



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS DE ARAGUAÍNA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE ANIMAL E SAÚDE PÚBLICA
NOS TRÓPICOS**

FABIANE MOREIRA DA SILVA SANTOS

Quantificação de *Paracoccidioides brasiliensis* em granulomas pulmonares de camundongos experimentalmente infectados e tratados com nanopartículas de itraconazol por via inalatória

ARAGUAÍNA/TO
2022

FABIANE MOREIRA DA SILVA SANTOS

Quantificação de *Paracoccidioides brasiliensis* em granulomas pulmonares de camundongos experimentalmente infectados e tratados com nanopartículas de itraconazol por via inalatória

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos da Universidade Federal do Tocantins como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Patrícia de Carvalho da Silva

Coorientador: Prof. Dr. José Carlos Ribeiro Junior

ARAGUAÍNA/TO
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

S237q Santos, Fabiane Moreira da Silva .

Quantificação de *Paracoccidioides brasiliensis* em granulomas pulmonares de camundongos experimentalmente infectados e tratados com nanopartículas de itraconazol por via inalatória. / Fabiane Moreira da Silva Santos. – Araguaína, TO, 2022.

53 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Araguaína - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, 2022.

Orientadora : Ana Patrícia De Carvalho da Silva

Coorientador: José Carlos Ribeiro Júnior

1. Paracoccidioidomicose. 2. Modelo murino. 3. Inovações. 4. terapêuticas. I. Título

CDD 636.089

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

FABIANE MOREIRA DA SILVA SANTOS

Quantificação de *Paracoccidioides brasiliensis* em granulomas pulmonares de camundongos experimentalmente infectados e tratados com nanopartículas de itraconazol por via inalatória

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos da Universidade Federal do Tocantins como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos.

Data de aprovação: 05 / 09 /2022

Banca Examinadora



Documento assinado digitalmente

ANA PATRICIA DE CARVALHO DA SILVA

Data: 09/12/2022 08:32:18-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

Profa. Dra. Ana Patrícia de Carvalho da Silva, UFT

Profa. Dra. Katyane de Sousa Almeida, UFT

Prof. Dr. Auricélio Alves de Macedo, FAVALE

*Dedico esta dissertação ao meu filho Benjamin
e minha gatinha Mimi Fofinha, são os melhores estímulos
para querer voar mais alto.*

*Seja forte e corajoso.
Josué 1:9*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus em toda sua honra e plenitude.

Ao Benjamin Moreira pela experiência mais impactante da minha vida.

Agradeço à minha mãe Trindade Moreira, pela confiança, apoio e companheirismo. Pela mão amiga e palavra de ânimo e conforto, principalmente por acreditar em mim, e me oferecer tudo que lhe foi possível até aqui, isso é tão difícil, mas tão necessário. Ao meu pai por ficar feliz com minha felicidade e apoio.

Às minhas irmãs Danielly Moreira e Adriana Moreira, além do meu cunhado Gabriel, pelo ânimo de vida e admiração. Aos bons amigos que sempre me saudaram com muita alegria e entusiasmo, seu Raimundo, Maiane e Damião.

Agradeço à minha gatinha Mimi Fofinha por fazer parte da minha vida e não me abandonar, embora eu acredite que se abrir a porta ela vá fugir. Ela é a base da minha alegria em todos os momentos do meu dia, obrigada por me acalmar, me fazer sorrir e principalmente por me fazer companhia, as coisas teriam sido bem difíceis sem você. À Paulina Martins e Gatiane Fofinha, não menos importantes, meus dois outros amores. Além da Paola Brachio e Q. Mary. É bom estar com vocês.

A minha orientadora Prof.^a Dra. Ana Patrícia de Carvalho, por acreditar em mim, me incentivar, motivar e acima de tudo por existir, você é um exemplo de educação, respeito e força, e um ótimo exemplo a ser seguido, obrigada por você ser você, aos momentos de ensinamento e descontração, isso foi e é muito importante para mim, agradeço por me incluir na sua trajetória.

Aos bons amigos da vida por estarem comigo em mais esse desafio, me incentivando e torcendo pelo meu sucesso, Tânia Fernandes, Jeane Paula, Paula Lorhanna, Rafaella Réquia e Gustavo Costa. Assim como Míriam Pereira, Ézio Rodrigues e Hellen Maciel, vocês foram ótimos companheiros de estudos.

Aos colegas do laboratório do Grupo de Estudos em Patologia, em especial Antônio Oliveira e Denise Ericeira por serem a base da minha pesquisa e terem dado início a esse grande trabalho.

À banca de qualificação pelas considerações destacadas a fim de otimizar a elaboração do trabalho.

À Universidade Federal do Tocantins – UFT.

Ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública – PPGSaspt.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil – CAPES.

RESUMO

A paracoccidioidomicose é uma micose sistêmica, causada pelo *Paracoccidioides brasiliensis*. Possui predileção por ambientes com variações de clima entre tropical e subtropical, tornando o Brasil extremamente propício ao agente, o qual concentra o maior número de casos registrados entre os países da América do Sul, com uma média de 171 mortes anuais, principalmente de trabalhadores agrícolas do sexo masculino. Acomete diversos órgãos em especial o pulmão, resultando na formação de granulomas, podendo levar ao óbito do paciente. A droga para tratamento é o itraconazol por via oral, que apresenta alguns inconvenientes como a necessidade de um tratamento que pode levar anos, absorção da droga, tempo de ação, períodos de tratamento longos, além dos efeitos adversos observados, o que sugere a necessidade de inovações terapêuticas. O grupo de pesquisa vem trabalhando na utilização e administração de nanopartículas de itraconazol por via inalatória, como um tratamento alternativo que seja direcionado para o órgão alvo (pulmão), com diminuição dos efeitos colaterais. Assim, camundongos foram infectados com *P. brasiliensis* e tratados com nanopartículas de itraconazol por via inalatória, sendo significativamente menor quando comparado aos grupos via oral ($P < 0,05$), controle negativo ($P < 0,05$) e controle positivo ($P < 0,001$), demonstrando diminuição do número de granulomas macro e microscopicamente nos pulmões em comparação aos demais grupos (tratados com itraconazol por via oral ou não tratados).

Palavras-chaves: Paracoccidioidomicose; Modelo murino. Inovações terapêuticas.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis is a systemic mycosis caused by *Paracoccidioides brasiliensis*. It has a predilection for environments with climate variations between tropical and subtropical, making Brazil extremely pleasant for the agent, which also concentrates the largest number of registered cases among the countries of South America, with an average of 171 deaths annually. It affects several organs, especially the lung, where it is responsible for the formation of granulomas, which can lead to the death of the patient. The usual drug to treatment is oral itraconazole, which has some drawbacks such as the need for a treatment that can take years, drug pharmacokinetics, besides the adverse effects observed, suggesting the need for therapeutic innovations. Our research group has been working on the use and administration of inhaled itraconazole nanoparticles as an alternative treatment that is directed to the target organ (lung), with increased side effects. Thus, mice were infected with *P. brasiliensis* and treated with itraconazole nanoparticles via inhalation, treated with itraconazole nanoparticles, was significantly lower when compared to the groups via oral ($P < 0.05$), negative control ($P < 0.05$) and positive control ($P < 0.001$), demonstrating decreased number of granulomas macro and microscopically in the lungs compared to the other groups (treated with itraconazole via oral or untreated).

Key-words: Paracoccidioidomycosis, Murine model. Therapeutic innovations.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1-** Morfologia do *Paracoccidioides brasiliensis* na fase leveduriforme contendo brotamentos múltiplos – setas (Objetiva: 40x, Grocott, barra com 500 µm20
- Figura 1-** Histopatologia do pulmão de camundongos experimentalmente infectados com *Paracoccidioides brasiliensis* e tratados ou não com itraconazol por via oral ou com nanopartículas por via inalatória. A: pulmão de camundongo não infectado e não tratado ausência fúngica; B: pulmão de camundongo infectado e tratado com itraconazol por via inalatória apresentando redução no número de fungos (setas); C: Pulmão de animal infectado e tratado com itraconazol por via oral (setas); D: pulmão de camundongo infectado e não tratado (setas) (Objetiva: 40x, Grocott-Gomori, barra com 500µm).....45
- Gráfico 1-** Contagem média de *Paracoccidioides brasiliensis* em granulomas pulmonares de camundongos experimentalmente infectados. Os resultados foram analisados quanto à normalidade antes de serem submetidos a ANOVA, com os valores das médias comparadas pelo teste T. As diferenças estatísticas estão representadas por asteriscos (* p < 0,05; *** p < 0,001) em relação ao controle negativo (CN) e entre os grupos Via Oral (VO) e inalatório (IN).....46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CN	Controle Negativo
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CP	Controle Positivo
EMVZ	Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia
EUA	Estado Unidos da América
GMS	<i>Grocott Methenamine Silver Stain</i>
GPY	<i>Glucose Peptone Yeast</i>
IN	Inalatório
IV	Intravenoso
PBS	Solução Fosfato Salina
PCM	Paracoccidioidomicose
PPGSaspt	Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos
RPMI	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
UFT	Universidade Federal do Tocantins
UNESP	Universidade Estadual de São Paulo
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV/VIS	Espectrofotometria
VO	Via oral
VI	Via inalatória

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3 ASPECTOS GERAIS DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE	18
REFERÊNCIAS.....	29

CAPÍTULO 2

ARTIGO 1. Quantificação de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> em granulomas pulmonares de camundongos experimentalmente infectados e tratados com nanopartículas de itraconazol por via inalatória.....	37
RESUMO.....	37
ABSTRACT.....	38
1 INTRODUÇÃO.....	38
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
2.1 Animais.....	39
2.2 Inóculo.....	40
2.2.1 Preparação e quantificação do inóculo.....	40
2.3 Formulação de nanopartículas de itraconazol.....	40
2.4 Imunossupressão dos animais.....	41
2.5 Infecção experimental.....	42
2.6 Tratamento experimental.....	43
2.7 Eutanásia e Histopatologia.....	43
2.7.1 Coloração especial com prata metenamina Grocott-Gomori (GMS).....	43

2.8 Contagem média de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	43
2.9 Análise Estatística.....	44
3 RESULTADOS.....	44
4 DISCUSSÃO.....	46
5 CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS.....	49
CAPÍTULO 3	
Considerações finais	53

1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas são um grande problema em saúde, sendo responsáveis pela morte de cerca de 1,5 milhões de pessoas no mundo anualmente (RODRIGUES, 2016). Entre as doenças fúngicas de grande importância está a paracoccidioidomicose sistêmica, de grande impacto na América Latina, em especial no Brasil (GIACOMAZZI et al., 2016). É uma doença negligenciada no país, não havendo notificação compulsória do número de casos. Dados sobre distribuição no país estão pautados basicamente em registros de internações e óbitos, estimando-se que 1 a 3 indivíduos a cada 100 mil habitantes, adoçam anualmente (MARTINEZ, 2017).

Paracoccidioides brasiliensis é o agente etiológico da doença, embora *Paracoccidioides lutzii* também esteja relacionado e causando agravos em saúde na região norte do país, principalmente no estado de Rondônia, onde foi inicialmente isolado (TEIXEIRA et al., 2014a). São fungos termodimórficos, modificando-se em resposta à temperatura ambiente. Pode ser considerado um fungo filamentosos e produzir conídios infectantes, ao ser inalado passa para o estágio leveduriforme e começa a parasitar o organismo do hospedeiro, desenvolvendo a doença durante a fase adulta (WANK; LONDERO, 1994; MENDES, 2017).

A doença pode ter um curso agudo/subagudo ou crônico, em que decorridos vários anos da infecção e alteração na imunidade do paciente, ele pode demonstrar os sinais da doença, através dos focos de infecção pulmonares, podendo ir a óbito (LONDERO, 1981).

O itraconazol constitui-se na terapêutica de escolha e pode ser administrado via oral (VO) ou intravenoso (IV) (AMBRÓSIO et al., 2014), geralmente utilizado no tratamento de doenças fúngicas em pele e também pulmões (KELLER, 2011). O tempo de utilização do fármaco pode chegar até 24 meses, e levar o paciente a quadros de diarreia, vômitos e danos hepáticos e renais (MARQUES, 2013).

A utilização de nanopartículas na indústria farmacêutica é capaz de modificar a biodisponibilidade de um fármaco, assim como minimizar os efeitos adversos causados por determinado princípio ativo e focalizar o local de ação da droga (LIU et al., 2020). Segundo Zhang et al. (2008), o crescimento do uso de nanopartículas terapêuticas está embasado na alta capacidade de ação dessa tecnologia, os grandes investimentos nesse setor projetam uma popularização do uso da técnica. Estudos como os de Santos-Júnior (2019a), ao produzir nanopartículas de itraconazol e Souza (2012), ao modificar a

estrutura da Anfotericina B, ambos os fármacos utilizados no tratamento da paracoccidioidomicose, demonstram a evolução das pesquisas em saúde. A modificação de estrutural de um fármaco já existente pode atuar de modo a diminuir os efeitos indesejáveis e potencializar os efeitos esperados (MATOS et al., 2015).

