



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA**

SAMILLY CESÁRIO ALVES

**Estudo do impacto das vesículas extracelulares liberadas por *Paracoccidioides lutzii*,
após cultivo em condições de privação e suficiência de ferro, na fagocitose por
macrófagos in vitro.**

**GOIÂNIA
2024**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio do Repositório Institucional (RI/UFG), regulamentado pela Resolução CEPEC no 1240/2014, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei no 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo dos Trabalhos de Conclusão dos Cursos de Graduação disponibilizado no RI/UFG é de responsabilidade exclusiva dos autores. Ao encaminhar(em) o produto final, o(s) autor(a)(es)(as) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação (TCCG)

Nome(s) completo(s) do(a)(s) autor(a)(es)(as): Samilly Cesário Alves

Título do trabalho: "Estudo do impacto das vesículas extracelulares liberadas por *Paracoccidoides lutizii*, após cultivo em condições de privação e suficiência de ferro, na fagocitose por macrófagos *in vitro*"

2. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador) Concorda com a liberação total do documento [x] SIM [] NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(à)(s) autor(a)(es)(as) e ao(à) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo do TCCG. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro.

Obs.: Este termo deve ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Ludmila De Matos Baltazar, Professora do Magistério Superior**, em 06/12/2024, às 16:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Samilly Cesario Alves, Discente**, em 10/12/2024, às 18:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5004277** e o código CRC **97B68992**.

SAMILLY CESÁRIO ALVES

Estudo do impacto das vesículas extracelulares liberadas por *Paracoccidioides lutzii*, após cultivo em condições de privação e suficiência de ferro, na fagocitose por macrófagos in vitro.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina da Universidade Federal de Goiás como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof.^a Ludmila de Matos Baltazar

Co-orientadora: Olívia Basso Rocha

GOIÂNIA

2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Alves, Samilly Cesário
Estudo do impacto das vesículas extracelulares liberadas por *Paracoccidioides lutzii*, após cultivo em condições de privação e suficiência de ferro, na fagocitose por macrófagos in vitro.
[manuscrito] / Samilly Cesário Alves. - 2024.
XXXII, 32 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Ludmila de Matos Baltazar; co-orientadora
Olivia Basso Rocha.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Biomedicina, Goiânia, 2024.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, lista de figuras.

1. *Paracoccidioides lutzii*. 2. vesículas extracelulares. 3. suficiência de ferro. 4. privação de ferro. 5. macrófagos. I. Baltazar, Ludmila de Matos, orient. II. Título.

CDU 61



UFG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos vinte nove dias do mês de novembro de dois mil e vinte e quatro iniciou-se a sessão pública de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado “Estudo do impacto das vesículas extracelulares liberadas por *Paracoccidioides lutizii*, após cultivo em condições de privação e suficiência de ferro, na fagocitose por macrófagos *in vitro*” de autoria de Samilly Cesário Alves, do curso de Biomedicina, do Instituto de Ciências Biológicas da UFG. Os trabalhos foram instalados pelo(a) Dra. Ludmila de Matos Baltazar - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/ UFG com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Dra. Carolina Rodrigues Costa - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/ UFG e Gabriel de Almeida Santos - Instituto de Ciências Biológicas/ UFG. Após a apresentação, a banca examinadora realizou a arguição do(a) estudante. Posteriormente, de forma reservada, a Banca Examinadora atribuiu a nota final de **9,5**, tendo sido o TCC considerado **aprovado**.

Proclamados os resultados, os trabalhos foram encerrados e, para constar, lavrou-se a presente ata que segue assinada pelos Membros da Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Ludmila De Matos Baltazar, Professora do Magistério Superior**, em 29/11/2024, às 11:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carolina Rodrigues Costa, Professor do Magistério Superior**, em 29/11/2024, às 11:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gabriel De Almeida Santos, Discente**, em 29/11/2024, às 14:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4997993** e o código CRC **DE3EE98A**.

DEDICATÓRIA

Dedico ao Senhor meu Deus e aos
meus Pais e toda família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, meu refúgio constante durante os anos desafiadores da graduação. Foi em Sua presença que encontrei força nos dias mais difíceis e conforto nas incertezas. Ele foi meu alicerce, meu amigo fiel, em quem depus toda a minha fé.

Aos meus pais e à minha irmã, meu mais profundo agradecimento por serem os pilares da minha vida. Vocês sempre acreditaram em mim, foram minha fonte de força e inspiração, incentivando-me a dar o meu melhor a cada dia. Vocês são meu maior exemplo de amor e dedicação.

Ao meu noivo, minha gratidão eterna por ser meu apoio incondicional. Obrigada por não me deixar desistir, por acreditar em mim quando eu duvidei e por estar ao meu lado em cada momento. Sua presença foi essencial nesta jornada.

À minha orientadora, Ludmila Baltazar, deixo um agradecimento especial por toda a paciência, compreensão e acolhimento que me ofereceu durante o tempo em que estive sob sua orientação. Serei eternamente grata por todo o aprendizado e pelas oportunidades que me proporcionou.

Aos meus colegas do laboratório, Camila, Emilly e Ana Paula, obrigada por cada momento compartilhado e pelo apoio inestimável. Ao Gabriel, meu "melhor mestrando", sou grata pelos ensinamentos e pela dedicação. Vocês foram fundamentais, não apenas no aspecto acadêmico, mas também como amigos que marcaram minha trajetória.

Às minhas queridas amigas Débora Ananias Barbosa, Maria Eduarda L. S. Xavier e Waylla Nunes, agradeço por compartilharem comigo as batalhas diárias e por estarem sempre ao meu lado. Aos amigos João E. C. Neto e Amanda Fabrícia, obrigada por me arrancarem sorrisos mesmo nos momentos mais difíceis. Amo vocês e carrego cada um no meu coração.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão à banca avaliadora, composta pela Dra. Ludmila Baltazar, Dra. Carolina Rodrigues e pelo mestrando Gabriel Almeida. A contribuição de vocês foi fundamental para a validação deste momento, e suas valiosas observações e insights foram essenciais para aprimorar este trabalho. Agradeço imensamente pelo tempo dedicado e pelo apoio, que foram cruciais para o sucesso deste projeto.

A todos que fizeram parte dessa caminhada, minha gratidão infinita por contribuírem para que este sonho se tornasse realidade.

