorphic fungal pathogen. *Infect Immun* 69:1–8. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.9.5760>
- Hrycyk MF, Garcia Garces H, de Bosco SMG et al (2018) Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*, *P. lutzii* and related species: infection in armadillos, soil occurrence and mycological aspects. *Med Mycol* 56:950–962. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx142>
- Ikeda R, Sugita T, Jacobson ES, Shinoda T (2003) Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. *Microbiol Immunol* 47:271–277. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2003.tb03395.x>
- Izacc SMS, Gomez FJ, Jesuino RSA et al (2001) Molecular cloning, characterization and expression of the heat shock protein 60 gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol*. <https://doi.org/10.1080/mmy.39.5.445.455>
- Kanetsuna F, Carbonell LM (1970) Cell wall glucans of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* 101:675–680
- Klein BS, Tebbets B (2007) Dimorphism and virulence in fungi. *Curr Opin Microbiol* 10:314–319. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.04.002>
- Klepser ME (2001) New insights in medical mycology: focus on fungal infections. Introduction. *Pharmacotherapy* 21:109S–110S
- Kregel KC (2002) Invited review: heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol* 92:2177–2186. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01267.2001>
- Magalhães A, Ferreira KS, Almeida SR et al (2012) Prophylactic and therapeutic vaccination using dendritic cells primed with peptide 10 derived from the 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Clin Vaccine Immunol* 19:23–29. <https://doi.org/10.1128/CVI.05414-11>
- Marcos CM, de Oliveira HC, da Silva JF et al (2016) Identification and characterisation of elongation factor Tu, a novel protein involved in *Paracoccidioides brasiliensis*-host interaction. *FEMS Yeast Res* 16:1–14. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow079>
- Marion CL, Rappleye CA, Engle JT, Goldman WE (2006) An  $\alpha$ -(1,4)-amylase is essential for  $\alpha$ -(1,3)-glucan production and virulence in *Histoplasma capsulatum*. *Mol Microbiol* 62:970–983. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05436.x>
- Marques SA (2012) Paracoccidioidomycosis. *Clin Dermatol* 30:610–615
- Martinez R (2015) Epidemiology of paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 57:11–20
- Martinez R (2017) New trends in paracoccidioidomycosis epidemiology. *J Fungi* 3:1–13. <https://doi.org/10.3390/jof3010001>
- Mendes RP, de Souza Cavalcante R, Marques SA et al (2017) Paracoccidioidomycosis: current perspectives from Brazil. *Open Microbiol J* 11:224–282. <https://doi.org/10.2174/1874285801711010224>
- Mendes-Giannini MJS, Monteiro Da Silva JL, De Fátima Da Silva J et al (2008) Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: recent advances. *Mycopathologia* 165:237–248. <https://doi.org/10.1007/s11046-007-9074-z>
- Menezes VM, Soares BG BG, Fontes CJF (2006) Drugs for treating paracoccidioidomycosis. *Cochrane Database Syst Rev*. <https://doi.org/10.1002/14651858.cd004967.pub2>
- Menino JF, Saraiva M, Gomes-Rezende J et al (2013) *P. brasiliensis* virulence is affected by SconC, the negative regulator of inorganic sulfur assimilation. *PLoS ONE* 8:1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074725>
- Motoyama AB, Venancio EJ, Brandao GO et al (2000) Molecular identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by PCR amplification of ribosomal DNA. *J Clin Microbiol* 38:3106–3109
- Nogueira SV, Fonseca FL, Rodrigues ML et al (2010) *Paracoccidioides brasiliensis* enolase is a surface protein that binds plasminogen and mediates interaction of yeast forms with host cells. *Infect Immun* 78:4040–4050. <https://doi.org/10.1128/IAI.00221-10>
- Oliveira MME, Almeida-Paes R, Gutierrez-Galhardo MC, Zancope-Oliveira RM (2014) Molecular identification of the *Sporothrix schenckii* complex. *Rev Iberoam Micol* 31:2–6. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.09.008>
- Pereira LA, Bão SN, Barbosa MS et al (2007) Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase

- suggests the potential for adhesin function. *FEMS Yeast Res* 7:1381–1388. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00292.x>
- Popi AF, Lopes JD, Mariano M (2002) GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. *Cell Immunol* 218:87–94. [https://doi.org/10.1016/S0008-8749\(02\)00576-2](https://doi.org/10.1016/S0008-8749(02)00576-2)
- Puccia R, Travassos LR (1991) 43-Kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. *J Clin Microbiol* 29:1610–1615
- Puccia R, Schenkman S, Gorin PAJ, Travassos LR (1986) Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. *Infect Immun* 53:199–206
- Puccia R, Carmona AK, Gesztesi JL, Juliano L, Travassos LR (1998) Exocellular proteolytic activity of *Paracoccidioides brasiliensis*: cleavage of components associated with the basement membrane. *Med Mycol* 36:345–348
- Ranganathan S, Garg G (2009) Secretome: clues into pathogen infection and clinical applications. *Genome Med* 1:1–7. <https://doi.org/10.1186/gm113>
- Rapplee CA, Eissenberg LG, Goldman WE (2007) *Histoplasma capsulatum*  $\alpha$ -(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the  $\beta$ -glucan receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609848104>
- Rocha-Silva F, Maria de Figueiredo S, Rutren La Santrer EF et al (2018) Paracoccidioidomycosis: detection of *Paracoccidioides brasiliensis* genome in biological samples by quantitative chain reaction polymerase (qPCR). *Microb Pathog* 121:359–362. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.05.039>
- Rodrigues-Vendramini FAV, Marschalk C, Toplak M et al (2018) Promising new antifungal treatment targeting chormate synthase from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 63:e01097-18
- Rousseaux SG-BM (2017) PCR ITS-RFLP for penicillium species and other genera. Humana Press, New York
- San-Blas G, Vernet D (1977) Induction of the synthesis of cell wall alpha-1,3-glucan in the yeastlike form of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVIC Pb9 by fetal calf serum. *Infect Immun* 15:897–902
- San-Blas G, San-Blas F, Serrano LE (1977) Host parasite relationships in the yeastlike form of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVIC Pb9. *Infect Immun* 15:343–346
- San-Blas G, Niño-Vega G, Barreto L et al (2005) Primers for clinical detection of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol* 43:4255–4257. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.8.4255-4257.2005>
- Sardi JCO, de Souza Pitanguí N, Voltan AR et al (2015) In vitro *Paracoccidioides brasiliensis* biofilm and gene expression of adhesins and hydrolytic enzymes. *Virulence* 6:642–651. <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1031437>
- Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Colombo AL et al (2017) Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop* 50:715–740. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0230-2017>
- Silva NC, Nery JM, Dias ALT (2014) Aspartic proteinases of *Candida* spp.: role in pathogenicity and antifungal resistance. *Mycoses* 57:1–11. <https://doi.org/10.1111/myc.12095>
- Silva E, Freitas KS, Lima RM, Baeza LC et al (2019) Interaction of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase points to the existence of metabolons in *Paracoccidioides lutzii*. *Front Microbiol* 10:1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01537>
- Soares DA, Barros Oliveira M, Feijó Evangelista A et al (2013) Phospholipase gene expression during *Paracoccidioides brasiliensis* morphological transition and infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108:808–811. <https://doi.org/10.1590/0074-0276108062013021>
- Sylvestre TF, Silva LRF, de Cavalcante RS et al (2014) Prevalence and serological diagnosis of relapse in paracoccidioidomycosis patients. *PLoS Negl Trop Dis* 8:e2834. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002834>
- Taborda CP, Da Silva MB, Nosanchuk JD, Travassos LR (2008) Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. *Mycopathologia* 165:331–339. <https://doi.org/10.1007/s11046-007-9061-4>
- Tacco BACDA, Parente JA, Barbosa MS et al (2009) Characterization of a secreted aspartyl protease of the fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol* 47:845–854. <https://doi.org/10.3109/13693780802695512>
- Teixeira MM, Theodoro RC, Niño-Vega G et al (2014) Paracoccidioides species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. *PLoS Pathog* 10:4–7. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004397>
- Teles FRR, Martins ML (2011) Laboratorial diagnosis of paracoccidioidomycosis and new insights for the future of fungal diagnosis. *Talanta* 85:2254–2264. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.07.099>
- Torres I, Hernandez O, Tamayo D et al (2013) Inhibition of PbGP43 expression may suggest that gp43 is a virulence factor in *Paracoccidioides brasiliensis*. *PLoS ONE* 8:e68434. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068434>
- Travassos LR, Taborda CP (2012) Paracoccidioidomycosis vaccine. *Hum Vaccines Immunother* 8:1450–1453. <https://doi.org/10.4161/hv.21283>
- van Burik J-AH, Magee PT (2001) Aspects of fungal pathogenesis in humans. *Annu Rev Microbiol* 55:743–772. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.743>
- Vicentini A, Gesztesi J, Franco M (1994) Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect Immun* 62:1465–1469
- Waterman SR, Hacham M, Panepinto J et al (2007) Cell wall targeting of laccase of *Cryptococcus neoformans* during infection of mice. *Infect Immun* 75:714–722. <https://doi.org/10.1128/IAI01351-06>
- Zhou X, Rodrigues AM, Feng P, De Hoog GS (2014) Global ITS diversity in the *Sporothrix schenckii* complex. *Fungal Divers* 66:153–165. <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0220-2>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



## Medication association and immunomodulation: An approach in fungal diseases and in particular in the treatment of paracoccidioidomycosis

Lauana Aparecida Santos<sup>a</sup>, Julianne Caravita Grisolia<sup>a</sup>, Luiz Cosme Cotta Malaquias<sup>a</sup>,  
Fernanda Borges de Araújo Paula<sup>b</sup>, Amanda Latércia Tranches Dias<sup>a</sup>, Eva Burger<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Microbiology and Immunology Department, Biomedical Sciences Institute, Federal University of Alfenas, Alfenas, MG, Brazil

<sup>b</sup> Department of Clinical and Toxicological Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Alfenas, Alfenas, MG, Brazil



### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Fungal diseases  
Immunomodulation  
Medication association

### ABSTRACT

Fungal infections have been increasing in recent decades, mainly affecting immunocompromised individuals, although certain mycoses, such as paracoccidioidomycosis (PCM), infect immunologically competent individuals. The major problems observed regarding fungal diseases are inadequate diagnosis, prolonged treatment time, the reduced number of drugs available for treatment, in addition to the fact that there are no vaccines for clinical use. Drug combination in order to immunomodulate the immune response is a new strategy used for the treatment of mycoses, since it is difficult to develop new antifungal drugs. The aim of this study is to present and analyze strategies recently suggested for the treatment of fungi of medical interest, in particular for PCM, such as the utilization of combinations of protein fractions or dead microorganisms, as vaccinal antigens, and cellular immunotherapy. We will also propose new therapeutic alternatives, such as lipids, vitamins, synthetic or natural products as well as the use of low intensity LASER therapy (LLLT) to modulate the immune response of the host, enhancing the efficiency of the existing treatments of mycoses of medical interest and in particular of PCM.

### 1. Introduction and state of the art

The incidence of individuals afflicted by fungal diseases is increasing over the last decades. In particular, paracoccidioidomycosis (PCM) is a fungal disease prevalent in Brazil affecting mainly male individuals and may be linked to the rural activities (Martinez, 2015). Therefore, this high incidence of fungal diseases may be attributed to the increase of immunosuppressed, transplanted and oncological individuals, chronic use of corticosteroids and increased life expectancy. Associated with this increase there is concern with the number of drugs available in the clinic being limited and the long time of investigation necessary for the development of antifungal drugs. The strategy of many studies is the association of drugs with substances that have immunomodulatory properties, mainly in the treatment of diseases caused by fungi of medical interest (Salazar et al., 2018).

In the elaboration of new therapeutic protocols, it is important to know the immunological aspects presented by the fungal disease besides the biology and genetics of the pathogen. The antifungal treatment and the immune system can interact. This interaction may be detrimental to the host or pathogen. Therefore, any mechanism that interferes with this interaction will reflect the success or otherwise of

the therapy used.

The objective of this review is to address treatment strategies in mycoses of medical interest with drug association in order to modulate the host's immune system, in particular in the treatment for PCM.

### 2. Fungal infections

Most fungal infections occur due to interaction of the pathogen and host immunity. The high incidence of these diseases is due to the greater spread of the use of immunosuppressive drugs in the treatment of HIV, transplant patients with autoimmune disease, increase of elderly individuals and inadequate use of antifungal agents providing resistance and increasing number of cancer patients. Thus, increased incidences of mycoses and the scarcity of antifungal therapy development lead to a public health concern (Posch et al., 2017). Individuals affected by fungal infections represent more than a quarter of the world population and PCM is considered the fifth cause of death. However, most of these infections that occur are superficial and can be easily treated (Brown et al., 2012). On the other hand, invasive diseases result in more than 50% mortality, with an estimated 1.5 million deaths per year. Among immunocompromised individuals, opportunistic fungal

\* Corresponding author.

E-mail address: [eva.burger@unifal-mg.edu.br](mailto:eva.burger@unifal-mg.edu.br) (E. Burger).

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105412>

Received 12 June 2019; Received in revised form 14 February 2020; Accepted 19 February 2020

Available online 02 March 2020

0001-706X/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.



infections are the main cause of mortality and morbidity (Armstrong-James et al., 2017).

For a fungal infection to occur, these microorganisms adapt to the host, and evade the immune system, so leading to a worse prognosis of the disease (Posch et al., 2017). Defects of host immunity in fungal infections induced the search for adjuvant immunotherapies that could improve immunity and reduce treatment time (Medici and Del Poeta, 2015).

Opportunistic fungi like *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Cryptococcus* spp. and *Pneumocystis* spp. are one of the four genera that cause more invasive diseases (Armstrong-James et al., 2017). Thermally dimorphic fungi such *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* and *C. posadasii*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* and *P. lutzii*, *Sporothrix* spp. and *Talaromyces marneffei* are the main responsible for invasive fungal diseases and can survive in the normal human host by changing their morphological form, thus overcoming their protective immunity.