Tendo em vista a necessidade de terapias alternativas que potencializassem os efeitos do antifúngico e a redução na apresentação dos efeitos adversos demonstrados pelos pacientes em tratamento, a pesquisa em questão, surge como uma possibilidade, onde é visada uma grande contribuição para a saúde pública.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de redução de infectividade através da contagem de *Paracoccidioides brasiliensis* após tratamento com formulação de itraconazol via inalatória

2.2 Objetivo Específico

- I. Quantificar *Paracoccidioides brasiliensis* nos granulomas pulmonares através de histomorfologia;
- II. Avaliar o uso da técnica de Grocott-Gomori na quantificação de *Paracoccidioides brasiliensis*.
- III. Avaliar a morfologia de *Paracoccidioides brasiliensis* intralesionais em granulomas pulmonares;

3 ASPECTOS GERAIS DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE

3.1 Histórico

A paracoccidioidomicose (PCM), foi previamente descrita por Adolf Lutz em 1908, que relatou a ocorrência da doença de forma cutâneo-mucosa e linfonodal, sendo descrito algum tempo depois a existência de formas viscerais (AZEVEDO; LISBOA, 1980). Segundo Lacaz (1983), primeiramente o agente etiológico foi denominado como *Zymonema brasiliensis* por Alfonso Splendore, sendo definido na década de 30, por Floriano Paulo de Almeida como *Paracoccidioides brasiliensis*, o qual se estabeleceu. A doença também sofreu variação em seu nome, sendo conhecida em alguns momentos da história como blastomicose brasileira, blastomicose sul-americana, doença de LUTZ e doença de LutzSplendoreAlmeida (LACAZ, 1983; PALMEIRO et al., 2005).

Durante muitos anos o fungo esteve sob pesquisa até chegar à classificação atual. A caracterização estrutural fúngica recebeu um grande avanço através dos estudos de Almeida (1930), quando comparou o fungo local ao que já era encontrado nos EUA, destacando que aquele encontrado no Brasil acometia a pele, mucosas e era adquirido através da via oral. Observou ainda a formação de estruturas arredondadas aderidas ao que poderia ser chamado de célula-mãe, como uma coroa e constatando que em resposta as alterações de temperatura o fungo era capaz de modificar sua forma, o definindo como um parasito de formato redondo e duplo contorno de membrana.

Divergências diagnósticas também foram observadas no início, exatamente quanto a formação dos granulomas, tornando necessária a visualização do fungo (MEDINA, 1942). Assim como na apresentação dos sinais clínicos, em especial ao acometimento dos pulmões na até então blastomicose, sendo consideradas raras naquele momento (NOVA, 1940), porém segundo as pesquisas foram sendo intensificadas e melhores resultados foram visualizados até associar a ocorrência da doença com os agravos pulmonares.

3.2 Etiologia

A PCM é uma importante micose sistêmica humana, seu principal agente etiológico é um fungo termodimórfico intitulado *Paracoccidioides brasiliensis*, que pertence à família Ajellomycetaceae e gênero *Paracoccidioides*, em conjunto com

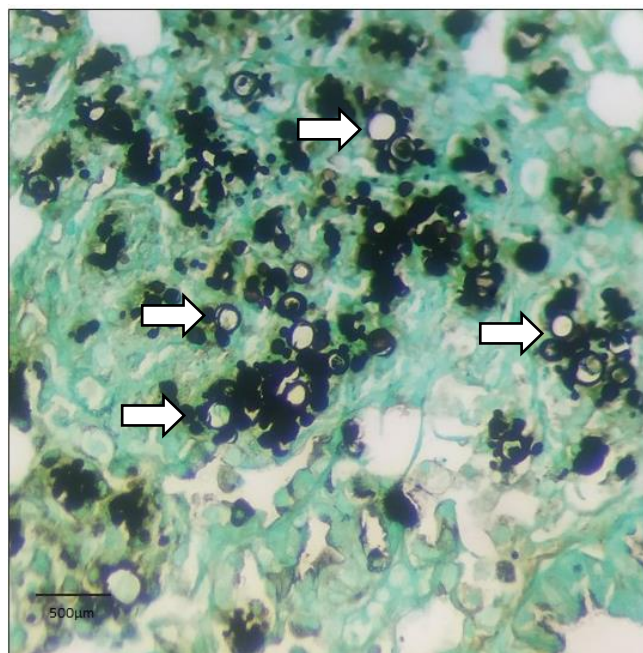
outros fungos de importância sanitária, dos gêneros *Blastomyces* e *Histoplasma* (TABORDA et al., 2015; SILVA et al., 2016). Está amplamente distribuído pelo país, sendo responsável pelo desenvolvimento de doença inflamatória crônica granulomatosa e com predisposição principalmente aos indivíduos de sexo masculino provenientes de zona rural que possuem contato frequente e direto com vegetações e solo (BRUMMER et al., 1993; RAMOS; SARAIVA, 2008).

Paracoccidioides brasiliensis é considerado um fungo imperfeito, por apresentar genética heterogênea, com reagrupamento resultando na formação de uma nova espécie, como *Paracoccidioides lutzii*, que também é responsável pelo desenvolvimento de quadro de PCM, fator que pode dificultar a detecção sorológica do agente (TABORDA et al., 2015; SILVA et al., 2016). *P. brasiliensis* pode ser classificado a partir das suas cinco espécies filogenéticas, que são S1a, S1b, PS2, PS3 e PS4 (MATUTE et al., 2006; MUNÕZ et al., 2016).

O agente etiológico é um fungo que por apresentar dimorfismo em resposta às modificações de temperatura, pode ser encontrado em duas fases, a misceliana (hifas septadas), sendo considerado um fungo filamentosos, onde pode ser observado na natureza, mas também reproduzido em cultivo *in vitro* em temperaturas em torno de 28° C, e na forma de levedura (globular) está associado aos tecidos infectados e reprodução *in vitro* em temperaturas de 36 °C e gerar resposta imune (SAN-BLAS, 1993).

Na forma parasitária esse fungo apresenta múltiplos brotamentos, exoesporulação, membrana birrefringente e uma cromatina bastante evidente, além disso há a sugestão que em termos práticos essas leveduras se assemelhem a uma roda de leme e que pode ser isolado a partir do solo e animais (Figura 1) (FURTADO et al., 1967; SAN-BLAS, 1993; ALMEIDA et al., 2009).

Figura 1 - Morfologia do *Paracoccidioides brasiliensis* na fase leveduriforme contendo brotamentos múltiplos – setas (Objetiva: 40x, Grocott, barra com 500 μ m)



Fonte: Arquivo pessoal, 2022.

As informações quanto ao tipo de habitat ideal para seu desenvolvimento não estão plenamente esclarecidas, mas os dados definem que ele possui fácil dispersão e já foram descritos em solos ácidos, geralmente os indivíduos acabam contraindo a doença em regiões de florestas tropicais ou subtropicais, locais úmidos, associados a fontes de águas naturais, com variação de temperatura entre 10 e 28° C, assim como volume de precipitação pluviométrica anual em torno de 500 a 2500 mm, demonstrando a predileção do agente por esse tipo de ambiente (RESTREPO-MORENO, 1994; WANKE; LONDERO; RAMOS, 1994; MARQUES, 2003).

3.3 Epidemiologia

A distribuição do agente fúngico está diretamente relacionada a fatores climáticos onde os locais de vegetação entre tropical e subtropical são preferíveis para o seu desenvolvimento, em comparação ao número de casos relatados por Veronesi et al. (2005) define que cerca de 80% correspondem a diagnósticos no Brasil, seguido por Venezuela, Colômbia, Equador, Bolívia e Argentina. Em áreas endêmicas considera-se que até 70% da população esteja cometida (MARQUES et al., 2007).

Através do tipo de espécie filogenética é possível determinar um padrão de distribuição, assim são observadas que as S1a e S1b estão distribuídas em maior frequência na América do Sul, em especial nas regiões sul e sudeste do Brasil, além de Argentina e Paraguai. A PS2, está distribuída de modo menos preciso, com poucos casos identificados, embora já registrados no Brasil e Venezuela, PS3 e PS4 são específicas da Venezuela e Colômbia, e o que diz respeito ao *Paracoccidioides lutzii*, este encontra-se bastante difundido entre a região centro-oeste e na Amazônia, contemplando o Brasil e também Equador (MARQUES-DA-SILVA et al., 2012; TEODORO et al., 2012; HAHN et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2014a; TEIXEIRA et al., 2014b).

Essa micose possui um alto índice de mortalidade no Brasil, sendo considerado o centro endêmico para a doença, com uma média de 171 óbitos por ano, destacando os estados da região sudeste e sul, como São Paulo e Paraná (COUTINHO et al., 2002). Os trabalhadores rurais, que desenvolvem suas atividades em uma interação direta com o solo apresentam uma maior predisposição ao desenvolvimento da doença (MARTINEZ, 2017), até 95% dos casos de PCM correspondem aos indivíduos do sexo masculino, que pode ser explicado pela escassez de β -estradiol, responsável pela inibição da conversão dos conídios em leveduras (PIZAN et al., 2010).

Estudos de prevalência como os desenvolvidos por Magalhães et al. (2014), mostram que a idade pode ser um fator predisponente a ocorrência da doença, sendo observado com ela uma relação direta, sem dados significativos sobre a relação entre o álcool e o tabagismo. Segundo Martinez (2017), a doença clínica está mais susceptível quando relacionada a critérios genéticos, uso em demasia de álcool e tabaco, além dos imunossupressão do indivíduo. Assentamentos rurais são locais com elevada importância no desenvolvimento da doença em crianças (MARQUES et al., 2013). Lavouras de café e fumo, também possuem um importante papel na ocorrência da doença pelo trabalho direto com o solo (MARTINEZ, 2017).

Ao que se observa no norte do país, os estados do Tocantins, Pará, Rondônia e Acre são responsáveis por elevados índices de internações e óbitos por PCM, fator associado a expansão da fronteira agrícola da Amazônia (BECKER, 2001; BECKER, 2005; COUTINHO, 2011). Santos-Júnior et al. (2019b), demonstraram que a PCM é considerada endêmica na porção norte do estado do Tocantins, e entre os anos de 2016 - 2018, 37 indivíduos foram diagnosticados e tratados na cidade de Araguaína.

Além dos casos relatados no ser humano, o gênero *Paracoccidioides* já foi isolado em animais como tatus e morcegos (MOREIRA, 2008; RICHINI-PEREIRA et al., 2008), excretas de pinguins (BAGAGLI et al., 2008), até mesmo em animais como porcos-espinho e guaxinins (RICHINI-PEREIRA et al., 2008). Casos em animais domésticos como cães já foram relatados e sua importância se dá pela sugestão da participação desses animais no ciclo da PCM no humano (BAGAGLI et al., 2008; MOREIRA, 2008; RICHINI-PEREIRA et al., 2008).

3.4 Patogenia

A infecção por PCM se dá de modo natural a partir da inalação de conídios, os esporos fúngicos (FRANCO, 1989). Causa doença em diversos órgãos, variando sua forma de apresentação, assim aqueles sem doença clínica sintetizam citocinas que acabam por ativar células como macrófagos e linfócitos TCD4 e TCD8, o que leva a formação dos granulomas múltiplos apresentados na enfermidade fúngica (BENARD et al., 2001).

A PCM é geralmente classificada em aguda, subaguda ou crônica, além disso a manifestação clínica é dependente da virulência da cepa envolvida, assim como o tipo de resposta imunológica desenvolvida frente a infecção, o tipo de tecido e as particularidades dos indivíduos acometidos (BENARD, 2008; MENDES-GIANINI et al., 2008).

É usualmente observado que a infecção ocorre enquanto o indivíduo é criança, e sua expressão vai de acordo a resposta imune, desta forma após um período de latência em nódulo fibrótico do pulmão, por ocasião de uma alteração na imunidade as manifestações clínicas têm início (BISINELLI; FERREIRA, 2002). Os sujeitos infectados pelo fungo podem acabar não desenvolvendo a doença, mas mostrar formação de granulomas compactos em resposta a produção de macrófagos e linfócitos TCD4+ e TCD8+ (FORTES et al., 2011).

A infecção ocorre por via aérea através da inalação dos conídios fúngicos, através da interferência térmica corpórea do hospedeiro ocorre ativação enzimática do patógeno, e o fungo deixa a forma infectante e passa a forma parasitária no organismo do hospedeiro, o que também pode ser caracterizado como transformação fúngica em levedura. Ao atingir o pulmão, ocorre disseminação, através da corrente sanguínea e linfática, resultando em alterações de mucosa oral e cutânea, formas agudas da

enfermidade (SAN-BLAS G; SAN-BLAS, 1984; GONZÁLES-OCHO, 1956; FRANCO, 1986).