RESUMO

Introdução: As vesículas extracelulares (VEs) são estruturas envoltas por membranas, liberadas pelas células para o espaço extracelular, e desempenham papéis fundamentais em processos biológicos e na regulação da resposta imune. No contexto do fungo *Paracoccidioides lutzii*, agente causador da paracoccidioidomicose, uma micose sistêmica granulomatosa prevalente no Brasil, observou-se que a produção e liberação de VEs são influenciadas por condições ambientais, como a restrição de ferro. O ferro é essencial para as funções metabólicas do fungo, e a privação desse mineral parece impactar significativamente tanto a produção quanto o conteúdo das VEs. Essas vesículas são cruciais para a interação do *P. lutzii* com o hospedeiro, incluindo células imunes como os macrófagos, onde podem modular a resposta imune e a patogênese da infecção. **Objetivos:** O objetivo deste estudo é analisar o efeito das VEs liberadas por *P. lutzii*, após o cultivo do fungo em condições de privação e suficiência de ferro, na fagocitose do fungo por macrófagos in vitro. **Metodologia:** Para investigar essa hipótese, foram realizados cultivos semanais de *P. lutzii* em ágar Infusão Cérebro-Coração e em meio Mínimo Modificado (MVM) sólido, sob privação (suplementado com ácido batofenantrolina dissulfônico, BPS) e em condição de suficiência de ferro (suplementado com $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$). Em seguida, foram conduzidos ensaios de fagocitose, onde foram avaliados a capacidade dos macrófagos de inativar o fungo (CMIF) e o índice de proliferação intracelular (IPR). **Resultados:** A estimulação com $\text{IFN}\gamma$ aumenta a inativação de *P. lutzii* nos macrófagos após 6 horas, evidenciando seu papel na ativação microbicida. No entanto, após 24 horas, as VEsFe e VEsBPS induzem aumento da proliferação fúngica intracelular, sugerindo um efeito imunomodulador negativo. Após a troca do meio, apenas o $\text{IFN}\gamma$ manteve a redução significativa do crescimento fúngico, enquanto as VEs não alteraram a interação com os macrófagos, indicando um efeito limitado na modulação da resposta imune. **Conclusão:** Os resultados indicam que o $\text{IFN}\gamma$ tem um papel fundamental na atividade microbicida dos macrófagos, reduzindo significativamente a proliferação de *P. lutzii*. Em contraste, as vesículas extracelulares (VEsFe e VEsBPS) apresentam um efeito imunomodulador negativo, favorecendo o aumento do crescimento fúngico em 24 horas, o que sugere que elas podem interferir na capacidade dos macrófagos de controlar a infecção. Após a troca do meio de cultura, apenas o $\text{IFN}\gamma$ continuou a inibir o crescimento do fungo. Esses achados ressaltam o potencial terapêutico do $\text{IFN}\gamma$ e a necessidade de mais estudos sobre os efeitos das vesículas extracelulares.

Palavras-chave: *Paracoccidioides lutzii*; vesículas extracelulares; suficiência de ferro; privação de ferro; macrófagos.

ABSTRACT

Introduction: Extracellular vesicles (EVs) are membrane-enclosed structures released by cells into the extracellular space and play fundamental roles in biological processes and in the regulation of the immune response. In the context of the fungus *Paracoccidioides lutzii*, the causative agent of paracoccidioidomycosis, a systemic granulomatous mycosis prevalent in Brazil, it was observed that the production and release of EVs are influenced by environmental conditions, such as iron restriction. Iron is essential for the metabolic functions of the fungus, and deprivation of this mineral appears to significantly impact both the production and content of EVs. These vesicles are crucial for the interaction of *P. lutzii* with the host, including immune cells such as macrophages, where they can modulate the immune response and the pathogenesis of the infection. **Objectives:** The aim of this study was to analyze the effect of EVs released by *P. lutzii*, after cultivation of the fungus under iron deprivation and sufficiency conditions, on the phagocytosis of the fungus by macrophages in vitro. **Methodology:** To investigate this hypothesis, *P. lutzii* were cultured weekly in Brain Heart Infusion agar and in solid Modified Minimal Medium (MVM), under iron deprivation (supplemented with bathophenanthroline disulfonic acid, BPS) and under iron sufficiency conditions (supplemented with Fe (NH₄)₂(SO₄)₂). Then, phagocytosis assays were conducted, where the ability of macrophages to inactivate the fungus (CMIF) and the intracellular proliferation index (IPR) were evaluated. **Results:** Stimulation with IFN γ increases the inactivation of **P. lutzii** in macrophages after 6 hours, evidencing its role in microbicidal activation. However, after 24 hours, VEsFe and VEsBPS induced an increase in intracellular fungal proliferation, suggesting a negative immunomodulatory effect. After changing the medium, only IFN γ maintained the significant reduction in fungal growth, while VEs did not alter the interaction with macrophages, indicating a limited effect in modulating the immune response. **Conclusion:** The results indicate that IFN γ has a fundamental role in the microbicidal activity of macrophages, significantly reducing the proliferation of *P. lutzii*. In contrast, extracellular vesicles (VEsFe and VEsBPS) present a negative immunomodulatory effect, favoring the increase in fungal growth at 24 hours, which suggests that they may interfere with the ability of macrophages to control the infection. After changing the culture medium, only IFN γ continued to inhibit fungal growth. These findings highlight the therapeutic potential of IFN γ and the need for further studies on the effects of extracellular vesicles.

Keywords: *Paracoccidioides lutzii*; extracellular vesicles; iron sufficiency; iron deprivation; macrophages.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Características macro e micromorfológicas do gênero *Paracoccidioides*. 2A. Aspectos da colônia micelial crescida a 28 °C. 2B. Hifas septadas com conídios. 2C. Aspectos da colônia leveduriforme crescida a 37 °C. 2D. Células arredondadas simples e com brotamento múltiplos (Lacaz et al., 1999; Teixeira et al., 2014; Hryck et al., 2018). 12

Figura 2. Esquema da infecção por *Paracoccidioides* spp. mostrando a forma termodimórfica e os principais hospedeiros (Shikanai-Yasuda., 2018). 13

Figura 3. Pacientes com a forma aguda/subaguda (juvenil) da paracoccidioidomicose. A) Massa de linfonodos na região supraclavicular, cervical e submandibular. B) Linfadenomegalia na paracoccidioidomicose. C) Lesões ulcerativas verrucosas no rosto e no ouvido, devido a disseminação pela corrente sanguínea. D) Lesões ulcerativas em forma de pápulas ou nódulos, também causadas pela disseminação hematogênica (Shikanai-Yasuda, 2018). 15

Figura 4. Capacidade dos macrófagos ativar o fungo após interação por 6 horas entre macrófagos e *P. lutzii*. *diferença estatística comparado ao grupo IFN γ + *P. lutzii*. &diferença estatística comparado ao grupo macrófagos + *P. lutzii*. 24

Figura 5. Capacidade dos macrófagos inativar o fungo após 24 horas de interação entre macrófagos e *P. lutzii*. &diferença estatística comparado ao grupo macrófagos + *P. lutzii*. 25

Figura 6. Avaliação da proliferação intracelular após lavagem do poço e adição de novo meio. **diferença estatística comparado aos grupos macrófagos + *P. lutzii*, macrófagos_VEsFe + *P. lutzii*, macrófagos_VEsBPS + *P. lutzii*. 25

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Pb01	<i>Paracoccidioides lutzii</i>
PCM	Paracoccidioidomicose
VEs	Vesículas extracelulares
Fe	Ferro
BHI	<i>Brain-Hart Infusion Agar</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
MVM	Meio sintético modificado
BPS	Ácido beta fenantrolina dissulfônico
DMEN	Meio Eagle Modificado Dulbecco
DLS	<i>Dynamic Ligth Scattering</i>
IFNy	Interferon gama
IF	Índice fagocítico
CMIF	Capacidade dos macrófagos em inativar o fungo
IPR	Índice de proliferação intracelular
SP	Serinoproteinase
FBA	Frutose 16-bifosfato aldose

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Etiologia e morfologia do <i>Paracoccidioides lutzii</i>	11
1.2 Paracoccidioidomicose	12
1.3 Epidemiologia	13
1.4 Manifestações Clínicas	14
1.5 Diagnóstico	15
1.6 Tratamento	16
1.7 Vesículas Extracelulares	17
1.8 Macrófagos	18
1.9 Imunidade nutricional	19
2 JUSTIFICATIVA	20
3 OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo geral	21
3.2 Objetivos específicos	21
4 METODOLOGIA	22
4.1 Microrganismos e meios de cultura	22
4.2 Isolamento e caracterização das VEs de <i>P. lutzii</i>	22
4.3 Avaliação do efeito das VEs no curso da infecção pelo fungo <i>P. lutzii</i> em macrófagos in vitro	23
5 RESULTADOS	24
6 DISCUSSÃO	26
7 CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

1.1 Etiologia e morfologia do *Paracoccidioides lutzii*

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença fúngica sistêmica de caráter endêmico na América Latina, com maior prevalência no Brasil. Ela é causada pelos fungos do gênero *Paracoccidioides*, incluindo as espécies *Paracoccidioides brasiliensis* e *P. lutzii* (Goes *et al.*, 2014). Esses microrganismos possuem dimorfismo térmico, adotando a forma micelial em temperaturas de 18-23°C e a forma leveduriforme em 35-37°C. Essa transição morfológica desempenha um papel crucial no desenvolvimento da infecção e na evolução da patologia (Oliveira *et al.*, 2015).