*Paracoccidioides brasiliensis* and *P. lutzii* are the etiological agents of PCM, a systemic mycosis endemic in Latin America (Wanke and Aidé, 2010). In Brazil it occurs predominantly in the south, southeast and center-west regions, presenting a greater number of cases compared to other Latin countries (Martinez, 2015). PCM can be considered as a neglected disease because notification of new cases is not mandatory and there are no treatment policies implemented (Gegembauer et al., 2014). The infection occurs by the inhalation of conidia and/or of mycelial fragments that are present in the soil. Studies have shown that the female hormone estrogen inhibits the transition from mycelial to yeast-like form, thereby conferring protection on the development of this infection (Salazar et al., 1988). Two distinct forms of this disease can be observed: acute or juvenile form (occurs in youngsters of both sexes and can evolve rapidly) and the chronic or adult form (occurs in males, characterizing a prolonged period of latency) (Franco et al., 1987).

### 3. Immune response against fungi and in particular to *Paracoccidioides brasiliensis*

In mammals the immune response to infectious diseases is diverse and adaptive mechanisms have been developed to better combat the infectious agent. The immune response to fungi includes several cell populations of both, the innate and the adaptive immunity, such as: macrophages, dendritic cells (DC) and natural killer cells (NK), T and B lymphocytes, monocytes, polymorphonuclear neutrophil (PMN). In addition to cells, soluble molecules such as cytokines including interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), TNF alpha (TNF- $\alpha$ ) have an important role. Upon entering the host organism the fungi activate innate and adaptive immune response, which comprise the phagocytosis process with secretion of microbicidal substances from oxidative and nitrosative metabolism, the recruitment of cells that release chemotactic factors or that activate components of the humoral immune response (complement system) to destroy the pathogen (Underhill and Pearlman, 2015).

#### 3.1. Role of innate immunity in fungal infections

In paracoccidioidomycosis the establishment of disease and fungal dissemination is based on the following principles: PCM is a mycosis that affects healthy individuals (therefore occurs in the absence of immunosuppressive drugs or infections), but specific immunity against *P. brasiliensis* antigens is deficient and can be modulated by other antigens (Benard et al., 1996). For the onset, progression and symptomatology of the disease the host immune response should be taken into account beyond age, sex, nutritional status, inhaled fungal particle size. The symptomatology in PCM in patients in the acute/subacute phase is short (usually two months), but it is prolonged in the chronic phase (usually longer than six months). Individuals affected, independently of the clinical form the disease presents, mount an adaptive immune

response (Mendes et al., 2017).

*Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) synthesizes antigens capable of interacting with the immune system and induces a complex and multifactorial response (Burger, 2010). The initial infection may be exudative or granulomatous characterized by a neutrophilic inflammatory response. The presence of this fungus in the tissue stimulates an inflammatory response with congestive-exudative characteristics (Fortes et al., 2011). The formation of granulomas occurs by the predominance of neutrophils that are replaced progressively by macrophages that differentiate into giant cells. As this process progresses, the granulomas have the presence of epithelioid cells and lymphoplasmacytic halo and fungi. Therefore, granulomas constitute a dynamic structure rich in immune cells (Xidieh et al., 1999). These cells are responsible for the “in situ” production of cytokines (Burger et al., 2013); that can be found near areas of fibrosis and necrosis. The presence of cicatricial fibrous tissue in the organs infected by the fungus, mainly the lungs, determines functional impairment limitation of these organs and causes marked decrease in the quality of life of the patients, even in those who achieve mycological cure. Therefore, the presence of granulomas characterizes PCM both in patients (Camargo et al., 2000) and in experimental models (Xidieh et al., 1999).

The cellular wall of fungi is a dynamic and important structure for the viability, morphogenesis and pathogenesis of these, with the ability to alter the composition and architecture of the cell wall due to environmental influences and stress conditions (Brown et al., 2012). Recognition of the constituents of most wall surface of fungal cells is critical to trigger the immune response of the host. When the immune system interacts with fungal cells, the elements of the immune system end up recognizing molecular structures preserved on the surface of the pathogen, known as pathogen associated molecular patterns (PAMPs), through transmembrane or soluble pathogen recognition receptors (PRRs) (Bonfim, Mamoni and Blotta; 2009). PRRs bind to PAMPs and immune cells produce humoral mediators (inflammatory cytokines, chemokines or complement elements), which function enhancing phagocytosis of the fungal cell, activating the humoral immune system and favouring the elimination of the pathogen.

PMN expressed on cells of the innate immune system such as DC, PMN or macrophages express toll-like receptors (TLR), nucleotide binding oligomerization (NOD) receptors of retinoic acid-induced genes (RIG-I) and lectin-type receptors C (CLR). Toll-like receptors have been described as having the ability to recognize a variety of pathogenic structures. TLRs have the ability to interact with fungal antigens and activate phagocytic cells, promoting immune response (Calich et al., 2008). Studies suggest that in *P. brasiliensis* infections, yeast cells penetrate macrophages through TLR2 and TLR4 receptors (Pagliari et al., 2010). PRRs induce signaling pathways by activating specific immunological responses of pathogens and controlling infection (Schmidt et al., 2017). TLR2 and TLR4 and dectin-1 receptors recognize and internalize *P. brasiliensis* and activate PMN (Calich et al., 2008; Feriotti et al., 2015).

Type C lectin receptors (Dectin 1 and Dectin 2) are pattern recognition receptors predominantly involved in antifungal immunity and expressed primarily by myeloid cells (Drummond et al., 2011). Lectins are transmembrane proteins that activate signaling processes, microbicidal activity and phagocytosis and are directly involved with the innate immune response. Dectin-1 receptor has the ability to recognize  $\beta$ -glucans present in the fungal cell wall and is crucial for antifungal protective immunity (Brown, 2012). Studies describe that dectin 1 participates in the recognition of *P. brasiliensis* (Feriotti et al., 2015). In human cells studies it was shown that dectin 1 binds to *P. brasiliensis* and is capable of cell modulation and activation through cytokine production such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-12, IL-8, IL-17 and IL-10 (Romagnolo et al., 2018).

Mechanisms of innate immunity are important in defense against fungi, being the complement system, NK cells and phagocytes the responsible of interaction between fungal antigens with phagocytic cells

receptors, such as those present on neutrophils, which promote the modulation of phagocytosis and the activation of cells. PMNs play a key role in the immune response against invasive fungal infections. They have the ability to migrate rapidly to the site of infection, being attracted by cytokines that are released by endothelial cells and macrophages. PMNs act as phagocytes, recruit and activate other cells of the immunity through the production of proinflammatory cytokines, produce reactive oxygen intermediates and release antimicrobial enzymes to form complex extracellular traps (NETs) assisting in the elimination of fungi (Cunha et al., 2014).

PMN can be found in PCM in large quantities in the tissues, presenting fungicidal activity against *P. brasiliensis* through products of oxidative metabolism ( $H_2O_2$  and superoxide anion), release of cytokines (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF and IL-15) (Rodrigues et al., 2007). PMN can also secrete cytokines, chemokines and growth factors, directly typing this fungus, being important in the innate immune response, and may interact with B lymphocytes, T lymphocytes activating the adaptive response. Studies have described that *P. brasiliensis* stimulated PMNs in vitro have the capacity to produce IL-8, contributing to an anti-apoptotic neutrophil process favoring the survival of this fungus. Studies have reported that IL-1 $\beta$ , IL-8 and TNF- $\alpha$  may be related to metabolic disorders such as febrile conditions and elevation of protein C. In addition, a number of cytokines such as IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12 and TNF- $\alpha$  may be capable of promoting a systemic inflammatory response to *P. brasiliensis* (Fortes et al., 2011).

### 3.2. Role of acquired immunity in fungal infections

In fungal diseases in addition to Th1 and Th2 lymphocytes other cell subsets are important in antifungal immunity such as Th17 cells (neutrophil recruitment), Th22 cells (tissue homeostasis) and regulatory T cells (T Reg). Several cytokines play important roles in modulating and regulating innate and adaptive immune responses, inducing proliferation and differentiation as well as activation and suppression of different target cells (Lehrnbecher et al., 2013; Romani, 2011).

#### 3.2.1. Role of acquired cellular immune response

The main protective adaptive immunity mechanism effective in resistance against *P. brasiliensis* is comprised of T cell-activated macrophages. In an experimental model, resistant mice produce higher levels of IFN- $\gamma$  and IL-2, whereas susceptible mice show lower IFN- $\gamma$  concentrations and significant levels of IL-5 and IL-10 at the beginning of the infection (Kashino et al., 2000). It was shown that blocking of macrophages in mice resulted in more pronounced clinical signs of PCM infection (Kashino et al., 1995).

T helper 1 type immune response plays a protective role leaving the host resistant to *P. brasiliensis*. This resistance has been attributed to the cytokines IFN- $\gamma$ , IL-12 and TNF- $\alpha$  and the histological aspects that present compact granulomas (Burger et al., 2013). TNF- $\alpha$  act on macrophagic function in human PCM, contributing to the formation of granulomas. The T-helper type 2 responses play an opposing role, in which the host becomes susceptible, producing IL-4, IL-5 and IL-10 cytokines, and the histological aspects present poorly organized granulomas (Murphy et al., 1994). The immune response pattern mediated by CD4+ T cells determines resistance or susceptibility contributing to immunoregulation in PCM (Thind et al., 2015).

In *P. brasiliensis* infections the CD4+ T cell subpopulations have been described capable of acting on immune responses against fungi such as: Th9, Th17 and Th22 cells. Patients with the acute clinical form of PCM they have a characteristic Th2/Th9 type response (Mendes et al., 2017). Prostaglandins produced by monocytes activate Th17 cells secreting cytokines such as IL-22, IL-23, IL-17, TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-6, IL-10 and IL-1 $\beta$ . Some immunoregulatory cytokines act on this Th17 response as: IL-10, TGF- $\beta$  and IL-4 (Cavassani et al., 2011). IL-17 producing cells promote an intense inflammatory process mediated by PMN and leading to resistance to the infectious process against *P.*

*brasiliensis* and *H. capsulatum*. Therefore, it is suggested increased IL-17 enhances the action of neutrophils decreasing fungal load (Thind et al., 2017).

Mutations in cellular and phagocytic immunity may be associated with susceptibility to fungal infections. Proteins that are part of the NADPH oxidase complex may be defective resulting in impaired production of reactive oxygen species or mutations that result in neutropenia, being considered risk factors in fungal infections. The response patterns regulated by Th1, Th2 and CD25+ T cells (Treg) (Romani, 2011). Deficiencies in inhibitory or regulatory T cells may be associated with poor prognosis in patients with sepsis (Ryan et al., 2017).

#### 3.2.2. Role of acquired humoral immune response

The role of specific anti-fungal antibodies in inducing protection in fungal infections was controversial for many years and previously considered non-existent or irrelevant. Moreover, some studies have shown that antibody-mediated immunity has a deleterious role, since fungal infection generates excessive humoral responses that can even cause damage to the host (Casadevall and Pirofski, 2011). Fungal antigens have also been associated with development of allergic pulmonary aspergillosis, mediated by IgE and fungal sinusitis and asthma caused by *C. neoformans* (Goldman et al., 2006). In PCM, humoral immunity was little addressed until 1990, because, similarly, it was considered less relevant to induce protection against *P. brasiliensis* and was considered important only as a diagnostic tool. However, studies have provided evidence that certain antibodies may modify the course of fungal infection to the benefit or detriment of the host. Thus, it was shown that in severe forms of PCM, patients have high titers of IgG4, IgA and IgE antibodies and also of granuloma suppressing cytokines such as IL-4, IL-5 and TGF- $\beta$  (Restrepo et al., 2011).

Recently it was suggested that antibodies can provide protection against fungal infections. Studies have shown that a monoclonal antibodies (mAb) to *Cryptococcus neoformans* were protective against cryptococcal infection suggesting that antibodies can modify the course of infection, conferring protection for the host, mediated by phagocytosis and the activation of the complement system mechanisms (Casadevall and Pirofski, 2012). In experimental PCM, studies have shown the role of monoclonal antibodies, revealing that mice immunized with a monoclonal antibody against *P. brasiliensis* 75 kDa protein were able to inhibit fungal growth presented less tissue inflammation in their lungs, with no granulomas formation (Xander et al., 2007). Another study revealed that mice passively immunized with a monoclonal antibody against the gp 70 kDa protein and infected with *P. brasiliensis* had no granuloma formation in the lungs (De Mattos Grosso et al., 2003).

These important contributions lead to the perspective of the development of therapeutic vaccines and antibody-mediated protection in fungal infections, including PCM (Casadevall and Pirofski, 2012)

## 4. Medication association and immunomodulation in fungal diseases

In an ideal situation, antifungal agents have the function of selectively destroying fungi and causing minimal side effects to the host. The major classes of antifungal drugs used in human treatment are the triazoles represented by Ketoconazole, Fluconazole, Voriconazole, Isavuconazole, Itraconazole, Polyenes like Amphotericin B and Echinocandins represented by Caspofungina, Micafungina and Anidulafungina (Seyedmousavi et al., 2017). However, there are fewer classes of antifungals when compared to the antibacterials available for treatment. This may be, due to difficulties or lack of interest in the development of new antifungal agents for the treatment of these mycoses.

The increase in the number of cases of fungal infections is associated with a higher number of oncologic patients, transplant recipients and



AIDS patients, comprising a large cohort of immunosuppressed individuals, highly susceptible to opportunistic fungi. The occurrence of mechanisms of intrinsic or extrinsic mutations of the pathogenic fungi, as well as the prolonged treatment time often accompanied by adverse reactions leading to the interruption of the therapy by the patients, and the ever increasing number of immunosuppressed individuals indicate the urgency of promoting research aiming for the discovery and development of new therapeutic alternatives and treatment protocols (Freitas et al., 2006). The fungal cell has some similarities with mammalian eukaryotes making it a challenge for the development of new therapeutic protocols. However, the interaction between host and fungal cell, consequently led to the exploration of new immunotherapeutic approaches (Salazar et al., 2018).

The therapeutic association as a new strategy in the treatment of mycoses can employ protein fractions, dead microorganisms, lipids, vitamins, synthetic or natural compounds associated with drugs already used in clinical practice. These compounds may present good prospects in modulating the immune response in order to enhance the activity of the immune system. Studies have been carried out regarding the use of drug combination and immunomodulation of the immune response, but there are still many aspects to be understood and defined (Freitas et al., 2006).

