

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE BIOMEDICINA**

ANA PAULA MARTINS DE MELO

**PADRONIZAÇÃO DO ISOLAMENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE
Paracoccidioides brasiliensis E DO MODELO MURINO DE
PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

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): Ana Paula Martins de Melo

Título do trabalho: "Padronização do isolamento de vesículas extracelulares de *Paracoccidioides brasiliensis* e do modelo murino de Paracoccidioidomicose"

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 16:43, 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 **Ana Paula Martins De Melo, Discente**, em 08/12/2024, às 17:52, 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 **5005872** e o código CRC **A3D9575A**.

ANA PAULA MARTINS DE MELO

**PADRONIZAÇÃO DO ISOLAMENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE
Paracoccidioides brasiliensis E DO MODELO MURINO DE
PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Goiás (UFG), como requisito para obtenção do título de bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dra. Ludmila de Matos Baltazar

Co-orientadora: Dra. Olivia Basso Rocha

Goiânia

2024

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

Melo, Ana Paula Martins de
Padronização do isolamento de vesículas extracelulares de Paracoccidioides brasiliensis e do modelo murino de Paracoccidioidomicose [manuscrito] / Ana Paula Martins de Melo. - 2024.
LI, 51 f.: il.

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

1. . I. Baltazar, Ludmila de Matos, orient. II. Título.

CDU 61



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 “Padronização do isolamento de vesículas extracelulares de *Paracoccidioides brasiliensis* e do modelo murino de Paracoccidioidomicose” de autoria de Ana Paula Martins de Melo, 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: Dr. Evandro Leão Ribeiro - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/ UFG e especialista 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 **10,00**, 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 06/12/2024, às 16:39, 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 **Evandro Leao Ribeiro, Professor do Magistério Superior**, em 06/12/2024, às 17:09, 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 06/12/2024, às 17:24, 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 **5023024** e o código CRC **B2D09B23**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família, que sempre me deu todo o suporte necessário para que fosse possível concluir o curso. Que mesmo vindo de outra cidade, me apoiaram na escolha de estudar na UFG.

À universidade e corpo docente, que com dedicação e sabedoria, compartilharam ensinamentos e me inspiraram nesta jornada acadêmica.

A minha orientadora e co-orientadora, que trabalhando direta e indiretamente tornaram possível a conclusão deste trabalho. Agradeço pelas orientações e ensinamentos, todos foram muito valiosos e muitos deles levarei para a vida.

Agradeço à Camila, Emily Eloá e Samilly, que me acolheram no laboratório e sempre estiveram dispostas a repassar seus conhecimentos. Agradeço por todo o apoio, cumplicidade e momentos de descontração. Esse processo não seria o mesmo sem a amizade de vocês.

Agradecimento especial ao Gabriel, que foi crucial para a realização deste trabalho, e também por todos os ensinamentos, conversas e conselhos. Alguém que tem o dom de sempre deixar o ambiente mais leve e descontraído, obrigada por sempre conseguir tirar risadas mesmo em momentos caóticos.

As minhas melhores amigas, Mariana e Emily, que desde o ensino fundamental e médio estão ao meu lado na alegria e na tristeza, por todas as minhas fases e momentos, sendo minha base e suporte.

A minha melhor amiga, Brena Maria, que é uma verdadeira irmã mais velha nos conselhos e "puxões de orelha", que mesmo em outro estado sempre demonstrou todo seu apoio, quem acreditou mais em mim do que eu mesma.

Ao Patrick, que desde o início da graduação esteve presente na minha vida. As viagens diárias de Anápolis para Goiânia foram muito especiais porque estava ao meu lado. Agradeço por sempre demonstrar seu apoio, sua companhia, conselhos e por muitas vezes ser um suporte que não me deixou cair diante toda pressão e dificuldade.

Por fim, aos meus amigos Matheus e Marco Antônio, com quem compartilhei toda a graduação e convivi bastante nesse final de curso. O café da manhã e almoço no RU se tornaram muito especiais na companhia de vocês. O estágio ficou muito mais divertido porque estavam comigo, aliviando o cansaço apenas com as risadas, histórias e fofocas que compartilhamos.

"A ciência é mais que um corpo de conhecimento, é uma forma de pensar, uma forma cética de interrogar o universo, com pleno conhecimento da falibilidade humana."

- Carl Sagan

RESUMO

A Paracoccidioomicose é uma relevante micose sistêmica do Brasil, sendo fungos do gênero *Paracoccidioides* spp. os agentes etiológicos e a espécie *Paracoccidioides brasiliensis* a mais prevalente do país. A infecção ocorre pela inalação dos propágulos infectantes, que se estabelecem nos pulmões e desenvolvem sua forma parasitária. Para controlar a doença, além da atuação do sistema imune inato, a imunidade nutricional também é considerada um reforço relevante ao restringir a disponibilidade de diversos nutrientes, incluindo os metais, como o ferro, que é importante para as funções metabólicas do fungo. Consequentemente, o patógeno desenvolve estratégias a fim de contornar a limitação deste metal, sendo as vesículas extracelulares potenciais estruturas responsáveis pela transferência de fatores de virulência entre células do fungo. Logo, esse estudo objetiva padronizar métodos para isolar e caracterizar vesículas extracelulares produzidas por *P. brasiliensis*, além de também padronizar o modelo murino de infecção pelo fungo. Essas abordagens visam conduzir estudos futuros para entender como as vesículas extracelulares influenciam a patogenicidade da doença. Para isso, as células de *P. brasiliensis* foram cultivadas em meio mínimo modificado (MVM) sólido, em condições de privação e de suficiência de ferro, para posterior extração das vesículas, que tiveram o perfil analisado por Nanosight e a quantificação do conteúdo proteico realizado pelo método do ácido bicinconínico. Para o ensaio com modelo murino, 12 camundongos da linhagem Balb/c machos (CEUA 065/2022) foram infectados com 1×10^6 células de *P. brasiliensis* 18 por animal, seguido de eutanásia nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a infecção. Nos tempos determinados, foi obtido o lavado broncoalveolar (LAV) para análise do perfil de células recrutadas e os pulmões foram também removidos, macerados em tampão fosfato salino 1x (PBS) e cultivados em meio infusão cérebro-coração (BHI) suplementado para avaliar a carga fúngica. O ensaio demonstrou que não houve diferença estatisticamente relevante na caracterização das vesículas extracelulares e na quantificação de suas proteínas. Para o modelo murino, foi observado o aumento na contagem de leucócitos totais e um aumento da carga fúngica no tecido pulmonar, mesmo com presença de infiltrado inflamatório. Estes resultados indicam que a padronização do modelo murino seria um avanço importante para estudos futuros acerca da patogenicidade da doença e a utilização das vesículas extracelulares como mecanismo de virulência do fungo.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*; padronização; vesículas extracelulares; modelo murino; ferro.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis is an important systemic mycosis in Brazil, being the fungus of the genus *Paracoccidioides* spp. the etiological agents and *Paracoccidioides brasiliensis* species, the most prevalent in the country. The infection occurs through inhalation of infective propagules, which settle in the lungs and change the morphology to parasitic form. In addition to the action of the innate immune system, nutritional immunity is also considered a relevant reinforcement to control the disease by restricting the availability of several nutrients, including metals such as iron, which is important for the metabolic functions of the fungus. Consequently, the pathogen has developed strategies to circumvent the limitation of this metal, and extracellular vesicles are strategic structures that may be involved in the transference of virulence factors between fungal cells. Therefore, this study aims to standardize methods for isolating and characterizing extracellular vesicles produced by *P. brasiliensis* and to standardize a murine model of infection by the fungus. These approaches are to conduct future studies to understand how extracellular vesicles influence the pathogenicity of the disease. For this purpose, *P. brasiliensis* cells were cultured in solid modified minimal medium (MVM) under iron deprivation and sufficiency conditions for subsequent extraction of vesicles, which had their profile analyzed by Nanosight and the quantification of protein content was performed using the bicinchoninic acid method. For the assay with a murine model, 12 male Balb/c mice (CEUA 065/2022) were infected with 1×10^6 *P. brasiliensis* 18 cells per animal, followed by euthanasia at 24, 48 and 72 hours after infection. For the murine model assay, 12 male Balb/c mice (CEUA 065/2022) were infected with 1×10^6 *P. brasiliensis* 18 cells per animal, followed by euthanasia at 24, 48, and 72 hours after infection. At the determined times, bronchoalveolar lavage (BAL) was obtained to analyze the profile of recruited cells and the lungs were also removed, macerated in 1x phosphate-buffered saline (PBS), and cultured in supplemented brain-heart infusion (BHI) medium to assess the fungal load. The assay demonstrated that there was no statistically relevant difference in the characterization of the extracellular vesicles and in the quantification of their proteins. For the murine model, an increase in the total leukocyte count and an increase in the fungal load in the lung tissue were observed, even with the presence of inflammatory infiltrate. These results indicate that the standardization of the murine model would be an important advance for future studies on the pathogenicity of the disease and the use of extracellular vesicles as a mechanism of fungal virulence.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*; standardization; extracellular vesicles; murine model; iron.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Pacientes com a forma aguda/subaguda da PCM.....	12
Figura 2 - Pacientes com a forma crônica da PCM.....	13
Figura 3 - Formas micelial e leveduriforme de <i>P. brasiliensis</i> , respectivamente.....	15
Figura 4 - Colônias nas fases leveduriforme (A) e filamentosa (B) de <i>P. brasiliensis</i>	15
Figura 5: Caracterização de vesículas extracelulares (VEs) de <i>P. brasiliensis</i> cultivadas em condições de suficiência de ferro (Fe) e restrição de ferro com BPS.....	25
Figura 6: Gráficos representativos do perfil de VEs de <i>P. brasiliensis</i> analisados pelo NanoSight.....	25
Figura 7 - Concentração de proteínas das VEs cultivadas em meio MVM com ferro (Fe) e com quelante de ferro (BPS).....	27
Figura 8 - Contagem total de leucócitos no LAV obtidos de camundongos Balb/c infectados por <i>P. brasiliensis</i>	28
Figura 9: Contagem de neutrófilos no LAV obtido de camundongos infectados por <i>P.</i> <i>brasiliensis</i>	29
Figura 10: Contagem de leucócitos mononucleares no LAV obtido de camundongos infectados por <i>P. brasiliensis</i>	30
Figura 11: Carga fúngica do tecido pulmonar em escala logarítmica em quantidade média de unidades formadoras de colônia (UFC) de <i>P. brasiliensis</i> por grama de tecido pulmonar (log UFC/g), avaliada em 24, 48 e 72 horas.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média da absorvância de proteínas das VEs ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$).....	26
Tabela 2 – Contagem de leucócitos presentes no LAV após infecção por <i>P. brasiliensis</i>	28
Tabela 3 – Carga fúngica pulmonar (UFC/g de tecido pulmonar).....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCA	Ácido bicinconínico
BHI	Infusão Cérebro-Coração (<i>Brain-Heart Infusion</i>)
BPS	Ácido batofenantrolina dissulfônico
BSA	Albumina sérica bovina
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CMPEA	Centro Multiusuário de Pesquisa e Experimentação Animal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
Fe	Ferro
GXM	Glucuronoxilomanana
IL	Interleucina
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
LAV	Lavado broncoalveolar
MVM	Meio mínimo
NI	Não infectados
NTA	Análise de Rastreamento de Nanopartículas
<i>P. brasiliensis</i>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PBS	Tampão fosfato-salino
PCM	Paracoccidioidomicose
RPM	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino
TGF- β	Fator de crescimento transformador β
UFC	Unidade formadora de colônia
UFG	Universidade Federal de Goiás
VEs	Vesículas extracelulares