As espécies do gênero *Paracoccidioides* interagem com células do hospedeiro utilizando proteínas adesivas chamadas adesinas, que modulam a resposta imunológica e afetam processos como coagulação e apoptose celular (Oliveira *et al.*, 2015). Enquanto *P. brasiliensis* é frequentemente encontrado em tatus, *P. lutzii* apresenta menor capacidade de formar micélio e gerar conídios em ambientes terrestres (Hrycyk *et al.*, 2018).

O *Paracoccidioides lutzii*, também denominado Pb01, é um fungo termodimórfico que pode exibir duas formas distintas dependendo da temperatura. Em 25°C, assume a forma filamentosa, considerada a fase infectante, enquanto em 37°C, transforma-se em levedura, caracterizada como sua fase patogênica (Hahn *et al.*, 2022).

Após a descoberta de três espécies (S1, PS2 e PS3) em 2006, *P. lutzii* foi identificado como uma espécie distinta em 2009. Posteriormente, em estudos adicionais, uma quarta espécie (PS4) foi descrita. Essa classificação possibilitou uma melhor compreensão da diversidade genética dentro do complexo de *Paracoccidioides* (Bonome *et al.*, 2023)

A diferenciação micromorfológica de *P. lutzii* pode ser fator de confusão, uma vez que a variabilidade na morfologia dos conídios pode ser parecida com as características de *P. brasiliensis*, resultando em interpretações incorretas. Avaliações morfológicas mostraram que amostras 'Pb01-like' apresentam conídios mais longos e uma maior diversidade de tamanhos (Almeida *et al.*, 2015; Melo *et al.*, 2013).

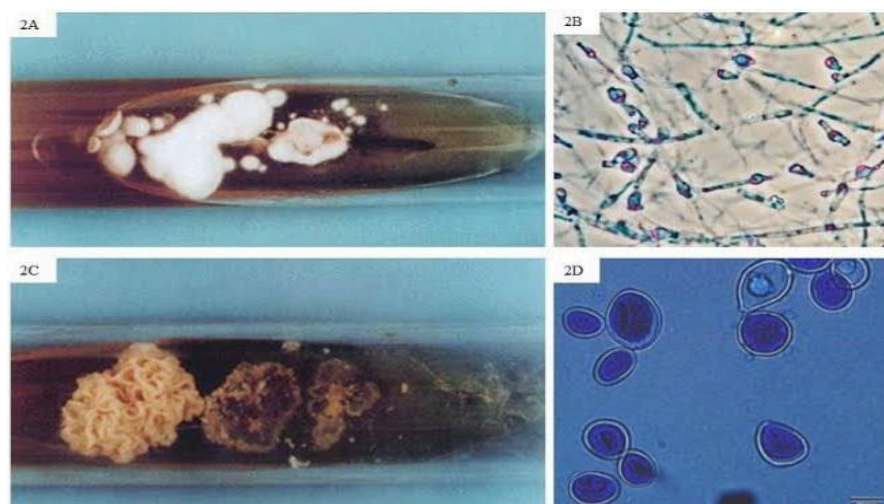


Figura 1. (a) Características macro e micromorfológicas do gênero *Paracoccidioides*. 2A. Aspectos da colônia micelial crescida a 28 °C. 2B. Hifas septadas com conídios. 2C. Aspectos da colônia leveduriforme crescida a 37 °C. 2D. Células arredondadas simples e com brotamento múltiplos (Lacaz et al., 1999; Teixeira et al., 2014; Hryck et al., 2018).

1.2 Paracoccidioidomicose

A PCM é uma micose sistêmica causada por fungos dimórficos do complexo *Paracoccidioides*, sendo os principais agentes *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. O primeiro caso dessa micose foi descrito em 1908 em São Paulo, pelo médico Adolpho Lutz, que estudou infecções pseudococcídicas em alguns pacientes (Hahn *et al.*, 2022).

A infecção começa quando esporos do fungo, presentes no solo, são inalados e chegam aos pulmões. Neste local, se transformam em leveduras, que podem se espalhar para outros órgãos através do sangue e linfa (Figura 2). Classicamente, a PCM se apresenta em duas formas clínicas principais: aguda/subaguda e crônica. A forma aguda, que afeta jovens de ambos os sexos, é caracterizada por uma lesão primária que se dissemina rapidamente, comprometendo órgãos como baço, fígado e medula óssea, podendo resultar em quadros clínicos moderados a graves. A forma crônica, por sua vez, que ocorre principalmente em homens adultos, manifesta-se de maneira mais lenta, com lesões que podem ser unifocais, limitadas a um único órgão, ou multifocais, envolvendo múltiplos sistemas (Melo *et al.*, 2013; Barrozo *et al.*, 2010; Mançano e Della Coletta, 2022).

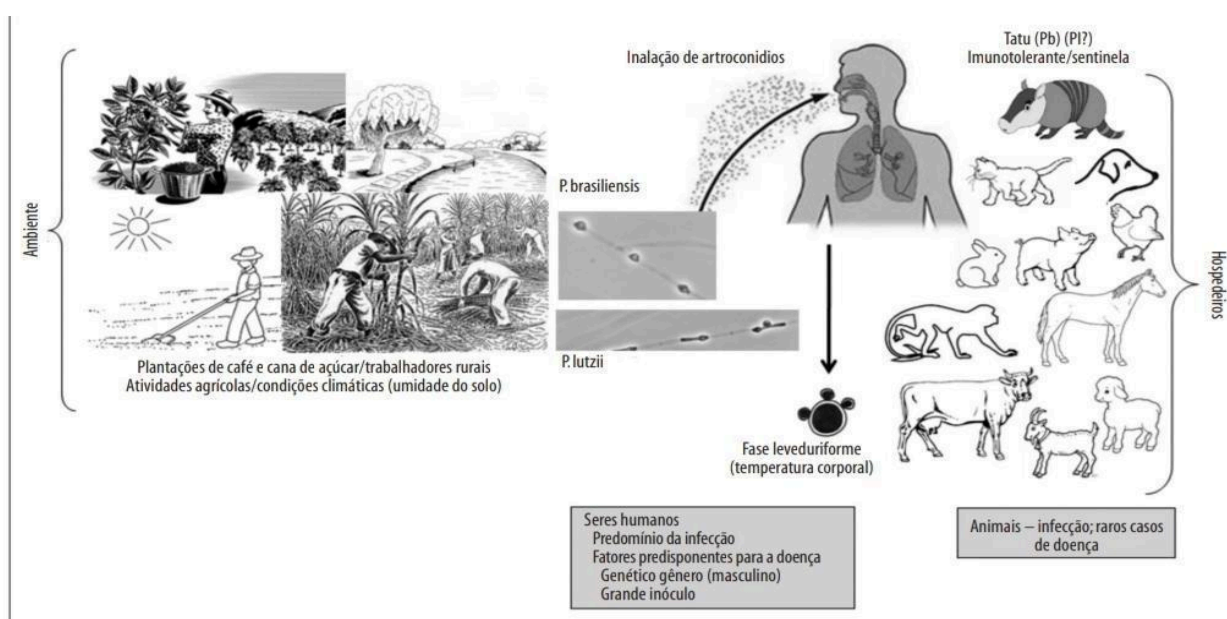


Figura 2. Esquema da infecção por *Paracoccidioides* spp. mostrando a forma termodimórfica e os principais hospedeiros (Shikanai-Yasuda., 2018).

