



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

DENISE CHRISTINE ERICEIRA SANTOS

**AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DE LESÕES GRANULOMATOSAS
PULMONARES EM CAMUNDONGOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS
COM *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS* E TRATADOS COM
NANOPARTÍCULAS DE ITRACONAZOL POR VIA INALATÓRIA**

ARAGUAÍNA-TO
2021

DENISE CHRISTINE ERICEIRA SANTOS

**AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DE LESÕES GRANULOMATOSAS
PULMONARES EM CAMUNDONGOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS
COM *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS* 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: Prof. Ana Patrícia de Carvalho da Silva
Co-Orientador interno: José Carlos Ribeiro Júnior
Co-Orientador: Auricélio Alves de Macêdo

ARAGUAÍNA-TO
2021

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

S237a Santos, Denise Christine Ericeira.

Avaliação morfológica de lesões granulomatosas pulmonares em camundongos experimentalmente infectados com *Paracoccidioides brasiliensis* e tratados com nanopartículas de itraconazol por via inalatória. / Denise Christine Ericeira Santos. – Araguaína, TO, 2021.
37 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, 2021.

Orientadora : Ana Patrícia de Carvalho Da Silva

Coorientador: José Carlos Ribeiro Júnior

1. *Paracoccidioides brasiliensis*. 2. Nanopartículas de itraconazol.
3. Granulomas. 4. Histomorfometria. 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).

DENISE CHRISTINE ERICEIRA SANTOS

**AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DE LESÕES GRANULOMATOSAS
PULMONARES EM CAMUNDONGOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS
COM *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS* 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 obtenção do Título de Mestre em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos.

Aprovada em: 14 / 09 / 2021

Banca Examinadora

Ana Patrícia de Carvalho da Silva

Ana Patrícia de Carvalho da Silva, Orientadora, UFT

Fabiano Mendes de Cordova

Fabiano Mendes de Cordova, Examinador interno, UFT

Auricélio Alves de Macêdo

Auricélio Alves de Macêdo, Examinador externo, UFT

ARAGUAÍNA, 2021

*Dedico este trabalho à minha mãe, Edite Ericeira,
que sempre foi meu ponto de apoio e inspiração, a
ela devo tudo que eu sou.*

“É necessário que ele cresça e que eu diminua.”

João 3:30

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por ter dado força para superar todas as dificuldades e concluir este trabalho.

Aos meus pais, Edite e Luís, pelo amor incondicional, compreensão e apoio nos momentos difíceis. Aos meus avós, Raimunda, Francisca e Dionísio, que sempre me incentivaram a lutar pelos meus objetivos e ajudaram em tudo que precisei. Ao meu padrasto, Manoel Júnior, pela motivação e força para seguir mesmo diante dos problemas.

A minha orientadora Prof.^a Dra. Ana Patrícia, por todos os ensinamentos, disponibilidade e ajuda na execução deste projeto.

Aos professores, Dr. Auricélio Macêdo e Dr. Fábio Andrade por todas as contribuições dadas neste trabalho.

A todos os professores da Pós-graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, pelo conhecimento repassado que contribuiu para meu crescimento profissional.

Ao Mestre Antônio Oliveira, que deu início a esse projeto de pesquisa e sempre esteve a disposição para ensinar o que fosse preciso.

A Mestre Márcia Aparecida, que foi uma grande parceira durante todo esse período. Compartilhamos conhecimento e também muitos momentos de aflição.

Aos meus amigos da Pós-graduação e colegas do Grupo de Estudos em Patologia, por toda a ajuda durante esse momento.

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

RESUMO

A paracoccidioidomicose é uma enfermidade causada pelo fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. Caracteriza-se por uma inflamação granulomatosa que acomete principalmente o pulmão e o tratamento consiste no uso prolongado de antifúngicos por via oral ou intravenosa, que causam muitos efeitos colaterais. Este estudo teve como objetivo avaliar o número e área dos granulomas nos pulmões de camundongos Swiss experimentalmente infectados com *Paracoccidioides brasiliensis* e tratados com nanopartículas de itraconazol por via inalatória, como um dos quesitos de avaliação da eficácia deste tratamento. Foram utilizados 28 camundongos, Swiss, entre 8 a 12 semanas de idade. Os animais foram aclimatados às condições do laboratório durante duas semanas antes do início do experimento. Para o procedimento de infecção, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com Cetamina 120 mg/kg e Xilazina 8 mg/kg e, em seguida infectados com 50 µL do inóculo contendo 5×10^6 células/mL de *Paracoccidioides brasiliensis*. Em seguida, foram distribuídos em quatro grupos: Grupo 1 – não infectados e não tratados, Grupo 2- infectados e não tratados, Grupo 3 – infectados e tratados por via oral e Grupo 4 – infectados e tratados por via inalatória. Para avaliar os efeitos da terapia proposta, realizou-se análise histopatológica do tecido pulmonar, para determinar a quantidade e área dos granulomas. O número de granulomas no tecido pulmonar dos animais infectados e tratados com itraconazol por via inalatória mostrou uma redução significativa ($P < 0,05$) em relação aos demais grupos. Em relação a área desses granulomas, não houve diferença estatística significativa entre os grupos. A administração por via inalatória de nanopartículas de itraconazol é uma proposta terapêutica promissora para o tratamento da paracoccidioidomicose.

Palavras-chave: paracoccidioidomicose; tratamento; granulomas; histomorfometria; pulmão.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis is a disease caused by the thermodimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. It is characterized by a granulomatous inflammation that mainly affects the lung and the treatment consists of the prolonged use of oral or intravenous antifungal agents, which cause many side effects. This study aimed to evaluate the number and area of granulomas in the lungs of Swiss mice experimentally infected with *Paracoccidioides brasiliensis* and treated with inhaled itraconazole nanoparticles, as one of the items to evaluate the effectiveness of this treatment. Twenty-eight Swiss mice between 8 and 12 weeks of age were used. The animals were acclimated to laboratory conditions for two weeks before the start of the experiment. For the infection procedure, the animals were anesthetized intraperitoneally with Ketamine 120 mg/kg and Xylazine 8 mg/kg and then infected with 50 μ L of the inoculum containing 5×10^6 cells/mL of *Paracoccidioides brasiliensis*. They were then divided into four groups: Group 1 – uninfected and untreated, Group 2- infected and untreated, Group 3 – infected and treated orally, and Group 4 – infected and treated by inhalation. To assess the effects of the proposed therapy, a histopathological analysis of the lung tissue was performed to determine the quantity and area of granulomas. The number of granulomas in the lung tissue of animals infected and treated with itraconazole by inhalation showed a significant reduction ($P < 0.05$) in relation to the other groups. Regarding the area of these granulomas, there was no statistically significant difference between the groups. The inhaled administration of itraconazole nanoparticles is a promising therapeutic proposal for the treatment of paracoccidioidomycosis.

Keywords: paracoccidioidomycosis; treatment; granulomas; histomorphometry; lung.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Morfologia do *Paracoccidioides brasiliensis* na fase leveduriforme contendo brotamentos múltiplos – seta (Objetiva: 40x, Grocott, barra com 500 µm)..... 16
- Figura 2 - Imagem representando a metodologia de mensuração da área do granuloma no programa ImageJ. A seta amarela indica a área do granuloma. 27
- Figura 3 - 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 infectado e não tratado apresentando numerosos granulomas (setas) (Objetiva: 4x, H.E, barra com 500µm); B: pulmão de camundongo infectado e tratado com itraconazol por via oral apresentando alguns granulomas (setas) (Objetiva: 4x, H.E., barra com 500µm); C e D: pulmão de camundongo infectado e tratado com nanopartículas de itraconazol por via inalatória apresentando uma quantidade reduzida de granulomas (setas) (Objetiva: 4x, H.E., barra com 500µm)..... 29
- Figura 4 - Granuloma apresentando miríade de estruturas leveduriformes contendo cápsula fina (setas), compatíveis com *Paracoccidioides brasiliensis* (Objetiva: 40x, H.E., barra com 500µm). 30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Número médio de granulomas no pulmão de camundongos de acordo com o tratamento.....	28
Tabela 2 - Área média dos granulomas (μm^2) no pulmão de camundongos de acordo com o tratamento.....	28