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 Aspectos gerais dos fungos	10
1.2 Paracoccidioidomicose e sua relevância clínica	11
1.3 Agente etiológico	14
1.4 Resposta imune e o ferro	16
1.5 Vesículas Extracelulares	17
2 JUSTIFICATIVA	19
3 OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo Geral	20
3.2 Objetivos Específicos	20
4 METODOLOGIA	21
4.1 Subcultivos para viabilidade do fungo	21
4.2 Isolamento e extração das VEs de <i>P. brasiliensis</i>	21
4.3 Caracterização das VEs por NanoSight	22
4.4 Quantificação de proteínas das VEs por Ensaio de Ácido Bicinconínico	22
4.4 Microrganismos, camundongos e local	22
4.4.1 Modelo <i>in vivo</i>	22
4.4.2 Infecção dos camundongos	23
4.4.3 Eutanásia e coleta das amostras	23
4.4.4 Análise do perfil inflamatório	23
4.4.5 Determinação da carga fúngica pulmonar	24
4.5. Análises estatísticas	24
4.6 Comitê de Ética	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1. Padronização da obtenção de VEs de <i>P. brasiliensis</i>	25
5.1.1 Caracterização das VEs	25
5.1.2 Quantificação de proteínas com ácido bicinconínico	26
5.2 Padronização de modelo murino de infecção por <i>P. brasiliensis</i>	27

5.2.1 Perfil inflamatório	27
5.2.2 Carga fúngica no tecido pulmonar	31
6 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
ANEXO - PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA DO PROTOCOLO N. 065/22	39

1 INTRODUÇÃO

Fungos termodimórficos do gênero *Paracoccidioides* spp. são os causadores de uma importante micose sistêmica do Brasil, a Paracoccidioidomicose (PCM). A doença é restrita à América Latina e desperta preocupações de saúde pública em áreas rurais, uma vez que o desenvolvimento saprofítico desses fungos no solo coloca em risco os profissionais que realizam atividades relacionadas ao manejo dessas áreas, como terraplenagem e agricultura (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2018).

Infelizmente, a doença não é considerada de notificação compulsória, sendo dessa forma impreciso os dados referentes a sua incidência e prevalência no país. Com isso, a PCM faz parte do grupo de doenças tropicais negligenciadas, afetando principalmente trabalhadores rurais todos os anos (Hahn *et al.*, 2022).

Um dos principais agentes etiológicos da doença é o fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*), que consiste em um complexo de grupos filogenéticos provenientes de diferentes regiões da América Latina, e no Brasil ocorre em algumas regiões, especialmente no sul e sudeste (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2018).

A infecção ocorre por meio da inalação dos conídios provenientes do ambiente que, uma vez instalados nos pulmões do hospedeiro, sofrem alteração morfológica para a forma leveduriforme em resposta ao dimorfismo térmico, estabelecendo sua fase parasitária, podendo se disseminar e alojar-se em outros locais, como mucosas, linfonodos e pele (Fortes *et al.*, 2011).

O controle da doença consiste principalmente na atuação de macrófagos que, além de atuar diretamente no controle da doença realizando a fagocitose do microrganismo, também produzem citocinas capazes de induzir a morte do fungo (Hahn *et al.*, 2022). Além disso, a imunidade nutricional também é considerada um reforço relevante exercendo a tarefa de restringir a disponibilidade de nutrientes e metais, dentre eles o ferro, o que afeta a sobrevivência do microrganismo por este ser um importante metal para suas funções metabólicas (Souza *et al.*, 2022).

Para superar essa limitação, o patógeno desenvolve estratégias para poder adquirir esse nutriente do hospedeiro, como a produção e captação por sideróforos, a via redutiva de assimilação de ferro e o aproveitamento de proteínas contendo ferro, como a hemoglobina. Ademais, os referidos autores afirmam que essa privação do ferro estimula um aumento da expressão de proteínas que contribuem para sua virulência (Souza *et al.*, 2020).

Outrossim, as vesículas extracelulares (VEs) também podem favorecer a virulência do microrganismo. Estas estruturas, presentes em uma ampla variedade de organismos procariotos e eucariotos, atuam no transporte de diferentes moléculas (Vallejo *et al.*, 2012), o que pode contribuir para a adaptação e sobrevivência desse patógeno no hospedeiro. No entanto, aspectos relacionados a essas estruturas ainda precisam ser esclarecidos, como o impacto e relevância da diversidade de tamanho e concentrações das VEs, e como essas questões são influenciadas por fatores externos, como as condições de crescimento (Rizzo; Rodrigues; Janbon, 2020)

Dessa forma, é pertinente desenvolver um método de padronização para a caracterização dessas vesículas extracelulares, considerando como as condições de restrição de ferro, importante metal para as funções metabólicas do fungo, impactam em sua relação com o hospedeiro.

1.1 Aspectos gerais dos fungos

Fungos são microrganismos eucariontes aclorofilados e destituídos de celulose, sendo incapazes de realizar fotossíntese, o que caracteriza sua natureza heterotrófica. Sua estrutura morfológica pode se apresentar como uma única célula (unicelular), que caracteriza a levedura, ou múltiplas células (multicelular). Nesse último caso, as células formam uma rede de filamentos conhecida como micélio ou hifas (Moraes; Leite; Goulart; 2008).

Sendo presentes em toda a natureza, a maioria destes organismos é considerada saprófita, desempenhando um papel importante no ecossistema ao contribuir para a degradação de matéria orgânica e para a ciclagem de nutrientes. Porém, esses organismos também podem desenvolver relações mutualísticas com outros indivíduos, onde se estabelece uma associação em que ambos são beneficiados, ou de comensais, em que o fungo é beneficiado sem causar danos ao outro organismo envolvido (Moraes; Leite; Goulart; 2008).

Em contrapartida, a capacidade de uma parcela dos fungos em atuarem como parasitas em animais, extraindo nutrientes e causando danos de gravidade variável aos seus hospedeiros, é um fenômeno de enorme relevância em contextos clínicos (Moraes; Leite; Goulart; 2008). Mesmo tendo enorme impacto na saúde humana, as doenças de origem fúngica são continuamente negligenciadas. Aproximadamente

1,5 bilhão de pessoas em todo o mundo sofrem de infecções fúngicas e mais de um milhão vão a óbito anualmente (Rizzo *et al.*, 2023).

Nesse sentido, a micologia médica atua com foco no estudo desses microrganismos fúngicos de importância para a saúde tanto humana quanto animal. A patogenicidade desses organismos depende da sua virulência e da defesa imunológica do hospedeiro, sendo que indivíduos com o sistema imune comprometido são mais propensos a desenvolver a infecção (Mezzari; Fuentefria, 2012). Sendo assim, um exemplo notável dessa relação parasitária é a Paracoccidioidomicose, uma importante micose sistêmica que afeta principalmente o Brasil (Nogueira; Andrade, 2014).

1.2 Paracoccidioidomicose e sua relevância clínica

A PCM é uma micose sistêmica de característica granulomatosa, onde as lesões podem se localizar em diferentes regiões do organismo (Moraes; Leite; Goulart; 2008). A grande maioria dos pacientes contraem a doença no Brasil, com prevalência nas regiões centro-oeste, sudeste e sul, sendo o restante proveniente de outros países da América Latina, como Argentina, Colômbia e Venezuela (Palmeiro; Cherubini; Yurgel, 2005).

Foi relatada pela primeira vez em 1908 por Adolpho Lutz, na cidade de São Paulo, Brasil (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2018). No início, pensava-se que a doença era causada pelo mesmo agente etiológico da blastomicose e, portanto, recebeu o nome de blastomicose sul-americana. Porém, com os avanços nos estudos moleculares e filogenéticos notou-se que não havia relação entre os agentes etiológicos de ambas patologias e o termo se tornou impróprio (Mezzari; Fuentefria, 2012).

A doença acomete em sua maioria trabalhadores rurais que realizam o manejo do solo contaminado com o fungo (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2018). A infecção geralmente acontece na primeira ou segunda década de vida, onde o fungo pode permanecer em latência por um longo período e, se houver algum desequilíbrio na relação parasito-hospedeiro, as manifestações clínicas começam a surgir. Diante disso, apesar do primeiro contato ocorrer em indivíduos jovens, o desenvolvimento da doença é mais comumente observado em pessoas adultas (Palmeiro; Cherubini; Yurgel, 2005).

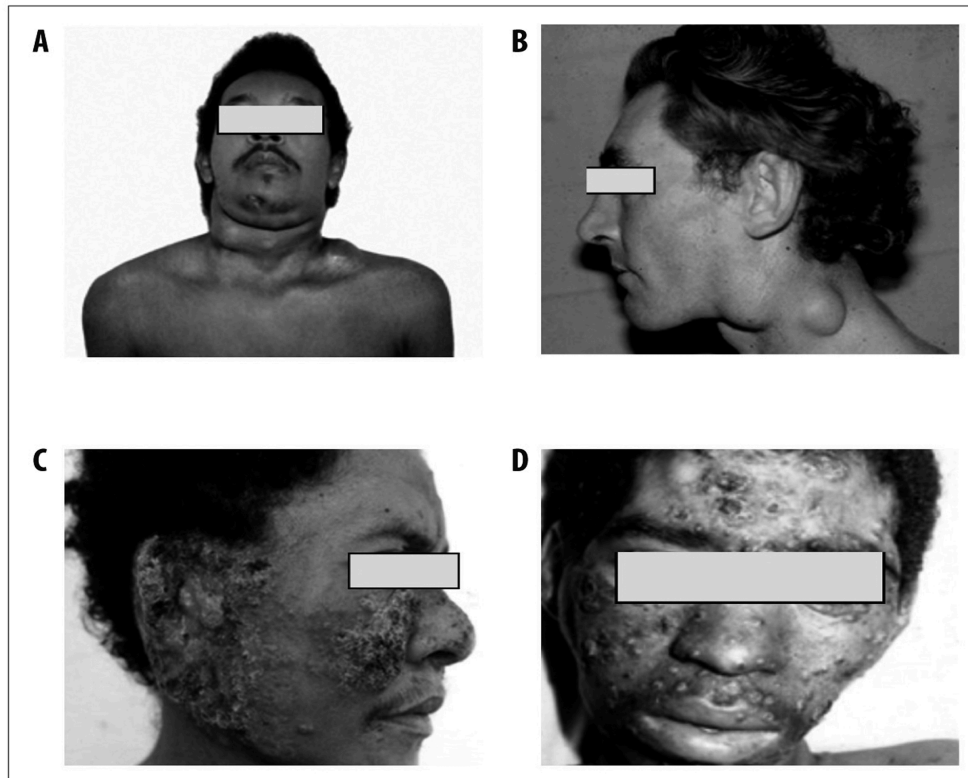
Usualmente, trabalhadores rurais apresentam uma realidade de baixo nível socioeconômico, tendendo a apresentar maiores índices de desnutrição, além de

desenvolverem hábitos como tabagismo e etilismo. Tais fatores são vistos como condições de risco, afetando negativamente o sistema imune, desempenhando um importante papel na progressão da infecção para a doença ativa (Fortes *et al.*, 2011).

A patologia se manifesta tanto na forma aguda/subaguda, acometendo crianças e jovens de até trinta anos em ambos os sexos, como também na forma crônica ou forma “adulta”, que acomete em sua maioria homens acima dos trinta anos de idade, sendo esta a responsável por cerca de 80 a 95% dos casos (Palmeiro; Cherubini; Yurgel, 2005).

A forma aguda/subaguda, também chamada de “forma juvenil” (Figura 1), possui uma evolução com rápida progressão a órgãos e sistemas, caracterizada pela presença de linfadenomegalia (A e B) e lesões cutâneas (C e D), além de manifestações no trato digestório. Já em relação à forma crônica (Figura 2), a doença evolui de maneira mais lenta, acometendo os pulmões, mucosas do trato aerodigestivo superior (A e B) e pele (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2018).