No interior das vias respiratórias o agente fica sujeito a ação do sistema imunofagocitário, ao adentrar o parênquima do pulmão, assim ele pode ser destruído ou na ocorrência de multiplicação resulta em um foco de infecção que através do linfonodo regional do hilo pulmonar leva a formação do complexo primário da paracoccidiodomicose, caso o sistema imunológico do paciente esteja ativamente responsivo o fungo pode ser eliminado ou reduzido e assim caracterizar a forma subclínica da doença (LACAZ et al., 1959; LOPEZ; RESTREPO, 1983).

A presença desse complexo primário permite a manutenção dos organismos, o que pode levar as lesões quiescentes e resultar na forma crônica após um longo período posterior à infecção. Características do agente como lipídeos e polissacarídeos são capazes de aumentar sua patogenicidade. Quando conseguem se reativar levam a uma reação inflamatória que culmina na formação do granuloma na tentativa de paralisar a ação fúngica (FIGUEIREDO et al., 1986; FRANCO, 1986).

3.5 Sinais Clínicos

Nos casos agudos ou subagudos, que correspondem a cerca de 3 a 5% dos casos, os indivíduos apresentam desde adenomegalia, hepatoesplenomegalia, disfunção de medula óssea, febre e anorexia. Em casos crônicos podem ser observadas lesões em pele e mucosas, além do acometimento de pulmão com manifestações respiratórias resultando primordialmente no óbito do paciente (FRANCO et al., 1987; LONDERO; RAMOS, 1990).

O estudo clínico desenvolvido por Paniago et al. (2003), demonstrou que entre os 422 casos de PCM a grande maioria correspondeu a forma crônica da doença e os principais sinais observados eram lesões orofaríngeas, rouquidão e tosse. Nos casos agudos e subagudos foi observado um intenso comprometimento do sistema imunofagocitário, com presença de adenomegalia, hepatomegalia e hisplenomegalia (PANIAGO et al., 2003).

Pacientes em estágio agudo/subagudo demonstram alterações digestivas como diarreia crônica disabsortiva e vômitos. É observada perda de peso e quadros de febre, linfadenomegalia, lesões cutâneas, massas abdominais e hepatoesplenomegalia (FERREIRA, 2009; SHIKANAI-YASUD et al., 2018).

Em casos crônicos da doença há um maior comprometimento respiratório, desta forma espera-se observar nesses pacientes sinais como tosse, dispneia, expectoração mucopurulenta, lesões ulceradas em pele e na mucosa nasofaríngea, odinofagia, disfagia e disfonia. Quanto ao sistema linfático a manifestação de adenomegalia é sempre relacionada (MENDES, 1994; VALLE et al., 1995).

A disfunção hormonal por envolvimento da adrenal resulta em sinais como astenia, emagrecimento, hipotensão, escurecimento de pele, dores abdominais, no sistema nervoso do paciente refletem sinais de cefaleia, convulsões e alteração de consciência e comportamento, comumente são observados distúrbios gastrointestinais (DEL-NEGRO et al., 1980; COLOMBO; FAIÇAL; KATER, 1994; ALMEIDA et al., 2004).

3.6 Macroscopia e microscopia das lesões

Os achados macroscópicos dos órgãos de indivíduos com PCM exibem granulomas múltiplos e compactos em resposta a ação de macrófagos e linfócitos TCD4 e TCD8, descritas com estruturas esbranquiçadas, circulares e bem definidas que aprofundam ao corte (BENARD et al, 2001; COSTA et al, 2013). Os pulmões são acometidos em 50 a 100% dos casos de paracoccidioidomicose (SOUZA JUNIOR, 2006) e pode exibir alterações como espessamento septal, reticulado e brônquico, além de nódulos e cistos pulmonares, além do fígado, onde já foi relatada a presença de granulomas (BENARD et al, 2001; COSTA et al, 2013; SANTOS-JÚNIOR, 2019a).

Achados como a consolidação pulmonar podem ser observados, ocorrendo em resposta a uma alveolite descamativa, caracterizada microscopicamente através de um infiltrado predominante de fungos e células inflamatórias (MARCHIORI et al., 2011). Ao avaliar microscopicamente o pulmão de camundongos experimentalmente infectados Santos-Júnior (2019a) observou que podem ser encontrados infiltrados linfohistiocitário e neutrofílico, multifocal intenso, contendo macrófagos epitelióides, células gigantes multinucleadas, associados a estruturas leveduriformes.

O Grocott-Gomori, (GMS), é uma técnica desenvolvida por Gomori no ano de 1946, com fins de teste histoquímico do glicogênio, ele atua inicialmente liberando grupos de aldeídos, a partir de um tratamento prévio da amostra com o ácido crômico e subsequente ação do nitrato de prata, que é o ponto chave da técnica e resulta na evidenciação da parede celular fúngica, resultando em uma coloração entre marrom-

escuro e preto das estruturas fúngicas daquela lâmina (GROCOTT, 1955; LAZCANO et al., 1991).

3.7 Diagnóstico

O padrão-ouro em diagnóstico da enfermidade, assim como em outras micoses é o isolamento em cultura, a técnica de biópsia em tecidos também constitui uma importante ferramenta diagnóstica para a doença (MENDES-GIANNINI; MELHEM, 2001).

A análise direta de amostras, através de líquido do lavado broncoalveolar, punção de linfonodo com agulha fina, raspagem de pele ou mucosas torna possível encontrar *Paracoccidioides* sp., outra possibilidade é através do isolamento do agente em pulmões, nódulos linfáticos e histopatologia das lesões, que se torna uma das técnicas de primeira escolha recomendadas quando impossível realizar o diagnóstico micológico (PEÇANHA et al., 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 2018). Dentro da histopatologia, devido a presença de grande quantidade do fungo dentro dos granulomas, além da técnica de coloração em Hematoxilina – Eosina, a capacidade da metamina de prata em evidenciar os múltiplos brotamentos, torna a técnica de Grocott – Grimori a mais indicada, por conseguir realçar os contornos da parede celular (GROCOTT, 1955).

O diagnóstico sorológico pode ser realizado através da pesquisa de anticorpos e antígenos relacionados ao agente etiológico, a Imunodifusão Dupla em Gel de Ágar é uma das opções mais utilizadas, sendo considerada a mais específica, além do teste de Elisa como triagem, Western-Blot e Pesquisa de antígeno específico (ELIAS et al., 2000; SHIKANAI-YASUDA et al., 2018). Uma técnica molecular já utilizada na detecção é o Nested PCR, que torna possível a detecção de fragmentos do DNA do fungo (BIALEK et al., 2001). Além das metodologias convencionais, a utilização das nanopartículas de ouro, uma inovação diagnóstica, surge como uma possibilidade que promete melhorar a eficiência e sensibilidade na detecção das biomoléculas (FERREIRA et al., 2016).

Outras doenças micóticas, tuberculose, leishmaniose, histoplasmose, sífilis, sarcóide e granulomatose de Wegener, podem ser considerados diagnósticos diferenciais pela similaridade entre algumas das manifestações clínicas observadas. (BLOTTA et al., 1999; BICALHO, 2001; MENDES-GIANNINI; MELHEM, 2001).

3.8 Tratamento

Está embasado no uso de três grupos farmacológicos: os antibióticos poliênicos, como a anfotericina B; compostos fulanilamídicos, que é a sulfaziadina, geralmente utilizada em associação com a anfotericina B e as drogas azólicas, por exemplo o fluconazol, cetoconazol e o itraconazol, que é a principal droga utilizada no tratamento da PCM (BISINELLI; FERREIRA, 2002). Casos mais graves necessitam de atendimento ambulatorial através da administração anfotericina B 1 mg/kg/dia intravenosa, com posterior sequência terapêutica à base de fármaco em comprimidos. O período de tratamento está diretamente relacionado as particularidades de cada caso, onde em casos mais leves pode levar em média seis meses, podendo chegar até a vinte e quatro meses em casos considerados mais graves (MARQUES, 2013).

3.8.1 Itraconazol

O itraconazol é até 100 vezes mais ativo que o cetoconazol, droga originalmente utilizada no tratamento da PCM (NARANJO et al., 1990), sendo substituído pelo fluconazol apenas nos casos de neuroparacoccidioidomicose, onde este se mostra mais efetivo (SHIKANAI-YASUDA, 2015). O itraconazol é feito sinteticamente e apresenta multianéis e com três átomos de nitrogênio, atuando sobre o ergosterol, fazendo com que a inibição de sua síntese pela alteração da membrana celular, leve à morte do fungo (NETO et al., 2014). É indicado no tratamento das afecções que acometem os olhos, boca e órgãos como o pulmão (KELLER, 2011). Segundo Shikanai-Yasuda (2015), embora os fármacos apresentem inúmero benefícios, a uso prolongado ou até mesmo o tipo de resposta que o organismo produz após o seu uso, é demonstrado através dos efeitos colaterais, em que são observados quadros de náuseas, erupções cutâneas e até efeito hepatotóxico, relembrando a importância de um tratamento cada vez mais seguro.

Embora sua utilização atual no tratamento da PCM seja por via oral, estudos de Santos-Júnior (2019a), com objetivo de uma melhor resposta e diminuição dos efeitos colaterais demonstraram que quando utilizados em camundongos de experimentação, o uso de nanopartículas de itraconazol por via inalatória, tornou-se funcional, assim reduzindo os granulomas de pulmão e impedindo o desenvolvimento de outras lesões nos demais órgãos.

3.9 Terapia Inalatória e Nanopartículas

O sistema respiratório é o alvo principal da ação das nanopartículas (MEDINA et al., 2007). A via inalatória surge como primeira opção nos casos de doença respiratória, com a ação direta sobre o órgão alvo da injúria (AGUIAR et al., 2017). As características inerentes ao organismo do paciente podem dificultar esse tipo de terapia. Robichaud, Fereydoonzad e Schuessler (2015), ao avaliarem pontos de interferência no desenvolvimento de nanopartículas, concluíram que variáveis como o tempo de infusão da nebulização, umidade do ar e o tamanho da partícula que está sendo trabalhada, podem interferir no processo, assim devem ser bem trabalhadas durante a pesquisa de desenvolvimento para estabelecer o equilíbrio ideal, projetando a eficiência do fármaco. Nanopartículas com tamanho inferior aos valores entre 1 e 5 μm , não conseguem chegar até o pulmão e efetuar seu efeito (PHILLIPS; ZHANG; JOHNSTON, 2017). Santos-Júnior (2019a), estabeleceu uma constante de 5 μm para suas nanopartículas de itraconazol, permitindo que o princípio ativo conseguisse ser utilizado via inalatório, com efeitos sobre o agente fúngico.

As nanopartículas são materiais de tamanho reduzido ($< 1000 \text{ nm}$), que possuem uma especificidade físico-química singular, o que permite a utilização desses materiais como tecnologia farmacêutica (MEDINA et al., 2007). Em busca de novas alternativas terapêuticas, visando equilibrar alguma problemática de um tratamento, surgem os investimentos em tecnologia em saúde, como é o caso das nanopartículas, assim como citado por Rudramurthy et al. (2017) ao estudarem novas possibilidades terapêuticas frente ao grande número de microrganismos resistentes aos antimicrobianos disponíveis no mercado, podendo ser uma solução para um problema atual e auxiliar na prevenção de problemáticas futuras.

Segundo Soliman (2017), embora exista uma grande disponibilidade de terapias antifúngicas disponíveis no mercado, as respostas terapêuticas deixam a desejar, pois existem limitações devido as características físico-químicas e a toxicidade desses fármacos, questões como baixa solubilidade aquosa acaba limitando as opções de formulação e restringindo os benefícios de alguns medicamentos. As nanopartículas mostram seus benefícios, já que através dessa tecnologia esse tipo de desordem estrutural pode ser corrigida e permitir novas formulações de um determinado fármaco. Ao diminuir o tamanho das partículas de um fármaco é possível observar uma variação de tamanho, morfologia, carga elétrica e revestimento de superfície, sendo possível

trabalhar a partícula a modo de atender as necessidades do pesquisador (MUBEEN et al., 2021).

A utilização desse tipo de tecnologia dispõe de inúmeros benefícios para a medicina, porém as ações adversas também podem ser observadas, assim como em qualquer fármaco, o que demonstra a importância de conhecer a metodologia de fabricação do produto e a realização de estudos sobre a toxicidade (MEDINA et al., 2007).