LISTA DE ABREVIACOES

B.O.D – Demanda Bioquímica de Oxignio

CEUA - Comitê de tica no Uso de Animais

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentao Animal

EMVZ - Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia

GYP - Glucose, Peptone, Yeast extract

HDT-UFT - Hospital de Doenças Tropicais da Universidade Federal do Tocantins

HP β CD - Hidroxipropil-beta-ciclodextrina

PBS – Soluo Salina Tamponada com Fosfato

PCM – Paracoccidiodomicose

RPMI – Meio contendo uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos e vitaminas

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Paracoccidioidomicose: aspectos históricos e etiologia	15
2.2 Epidemiologia e Patogenia	16
2.3 Formas clínicas da paracoccidioidomicose	18
2.4 Caracterização macroscópica e microscópica da lesão causada por <i>Paracoccidioides spp.</i>	19
2.5 Itraconazol	20
2.6 Terapia inalatória	21
2.7 Nanopartículas de Itraconazol	21
3 OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo geral	23
3.2 Objetivos específicos	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Camundongos	24
4.2 Preparação e quantificação do inóculo de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	24
4.3 Modelo experimental murino de infecção	25
4.4 Tratamento	25
4.5 Eutanásia e histopatologia	26
4.6 Quantificação e análise morfométrica dos granulomas	26
4.7 Análise Estatística	27
5 RESULTADOS	28
6 DISCUSSÃO	31
7 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença sistêmica causada por fungos do gênero *Paracoccidioides*, composto por duas espécies principais: *P. brasiliensis* e *P. lutzii* (TEIXEIRA et al., 2014). É uma infecção fúngica endêmica nos países da América Latina, principalmente no Brasil, que possui aproximadamente 80% dos casos (SHIKANAI-YASUDA et al., 2018).

Caracteriza-se por uma inflamação granulomatosa que acomete principalmente o pulmão (90% dos casos) e o tratamento padrão consiste no uso prolongado de antifúngicos por via oral ou endovenosa, com eficácia comprovada, sendo que os mais utilizados são os derivados azólicos (cetoconazol, fluconazol e itraconazol) e a anfotericina B, sendo esta para as formas graves. O uso crônico desses fármacos causa efeitos colaterais principalmente no trato gastrointestinal, além de alterações na função renal e hepática (FORTES et al., 2011; SHIKANAI-YASUDA et al., 2018).

Dessa forma, a busca por novas vias de administração é uma alternativa que pode contribuir com a farmacocinética e farmacodinâmica das drogas tradicionalmente utilizadas, visando otimizar a biodisponibilidade do fármaco e reduzir o potencial de toxicidade sistêmica (BAILEY; BERKLAND, 2009; YANG et al., 2010). Um exemplo disso foi o desenvolvimento de nanopartículas de itraconazol por via inalatória no tratamento de aspergilose pulmonar em falcões e codornas, com o objetivo de concentrar a droga no local da infecção com exposição sistêmica mínima, diminuir os efeitos colaterais e as interações medicamentosas (WLAZ et al., 2015; PARDEIKE et al., 2016).

Nosso grupo de pesquisa utilizou um modelo experimental murino de infecção pelo *P. brasiliensis* com camundongos Swiss imunossuprimidos e trabalhou na elaboração de nanopartículas de itraconazol para tratamento da PCM por via inalatória. Os resultados foram promissores, uma vez que camundongos tratados com nanopartículas de itraconazol por via inalatória, obtiveram redução significativa no escore histopatológico de lesões granulomatosas em relação aos animais infectados e tratados com itraconazol por via oral. Assim, para dar continuidade à pesquisa e fazer uma avaliação mais acurada do potencial terapêutico das nanopartículas de itraconazol contra a PCM, avaliou-se morfometricamente os granulomas nos pulmões de camundongos experimentalmente infectados com *P. brasiliensis*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

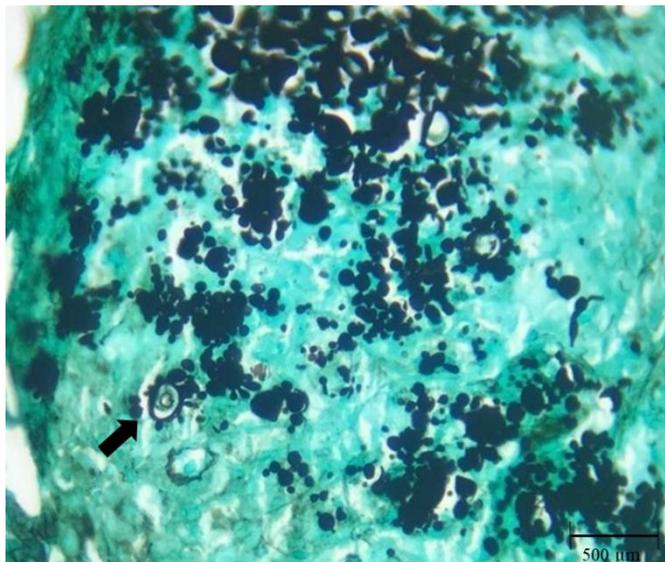
2.1 Paracoccidioidomicose: aspectos históricos e etiologia

A paracoccidioidomicose (PCM) foi descrita pela primeira vez em 1908 pelo médico Adolpho Lutz, a partir de lesões orais de pacientes internados na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, no Brasil (LUTZ, 1908). Em 1912, após realizar diversas análises morfológicas do fungo, Alfonso Splendore sugeriu o nome *Zymonema brasiliensis*, e somente em 1930, o médico Floriano Paulo de Almeida criou um novo gênero dentro do Reino Fungi, denominado *Paracoccidioides* e classificou a espécie como *Paracoccidioides brasiliensis*. A enfermidade foi denominada oficialmente de paracoccidioidomicose em 1971, durante uma reunião de micologistas realizada em Medellín, na Colômbia (PALMEIRO; CHERUBINI; YURGEL, 2005).

O *P. brasiliensis* é o principal agente etiológico da PCM e caracteriza-se por ser um fungo termodimórfico, que cresce na forma de micélio na temperatura ambiente (20-26°C) e em temperaturas mais altas (35-37°C) apresentam a forma de levedura. A fase de micélio cresce lentamente, 20 a 30 dias, produzindo colônias pequenas, irregulares, brancas a bronzeadas e cobertas por micélios aéreos curtos que frequentemente aderem ao ágar, quebrando sua superfície. Um pigmento marrom difuso é produzido por alguns isolados e microscopicamente, as hifas são finas e septadas. A parede celular desse fungo é composta principalmente por quitina α e β -1,3-glucana, sendo que na forma de levedura a quantidade de quitina é superior a forma de micélio (NICKERSON; EDWARDS, 1949; KANETSUNA et al., 1969; BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO; 1993).

Na fase de levedura, as colônias são moles, enrugadas e de cor creme e o crescimento se torna aparente após 10 a 15 dias de incubação. As células apresentam tamanhos diferentes, 4 a 30 μm , geralmente ovais e alongadas, e tem uma parede celular retrátil espessa e um citoplasma que contém gotículas lipídicas protuberantes. A principal característica da forma de levedura é a roda de leme ou as orelhas do Mickey Mouse, isto é, uma célula-mãe em brotamento rodeada por várias células-filhas periféricas, na qual baseiam-se os diagnósticos (Figura 1) (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO; 1993).

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



Fonte: Arquivo pessoal

Os avanços nas ferramentas de Biologia Molecular permitiram separar esse fungo em cinco espécies filogenéticas. As espécies S1a e S1b são encontradas nas regiões Sudeste e Sul do Brasil, Argentina e Paraguai, a PS2 é encontrada no Sudeste do Brasil e Venezuela, a PS3 e PS4 são endêmicas na Colômbia e Venezuela, respectivamente. Esses grupos de espécies atendem a definição biológica da espécie, ou seja, são morfologicamente iguais, mas não se reproduzem entre si (SHIKANAI-YASUDA et al., 2018).