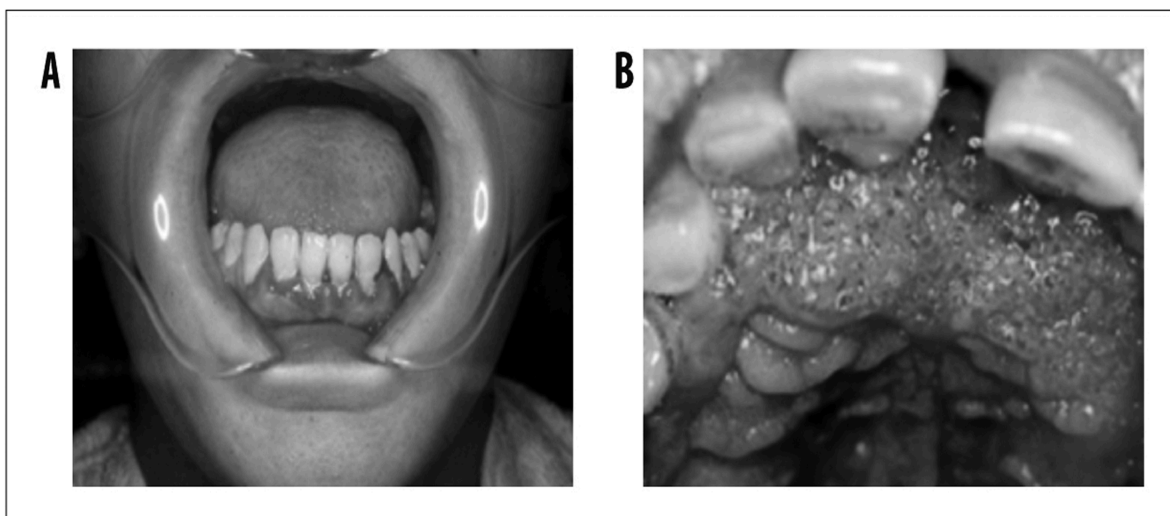
Figura 1 - Pacientes com a forma aguda/subaguda da PCM



Fonte: Adaptado de Shikanai-Yasuda *et al.* (2018).

Notas: Massas ganglionares em região supraclavicular, cervical e submandibular (A); Linfadenomegalia (B); Lesões ulceradas de aspecto verruciforme em face e pavilhão (C); Lesões de aspecto papulonodular e ulceradas (D).

Figura 2 - Pacientes com a forma crônica da PCM



Fonte: Shikanai-Yasuda *et al.* (2018).

Notas: Gengivoestomatite (A); Estomatite moriforme de Aguiar Pupo (B).

Segundo Martínez (2017), embora mulheres também sejam acometidas pelo fungo, elas são menos propensas a desenvolver a doença, uma vez que a presença de hormônios estrógenos inibem a conversão dos conídios para a forma de levedura (fase parasitária), crucial para o desenvolvimento da doença. Já em indivíduos mais jovens, por não possuírem níveis elevados desse hormônio, ambos os sexos são afetados igualmente. Essa inibição é feita pela ação do 17-beta-estradiol e dietilestilbestrol, que realizam o bloqueio da síntese de proteínas expressas na conversão de filamento para levedura, assim, intervindo na patogenicidade do fungo (Mezzari; Fuentefria, 2012).

O tratamento da doença consiste, basicamente, no uso de três medicamentos principais, sendo eles o itraconazol, o cotrimoxazol e a anfotericina B. O itraconazol é o mais recomendado para formas leves a moderadas da doença, enquanto o cotrimoxazol é o segundo mais indicado para a mesma condição. Para formas mais graves e disseminadas, a anfotericina B é a mais utilizada. A problemática desse tratamento é o risco de sequelas a longo prazo. A anfotericina B, por exemplo, é um potencial agente nefrotóxico, devendo ser evitada em pacientes que apresentam quadros como insuficiência renal (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2018).

O diagnóstico da PCM é clínico e laboratorial. A confirmação laboratorial a partir da presença do fungo em amostras biológicas como escarros, lesões cutâneas e aspirado ganglionar, é altamente eficaz. Em contrapartida, os exames sorológicos

são importantes para auxiliar no diagnóstico, além de avaliar recaídas da doença e resposta às formas terapêuticas utilizadas (Wanke; Aidê, 2009).

1.3 Agente etiológico

O gênero *Paracoccidioides* pertence ao Filo Ascomycota, Classe Euromycetes, Ordem Onygenales e Família Ajellomycetaceae (Onygenaceae) (Bagagli *et al.*, 2008; Hahn *et al.*, 2022). Por longos anos, pensava-se que *Paracoccidioides* era um táxon monotípico, sendo representado por *P. brasiliensis*. Porém, com avanços nos estudos moleculares, novas espécies foram identificadas e, dessa forma, houve inclusão destas ao gênero *Paracoccidioides*, sendo propostos cinco agrupamentos filogenéticos: S1a, S1b, PS2, PS3 e PS4. Com isso, foi denominado que o agrupamento S1 é representado por *P. brasiliensis sensu stricto*, PS2 por *P. americana*, PS3 por *P. restrepiensis* e PS4 por *P. venezuelensis*. Atualmente, *P. brasiliensis* é considerado um dos principais agentes responsáveis pela Paracoccidioidomicose (Hahn *et al.*, 2022).

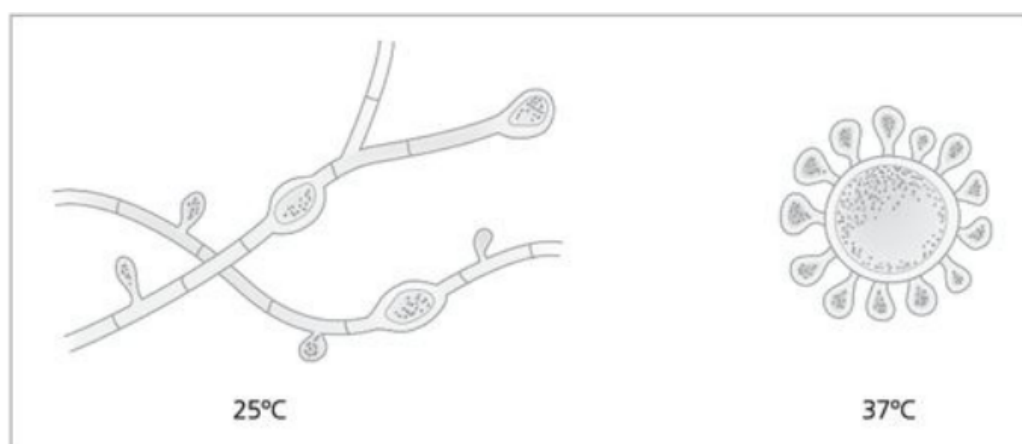
Sendo mais comum na América do Sul, *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo sapróbio, que apresenta reprodução assexuada e dimorfismo térmico, ou seja, pode apresentar a forma micelial ou leveduriforme a depender da temperatura (Palmeiro; Cherubini; Yurgel, 2005). Dessa forma, se desenvolve sob a forma de micélio na temperatura de 25 a 30°C e de levedura entre 35 e 37°C, sendo estas as formas infectantes e parasitárias, respectivamente (Mezzari; Fuentesfria, 2012). Durante essa fase de transição, há a expressão de genes e síntese de novas proteínas importantes na morfogênese para a sobrevivência do fungo no hospedeiro e conferir virulência e patogenicidade (Santos *et al.*, 2012).

Nesse sentido, a infecção por *P. brasiliensis* ocorre pela inalação dos conídios infectantes que se depositam nos alvéolos pulmonares, realizando a transição para levedura ao sofrerem as alterações de temperatura do ambiente para o organismo do hospedeiro, assim, estabelecendo sua forma parasitária (Borges-Walmsley *et al.*, 2002). Ademais, a infecção pode se disseminar por via hematogênica ou linfática acometendo outros locais, como mucosas, linfonodos, pele, fígado, baço, ossos e medula óssea (Fortes *et al.*, 2011).

A transição morfológica pode ser observada em laboratório. De acordo com Mezzari e Fuentesfria (2012), sob a temperatura de aproximadamente 25°C há o desenvolvimento da forma filamentosa, com hifas septadas e artroconídios e

clamidoconídios, enquanto que na forma de levedura há células (brotos) ligadas às células-mãe (Figura 3). Já em relação às características macroscópicas, os autores afirmam que a colônia da forma filamentosa apresenta coloração branca ou creme possuindo pregas e dobras, com aspecto de pipoca estourada. Enquanto que, ao incubar na temperatura de 37°C no meio ágar infusão cérebro-coração (BHI), as colônias leveduriformes apresentam coloração creme e aspecto cerebriforme (Figura 4).

Figura 3 - Formas micelial e leveduriforme de *P. brasiliensis*, respectivamente



Fonte: Mezzari e Fuentefria (2012).

Figura 4 - Colônias nas fases leveduriforme (A) e filamentosa (B) de *P. brasiliensis*



Fonte: Santos (s.d).

Fortes *et al.* (2011), destacam a importância da imunidade inata na ação contra o fungo, onde monócitos, macrófagos, neutrófilos e células assassinas

naturais (*natural killer*) desempenham um papel eficiente conferindo resistência ao hospedeiro. Nesse sentido, a capacidade do hospedeiro em desenvolver uma resposta imunológica eficaz é crucial para determinar a gravidade da doença.

1.4 Resposta imune e o ferro

A resposta imune contra patógenos, como fungos, envolve basicamente a resposta imune inata e a adaptativa. A resposta inata atua sendo a primeira linha de defesa contra microrganismos invasores, onde células dendríticas, células assassinas naturais, fagócitos, dentre outros componentes, são ativados e atuam no local da inflamação. Em contrapartida, a resposta adaptativa é caracterizada pela pré-exposição ao agente infeccioso, possuindo especificidade e a habilidade de construir respostas mais efetivas a cada exposição. As principais células que compõem esse mecanismo são linfócitos T (TCD4+ e TCD8+) e linfócitos B (produtores de anticorpos), além de células efectoras e células apresentadoras de antígenos (Abbas; Lichtman; Pillai, 2015).

Na PCM, a resposta imune relacionada à forma controlada da doença, sem manifestações clínicas, consiste em uma resposta do tipo Th1, que envolve ativação de efetores tanto da resposta adaptativa como da resposta inata, como ativação do subconjunto celular de linfócitos TCD4+ e TCD8+ e macrófagos, principalmente, controlando a proliferação do patógeno. Formas mais brandas da PCM apresentam formação de granulomas com prevalência de neutrófilos atuando na fagocitose do patógeno, controlando a doença. Já em formas mais graves, a resposta do tipo Th2 é mais comum, havendo a produção de citocinas como IL-4, IL-5, IL-10 e fator de crescimento transformador β (TGF- β), além da ativação de linfócitos B para a produção de anticorpos, que contribuem para a formação de granulomas frouxos levando à perda do controle da patologia (Hahn *et al.*, 2022).

Em modelos experimentais, Kashino *et al.* (1995) demonstraram que macrófagos são essenciais para o controle da doença, uma vez que ao bloquear a função dessas células observou-se um agravamento da doença, evidenciado pelo aumento da mortalidade e lesões disseminadas nos camundongos.