1.3 Epidemiologia

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica prevalente em áreas rurais da América Latina, sendo o Brasil responsável por cerca de 80% dos casos. A distribuição geográfica dos agentes causadores da PCM, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*, abrange principalmente o Brasil, Colômbia, Venezuela, Equador e Argentina. O *P. lutzii* é mais comum na região Centro-Oeste do Brasil, especialmente no estado do Mato Grosso (Hahn *et al.*, 2022). Estima-se que aproximadamente 10 milhões de pessoas estejam infectadas na América Latina, com a doença afetando majoritariamente trabalhadores rurais envolvidos em atividades como o cultivo de café e tabaco (Martinez, 2017)

Habita principalmente o solo, onde se desenvolve em ambientes naturais ricos em matéria orgânica. Sua presença é frequentemente associada a áreas de vegetação densa e solos

úmidos, condições que favorecem a sobrevivência dos esporos. *P. lutzii* possui características genômicas distintas em relação ao *Paracoccidioides brasiliensis*, o que pode afetar o curso da infecção e resultados clínicos ao tratamento da PCM. (Melo *et al.*, 2013; Almeida *et al.*, 2013).

Fatores ambientais, como expansão agrícola e desmatamento, contribuem para a disseminação do fungo (Oliveira *et al.*, 2015). Já os fatores individuais associados à progressão da PCM incluem predisposição genética, tabagismo, consumo de álcool e imunossupressão (Martinez, 2017). Embora rara, fora da América Latina, casos têm sido registrados em viajantes provenientes da região (Carvalho *et al.*, 2009).

A doença é prevalente na zona rural e atinge mais homens na faixa etária de 30 a 60 anos, especialmente aqueles envolvidos na agricultura, uma vez que a infecção está geralmente associada à manipulação do solo. A maior ocorrência em homens é atribuída à influência dos hormônios sexuais pois o estradiol atua como um fator protetor nas mulheres, impedindo a conversão de conídios para leveduras, enquanto a testosterona, parece favorecer um perfil imunológico menos eficiente para o controle da doença em homens (Pinzan *et al.*, 2010; Canteros, 2018).

1.4 Manifestações Clínicas

A PCM pode se apresentar em duas formas clínicas principais: aguda/subaguda e crônica. A forma aguda ocorre predominantemente em jovens de ambos os sexos, enquanto a forma crônica afeta principalmente homens adultos, devido à influência de hormônios sexuais, como o estradiol, que protege as mulheres ao inibir a transformação de conídios em leveduras (Pinzan *et al.*, 2010).

Os pulmões são frequentemente os órgãos mais comprometidos, mas lesões em pele, mucosas e linfonodos também são comuns (Figura 3). Ulcerações na cavidade oral, com áreas eritematosas e granulosas, são manifestações clássicas, demandando atenção de dentistas, dermatologistas e médicos da atenção primária para diagnóstico precoce (Villalba, 2021 ; Barros *et al.*, 2018).

De maneira geral, os sintomas da PCM incluem tosse persistente, dispneia, perda de peso significativa e o surgimento de lesões cutâneas ou mucosas . A doença quando em sua forma crônica afeta predominantemente o sistema respiratório, mas também pode gerar

manifestações extrapulmonares, como linfadenopatia e comprometimento oral (Shikanai-Yasuda, 2018).



Figura 3. Pacientes com a forma aguda/subaguda (juvenil) da paracoccidioidomicose. A) Massa de linfonodos na região supraclavicular, cervical e submandibular. B) Linfadenomegalia na paracoccidioidomicose. C) Lesões ulcerativas verrucosas no rosto e no ouvido, devido a disseminação pela corrente sanguínea. D) Lesões ulcerativas em forma de pápulas ou nódulos, também causadas pela disseminação hematogênica (Shikanai-Yasuda, 2018).

A imunidade protetora contra a PCM envolve imunidade inata, incluindo células fagocíticas (macrófagos e neutrófilos) e produção de citocinas, e imunidade adaptativa, através de anticorpos específicos e linfócitos T ativados, que são fundamentais para desenvolver uma resposta imune mais efetiva e duradoura (Burguer, 2021; Grisolia *et al.*, 2023).

Enzimas como serinoproteinases (SP) e frutose-1,6-bifosfato aldolase (FBA) são consideradas um dos co-fatores de virulência de *P. lutzii*, desempenhando um papel crucial na interação com macrófagos e contribuindo com a interação entre patógeno-hospedeiro. Essas enzimas facilitam a adaptação do fungo ao ambiente no qual se encontra, potencializando sua capacidade de provocar infecções. Estudos indicam que novos peptídeos imunogênicos de *P. lutzii* têm grande potencial para o desenvolvimento de vacinas peptídicas contra a PCM, podendo auxiliar no tratamento (Silva *et al.*, 2021; Vieira *et al.*, 2019)

1.5 Diagnóstico

O diagnóstico da PCM apresenta desafios significativos, principalmente pela semelhança de seus sintomas com os de outras doenças, como tuberculose e sarcoidose (Trindade *et al.*, 2022). Para maior precisão, é necessário utilizar uma combinação de métodos clínicos, laboratoriais e moleculares. Entre os exames laboratoriais, destacam-se os testes sorológicos, o exame microscópico direto, a cultura do fungo e a análise histopatológica por meio de biópsias, sendo o padrão ouro de diagnóstico. (Araújo *et al.*, 2021).

Os testes sorológicos, como a imunodifusão e a fixação de complemento, são ferramentas valiosas, com uma eficácia diagnóstica de até 97,7% em determinados estudos (Castañeda *et al.*, 1981). Além disso, os avanços nos métodos moleculares, como a PCR, têm se mostrado essenciais para identificar e diferenciar as espécies do complexo *Paracoccidioides*, como *P. brasiliensis* e *P. lutzii* (Teixeira *et al.*, 2014). No entanto, a detecção específica de *P. lutzii* ainda é limitada pela ausência de antígenos apropriados para esses testes (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2018).

A doença apresenta manifestações clínicas variadas, algumas vezes atípicas, o que pode dificultar o reconhecimento pelos profissionais de saúde e atrasar o diagnóstico definitivo (Santos *et al.*, 2019; Mançano & Coletta, 2022).

1.6 Tratamento

O tratamento da PCM depende da gravidade do quadro clínico, sendo os antifúngicos a base da terapia. Para casos leves, são amplamente utilizados medicamentos da classe dos azóis, como itraconazol, e derivados de sulfa, enquanto formas moderadas a graves podem demandar tratamentos prolongados ou o uso de antifúngicos parenterais, como anfotericina B (Shikanai-Yasuda, 2015). O itraconazol, em particular, têm demonstrado alta eficácia no tratamento das formas crônicas da PCM, mas o manejo de casos agudos ainda enfrenta limitações, especialmente quanto à necessidade de novas combinações terapêuticas mais eficazes (Shikanai-Yasuda, 2015).