Nanopartículas podem ser usadas na formulação de biomarcadores celulares, diagnóstico molecular e na formulação de novas terapias medicamentosas (MEDINA et al., 2007), assim como a proposta estabelecida por Santos-Júnior (2019a) ao formular nanopartículas de itraconazol para tratamento antifúngico por via inalatória em modelo murino. Além de permitir a ampliação das vias de administração de um determinado medicamento, esse tipo de terapia tem se destacado entre as doenças infecciosas, tornando-se uma excelente alternativa nos casos de doenças fúngicas, por apresentarem um longo período de tratamento (RENZI et al., 2021). Como observado com as nanopartículas de itraconazol via inalatória em camundongos experimentalmente infectados por *Paracoccidioides brasiliensis* (SANTOS-JÚNIOR, 2019a).

REFERÊNCIAS

AGUIAR, R.; LOPES, A.; ORNELAS, C.; FERREIRA, R.; CAIADO, J.; MENDES, A.; BARBOSA, M. P. Terapêutica inalatória: Técnicas de inalação e dispositivos inalatórios. **Revista Portuguesa de Imunoalergologia**, v. 25, n. 1, p. 9-26, 2017.

ALMEIDA, A. J.; CUNHA, C.; CARMONA, J. A.; SAMPAIO-MARQUES, B.; CARVALHO, A.; MALAVAZI, I.; STEENSMA, H. Y.; JOHNSON, D. I.; LEAO, C.; LOGARINHO, E.; GOLDMAN, G. H.; CASTRO, A. G.; LUDOVICO, P.; RODRIGUES, F. Cdc42p controls yeast-cell shape and virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genetics Biology**, v. 46, n. 12, p. 919-26, 2009.

ALMEIDA, F. P. Estudos comparativos do granuloma coccidióidicos nos Estados Unidos e no Brasil: novo gênero para o parasito brasileiro. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, v. 5, p. 125-4, 1930.

ALMEIDA, S. M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TEIVE, H. A.; RIBEIRO, C. E.; WERNECK, L. C. Central nervous system paracoccidioidomycosis: clinical features and laboratory findings. **Journal of Infection**, v. 48, n. 2, p. 193-8, 2004.

AMBROSIO, A. V. A.; CAMELO, C. C. S.; BARBOSA, C. V. Paracoccidioidomicose (doença de Lutz-SPLENDRE-almeida): tratamento, duração do tratamento, recidiva, reação paradoxal, prognóstico, profilaxia. **Revista de Medicina Minas Gerais**, v. 24, n.1, p. 74-80, Minas Gerais, 2014.

AZEVEDO, J. F.; LISBOA C. D. S. G. Paracoccidioidomicose-estudo de 106 casos. **Jornal de Pneumologia**, v. 6, n. 1, p. 30-33, mar. 1980.

BAGAGLI, E.; THEODORO, R. C.; BOSCO, S. M.; MCEWEN, J. G. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4, p. 197-207, 2008.

BECKER, B. K. Geopolítica da Amazônia. **Estudos Avançados**, v. 19, n. 53, p. 71- 86, 2005.

BECKER, B. K. Modelos e cenários para a Amazônia: o papel da ciência. Revisão das políticas de ocupação da Amazônia: é possível identificar modelos para projetar cenários. **Parcerias estratégicas**, v. 12, p. 135-159, 2001.

BENARD, G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 165, p. 209-21, 2008.

BENARD, G.; ROMANO, C. C.; CACERE, C. R.; JUVENALE, M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; DUARTE, A. J. Imbalance of IL-2, IFN- γ and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, v. 13, n. 4, p. 248-252, 2001.

BIALEK, R.; IBRICEVIC, A.; AEPINUS, C.; NAJVAR, L. K.; FOTHERGILL, A.W.; KNOBLOCH, J.; GRAYBILL, J. R. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a nested PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 8, p. 2940-2, 2000.

BICALHO, R. N.; ESPÍRITO, S. M. F.; AGUIAR, M. C. F.; et al. Oral paracoccidioidomycosis: A retrospective study of 62 Brazilian patients. **Oral Diseases**, v. 7, p. 56-60, 2001.

BISINELLI, J. C.; FERREIRA, M. L. S. Doenças infecciosas: paracoccidioidomicose (blastomicose sul-americana). In: Tommasi, A. F. Diagnóstico em patologia bucal. 3^a ed. São Paulo: **Pancast**, 2002. p. 202-9.

BLOTTA, M. H. S. L.; MAMONI, R. L.; OLIVEIRA, S. J.; et al. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil; a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, p. 390-4, 1999.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, p. 89-117, 1993.

COLOMBO, A. L.; FAICAL, S.; KATER, C. E. Systematic evaluation of the adrenocortical function in patients with paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 127, p. 89-93, 1994

COSTA, A. N.; BENARD, G.; ALBUQUERQUE, A. L. P.; FUJITA, C. L.; MAGRI, A. S. K.; SALGE, J. M.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, C. R. R. The lung in paracoccidioidomycosis: new insights into old problems. **Clinics**, v. 68, n. 4, p. 441-448, 2013.

COUTINHO, Francisco Ziadis. **Morbimortalidade por paracoccidioidomicose no Brasil (1998-2006)**. 2011. 121f. Tese (Doutorado) Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca. Rio de Janeiro, 2011.

COUTINHO, Z. F.; SILVA, D.; LAZERA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R. M.; SABROZA, P. C.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 5, p. 1441-54, 2002.

DEL-NEGRO, G.; MELO, E. H. L.; RODBARD, D.; MELO, M. R.; LAYTON, J.; WACHSLICHT-RODBARD, H. Limited adrenal reserve in paracoccidioidomycosis: cortisol and aldosterone responses to 1-24 ACTH. **Clinical Endocrinology**, v. 13, n. 6, p. 553-9, 1980.

ELIAS, C. M. R.; SILVA, L. C.; KAWASAKI, M.; CAMARGO, Z. P. Conventional versus molecular diagnostic tests. **Medical Mycology**. v. 38 Suppl 1: p. 139-45, 2000.

FERREIRA, C. S.; RIBEIRO, E. M. C.; GOES, A. D. M.; SILVA, B. M. Current strategies for diagnosis of paracoccidioidomycosis and prospects of methods based on gold nanoparticles. **Future Microbiology**, v. 11, p. 973-85, 2016.

FERREIRA, M. S. Paracoccidioidomycosis. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 10, n. 4, p. 161-5, 2009.

FIGUEIREDO, F.; SILVA, C. L.; ALVES, L. M. C.; ROSSII, M. A. Participation of *Paracoccidioides brasiliensis* lipids and polysaccharides in the evaluation of granulomas. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 9, p. 615, 1986.

FORTES, M. R. P.; KUROKAWA, C. S.; MARQUES, S. A.; MIOT, H. A.; MARQUES, M. E. A. Immunology of paracoccidioidomycosis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 3, p. 516-525, 2011.

FRANCO, M. F.; MONTENEGRO, M. R.; MENDES, R. P.; MARQUES, S. A.; DILLON, N.L.; MOTA, N.G.S. Paracoccidioidomycosis: a recent proposed classification of clinical forms. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 20, n. 2, p. 129-132, 1987.

FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **Journal Medicina Veterinary Mycology**. v. 25, p. 5-18, 1986.

FRANCO, M.; SANO, A.; KERA, K.; NISHIMURA, K.; TAKEO, K.; MIYAJI, M. Chlamydospore formation by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 31, n. 3, p. 151- 157, 1989.

FURTADO, J. S.; BRITO, T.; FREYMULLER, E. The structure and reproduction of *Paracoccidioides brasiliensis* in human tissue. **Sabouraudia**, v. 5, n. 3, p. 226-9, 1967.

GIACOMAZZI, J.; BAETHEN, L.; CARNEIRO, L. C.; MILLINGTON, M. A.; DENNING, D. W.; COLOMBO, A. L.; PASQUALOTTO, A. C. The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, v. 59, p. 145–150, 2016.

GONZÁLES-OCHOA, A. Clasificación clínica de las micosis. **Revista del Intituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales**, v. 16, p. 1, 1956.

GROCOTT, R. G. A Stain for Fungi in Tissue Sections and Smears. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 25(8-ts), p. 975–979, 1955.

HAHN, R. C.; RODRIGUES, A. M.; FONTES, C. J.; NERY, A. F.; TADANO, T.; QUEIROZ-JÚNIOR, L. P. Fatal fungemia due to *Paracoccidioides lutzii*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 2, p. 394-8. Aug. 2014.

KELLER, K. A. Therapeutic review. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 20, n. 2, p. 156- 60, 2011.

LACAZ, C. S. P. Presente e futuro da paracoccidioidomicose. **Revista de Patologia Tropical**, v. 12, n. 1, p. 37-52, jan./abr.1983.

LACAZ, C.S.; PASSOS-FILHO, M. C. R.; FAVA-NETTO, C.; MACARRON, R. Contribuição para o estudo da Blastomicose-infecção: inquérito com paracoccidioidina. Estudo sorológico e clínico março/2008 Coordenadoria de Controle de Doenças página 21 Volume 5 N° 51 BEPA Boletim Epidemiológico Paulista ISSN 1806-423-X radiológico dos paracoccidioidinos-positivos. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo. v. 1, p. 245-5, 1959.

LAZCANO, O; SPEIGHTS, V.O; BILBAO, J; BECKER, J; DIAZ, J; Combined Fontana-Masson-Mucin Staining of *Cryptococcus neoformans*. **Archives Pathology Laboratory Medicine**, v. 115, p. 1145-1149, 1991.

LIU, Y.; YANG, G.; JIN, S.; XU, L.; ZHAO, C. X. Development of High-Drug-Loading Nanoparticles. **Chempluschem**, v. 85, n. 9, p. 2143-2157, 2020.

LONDERO, A. T.; RAMOS, T. C. D. Paracoccidioidomycosis: estudo clínico-micológico de 260 casos observados no interior do estado do Rio Grande do Sul. **Jornal de Pneumologia**, v. 16, p. 129-132, 1990.

LONDERO, A. T.; SEVERO, L. C. The gamut of progressive pulmonary paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 75, n. 2, p. 65-74, 1981.

LOPEZ, R. C.; RESTREPO, A. Spontaneous regression of pulmonary paracoccidioidomycosis. **Mycopathology**, v.83, p. 187-9, 1983.

MAGALHÃES, E. M.; RIBEIRO, C. F.; DÂMASO, C. S.; COELHO, L. F.; SILVA, R. R.; FERREIRA, E. B.; RODRIGUES, M. R.; CAMARGO, Z. P.; VELLOSO, T. R.; MALAQUIAS, L. C. Prevalence of paracoccidioidomycosis infection by intradermal reaction in rural areas in Alfenas, Minas Gerais, Brazil. **Journal of the Institute of Tropical Medicine of São Paulo**, v. 54, n. 4, p. 281-285, 2014.

MARCHIORI, E.; VALIANTE, P. M.; ESCUISSATO, D. L.; SOUZA JR., A. S.; MANO, C. M.; ZANETTI, G. Paracoccidioidomycose: Tomografia Computadorizada de Alta Resolução - Correlação Patológica. **Eur J Radiol**, v. 77, p. 80-84, 2011.

MARQUES, A. P.; OLIVEIRA, S. M.; REZENDE, G. R.; MELO, D. A.; FERNANDES-FITTS, S. M.; PONTES, E. R.; BONECINI-ALMEIDA, M. G.; CAMARGO, Z. P.; PANIAGO, A. M. Evaluation of *Paracoccidioides brasiliensis* infection by gp 43 intradermal test in rural settlements in Central-West Brazil. **Mycopathologia**, v. 176, n. 1-2, p. 41-47, 2013.

MARQUES, S. A. Paracoccidioidomycose: atualização epidemiológica, clínica e terapêutica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 2, p. 135-150, 2003.

MARQUES, S. A. Paracoccidioidomycosis: epidemiological, clinical, diagnostic and treatment up-dating. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 88, n. 5, p. 700-711, 2013.

MARQUES, S. A.; CORTEZ, D. B.; LASTORIA, J. C.; CAMARGO, R. M. P.; MARQUES, M. E. A. Paracoccidioidomycose: Frequência, morfologia e patogênese de lesões tegumentares. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, p. 411-7, 2007.

MARQUES-DA-SILVA, S. H.; RODRIGUES, A. M.; HOOG, G. S.; SILVEIRA-GOMES, F.; CAMARGO, Z. P. Occurrence of *Paracoccidioides lutzii* in the Amazon region: description of two cases. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 4, p. 710-4, Oct. 2012.

MARTINEZ, R. New Trends in Paracoccidioidomycosis Epidemiology. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, 2017.

MATOS, B. N.; OLIVEIRA, P. M.; AREDA, C. A.; CUNHA-FILHO, M. S. S.; GRATIERI, T.; GELFUSO, G, M. Preparações farmacêuticas e cosméticas com uso de nanotecnologia. **Brasília Médica**, v. 52, n. 1, p. 8-20, 2015.