Outrossim, o hospedeiro também emprega outro mecanismo desempenhado pela defesa inata, denominado imunidade nutricional, que se baseia em restringir a disponibilidade de nutrientes a fim de afetar a sobrevivência do microrganismo (Souza *et al.*, 2022). Na infecção por PCM, em que o organismo parasitado

estabelece a privação de diversos nutrientes e metais, incluindo o ferro, um importante metal para as funções metabólicas do fungo, o principal responsável a realizar este controle é o hormônio hepcidina produzido no fígado, que age degradando uma proteína responsável pela liberação deste metal das células, a ferroportina, conseguindo dessa forma refrear a quantidade de ferro liberada no organismo (Marchetti *et al.*, 2020).

No entanto, patógenos como *P. brasiliensis*, desenvolveram estratégias de modo a contornar essa limitação imposta pelo hospedeiro, como adotar vias redutivas de ferro férrico (Fe^{3+}) para ferro ferroso (Fe^{2+}) e produção de sideróforos para a obtenção do metal das células (Silva *et al.*, 2020). Os sideróforos possuem grande afinidade ao ferro férrico e, assim, os adquirem de proteínas como a transferrina e o transportam para o espaço intracelular do fungo (Marchetti *et al.*, 2020). Além disso, o patógeno também realiza a captação de hemoglobina através do receptor Rbt5, o que pode ser considerado outra maneira do fungo contornar os baixos níveis de ferro (Camacho; Niño-Vega, 2017).

Segundo Parente *et al.* (2011), tal como o desenvolvimento de mecanismos para captação de ferro, o fungo também ajusta seu metabolismo para sobreviver ao ambiente de restrição desse metal. Assim, estudar o papel da deficiência deste importante nutriente é essencial para a compreensão do comportamento do fungo nesta condição de estresse e como isso influencia na resposta do hospedeiro.

1.5 Vesículas Extracelulares

As vesículas extracelulares (VEs), de um modo geral, são partículas derivadas da membrana fosfolipídica de diferentes tipos de célula e atingem o espaço extracelular, podendo apresentar formas e tamanhos variados (Rizzo *et al.*, 2023). Elas podem atuar em diversos processos no organismo, tanto fisiológicos, como imunidade inata e coagulação sanguínea, quanto em processos patológicos, como câncer e doenças neurodegenerativas (Xu *et al.*, 2018). Essas estruturas podem transportar diversas moléculas, como proteínas e lipídios. Por meio das VEs, essas moléculas podem ser trocadas entre células, servindo como um meio de comunicação intercelular (Rizzo; Rodrigues; Janbon, 2020).

Em fungos, essas estruturas foram isoladas em poucos gêneros, incluindo *Paracoccidioides*, *Histoplasma*, *Candida* e *Cryptococcus* (Rizzo; Rodrigues; Janbon, 2020). Os primeiros estudos sugerindo a existência de VEs fúngicas ocorreram na

década de 1970. Porém, apenas em 2006 essas estruturas foram descritas em fungos em um estudo realizado por Rodrigues *et al.* com *Cryptococcus neoformans*.

Em seu estudo, Rodrigues *et al.* (2006) conseguiram demonstrar a presença de glucuronoxilomanana (GXM) nas VEs de *C. neoformans*, que é um componente essencial da cápsula do fungo. Esse composto é sintetizado no espaço intracelular e transportado para o ambiente extracelular através das VEs, que é essencial para formação da cápsula e, conseqüentemente, para a virulência do fungo. Ademais, por meio de análises microscópicas, foi notado a presença dessas estruturas tanto em células encapsuladas quanto em células sem cápsula, sugerindo que as vesículas podem transportar diferentes compostos, o que pode influenciar na resposta imune do hospedeiro. Ademais, Bielska *et al.* (2018) apontam em seus estudos a participação de VEs no perfil de virulência de *Cryptococcus gattii*. Aparentemente, vesículas extracelulares liberadas pelo fungo são internalizadas por macrófagos previamente ativados, modulando a sobrevivência e proliferação do fungo dentro dos fagossomos.

Para o gênero *Paracoccidioides*, Silva *et al.* (2015) estudaram os componentes das VEs que modulam sua virulência, identificando polissacarídeos, glicoproteínas e epítomos de carboidratos reconhecidos por receptores DC-SIGN. A análise da composição de carboidratos revelou que os principais achados são glicose, manose e galactose, além de polissacarídeos como galactofuranosilmanana. Dessa forma, todos estes componentes podem atuar de forma crucial na virulência do *P. brasiliensis* e na sua capacidade de evadir a defesa imune, modulando sua interação com o sistema imunológico do hospedeiro. Com isso, entender os mecanismos relacionados às VEs é de suma importância para elucidar seu papel na transferência de fatores de virulência do fungo.

2 JUSTIFICATIVA

A PCM é uma importante infecção fúngica sistêmica no Brasil, que afeta principalmente trabalhadores rurais. O diagnóstico tardio, que afeta especialmente a parcela da população com situações socioeconômicas precárias e de difícil acesso à assistência médica, pode cooperar para o agravamento da patologia e para a ocorrência de sequelas.

Embora haja progresso nos estudos acerca da patogenicidade do fungo, muitos aspectos relacionados a sua virulência ainda continuam pouco esclarecidos. Nesse contexto, as vesículas extracelulares têm se destacado como potenciais mediadores na transferência de fatores de virulência entre as células do fungo e potencialmente envolvidas com a transferência de informações durante a infecção. Ainda, pouco se sabe sobre fatores externos, como disponibilidade de nutrientes como o ferro, que poderiam influenciar a produção e liberação de vesículas por fungos. Consoante a isso, ressalta-se a relevância da padronização de modelo murino da PCM por *P. brasiliensis* para estudos dos mecanismos de patogenicidade do fungo e de fatores relacionados às interações fungo-hospedeiro.

Diante do exposto, esse trabalho se justifica por elaborar metodologias para padronização da obtenção das VEs de *P. brasiliensis* após cultivo em meio com suficiência e privação de ferro e também para padronizar o modelo murino de infecção por *P. brasiliensis*. Essas padronizações são necessárias para futuros estudos de interação *P. brasiliensis*-hospedeiro e do papel das VEs no curso da infecção em modelo murino.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Padronizar o isolamento de VEs de *Paracoccidioides brasiliensis* e o modelo murino da PCM por *P. brasiliensis*.

3.2 Objetivos Específicos

- Isolar as VEs liberadas pelo fungo *P. brasiliensis* após cultivo do fungo em condições de privação e de suficiência de ferro;
- Caracterizar as VEs liberadas pelo fungo *P. brasiliensis* após cultivo do fungo em condições de privação e suficiência de ferro;
- Analisar o perfil inflamatório do lavado broncoalveolar (LAV) após a infecção por *P. brasiliensis*.
- Avaliar a carga fúngica do pulmão após a infecção por *P. brasiliensis*.

4 METODOLOGIA

4.1 Subcultivos para viabilidade do fungo

O fungo *P. brasiliensis* 18 foi mantido em ágar Infusão Cérebro-Coração (*Brain-Heart Infusion Agar*, BHI) acrescido de glicose 4%, incubado a 36 °C para manter a fase leveduriforme. Foram feitos subcultivos semanais para garantir a manutenção da viabilidade do fungo. Esses procedimentos foram realizados no laboratório de Micologia, no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG).

4.2 Isolamento e extração das VEs de *P. brasiliensis*

As VEs produzidas pelo fungo *P. brasiliensis* foram isoladas seguindo o protocolo descrito por Reis *et al.*, 2019, sendo feitas algumas adaptações e execução em quadruplicata. Primeiramente, utilizou-se uma alça de platina calibrada em 10 µL para inocular o fungo em 100 mL de meio BHI líquido, que foi incubado por 48 horas a 36 °C. Após esse período, o volume foi dividido em dois tubos de 50 mL esterilizados e centrifugado por 10 minutos a 3500 RPM, o sobrenadante foi descartado e realizado uma nova centrifugação com a adição de 50 mL de tampão fosfato-salino 1x (PBS). O *pellet* foi ressuscitado em 50 mL de MVM líquido com suficiência de ferro (suplementado com 3,5 µM de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$) e privação do mesmo utilizando o agente quelante ácido batofenantrolina dissulfônico (BPS, 10 µM), sendo incubados por 24h a 36 °C.

Em seguida, o volume foi transferido para tubos de 50 mL esterilizados e centrifugado por 10 minutos a 3500 RPM e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuscitado em 3 mL de PBS 1x livre de metais e após contagem foi inoculado em concentração de 1×10^6 cels/mL em meio MVM sólido com suficiência e privação de ferro, sendo incubados por 7 dias em estufa a 36 °C.

Após o período de cultivo, as células de cada placa foram lavadas com 7 mL de PBS 1x filtrado (filtro 0,22 µm), sendo raspadas cuidadosamente com auxílio do rodinho por toda a superfície do meio a fim de retirar as células aderidas. As suspensões resultantes foram transferidas para tubos de 50 mL esterilizados destinados a cada condição de cultivo do fungo. As amostras foram centrifugadas a 15000 RPM por 20 minutos, o sobrenadante foi recolhido, este processo foi realizado 3 vezes. O sobrenadante recuperado foi filtrado em filtro 0,45 µm.

Posteriormente, os sobrenadantes foram transferidos para os tubos de ultracentrifugação e submetidos a uma rotação de 100.000 g por 1 hora a 4 °C para a sedimentação das VEs. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi ressuspensionado em 1 mL de PBS 1x filtrado e foram ultracentrifugados novamente nas mesmas condições. Em seguida, é feito o descarte do sobrenadante e a ressuspensão em 100 µL de PBS 1x, que são transferidos para eppendorfs esterilizados e armazenados a - 20 °C.

4.3 Caracterização das VEs por NanoSight

A caracterização foi feita utilizando o sistema NanoSight, que emprega a técnica de Análise de Rastreamento de Nanopartículas, em inglês sendo *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA), para determinar a concentração e o tamanho das vesículas.

4.4 Quantificação de proteínas das VEs por Ensaio de Ácido Bicinconínico

Para a quantificação de proteínas das VEs foi realizado o método ácido bicinconínico (BCA), sendo o teste realizado em duplicata. O reagente de trabalho foi preparado utilizando ácido bicinconínico e sulfato de cobre (CuSO₄) de acordo com o fabricante (Sigma-Aldrich). Para iniciar o ensaio, foi feita uma solução de 30 µL de albumina bovina sérica (BSA) e 30 µL de PBS 1x para montar a curva de calibração. A quantificação foi feita utilizando 4 µL de cada amostra e 196 µL do reagente de trabalho sendo lida em espectrofotometria por uma leitora de 96 placas em comprimento de onda de 560 nm. A quantificação das proteínas foi obtida com o valor referente à média simples da absorbância das duplicatas, sendo expressa em µg/µL.

4.4 Microrganismos, camundongos e local

4.4.1 Modelo *in vivo*

Para as análises *in vivo* foram utilizados 12 camundongos da linhagem Balb/c, machos, com idades entre 6 e 8 semanas e peso médio entre 20 e 25 gramas. Todos os animais foram mantidos e manipulados no Centro Multiusuário de Pesquisa e Experimentação Animal (CMPEA) do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP/UFG). Os camundongos foram mantidos em microisoladores contendo maravalha autoclavada, sob temperatura de 23 °C e sendo submetidos a

ciclos de 12 horas de claro e escuro (12h claro/12h escuro). Eles tiveram livre acesso à água e ração balanceada (*ad libitum*).

4.4.2 Infecção dos camundongos

Para realização da infecção, os camundongos primeiramente foram anestesiados com um coquetel de Cetamina (80 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg), administrado via intraperitoneal, sendo a dose ajustada de acordo com o peso corporal de cada animal. A infecção foi feita por via intratraqueal, onde foi realizado um corte na região ventral do pescoço para expor a traqueia e fazer uma inoculação direta, onde cada animal recebeu 30 µL de uma suspensão contendo 1×10^6 céls/camundongo de leveduras de *P. brasiliensis*.