2.2 Epidemiologia e Patogenia

A PCM é uma infecção fúngica endêmica e restrita aos países da América Latina, na qual o Brasil apresenta a maioria dos casos confirmados, cerca de 80%, seguido por Venezuela, Colômbia, Argentina e Equador (MARTINEZ, 2017). Uma vez que a doença não é considerada de notificação compulsória no Brasil, os dados baseiam-se em inquéritos epidemiológicos, e estima-se que a incidência anual varia de 1 a 3 casos a cada 100 mil habitantes e taxa de mortalidade de 1,45/milhão de habitantes (COUTINHO et al., 2002).

Entre os anos de 1998 e 2006, foram registradas 6.732 internações hospitalares por paracoccidioidomicose, aproximadamente 50% de todas as internações causadas por micoses sistêmicas. A Região Sul registrou a maior taxa de internações, seguida das Regiões Sudeste, Centro-Oeste, Norte e Nordeste (COUTINHO et al., 2015).

O fungo é frequentemente isolado no solo e o seu desenvolvimento no ambiente está relacionado com a temperatura, umidade e índice pluviométrico, que auxiliam na sua esporulação e dispersão. O principal fator de risco são as profissões ou atividades relacionadas com o manejo do solo contaminado com o fungo, observa-se que a maioria dos pacientes diagnosticados tiveram ou tem contato com o ambiente rural devido a profissão, residência ou ambos (MARTINEZ, 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 2018).

A PCM acomete principalmente indivíduos do sexo masculino, aproximadamente 75% a 95% dos casos, isso justifica-se devido à ausência do estrógeno, hormônio que inibe a conversão dos conídios para levedura atuando como fator de proteção, além disso, o estrógeno estimula a produção de citocinas Th1, que são eficazes no combate ao fungo (PINZAN et al., 2010). Outros fatores ligados ao desenvolvimento da doença são o tabagismo e alcoolismo, eles propiciam o desequilíbrio entre parasita-hospedeiro, favorecendo a multiplicação e disseminação do agente (SANTOS et al., 2003).

A PCM é um agravo de interesse estadual no Tocantins desde a publicação da Portaria SESAU/TO nº 236 de 09 de março de 2016. Em virtude disso, foi realizado um estudo em Araguaína, Tocantins, que objetivou caracterizar o perfil sociodemográfico e epidemiológico dos casos de PCM notificados no Hospital de Doenças Tropicais da Universidade Federal do Tocantins (HDT-UFT), no período de 2016 a 2018. Dos 46 casos notificados, 80,4% (n = 37) foram confirmados. A maioria dos casos ocorreu em pessoas do gênero masculino, de baixa escolaridade, idade economicamente ativa (entre 20 e 69 anos) e com profissão relacionada a atividade rural (SANTOS-JÚNIOR et al., 2019).

A infecção acontece a partir da inalação dos conídios, estes atingem facilmente os alvéolos pulmonares, local onde se transformam em células leveduriformes constituindo a forma patogênica do fungo. Pode ocorrer a disseminação para outros órgãos por meio da corrente sanguínea e vasos linfáticos (McEWEN et al., 1987). A infecção ocorre principalmente nas duas primeiras décadas de vida, porém ela pode permanecer latente durante anos, sendo infrequente a apresentação clínica da doença durante esse período (PALMEIRO; CHERUBINI; YURGEL, 2005).

O estabelecimento da doença depende de fatores ligados ao fungo, como virulência da cepa infectante, composição antigênica e quantidade de conídios inalados e, principalmente, a fatores relacionados com a resposta imunológica do hospedeiro. Diversos mecanismos da imunidade inata são ativados, pois o controle da infecção depende de uma resposta imune celular efetiva. Proteínas do sistema complemento e atividade microbicida das células *natural*

killer e dos fagócitos, atuam de forma significativa no combate ao patógeno (FORTES et al., 2011).

A maioria dos indivíduos infectados em uma área endêmica não desenvolvem a doença, exibindo um padrão T-helper (Th) 1 da resposta imune, caracterizado pela síntese de citocinas que ativam macrófagos e linfócitos TCD4+ e TCD8+, resultando na formação de granulomas compactos que atuam no controle da replicação fúngica (OLIVEIRA et al., 2002; FORTES et al., 2011).

O principal fator de virulência do *P. brasilienses*, é uma glicoproteína de 43 KDa, gp43, envolvida na entrada do fungo na célula hospedeira, inibição da fagocitose e indução da apoptose em células mononucleares do sangue periférico. A invasão as células epiteliais afetam o citoesqueleto, interferindo em aspectos morfológicos da actina, tubulina e componentes da citoqueratina (MENDES-GIANNINI et al., 2008). Além disso, estudos em camundongos infectados com *P. brasiliensis* mostraram que o fungo ao invadir o timo promove atrofia severa das células resultando no aumento nas taxas de apoptose, sugerindo que essas alterações podem estar envolvidas no processo de imunossupressão periférica observada na paracoccidiodomicose (SOUTO et al., 2003).

2.3 Formas clínicas da paracoccidiodomicose

A paracoccidiodomicose é classificada em PCM-infecção, PCM-doença e Forma residual/sequelas. Essa classificação utilizada para diferenciar as formas clínicas foi proposta em 1986, no *International Colloquium on Paracoccidiodomycosis*, realizado em Medellín, Colômbia. A PCM-infecção caracteriza-se pela presença do fungo em indivíduos saudáveis, identificado a partir de testes de reação intradérmica positiva e achados de fungos latentes em necropsia (SHIKANAI-YASUDA et al., 2018).

A PCM-doença divide-se em forma aguda e forma crônica. A forma aguda é responsável por 5 a 25% dos casos, acomete crianças, adolescentes e adultos jovens (até 30 anos), apresenta evolução rápida e os sintomas mais comuns são linfadenomegalia localizada ou generalizada, hepatoesplenomegalia, alterações digestivas e lesões cutâneas. A forma crônica é a mais comum, aproximadamente 74 a 96% dos casos, acomete adultos com 30 a 60 anos de idade, principalmente do sexo masculino e instala-se de maneira lenta. O comprometimento pulmonar está presente em 90% dos pacientes, além disso a mucosa oral e a pele também são acometidas (SHIKANAI-YASUDA et al., 2018).

As formas residuais, também chamadas sequelas, caracterizam-se pelas manifestações clínicas decorrentes de alterações anatômicas e funcionais causadas pelas cicatrizes que se seguem ao tratamento da PCM. (SHIKANAI-YASUDA et al., 2018).

2.4 Caracterização macroscópica e microscópica da lesão causada por *Paracoccidioides spp.*

A paracoccidioidomicose é classificada como uma doença granulomatosa pulmonar. O processo inflamatório granulomatoso é um dos mecanismos da resposta imunológica e surge em função de determinados agentes agressores ou antígenos que não puderam ser eliminados pela primeira linha de defesa do aparelho respiratório que é constituída por fatores mecânicos, como pelos e reflexo da tosse (SILVA; ROSA; CAPELOZZI, 2003).

A formação do granuloma é determinada pela interação entre as células T helper e macrófagos/monócitos, mediadas por algumas citocinas. Durante a evolução da infecção, os linfócitos CD4 Th1 sintetizam citocinas pró-inflamatórias, como: INF- γ , TNF- α e IL-12 que conferem proteção ao hospedeiro, evitando a disseminação fúngica. O TNF- α atua sobre a função macrófagica na paracoccidioidomicose, modulando e amplificando a resposta imune, o que promove a reação granulomatosa e atividade fungicida mediada por macrófagos. A ausência desta citocina resulta no comprometimento dos mecanismos de defesa associado à incapacidade de desenvolver reações granulomatosas eficientes para conter a multiplicação desse fungo (FORTES et al., 2011).

Nas lesões granulomatosas de pele e mucosa, é possível detectar a presença de TNF- α de forma difusa, expressando-se nas células mononucleares do infiltrado inflamatório ao redor do granuloma e em ceratinócitos, indicando o envolvimento desta citocina na gênese e manutenção de granulomas. Portanto, o tipo de citocina envolvida no processo determina o sucesso ou não da implantação do *P. brasiliensis* no tecido do hospedeiro, podendo permitir a instalação e a reprodução dos fungos em vários órgãos e sistemas (FORTES et al., 2011).