MATUTE, D.R.; MCEWEN, J. G.; PUCCIA, R.; MONTES, B. A.; SAN-BLAS, G.; BAGAGLI, E.; et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, n. 1, p. 65-73, jan. 2006.

MEDINA, C.; SANTOS-MARTINEZ, M. J.; RADOMSKI, A.; CORRIGAN, O. I.; RADOMSKI, M. W. Nanopartículas: significado farmacológico e toxicológico. **British Journal of Pharmacology**, v. 150, n. 5, p. 552-558, 2007.

MEDINA, H. **Lesões histopatológicas em três casos de granuloma paracoccidioidico**. Arquivos do Departamento Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul, v. 3, p. 99-102, 1942.

MENDES, R. P.; CAVALCANTE, R. S.; MARQUES, S. A.; MARQUES, M.; VENTURINI, J.; SYLVESTRE, T. F.; PANIAGO, A.; PEREIRA, A. C.; DA SILVA, J. F.; FABRO, A. T.; BOSCO, S.; BAGAGLI, E.; HAHN, R. C.; LEVORATO, A. D. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. **The Open Microbiology Journal**, v. 11, p. 224–282., 2017

MENDES, R. P.; The Gamut of Clinical Manifestations. In: Franco M, Lacaz Cs, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, Editors. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton: **CRC Press**, v. 2, p. 233-58, 1994.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; MELHEM, M. C. Infecções fúngicas. In: Ferreira AW, Àvila SLM. Diagnóstico Laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. **Guanabara-Koogan**: São Paulo; 2001.

MENDES-GIANNINI, M. J.; MONTEIRO, S. J. L.; FÁTIMA, S. J.; DONOFRIO, F. C.; MIRANDA, E. T.; ANDREOTTI, P. F.; et al. Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: recent advances. **Mycopathologia**. v. 165, p. 237-48, 2008.

MOREIRA, A. P. V. Paracoccidioidomicose: histórico, etiologia, epidemiologia, patogênese, formas clínicas, diagnóstico laboratorial e antígenos. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 5, n. 51, p. 11-24, 2008.

MUBEEN, B.; ANSAR, A. N.; RASOOL, R.; ULLAH, I.; IMAM, S. S.; ALSHEHRI, S.; GHONEIM, M. M.; ALZAREA, S. I.; NADEEM, M. S.; KAZMI, I. Nanotechnology as a Novel Approach in Combating Microbes Providing an Alternative to Antibiotics. **Antibiotics**, v. 10, n. 12, p. 1473, 2021.

MUÑOZ, J. F.; FARRER, R. A.; DESJARDINS, C. A.; GALLO, J. E.; SYKES, S.; SAKTHIKUMAR, S.; et al. Genome diversity, recombination, and virulence across the major lineages of *Paracoccidioides*. **MSphere**, v. 1, n. 5, p. 213-16, Sep. 2016.

NARANJO, M. S.; TRUJILLO, M.; MUNERA, M. I.; RESTREPO, P.; GOMEZ, I.; RESTREPO, A. Tratamento da paracoccidioidomicose com itraconazol. **Journal of Medical Veterinary Mycology**. v. 28, p. 67-76, 1990.

SILVA NETO, B. R. CARVALHO, P. F. Z.; BAILÃO, A. M.; MARTINS, W. S.; SOARES, C. M. A.; PEREIRA, M. Transcriptional profile of *Paracoccidioides* spp. in response to itraconazole. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 1-15, 2014.

NOVA, R. Formas otorrinolaringológicas das blastomicoses. **Anais do Primeiro Congresso Sul-Americano de Otorrinolaringologia**. Buenos Aires. 1940.

PALMEIRO, M.; CHERUBINI, K.; YURGEL, L. S. Paracoccidioidomicose- Revisão da literatura. **Scientia Medica**, Porto Alegre: PUCRS, v. 15, n. 4, p. 274-278, out./dez. 2005.

PANIAGO, A. M. M.; AGUIAR, J. I. A.; AGUIAR, E. S.; CUNHA, R. V.; PEREIRA, G. R. O.; LONDERO, A. T.; WANKE, B. Paracoccidioidomicose: estudo clínico e epidemiológico de 422 casos observados no Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 36, n. 4, p. 455-459, July 2003.

PEÇANHA, P. M.; BATISTA-FERREIRA, M. E.; MASSARONI, P. M. A.; SCHMIDT, E. B.; LAMAS-DE-ARAÚJO, M.; ZANOTTI, R. L.; POTRATZ, F. F.; DELBONI-NUNES, N. E.; FERREIRA, C. U. G.; DELMAESTRO, D.; FALQUETO, A. Paracoccidioidomicose: Aspectos epidemiológicos e clínicos estudados em 546 casos o Estado do Espírito Santo, Brasil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 3, p. 836-844, Sep. 2017.

PHILLIPS, J. E.; ZHANG, X.; JOHNSTON, J. A. Dry Powder and Nebulized Aerosol Inhalation of Pharmaceuticals Delivered to Mice Using a Nose-only Exposure System. **Journal of Visualized Experiments**, n. 122, p. e55454, 2017.

PINZAN, C. F.; RUAS, L. P.; CASABONA-FORTUNATO, A. S.; CARVALHO, F. C.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Immunological basis for the gender differences in murine *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **PloS One**, v. 5, n. 5, p. e10757, 2010.

RAMOS, E. S. M.; SARAIVA, L. E. Paracoccidioidomycosis. **Clinics in Dermatology**, v. 26, p. 257-69, 2008.

RENZI, D. F.; CAMPOS, L. A.; MIRANDA, E. H.; MAINARDES, R. M.; ABRAHAM, W. R.; GRIGOLETTO, D. F.; KHALIL, N. M. Nanoparticles as a Tool for Broadening Antifungal Activities. **Current Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 9, p. 1841-1873, 2021.

RESTREPO-MORENO, A. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Franco MF, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, DEL NEGRO, G. editors. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton: **CRC Press**. p. 121-130, 1994.

RICHINI-PEREIRA, V. B. M.; GIMENES, B. S.; GRIESE, J.; CORDEIRO, T. R.; ASSIS, G. M. S.; JOSÉ-SILVA, R.; BAGAGLI, E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. **Medical mycology**, v. 46 n. 1, p. 35-40, 2008.

ROBICHAUD, A.; FERREYDOONZAD, L.; SCHUESSLER, T. F. Delivered dose estimate to standardize airway hyperresponsiveness assessment in mice. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 308, n. 8, p. L837- L846, 2015.

RODRIGUES, M. L. Funding and Innovation in Diseases of Neglected Populations: The Paradox of Cryptococcal Meningitis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, mar 2016.

RUDRAMURTHY, G. R.; SWAMY, M. K.; SINNIHAH, U. R.; GHASEMZADEH, A. Nanoparticles: Alternatives Against Drug-Resistant Pathogenic Microbes. **Molecules**, v. 27, n. 21, p. 836, 2016.

SAN-BLAS, G. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 31, n. 2, p. 99-113, 1993.

SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F. Molecular aspects of fungal dimorphism. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 101-27, 1984.

SANTOS-JÚNIOR, A. et al. Paracoccidioidomicose: caracterização clínico-epidemiológica dos casos notificados no Hospital de Doenças Tropicais da Universidade Federal do Tocantins (HDT-UFT), Brasil, no período de 2016 a 2018. XL International Sodebras Congress, 10 a 12 de dezembro de 2018 – Vitória – ES. **Sodebras**, v. 14, n. 159, Mar. 2019b.

SANTOS-JÚNIOR, A. O. **Avaliação do potencial terapêutico de nanopartículas com itraconazol por via inalatória em camundongos experimentalmente infectados com *Paracoccidioides brasiliensis***. 2019. 63f. Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal do Tocantins, Curso de pós-graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública. Araguaína, 2019a.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. Paracoccidioidomycosis Treatment. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57 Suppl 1, n. 1, p. 31–37, 2015.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; TELLES, F. D. Q.; KONO, A.; PANIAGO, A. M. M.; MARTINEZ, R. II Consenso Brasileiro em Paracoccidioidomicose - 2017. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 27, 2018.

SILVA, J. D. F.; OLIVEIRA, H. C.; MARCOS, C. M.; ASSATO, P. A.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Advances and challenges in paracoccidioidomycosis serology caused by *Paracoccidioides* species complex: an update. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 84, n. 1, p. 87-94, 2016.

SOLIMAN, G. M. Nanoparticles as safe and effective delivery systems of antifungal agents: Achievements and challenges. **Internacional Journal of Pharmaceutics**, v. 15, n.1, p. 15-32, 2017.

SOUZA, A. C. O. **Avaliação e tratamento da paracoccidioidomicose experimental utilizando diferentes doses de anfotericina B nanoestruturada em polímeros de ácido poli(lático-co-glicólico)**. 2012. 83f. Tese (Doutorado em Patologia Molecular). Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

SOUZA JR, A.; GASPARETTO, E.; DAVAUS, T.; ESCUISSATO, D.; MARCHIORI, E. Achados de TC de alta resolução de 77 pacientes com paracoccidioidomicose pulmonar não tratada. **AJR**, v. 187, p. 1248-1252, 2006.

TABORDA, C.; URÁN, M. E.; NOSANCHUK, J. D.; TRAVASSOS, L. R. Paracoccidioidomycosis: challenges in the development of a vaccine against an endemic

mycosis in the Americas. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, p. 21-24, 2015.

TEIXEIRA, M. M.; THEODORO, R. C.; NINO-VEGA, G.; BAGAGLI, E.; FELIPE, M. S. S. *Paracoccidioides* species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 10, Oct. 2014b.

TEIXEIRA, M. M.; THEODORO, R. C.; OLIVEIRA, F. F.; MACHADO, G. C.; HAHN, R. C.; BAGAGLI, E.; et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. **Medicine Mycology**, v. 52, n. 1, p. 19-28, jan. 2014a.

THEODORO, R. C.; TEIXEIRA, M. M.; FELIPE, M. S. S.; PADUAN, K. S.; RIBOLLA, P. M.; SAN-BLAS, G, et al. Genus *Paracoccidioides*: species recognition and biogeographic aspects. **PLoS One**, v. 7, n. 5, mai. 2012.

VALLE, A. C. F.; APRIGLIANO-FILHO, F.; MOREIRA, J. S.; WANKE, B. Clinical and endoscopic findings in the mucosae of the upper respiratory and digestive tracts in posttreatment follow-up of paracoccidioidomycosis patients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo. v. 37, n. 5, p. 407-13, 1995.

VERONESI, R.; FOCACCIA, R. Tratado de infectologia: v. 1 e 2. In: Tratado de infectologia: v. 1 e 2. 2005.

WANKE, B; LONDERO, A. T. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: FRANCO, M. F; LACAZ, C. S; RESTREPO-MORENO, A; DEL NEGRO. Paracoccidioidomycosis. **CRC Press**. p. 109- 20, 1994.

ZHANG, L.; GU, F. X.; CHAN, J. M.; WANG, A. Z.; LANGER, R. S.; FAROKHZAD, O. C. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. **Clinical Pharmacology Therapeutics**. v. 83, n. 5, p. 761-9, 2008.

CAPÍTULO 2 – ARTIGO A

Quantificação de *Paracoccidioides brasiliensis* em granulomas pulmonares de camundongos experimentalmente infectados e tratados com nanopartículas de itraconazol por via inalatória

Fabiane Moreira da Silva Santos¹, Ana Patrícia de Carvalho da Silva¹, José Carlos Ribeiro Junior¹.

¹Universidade Federal do Norte do Tocantins – Araguaína, Tocantins, Brasil.

Correspondência: fabianemorantos@gmail.com

RESUMO

A paracoccidioidomicose é uma importante micose sistêmica humana, causada pelo fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. Afeta diversos órgãos, os casos mais graves evoluem para o desenvolvimento de granulomas múltiplos preferencialmente em pulmão. O itraconazol via oral é base do tratamento, porém é de longo uso, com efeitos colaterais e um tempo de resposta que poderia ser encurtado se houvesse tecnologias disponíveis para concentrar esse princípio ativo diretamente sobre o órgão alvo. Assim, o objetivo desse trabalho é quantificar os fungos nos granulomas pulmonares dos diferentes grupos, avaliando a eficácia das nanopartículas de itraconazol no tratamento de camundongos experimentalmente infectados com *Paracoccidioides brasiliensis*. Foram utilizados camundongos da linhagem *Swiss*, divididos em 4 grupos: Controle negativo - não infectados/não tratados; Controle positivo – infectados/não tratados; Via oral – infectados/tratamento oral; Via inalatória – infectados/tratamento inalatório. Os animais segundo seus respectivos grupos foram submetidos à infecção experimental, tratamento e eutanásia ao final do processo, seguindo as diretrizes de bem estar animal. Amostras de pulmão foram coletadas e submetidas a histopatologia com coloração especial em Grocott – Gomori, analisados segundo leitura cega, com divisão de lâmina em dez campos distintos. A contagem de *P. brasiliensis* por campo foi realizada no software ImageJ e as médias por animal submetidas a ANOVA e teste T de student. Os resultados após quantificação demonstraram que o número de fungos contabilizados nos pulmões dos camundongos pertencentes ao grupo via inalatória, tratado com nanopartículas de itraconazol, foi significativamente menor quando comparado aos grupos via oral ($P < 0,05$), controle negativo ($P < 0,05$) e controle positivo ($P < 0,001$). Esses resultados suportam a noção de que a utilização de nanopartículas de itraconazol é uma possibilidade terapêutica para o tratamento da paracoccidioidomicose.