4.4.3 Eutanásia e coleta das amostras

Os camundongos foram eutanasiados por exposição a CO₂, enquanto permaneciam nos microisoladores, seguindo as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), nos tempos determinados de 24, 48 e 72 horas após a infecção. Após o óbito, foi obtido o lavado broncoalveolar através da introdução de 2 mL de PBS 1x esterilizado na traquéia dos camundongos, com o auxílio de uma cânula flexível de 20 G, sendo o fluido cuidadosamente aspirado e armazenado.

Posteriormente, foi realizada laparotomia para expor a cavidade torácica e obter os pulmões que foram primeiramente pesados, seguido de maceração, com auxílio do êmbolo de seringa de 10 ml, após a adição de PBS 1x.

4.4.4 Análise do perfil inflamatório

Para a análise do perfil leucocitário do lavado broncoalveolar (LAV) foram contabilizados leucócitos totais, mononucleares (monócitos e macrófagos) e neutrófilos (polimorfonucleares). Inicialmente, as amostras de LAV foram submetidas a uma centrifugação a 1200 RPM por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular ressuscitado em 100 µL de BSA 3%. Com essa suspensão, foi realizada a contagem dos leucócitos totais de cada amostra em microscopia óptica utilizando câmara de Neubauer.

Em seguida, foi feita a contagem diferencial. Para isso, foi feita uma alíquota com 10 µL de cada suspensão de células e 90 µL de BSA 3%, e as amostras

centrifugadas utilizando centrífuga Cytospin (citocentrífuga), em uma rotação de 1000 RPM durante 5 minutos, formando uma camada fina de células em lâminas de vidro, que foram coradas pelo método Panótico Rápido. As lâminas foram analisadas por microscopia óptica, sendo contadas um total de 100 células, diferenciando mononucleares e polimorfonucleares/ neutrófilos.

4.4.5 Determinação da carga fúngica pulmonar

Para avaliar a carga fúngica, 500 µL do macerado do pulmão foi plaqueado em meio BHI sólido suplementado com Soro fetal bovino (SFB) a 4%, glicose a 4% e gentamicina na concentração de 40 µg/mL e incubados a 36 °C por 7 a 20 dias. As colônias foram contadas manualmente e a carga fúngica foi expressa por grama de pulmão, que foi obtido pela razão do número total de colônias e do peso do tecido pulmonar de cada animal. Os resultados foram expressos em escala logarítmica.

4.5. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 utilizando análise de variância (One-way ANOVA), seguida do pós-teste de Newman-Keuls. Foram considerados significativos os valores de $P < 0,05$.

4.6 Comitê de Ética

Todos os procedimentos realizados envolvendo o uso de animais estavam de acordo com os “Princípios de Ética na Experimentação Animal”, sendo aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (UFG), sob o protocolo nº 065/22. Todas as etapas experimentais foram conduzidas em conformidade com as diretrizes éticas estabelecidas pela legislação vigente (Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e o Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009) e com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

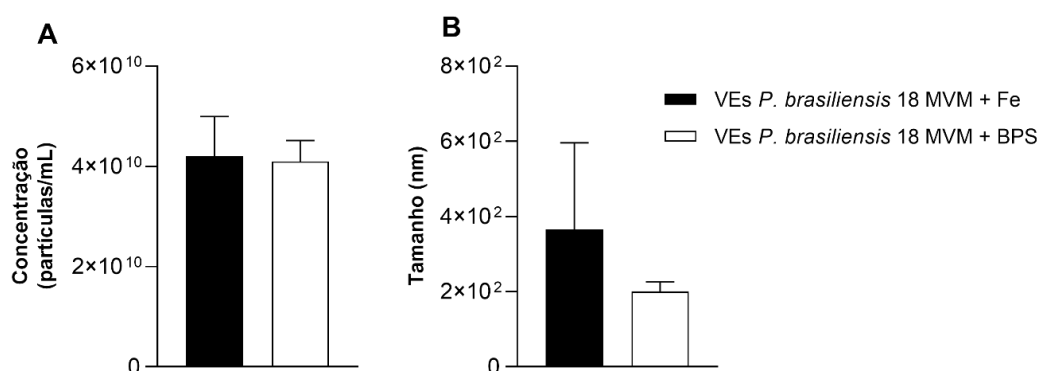
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Padronização da obtenção de VEs de *P. brasiliensis*

5.1.1 Caracterização das VEs

A partir da análise da concentração e tamanho das VEs realizados por NanoSight foi possível obter as Figuras 5A e 5B e 6A e 6B, que apresenta os dados considerando as condições de cultivo do fungo *P. brasiliensis* sob suficiência e privação de ferro em meio MVM.

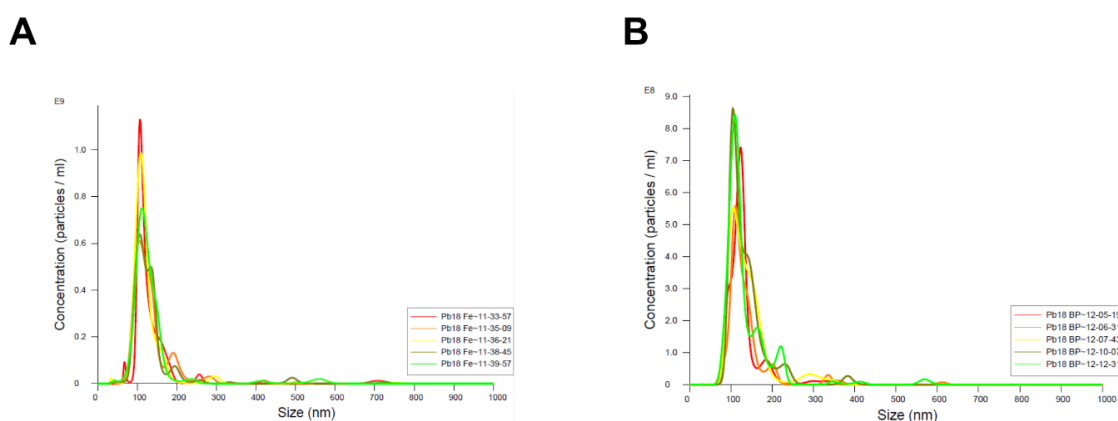
Figura 5: Caracterização de vesículas extracelulares (VEs) de *P. brasiliensis* cultivadas em condições de suficiência de ferro (Fe) e restrição de ferro com BPS



Fonte: Baltazar (2024).

Notas: (A) Concentração média de partículas, aproximadamente $4,8 \times 10^{10}/\text{mL}$ para as VEs cultivadas com ferro e $4,7 \times 10^{10}/\text{mL}$ para as VEs sob restrição de ferro ($p > 0,05$). (B) O tamanho médio das vesículas, cerca de 390 nm para as VEs na presença de ferro, enquanto as VEs sob restrição de ferro apresentaram aproximadamente 200 nm ($p > 0,05$).

Figura 6: Gráficos representativos do perfil de VEs de *P. brasiliensis* analisados pelo NanoSight



Fonte: Baltazar (2024).

Notas: (A) VEs de *P. brasiliensis* obtidas após cultivo do fungo em condição de suficiência de ferro. (B) VEs de *P. brasiliensis* obtidas após cultivo do fungo em condição de privação de ferro.

A Figura 5 mostra uma semelhança entre as concentrações de VEs liberadas nas duas condições de cultivo (A). Já em relação ao tamanho (B) as VEs liberadas na restrição de ferro tendem a ser menores, porém, não foi estatisticamente significativo devido ao elevado desvio padrão, o que indica uma considerável variação no tamanho das VEs nas condições analisadas. O perfil das VEs de *P. brasiliensis* após análise pelo NanoSight pode ser observado na Figura 6A e 6B, que revela distribuição das VEs quanto a concentração e tamanho, e, é possível observar que a maior parte da população, em ambas as condições, apresenta tamanho entre 100 e 200 nm.

De modo geral, não foi observada uma diferença estatisticamente significativa tanto na concentração como no tamanho das VEs entre as condições de suficiência e privação de ferro. Dessa forma, pesquisas adicionais são necessárias para investigar melhor a influência do ferro nas características dessas estruturas.

5.1.2 Quantificação de proteínas com ácido bicinconínico

A tabela 1 apresenta a média de absorvância das proteínas extraídas das VEs de *P. brasiliensis* após cultivo em presença de ferro e com o quelante de ferro (BPS). Os valores de absorvância representam a concentração das proteínas presentes nas VEs.

Tabela 1 – Média da absorvância de proteínas das VEs ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)

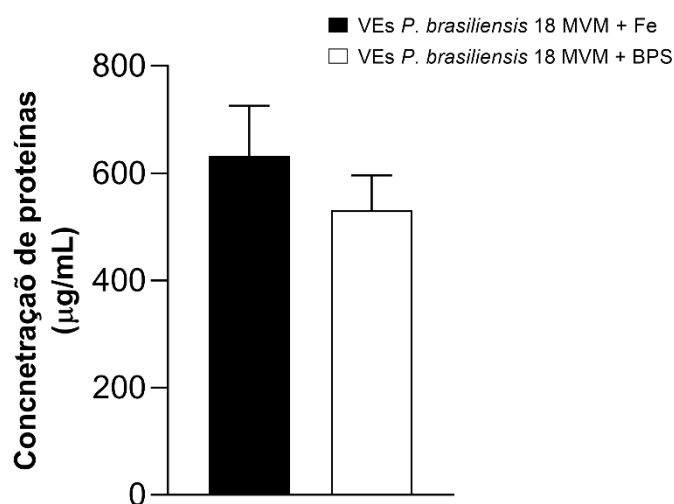
Réplicas	VEs + Fe	VEs + BPS
1	0,585	0,498
2	0,876	0,492
3	0,572	0,606
4	0,740	0,625
Média	0,693	0,555

Fonte: Santos (2024).

Notas: VEs: veículas extracelulares. Fe: ferro. BPS: ácido batofenantrolina dissulfônico.

Através destes dados foi possível obter a média simples da concentração de proteínas das quadruplicatas e convertê-las para $\mu\text{g}/\text{mL}$, sendo representadas na Figura 7.

Figura 7 - Concentração de proteínas das VEs cultivadas em meio MVM com ferro (Fe) e com quelante de ferro (BPS)



Fonte: Baltazar (2024).

Notas: Observa-se maior concentração média de proteínas nas VEs do grupo suplementado com ferro (693 µg/mL), enquanto o grupo com BPS apresenta uma menor concentração (555 µg/mL). $p > 0,05$. Experimento realizado em quadruplicata.

As VEs cultivadas em suficiência de ferro apresentaram uma média de 693 µg/mL, que foi mais elevada do que as VEs obtidas sob cultivo em deficiência de ferro, onde a média da concentração foi de 555 µg/mL. No entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa justificada pelo desvio padrão.