#### 4.1. Cytokine therapy

At first therapeutic protocols focused on the use of cytokines. Colony stimulating factor such as GM-CSF and G-CSF were successfully used in order to increase the number of myeloid cells and consequently to activate PMN. IFN- $\gamma$  was also used as an adjuvant therapy, since it has the ability to activate phagocytic cells and to restore defects in the Th1 response; such treatment was efficient in patients with chronic granulomatous disease due to cryptococcal meningitis (Salazar et al., 2018). Combinations of drugs have also been used in order to potentiate the therapeutic action. The combination of Itraconazole and Flucytosine in the treatment of chromoblastomycosis was found to be effective even in severe and subcutaneous forms, observing an additive effect against the fungus in which inhibition of ergosterol synthesis and suppression of DNA synthesis occurred respectively (Antonello et al., 2011). Another therapeutic alternative has been studied, with the use of anti-inflammatory drugs such as Meloxicam in the treatment of PCM in which a reduction in the number of granulomas in a murine model (Michelin et al., 2002). Celecoxib was used in the treatment of histoplasmosis demonstrating that there was an increase in CD4<sup>+</sup> T cells and reducing the production of inflammatory cytokines and chemokines concomitantly with preservation of the lung parenchyma (Pereira et al., 2013). An IL4 antagonist was used in combination with the antifungal agent with Amphotericin B and Fluconazole in the treatment of *C. albicans*, noting that there was a synergistic effect with the antifungal drug used, suggesting that the inhibition of IL-4 allows the expansion of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and the presence of IL-12 (Cenci et al., 1997).

#### 4.2. Role of vitamin D

The use of vitamin D has also been the subject of research because of the ability to stimulate innate immunity, in addition to presenting endocrine benefits. It has recently been demonstrated that calcitriol is able to regulate the immune response by Th1 and Th17 cells. In addition, it induces the production of cathelicidin and has demonstrated an ability to penetrate and inhibit the growth of *C. albicans*. Another activity presented by vitamin D is to modulate positively the immune response in bacterial infections. Vitamin D was used in association with Amphotericin B in the treatment of aspergillosis and it was observed that it decreased the toxicity of the drug, contributing to lessen the collateral effects of the therapy and leading to better outcome of the therapy (Sirivoranankul et al., 2014).

#### 4.3. Immunotherapy

In immunotherapy, monoclonal antibodies against *C. neoformans* were also observed, being beneficial in the treatment besides inducing opsonization and hindering the growth and fungal metabolism. In patients with AIDS and cryptococcosis meningitis treated with monoclonal antibody has the ability to reduce serum antigen titers of fungus (Salazar et al., 2018). Another alternative developed for the treatment against the *Cryptococcus gattii* strain was the use of purified pCramoll, an isolectin extracted from seeds of *Cratylia mollis*, a native species from Brazil in combination with Itraconazole. The results demonstrated a decrease in lung and brain fungal load along with the cytokine modulating effect of IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10 and IL-17 in treated mice, configuring satisfactory effects (Jandú et al., 2017).

Another alternative developed for the treatment against the *Cryptococcus gattii* strain was the use of purified pCramoll, an isolectin extracted from seeds of *Cratylia mollis*, a native species from Brazil in combination with Itraconazole. The results demonstrated a decrease in lung and brain fungal load along with the cytokine modulating effect of IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10 and IL-17 in treated mice, configuring satisfactory effects (Jandú et al., 2017).

#### 4.4. Cell therapy

Cell immunotherapy also presented satisfactory results mainly in transplanted patients. Satisfactory effects have already been demonstrated in the treatment of Epstein-Barr and cytomegalovirus. Based on these results the hypothesis of the use in fungal diseases was raised, precisely because it involves reconstitution of antifungal immunity, by the transfer of specific T cells. Experiments carried out in mice infected with *Aspergillus fumigatus* demonstrated enhanced resistance to infection, inducing higher production of memory cells (Gonzalez et al., 2017).

Pathogen-specific effector T cells play an important role in the control of viral and fungal infections in immunosuppressed individuals. T cell therapy is a promising alternative in the treatment of infectious diseases (Neumann-Haefelin and Thimme, 2013). Studies with chimeric antigen receptor T cells (CAR T cells) represent an important scientific advance especially in cancer treatment (Couzín-Frankel, 2016). CAR T cells have the specificity of monoclonal antibody combined with the effector functions of a cytotoxic T cells, whereas chimeric antigen receptors (CARs) are synthetic receptors that act to potentiate the action of these cells (Subklewe et al., 2019). There are few anti-infectious CARs described in the literature. CAR T cell therapy directed against opportunistic fungal infections, such as invasive aspergillosis has shown satisfactory results. The advantages of this alternative therapy are that it allows greater recognition of the antigen independent of the major histocompatibility complex and may have higher specificity, being important especially in infectious diseases because it can suppress the pathogen escape mechanisms (Seif et al., 2019).

#### 4.5. Antifungal vaccines

Antifungal vaccines have also become a treatment strategy in fungal diseases. Vaccines based on  $\beta$ -glucan molecules, a class of extracellular carbohydrate antigens that are expressed in fungal cells, have been used in experimental studies in mice, where the use of the vaccines provoked the production of antibodies of the IgG type and being effective in the treatment against infection by *C. albicans*. In another study using combination treatment with Fluconazole in mice with cryptococcosis, it demonstrated a modulating effect and could be used with a therapeutic alternative (Liaoa et al., 2016).

## 5. Immunomodulatory treatment and drug combination in paracoccidioidomycosis

The treatment used in PCM consists of drugs with antifungal action in particular on *P. brasiliensis*. The choice of the drug to be administered depends on some circumstances such as: severity of clinical condition, drug resistance, gastrointestinal absorption capacity, association with co-infections or other comorbidities such as cancer, adherence to treatment, and hypersensitivity reactions to the compounds present in the (Ambrósio et al., 2014). Treatment may occur through the administration of drugs such as Amphotericin B belonging to the class of Polyenes; Sulfadiazines derived from Sulfamidic or Ketoconazole, Fluconazole, Posaconazole, Voriconazole and Itraconazole which are derived from azole and Terbinafine (Mendes, 2009).

Sulfas were the first drugs used in the treatment of mycosis and continue to be used even in the present day including in the severe forms that affect children. The most commonly used treatment in children is the combination of Sulfamethoxazole and Trimethoprim both in oral and intravenous formulations, reserving the latter for acute/severe and neurological forms (Ambrósio et al., 2014; Mendes, 2009). Amphotericin B is another therapeutic option used in severe forms of PCM in both adults, children and adolescents; initially therapy is administered by the intravenous route until remission of the disease and later changed to oral formulations. This drug has side effects like nephrotoxicity so it should be used with caution (Amaral et al., 2009; Saldanha et al., 2016).

The discovery of imidazole and triazole derivatives has revolutionized the treatment of this disease, having good activity on *P. brasiliensis* and presenting few side effects, since the adverse effects are infrequent at the recommended doses and when they appear soft and controllable, such as nausea, vomiting, increased serum transaminases, rash, hypokalemia and hyperuricemia (Shikanai-Yasuda, 2015). Currently, data on the treatment of PCM with Itraconazole are more effective with shorter duration of treatment; other comparative studies show that the use of Itraconazole for the treatment of PCM has been the drug of choice in most cases (Goldani and Wirth, 2017).

In developing the therapeutic or prophylactic treatment in fungal diseases two characteristic are presented; the ability to reduce fungal load and reduce side effects. In the PCM some studies have been carried out in order to reduce the time of treatment and consequently reducing the damages caused by the immune response induced by the fungus. The antifungal agents routinely used in the treatment of PCM have protocols lasting from 2 to 6 months. The length of the treatment is due to the frequency means of relapse of the disease (Ruas et al., 2012). Therefore, the search for new therapeutic alternatives in order to immunomodulate the immune response is necessary.

A study conducted with the drugs Sulfamethoxazole/Trimetoprim combined a compound derived from the plant *Allium satum* that has been described antifungal activity. The results demonstrated positive effects during treatment in an animal model. The animals treated with the drug combination developed a Th1 immune response producing high levels of IFN- $\gamma$  and IL-12 and low levels of IL-10, and this treatment was protective to the host due to antifungal activity (Thomaz et al., 2008).

Some adverse effects may be observed when Itraconazole is used in the treatment of PCM, such as the presence of tissue fibrosis in patients with the chronic form of the disease. A study on the combined use of this antifungal with specific monoclonal antibody (mAb-anti-Ly6G) during the chronic phase of the disease reduced the number of fungi, inflammatory response and reduction of foci of fibrosis. The results suggest an infection control and reduction of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3, GATA-3, RORC, Ahr, MMP-1 $\alpha$ . These results were explained by the fact that the combination of drugs negatively regulates the inflammatory and pro-inflammatory genes (Arias et al., 2018). Another study associating Itraconazole with Pentoxifylline (the drug with immunomodulatory and antifibrotic properties) showed that

treated mice had a faster reduction of the granulomatous inflammatory process and foci of pulmonary fibrosis. These results were satisfactory when compared to Itraconazole monotherapy (Naranjo et al., 2011).

Cytokine stimulation of the Th1 response usually increases the efficacy of antifungal agents, but when Th2-type immunity is not desired, this type of response is detrimental to the fungus favoring the establishment of the infectious process. Thus, the efficacy of the treatment is dependent on the host's immune response and the strategy used in the treatment. Immunization with peptide 10 (this being the main diagnostic antigen of *P. brasiliensis* gp43), observed that the immunization and combination of mice had the production of IL-12 and IFN- $\gamma$  and reduction of IL-4 and IL-10. Thus, suggesting additive protection, however, even using p10 immunization without association with chemotherapy, effective results were observed in PCM (Travassos et al., 2012).

Rifampicin and Amphotericin B have also been used in combination in the treatment of PCM. The results demonstrated a potent antifungal effect in a shorter time of treatment and reduced cases of relapse of the disease after the end of the administration of the drugs. These results suggest that it was possible to improve the immune response of individuals receiving combination treatment (Wanke et al., 1984).

Using a  $\beta$ -glucan adjuvant stimulant in combination with Itraconazole in PCM-confirmed patients, they observed that this protocol reduced treatment time. The explanation of the efficacy of the combined treatment is that  $\beta$ -glucan induces a positive modulation of the immune response and the mechanisms as indeed happens are still not well established. Therefore, suggesting that it induces human monocytes to produce TNF- $\alpha$  and IL1 $\beta$ . Thus, the regression of the observed lesions may be associated with an improvement in the cellular immune response (Garcia et al., 2014).

The early studies with low level LASER therapy (LLLT) were directed to treat side effects caused by chemotherapy and radiotherapy in cancer patients (Mester, 1996). Woodruff et al., 2004 and Peplow et al., 2011 reviewed the anti-inflammatory effects of LLLT, the former focusing on LLLT as a photobiomodulator, acting on the release of growth factors and cytokines and the later on the effects of LLLT how the strategy for treating wounds. Experimental animal model studies using LLLT as a therapeutic alternative in PCM showed that it was able to reduce local inflammation produced by *P. brasiliensis* and influencing local cytokine production. (Ferreira et al., 2006). Its effects have an anti-inflammatory action increasing wound healing; it can act in intracellular processes, where light can be absorbed by components of the mitochondrial respiratory chain, which can result in increased ROS production. Studies have shown that LLLT is effective as an anti-inflammatory and is used in the treatment of PCM, where mice infected with *P. brasiliensis* and irradiated had a reduction of paw edema, and also presented a faster wound healing. Mice infected by *P. brasiliensis* were able to cause an increase in fungicide capacity and also allowed the recruitment of more active PMNs capable of combating the disease (Burger et al., 2015).

## 6. Current treatment guidelines and future treatment possibilities in PCM

From its discovery in 1908 by Adolfo Lutz, until 1940 PCM was considered a terminal disease because there were not adequate drugs for the treatment (Mendes et al., 2017). Studies describe that differently from other pathogenic fungi, *P. brasiliensis* and *P. lutzii* are susceptible to most antifungals. Despite being susceptible to most antifungal agents, Cotrimoxazole (Sulfamethoxazole/Trimetoprim combination), Amphotericin B and sometimes Itraconazole are the most commonly used drugs in clinical practice, due to their more accessible cost. Current PCM treatment guidelines describe that in mild and moderate forms 200 mg per day Itraconazole is the treatment of choice and may last from 9 to 18 months, with an average of 12 months, always evaluating the clinical, immunological and radiological parameters



(Shikanai-Yasuda et al., 2017). Voriconazole, Posaconazole and Isavuconazole may be considered as possible substitutes for Itraconazole (Mendes et al., 2017). As a second alternative of treatment choice in mild and moderate forms Cotrimoxazole has shown satisfactory results in the treatment of these patients. However, in severe and disseminated forms Amphotericin B in deoxycholate or in lipid formulation is indicated for treatment and may be administered for an average of 2 to 4 weeks. After clinical improvement, oral treatment is used. However, when Amphotericin B treatment is not possible, intravenous formulation of Cotrimoxazole or Fluconazole is recommended (Shikanai-Yasuda et al., 2017). There are many challenges during the treatment of this systemic mycosis and the physician must always take into consideration the possibility of relapse and the onset of sequelae due to long treatment. Clinical cure is considered when there are no signs and symptoms of disease and normalization of the erythrocyte sedimentation rate (Mendes et al., 2017).