Na atenção primária, o cetoconazol também tem sido usado com bons resultados em determinados contextos (Pripas, 1988). No entanto, um dos principais desafios do tratamento da PCM é sua longa duração, que frequentemente resulta no abandono do tratamento por parte dos pacientes, comprometendo a eficácia terapêutica e favorecendo complicações e recidivas (Santos et al., 2019). Apesar de, em geral, a PCM responder bem ao tratamento antifúngico, a possibilidade de sequelas graves — como fibrose pulmonar e alterações funcionais em órgãos comprometidos — reforça a necessidade de diagnóstico precoce e manejo adequado (Araújo *et al.*, 2021).

Por ser uma das principais causas de morbidade entre as doenças infecciosas no Brasil, a PCM exige esforços multidisciplinares que englobam

o aprimoramento das ferramentas de diagnóstico, o fortalecimento das políticas públicas de saúde, a ampliação do acesso a tratamentos eficazes e a conscientização sobre a importância da adesão terapêutica. Apenas por meio dessas ações será possível reduzir o impacto da PCM, especialmente na população rural e vulnerável.

1.7 Vesículas Extracelulares

As vesículas extracelulares (VEs) são estruturas associadas à membrana que são liberadas pelas células e desempenham papéis essenciais na comunicação celular, transferência de metabólitos e na reestruturação celular durante o desenvolvimento, além de atuarem em resposta a estresse ou lesões. (Wang *et al.*, 2024).

Atualmente são classificados em três categorias: microvesículas (ectossomos), que se formam por brotamento da membrana plasmática; exossomos, originados de corpos multivesiculares que se fundem com a membrana para liberar o conteúdo; e corpos apoptóticos, que são liberados durante a apoptose e contêm detritos celulares e moléculas sinalizadoras (Ibrahim & Khan, 2021).

Sua composição interna é variada, incluindo proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e metabólitos, que são incorporados de maneira seletiva, conforme as necessidades específicas da célula *P. lutzii*, por exemplo, produz e libera VEs com populações de RNA, incluindo mRNAs e pequenos RNAs não codificantes, que têm o potencial de afetar a virulência do

fungo e regular as respostas imunológicas do hospedeiro. Estudos indicam que VEs desempenham um papel crucial na comunicação intercelular e se destacam como veículos promissores para a entrega de biomoléculas terapêuticas, especialmente para a administração direcionada de ácidos nucleicos (Silva *et al.*, 2019; Yuan, 2022).

Tem sido demonstrado o potencial das VEs na entrega específica de medicamentos, especialmente em modelos da barreira hematoencefálica, onde há variações na permeabilidade e na distribuição dos compostos. Por isso, as vesículas extracelulares estão sendo exploradas por sua capacidade de entregar medicamentos, especialmente por sua habilidade de encapsular macromoléculas e direcioná-las a células-alvo (Pedrioli *et al.*, 2021; Nordmeier *et al.*, 2022; Marazioti *et al.*, 2019).

1.8 Macrófagos

Os macrófagos são células essenciais do sistema imunológico. Eles se originam dos monócitos e, ao se deslocarem para os tecidos, se transformam em macrófagos, tendo um papel importante na proteção do organismo contra patógenos e na preservação da homeostase dos tecidos. A principal função dos macrófagos é a fagocitose, que envolve a ingestão e destruição de células danificadas, detritos e agentes estranhos, como bactérias e vírus (Minucci *et al.*, 2022).

Além disso, eles modulam a resposta imunológica ao liberar citocinas que atraem outras células do sistema imune para o local da infecção. São classificados em diferentes subtipos, sendo o M1 e o M2 os mais conhecidos. M1 são pró-inflamatórios, auxiliando na montagem de respostas imunes, enquanto os macrófagos M2 são anti-inflamatórios, auxiliando no reparo tecidual e na resolução da inflamação (Ramalingam *et al.*, 2024).

Os macrófagos são células importantes na fase inicial da infecção por *Paracoccidioides* spp., uma vez que desempenham um papel fundamental na mediação da resposta inflamatória e por possuir atividade fungicida contra fungos. De forma interessante, *Paracoccidioides* spp. possui a habilidade de sobreviver e se multiplicar dentro dos macrófagos, utilizando estratégias adaptativas para neutralizar o microambiente hostil e carente de nutrientes que as células criam durante a infecção. Essa capacidade de adaptação permite que o fungo evada das defesas imunológicas do hospedeiro e persista no organismo (Silva *et al.*, 2022).

Fungos do gênero *Paracoccidioides* spp. melhoram sua sobrevivência quando em contato com macrófagos ao aumentar a produção de superóxido dismutases, enzimas que ajudam a neutralizar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio durante a explosão respiratória dos macrófagos. Isso facilita a persistência dos fungos no organismo (Tamayo *et al.*, 2016).

Para *P. lutzii* foi demonstrado que proteínas são expressas de forma diferencial durante a interação com monócitos humanos, evidenciando a importância dos macrófagos na patogênese da PCM. Além disso, pesquisas sobre macrófagos na PCM identificam subpopulações M1 e M2 distintas, associadas a perfis de citocinas Th1 e Th2 em lesões mucosas. Essas subpopulações afetam a resposta imune e a evolução da doença (Pagliari *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2021).

1.9 Imunidade nutricional

O ferro (Fe) é um micronutriente essencial para diversos organismos, incluindo fungos do gênero *Paracoccidioides* spp. Ele desempenha um papel crucial em processos como a respiração celular e a síntese de DNA. *Paracoccidioides* spp. utiliza sideróforos, moléculas que se ligam ao ferro, para captá-lo do ambiente extracelular, estratégia que é fundamental para sua sobrevivência em condições adversas. *Paracoccidioides* spp. também adquire o ferro através da hemoglobina, por meio de mecanismos mediados por receptores, que são importantes para seu crescimento e virulência durante a infecção (Bailão *et al.*, 2014; Guedes, 2024).

O ferro atua como um cofator em reações que produzem radicais livres. Embora esses radicais sejam utilizados pelo sistema imunológico para combater patógenos, níveis excessivos de ferro podem resultar em estresse oxidativo e danos às células do hospedeiro, prejudicando ainda mais a resposta imune. A deficiência de ferro em *P. lutzii* provoca respostas adaptativas, levando à maior utilização de hemoglobina e ao aumento da expressão de adesinas. Essas mudanças podem afetar tanto sua atividade metabólica quanto sua virulência (Souza *et al.*, 2020; Barbosa, 2012)

2 JUSTIFICATIVA

A paracoccidiodomicose (PCM) é uma micose sistêmica que afeta milhares de pessoas, especialmente em regiões da América Latina, representando um desafio significativo para a saúde pública no Brasil. Estudar os mecanismos pelos quais o fungo *P.lutzii* sobrevive e interage com o hospedeiro humano é essencial para o avanço no entendimento dessa doença e no desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes.

As vesículas extracelulares (VEs) desempenham um papel crucial nessa interação, funcionando como veículos que transportam moléculas bioativas, como enzimas, proteínas e materiais genéticos. Essas vesículas podem modular negativamente a resposta imune do hospedeiro, favorecendo a sobrevivência do fungo em ambientes hostis. Paralelamente, o *P. lutzii* utiliza estratégias sofisticadas para obter ferro, um nutriente essencial para sua sobrevivência, como a produção de sideróforos e o aproveitamento de hemoglobina, o que reforça sua capacidade de adaptação e virulência (Silva *et al.*, 2019; Borges *et al.*, 2024).