5.2 Padronização de modelo murino de infecção por *P. brasiliensis*

5.2.1 Perfil inflamatório

Os dados referentes à contagem de leucócitos totais e diferencial (mononucleares e neutrófilos) do lavado broncoalveolar estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Contagem de leucócitos presentes no LAV após infecção por *P. brasiliensis*

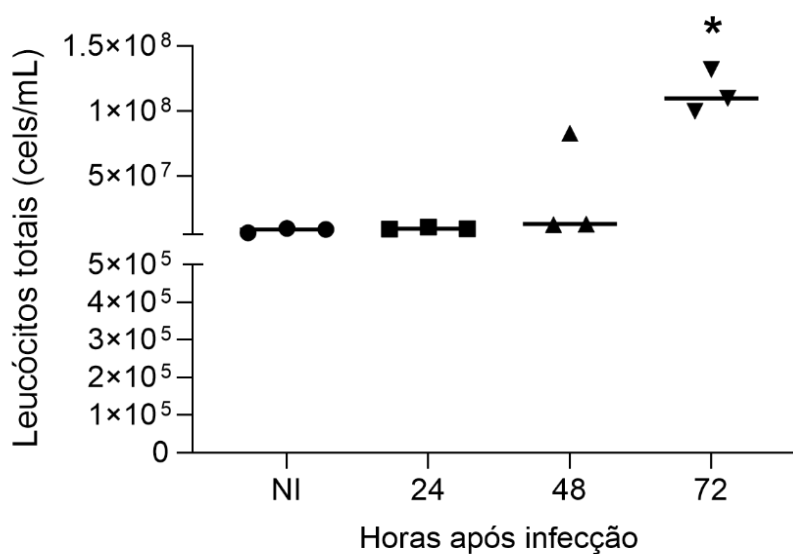
Eutanásia pós infecção	Animais	Leucócitos Totais	Mononucleares	Neutrófilos
NI (1)	A1	$8,7 \times 10^6$	$3,393 \times 10^6$	$5,307 \times 10^6$
	A2	$9,6 \times 10^6$	$4,32 \times 10^6$	$5,28 \times 10^6$
	A3	$6,2 \times 10^6$	$2,976 \times 10^6$	$3,224 \times 10^6$
24h	A4	$9,1 \times 10^6$	$3,367 \times 10^6$	$5,733 \times 10^6$
	A5	$9,3 \times 10^6$	$3,72 \times 10^6$	$5,58 \times 10^6$
	A6	$1,07 \times 10^7$	$0,3959 \times 10^7$	$0,6741 \times 10^7$
48h	A7	$1,25 \times 10^7$	$0,375 \times 10^7$	$0,875 \times 10^7$
	A8	$8,3 \times 10^7$	$2,573 \times 10^7$	$5,727 \times 10^7$
	A9	$1,3 \times 10^7$	$0,481 \times 10^7$	$0,819 \times 10^7$
72h	A10	$1,32 \times 10^8$	$0,4092 \times 10^8$	$0,9108 \times 10^8$
	A11	$1,1 \times 10^8$	$0,418 \times 10^8$	$0,682 \times 10^8$
	A12	$1,0 \times 10^8$	$0,41 \times 10^8$	$0,59 \times 10^8$

Fonte: Santos (2024).

Notas: (1) Animais não infectados.

Com isto, foi possível obter as Figuras 8, 9 e 10 para representar o perfil inflamatório, constituído por contagem de leucócitos totais, neutrófilos e mononucleares, respectivamente.

Figura 8 - Contagem total de leucócitos no LAV obtidos de camundongos infectados por *P. brasiliensis*



Fonte: Baltazar (2024).

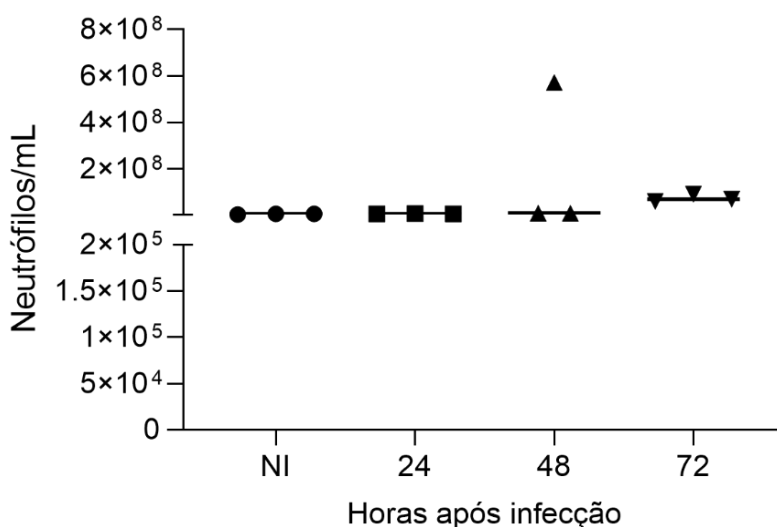
Notas: No tempo de 24h após a infecção, a média foi de $9,7 \times 10^6$ leucócitos/mL, aumentando para $1,1 \times 10^7$ /mL 48h após a infecção e, alcançando o pico de $1,1 \times 10^8$ /mL 72h após a infecção. Camundongos não infectados (NI) apresentaram uma média de $8,2 \times 10^6$ /mL. *grupo estatisticamente diferente em relação a todos os outros grupos. N= 3 animais em cada tempo experimental.

Nos tempos de 24 e 48 horas após a infecção, os animais não apresentaram aumento na contagem de leucócitos totais comparado ao grupo NI (Figura 8). O animal A8, por sua vez, demonstrou um padrão de recrutamento celular mais acentuado comparado aos outros animais. Em 72 horas (Figura 8), no entanto, houve aumento significativo na contagem total de leucócitos comparado aos outros grupos.

A Figura 8 evidencia, portanto, um aumento progressivo do recrutamento de células para o ambiente pulmonar ao longo da infecção, que se mostra mais intenso no tempo de 72 horas após a infecção. Esse resultado condiz com a resposta do sistema imune frente a infecções, onde componentes celulares, principalmente da resposta inata, migram para o local da agressão nos momentos iniciais após contato com o fungo (Hahn *et al.*, 2022).

Na Figura 9, houve um leve aumento quanto ao recrutamento de polimorfonucleares (neutrófilos) para o local da infecção ao longo do tempo avaliado.

Figura 9: Contagem de neutrófilos no LAV obtido de camundongos infectados por *P. brasiliensis*



Fonte: Baltazar (2024).

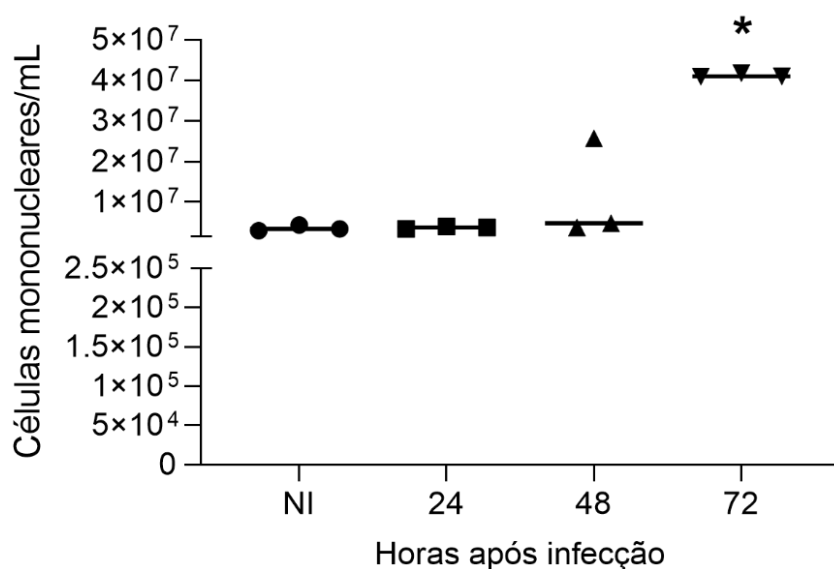
Notas: Em 24h, a média foi de $6,0 \times 10^6$ /mL, aumentando para $2,47 \times 10^7$ /mL após 48h e atingindo $7,2 \times 10^7$ /mL em 72h. Camundongos não infectados (NI) apresentaram uma média de $4,6 \times 10^6$ /mL. N= 3 animais em cada tempo experimental.

Neutrófilos são células importantes nas fases iniciais das respostas inflamatórias, sendo os primeiros leucócitos recrutados para o local da inflamação, exercendo a função fagocítica (Cruvinel *et al.*, 2010). Em pacientes com

paracoccidiodomicose foi relatado diminuição no número de neutrófilos, o que pode dificultar o controle da infecção pelo fungo. Dessa forma, neutrófilos de pacientes com PCM aparentemente são pouco eficientes no controle da infecção se comparados com os de indivíduos saudáveis, o que sugere que o fungo possui alguma ação que causa a inativação dessas células (Hahn *et al.*, 2022). Isso pode explicar a ausência de recrutamento significativo de neutrófilos para o ambiente pulmonar ao longo da infecção, observado no presente modelo.

Em relação à contagem de células mononucleares (Figura 10), em 24 e 48 horas após a infecção não houve diferença significativa no número de células se comparado ao grupo controle (NI). Entretanto, 72 horas após a infecção houve aumento significativo no recrutamento de mononucleares para o local de infecção.

Figura 10: Contagem de leucócitos mononucleares no LAV obtido de camundongos infectados por *P. brasiliensis*



Fonte: Baltazar (2024).

Notas: Em 24h, a média foi de $3,7 \times 10^6$ /mL, aumentando em 48h para $1,1 \times 10^7$ /mL e subindo levemente para $4,1 \times 10^7$ /mL às 72h. Camundongos não infectados (NI) apresentaram uma média de $3,6 \times 10^6$ /mL. *grupo estatisticamente diferente em relação a todos os outros grupos. N= 3 animais em cada tempo experimental.

Ao longo do processo inflamatório, os monócitos se diferenciam em macrófagos para uma atuação mais eficiente no combate aos patógenos. A ação dessas células envolve atividade fagocítica, apresentação de antígenos, produção de citocinas e mediadores inflamatórios, dentre outras, assim, macrófagos são de extrema importância na primeira linha de defesa contra fungos, incluindo *P.*

brasiliensis (Abbas; Lichtman; Pillai, 2015). Portanto, o aumento dessas células ao longo da infecção é uma importante observação e sugere a montagem de uma resposta frente a infecção pelo fungo.

5.2.2 Carga fúngica no tecido pulmonar

Com a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e o peso dos pulmões de cada animal, foi possível obter a razão UFC/g expressos em escala logarítmica após a infecção (24, 48 e 72 horas), representados na Tabela 3 e Figura 11.

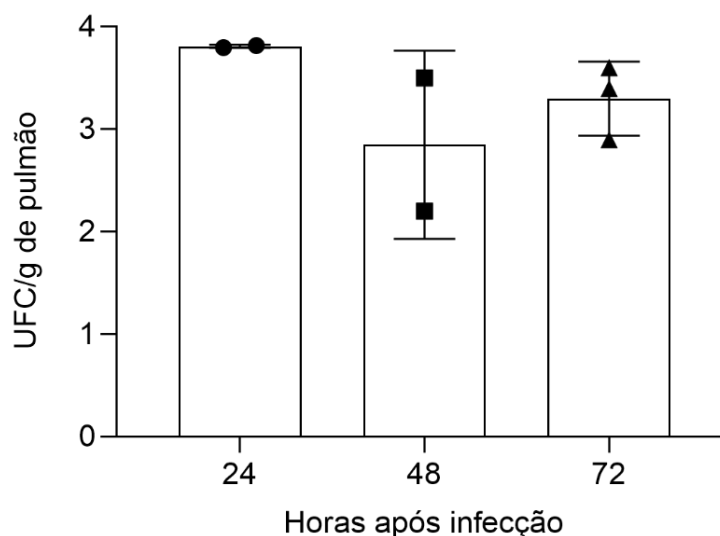
Tabela 3 – Carga fúngica pulmonar (UFC/g de tecido pulmonar)

Eutanásia pós infecção	Animais	UFC	Peso dos pulmões (g)	Razão UFC/g em log
24h	A4	1448	0,4455	3,51
	A5	1288	0,4131	3,49
	A6	-	0,4176	-
48h	A7	784	0,4825	3,21
	A8	29	0,3817	1,88
	A9	-	0,4061	-
72h	A10	568	0,3943	3,16
	A11	187	0,4577	2,61
	A12	874	0,3880	3,35

Fonte: Santos (2024).