Palavras-chaves: Paracoco. Antifúngico. Inalação. Contagem. Grocott-Gomori.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis is an important human systemic mycosis, caused by the thermodimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. It affects several organs, the most severe cases evolving to the development of multiple granulomas preferentially in the lung. Oral itraconazole is the basis of treatment, but it is long term, with side effects and a response time that could be shortened if there were available technologies to concentrate this active ingredient directly on the target organ. Thus, the objective of this work is to quantify the fungi in the lung granulomas of different groups, evaluating the efficacy of itraconazole nanoparticles in the treatment of mice experimentally infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. Swiss mice were used, divided into 4 groups: Group 1 - non-infected/no treatment; Group 2 - infected/no treatment; Group 3 - infected/oral treatment; Group 4 - infected/inhalation treatment, which were submitted to experimental infection, treatment, and euthanasia at the end of the process, following the animal welfare guidelines. Lung samples were collected and submitted to histopathology with special staining in Grocott - Gomori, and analyzed according to blind reading, with division of the slide into ten distinct fields. The *P. brasiliensis* count per field was done in ImageJ software and the means per animal were submitted to ANOVA and Student's T test. The results after quantification showed that the number of fungi counted in the lungs of mice belonging to the group treated with itraconazole nanoparticles, was significantly lower when compared to the oral ($P < 0.05$), negative control ($P < 0.05$), and positive control ($P < 0.001$) groups. These results support the notion that the use of itraconazole nanoparticles is a therapeutic possibility for the treatment of paracoccidioidomycosis.

Key words: Paracoco. Antifungal. Inhalation. Counting. Grocott-Gomori.

1 INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica, não contagiosa, causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*). O habitat natural desse fungo é ainda discutido, porém acredita-se que ele habita o solo e a vegetação de áreas geográficas úmidas, entrando no corpo pelo trato respiratório, por inalação (ROMÃO, 2007). Geograficamente limita-se à América Latina com as áreas endêmicas estendendo-se desde o México até a Argentina, o maior número de casos tem sido relatado no Brasil, na Colômbia e na Venezuela (JIMÉNEZ, 2015).

Os pulmões sofrem grandes danos nos casos crônicos e demonstram sequelas pós tratamento, como a presença de enfisema e fibrose (MENDES et al., 2017). Em indivíduos com resposta imunológica satisfatória, o desenvolvimento da infecção é contido, havendo resolução do processo. O fungo permanece nesses locais, em meio a lesões fibróticas, em estado latente, porém viável. Após um período prolongado, a

infecção pode progredir e dar origem às formas crônicas (reativação endógena) (WANKE; AIDÉ, 2009).

Pela importância em saúde dessa doença e os danos relacionados a sua presença, metodologias terapêuticas inovadoras estão sendo desenvolvidas. Torna-se necessária a busca por melhores resultados e métodos que aumentem a eficácia da terapia, priorizando o paciente. A nanotecnologia é um multicanal que envolve áreas como a química, física, biologia e medicina, confere o insumo necessário para inovação (LEE et al., 2012).

O itraconazol é a droga de eleição na terapêutica da PCM sem acometimento sistêmico grave, podendo ser administrado VO ou IV (AMBRÓSIO et al., 2014). O tratamento por via inalatória com o itraconazol surge como uma possível alternativa, mas que não é utilizada na prática clínica por não existir formulação disponível. O intuito de desenvolver uma formulação inalatória de itraconazol em nanopartículas é diminuir os efeitos colaterais gastrointestinais, concentrar a medicação no órgão alvo, ou seja, o pulmão.

Santos-Júnior (2019), que demonstrou a possibilidade da formulação dessas nanopartículas de itraconazol e o seu uso por via nasal em modelo murino, dá a oportunidade de avaliar o potencial dessa terapia na redução do número de *P. brasiliensis* presentes em granulomas pulmonares, comparando com outras formas de administração do fármaco, a fim de complementar os dados de eficácia da pesquisa, justificando o seu desenvolvimento.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados 28 camundongos de linhagem *Swiss*, fêmeas, não castradas, com peso de aproximadamente 35 g e idade entre 8 e 12 semanas, provenientes do Laboratório de Patologia Experimental da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – EMVZ – UFT. Os espécimes foram distribuídos em gaiolas (7 animais/gaiola), ante condições padronizadas de luminosidade (ciclos alternados de 12 horas entre claro e escuro), e temperatura ($23^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$), com alimentação e água *ad libitum*. Ações foram adotadas em acordo com as diretrizes do Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, publicado pelo Instituto Nacional de Saúde dos EUA, e a pesquisa foi

aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais - UFT (CEUA – 23101.002945/2018-61).

2.2 Inóculo

A amostra utilizada para o estudo foi o isolado de *Paracocidioides brasiliensis*, linhagem S1a (MUNOZ et al., 2016), disponibilizada pelo Laboratório de Micologia da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), campus de Botucatu. O isolado foi mantido em meio Agar Saboround acrescido de extrato de levedura (GPY – Kasvi), em incubadora bacteriológica tipo B.O.D. (Hydrosan) à 35° C sob a forma de levedura e repicado a cada 7 dias (FERNANDES et al., 2017; PINTO et al., 2017).

2.2.1 Preparação e quantificação do inóculo

O fungo foi inoculado em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) e mantido por 7 dias à 35° C, umidade de 45%, sob agitação à 60 rpm em uma incubadora shaker (Hydrosan Biosan) para a cultura de *P. brasiliensis*.

A cultura mantida em RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) foi centrifugada por 5 minutos a 4000 rpm (Centribio), o sobrenadante desprezado e o precipitado ressuspendido em PBS estéril (PBS-Mallincrodt e Carlo Erba), procedimento realizado 3 vezes. A suspensão resultante colocada em agitador vórtex durante 15 segundos e a densidade celular, ajustada com espectrofotômetro (PG Instruments T80+ UV/VIS), acrescentando-se PBS estéril suficiente para obter uma absorbância equivalente de uma solução-padrão no valor de 0,5 da escala de McFarland, em comprimento de onda de 625 nm. Esse procedimento forneceu uma suspensão-padrão de levedura contendo de 1×10^6 a 5×10^6 células/mL.

A viabilidade do inóculo foi determinada através da adição de 0,5 ml da solução padronizada acrescida de 0,5 ml de PBS estéril acrescida de verde janus 0,02%. Após 20 minutos a solução foi agitada e uma alíquota levada ao microscópio óptico utilizando-se um hemocitômetro (câmara de Neubauer). As células que permaneceram sem coloração foram consideradas viáveis. A viabilidade é considerada satisfatória quando maior ou igual 80%. A suspensão de trabalho para *P. brasiliensis* foi produzida centrifugando-se o inóculo padrão e ressuspendendo-o em meio líquido RPMI 1640 (TAKAHAGI-NAKAIRA et al., 2009).

2.3 Formulação de nanopartículas de itraconazol

Embora testadas outras formulações para solubilidade do itraconazol em água, o β -CD e HP- β -CD foram utilizados em meio aquoso para formulação de nanopartículas apresentando os melhores resultados.

Algumas variações de substâncias foram testadas, em diferentes concentrações de HP- β -CD (Sigma-Aldrich) (Solução 1: sem ciclodextrina, Solução 2: 6% m/v, Solução 3: 12% m/v e Solução 4: 24% m/v), foram preparadas com água destilada com um volume final de 10 mL. Dez miligramas de itraconazol foram dissolvidos em 100 μ l (1% do volume da solução final) de propilenoglicol (Sigma-Aldrich) e 36 μ l de ácido clorídrico (HCl) (Sigma-Aldrich) a 36,5% (3,6 μ l/ml da solução final).

O itraconazol foi dissolvido em propilenoglicol (Sigma-Aldrich) logo em seguida e posteriormente acidificado por microgotejamento à solução de ciclodextrina aquosa e mantido sob agitação magnética (Velp científica ARE Heating Magnetic Stirrer) por 1 hora a temperatura ambiente (25 °C). Após esse período, adicionou-se NaOH (Cromoline) à solução sob agitação e, com o auxílio de um medidor de pH (Thermo Scientific Orion Star A211), corrigiu-se o pH para $7,0 \pm 0,1$. Após a correção do pH, as soluções foram mantidas sob refrigeração a 8 °C. (HOSTETLER et al., 1992; MIYAKE et al., 1999; PEETERS et al., 2002; HOLVOET et al., 2007).

Foi utilizado um turbidímetro (Instrutherm) para medir a turbidez nas diferentes formulações, antes e após centrifugação. Além de avaliada a concentração inibitória mínima (CIM) através de uma formulação específica que contou com concentração final de 3,2 mg/ml de itraconazol e na proporção de HP β CD de 24% m/v (80 vezes a quantidade de itraconazol – 2,56 g), seguindo as mesmas etapas do processo.

2.4 Imunossupressão dos animais

Com o intuito de tornar as condições experimentais dos camundongos semelhantes às vividas pelos pacientes com paracoccidiodomicose, os animais foram imunossuprimidos farmacologicamente. Uma semana antes da inoculação experimental a imunossupressão foi induzida nesses animais com o uso de dexametasona diluída na água do bebedouro na concentração de 8 mg/L acrescido de 1 g/L de amoxicilina em oferta *ad libitum*, sendo mantida até o final do experimento (MACHADO et al., 1985; ALEIXO et al., 2012; HU et al., 2016; SANTOS-JÚNIOR, 2019).

2.5 Infecção experimental

A infecção foi precedida pela anestesia dos camundongos que consistiu na utilização de cetamina 120 mg/kg e xilazina 8 mg/mg/kg por via intraperitoneal (SEABRA; POMPEU; VALENTI, 2018), em volume final de 50 µl do inóculo de *P. brasiliensis* (1×10^6 a 5×10^6 células/mL) (DA SILVA et al., 2013). O inóculo foi administrado com auxílio de laringoscopia direta com um otoscópio standard tamanho neonatal adaptado para o procedimento e através de uma seringa de vidro de Hamilton de 50 µL conectada a um cateter de teflon de 20 G (gauge).

Após, foi realizada a insuflação com 100 µL de ar para adequada dispersão do inóculo pelos pulmões e desobstrução da via aérea principal (RAYAMAJHI et al., 2011). Os animais foram mantidos sob observação até a recuperação completa da anestesia, e o tratamento foi iniciado 48 h após a inoculação (PINA et al., 2004; GONZÁLEZ et al., 2008).

2.6 Tratamento Experimental

Os animais foram divididos em 4 grupos com 7 animais em cada grupo (n = 7). Todos submetidos as mesmas condições, inclusive na imunossupressão:

- I. Animais não infectados e não tratados (Controle Negativo – CN);
- II. Animais infectados e não tratados (Controle Positivo – CP);
- III. Animais infectados e tratados com Itraconazol por via oral (Grupo via oral – VO) – onde os animais receberam o fármaco através do método de gavagem na dose de 1 mg/mL/animal, uma vez ao dia, durante sete dias.
- IV. Animais infectados e tratados com nanopartículas de Itraconazol por via inalatória (Grupo via inalatória – IN) – a técnica utilizada consistiu no uso de um inalador de rede vibratória OMROM NE-U22LA, acoplado a uma câmara de nebulização de corpo inteiro (SANTOS-JÚNIOR, 2019), na dosagem de 1 mg/dia/animal por via inalatória numa solução de 3 mg/ml e velocidade de nebulização de 0,25 mL de solução por minuto e volume final padronizado de 1mL /animal, por sete dias.

2.7 Eutanásia e Histopatologia

O protocolo de eutanásia utilizado seguiu de acordo o que estabelece o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. Dessa forma, após decorridos 7 dias de tratamento, por via intraperitoneal foi administrado em sobredosagem 300 mg/kg de cetamina + 30 mg/kg de xilazina, seguida de perda da consciência e deslocamento cervical, seguindo para o processo de necrópsia com coleta do lobo caudal esquerdo dos pulmões.