A compreensão dos efeitos das VEs na interação com células imunes, como os macrófagos, é fundamental, visto que essas células desempenham um papel central na imunidade inata e na defesa contra infecções fúngicas. Estudos indicam que o uso de citocinas, como o interferon-gama (IFN γ), pode estimular a atividade microbicida dos macrófagos, reduzindo a proliferação do fungo. No entanto, a influência das VEs nessa interação ainda não está totalmente elucidada (Casanova *et al.*, 2024; Oliveira *et al.*, 2021).

Assim, investigar a relação entre a privação de ferro, a produção de VEs e os mecanismos de virulência de *P. lutzii* permitirá um melhor entendimento sobre a patogênese da PCM. Esses resultados poderão contribuir significativamente para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, direcionadas tanto à modulação da resposta imune quanto à inibição de mecanismos de adaptação do fungo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o impacto das vesículas extracelulares (VEs) de *P.lutzii*, produzidas em condições de suficiência e privação de ferro, na interação com macrófagos *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade dos macrófagos em inativar *P. lutzii* após 6 e 24 horas de interação, na presença de VEs em condições de suficiência e privação de ferro e na presença de IFN γ .
- Determinar o índice de proliferação intracelular (IPR) do fungo após o período inicial de fagocitose e a troca do meio de cultura, correlacionando o papel das VEs e do IFN γ na modulação dessa resposta.

4 METODOLOGIA

4.1 Microrganismos e meios de cultura

O *Paracoccidioides lutzii* foi cultivado em ágar Infusão Cérebro-Coração (Brain-Heart Infusion Agar, BHI) com a adição de 4% de glicose, incubado a 36 °C para manter a fase leveduriforme. Subcultivos foram realizados semanalmente para garantir a viabilidade do fungo.

Para analisar as variáveis experimentais de *P. lutzii* sob condições de suficiência (suplementado com 3,5 µM de Fe (NH₄)₂(SO₄)₂) e privação de ferro (suplementado com 10 µM do quelante de ferro (Fe), ácido batofenantrolinadissulfônico), o cultivo seguiu o protocolo descrito por Souza *et al.* (2022). Em resumo, as células de *P. lutzii* na fase leveduriforme foram cultivadas em meio BHI líquido com 4% de glicose, agitando a 36 °C por 48 horas. Após esse processo, as células foram centrifugadas, lavadas com tampão fosfato salino 1x (PBS 1x) e, em seguida, cultivadas em meio sintético modificado (MVM) líquido por 24 horas, nas duas condições. Após esse período, foram centrifugadas e o pellet foi ressuspensionado e cultivado em meio MVM sólido com suficiência e privação de Fe por 7 dias na concentração de 1*10⁶ cels/ml.

Para os ensaios de interação com macrófagos, foram utilizadas células imortalizadas derivadas do sarcoma murino da linhagem J774, amplamente utilizados para mimetizar as funções primárias destes macrófagos. Essas células foram cultivadas em Meio Eagle Modificado Dulbecco (DMEM), sendo a troca do meio realizada a cada dois dias. Essa abordagem permitiu investigar como *P. lutzii* interage com este tipo de célula imune, contribuindo para uma compreensão mais aprofundada de suas estratégias de sobrevivência e virulência.

4.2 Isolamento e caracterização das VEs de *P. lutzii*

As vesículas produzidas por *P. lutzii* foram isoladas seguindo o protocolo estabelecido por Reis *et al.* (2019). Após 7 dias de cultivo em MVM sólido, as células fúngicas foram

suspensas em tampão fosfato salino (PBS 1x) e, em seguida, centrifugadas a 3500 RPM por 5 minutos, seguida de uma nova centrifugação do sobrenadante a 15.000 g. As vesículas foram isoladas pela ultracentrifugação a 100.000 g durante 1 hora, permitindo a sedimentação das vesículas. A caracterização das VEs liberadas pelos fungos foi realizada por meio do NanoSight, que permitiu analisar o tamanho e a distribuição das vesículas.

4.3 Avaliação do efeito das VEs no curso da infecção pelo fungo *P. lutzii* em macrófagos in vitro

Nos ensaios de interação entre VEs-macróforos-fungos foram avaliados a capacidade dos macróforos de inativar o fungo (CMIF) e o índice de proliferação intracelular (IPR).

4.3.1. Plaqueamento e desafio com leveduras de *P. lutzii*

Para avaliação do CMIF, células J774 foram depositadas em microplacas de 96 poços na proporção 1×10^6 e foram pré ativadas com as VEs por 1 hora. Após esta etapa os macróforos foram desafiados com *P. lutzii* incubados no período de 5 e 24 horas, em seguida foram lisados utilizando água destilada estéril e incubados em meio BHI sólido acrescido de glicose por 7 dias a 36°C, permitindo a quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC).

4.3.2. Índice de proliferação intracelular in vitro

Para determinação do IPR, o sobrenadante foi retirado após 6 horas de incubação. Em seguida, foi adicionado novo meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de gentamicina, mantendo a cultura por um período adicional de 24 horas. Em seguida os macróforos foram lisados, e plaqueados em BHI sólido, a fim de obter a viabilidade do fungo.

4.5. Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o software GraphPad Prism 5.0. Foi aplicada a análise de variância de uma via (One-way ANOVA), seguida do teste post hoc de Newman-Keuls quando apropriado. Considerar-se-á que os resultados são estatisticamente significativos para valores de $P < 0,0$.

5 RESULTADOS

Este estudo avaliou o impacto das VEs liberadas por *P. lutzii*, cultivado em privação ou presença de ferro, na fagocitose do fungo por macrófagos in vitro. Na figura 4, após 6 horas de interação entre macrófagos e *P. lutzii*, observou-se o grupo macrófagos estimulados com $IFN\gamma$ apresentou redução da carga fúngica, apesar de não estatisticamente diferente, quando comparado ao grupo controle, macrófagos + *P. lutzii*. Em contrapartida, os grupos tratados com VEsFe e VEsBPS não apresentaram diferença significativa entre eles, mas foram estatisticamente diferentes em relação ao controle, com maior carga fúngica. Na figura 5, após 24 horas de interação entre macrófagos e *P. lutzii*, foi observado que os grupos macrófagos tratados com $IFN\gamma$ e VEsBPS apresentaram aumento significativo da carga fúngica comparado com o grupo controle.

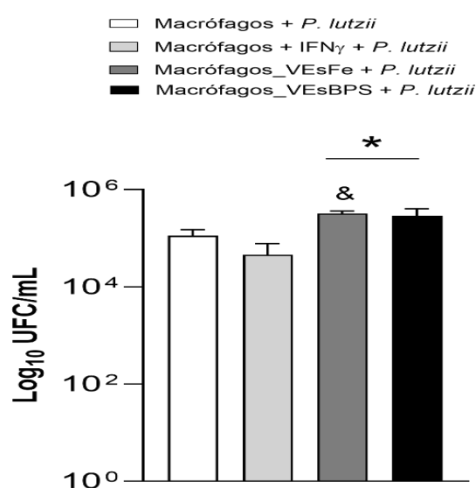


Figura 4: Capacidade dos macrófagos ativar o fungo após interação por 6 horas entre macrófagos e *P. lutzii*. *diferença estatística comparado ao grupo $IFN\gamma$ + *P. lutzii*. &diferença estatística comparado ao grupo macrófagos + *P. lutzii*.