One of the challenges for therapeutic success in this mycoses is the socioeconomic status of most patients; as it mainly affects rural workers with low level of education, and difficulty in accessing health services, these patients are more susceptible to delays in diagnosis, which may contribute to the progression of the disease that may evolve generating sequelae (Shikanai-Yasuda et al., 2017). When it comes to the treatment itself, the challenges that can be encountered during the treatment protocol established in patients with PCM are diverse. As already mentioned, the treatment of this mycosis is prolonged, the drugs have collateral effects, thus provoking low adherence to the treatment by the patient. As the choice of the drug to be used depends on the clinical form of the disease, a patient with mild to moderate clinical form, treated by oral medication has a rapid clinical improvement and may abandon the established therapy before reaching the cure criteria (Mendes et al., 2017; Shikanai-Yasuda et al., 2017). In addition, clinical follow-up is required in these patients who are being treated and if drug dose adjustment is needed, side effects may also arise, requiring switching to another drug. Finally, even with clinical improvement throughout the treatment it is necessary to follow this patient precisely in order to avoid relapses of the disease (Shikanai-Yasuda et al., 2015; Shikanai-Yasuda, 2017). The use of the term “definitive cure” in PCM patients cannot be applied because the treatment does not totally eradicate *P. brasiliensis*. The treatment aims to reduce the number of fungal cells and to allow the recovery of cellular immunity (Shikanai-Yasuda, 2015). Therefore, the use of drugs that stimulate the immune system can help to reduce the treatment time and reduce the challenges encountered in treating these mycoses.

One of the future possibilities of PCM treatment described in the literature is the use of corticosteroids combined with antifungals. There are few reports on the use of this therapeutic combination, but such approach has been studied because PCM has the presence of intense inflammation in affected patients. Studies report that the use of different anti-inflammatory drugs may reduce inflammation during antifungal therapy and lead to better clinical results in histoplasmosis (Pereira et al., 2013) and PCM (Shikanai-Yasuda et al., 2017).

Immunostimulants such as  $\beta$ -glucan has been a promising alternative in combined treatment, showing satisfactory results in animal model (García et al., 2014). This alternative can potentiate the mechanisms of the immune response and thus present better clinical cure results. Low-level LASER therapy is also another promising alternative in treating mycoses. The use of this therapy to reduce the intense inflammatory response, as well as to activate the incoming neutrophils, in combination with the conventional drugs therapy is aimed to reduce treatment time as well as to potentiate the mechanisms of immune response against these fungi.

Combining compounds extracted from plants with antifungals used in clinical practice is also another promising alternative treatment. Research on new antifungal drugs from plant extracts, such as propolis, have shown that macrophages stimulated with this extract showed higher fungicidal activity against *P. brasiliensis* (Murad et al., 2002).

Drug association has shown promise in the treatment of mycosis mostly when using drugs with already known pharmacological mechanisms and possible interactions with other substances. Thus, the combination of these therapeutic agents would reduce the time necessary for the development of new drugs.

## 7. Conclusion

Fungal diseases in general and especially PCM are a public health problem in Latin America. One of the important measures that would help to identify the real extent of PCM in these endemic areas, particularly Brazil is the compulsory notification of this disease to the health authorities, as is required with tuberculosis and AIDS and the creation of national notification registers via access to medicines. These actions would allow to assess the current epidemiological impact of PCM, for example, as it was found to be the 5th cause of death from infectious diseases. The introduction of simple diagnostic methods for different mycoses which would facilitate the determination of the most efficient and least prolonged treatment protocols would also provide much progress in this field.

Fungal infections present a high incidence in healthy and mainly immunosuppressed individuals. The prevalence of PCM in Brazil is high in different regions and affects individuals who work in agriculture, which is a strong economic sector in the country. This particular mycosis is still considered a neglected disease, precisely because it occurs in rural environments, affecting mostly low-income individuals who have not adequate medical care. Such problems favor that individuals affected with PCM are diagnosed at more advanced stages of the disease, therefore compromising the treatment and decreasing the possibility of rapid and complete cure with few side effects and no sequelae.

Current treatment guidelines for PCM are; the use of Itraconazole in mild and moderate forms, always evaluating the patients' clinical condition. Another alternative also established by the guidelines is the use of Cotrimoxazole also in mild and moderate clinical forms. In severe forms the established treatment is the use of Amphotericin B in deoxycholate or in lipid formulation.

The development of new drugs especially antifungals takes many years of research and investment. The use of drugs in combination is a promising strategy for the standardization of new treatment protocols for fungal diseases treatment. However, for the development of new treatment protocols, studies need to be intensified in order to understand the effects of the combination of drugs on the body and how they can improve or even enhance the action of the immune system. Antifungal treatment and the host immune response are known to interact and any mechanism that interferes with the host immune response will reflect on therapeutic success. Thus, knowing the etiological agent of the disease and its genetic/biological aspects, the search for new drugs association and immunomodulation in fungal infections and in particular in paracoccidioidomycosis is of great relevance. It is also worth noting that the use of new treatment strategies such as low-level LASER therapy, natural products, vitamins and immunotherapy, which are therapeutic alternatives that do not initially have side effects combined with the established and standardized treatments may reduce treatment time.

## Declaration of Competing Interest

None.

## Acknowledgements

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (APQ 012941-16), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (305216/2016-3) and Santos, LA and Grisolia, JC are recipient of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)



## scholarships.

## References

- Amaral, A.C., Bocca, A.L., Ribeiro, A.M., Nunes, J., Peixoto, D.L.G., Simioni, A.R., Primo, F.L., Lacaia, Z.G.M., Bentes, R., Títze-de-Almeida, R., Tedesco, A.C., Morais, P.C., Felipe, M.S.S., 2009. Amphotericin B in poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and dimercaptosuccinic acid (DMSA) nanoparticles against paracoccidioidomycosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 63, 526–533.
- Ambrósio, A.V.A., Camelo, C.C.S., Barbosa, C.V., Tomazatti, F.G., Brazões, F.A., de, S., Veloso, J.M., Rodrigues, G.V., Rodrigues, L.F., Oliveira, P.L.D.de, Aguiar, R.A., Siqueira, V.S., Jardim, V.B., Gontijo, V.A.C., Moura, A.C.L.de, Paula, L.de, Santos, L.da S., Sulmonetti, N., Freitas, R.M.de, Cruz, S.G.da, Araújo, S.de A., Pedroso, V.S.P., Siqueira, W.C., Rachel, F.R.-S., Caligiorno, B., Góes, A.M., Ferreira, C.S., Pedroso, E.R.P., 2014. Paracoccidioidomycosis disease (Lutz-Splendore-Almeida disease): additional workup, differential diagnosis, cure control. *Rev. Médica Minas Gerais.* 24, 81–92.
- Armstrong-James, D., et al., 2017. Immunotherapeutic approaches to treatment of fungal diseases. *Lancet Infect. Dis.* 17, 393–402.
- Antonello, V.S., Silva, M.C.A.da., Cambruzzi, E., Kliemann, D.A., Santos, B.R., Queiroz-Telles, F., 2011. Treatment of severe chromoblastomycosis with itraconazole and 5-fluorouracil association. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 52, 329–331.
- Arias, J.D.P., Tamayo, P.A.P., Arango, J.C., Salazar-Pérez, L.M., González, A., 2018. Itraconazole in combination with neutrophil depletion reduces the expression of genes related to pulmonary fibrosis in an experimental model of paracoccidioidomycosis. *Med. Mycol.* 5 (1), 579–590 56.
- Benard, G., Hong, M.A., Del Negro, G.M.B., Batista, L., Shikhan Yasuda, M.A., Duarte, A.J.da S., 1996. Antigen-specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis. *Am. J. Trop. Med. Hygiene* 54 (1), 7–12.
- Brown, G.D., Denning, D.W., Gow, N.A.R., Levitz, S.M., Netea, M.G., White, T.C., 2012. Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med* 4, 165rv13.
- Burger, E., Mendes, A.C.S.C., Bani, G.M.A.C., Brigagão, M.R.P.L., Santos, G.B., Malaquias, L.C.C., Chavasco, J.K., Verinaud, L.M., de Camargo, Z.P., Hamblin, M.R., Sperandio, F.F., 2015. Low-level laser therapy to the mouse femur enhances the fungicidal response of neutrophils against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Plos Negl. Trop. Dis.* 9, 1–19.
- Burger, E., Nishikaku, A.S., Gameiro, J., Francelin, C., Camargo, Z.P., et al., 2013. Cytokines expressed in the granulomatous lesions in experimental paracoccidioidomycosis: role in host protective immunity and as fungal virulence factor. *J. Clin. Cell Immunol.* 51, 10.
- Burger, E., 2010. *Immunologia das micoses*. In: ZAITZ, C (Ed.), *Compêndio De Micologia Médica*, 2 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, pp. 108–122.
- Calich, V.L.G., Pina, A., Felonato, M., Bernardino, S., Costa, T.A., Loures, F.V., 2008. Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and myd88 in paracoccidioidomycosis. *Fems Immunol. Med. Microbiol.* 53, 1–7.
- Camargo, Z.P., De Franco, M.F., 2000. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev. Iberoam. Micol.* 17, 41–48.
- Casadevall, A., Pirofski, L., 2012. Immunoglobulins in defense, pathogenesis and therapy of fungal diseases. *Cell Host Microbe.* 17 (5), 447–456.
- Casadevall, A., Pirofski, L.A., 2011. A new synthesis for antibody-mediated immunity. *Nat. Immunol.* 13, 21–28.
- Cavassani, K.A., et al., 2011. Cell-free antigens from *Paracoccidioides brasiliensis* drive IL-4 production and increase the severity of paracoccidioidomycosis. *PLoS ONE* 6 (6), 214–223.
- Cenci, E., et al., 1997. Induction of protective Th1 responses to *Candida albicans* by antifungal therapy alone or in combination with an interleukin-4 antagonist. *J. Infect. Dis.* 176, 217–226.
- Couzin-Frankel, J., 2016. Cancer immunotherapy. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 8363, 167–189.
- Cunha, C., et al., 2014. Neutrophil responses to aspergillosis: new roles for old players. *Mycopathologia* 178, 387–393.
- De Mattos Grosso, D., de Almeida, S.R., Mariano, M., Lopes, J.D., 2003. Characterization of gp70 and Anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. *Infect. Immun.* 71 (11), 6534–6542.
- Drummond, R.A., Saijo, S., Iwakura, Y., Brown, G.D., 2011. The role of Syk/CARD9 coupled C-type lectins in antifungal immunity. *Eur. J. Immunol.* 41, 276–281.
- Ferreira, M.C., Brito, V.N., Gameiro, J., Costa, M.R.S.N., Vasconcelos, E.C.C., Cruz-Hoffling, M.A., Verinaud, L., 2006. Effects of hene laser irradiation on experimental paracoccidioidomycotic lesions. *J. Photochem. Photobiol. B.* 84 (2), 141–149.
- Ferriotti, C., Bazan, S.B., Loures, F.V., Araújo, E.F., Costa, T.A., Calich, V.L.G., 2015. Expression of dectin-1 and enhanced activation of NALP3 inflammasome are associated with resistance to paracoccidioidomycosis. *Front. Microbiol.* 6, 1–13.
- Fortes, M.R.P., Miot, H.A., Kurokawa, C.S., Marques, M.E.A., Marques, S.A., 2011. Immunology of paracoccidioidomycosis. *An. Bras. Dermatol.* 86, 516–525.
- Franco, M., Montenegro, M.R., Mendes, R.P., Marques, S.A., Dillon, N.L., Mota, N.G., 1987. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 20, 129–132.
- Freitas, J.C.de O.C., Medeiros, A.da C., Sales, V.S.de F., 2006. Proteção pela glucana em modelo experimental de seps. *Acta Cir. Bras.* 19, 296–307.
- Garcia, N.G., Oliveira, D.T., Pereira, A.A.C., De Sá Magalhães, E.M., Hanemann, J.A.C., 2014. Extensive cutaneous lesions in paracoccidioidomycosis successfully treated with itraconazole and  $\beta$ -glucan. *Int. J. Dermatol.* 53, 2013–2015.
- Gegembauer, G., Araujo, L.M., Pereira, E.F., Rodrigues, A.M., Paniago, A.M.M., Hahn, R.C., de Camargo, Z.P., 2014. Serology of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii*. *Plos Negl. Trop. Dis.* 8 (7), e2986.
- Goldani, L.Z., Wirth, F., 2017. Animal models and antifungal agents in paracoccidioidomycosis: an overview. *Mycopathologia.* 182, 633–643.
- Goldman, D.L., Davis, J., Bommarito, F., Shao, X., Casadevall, A., 2006. Enhanced allergic inflammation and airway responsiveness in rats with chronic *Cryptococcus neoformans* infection suggests a potential role for fungal pulmonary infection in the pathogenesis of asthma. *J. Infect Dis* 193, 1178–1186.
- Gonzalez, G.C., Clancy, L.E., Gottlieb, D., 2017. Prospects for adoptive T-cell therapy for invasive fungal disease. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 30, 518–527.
- Jandú, J.J., Costa, M.C., Santos, J.R.A., Andrade, F.M., Magalhães, T.F., Silva, M.V., Castro, M.C.A.B., Coelho, L.C.B.B., Gomes, A.G., Paixão, T.A., Santos, D.A., Correia, M.T.S., 2017. Treatment with pCramoll alone and in combination with fluconazole provides therapeutic benefits in *C. gattii* infected mice. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 1–11.
- Kashino, S.S., Fazioli, R.A., Cafalli-Favati, C.Z., Meloni-Bruneri, L.H., Vaz, C.A.C., Burger, E., Singer-Vermees, L.M., Calich, V.L.G., 2000. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN gamma production. *J. Interf. Cytokine Res.* 20 (1), 89–97.
- Kashino, S.S., Fazioli, R.A., Moscardi-Bacchi, M., Franco, M., Singer-Vermees, L.M., Burger, E., Calich, V.L.G., 1995. Effect of macrophage blockade on the resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Mycopathologia* 130, 131–140.
- Lehrbecher, T., et al., 2013. Immunotherapy in invasive fungal infection – focus on invasive aspergillosis. *Curr. Pharm. Des.* 19, 3689–3712.
- Liao, G., et al., 2016. 6-O-Branched oligo- $\beta$ -glucan-based antifungal glycoconjugate vaccines. *ACS Infect. Dis.* 2 (2), 123–131.
- Martinez, R., 2015. Epidemiology of paracoccidioidomycosis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 57, 11–20.
- Medici, N.P., Poeta, M.Del., 2015. New insights on the development of fungal vaccines: from immunity to recent challenges. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 110, 966–973.
- Mendes, R.P., Cavalcante, R.de S., Marques, S.A., Marques, M.E.A., Venturini, J., Sylvestre, T.F., Paniago, A.M.M., Pereira, A.C., da Silva, J.de F., Fabro, A.T., Bosco, S.de M.G., Bagagli, E., Hahn, R.C., Levorato, A.D., 2017. Paracoccidioidomycosis: current perspectives from Brazil. *Open Microbiol. J.* 11 (1), 224–282.
- Mendes, R.P., 2009. Paracoccidioidomycosis. In: Rocha, MOC, Pedroso, ERP (Eds.), *Fundamentos Em Infectologia*. Rio de Janeiro: Rubio, pp. 945–994.
- Mester, E., 1996. The use of laser beam in therapy. *Orv Hetil.* 107, 1012–1016.
- Michelin, M.A., Figueiredo, F., Cunha, F.Q., 2002. Involvement of prostaglandins in the immunosuppression occurring during experimental infection by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Exp. Parasitol.* 102 (3–4), 170–177.
- Murad, J., Calvi, S., Soares, A.M.V., Bankova, V., Sforzin, J., 2002. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against paracoccidioides brasiliensis. *J. Ethnopharmacol.* 79 (3), 331–334.
- Murphy, J.W., Wu-HSIEH, Singer-Vermees L.M., Ferrante, A., Moser, S., Russo, M., Vaz, C.A., Burger, E., Calich, V.L., Kowanko, I.C., 1994. Cytokines in the host response to mycotic agents. *Med. Mycol.* 32, 203–210.
- Naranjo, T.W., et al., 2011. Combined itraconazole-pentoxifylline treatment promptly reduces lung fibrosis induced by chronic pulmonary paracoccidioidomycosis in mice. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 24 (1), 81–91.
- Neumann-Haefelin, C., Thimme, R., 2013. Adaptive immune responses in hepatitis e virus infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 369, 243–262.
- Pagliari, C., et al., 2010. Characterization of cytotoxic immune response in skin and mucosal lesions of paracoccidioidomycosis. *J. Cutan. Pathol.* 37, 565–570.
- Peplow, P.V., Chung, T.Y., Ryan, B., Baxter, G.D., 2011. Laser photobiomodulation of gene expression and release of growth factors and cytokines from cells in culture: a review of human and animal studies. *Photomed. Laser Surg.* 29, 285–304.
- Pereira, P.A.T., Trindade, B.C., Secatto, A., Nicolette, R., Peres-Buzalaf, C., Ramos, S.G., Sadikot, R., Bitencourt, C.da S., Faccioli, L.H., 2013. Celecoxib improves host defense through prostaglandin inhibition during *Histoplasma capsulatum* infection. *Mediators Inflamm.* 2013, 1–11.
- Posch, W., Steger, M., Wilflingseder, D., Lass-Flörl, C., 2017. Promising immunotherapy against fungal diseases. *Expert Opin. Biol. Ther.* 17, 861–870.
- Restrepo, A., et al., 2011. Paracoccidioidomycosis. edit. In: KAUFFMAN, C.A (Ed.), *Essentials of Clinicals Mycology*, 2 ed. Springer, New York, pp. 367–385.
- Rodrigues, D.R., Dias-Melicio, L.A., Calvi, S.A., Peraçoli, M.T.S., Soares, A.M.V.C., 2007. *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. *Med. Mycol.* 45, 27–33.
- Romani, L., 2011. Immunity to fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 275–288.
- Romagnolo, A.G., de Quaglia, E., Silva, J.C., Della Coletta, A.M., Gardizani, T.P., Martins, A.T.L., et al., 2018. Role of Dectin-1 receptor on cytokine production by human monocytes challenged with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycoses* 61, 222–230.
- Ruas, L.P., Carvalho, F.C., Roque-Barreira, M.C., 2012. ArtinM offers new perspectives in the development of antifungal therapy. *Front. Microbiol.* 3, 1–6.
- Ryan, T., Coakley, J.D., Martin-Loeches, I., 2017. Defects in innate and adaptive immunity in patients with sepsis and health care associated infection. *Ann. Transl. Med.* 5 447–447.
- Salazar, F., Brown, G.D., 2018. Antifungal innate immunity: a perspective from the last 10 years. *J. Innate Immun.* 10, 1–25.
- Salazar, M.E., Restrepo, A., Stevens, D.A., 1988. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect. Immun.* 56, 711–713.
- Saldanha, C.A., Garcia, M.P., Iocca, D.C., Rebelo, L.G., Souza, A.C.O., Bocca, A.L., Almeida Santos, M.de F.M., Morais, P.C., Azevedo, R.B., 2016. Antifungal activity of amphotericin b conjugated to nanosized magnetite in the treatment of paracoccidioidomycosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, 1–18.
- Schmidt, S., Tramsen, L., Lehrbecher, T., 2017. Natural killer cells in antifungal immunity. *Front. Immunol.* 8, 1–10.