Macroscopicamente os nódulos granulomatosos apresentam-se como áreas esbranquiçadas, elevadas, circulares, bem delimitadas, multifocais, firmes, podendo ser mineralizadas e que aprofundam ao corte. Microscopicamente apresentam um infiltrado de células inflamatórias composto por macrófagos, linfócitos, neutrófilos, histiócitos, plasmócitos e com células gigantes multinucleadas do tipo Langhans e geralmente organizados e delimitados por um anel de linfócitos e com proliferação de fibras de colágeno (BENARD, 2008; LOTH et al., 2015).

O fungo pode ser encontrado no interior dos granulomas, identificado pela membrana birrefringente. Os elementos multibrotantes são a forma infectante característica do *P. brasiliensis* e podem ser difíceis de visualizar com a coloração Hematoxilina-Eosina, sendo necessário uma coloração especial, Metenamina de Prata, que deve ser usada para examinar o tecido quanto à presença desses microrganismos (BENARD, 2008; LOTH et al., 2015).

No pulmão, esses granulomas representam uma resposta imunológica importante no controle da infecção, geralmente são múltiplos e apresentam-se como estruturas esféricas, bem organizadas e formadas por macrófagos e linfócitos. Além disso, distorção arquitetural, espessamento septal e reticulado, enfisema centrolobular ou parasseptal, espessamento brônquico e bandas parenquimatosas são as alterações mais frequentemente encontradas no exame macroscópico dos pulmões de indivíduos doentes ou com sequelas providas pela enfermidade (COSTA et al., 2013).

2. 5 Itraconazol

O itraconazol, derivado do triazol, foi desenvolvido na década de 1980 e é indicado no tratamento de infecções fúngicas dos olhos, boca, unhas, pele, vagina e órgãos internos. É um antifúngico bastante utilizado devido ao seu amplo espectro de ação e potência aprimorada contra patógenos de grande ocorrência, incluindo espécies de *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, e *Paracoccidioides* (COWEN; STEINBACH, 2008).

Seu mecanismo de ação baseia-se na inibição da síntese de ergosterol, principal componente da membrana celular fúngica, a partir da interação com uma enzima do citocromo P450, necessária para a conversão do lanosterol em ergosterol. Esse mecanismo altera a permeabilidade da membrana celular e a viabilidade da célula fúngica (COWEN; STEINBACH, 2008).

O itraconazol apresenta propriedades físico-químicas típicas de uma base fraca pouco solúvel (pKa de 3,7 e solubilidade aquosa de 1ng/mL), com estabilidade limitada em temperaturas elevadas e em pH baixo. Isso resulta na baixa dissolução no trato gastrointestinal e possivelmente a sua precipitação no intestino delgado, o que justifica a sua biodisponibilidade incompleta (VAN SPEYBROECK et al., 2010).

Este medicamento é o mais utilizado no tratamento dos diferentes quadros clínicos da paracoccidioidomicose, com eficácia comprovada. A duração do tratamento depende da gravidade da doença, com uma média 6 a 24 meses e os principais efeitos colaterais são os distúrbios gastrintestinais, como náuseas, vômito e dor abdominal, e alterações na função renal

e hepática. Há relatos menos frequentes como cefaleia, erupções cutâneas, prurido, urticária, angioedema e distúrbios menstruais (MARQUES, 2013; SHIKANAI-YASUDA et al., 2018).

2.6 Terapia inalatória

Geralmente nas doenças que atingem o trato respiratório, o órgão-alvo do patógeno são os pulmões, desse modo essas infecções podem não responder bem à terapia sistêmica com formas farmacêuticas orais devido à difusão insuficiente do fármaco nos tecidos pulmonares e no lúmen. Um aumento na quantidade da dose destinada a compensar a má difusão, pode levar a toxicidade sistêmica, portanto, a administração por via inalatória é uma alternativa promissora para o tratamento de doenças pulmonares (YANG et al., 2010; AGUIAR et al., 2017).

A via inalatória atualmente é reconhecida como a via de eleição para a administração de medicamentos no tratamento de doenças respiratórias, contribuindo para a qualidade de vida dos pacientes. Essa via de administração proporciona diversas vantagens: altas concentrações da droga no local da infecção, início de ação rápido, redução dos efeitos colaterais sistêmicos e diminui os custos da medicação (AGUIAR et al., 2017).

A concentração do itraconazol no tecido pulmonar deve ser maior que 0,5 µg/grama de pulmão para que se tenha um efeito antifúngico (SOBEL et al., 2000). Um estudo demonstrou que após a nebulização de uma solução de itraconazol/HPβCD, a concentração dessa formulação no tecido pulmonar de camundongos foi de 3.38 ± 1.12 µg/g, ou seja, praticamente sete vezes maior que a concentração mínima necessária para o efeito antifúngico, evidenciando o alto potencial dessa via (YANG et al., 2010).

No entanto, a sua otimização é influenciada por alguns aspectos dentre eles a deposição pulmonar, que constitui o principal fator de eficácia dessa terapia. O local de deposição depende diretamente do tamanho das partículas, dessa maneira, partículas maiores que 5 µm não atingem os pulmões e depositam-se na primeira porção, cavidade oral e nasal, as menores que 1 µm são facilmente exaladas, sendo entre 1 e 5 µm o tamanho ideal (YANG et al., 2010; PHILLIPS; ZHANG; JOHNSTON, 2017).

2.7 Nanopartículas de Itraconazol

Nos últimos anos os diversos avanços em pesquisas relacionadas à saúde possibilitaram o desenvolvimento de fármacos e, com isso houve um maior interesse em pesquisas voltadas a nanociência e nanotecnologia. Muitos trabalhos científicos descrevem os benefícios da nanotecnologia no tratamento terapêutico, voltados principalmente ao tratamento

de câncer, doenças inflamatórias, cardiovasculares, neurológicas, dentre outras (SBALQUEIRO et al., 2018).

Os produtos farmacêuticos de nanopartículas oferecem diversas vantagens sobre as formulações contendo partículas. A medida que a partícula diminui, um número maior de moléculas é encontrado em sua superfície, proporcionando uma grande área superficial, o que resulta em um aumento na velocidade de dissolução do fármaco. Essas formulações também têm sido utilizadas para melhorar a biodisponibilidade de drogas hidrofóbicas insolúveis (BAILEY; BERKLAND, 2009).

A terapia sistêmica muitas vezes resulta na administração de doses superiores as quantidades necessárias com o objetivo de aumentar a velocidade de difusão do fármaco no organismo, o que causa o aumento dos efeitos colaterais e diminuição da eficácia do tratamento (SBALQUEIRO et al., 2018). Estudos demonstram que a utilização de pequenas estruturas permite que o fármaco atinja exatamente o órgão desejado, dessa maneira as nanopartículas se ligam e podem ser internalizadas por uma variedade de tipos de células (BAILEY; BERKLAND, 2009).

Rundfeldt et al. (2013) utilizaram nanopartículas de itraconazol por via inalatória em um modelo murino infectado por espécies de *Aspergillus*. Os resultados mostraram altas concentrações do fármaco em tecidos pulmonares, acima da concentração inibitória mínima, inclusive concentrações superiores às alcançadas pela dosagem oral. Um estudo desenvolvido por Wlaz et al. (2015) avaliou o potencial terapêutico do itraconazol por via inalatória em casos de Aspergilose em codornas. Os animais infectados e tratados com itraconazol por essa via de administração não apresentaram granulomas nos pulmões, além disso a avaliação macroscópica não relevou sinais de toxicidade.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a eficácia do tratamento com nanopartículas de Itraconazol por via inalatória em camundongos Swiss experimentalmente infectados com *Paracoccidioides brasiliensis*.

3.2 Objetivos específicos

- Mensurar a área dos granulomas nos pulmões de camundongos experimentalmente infectados com *Paracoccidioides brasiliensis*, tratados ou não com nanopartículas de Itraconazol por via inalatória.
- Contar o número de granulomas microscopicamente nos pulmões de camundongos experimentalmente infectados com *Paracoccidioides brasiliensis*, tratados ou não com nanopartículas de Itraconazol por via inalatória.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Camundongos

Foram utilizados 28 camundongos da linhagem Swiss, fêmeas, não castradas, entre 8 e 12 semanas de idade e com peso aproximado de 35g, fornecidos pelo Laboratório de Patologia Experimental da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia (EMVZ-UFT). Os animais foram alojados em gaiolas (7 animais/gaiola), sob condições padrões de luminosidade (ciclos alternados de claro/escuro de 12 horas), em temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) e recebendo água e ração *ad libitum*. Os animais foram aclimatados às condições do laboratório durante duas semanas antes do início do estudo. O manuseio e procedimentos com os animais foram realizados de acordo com o 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).