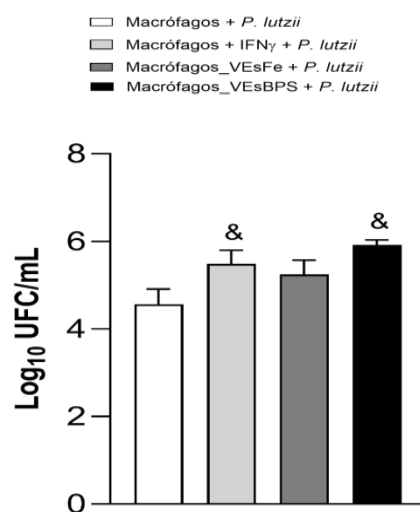


Figura 5: Capacidade dos macrófagos inativar o fungo após 24 horas de interação entre macrófagos e *P. lutzii*. &diferença estatística comparado ao grupo macrófagos + *P. lutzii*.

Por fim, na figura 6 após a lavagem e a adição de um novo meio foi observado menor IPR no grupo macrófagos estimulados com IFN γ . Enquanto que os grupos tratados com VEsBPS e VEsFe não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle.

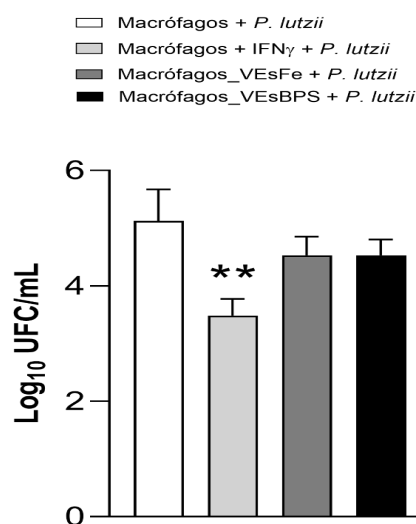


Figura 6: Avaliação da proliferação intracelular após lavagem do poço e adição de novo meio (DMEN). **diferença estatística comparado aos grupos macrófagos + *P. lutzii*, macrófagos_VEsFe + *P. lutzii*, macrófagos_VEsBPS + *P. lutzii*.

6 DISCUSSÃO

A estimulação de macrófagos com $\text{IFN}\gamma$ aumentou a capacidade de inativação de *P. lutzii* após 6 horas de interação, confirmando o papel do $\text{IFN}\gamma$ na ativação de macrófagos e a atividade microbicida dessas células. Essa observação condiz com os estudos que destacam a importância desta citocina na ativação do metabolismo oxidativo e na produção de espécies reativas de oxigênio, que contribuem para eliminação do patógeno (Casanova *et al.*, 2024).

O aumento da proliferação intracelular do fungo após interação com macrófagos tratados com VEsFe e VEsBPS indica que as VEs modulam negativamente a capacidade dos macrófagos de controlar o fungo, favorecendo sua replicação intracelular do mesmo. Esse efeito pode estar relacionado à presença de fatores de virulência nas VEs, como enzimas antioxidantes que neutralizam espécies reativas de oxigênio (EROs), ou moléculas que interferem na sinalização inflamatória dos macrófagos. A similaridade entre os efeitos com VEsFe e VEsBPS sugere que a disponibilidade de ferro durante o cultivo do fungo, aparentemente não tem influência na composição ou função imunomoduladora das vesículas de *P. lutzii* (Borges *et al.*, 2024). Entretanto para confirmar essa hipótese outras análises serão realizadas.

Mácrofagos estimulados com $\text{IFN}\gamma$ apresentaram uma redução significativa da proliferação intracelular de *P. lutzii* após lavagem e troca de meio de cultura, evidenciando a capacidade do $\text{IFN}\gamma$ em ativar efetivamente os mácrofagos (Harbrecht *et al.*, 1996). Essa mesma análise de IPR indicou que VEs obtidas do fungo na condição de suficiência e privação de ferro atuaram de forma semelhante pois não houve diferença entre esses grupos quanto a carga fúngica, sugerindo que as VEs em ambas as circunstâncias não são suficientes para alterar significativamente ativação dos macrófagos.

Os resultados indicam que $\text{IFN}\gamma$ desempenha papel importante na modulação da resposta dos macrófagos contra *P. lutzii*, enquanto as VEs, os resultados indicam até o momento, podem ter um papel duplo, favorecendo a sobrevivência do fungo nos estágios iniciais da interação com os macrófagos, mas em estágios mais tardios a influência das VEs aparenta não ter relevância e/ou seu efeito pode ter findado. Para confirmar essa hipótese, outras análises serão realizadas.

7 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo reforçam a relevância do interferon-gama (IFN γ) na modulação da resposta imune contra *P.lutzii*. Foi evidenciado que essa citocina promoveu a redução significativa da proliferação intracelular do fungo em macrófagos, mesmo em condições adversas, destacando seu papel no aumento da atividade microbicida dessas células. Esse achado ressalta o potencial terapêutico do IFN γ em infecções por patógenos intracelulares.

Em contrapartida, as vesículas extracelulares (VEs) liberadas por *P. lutzii* mostraram um efeito imunomodulador negativo, favorecendo a proliferação do fungo nos estágios iniciais de interação com os macrófagos. Contudo, após períodos mais longos ou em condições modificadas, como a troca do meio de cultura, o impacto das VEs se tornou menos significativo, sugerindo que seus efeitos podem ser transitórios ou dependentes do microambiente. Esses resultados indicam que as VEs possuem mecanismos de modulação que favorecem a sobrevivência inicial do fungo, mas não sustentam esse efeito em estágios mais avançados da interação.

Adicionalmente, não foram observadas diferenças significativas no comportamento imunomodulador das VEs obtidas em condições de suficiência ou privação de ferro, sugerindo que a disponibilidade desse nutriente não afeta drasticamente a composição funcional das vesículas. Isso levanta questões sobre outros possíveis fatores que possam influenciar a funcionalidade das VEs e aponta a necessidade de investigações adicionais.

Dessa forma, este trabalho destaca o impacto das VEs no contexto da paracoccidiodomicose e reforça a importância de citocinas como o IFN γ no controle da infecção. Esses achados contribuem para um melhor entendimento dos mecanismos de interação patógeno-hospedeiro e podem orientar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, seja pela potencial inibição das VEs ou pelo uso de moduladores imunológicos como o IFN γ . Além disso, a ausência de diferenças funcionais nas VEs sob diferentes condições ambientais sugere que estudos futuros devem explorar com maior detalhe os determinantes moleculares de sua função imunomoduladora, ampliando o conhecimento sobre a fisiopatologia do *P. lutzii* e da paracoccidiodomicose.