- Seif, M., Einsele, H., Loeffler, J., 2019. CAR T cells beyond cancer: hope for immunomodulatory therapy of infectious diseases. *Front. Immunol.* 10, 2711.
- Seyedmousavi, S., Rafati, H., Ilkit, M., Toloee, A., Hedayati, M.T., Verweij, P., 2017. Systemic antifungal agents: current status and projected future developments. *Methods Mol. Biol.* 1508, 107–139.
- Shikanai-Yasuda, M.A., Mendes, R.P., Colombo, A.L., Queiroz-Telles, F.de, Kono, A.S.G., et al., 2017. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 5 (50), 715–740 Shikanai-Yasuda, M.A., 2015. Paracoccidioidomycosis treatment. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 57, 31–37.
- Sirivoranankul, C., Martínez, M., Chen, V., Clemons, K.V., Stevens, D.A., 2014. Vitamin D and experimental invasive aspergillosis. *Med. Mycol.* 52, 847–852.
- Subklewe, M., Von Bergwelt-Baildon, M., Humpe, A., 2019. Chimeric antigen receptor T cells: a race to revolutionize cancer therapy. *Transfus. Med. Hemotherapy* 46, 15–24.
- Thind, S.K., Taborda, C.P., Nosanchuk, J.D., Thind, S.K., Taborda, C.P., Nosanchuk, J.D., 2017. Dendritic cell interactions with *Histoplasma* and *Paracoccidioides*. *Virulence* 6 (5), 424–432.
- Thomaz, L., Apitz-Castro, R., Marques, A.F., Travassos, L.R., Taborda, C.P., 2008. Experimental paracoccidioidomycosis: alternative therapy with ajoene, compound from *Allium sativum*, associated with sulfamethoxazole/trimethoprim. *Med. Mycol.* 46, 113–118.
- Travassos, L.R., Taborda, C.P., 2012. Paracoccidioidomycosis vaccine. *Hum. Vaccines Immunother.* 8, 1450–1453.
- Underhill, D.M., Pearlman, E., 2015. Immune interactions with pathogenic and commensal fungi: a two-way street. *Immunity* 43 (5), 845–858 17.
- Wanke, B., et al., 1984. Associação da rifampicina à anfotericina B no tratamento da paracoccidioidomycose. *Rev. Inst. Med. Trop.* 26 (4), 205–211.
- Wanke, B., Aidé, M.A., 2010. Capítulo 6 - Paracoccidioidomycose. *J. Bras. Pneumol.* 35, 1245–1249.
- Woodruff, L.D., Bounkeo, J.M., Brannon, W.M., Dawes, K.S., Barham, C.D., Waddell, D.L., Enwemeka, C.S., 2004. efficacy of laser therapy in wound repair: a meta-analysis of the literature. *Photomed. Laser Surg.* 22 (3), 241–247.
- Xander, P., et al., 2007. A surface 75 kDa protein with acid phosphatase activity recognized by monoclonal antibodies that inhibit *Paracoccidioides brasiliensis* growth. *Microbes Infection* 9, 1484–1492.
- Xidieh, C.F., Lenzi, H.L., Calich, V.L.G., Burger, E., 1999. influence of the genetic background on the pattern of lesions developed by resistant and susceptible mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Microbiol. Immunol.* 188, 41–49.



## Seroepidemiological survey on sporotrichosis-infection in rural areas of the south of Minas Gerais State, Brazil

Julianne Caravita Grisolia<sup>1</sup> · Lauana Aparecida Santos<sup>2</sup> · Leticia Maria Leomil Coelho<sup>1</sup> · Roberta Ribeiro Silva<sup>3</sup> · Zoilo Pires de Camargo<sup>4</sup> · Tania Regina Grão Velloso<sup>5</sup> · Luiz Felipe Leomil Coelho<sup>6</sup> · Jorge Kleber Chavasco<sup>6</sup> · Luiz Cosme Cotta Malaquias<sup>6</sup>

Received: 1 October 2019 / Accepted: 16 April 2020  
 © Sociedade Brasileira de Microbiologia 2020

### Abstract

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis caused by traumatic inoculation into the skin by fungi species of the genus *Sporothrix*. The disease has different clinical manifestations (cutaneous, lymphocutaneous, and disseminated), and can also progress to a systemic infection. Despite having a worldwide distribution, sporotrichosis is most prevalent in tropical and subtropical countries. In Brazil, reports of the disease are higher frequent, where cases of the disease were found in Rio de Janeiro, Sao Paulo, Curitiba, Pernambuco, and Paraiba, among others. Certain groups of people may be more exposed to the causative agent of disease, such as residents of rural areas. Thus, this work aimed to carry out a seroepidemiological survey of the prevalence of sporotrichosis in four rural locations in the south of Minas Gerais State, Brazil. In this study, we used an indirect ELISA test in the survey on the prevalence of sporotrichosis. Data obtained in this study evaluated a population of 631 individuals and showed a prevalence of 44.69%. The distribution of seroprevalence of sporotrichosis with respect to age groups and gender showed no significant statistical difference. Thus, we found a high seroprevalence of sporotrichosis-infection in rural regions of southern Minas Gerais State, Brazil, with no difference in prevalence in relation to gender and age.

**Keywords** Sporotrichosis · *Sporothrix* · ELISA · Seroprevalence

Responsible Editor: Sandro Rogério de Almeida.

✉ Luiz Cosme Cotta Malaquias  
[luizcosme@hotmail.com](mailto:luizcosme@hotmail.com)

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas a Saúde, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, Brazil

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, Brazil

<sup>3</sup> Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, Brazil

<sup>4</sup> Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

<sup>5</sup> Departamento de Clínica Odontológica, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil

<sup>6</sup> Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 - Centro, Alfenas, Minas Gerais 37130-001, Brazil

### Introduction

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis characterized by lesions in the skin and subcutaneous tissue caused by inoculation of species of the *Sporothrix* genus. Infection with this fungus is related to areas of the body exposed to trauma, such as upper limbs, face, and lower limbs, usually caused by traumatic inoculation with material contaminated with *Sporothrix* conidia [1]. *Sporothrix schenckii* was considered a unique pathogenic species on the earliest reports of sporotrichosis; however, genetic sequencing studies confirmed that *S. schenckii* was composed of the cryptic species: *S. albicans*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. luriei*, *S. mexicana*, and *S. schenckii* [2–4]. *S. brasiliensis* and *S. schenckii* are common in Brazil, *S. mexicana* is present in Mexico, and *S. globosa* is common in countries such as China, India, Japan, USA, Spain, and Italy [5, 6].

This disease presents the following clinical forms: localized, disseminated, lymphocutaneous, and extracutaneous [7, 8]. The lymphocutaneous form presents nodular and ulcerated infiltrations at the site of inoculation and may compromise



lymphatic vessels evolving into a systemic form [1]. In disseminated cutaneous form, there may be involvement of one or more organs, usually associated with some debilitating disease [9]. The pulmonary (extracutaneous) form manifests itself through the inhalation of conidia, usually related to immunodeficiency [10]. The severity of the clinical forms of sporotrichosis depends on the site of inoculation, depth of infection, the virulence of the fungal strain, and the patient's immune status [11, 12].

There is a difference between sporotrichosis-disease and sporotrichosis-infection. In the case of sporotrichosis-infection, the individuals present a healthy appearance and a positive reaction to *Sporothrix* spp. antigens in intradermal or serological tests but show no sign of the clinical disease. On the other hand, patients with sporotrichosis-disease have cutaneous and serological positive tests and present clinical signs of the disease [13, 14]. In the last years in Brazil, a significant increase in confirmed clinical cases of sporotrichosis in cats and in humans leads to an interest in studies on this disease [15–17].

The serological tests used in the routine diagnostic include agglutination, immunoprecipitation, and immunoenzymatic tests. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) has been used to diagnose different pathologies. For sporotrichosis, ELISA has been used with antigens produced from the crude extract of yeast or filamentous form of the fungus or purified antigens. Studies performed by Almeida-Paes et al. [13] found a specificity of 89% and a sensitivity of 97%. Fernandes et al. [18] using the crude exoantigen extract obtained a sensitivity of 96% and specificity of 98%.

Due to the lack of data on the prevalence of sporotrichosis-infection, the present study was carried out with the objective to access the seroprevalence of sporotrichosis in rural areas of the south of Minas Gerais State.

## Materials and methods

### Location, study population, and sample selection

A total of 631 serum samples were collected from residents of rural areas from south of Minas Gerais State, Brazil. The main work activity was related to coffee plantation. Most workers also cultivated vegetable gardens as a subsistence activity. The graphical representation of the cities is shown in Fig. 1. Recruitment of residents was done by spontaneous demand. The health worker from each locality announced the day of the meeting. After clarifying the objectives of the research, free and informed consent term was read and signed. Pregnant women and children under 10 were excluded from the study. Subsequently, the registration form was filled out, with personal data such as full name, date of birth, profession, marital status, gender, residence, naturalness, telephone number, general health status, and medications in use. During the interview, it

was assessed the resident's knowledge of signs and symptoms that might indicate prior contact with sporotrichosis. They also reported had not previously undergone sporotrichin skin test assessment. After authorization of the residents, blood was collected to obtain the serum. This work was approved by the Research Ethics Committee of UNIFAL-MG. Also, in the accomplishment of this study, 10 sera were used from sporotrichin-negative individuals as a negative control. The sporotrichin-negative group consisted of students reporting no previous sporotrichosis and did not use immunosuppressive drugs, in addition to the sporotrichin-negative skin test. And as positive control in the ELISA test, a group composed of sera from 3 patients with sporotrichosis. Sera from patients with paracoccidioidomycosis were used to check cross-reaction because this mycosis is also present in rural areas. Confirmation of both diseases was performed by clinical and laboratory examination (visualization of fungal elements compatible with *Sporothrix* sp. in culture, sporotrichin test for sporotrichosis, and histopathological and double immunodiffusion tests for paracoccidioidomycosis).