4.2 Preparação e quantificação do inóculo de *Paracoccidioides brasiliensis*

Utilizou-se 6 diferentes isolados de *P. brasiliensis* para a realização dos ensaios biológicos. Dois deles foram provenientes do Laboratório de Micologia da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP) campus Botucatu, um isolado clínico e um isolado de tatu. Os outros 4 isolados clínicos eram do acervo próprio do Laboratório de Saúde Pública de Araguaína-TO, que estavam à disposição dos pesquisadores.

Os isolados foram mantidos em meio Agar Sabourand acrescido de extrato de levedura (Kasvi), em incubadora bacteriológica tipo B.O.D. (Hydrosan) a 35°C sob a forma de levedura e repicados a cada 7 dias (PINTO et al., 2017; FERNANDES et al., 2017). Para a preparação do inóculo fúngico, selecionou-se uma cultura de *P. brasiliensis* que apresentava o maior crescimento *in vitro*, repicada semanalmente em meio GPY (Kasvi). Os fungos foram inoculados em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) e mantidos por 7 dias à 35°C , umidade de 45%, sob agitação à 60 rpm em uma incubadora shaker (Hydrosan Biosan).

A cultura mantida em RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) foi centrifugada por 5 minutos a 4000 rpm (Centribio). O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspenso em PBS estéril (PBS-Mallincrodt e Carlo Erba). O procedimento foi repetido por 3 vezes. A suspensão resultante foi 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 fornece uma suspensão-padrão de levedura contendo de 1×10^6 a 5×10^6 células/mL.

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

4.3 Modelo experimental murino de infecção

Antes da inoculação, os animais utilizados nesse experimento foram imunossuprimidos com o objetivo de aproximar as condições experimentais à realidade dos pacientes diagnosticados com paracoccidiodomicose. Para a indução de imunossupressão, foi utilizado dexametasona diluído na água do bebedouro na concentração de 8 mg/L acrescido de amoxicilina 1 g/L ofertado *ad libitum*, uma semana antes da inoculação experimental e mantido até o final do experimento para todos os animais (MACHADO et al., 1985; ALEIXO et al., 2012; HU et al., 2016; SANTOS-JÚNIOR, 2019).

Os camundongos foram anestesiados por via intraperitoneal com Cetamina 120 mg/kg e Xilazina 8 mg/kg (SEABRA; POMPEU; VALENTI, 2018), posicionados verticalmente no suporte de intubação e submetidos à laringoscopia direta com um otoscópio standard tamanho neonatal adaptado para o procedimento, seguida de instilação do inóculo de 50µL (concentração de 5×10^6 células/mL de *P. brasiliensis*) através de uma seringa de vidro de Hamilton de 50µL conectada a um cateter de teflon de 20 G (gauge). Logo na sequência, foi realizada a insuflação com 100µL 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 48h após a inoculação (PINA et al., 2004; GONZÁLEZ et al., 2008).

4.4 Tratamento

Os animais foram divididos em quatro grupos (n = 7):

- Animais não infectados e não tratados (Controle Negativo – CN);

- Animais infectados e não tratados (Controle Positivo – CP);
- Animais infectados e tratados com Itraconazol por via oral (Grupo via oral – VO)
- Animais infectados e tratados com nanopartículas de Itraconazol por via inalatória (Grupo via inalatória – IN)

O tratamento dos animais com itraconazol por via inalatória foi realizado utilizando-se o inalador de rede vibratória OMRON NE-U22LA acoplado a uma câmara de nebulização de corpo inteiro (SANTOS-JÚNIOR, 2019). O inalador tem velocidade de nebulização de 0,25 mL de solução por minuto, e a quantidade da solução para cada animal foi padronizada após a caracterização das formulações, em torno de 1mL por animal. Os animais do grupo via oral foram tratados utilizando itraconazol por via oral pelo método de gavagem, na dosagem de 1 mg/mL/animal, uma vez ao dia. O tratamento teve duração de sete dias.

4.5 Eutanásia e histopatologia

Os animais foram eutanasiados seguindo as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. O método para eutanásia foi de acordo com o seguinte protocolo: administração, por via intraperitoneal, de sobredosagem de cetamina 300 mg/kg + xilazina 30 mg/kg, após confirmação da perda de consciência, realizou-se o deslocamento cervical. Em seguida, a necropsia foi realizada e retirou-se fragmentos do lobo caudal esquerdo dos pulmões.

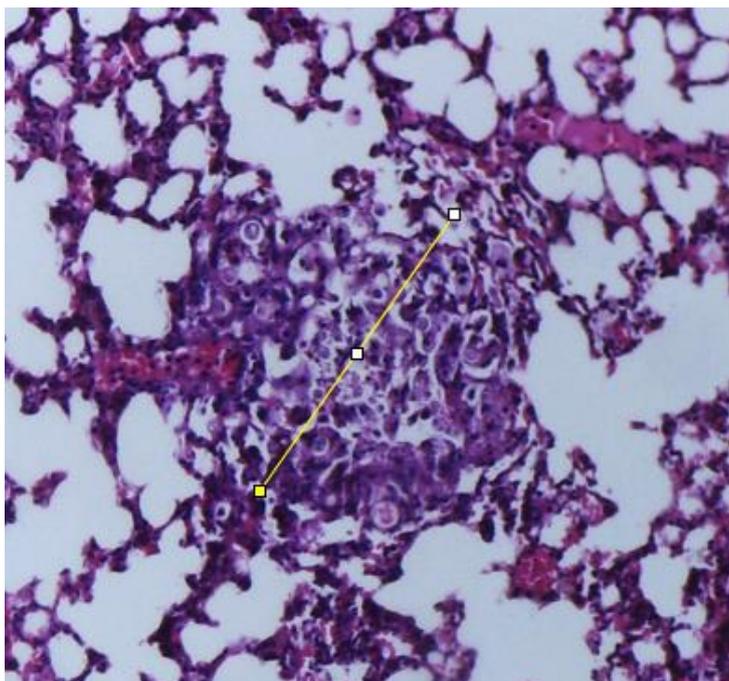
Fragmentos do lobo esquerdo pulmonar, previamente fixados em formaldeído 10% tamponado, foram processados seguindo as etapas de desidratação, diafinização, embebição por parafina e emblocamento. Em seguida, foram feitas secções na espessura de 4 µm montadas em lâminas histológicas e coradas pelo método Hematoxilina e Eosina (H&E) para evidenciar a formação de granulomas, além disso a coloração metenamina-nitrato de prata (Grocott) foi utilizada para evidenciação do *P. brasiliensis*.

4.6 Quantificação e análise morfométrica dos granulomas

Para a determinação do número total de granulomas presentes em cada corte histológico por animal, as lâminas foram divididas em dez campos microscópicos selecionados aleatoriamente e examinadas usando leitura cega de amostras. Neste procedimento utilizou-se uma objetiva de 4x. Ao final da contagem de cada campo, realizou-se a soma total e em seguida, a média de granulomas por animal.

Para avaliar a área dos granulomas, imagens foram obtidas por meio de um microscópio óptico adaptado a um sistema computadorizado de análise de imagens, Image-Pro Plus (Media Cybernetics, versão 7.0, EUA) e em seguida analisadas em um programa ImageJ (National Institutes of Health, EUA, versão 6.0) (Figura 2). A área dos granulomas foi determinada em μm^2 .

Figura 2 - Imagem representando a metodologia de mensuração da área do granuloma no programa ImageJ. A seta amarela indica a área do granuloma.



Fonte: Arquivo pessoal.

4.7 Análise Estatística

Os resultados foram expressos em média e desvio padrão (média \pm DP). Inicialmente, realizou-se a estatística descritiva e em seguida a normalidade dos resíduos foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey para comparações múltiplas das médias estimadas a 5% de significância. Ao final, gerou-se as tabelas com o Microsoft Excel 2016 para a visualização das médias estimadas, separadas por nível de tratamento. O software R versão 4.1.0 (2021) foi utilizado em todas as análises estatísticas.