Notas: Não houve crescimento das colônias dos animais 6 e 9. Essa ausência não compromete a interpretação geral da carga fúngica pulmonar. UFC: unidade formadora de colônia. N= 3 animais em cada tempo experimental.

Figura 11: Carga fúngica do tecido pulmonar em escala logarítmica em quantidade média de unidades formadoras de colônia (UFC) de *P. brasiliensis* por grama de tecido pulmonar (log UFC/g), avaliada em 24, 48 e 72 horas.



Fonte: Baltazar (2024).

Notas: Em 24 horas apresentou carga fúngica de $10^{3,5}$ UFC/g, em 48 horas de $10^{2,5}$ UFC/g e em 72 horas de aproximadamente 10^3 UFC/g de pulmão. N= 3 animais em cada tempo experimental. Não foi possível quantificar a carga fúngica dos animais 6 e 9 devido à falta de dados acerca da contagem de UFC.

Com as primeiras 24 horas, já foi possível observar uma elevada carga fúngica no tecido pulmonar dos camundongos, o que demonstra permanência do fungo no tecido mesmo 24 horas após a infecção. Esse pode ser entendido como sendo um comportamento esperado em uma infecção inicial, uma vez que o sistema imunológico está iniciando o recrutamento de células de defesa.

Em 48 horas após a infecção, notou-se uma leve redução na carga fúngica, que pode ter ocorrido devido a não recuperação de colônias a partir do pulmão de um dos animais desse grupo e/ou devido a infecção ineficiente dos animais desse grupo.

Em 72 horas, foi observado manutenção da carga fúngica, de certa forma estável, comparado ao tempo de 24 horas após a infecção. Isso pode indicar uma adaptação do fungo ao ambiente pulmonar, uma vez que o patógeno pode desenvolver estratégias a fim de contornar as defesas do sistema imunológico, como resistência à fagocitose por macrófagos (Silva *et al.*, 2006).

6 CONCLUSÃO

Neste estudo foi realizado a padronização do isolamento, caracterização de VEs de *P. brasiliensis* e do modelo murino para paracoccidiodomicose.

Com relação aos resultados da padronização do isolamento de VEs, não foi observada diferença estatisticamente relevante tanto na concentração como no tamanho das VEs analisadas entre as duas condições, de suficiência e privação de ferro. Dessa forma, pesquisas adicionais são necessárias para investigar melhor a influência do ferro na concentração e tamanho das VEs liberadas por *P. brasiliensis*.

Por outro lado, foi demonstrado que o ferro pode influenciar a carga de proteínas presentes nas VEs de *P. brasiliensis*, uma vez que a concentração de proteínas nas VEs de fungo cultivado em condição de suficiência de ferro tende a ser maior, podendo impactar na virulência do fungo.

Quanto à padronização de modelo murino da PCM, a análise do perfil inflamatório indicou recrutamento de leucócitos para o local de infecção no decorrer do tempo. Foi observado aumento significativo no tempo de 72 horas após a infecção, com prevalência de mononucleares nesse tempo. Em relação à carga fúngica, a persistência do patógeno no ambiente pulmonar 72 horas após a infecção indica a padronização do modelo, visto que, mesmo com a presença do infiltrado inflamatório, essa resposta imune não está sendo suficiente para conter a carga fúngica.

Dessa forma, a padronização do isolamento de vesículas extracelulares de *P. brasiliensis* e do modelo murino de paracoccidiodomicose estabelecem bases essenciais para estudos futuros, pois uma vez padronizado o modelo, é possível estudar se as vesículas extracelulares interferem no curso da infecção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda., 2015. p. 23-40.

BAGAGLI, E.; THEODORO, R. C.; BOSCO, S. M. G.; MCEWEN, J. G. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4, p. 197–207, 1 abr. 2008.

BIELSKA, E.; SISQUELLA, M. A.; ALDEIEG, M; BIRCH, C.; O'DONOGHUE, E. J.; MAY, R. C. Pathogen-derived extracellular vesicles mediate virulence in the fatal human pathogen *Cryptococcus gattii*. **Nature Communications**, v. 9, p. 1556, 19 abr. 2018.

BORGES-WALMSLEY, M. I.; CHEN, D.; SHU, X.; WALMSLEY, A. R. Patobiologia do *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends in Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 80–87, 1 fev. 2002.

CAMACHO, E.; NIÑO-VEGA, GA *Paracoccidioides* Spp.: Fatores de virulência e estratégias de evasão imunológica. **Mediadores da inflamação**, v. 2017, p. 1–19, 2017.

CRUVINEL, W. DE M.; JÚNIOR, D. M.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. DE S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, A. E. C. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, p. 434–447, ago. 2010.

DA SILVA, M. B.; MARQUES, A. F.; NOSANCHUK, J. D.; CADADEVALL, A.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 1, p. 197–205, 1 jan. 2006.

FORTES, M. R. P.; MIOT, H. A.; KUROKAWA, C. S.; MARQUES, M. E. A.; MARQUES, S. A. Imunologia da paracoccidiodomicose. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, p. 516–524, jun. 2011.

HAHN, R. C.; HAGEN, F.; MENDES, R. P.; BURGER, E.; NERY, A. F.; SIQUEIRA, N. P.; GUEVARA, A.; RODRIGUES, A. M.; CAMARGO, Z. P. Paracoccidiodomycosis: Current Status and Future Trends. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 35, n. 4, p. e00233, 8 set. 2022.

KASHINO, S. S.; FAZIOLI, R. A.; MOSCARDI-BACHI, M.; FRANCO, M.; SINGER-VERMES, L. M.; BURGER, E.; CALICH, V. L. Effect of macrophage blockade on the resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Mycopathologia**, v. 130, n. 3, p. 131–140, 1 jun. 1995.

MARCHETTI, M.; BEI, O. D.; BETTATI, S.; CAMPANINI, B.; KOVACHKA, S.; GIANQUINTO, E.; SPYRAKIS, F.; RONDA, L. Iron Metabolism at the Interface between Host and Pathogen: From Nutritional Immunity to Antibacterial Development. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 6, p. 2145, 20 mar. 2020.

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

MEZZARI, A.; FUENTEFRIA, M. **Micologia no laboratório clínico**. 1º ed. Barueri, SP: Editora Manole, 2012. p. 80-84

MORAES, R.; LEITE, I.; GOULART, E. **Parasitologia e micologia humana**. 5. ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2008. p. 520-524.

NOGUEIRA, M. G. DOS S.; ANDRADE, G. M. Q. Paracoccidiodomicose em crianças e adolescentes. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 25, n. 2, p. 260–268, 2014.

PALMEIRO, M.; CHERUBINI, K.; YURGEL, L. Paracoccidioidomicose – Revisão da Literatura. **Scientia Medica**, Porto Alegre: PUCRS, v. 15, n. 4, out./dez. 2005.

Paracoccidioidomicose - *Paracoccidioides brasiliensis* | Micoses | Doenças Infeciosas e Parasitárias do Sistema Digestivo | Atlas de Parasitologia Clínica e Doenças Infeciosas Associadas ao Sistema Digestivo. Disponível em:

<<https://parasitologiaclinica.ufsc.br/index.php/info/conteudo/doencas/micoses/pacococcidioidomicose/>>. Acesso em: 24 out. 2024.

PARENTE, A. F. A.; BAILÃO, A. M.; BORGES, C. L.; PARENTE, J. A.; MAGALHÃES, A. D.; RICART, C. A.; SOARES, C. M. A. Análise proteômica revela que a disponibilidade de ferro altera o estado metabólico do fungo patogênico *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLOS ONE**, v. 6, n. 7, p. e22810, 28 jul. 2011.

Reis, F. C. G.; BORGES, B. S.; JOZEFOWICZ, L. J.; SENA, B. A. G.; GARCIA, A. W. A.; MEDEIROS, L. C.; MARTINS, S. T.; HONORATO, L.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H.; KMETZSCH, L.; NIMRICHTER, L.; ALVEZ, L. R.; STAATS, C. C.; RODRIGUES, M. L. Affiliations Expand A Novel Protocol for the Isolation of Fungal Extracellular Vesicles Reveals the Participation of a Putative Scramblase in Polysaccharide Export and Capsule Construction in *Cryptococcus gattii*. **mSphere**. 2019 Mar 20;4(2):e00080-19. doi: 10.1128/mSphere.00080-19.

RIZZO, J.; TROTTIER, A.; MOYRAND, F.; COPPÉE, J. Y.; MAUFRAIS, C.; ZIMBRES, A. C. G.; DANG, T. T. V.; ALANIO, A.; DESNOS-OLLIVIER, M.; MOUYNA, I.; PÉHAU-ARNAUDE, G.; COMMERE, P. H.; NOVAULT, S.; ENE, I. V.; NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M. L.; JANBON, G. Coregulation of extracellular vesicle production and fluconazole susceptibility in *Cryptococcus neoformans*. **mBio**, v. 14, n. 4, p. e00870, 13 jun. 2023.

RIZZO, J.; RODRIGUES, M. L.; JANBON, G. Extracellular Vesicles in Fungi: Past, Present, and Future Perspectives. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 15 jul. 2020.

RODRIGUES, M. L.; NIMRICHTER, L.; OLIVEIRA, D. L.; FRASES, S.; MIRANDA, K.; ZARAGOZA, O.; ALVAREZ, M.; NAKOUZI, A.; FELDMESSER, M.; CASADEVALL, A. Vesicular Polysaccharide Export in *Cryptococcus neoformans* Is a Eukaryotic Solution to the Problem of Fungal Trans-Cell Wall Transport. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 1, p. 48, 17 nov. 2006.

SANTOS, R. DA S.; LIMA, P. S.; PAULA, L. B.; REIS, A. A. S.; BARBOSA, M. S. Mecanismos celulares e moleculares envolvidos no processo de transição dimórfica em fungos patogênicos humanos. Três Corações: **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 10, n. 1, p. 105-116, 2012.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; TELLES, F. 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.; MARTINEZ, R. II Consenso Brasileiro em Paracoccidioidomicose - 2017. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 27, p. e0500001, 16 ago. 2018.

SILVA, M. G.; CURCIO, J. S.; SILVA-BAILÃO, M. G.; LIMA, R. M.; TOMAZETT, M. V.; DOUZA, A. F.; CRUZ-LEITE, V. R. M.; SBARAINI, N.; BAILÃO, A. M.; RODRIGUES, F.; PEREIRA, M.; GONÇALES, R. A.; SOARES, C. M. A. Molecular characterization of siderophore biosynthesis in *Paracoccidioides brasiliensis*. **IMA Fungus**, v. 11, p. 11, 29 jun. 2020.

SILVA, R. P.; HEISS, C.; BLACK, I.; AZADI, P.; GERLACH, J. Q.; TRAVASSOS, L. R.; JOSHI, L.; KILCOYNE, M.; PUCCIA, R. Extracellular vesicles from *Paracoccidioides* pathogenic species transport polysaccharide and expose ligands for DC-SIGN receptors. **Scientific Reports**, v. 5, p. 14213, 21 set. 2015.

SOUZA, A. F.; PIGOSSO, L. L.; SILVA, L. O. S.; GALO, I. D. C.; PACCEZ, J. D.; SILVA, K. S. F.; OLIVEIRA, M. A. P.; PEREIRA, M.; SOARES, C. M. A. Iron Deprivation Modulates the Exoproteome in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 903070, 3 jun. 2022.

SOUZA, A. F.; PAULA, M. S.; LIMA, R. M.; SILVA, M. G.; CURCIO, J. S.; PEREIRA, M.; SOARES, C. M. A. The “Little Iron Waltz”: The Ternary Response of *Paracoccidioides* spp. to Iron Deprivation. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 221, 12 out. 2020.