REFERÊNCIAS

- BARROS, L. *et al.* Paracoccidioidomicose na mucosa oral: Relato de caso. **Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial**, v. 59, n. 3, 2018.
- BARROZO, L. V. *et al.* First description of a cluster of acute/subacute paracoccidioidomycosis cases and its association with a climatic anomaly. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 3, p. e643, 2010.
- BURGER, E. Paracoccidioidomycosis protective immunity. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 2, p. 137, 2021.
- BARBOSA, M. O envolvimento do ferro na modulação da resposta imune em pacientes multibacilares da hanseníase. 2012.
- BAILÃO, E. F. L. C. *et al.* Hemoglobin uptake by Paracoccidioides spp. is receptor-mediated. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 5, p. e2856, 2014.
- BORGES, Montanari *et al.* Extracellular vesicles from virulent Paracoccidioides brasiliensis induce TLR4 and dectin-1 expression in innate cells and promote enhanced Th1/Th17 response. *Virulence*, v. 15, n. 1, p. 2329573, 2024. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21505594.2024.2329573>. Acesso em: 21 nov. 2024.
- CANTEROS, C. E. Paracoccidioidomycosis: chronicle of a neglected disease. **Medicina**, v. 78, n. 3, p. 180–184, 2018.
- CASANOVA, Jean-Laurent; MACMICKING, John D.; NATHAN, Carl F. Interferon- γ and infectious diseases: Lessons and prospects. *Science*, v. 384, n. 6693, p. ead12016, 2024. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.adl2016>. Acesso em: 21 nov. 2024.
- DE OLIVEIRA, L. B. Z. *et al.* Molecular phylogenetic analysis of Paracoccidioides species complex present in paracoccidioidomycosis patient tissue samples. **Microorganisms**, v. 11, n. 3, p. 562, 2023.
- DEL NEGRO, G. M. *et al.* The sensitivity, specificity and efficiency values of some serological tests used in the diagnosis of paracoccidioidomycosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 33, n. 4, p. 277–280, 1991.
- DE SOUZA, A. F. *et al.* Interacting with hemoglobin: Paracoccidioides spp. Recruits hsp30 on its cell surface for enhanced ability to use this iron source. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 1, p. 21, 2021.
- DE OLIVEIRA, H. C. *et al.* Paracoccidioides-host interaction: An overview on recent advances in the paracoccidioidomycosis. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1319, 2015.
- GRISOLIA, J. C. *et al.* Itraconazole and neutrophil interactions in the immune-inflammatory response of paracoccidioidomycosis using a murine air pouch infection model. **Life sciences**, v. 315, n. 121371, p. 121371, 2023.

GÓMEZ, B. L. *et al.* Use of monoclonal antibodies in diagnosis of paracoccidioidomycosis: new strategies for detection of circulating antigens. **Journal of clinical microbiology**, v. 35, n. 12, p. 3278–3283, 1997.

GÓES, A. M. DE *et al.* Paracoccidioidomycosis disease (Lutz-Splendore-Almeida): etiology, epidemiology, and pathogenesis. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 24, n. 1, p. 61–65, 2014.

GUEDES, A. C. **Papel das vesículas extracelulares produzidas por *P. brasiliensis* na homeostase de ferro.** [s.l.] Universidade de São Paulo. Agência de Bibliotecas e Coleções Digitais, 2024.

HAHN, R. C. *et al.* Paracoccidioidomycosis: Current status and future trends. **Clinical microbiology reviews**, v. 35, n. 4, p. e0023321, 2022.

HRYCYK, M. F. *et al.* Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*, *P. lutzii* and related species: infection in armadillos, soil occurrence and mycological aspects. **Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 56, n. 8, p. 950–962, 2018.

MONTANARI BORGES, B. *et al.* Extracellular vesicles from virulent *P. brasiliensis* induce TLR4 and dectin-1 expression in innate cells and promote enhanced Th1/Th17 response. **Virulence**, v. 15, n. 1, p. 2329573, 2024.

MANÇANO, A. S. F.; DELLA COLETTA, A. M. DIFICULDADE NO DIAGNÓSTICO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE. **Ensaio USF**, v. 5, n. 1, 2022.

MARTINEZ, R. New trends in paracoccidioidomycosis epidemiology. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 3, n. 1, 2017.

MARAZIOTI, A. *et al.* Cellular vesicles: New insights in engineering methods, interaction with cells and potential for brain targeting. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 370, n. 3, p. 772–785, 2019.

MARQUES-DA-SILVA, S. H. *et al.* Occurrence of *Paracoccidioides lutzii* in the Amazon region: description of two cases. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 87, n. 4, p. 710–714, 2012.

MEIRA, D. A. *et al.* The use of glucan as immunostimulant in the treatment of paracoccidioidomycosis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 55, n. 5, p. 496–503, 1996.

MOREJÓN, K. M. L.; MACHADO, A. A.; MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycosis in patients infected with and not infected with human immunodeficiency virus: a case-control study. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 80, n. 3, p. 359–366, 2009.

MINUCCI, S. B.; HEISE, R. L.; REYNOLDS, A. M. **Agent-based vs. equation-based multi-scale modeling for macrophage polarization.** 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1101/2022.06.20.496801>>

NOBREGA DE ALMEIDA, J., Jr *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for differentiation of the dimorphic fungal species *Paracoccidioides*

brasiliensis and *Paracoccidioides lutzii*. **Journal of clinical microbiology**, v. 53, n. 4, p. 1383–1386, 2015..

OLIVEIRA, F. C. S. *et al.* Differentially expressed proteins in the interaction of *Paracoccidioides lutzii* with human monocytes. **Revista iberoamericana de micologia**, v. 38, n. 4, p. 159–167, 2021.

PEÇANHA, P. M. *et al.* Paracoccidioidomycosis: What we know and what is new in epidemiology, diagnosis, and treatment. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 10, p. 1098, 2022.

PINZAN, C. F. *et al.* Immunological basis for the gender differences in murine *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **PloS one**, v. 5, n. 5, p. e10757, 2010.

PERES DA SILVA, R. *et al.* Comparison of the RNA Content of Extracellular Vesicles Derived from *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*. **Cells (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 7, p. 765, 2019.

PEDRIOLI, G. *et al.* Extracellular Vesicles as promising carriers in drug delivery: Considerations from a cell biologist's perspective. **Biology**, v. 10, n. 5, p. 376, 2021.

PAGLIARI, C. *et al.* Paracoccidioidomycosis: characterization of subpopulations of macrophages and cytokines in human mucosal lesions. **Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 57, n. 6, p. 757–763, 2019.

PARISE-FORTES, M. R. *et al.* Experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster: fungicidal activity and production of inflammatory cytokines by macrophages. **Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 38, n. 1, p. 51–60, 2000.

PINHEIRO, B. G. *et al.* Molecular tools for detection and identification of *Paracoccidioides* species: Current status and future perspectives. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 6, n. 4, p. 293, 2020.

SILVA, L. B. R. *et al.* Identification of potentially therapeutic immunogenic peptides from *Paracoccidioides lutzii* species. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 670992, 2021.

SILVA, Roberta Peres da *et al.* Comparison of the RNA content of extracellular vesicles derived from *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*. **Cells**, v. 8, n. 7, p. 765, 2019. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/35594>. Acesso em: 21 nov. 2024 [OBJ]

SHIKANAI-YASUDA, M. A. *et al.* Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 715–740, 2017.

TRINDADE, J. B. DE S. *et al.* Avanços e desafios no diagnóstico de paracoccidioidomicose causada pelo complexo de espécies da paracoccidioides: revisão integrativa. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 3, p. e13911326152, 2022.

TEIXEIRA, M. DE M. *et al.* *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. **Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 52, n. 1, p. 19–28, 2014.

TOMAZETT, M. V. *et al.* Identification and characterization of *Paracoccidioides lutzii* proteins interacting with macrophages. **Microbes and infection**, v. 21, n. 8–9, p. 401–411, 2019.

TEIXEIRA, M. M. *et al.* Paracoccidioides species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 10, p. e1004397, 2014.

TEIXEIRA, M. DE M. *et al.* Molecular and morphological data support the existence of a sexual cycle in species of the genus Paracoccidioides. **Eukaryotic cell**, v. 12, n. 3, p. 380–389, 2013.

VILLALBA, H. **Características microscópicas da paracoccidioidomicose bucal**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2021.

WANG, J.; BARR, M. M.; WEHMAN, A. M. Extracellular vesicles. **Genetics**, v. 227, n. 4, 2024.

ZACHARIAS, D. *et al.* A comparative histopathological, immunological, and biochemical study of experimental intravenous paracoccidioidomycosis induced in mice by three *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. **Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 24, n. 6, p. 445–454, 1986.