5 RESULTADOS

Os valores médios obtidos neste experimento demonstraram que o número de granulomas contabilizados nos pulmões dos camundongos pertencentes ao grupo tratado com nanopartículas de itraconazol, foi significativamente menor quando comparado aos demais grupos ($P < 0,05$), sendo que o grupo controle positivo apresentou a maior média de número de granulomas pulmonares (Tabela 1).

Tabela 1- Número médio de granulomas no pulmão de camundongos de acordo com o tratamento.

Tratamento	Número médio de granulomas
CN	0 ^c
CP	2,81 ± 1,12 ^a
VO	1,31 ± 0,79 ^b
IN	0,3 ± 0,35 ^c

Médias seguidas com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

A análise morfométrica dos granulomas não indicou diferença estatística significativa na área dos granulomas entre os grupos experimentais ($P < 0,05$) (Tabela 2).

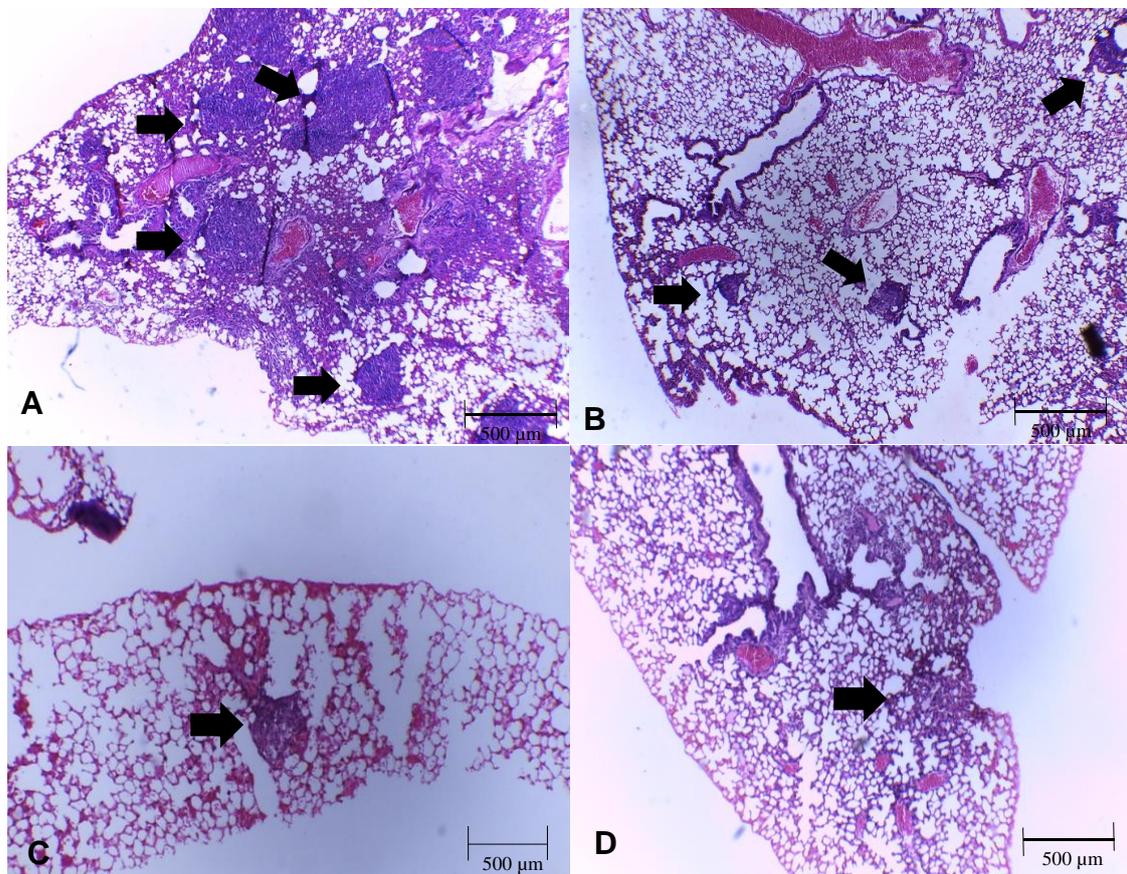
Tabela 2 - Área média dos granulomas (μm^2) no pulmão de camundongos de acordo com o tratamento.

Tratamento	Área média dos granulomas (μm^2)
CN	0 ^b
CP	1,16 ± 0,27 ^a
VO	1,03 ± 0,11 ^a
IN	0,99 ± 1,06 ^a

Médias seguidas com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

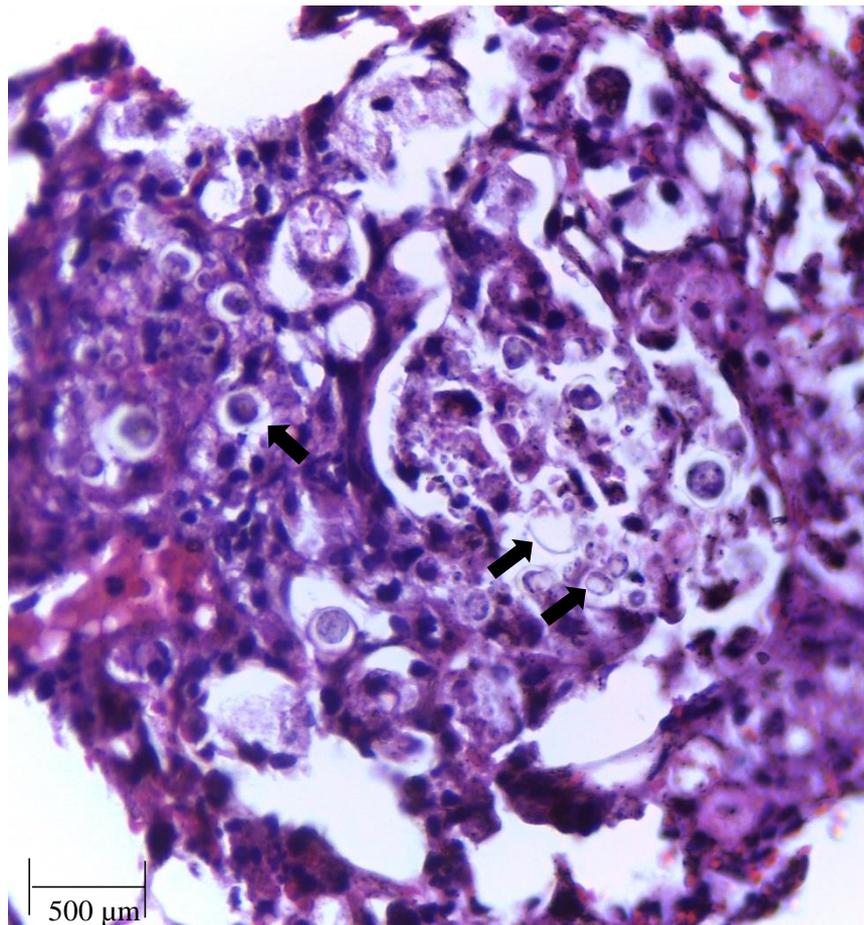
Os pulmões dos camundongos infectados e não tratados apresentaram uma grande quantidade de granulomas distribuídos por todo o parênquima (Fig. 3A). No pulmão dos camundongos infectados e tratados por via oral, observou-se redução destes granulomas (Fig. 3B), e no pulmão dos camundongos tratados por via inalatória a redução foi significativamente maior quando comparada aos demais grupos (Fig. 3C e 3D).

Figura 3- 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 infectado e não tratado apresentando numerosos granulomas (setas) (Objetiva: 4x, H.E, barra com 500µm); B: pulmão de camundongo infectado e tratado com itraconazol por via oral apresentando alguns granulomas (setas) (Objetiva: 4x, H.E., barra com 500µm); C e D: pulmão de camundongo infectado e tratado com nanopartículas de itraconazol por via inalatória apresentando uma quantidade reduzida de granulomas (setas) (Objetiva: 4x, H.E., barra com 500µm).



Os granulomas foram caracterizados por um infiltrado inflamatório linfo-histiocitário, com alguns neutrófilos, multifocal, associados a macrófagos epitelióides, envolvidos por tecido conjuntivo fibroso, contendo miríade de estruturas arredondadas, leveduriformes (setas), variando de 12 a 20 μm , com cápsula birrefringente (Fig. 4).