2.6.1 Coloração especial com prata metenamina Grocott-Gomori (GMS)

Os cortes histológicos para coloração em Grocott passaram pela oxidação em ácido crômicos à 4% durante 15 minutos, seguido de lavagem em água corrente durante 10 minutos, após isso tratados com bissulfeto de sódio 1% objetivando a remoção de qualquer tipo de resíduo, com uma lavagem por 5 min, e três trocas em água corrente. Após isso, submetida a prata metenamina pré-aquecida em estufa em 60° C, por 15 segundos, lavada em água destilada, consecutivamente submetidos ao cloreto de ouro 1% até clareamento com posterior lavagem em água destilada, por fim imerso em hipossulfito de sódio 5% por 1 minuto e lavado em água corrente, empregada a luz verde e finalizado com a lavagem.

2.8 Contagem média de *Paracoccidioides brasiliensis*

Para contagem do número de células fúngicas presentes em cada corte histológico por animal, foi utilizada a técnica de leitura cega, todas as lâminas foram numeradas de modo aleatório e divididas em dez campos microscópicos distintos, observadas e fotografadas em objetiva de 40x.

As imagens foram obtidas através de microscópio óptico adaptado para fotografia e analisadas no programa ImageJ (National Institutes of Health, EUA, versão 6.0), com o resultado expresso em forma de média por animal.

2.9 Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados e expressos em forma de número de *P. brasiliensis* em Log de UFC. Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey, para comparações das médias dos grupos, estimadas significativas as diferenças para $p < 0,05$.

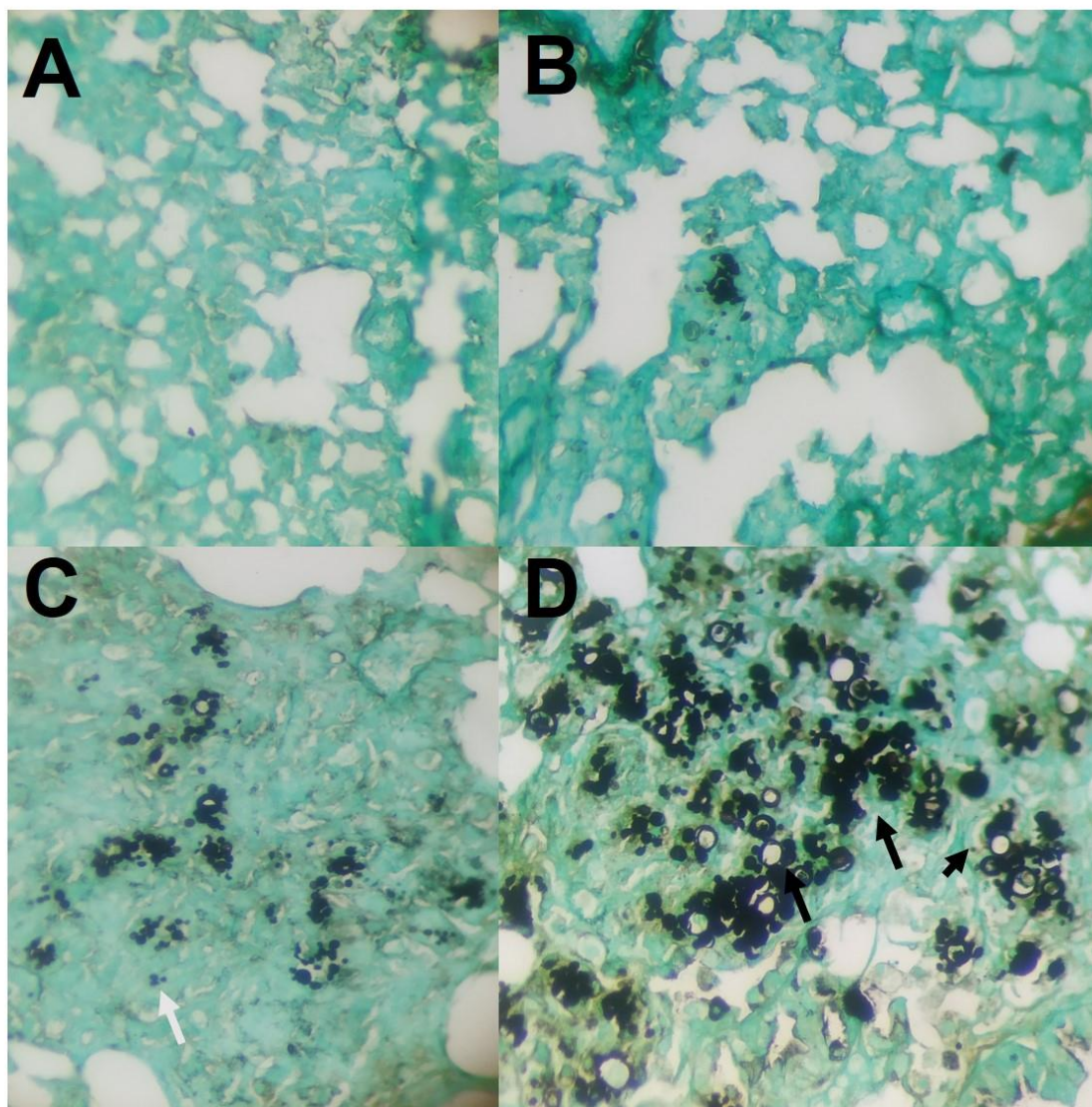
3 RESULTADOS

As imagens representativas de cada um dos quatro grupos experimentais demonstram a presença de fungos em quantidades crescentes nos granulomas pulmonares nos grupos infectados e tratado por via inalatória, via oral e não tratados, assim como a ausência de fungo no grupo controle negativo, tendo em vista que os animais não recebem o inóculo fúngico (Figura 1).

A figura 2A, demonstra ausência de fungos, por se tratar do pulmão de animais não infectados e conseqüentemente não tratados. Observa-se na figura 2B (IN), uma discreta quantidade de fungos no granuloma quando comparado a figura 2C (VO), que demonstra uma quantidade moderada e 2D (CP) o grupo com uma quantidade intensa de *P. brasiliensis*, exatamente por não ter recebido qualquer tratamento durante o experimento.

Foi possível observar a impregnação pela prata delimitando os contornos fúngicos e corando em variação de marrom à preto os cortes histológicos. Quanto a sua morfologia é possível observar os brotamentos simples e múltiplos partindo de uma estrutura central arredondada (levedura). Quando emitem múltiplos brotamentos são semelhantes a uma roda de leme (setas pretas) e quando emitem dois brotamentos apenas são chamados de cabeça de Mickey (seta branca).

Figura 1. Histopatologia do pulmão de camundongos experimentalmente infectados com *Paracoccidioides brasiliensis* e tratados ou não com itraconazol por via oral ou com nanopartículas por via inalatória. A: pulmão de camundongo não infectado e não tratado evidenciando a ausência de estruturas fúngicas; B: pulmão de camundongo infectado e tratado com itraconazol por via inalatória apresentando redução no número de fungos (seta); C: Pulmão de animal infectado e tratado com itraconazol por via oral, com presença moderada de fungos com brotamentos múltiplos (setas) D: pulmão de camundongo infectado e não tratado com presença de uma quantidade intensa de fungos (setas). (Objetiva: 40x, Grocott-Gomori, barra com 500 μm).



Fonte: Arquivo pessoal, 2022.

Os valores obtidos após quantificação, expressos em média de Log de *P. brasiliensis* por grupo experimental demonstraram que o número de fungos contabilizados nos pulmões dos camundongos pertencentes ao grupo via inalatória, tratado com nanopartículas de itraconazol, foi significativamente menor quando

comparado aos demais grupos ($P < 0,05$), indicando que houve redução significativa do número de fungos, inclusive quando comparado ao grupo via oral, via de administração padrão para o tratamento dessa enfermidade(Gráfico 1).

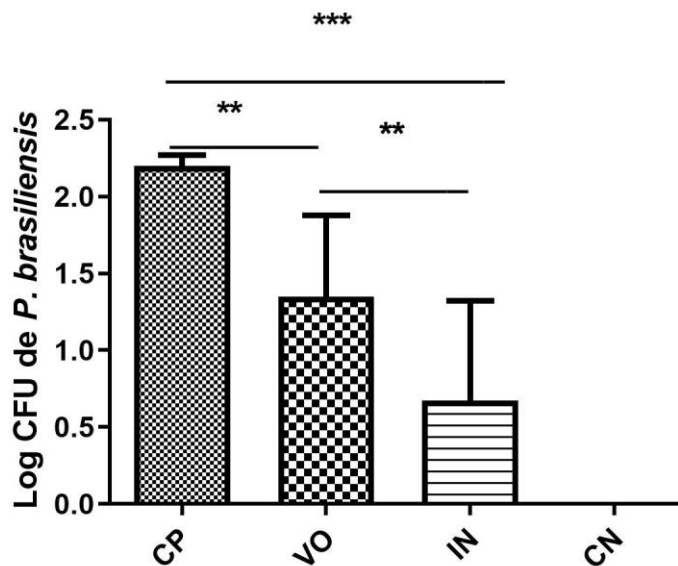


Gráfico 1. Número de CFU *P. brasiliensis* em granulomas pulmonares de camundongos experimentalmente infectados, não tratados e tratados, via oral com itraconazol e via inalatória com nanopartículas de itraconazol. Os resultados foram analisados quanto à normalidade antes de serem submetidos a ANOVA, com os valores das médias comparadas pelo teste de Tukey. As diferenças estatísticas estão representadas por asteriscos (** $p < 0,05$; *** $p < 0,001$) em relação ao controle negativo (CN) e entre os grupos Via Oral (VO) e Via Inalatória (IN).

4 DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que houve redução significativa do número de fungos nos granulomas pulmonares dos camundongos que foram tratados por via inalatória em relação aos demais grupos, dando ênfase para redução significativa quando comparados com o grupo de administração via oral, via padrão de tratamento da doença.

É possível constatar que essa via de administração (IN) e a utilização de nanopartículas de itraconazol tem grande potencial para ser utilizada como tratamento alternativo da PCM (SANTOS-JÚNIOR, 2019a; SILVA, 2021). Como observado no presente trabalho, que mostra o potencial de inovação dessa terapia por via inalatória ao

demonstrar através da redução do número de *P. brasiliensis* em granulomas dos camundongos experimentados.

Ao relatar a proposta de modificação da via de administração da medicação de preleção, o itraconazol, nos casos de PCM e submeter aos testes experimentais, impulsiona o pensamento sobre as novas terapias e metodologias aplicadas no tratamento de doenças de importância em saúde pública e que podem contribuir de forma significativa na saúde populacional, assim como experimentado por Souza (2012), quando testou a nanomodificação das partículas de Anfotericina B, uma droga que também é usada no tratamento da paracoccidioidomicose.

O aumento no número de casos de doenças fúngicas e o crescente número de indivíduos imunossuprimidos, impulsionam o avanço nas pesquisas por tratamentos mais eficazes para esses casos (ROMANI, 2011), em resposta a isso há também um elevado número de óbitos, que acaba por demonstrar a contribuição desse tipo de estudo para a saúde do indivíduo.

A fim de complementar os resultados da redução no número de fungos nos granulomas pulmonares de camundongos tratados com itraconazol por via inalatória, o estudo utilizou a técnica de Grocott-Gomori, uma vez que esta, ao impregnar a prata na membrana celular do fungo, realça seu contorno, permitindo a visualização das estruturas, brotamentos e esporos, além de classificar a fase reprodutiva e estimar se o fungo não apresenta mais atividade. O uso da coloração H.E, nesses casos, é imprescindível para avaliação inicial do processo inflamatório e da estrutura fúngica (SANTOS, 2019). Grocott-Gomori é a técnica mais indicada quando se deseja caracterizar o fungo e consequentemente quantificá-lo (ARAÚJO; SOUSA; CORREIA, 2003).

Quando comparada a outras técnicas de coloração no exame histopatológico, como HeE e PAS, autores como Bisinelli et al. (2001), ressaltam a sobressalência da técnica de Grocott-Gomori, destacando seu alto potencial de sensibilidade na visualização do agente etiológico, assim como observado no presente trabalho, já que as estruturas fúngicas estão facilmente perceptíveis em lâmina, ainda assim, não descartam a possibilidade de uso de ambas as técnicas de coloração.

Ao relacionar estudos já feitos com uso de coloração HeE, como aqueles desenvolvidos por Santos (2021), é possível evidenciar a importância da técnica de Grocott-Gomori como uma alternativa quando se necessita identificar os fungos, e HeE na evidência da presença dos granulomas causados pela doença, o que torna a

associação das técnicas bastante útil quanto mais profundo o tipo de estudo e a resposta que se busca.