### Production of *S. schenckii* antigens

The strain (Ss118) used in this study is available in the culture collection of the Mycology bank of the Evandro Chagas Clinical Research Institute, Fiocruz, Brazil. The *S. schenckii* antigen was produced according to the method described by Mendoza et al. [19]. Briefly, pure yeast *Sporothrix schenckii* cultures were centrifuged at 5000g for 10 min at 4 °C and washed 3 times in sterile saline, where supernatants were discarded after centrifugation for removing impurities, and the pellets were frozen in liquid nitrogen. The stored pellets were macerated to a fine powder, vortexed for 30 min at 4 °C in Tris-Ca<sub>2</sub> buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.8, 2 mM CaCl<sub>2</sub>) containing a commercial cocktail of protease inhibitors (1:1000) (GE Healthcare), RNase and DNase (1:1000) (GE Healthcare), and 600 µm glass beads (1:1) (Sigma). Cell debris and glass beads were removed by centrifugation at 5000g for 10 min at 4 °C, at the end dithiothreitol (20 mM) was added. For determination of total antigen proteins, the Bradford method was used (BRADFORD; 1976), after the extracts were kept at –80 °C until use.

### Enzyme-linked immunosorbent assay

The ELISA technique was performed according to the protocol proposed by Coelho et al. [20]. Briefly, 96-well polystyrene plates were sensitized with crude extract of *S. schenckii* fungus at a concentration of 5 µg/mL in 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6 overnight at 4 °C. Afterward, the plate was washed with 0.9% NaCl solution and blocked with 200 µL per well with 5% skimmed milk powder solution in PBS-TWEEN at 37 °C for 1 h. The plate was washed again



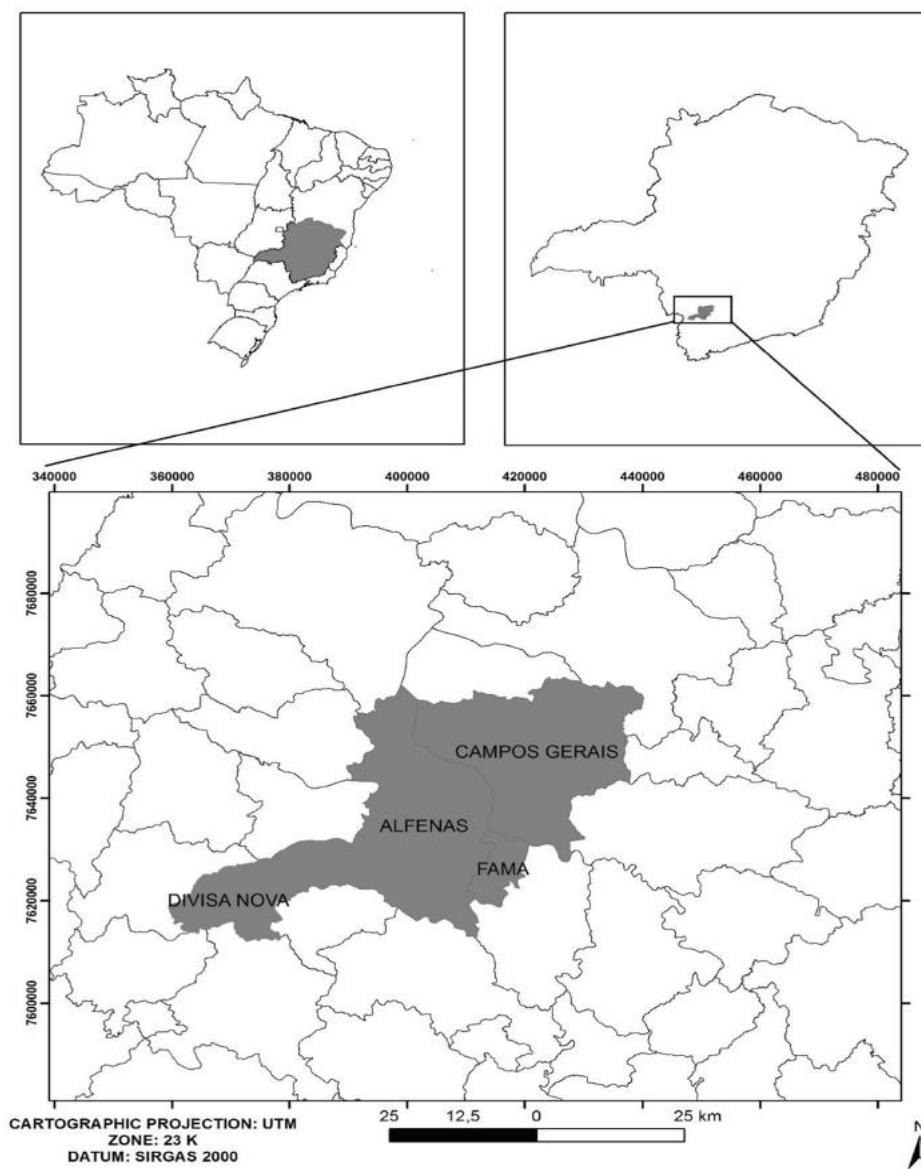


Fig. 1 Map of the region where the data were collected showing the different cities in the south of Minas Gerais State, Brazil

**Table 1** Distribution of gender and age average (minimum to maximum) among rural dwellers

|                               | Male                  | Female                | Total                 |
|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Number (%)                    | 344 (54.52%)          | 287 (45.48%)          | 631 (100%)            |
| Age average (minimum-maximum) | 43.31 ± 16.35 (10-86) | 41.57 ± 14.92 (12-82) | 42.52 ± 15.67 (10-86) |

**Table 2** Distribution of seroprevalence of sporotrichosis in rural dwellers by gender

| ELISA    | Gender       |              | Total        | <i>p</i> <sup>*</sup> |
|----------|--------------|--------------|--------------|-----------------------|
|          | Male         | Female       |              |                       |
| Negative | 55.52% (191) | 55.05% (158) | 55.31% (349) | 0.428                 |
| Positive | 44.48 (153)  | 44.95% (129) | 44.69% (282) |                       |
| Total    | 100% (344)   | 100% (287)   | 100% (631)   |                       |

\**p* value obtained by chi-square test and significance level at 5%

with 0.9% NaCl solution and dilutions of the sera (1/800, 1/1600, 1/3200, 1/6400) in PBS-TWEEN with 3% gelatin were added to respective wells. The plate was then incubated for 1 h at 37 °C and after this time and was washed with 0.9% NaCl solution. After this period, it was added 100 µL of 6 M urea solution for 5 min and the plate washed again as described above. One hundred microliters per well of the peroxidase-labeled goat anti-human IgG serum conjugate (SIGMA-ALDRICH) at 1:8000 dilution in PBS-TWEEN containing 3% gelatin was incubated for 1 h at 37 °C. The plate was washed with 0.9% NaCl solution. In each well, 100 µL of o-phenylenediamine (OPD) (SIGMA-ALDRICH) substrate was added (20 mg of OPD, 40 mL of 0.1 M citrate buffer, pH 4.5 and 40 µL of 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and allowed to stand for 8 min in the absence of light. The reaction was then stopped by the addition of 30 µL of 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> per well. The plate reading was performed by optical density using the wavelength of 490 nm in a plate reader (ZENITH). The cut-off point was calculated between the mean optical density of sera from sporotrichin-negative individuals plus twice the standard deviation for each plate at serum dilution at 1/1600. Optical density values above the cut-off point were considered positive and below negative.

### Data analysis

Frequency distributions of socio-demographic data (age and gender) were performed and these were distributed according to the results obtained in the positive or negative ELISA test. The descriptive analysis of the data was performed using the statistical program SPSS (version 19); analysis of the

frequency and distribution of the main variables were performed, aiming to characterize the population served. For the continuous variables, the mean, median, and quartiles were calculated. The existence of an association between the continuous variables was evaluated using analysis of variance for comparisons between groups. Categorical variables were compared using the chi-square test.

## Results

### Population characterization

A total of 631 sera of individuals living in the rural areas from south of Minas Gerais State, Brazil (Alfenas, Divisa Nova, Campos Gerais, and Fama) were evaluated. Among these individuals, 344 were male (54.52%) and 287 were female (45.48%). The mean age was 42.52 ± 15.67 years. The minimum age was 10 years and the maximum age was 86 years (Table 1).

### Seroprevalence of sporotrichosis by the ELISA test using sera from rural dwellers

The data presented in Table 2 shows that the prevalence of sporotrichosis in rural dwellers was 44.69% (153 males and 129 females, respectively), presenting a positivity of 44.48% for males and 44.95% for females gender (*p* = 0.428) using the sera dilution at 1/1600. The same result was found using the cut-off point for sera dilutions of 1/3200 and 1/6400 (data not shown).

Regarding the distribution by age group, the prevalence in the age group of 16 to 29 years was 44.44% and in the age group of 30 to 49 years was 44.68%. In individuals older than 50 years old, the prevalence was 44.86%. The data did not differ statistically (*p* = 0.997) (Table 3).

### Seroprevalence distributions of sporotrichosis by cities

The prevalence found in the rural areas studied ranged from 36.9 to 48.08% and did not present statistical difference (*p* = 0.375) (Table 4).

**Table 3** Distribution of seroprevalence of sporotrichosis in rural dwellers by age group

| ELISA    | Age range (years) |              |              | Total        | <i>p</i> <sup>*</sup> |
|----------|-------------------|--------------|--------------|--------------|-----------------------|
|          | 16–29             | 30–49        | > 50         |              |                       |
| Negative | 55.56% (80)       | 55.31% (151) | 55.14% (118) | 55.31% (349) | 0.997                 |
| Positive | 44.44% (64)       | 44.68% (122) | 44.86% (96)  | 44.69% (62)  |                       |
| Total    | 100% (144)        | 100% (273)   | 100% (214)   | 100% (631)   |                       |

\**p* value obtained by chi-square test and significance level at 5%

**Table 4** Distribution of sporotrichosis prevalence by different localities

| ELISA    | Cities      |               |            |              | Total        | <i>p</i> * |
|----------|-------------|---------------|------------|--------------|--------------|------------|
|          | Divisa Nova | Campos Gerais | Fama       | Alfenas      |              |            |
| Negative | 51.92% (27) | 54.13% (131)  | 63.1% (65) | 53.84% (126) | 55.31% (349) | 0.375      |
| Positive | 48.08% (25) | 45.87% (111)  | 36.9% (38) | 46.16% (108) | 44.69% (282) |            |
| Total    | 100% (52)   | 100% (242)    | 100% (103) | 100% (234)   | 100% (631)   |            |

\**p* value obtained by chi-square test and significance level at 5%

Regarding the female gender in relation to the studied localities, the prevalence of sporotrichosis also did not present a significant statistical difference ( $p = 0.582$ ) (Table 5).

The prevalence of sporotrichosis in the male gender in relation to the studied localities did not present a statistically significant difference ( $p = 0.371$ ) (Table 6).

## Discussion

Sporotrichosis has a wide geographic distribution, presenting a variable prevalence between countries and regions [8], being more frequent in tropical zones, where the environmental conditions favor the propagation of the fungus [21]. In Brazil, the most common species are *S. schenckii* and *S. brasiliensis* [5]. Cases of the disease vary from region to region, and the State of Rio de Janeiro is considered endemic to the disease due to the high rate of zoonotic transmission by cats [16, 22]. In the State of Minas Gerais, data on sporotrichosis prevalence are scarce [23].

The soil has always been considered one of the main reservoirs of *Sporothrix* genus, constituting an important source of contamination. The disease is most commonly observed in individuals who are in close contact with plants and soil, reinforcing the importance of this study carried out in rural locations [24].

The gold standard diagnosis for sporotrichosis-disease is the identification of the fungus in biological samples or in culture. Although the test has a high specificity, its sensitivity is low, which can lead to false-negative diagnoses [25]. For the diagnosis of sporotrichosis and other subcutaneous diseases, serological tests are also used, among them the enzyme immunoassay (ELISA). The ELISA test for sporotrichosis was described

in the literature presenting a good specificity and sensitivity [26]. In this work, an ELISA test was used as a tool to survey the seroprevalence of sporotrichosis-infection in rural locations. In order to decrease possible cross-reactions, several dilutions of serum and treatment with 6M urea solution were used. The treatment with 6M urea was able to eliminate the low-affinity Ag-Ac bonds, aiming the detection of antibodies with high affinity and decreasing false-positive results [27, 28]. The study conducted by Coelho et al. [20] showed efficient discrimination among sera from patients with sporotrichosis, patients with paracoccidioidomycosis, and from sporotrichin-negative individuals using the same ELISA technique [27]. In the present work, the seroprevalence of sporotrichosis-infection was done using the same technique described by Coelho et al. Namujju et al. [28] were able to associate high- and low-affinity antibodies in African women at risk of infection by certain human papillomavirus (HPV) strains using the ELISA test similar to that employed by Coelho et al. [20].

Barros et al. [29] described an epidemic of sporotrichosis-disease in humans in Rio de Janeiro, resulting from the zoonotic transmission. The study was based on information provided by 255 individuals, being 94 infected and 161 without symptoms of the disease. The prevalence of sporotrichosis was four times higher among individuals who lived in contact with infected cats. In this way, there was a higher prevalence in women over 40 years old, who were involved in domestic work. Data obtained from hunters in the south of Minas Gerais State showed the prevalence of sporotrichosis-infection with a higher prevalence in men over 40 years of age, being these rural workers with an exposition of a high risk of contamination [21].