Figura 4- Granuloma apresentando miríade de estruturas leveduriformes contendo cápsula fina (setas), compatíveis com *Paracoccidioides brasilienses* (Objetiva: 40x, H.E., barra com 500 μm).



6 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostraram uma redução significativa no número dos granulomas formados nos pulmões de camundongos infectados com *P. brasiliensis* e tratados com nanopartículas de itraconazol por via inalatória, dando respaldo assim para comprovar um dos quesitos que envolvem a eficácia desse tratamento na paracoccidiodomicose pulmonar em camundongos.

Esse estudo foi o primeiro a utilizar e avaliar essa via de administração e apresentação farmacológica para o tratamento da paracoccidiodomicose pulmonar em modelo murino de infecção. Existem poucos artigos que relatam o uso do itraconazol e outros antifúngicos por via inalatória, e a maioria deles são direcionados para a análise farmacocinética da formulação (YANG et al., 2010).

A paracoccidiodomicose é uma enfermidade que atinge principalmente o trato respiratório, devido a sua via de transmissão ser a inalatória (YASUDA et al., 2018). O tratamento padrão consiste no uso prolongado de antifúngicos por via oral ou intravenosa, que por muitas vezes não gera resultados tão positivos devido a difusão insuficiente do fármaco nos tecidos pulmonares. A via inalatória, nesses casos, torna-se uma alternativa viável, visto que ao concentrar a droga no local da infecção aumenta a eficácia do medicamento, além de reduzir a exposição sistêmica que causam efeitos colaterais. Dessa maneira, a escolha dessa via de administração se deu com base nessas características (YANG et al., 2010; AGUIAR et al., 2017).

Além disso, o uso de nanopartículas oferece diversas vantagens, entre elas uma maior área superficial que leva a um aumento na velocidade de dissolução, por isso são usadas para melhorar a biodisponibilidade de drogas hidrofóbicas insolúveis, como é o caso do itraconazol (BAILEY et al., 2009).

Alguns trabalhos relatam a eficácia de nanopartículas de itraconazol por via inalatória no tratamento de aspergilose pulmonar em camundongos, codornas e falcões. Essa via de administração mostrou-se eficaz no controle dessa doença nessas espécies, evitando o aparecimento dos sinais clínicos, isso evidencia o quanto a via inalatória é promissora no tratamento de infecções pulmonares. (RUNDFELDT et al., 2013; WLAZ et al., 2015; PARDEIKE et al., 2016).

Na análise histopatológica, as alterações microscópicas encontradas nos grupos são semelhantes às descritas na literatura, em que os granulomas são compostos por células

epitelióides, linfócitos, histiócitos, células gigantes do tipo Langhans e todas circundam o fungo (GONZÁLEZ et al., 2008; NARANJO et al., 2010).

A formação do granuloma depende do tipo de resposta imunológica produzida, Th1 ou Th2. A resposta Th1 está ligada à resistência ao fungo, nela há produção de granulomas compactos e citocinas pró-inflamatórias que atuam promovendo a reação granulomatosa. A resposta Th2 está ligada a baixa resistência, pois nela há produção deficiente de células de defesa e envolvimento de citocinas que não participam da formação de granulomas (FORTES et al., 2011).

A análise morfométrica apontou que a área média dos granulomas nos pulmões dos animais não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos infectados e tratados e o grupo controle positivo. Sabe-se que a presença do *P. brasiliensis* induz a reação granulomatosa a partir da ativação da resposta imunológica do tipo Th1 e a administração do itraconazol gera inviabilidade fúngica, dessa maneira ocorre a diminuição do número desses patógenos no tecido pulmonar e conseqüentemente menor quantidade de granulomas, porém neste experimento não foi observado diferença estatística significativa em relação área dos granulomas (FORTES et al., 2011).

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a utilização de nanopartículas de itraconazol por via inalatória foi capaz de reduzir, de forma significativa, o número de granulomas nos pulmões de camundongos experimentalmente infectados com *Paracoccidioides brasiliensis*, suportando a noção da eficácia no tratamento da PCM.

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.
- ALEIXO, F.S.; VASCONCELOS, F. F.; SOARES, J. D. A. H.; JÚNIOR, R. S. L.; GARCIA-ZAPATA, 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.
- AMBRÓSIO, A. V. A.; CAMELO, C. C. S.; BARBOSA, C. V.; TOMAZATTI, F. G.; BRAZÕES, F. A. S.; VELOSO, J. M.; RODRIGUES, G. V.; RODRIGUES, L. F.; OLIVEIRA, P. I. D.; AGUIAR, R. A.; SIQUEIRA, V. S.; JARDIM, V. B.; GONTIJO, V. A. C.; MOURA, A. C. L.; PAULA, I.; SANTOS, L. S.; SULMONETTI, N.; FREITAS, R. M.; CRUZ, S. G.; ARAÚJO, S. A.; PEDROSO, V. S. P.; SIQUEIRA, W. C.; SILVA, F. R.; CALIGIORNE, R. B.; GOÉS, A. M.; FERREIRA, C. S.; PEDROSO, E. R. P. Paracoccidiodomicose (doença de Lutz-Splendore-Almeida): propedêutica complementar, diagnóstico diferencial, controle de cura. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 24, n. 1, p. 81-92, 2014.
- BAILEY, M. M.; BERKLAND, C. J. Nanoparticle Formulations in Pulmonary Drug Delivery. **Medicinal Research Reviews**, v. 29, n. 1, p. 196-212, 2009.
- BENARD, Gil. An overview of the immunopathology of human paracoccidiodomycosis. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 209-221, 2008.
- BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidiodomycosis: an Update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 2, p. 89-117, 1993.
- CAZEDEY, E. C. L.; AZEVEDO, R. C. P.; SILVA, E. F.; ARAÚJO, M B. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de itraconazol em produtos farmacêuticos por CLAE. **Química Nova**, v. 30, n. 4, 774-776, 2007.
- COSTA, A. N.; BENARD, G.; ALBUQUERQUE, A. L. P.; FUJITA, C. L.; MAGRI, A. S. K.; SALGE, J. M.; YASUDA-SHIKANAI, M. A.; CARVALHO, C. R. R. The lung in paracoccidiodomycosis: new insights into old problems. **Clinical**, v. 68, n. 4, p. 441-448, 2013.
- COSTA, M. V.; LANDGRAF, T. N.; CORRÊA, P. C.; SOUZA, I. E. L.; FERNANDES, F. F.; CASTELO, A. P. Quantitation of pulmonary fungal burden in *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice by real-time PCR. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 62, 2019.
- COUTINHO, Z. F.; SILVA, D.; LAZÉRA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R. M.; SABROZA, P. C.; WANKE, B. Mortalidade por paracoccidiodomicose no Brasil (1980-1995). **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 5, p. 1441-1454, 2002.
- COUTINHO, Z. F.; WANKE, B.; TRAVASSOS, C.; OLIVEIRA, R. M.; XAVIER, D. R.; JUNIOR, C. E. A. C. Hospital morbidity due to paracoccidiodomycosis in Brazil (1998–2006). **Tropical Medicine and International Health**, v. 20, n. 5, p. 673-680, 2015.

COWEN, L. E.; STEINBACH, W. J. Stress, Drugs, and Evolution: the Role of Cellular Signaling in Fungal Drug Resistance. **American Society for Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 747–764, 2008.

CRUZ, R. C.; WERNECK, S. M. C.; OLIVEIRA, C. S.; SANTOS, P. C.; SOARES, B. M.; SANTOS, D. A.; CISALPINO, P. S. Influence of different media, incubation times, and temperatures for determining the MICs of seven antifungal agents against *Paracoccidioides brasiliensis* by microdilution. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 436-443, 2013.

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.

FILHO, L. P. V.; BRAGA, W. G.; FREITAS, C. A.; BINDA, J. T. N.; LIMA, L. V.; BARBOSA, L. F.; MUNDIM, P. L. T.; ALMEIDA, T. C. A. Management of sporotrichosis with the use of Itraconazole: narrative review. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 5, n. 3, Curitiba, p. 14678-14689, 2020.