Ao serem impregnadas pela prata, as lâminas contendo o *P. brasiliensis* acabaram tendo os contornos fúngicos delimitados o que permitiu sua identificação de modo preciso, isso ocorreu em decorrência da liberação dos grupos aldeídos em resposta ao uso de ácido crômico e redução nos complexos alcalinos dos polissacarídeos da parede celular fúngica frente ao nitrato de prata, o que acaba por apoiar a escolha da técnica empregada no trabalho (GROCOTT, 1995; BANCROFT; STEVENS, 1996).

A utilização das nanopartículas de itraconazol como uma nova forma de apresentação do fármaco, vem trazendo resultados promissores observados nos trabalhos do nosso grupo de pesquisa, como por exemplo os resultados obtidos por Falcão (2018), ao sintetizar nanopartículas de Anfotericina B, também para os casos de infecção por *P. brasiliensis*. Tang (2018), a fim de proporcionar uma administração oral, desenvolveu nanopartículas de quitosana e itraconazol para atuar contra o *C. neoformans*, ou as nanoformulações de prata e ouro desenvolvidas para tratar micoses micose cutânea e em queratinócitos humanos realizada por Ronaveri et al. (2018).

Os animais que receberam nanopartículas por via inalatória apresentaram uma redução significativa no número de fungos, quando comparados ao grupo via oral. O que segue os preceitos de Bailey et al. (2009), que define que as nanopartículas são responsáveis por aumentar a área de contato do órgão com o princípio ativo desejado, que pode explicar a maior eficácia experimental da administração inalatória quando comparada com o via oral. Segundo observado no gráfico de médias de *P. brasiliensis*, o que acaba por diminuir o tempo de absorção daquele fármaco, evitando as perdas e potencializando sua ação local, exatamente como demonstra o estudo.

Um comparativo eficaz relacionado à importância das nanopartículas, com relação a *Candida albicans* e os casos orofaríngeos, com tratamento antifúngico que acaba tendo baixa biodisponibilidade e elevados efeitos adversos, resultando em um estudo sobre as nanopartículas de prata para o tratamento dessa enfermidade, visando diminuir a problemática terapêutica (FALCÃO, 2018). Dessa forma, as nanopartículas de itraconazol, administradas por via inalatória, têm muito a contribuir no cenário de tratamento da PCM.

5 CONCLUSÃO

A nanoformulação das partículas de itraconazol e a administração destas por via inalatória reduz de forma significativa a quantidade de fungos nos granulomas pulmonares em modelo murino de infecção, demonstrando seu potencial de eficácia no tratamento da paracoccidiodomicose.

REFERÊNCIAS

ALEIXO, F.S.; VASCONCELOS, F. F.; SOARES, J. D. A. H.; JÚNIOR, R. S. L.; GARCIAZAPATA, M. T. A. Avaliação do efeito de medicamentos imunossupressores na reativação da toxoplasmose crônica murina. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 41, n. 2, p.69-178, jun.2012.

AMBROSIO, A. V. A.; CAMELO, C. C. S.; BARBOSA, C. V. Paracoccidiodomicose (doença de Lutz-SPLENDRE-almeida): tratamento, duração do tratamento, recidiva, reação paradoxal, prognóstico, profilaxia. **Revista de Medicina Minas Gerais**, v. 24, n.1, p. 74-80, Minas Gerais, 2014.

ARAÚJO, M. S. D.; SOUSA, S. C.; CORREIA, D. Avaliação do exame citopatológico como método para diagnosticar a paracoccidiodomicose crônica oral. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 427-430, 2003.

BAILEY, M. M.; BERKLAND, C. J. Nanoparticle Formulations in Pulmonary Drug Delivery. **Medicinal Research Reviews**, v. 29, n. 1, p. 196-212, 2009.

BANCROFT, J. D.; STEVENS, A. - Theory and practice of histological techniques. 4. ed. Hong Kong: **Churchill Livingstone**, p. 300-2, 1996.

BISINELLI, J. C.; TELLES, F. Q.; SOBRINHO, J. A.; RAPOPORT, A. Manifestações estomatológicas da paracoccidiodomicose. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 67, p. 683-687, 2001.

DA SILVA, J. F.; OLIVEIRA, H.C.; MARCOS, C. M.; SILVA, R. A. M.; COSTA, T. A.; CALICH, V. L. G.; ALMEIDA, A. M. F.; MENDES-GIANNINI. *Paracoccidoides brasiliensis* 30 kDa adhesin: identification as a 14-3-3 protein, cloning and subcellular localization in infection models. **PloS One**, v. 8, n. 4, p. e62533, 2013

FALCÃO, C. M. S. B. C. Atividade Antifúngica de Nanopartículas de Prata e de sua associação com Fluconazol frente a cepas de *Candida albicans* resistentes. (2018). 76f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-graduação em odontologia. Recife. 2018.

FERNANDES, F. F.; OLIVEIRA, A. F.; LANDGRAF, T. N.; CUNHA, C.; CARVALHO, A.; VENDRUSCOLO, P. E.; GONÇALES, R. A.; ALMEIDA, F.; SILVA, T. A.; RODRIGUES, F.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Impact of Paracoccin

Gene Silencing on *Paracoccidioides brasiliensis* Virulence. **Mbio**, v. 8, n. 4, e00537-17, 2017.

GONZÁLEZ, A.; RESTREPO, A.; CANO, L. E. Pulmonary immune responses induced in BALB/c mice by *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 313- 330, 2008.

GROCOTT, R. G. A. - A stain for fungi in tissue sections and smears: using Gomori's methenamine - silver nitrate technic. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 25, p. 975-9, 1995.

HOLVOET, C.; VANDER HEYDEN, Y.; PLAIZIER-VERCAMMEN, J. Influence of preparation method on itraconazole oral solutions using cyclodextrins as complexing agents. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 62, n. 7, p. 510-514, 2007.

HOSTETLER, JOHN S.; HANSON, L. H.; STEVENS, D. A. Effect of cyclodextrin on the pharmacology of antifungal oral azoles. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n. 2, p. 477-480, 1992.

HU, Y.; WANG, D.; ZHAI, K.; TONG, Z. Transcriptomic analysis reveals significant B lymphocyte suppression in corticosteroid-treated hosts with *Pneumocystis pneumonia*. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 56, n. 3, p. 322-331, 2016.

JIMÉNEZ, M. E. U. *Paracoccidioides lutzii*: estudo de alguns mecanismos de patogenicidade. São Paulo, 2015, p.1. (Tese de Doutorado). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

LEE, D-E.; KOO, H.; SUN, I. C; RYU, J. H; KIM, K.; KWON, I. C. Nanopartículas multifuncionais para imagens multimodais e teragnose. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 7, p. 2656-2672, 2012

MACHADO, L. R.; FECCHIO, D.; LIMONGI, J. C. P.; BERGER, A.; LIVRAMENTO, J. A.; SPINA-FRANÇA, A. Neurocryptococcosis and immunossupression: an experimental model in mice. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 43, n. 1, p. 29-38, 1985.

MENDES, R. P.; CAVALCANTE, R. S.; MARQUES, S. A.; MARQUES, M.; VENTURINI, J.; SYLVESTRE, T. F.; PANIAGO, A.; PEREIRA, A. C.; DA SILVA, J. F.; FABRO, A. T.; BOSCO, S.; BAGAGLI, E.; HAHN, R. C.; LEVORATO, A. D. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. **The Open Microbiology Journal**, v. 11, p. 224–282., 2017.

MIYAKE, K. *et al.* Characterization of itraconazole/2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex in aqueous propylene glycol solution. **International journal of pharmaceutics**, v. 179, n. 2, p. 237-245, 1999.

MUÑOZ, J. F. *et al.* Genome Diversity, Recombination, and Virulence across the Major Lineages of *Paracoccidioides*. **mSphere**, v. 1, n. 5, p. e00213-16, out. 2016.

PINTO, M E. A.; ARAÚJO, S. G.; MORAIS, M. I.; SÁ, N. P.; LIMA, C. M.; ROSA, C. A.; SIQUEIRA, E. P.; JOHANN, S.; LIMA, L. A. R. S. Antifungal and antioxidant activity of fatty acid methyl esters from vegetable oils. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 89, n. 3, p. 1671-1681, 2017.

PEETERS, Jef *et al.* Characterization of the interaction of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin with itraconazole at pH 2, 4, and 7. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 91, n. 6, p. 1414-1422, 2002.

RAYAMAJHI, M.; REDENTE, E. F.; CONDON, T. V.; GONZALEZ-JUARRERO, M.; RICHES, D. W.; Lenz, L. L. Non-surgical Intratracheal Instillation of Micewith Analysis of Lungs and Lung Draining Lymph Nodes by Flow Cytometry. **Journal of Visualized Experiment**, v. 51, e. 2702 10.3791/2702, 2011.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 4, p. 275-88, 2011.

ROMÃO, J. F. F. **Morfologia e mecânica pulmonares no curso da infecção experimental induzida pelo *Paracoccidioides brasiliensis* em camundongos**. 2007. 141 f. Tese (Doutorado em Medicina) - Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

RÓNAVÁRI, A.; IGAZ, N.; GOPISETTY, M. K.; SZERENCSES, B.; KOVÁCS, D.; PAPP, C.; VÁGVÖLGYI, C.; BOROS, I. M.; KÓNYA, Z.; KIRICSI, M.; PFEIFFER, I. Biosynthesized silver and gold nanoparticles are potent antimycotics against opportunistic pathogenic yeasts and dermatophytes. **International Journal Nanomedicine**, v. 1, n. 13, p. 695-703, 2018.

SANTOS, D. E S. **Avaliação morfométrica de lesões granulomatosas pulmonares em camundongos experimentalmente infectados com *Paracoccidioides brasiliensis* e tratados com nanopartículas de itraconazol por via inalatória**. 2021. 37f. Dissertação (Mestrado Acadêmico). Programa de Pós-graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos – Universidade Federal do Tocantins. Araguaína, 2021.

SANTOS-JÚNIOR, A. O. **Avaliação do potencial terapêutico de nanopartículas com itraconazol por via inalatória em camundongos experimentalmente infectados com *Paracoccidioides brasiliensis***. 2019. 63f. Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal do Tocantins, Curso de pós-graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública. Araguaína, 2019.

SEABRA, D. I.; POMPEU, E.; VALENTI, M. L. G. Anestesia e analgesia de animais utilizados em protocolos experimentais. Central Vivarium of the University of São Paulo Medical School. v. 8, 2018.

SOUZA, A. C. O. **Avaliação e tratamento da paracoccidioidomicose experimental utilizando diferentes doses de anfotericina B nanoestruturada em polímeros de ácido poli(lático-co-glicólico)**. 2012. 83f. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

TAKAHAGI-NAKAIRA, E.; SUGIZAKI, M. F.; PERAÇOLI, M. T. S. Microdilution procedure for antifungal susceptibility testing of *Paracoccidioides brasiliensis* to amphotericin b and itraconazole. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 15, n. 4, p. 718-731, 2009.

TANG, Y.; WU, S.; LIN, J.; CHENG, L.; ZHOU, J.; XIE, J. Nanopartículas direcionadas contra pneumonia criptocócica por interações entre quitosana e seu ligante peptídico. **Nano Letters**, v. 18, p. 6207-6213, 2018.

WANKE, B.; AIDÊ, M. A. Capítulo 6 – Paracoccidiodomicose. Trabalho realizado na Universidade Federal Fluminense -UFF-Niterói-RJ. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 12, p. 1245-1249, 2009.

CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Alguns tópicos observados durante o trabalho dizem respeito a paracoccidioidomicose ser uma doença que requer uma atenção em seu diagnóstico e tratamento, a escolha do melhor método e do princípio ativo ideal, demonstram resultados positivos aos indivíduos, otimizando os resultados.

O estudo do tratamento via inalatória após infecção experimental com *Paracoccidioides brasiliensis*, vem como uma nova metodologia a ser aplicada em indivíduos futuramente, conforme o desenvolvimento de todas as fases do estudo. Englobam o desenvolvimento da nanopartícula, os estudos que embasam sua eficiência na redução do número de fungos presentes dentro dos granulomas pulmonares e as diferentes formas de quantificar o agente, através dos métodos possíveis, atestando assim a capacidade da formulação em ser infundida, absorvida e desenvolver efeito, reduzindo assim o número de fungos, e as demais etapas que vem a seguir para elucidar as características de toxicidade e segurança da formulação.

O uso de nanopartículas para uso inalatório na saúde, como forma de tratamento, ou viabilizando uma determinada metodologia, potencializam as possibilidades terapêuticas disponíveis. Abrangendo as mais diversas classes e categorias de fármacos e tratando doenças com diversas as causas e que gerem agravo nos pulmões, desde casos mais leves, até os mais graves. Características que embasam a importância da pesquisa experimental, e ressaltam a sua importância ao contribuir com os avanços em saúde.