The seroprevalence of sporotrichosis-infection found in this work was 44.69% with a similar distribution between male and female gender (Table 2). Data on the prevalence of

**Table 5** Distribution of the prevalence of sporotrichosis by female gender in relation to different localities

| ELISA    | Cities      |               |             |              | Total      | <i>p</i> * |
|----------|-------------|---------------|-------------|--------------|------------|------------|
|          | Divisa Nova | Campos Gerais | Fama        | Alfenas      |            |            |
| Negative | 8.23% (13)  | 38.61% (61)   | 20.89% (33) | 32.28% (51)  | 100% (158) | 0.582      |
| Positive | 6.98% (9)   | 39.53% (51)   | 13.95% (18) | 39.53% (51)  | 100% (129) |            |
| Total    | 7.67% (22)  | 39.02% (112)  | 17.77% (51) | 35.54% (102) | 100% (287) |            |

\**p* value obtained by chi-square test and significance level at 5%



**Table 6** Distribution of prevalence of sporotrichosis by male gender in relation to different localities

| ELISA    | Cities      |               |             |              | Total      | <i>p</i> * |
|----------|-------------|---------------|-------------|--------------|------------|------------|
|          | Divisa Nova | Campos Gerais | Fama        | Alfenas      |            |            |
| Negative | 7.33% (14)  | 36.65% (70)   | 16.75% (32) | 39.27% (75)  | 100% (191) | 0.371      |
| Positive | 10.46% (16) | 39.22% (60)   | 13.07% (20) | 37.25% (57)  | 100% (153) |            |
| Total    | 8.72% (30)  | 37.79% (130)  | 15.12% (52) | 38.37% (132) | 100% (344) |            |

\**p* value obtained by chi-square test and significance level at 5%

sporotrichosis-infection are rare. Rodrigues and de Resende [23] found a prevalence of 13.67% for sporotrichosis-infection in 417 employees of Morro Velho mining in Minas Gerais State using intradermal sporotrichin test. In turn, Sánchez-Alemán, Araiza, and Bonifaz [30] described a prevalence of 6.25% in a sample of 144 individuals for sporotrichosis in Mexico also using intradermal test. Data reported by Ghosh et al. [31] in India report prevalence of sporotrichosis ranging from 22.9 to 40.0% also using the intradermal test. They also observed that the prevalence increased according to the increase of the age and in both genders, being higher in populations that engaged in horticulture, gardening, and carpentry (43.2%) and agriculture (33.9%), similar prevalence to the ones found in the present study.

Regarding the age groups, seroprevalence did not present a statistical difference either ( $p = 0.997$ ), and the prevalence found in individuals aged between 10 and 29 years was 44.44%, in the age range of 30 to 49 years was 44.68%, and in the age group over 50 years was 44.86% (Table 3). The data presented in this work are different from the data presented by Ghosh et al. [31] who reported that the prevalence increased as the age groups increased. The data presented herein related to the age groups also differ from those presented by Alves et al. [21] evaluating sporotrichosis-disease in rural workers and Barros et al. [29] evaluating domestic workers, since both identified a higher prevalence of sporotrichosis over 40 years.

No significant difference in the prevalence among the different locations in rural areas analyzed was found (48.08%, 45.87%, 36.9%, and 46.16% in the localities of Divisa Nova, Campos Gerais, Fama, and Alfenas, respectively) ( $p = 0.375$ ) (Table 4). Also, the prevalence did not vary statistically in the male and female genders relative to the rural areas studied ( $p = 0.371$  and  $p = 0.582$ , respectively) (Tables 5 and 6).

According to Barros et al. [29], sporotrichosis affects both genders and all age groups. Regarding the prevalence between men and women and among the age groups, it is both related to the exposure to the fungus. Brazil has had sporotrichosis outbreaks where the main means of transmission occur due to contact with infected felines. This is a very particular disease transmission profile of urban localities (cities), whose residents adopt the cat as a pet [14, 16, 17, 22]. In the rural locations studied, the main domestic animal adopted by the residents was the dog raised in the peridomicile. Obviously, we cannot rule out transmission of the disease via contact with

infected cats, but we believe this is less likely because of the profile of the population studied.

It is important to emphasize that the present study was carried out with residents of rural areas, where coffee culture stands out. These localities have proximity among them, characterized as a mesothermal tropical climate region (hot and humid). This might explain why no statistically significant differences were found in the prevalence of sporotrichosis in relation to gender and age groups and among rural areas studied.

The seroprevalence of sporotrichosis-infection in rural localities of the South of Minas Gerais State was reported for the first time and data here presented show no difference in prevalence between age groups or gender.

**Acknowledgments** We thank Prof. Dr. Mario Leon Silva Vergara from Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) for providing sera and information about the medical status of the patients included in this study. Also, we thank Dr. Anderson Messias Rodrigues for their critical review of the manuscript.

### Compliance with ethical standards

After clarifying the objectives of the research, free and informed consent term was read and signed. This work was approved by the Research Ethics Committee of UNIFAL-MG.

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

### References

- Lopes-Bezerra LM, Schubach A, Costa RO (2006) Sporotrichosis schenckii. *An Acad Bras Cienc* 78:293–308. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652006000200009>
- Alba-Fierro CA, Pérez-Torres A, Toriello C, Romo-Lozano Y, López-Romero E, Ruiz-Baca E (2016) Molecular components of the *Sporothrix schenckii* complex that induce immune response. *Curr Microbiol* 73(2). <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1045-5>
- de Araujo ML, Rodrigues AM, Fernandes GF, de Camargo ZP, de Hoog GS (2015) Human sporotrichosis beyond the epidemic front reveals classical transmission types in Espírito Santo, Brazil. *Mycoses* 58(8):485–490. <https://doi.org/10.1111/myc.12346>
- Teixeira MM, de Almeida LGP, Kubitschek-Barreira P, Alves FL, Kioshima ÉS, Abadio AKR, Fernandes L, Derengowski LS, Ferreira KS, Souza RC, Ruiz JC, de Andrade NC, Paes HC, Nicola AM, Albuquerque P, Gerber AL, Martins VP, Peconick



- LDF, Neto A, Chaucanez CB, Silva PA, Cunha OL, de Oliveira FFM, dos Santos TC, Barros ALN, Soares MA, de Oliveira LM, Marini MM, Villalobos-Duno H, Cunha MML, de Hoog S, da Silveira JF, Henriessat B, Niño-Vega GA, Cisalpino PS, Mora-Montes HM, Almeida SR, Stajich JE, Lopes-Bezerra LM, Vasconcelos ATR, Felipe MSS (2014) Comparative genomics of the major fungal agents of human and animal Sporotrichosis: *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. *BMC Genomics* 15:943. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-943>
5. Mahajan VK (2014) Sporotrichosis: an overview and therapeutic options. *Dermatol Res Pract* 2014:1–13. <https://doi.org/10.1155/2014/272376>
  6. Chakrabarti A, Bonifaz A, Gutierrez-galhardo MC, Mochizuki T, Li S (2014) Global epidemiology of sporotrichosis. 2015:3–14. doi:<https://doi.org/10.1093/mmy/myu062>
  7. Romero-cabello R, Bonifaz A, Romero-ferregrino R et al (2011) Disseminated sporotrichosis. *BMJ Case Rep* 2011:4–7. <https://doi.org/10.1136/bcr.2010.3404>
  8. Orofino-costa R. Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics\*. 606–620
  9. Schechtman RC (2010) Sporotrichosis: part I. *Skinmed* 8(4):216–220
  10. Neto JP, Machado AA, Castro G De, Alda S, Quaglio S (1999) Esporotricose cutânea disseminada como manifestação inicial da síndrome da imunodeficiência adquirida - relato de caso Acquired immunodeficiency syndrome presenting as disseminated cutaneous sporotrichosis - case report. 32(1):57–61. doi:<https://doi.org/10.1590/S0037-86821999000100011>
  11. Vásquez-del-Mercado E, Arenas R, Padilla-Desgarenes C (2012) Sporotrichosis. *Clin Dermatol* 30(4):437–443. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2011.09.017>
  12. García Camero L, Lozoya Pérez N, González Hernández S, Martínez Álvarez J (2018) Immunity and treatment of sporotrichosis. *J Fungi* 4(3):100. <https://doi.org/10.3390/jof4030100>
  13. Almeida-Paes R, Pimenta MA, Pizzini CV et al (2007) Use of mycelial-phase *Sporothrix schenckii* exoantigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of sporotrichosis by antibody detection. *Clin Vaccine Immunol* 14(3):244–249. <https://doi.org/10.1128/CVI.00430-06>
  14. Brandolt TM, Madrid IM, Poester VR et al (2019) Original article human sporotrichosis : a zoonotic outbreak in southern Brazil, 2012–2017. *M arcia* 2018:1–7. <https://doi.org/10.1093/mmy/myy082>
  15. Paes R de A (2007) Antígenos e anticorpos na esporotricose: caracterização e aplicações diagnósticas. xi,86-xi,86. <http://search.bvsalud.org/portal/resource/en/lil-493823>
  16. Barros MBDL, Schubach ADO, do Valle ACF et al (2004) Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. *Clin Infect Dis* 38:529–535. <https://doi.org/10.1086/381200>
  17. Boechat JS, Marques M, Oliveira E et al (2018) Feline sporotrichosis : associations between clinical-epidemiological profiles and phenotypic-genotypic characteristics of the etiological agents in the Rio de Janeiro epizootic area. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 113: 185–196. <https://doi.org/10.1590/0074-02760170407>
  18. Fernandes GF, Lopes-Bezerra LM, Bernardes-Engemann AR, Schubach TMP, Dias MAG, Pereira SA, Camargo ZP (2011) Serodiagnosis of sporotrichosis infection in cats by enzyme-linked immunosorbent assay using a specific antigen, SsCBF, and crude exoantigens. *Vet Microbiol* 147(3–4):445–449. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.07.007>
  19. Mendoza M, Díaz AM, Hung MB, Zambrano EA, Díaz E, De Alborno MC (2002) Production of culture filtrates of *Sporothrix schenckii* in diverse culture media. *Med Mycol* 40(5):447–454. <https://doi.org/10.1080/mmy.40.5.447.454>
  20. Coelho LML, Grisolia JC, Lúcia M et al (2019) Effects of metaperiodate and urea solutions on the serological diagnosis of human sporotrichosis using an indirect ELISA test. *Brazilian J Med Biol Res* 50(1):139–145
  21. Alves SH, Boettcher CS, De Oliveira DC et al (2010) Sporothrix schenckii associated with amadillo hunting in Southern Brazil : epidemiological and antifungal susceptibility profiles Sporothrix schenckii relacionado à caça ao tatu no Sul do Brasil : aspectos epidemiológicos e suscetibilidade. *Rev Soc Bras Med Trop* 43(5): 523–525. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822010000500010>
  22. Montenegro H, Rodrigues AM, Dias MAG, da Silva EA, Bernardi F, de Camargo ZP (2014) Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: an emerging animal infection in São Paulo, Brazil. *BMC Vet Res* 10(1):269. <https://doi.org/10.1186/s12917-014-0269-5>
  23. Rodrigues M, de Resende M (1996) Epidemiologic skin test survey of sensitivity to paracoccidioidin, histoplasmin and sporotrichin among gold mine workers of Morro Velho Mining, Brazil. *Mycopathologia* 135(2):89–98
  24. da Rosa ACM, Scroferneker ML, Vettorato R, Gervini RL, Vettorato G, Weber A (2005) Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. *J Am Acad Dermatol* 52(3 Pt 1): 451–459. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2004.11.046>
  25. Schechtman RC (2010) Sporotrichosis part II. *Skinmed* 8(4):275–280
  26. Bernardes-Engemann AR, De Lima Barros M, Zeitone T, Russi DC, Orofino-Costa R, Lopes-Bezerra LM (2015) Validation of a serodiagnostic test for sporotrichosis: a follow-up study of patients related to the Rio de Janeiro zoonotic outbreak. *Med Mycol* 53(1): 28–33. <https://doi.org/10.1093/mmy/myu058>
  27. Pajuaba ACAM, Silva DAO, Mineo JR (2010) Evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assays and IgG avidity assays using a protein A-peroxidase conjugate for serological distinction between *Brucella abortus* S19-vaccinated and -infected cows. *Clin Vaccine Immunol* 17(4):588–595. <https://doi.org/10.1128/CVI.00444-09>
  28. Namujju PB, Hedman L, Hedman K, Banura C, Mbidde EK, Kizito D, Byaruhanga RN, Muwanga M, Kirnbauer R, Surcel HM, Lehtinen M (2011) Low avidity of human papillomavirus (HPV) type 16 antibodies is associated with increased risk of low-risk but not high-risk HPV type prevalence. *BMC Res Notes* 4(1964):170. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-170>
  29. Barros MB d L, Schubach TP, Coll JO, Gremião ID, Wanke B, Schubach A (2010) Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. *Rev Panam Salud Pública* 27(6):455–460. <https://doi.org/10.1590/S1020-49892010000600007>
  30. Sánchez-Alemán M, Araiza J, Bonifaz A (2004) Isolation and characterization of wild *Sporothrix schenckii* strains and investigation of sporotrichin reactors. *Gac Med Mex* 140(5):507–512
  31. Ghosh A, Chakrabarti A, Sharma V, Singh K, Singh A (1999) Sporotrichosis in Himachal Pradesh (north India). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93(1):41–45

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## ANO DE 2019 RESUMOS EM ANAIS NACIONAIS E INTERNACIONAIS

Effect of antifungal and anti-inflammatory therapy on the granulomatous response in experimental paracoccidioidomycosis

Burger E.<sup>1</sup>, Santos L.A.<sup>2,3</sup>, Caravita Grisolia J.<sup>2,3</sup>, Oliveira A.M.<sup>4</sup>, Malaquias L.C.C.<sup>2</sup>, Rodrigues A.M.<sup>5</sup>, Camargo Z.P.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Federal University of Alfenas-UNIFAL, Microbiology and Immunology, Alfenas, Brazil, <sup>2</sup>Federal University of Alfenas-UNIFAL, Microbiology and Immunology, Biomedical Sciences Institute, Alfenas, Brazil, <sup>3</sup>CAPES Scholarship, Brasilia, Brazil, <sup>4</sup>University José do Rosário Vellano, University Hospital - Pathology, Alfenas, Brazil, <sup>5</sup>Federal University of São Paulo-UNIFESP, Microbiology, Immunology and Parasitology; Escola Paulista de Medicina, São Paulo, Brazil

Paracoccidioidomycosis is a very severe granulomatous mycosis caused by the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* (*Pb*). Previously, we characterized the striking differences in granulomatous lesions associated with susceptible or resistant mice. In the former, we found multiple non-encapsulated granulomas with numerous budding *Pb* yeasts, suggesting viability. In the later, we observed massive destruction of *Pb* contained in few granulomas, delimited by thick collagen type I fibers.