FORTES, M. R. P.; KUROKAWA, C. S.; MARQUES, S. A.; MIOT, H. A.; MARQUES, M. E. A. Imunologia da paracoccidioidomicose. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 3, Rio de Janeiro, p. 516-524, 2011.

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

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.

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.

KANETSUNA, F.; CARBONELL, L. M.; MORENO, R. E.; RODRIGUEZ, J. Cell Wall Composition of the Yeast and Mycelial Forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Bacteriology**, v. 97, n. 3, p. 1036-1041, 1969.

LOTH, Eduardo Alexandre et al. Experimental paracoccidioidomycosis in pregnant rats. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 6, p. 515-518, 2015.

LUTZ, A. Uma mycose pseudococcidica localizada na bocca e observada no Brazil. Contribuição ao conhecimento das Hyphoblastomycoses americanas. **O Brazil-Medico, Revista Semanal de Medicina e Cirurgia**, v. 22, n. 13, p.121-141, 1908.

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.

- MARQUES, Silvio Alencar. Paracoccidioidomycosis: epidemiological, clinical, diagnostic and treatment up-dating. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 88, n. 5, p. 700-711, 2013.
- MARTINEZ, R. New Trends in Paracoccidioidomycosis Epidemiology. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, 2017.
- MARTINS, R. F; VASCONCELOS, A. C; MORO, L; COSTA, J. O. Apoptose e morfometria das lesões granulomatosas induzidas pelo *Angiostrongylus Vasorum* em cães. **Bioscience Journal**, v. 24, n. 2, Uberlândia, p. 97-102, 2008.
- McEWEN, J. G.; BEDOYA, V.; PATIÑO, M. M.; SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A. M. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 25, p. 165-175, 1987.
- MENDES-GIANNINI, M. J. S.; SILVA, J. L. M.; SILVA, J. F.; DONOFRIO, F. C.; MIRANDA, E. T.; ANDREOTTI, P. F.; SOARES, C. P. Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: recent advances. **Mycopathologia**, v. 165, p. 237-248, 2008.
- MOREIRA, A. P. V. Paracoccidioidomycose: histórico, etiologia, epidemiologia, patogênese, formas clínicas, diagnóstico laboratorial e antígenos. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 5, n. 51, p. 11-24, 2008.
- NARANJO, T. W.; LOPERA, D. E.; DIAZ-GRANADOS, L. R.; DUQUE, J. J.; RESTREPO, A.; CANO, L. E. Histopathologic and immunologic effects of the itraconazole treatment in a murine model of chronic pulmonary paracoccidioidomycosis. **Institut Pasteur**, v. 12, p. 1153-1162, 2010.
- NICKERSON, W. J.; EDWARDS, G. A. Studies on the physiological bases of morphogenesis in fungi - The respiratory metabolism of dimorphic pathogenic fungi. **The Journal of General Physiology**, v. 33, p. 41-55, 1949.
- OLIVEIRA, S. J.; MAMONI, R. L.; MUSATTI, C. C.; PAPAORDANOU, P. M. O.; BLOTTA, M. H. S. L. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 139-144, 2002.
- PALMEIRO, M.; CHERUBINI, K.; YURGEL, L. S. Paracoccidioidomycose–revisão da literatura. **Scientia Medica**, v. 15, n. 4, p. 274-278, 2005.
- PARDEIKE, J.; WEBER, S.; ZARFL, H. P.; PAGITZ, M.; ZIMME, A. Itraconazole-loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for pulmonary treatment of aspergillosis in falcons. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 108, p. 269-276, 2016.
- PINA, A.; VALENTE-FERREIRA, R. C.; MOLINARI-MADLUM, E. E. W.; VAZ, C. A. C.; KELLER, A. C.; CALICH, V. L. G. Absence of interleukin-4 determines less severe pulmonary paracoccidioidomycosis associated with impaired Th2 response. **Infection and immunity**, v. 72, n. 4, p. 2369-2378, 2004.

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

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.

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.

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

RUNDFELDT, C.; STECKEL, H.; SCHERLISS, H.; WYSKA, E.; WLAZ, P. Inhalable highly concentrated itraconazole nanosuspension for the treatment. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 83, p. 44-53, 2013.

SANTOS Jr, A. O.; ROCHA, M. D. H. A.; CAVALCANTE, P. A. M.; RIBEIRO, R. S.; MARIANO, W. S. Paracoccidioidomycose: 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. In: XL International Sodebras Congress, 2019, Vitória-ES. **Anais do XL International Sodebras Congress**, 2019. p. 94-97.

SANTOS, W. A.; SILVA, B. M.; PASSOS, E. D.; ZANDONADE, E.; FALQUETO, A. Associação entre tabagismo e paracoccidioidomycose: um estudo de caso-controle no Estado do Espírito Santo, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 1, p. 245-253, 2003.

SBALQUEIRO, G. R.; BALVEDI, L. T.; BETTIATO, R.; RIBAS, J. L. C. Uso da nanotecnologia para o desenvolvimento de fármacos. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 12, n.10, 2018.

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**. http://www.bioterio.fm.usp.br/pdf/Anestesia_e_Analgesia.pdf. 2018.

SILVA, A. S. F.; ROSA, D. C.; CAPELOZZI, V. L. Doenças pulmonares intersticiais granulomatosas: uma abordagem diagnóstica para o patologista geral. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 29, n.3, p. 151-160, 2003.

SOBEL, J. D. Practice guidelines for the treatment of fungal infections. For the Mycoses Study Group. **Infectious Diseases Society of America**, v. 30, n. 4, p. 652-652, 2000.

SOUTO, P. C. S.; BRITO, V. N.; GAMEIRO, J.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; VERINAUD, L. Programmed cell death in thymus during experimental paracoccidioidomycosis. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 192, p. 225-229, 2003.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; TELLES, F. D. Q.; KONO, A.; PANIAGO, A. M. M.; NATHAN, A.; VALLE, A. C. F.; BAGAGLI, E.; BENARD, G.; FERREIRA, M. S.; TEIXEIRA, M. M.; VERGARA, M. L. S.; PEREIRA, R. M.; CAVALCANTE, R. S.; HAHN, R.; DURLACHER, R. R.; KHOURY, Z.; CAMARGO, Z. P.; MORETTI, M. L.; FERREIRA, M. S. II Consenso Brasileiro em Paracoccidioidomicose-2017. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 27, 2018.

SPEYBROECK, M. V.; MOLS, R.; MELLAERTS, R.; THI, T.; MARTENS, J. A.; HUMBEECK, J. V.; ANNAERT, P.; MOOTER, G. V.; AUGUSTIJNS, P. Combined use of ordered mesoporous silica and precipitation inhibitors for improved oral absorption of the poorly soluble weak base itraconazole. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, n. 3, p. 354-365, 2010.

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.

TEIXEIRA, M. M.; THEODORO, R. C.; OLIVEIRA, F. F. M.; MACHADO, G. C.; HAHN, R. C.; BAGAGLI, E.; SAN-BLAS, G.; FELIPE, M. S. S. *Paracoccidioides lutzii* sp. Nov.: biological and clinical implications. **Medical Micology**, v. 52, n. 1, p. 19-28, 2014.

VAN SPEYBROECK, Michiel et al. Combined use of ordered mesoporous silica and precipitation inhibitors for improved oral absorption of the poorly soluble weak base itraconazole. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, n. 3, p. 354-365, 2010.

WLAZ, P.; KNAGA, S.; KASPEREK, K.; WLAZ, A.; POLESZAK, E.; WITKOWSKA, G. J.; WINIARCZYK, S.; WYSKA, E.; HEINEKAMP, T.; RUNDDELDT, C. Activity and Safety of Inhaled Itraconazole Nanosuspension in a Model Pulmonary *Aspergillus fumigatus* Infection in Inoculated Young Quails. **Mycopathologia**, v. 180, p. 35-42, 2015.

YANG, W.; CHOW, K. T.; LANG, B.; WIEDERHOLD, N. P.; JOHNSTON, K. P.; WILLIAMS, R. O. *In vitro* characterization and pharmacokinetics in mice following pulmonary delivery of itraconazole as cyclodextrin solubilized solution. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, n. 5, p. 336-347, 2010.