With these parameters established, we could monitor whether a novel, experimental combined therapy could elicit alterations in granulomas patterns from susceptible to resistant pattern.

Swiss mice were intraperitoneally infected with *Pb* and three days later treatment was initiated with daily doses of either itraconazole (3mg/mL), celecoxib (6mg/mL) or both itraconazole (3mg/mL)/celecoxib (6mg/mL) for 15 days, when they were sacrificed and the spleen, lungs, liver and

### P401

Efficacy of Celecoxib solely or in combination with Itraconazole in the treatment of murine paracoccidioidomycosis

E. Burger<sup>1</sup>, L.A. Santos<sup>1</sup>, J.C. Grisolia<sup>1</sup>, N.A. Dias<sup>1</sup>, F.B.D.A. Paula<sup>2</sup>, A.M. De Oliveira<sup>3</sup>, A.M. Rodrigues<sup>4</sup>, Z.P.D. Camargo<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department Of Microbiology And Immunology, Federal University of Alfenas, Alfenas, Brazil, <sup>2</sup>Department Of Clinical And Toxicological Analysis - Pharmaceutical Sciences Faculty, Federal University of Alfenas, Alfenas, Brazil, <sup>3</sup>Laboratory Of Pathology - José Do Rosário Vellano University, UNIFENAS, Alfenas, Brazil, <sup>4</sup>Department Of Microbiology, Immunology And Parasitology, Federal University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

**Objectives:** Our objective is to evaluate the effectiveness of Celecoxib, of Itraconazole and both, as a combined treatment for paracoccidioidomycosis, a highly prevalent granulomatous mycosis in Latin America using a murine model.

**Methods:** Mice were intraperitoneally infected with a virulent *P. brasiliensis* isolate and three days later, daily administration by gavage of either 3mg/mL Itraconazole (I), or 6mg/mL Celecoxib (C) or both 3mg/mL Itraconazole and 6mg/mL Celecoxib (I+C) was initiated and kept for 15 days. Controls included infected, non-treated mice (*Pb*) and non-infected mice. Body weight and survival rate were monitored daily. At 7 and 15 days of infection, delayed type hypersensitivity (DTH) was evaluated and serum was obtained for specific anti-*P. brasiliensis* IgG antibody determination. At the last day of treatment, the mice were sacrificed and spleen, lungs, liver and epiploic/pancreas were collected and their macroscopic characteristics were analyzed. Following, the organs were either processed and stained with H/E for general histology, or macerated, for quantification of viable fungi.

**Results:** There was no difference in the body weight of infected, treated or uninfected controls and there were no deaths registered during this early phase of the infection in mice from any group. In all experimental groups, DTH decreased from day 7 to day 15 and, in contrast, specific IgG titers

increased from day 7 to day 15. But At 15 days, both, DTH reactivity and IgG titers were the highest in the Pb group, lower in the I group and in the C group, and the lowest in the I+C group. This decrease in both cellular and humoral specific immunity in the groups most treatment-covered may be explained by the elimination of viable *P. brasiliensis* by the drugs, rendering a full immune response less necessary. The histological aspects demonstrated that treatment with I+C was the one that reduced the most the number of lesions and the severity of the granulomatous response in all organs. When analyzing the control of fungal growth in the tissues, both mice from the I and from the C groups showed less fungi scattered in the tissue than mice from the Pb group; however the lowest numbers of fungi were found in mice from the I+C group. In the epiplooo, which is the organ of shock for this model of *P. brasiliensis* infection, the animals of the I+C group had the fewest fungi with preserved morphology. The same was found in terms of viable fungi, as the number of CFUs was lower in all organs of treated mice, and more markedly in those receiving the combined I+C therapy.

**Conclusion:** We showed the effect of the antifungal drug Itraconazole and also of the anti-inflammatory drug Celecoxib at the tissue level. This is the first report of the direct effect of Celecoxib on *P. brasiliensis* as well as in combination with Itraconazole. Our results suggest that this combined treatment employing an antifungal and an anti-inflammatory drug may constitute a new efficient therapeutic strategy. Grants: CNPq 305216/2016-3 and FAPEMIG APQ 012941-16. L.A. Santos and J.C. Grisolia are recipient of CAPES scholarships.

ISSN 2237-3446  
Volume 55  
Junho 2019

JORNAL BRASILEIRO DE  
**PATOLOGIA E  
MEDICINA LABORATORIAL**

BRAZILIAN JOURNAL OF PATHOLOGY AND LABORATORY MEDICINE

Uma publicação conjunta das sociedades: SBPCML (Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial), SBP (Sociedade Brasileira de Patologia) e SBC (Sociedade Brasileira de Citopatologia)

**SUPLEMENTOS PATOLOGIA**





## TÍTULO

INFLUENCE OF ANTIFUNGAL AND ANTIFLAMMATORY TREATMENT ON GRANULOMATOUS RESPONSE OF PARACOCCIDIOIDOMYOSIS IN THE EARLY STAGES OF THE DISEASE.

| Autor                   | Instituição | Cidade | UF | País |
|-------------------------|-------------|--------|----|------|
| LAUANA APARECIDA SANTOS | UNIFAL      |        |    |      |

| Autor             | Instituição | Cidade | UF | País |
|-------------------|-------------|--------|----|------|
| Santos, L.A.      | UNIFAL      |        |    |      |
| Santos, L.A.      | UNIFAL      |        |    |      |
| Grisolia, J.C.    | UNIFAL      |        |    |      |
| Malaquias, L.C.C. | UNIFAL      |        |    |      |
| De Oliveira, A.M. | UNIFENAS    |        |    |      |
| Verinaud, M.C.L.  | UNICAMP     |        |    |      |
| De Camargo, Z.P.  | UNICAMP     |        |    |      |
| Burger, E.        | UNIFAL      |        |    |      |

| Área de Conhecimento |
|----------------------|
| PATOLOGIA INFECCIOSA |

## CONTEÚDO

The thermo-dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) is the etiological agent of paracoccidioidomycosis, the systemic granulomatous mycosis of greatest prevalence in Brazil. If the disease is established, the treatment is long and complicated, therefore justifying studies on the influence of antifungal therapy on the pathological mechanisms of defense against Pb. In the present study, mice were ip infected with the virulent isolate Pb18 and 3 days later, gavage treatment was started with itraconazole (itra) [3mg/mL], or celecoxib (cxb) [6mg/mL] or combination of itra [3mg/mL]/cxb [6mg/mL] and kept for 15 days daily. At 7 and 15 days post-infection the mice were, weighed, delayed type hypersensitivity test (DHT) was performed with paracoccidioidin and whole blood was collected to obtain serum for specific antibody titers determinations by ELISA. The mice were sacrificed at 15 days post-infection, spleen, lungs, liver and epiploon/pancreas were collected, weighed, measured, processed and stained with H/E for general histology, macerated for colony forming units (CFU) quantification and nitric oxide (NO) dosage. The results showed that mice treated with cxb/itra had lower DTH reactions as well as lower titers of specific IgG antibodies when compared to those of the untreated infected group. Total body weight was not influenced by the treatment, but the spleen and epiploon/pancreas had lower weight and the lungs had smaller volume in the group treated with cxb/itra. The diameter of the organs was not statistically different. The number of CFU was lower for all organs and the NO concentration was lower in the liver and epiploon/pancreas in the cxb/itra treated group, when compared with the infected untreated group. In general, histology data showed that cxb/itra treatment reduced the number of lesions and the severity of the granulomatous response in all organs. The epiploon/pancreas is the organ of shock for this model of Pb infection, and in cxb/itra treated mice fewer fungi with preserved morphology were observed. These results strongly suggest that this combination of drugs influenced the control of the granulomatous response in a positive way, helping to combat Pb, suggesting that this therapy positively interacted with the immunopathological response, resulting in a marked reduction of the granulomatous lesions characteristic of this severe mycosis.

## TÍTULO

STEREOLOGY OF THE GRANULOMATOUS RESPONSE OF MICE TREATED WITH ITRACONAZOLE AND CELECOXIB IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS

| Autor                   | Instituição                     | Cidade | UF | País |
|-------------------------|---------------------------------|--------|----|------|
| LAUANA APARECIDA SANTOS | UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS |        |    |      |

| Autor             | Instituição                     | Cidade | UF | País |
|-------------------|---------------------------------|--------|----|------|
| Santos, L.A.      | UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS |        |    |      |
| Santos, L.A.      | UNIFAL                          |        |    |      |
| Grisolia, J.C.    | UNIFAL                          |        |    |      |
| De Oliveira, A.M. | UNIFENAS                        |        |    |      |
| Malaquias, L.C.C. | UNIFAL                          |        |    |      |
| Verinaud, M.C.L.  | UNICAMP                         |        |    |      |
| De Camargo, Z.P.  | UNICAMP                         |        |    |      |
| Burger, E.        | UNIFAL                          |        |    |      |

| Área de Conhecimento |
|----------------------|
| PATOLOGIA INFECCIOSA |

## CONTEÚDO

Paracoccidioidomycosis is a granulomatous disease caused by the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb). The benign forms of this mycosis are characterized by the presence of compact granulomas with few fungi, mostly with altered morphology. In severe forms, loose granulomas, necrosis and numerous fungi with preserved morphology can be found. The treatments available are limited, and understanding the mechanisms of granulomatous response during new therapeutic alternatives is of paramount importance. Swiss mice were ip infected with the virulent Pb18 isolate and after three days, treatment was initiated with either itraconazole (itra) [3mg/mL], or celecoxib (cxb) [6mg/mL] or both itra [3mg/mL]/cxb [6mg/mL] and maintained for 15 days, daily. At that time the mice were sacrificed and the spleen, lungs, liver and epiploon were collected, processed, stained with H/E and analyzed for stereological studies to evaluate tissue cellularity, numbers of inflammatory cells, vases, neovas and granulomas, and also for differential counts of peripheral blood cells. Inflammation scores and granulomatous lesions types were also analysed. The results showed that in mice receiving cxb/itra the number of neutrophils in peripheral blood decreased when compared to those of untreated infected animals. Tissue cellularity showed the same alterations, in all organs: the number of inflammatory cells decreased gradually in the lungs liver and epiploon, the groups treated with cxb, itra and cxb/itra. When analyzing the inflammation score, we observed that the mice treated with cxb/itra had a moderate score in all organs. The numbers of vessels and neovas were lower in the lungs and epiploon in the cxb/itra treated groups when compared with the other groups. The total granulomas numbers in liver, lungs and epiplon decreased in the groups treated with either cxb, itra or cxb/itra. When evaluating the type of granulomas formed, we found that the mice treated with cxb/itra had fewer exudative and organized granulomas when compared to the other groups, for all organs. Our results allow to conclude that combined cxb/itra therapy markedly decreased the lesions caused by the fungus. Grants: CNPq 305216/2016-3 and FAPEMIG APQ 012941-16. Grisolia, JC and SANTOS, LA are recipient of CAPES scholarships.

## PREMIAÇÃO ANO DE 2019



**CERTIFICADO**

**32º CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA**  
Fortaleza / Ceará - CEC  
FOCALIZANDO O FUTURO 02 a 05 de maio de 2019

Conferimos ao trabalho

**STEREOLOGY OF THE GRANULOMATOUS RESPONSE OF MICE TREATED WITH ITRACONAZOLE AND CELECOXIB IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS**

dos autores LAUANA APARECIDA SANTOS; LAUANA APARECIDA SANTOS; JULIANNE CARAVITA GRISOLIA; ADRIANO MACEDO DE OLIVEIRA; LUIZ COSME COTTA MALAQUIAS; LIANA MARIA CARDOSO VERINAUD; ZOILO PIRES DE CAMARGO; EVA BURGER O "Prêmio SBP Categoria Pôster" pelo trabalho apresentado na modalidade Categoria Pôster, durante o 32º Congresso Brasileiro de Patologia, realizado de 02 a 05 de maio de 2019 no Centro de Eventos do Ceará em Fortaleza/CE.

Fortaleza, 05 de maio de 2019

|   |   |   |
|---|---|---|
|  |  |  |
| <b>Dr Clóvis<br/>Clock</b>  | <b>Dr. Cleto<br/>Nogueira</b>   | <b>Dra. Katia Ramos<br/>Moreira Leite</b>   |
| Presidente da<br>Sociedade Brasileira<br>de Patologia                                 | Presidente do 32º<br>Congresso Brasileiro de<br>Patologia                             | Presidente da Comissão<br>Científica do 32º<br>Congresso Brasileiro de<br>Patologia   |

 Sociedade Brasileira de PATOLOGIA

 **AMB**  
Associação Médica Brasileira

 CNA



**CERTIFICADO**




Conferimos ao trabalho


**INFLUENCE OF ANTIFUNGAL AND ANTIFLAMMATORY TREATMENT ON GRANULOMATOUS RESPONSE OF PARACOCCIDIOIDOMYOSIS IN THE EARLY STAGES OF THE DISEASE.**

dos autores LAUANA APARECIDA SANTOS; LAUANA APARECIDA SANTOS; JULIANNE CARAVITA GRISOLIA; LUIZ COSME COTTA MALAQUIAS; ADRIANO MACEDO DE OLIVEIRA; LIANA MARIA CARDOSO VERINAUD; ZOILO PIRES DE CAMARGO; EVA BURGER O "Prêmio SBP Categoria Oral" pelo trabalho apresentado na modalidade Categoria Apresentação Oral , durante o 32º Congresso Brasileiro de Patologia, realizado de 02 a 05 de maio de 2019 no Centro de Eventos do Ceará em Fortaleza/CE.

Fortaleza, 05 de maio de 2019

  
 Dr Clóvis  
 Clock  
 Presidente da  
 Sociedade Brasileira  
 de Patologia

  
 Dr. Cleto  
 Nogueira  
 Presidente do 32º  
 Congresso Brasileiro de  
 Patologia

  
 Dra. Katia Ramos  
 Moreira Leite  
 Presidente da Comissão  
 Científica do 32º  
 Congresso Brasileiro de  
 Patologia