VALLEJO, M. C.; NAKAYASU, E. S.; MATSUO, A. L.; SOBREIRA, T. J. P.; LONGO, L. V. G.; GANIKO, L.; ALMEIDA, I. C.; PUCCIA, R. Proteoma de vesículas e extracelular livre de vesículas de *Paracoccidioides brasiliensis*: análise comparativa com outros fungos patogênicos. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 3, p. 1676, 14 fev. 2012.

WANKE, B.; AIDÊ, M. A. Capítulo 6 - Paracoccidioidomicose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, p. 1245–1249, dez. 2009.

XU, R.; RAI, A.; CHEN, M.; SUWAKULSIRI, W.; GREENING, D. W.; SIMPSON, R. J. Vesículas extracelulares no câncer — implicações para futuras melhorias no tratamento do câncer. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 15, n. 10, p. 617–638, out. 2018.

ANEXO - PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA DO PROTOCOLO N. 065/22

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 04 de julho de 2022.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA DO PROTOCOLO N. 065/22

I - Finalidade do projeto de pesquisa: Pesquisa – Iniciação Científica, Mestrado, Doutorado, Outros

II - Identificação:

- Data de apresentação a CEUA:** 29/06/22
- Data de término do projeto:** 31/12/2025
- Título do projeto:** Vesículas extracelulares: uma nova plataforma para o estudo dos mecanismos de patogenicidade e das interações patógeno-hospedeiro
- Pesquisador Coordenador no SIGAA/ Unidade:** Ludmila de Matos Baltazar/IPTSP
- Pesquisador Responsável/ Unidade:** Ludmila de Matos Baltazar/IPTSP
- Pesquisadores Participantes/ Unidade:**
- Médico Veterinário/CRMV:** Daniel Silva Goulart/4632
- Unidade onde será realizada a pesquisa:** CMPEA/IPTESP

III - Objetivos e justificativa do projeto: Investigar e entender o papel das VEs como carreadoras de mediadores de origem fúngica que podem levar a ativação ou ao controle da inflamação no parênquima pulmonar após a infecção pelo fungo *P. brasiliensis*. É necessário entender se as VEs secretadas pelo fungo atuam ou auxiliando a evasão do fungo do sistema imune do hospedeiro ou se elas influenciam no reconhecimento e montagem da resposta imune pelo hospedeiro. Informações sobre as interações VEs-hospedeiro ainda são controversas, por exemplo, estudos da relação VEs de *C. neoformans*-hospedeiro indicaram que elas podem tanto realçar como controlar a infecção pelo fungo [9, 10]. Em relação a *P. brasiliensis*, a presença de nas VEs de moléculas que mediam o reconhecimento do fungo pelas células do sistema imune inato como a manose e N-acetilglicosamina, sugere que VEs podem estar envolvidas na ativação desse sistema no hospedeiro [11]. Entretanto, pouco ainda se sabe sobre o papel das VEs na relação *P. brasiliensis*-hospedeiro, principalmente devido à falta de modelos que permitam tal investigação. Ou seja, para entender essa relação é necessário empregar modelos que nos permitam avaliar o fungo, as características de VEs liberadas por eles e os fatores que poderiam modular essas características, assim como o hospedeiro, investigando como eles respondem ao fungo e as suas VEs, e, como VEs com diferentes características podem modular sua resposta, permitindo assim um estudo vertical da delicada relação fungo-hospedeiro e fungo-VE-hospedeiro.

IV - Sumário do projeto:

❑ **Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos e necessidade do número de animais:** Para a investigação do papel das VEs na interação fungo-hospedeiro e imunodulação não há modelos alternativos, principalmente devido ao fato de que modelos como o de *Caenorhabditis elegans*, *Galleria mellonella* ou *Tenebrio molitor* não dispõem dos componentes do sistema imune inato e adaptativo que se pretendem avaliar na presente proposta. A pesquisadora apresentou ferramenta estatística e referências científicas que justificam o número de animais empregados no estudo:

Experimento 1: grupos A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, com 12 animais cada, totalizando 120 animais;

Experimento 2: grupos A, B, C (n = 36 cada); D, E, F, G, H, I, J, K (n = 9 cada), totalizando 180 animais;

Experimento 3: A, B, C, D (n = 36 cada); E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P (n = 9 cada), totalizando 252 animais;

Experimento 4: A, B, C, D (n = 36 cada); E, F, G, H, I, J, K, L, M (n = 9 cada), totalizando 225 animais;

Experimento 5: A, B, C, D (n = 36 cada); E, F, G, H, I, J, K, L (n = 9 cada), totalizando 216 animais;

❑ **Prevê Projeto Piloto:** Não.

❑ **Descrição do animal utilizado (Explicitar: espécie/ linhagem/ sexo (informar número por sexo)/ peso e/ou idade etc):** 993 Camundongos *Mus musculus* machos, linhagem C57 BL/6, com 6 a 8 semanas e 23 gramas.

❑ **Espécie animal utilizada/ número total de animais/ Número de animais por tratamento ou grupo experimental:** 993 Camundongos *Mus musculus* machos distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

Experimento 1: grupos A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, com 12 animais cada, totalizando 120 animais;

Experimento 2: grupos A, B, C (n = 36 cada); D, E, F, G, H, I, J, K (n = 9 cada), totalizando 180 animais;

Experimento 3: A, B, C, D (n = 36 cada); E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P (n = 9 cada), totalizando 252 animais;

Experimento 4: A, B, C, D (n = 36 cada); E, F, G, H, I, J, K, L, M (n = 9 cada), totalizando 225 animais;

Experimento 5: A, B, C, D (n = 36 cada); E, F, G, H, I, J, K, L (n = 9 cada), totalizando 216 animais;

❑ **Fonte de obtenção do animal:** Centro Multiusuário de Pesquisa e Experimentação Animal.

❑ **Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade), alimentação/hidratação:** Os animais serão mantidos no CMPEA/IPTESP. Receberão ração e água autoclavadas ad libitum em Microisoladores 32x20x21 cm, 5 animais por gaiola revestida com maravalha autoclavada sem enriquecimento ambiental. Ciclos de claro e escuro de 12h controlado.

❑ **Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada e análise dos riscos aos pesquisadores/alunos:** os animais serão inoculados uma única vez com *Paracoccidioides brasiliensis*, nível de segurança 2, via intratraqueal. A equipe será treinada para realizar a manipulação dos animais e a infecção visando minimizar quaisquer desconforto e estresse para os animais. Da mesma forma, será treinada para que durante a contenção dos animais para a aplicação da anestesia, fazê-la de forma a evitar arranhaduras e mordeduras. Em todos os procedimentos a equipe estará paramentada com EPIs, tais como jaleco, luvas e máscaras.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufg@gmail.com

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



□ **Procedimentos experimentais do projeto de pesquisa:** Experimento 1: Avaliação do comportamento dos macrófagos murinos após pré-estímulo com VEs de *P. brasiliensis* obtidas ou não de fungos submetidos a restrição nutricional.

Procedimento: Os camundongos serão eutanasiados após sedação com dose 3 vezes maior que a dose utilizada para anestesia, seguido de deslocamento cervical. Após tal procedimento a medula óssea será retirada do fêmur e da tibia para subsequente diferenciação *in vitro* de macrófagos derivados da medula óssea. Os ensaios de fagocitose *in vitro* serão realizados utilizando monócitos/macrófagos derivados de medula óssea, provenientes de camundongos da linhagem C57 selvagens, os quais serão utilizados para o estudo da capacidade do fungo sobreviver após a fagocitose, bem como dos mecanismos de interação das VEs com os macrófagos e os mecanismos de maturação e acidificação do fagossoma após pré-estímulo com VEs de *P. brasiliensis*. Tal análise será realizada em placas de 96 poços incubados a 37°C em câmara de CO₂ por diferentes períodos de tempo, inicialmente, 3 horas, 6 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, e 96 horas. Ainda será avaliado se a opsonização das células de *P. brasiliensis* com soro obtido de camundongos após a imunização resulta em neutralização do fungo e consequente impedimento da infecção dos macrófagos murinos *in vitro*. As amostras obtidas desse ensaio serão utilizadas para avaliar o índice fagocítico, a capacidade do fungo sobreviver após a fagocitose, índice de proliferação intracelular, bem como produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio após pré-estímulo com VEs de *P. brasiliensis*, ELISA para avaliação do perfil de citocinas e perfil de ativação celular por citometria de fluxo. Ainda será avaliado a forma de interação das VEs com os macrófagos e se o pré-estímulo com VEs altera o reconhecimento, maturação e acidificação do fagossoma.

Experimento 2: Caracterização da cinética de replicação fúngica nos tecidos e da resposta imunoinflamatória após pré-tratamento com VEs de *P. brasiliensis*.

Procedimento: O experimento inicial será realizado com o intuito de determinar a dose de VEs de *P. brasiliensis* efetiva em reduzir a carga fúngica após infecção com o fungo. Os tecidos a serem avaliados serão: pulmão (e lavado bronco-alveolar), fígado, baço e sangue. Nesse experimento os camundongos serão pré-tratados com VEs dose de 100 ng de VEs, e, nos tempos de 1 hora e 3 horas e após o pré-tratamento os camundongos serão infectados com o fungo *P. brasiliensis*. Os animais serão infectados por via intratraqueal com uma suspensão de células de *P. brasiliensis* na concentração de 1x10⁶ células em um volume máximo de 30 µL de solução por animal (C57BL/6 selvagens – WT). Para a infecção os camundongos serão anestesiados por meio da administração intraperitoneal de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg). Nos tempos determinados, inicialmente 72 horas, 7 dias, 14 dias e 30 dias após a infecção os camundongos serão eutanasiados após sedação utilizando 3 vezes a dose utilizada para anestesia, seguido de deslocamento cervical. Desses animais será retirado o sangue total por punção da veia cava inferior e em seguida serão retirados os órgãos (Pulmão, Lavado-Bronco Alveolar, Baço, Fígado, Sangue e Soro) para ensaios como: determinação da carga fúngica, MPO, EPO, NAG, ELISA, perfil celular por citometria de fluxo, histologia, contagem total e diferencial de leucócitos no sangue.

Experimento 3: Caracterização da cinética de replicação fúngica nos tecidos e da resposta imunoinflamatória após tratamento tanto com VEs de *P. brasiliensis* como com o antifúngico itraconazol antes da infecção pelo fungo.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufg@gmail.com

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Procedimento: O experimento será realizado com o intuito de determinar se as VEs de *P. brasiliensis* reduzem a carga fúngica nos tecidos de forma semelhante ao tratamento com o antifúngico de escolha itraconazol. Os tecidos a serem avaliados serão: pulmão (e lavado bronco-alveolar), fígado, baço e sangue. Nesse experimento os camundongos serão pré-tratados com VEs dose de 100 ng de VEs, e, no tempo ótimo de pré-tratamento serão infectados com o fungo *P. brasiliensis*. Os animais serão infectados por via intratraqueal com uma suspensão de células de *P. brasiliensis* na concentração de 1×10^6 células em um volume máximo de 30 μ L de solução por animal (C57BL/6 selvagens – WT). Para a infecção os camundongos serão anestesiados por meio da administração intraperitoneal de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg). Vinte e quatro horas após a infecção os animais serão tratados com o antifúngico itraconazol, dose de 1mg/kg/animal, diariamente via intraperitoneal. Nos tempos determinados, inicialmente 72 horas, 7 dias, 14 dias e 30 dias os camundongos serão eutanasiados após sedação utilizando 3 vezes a dose utilizada para anestesia, seguido de deslocamento cervical. Desses animais será retirado o sangue total por punção da veia cava inferior e em seguida serão retirados os órgãos (Pulmão, Lavado-Bronco Alveolar, Baço, Fígado, Sangue e Soro) para ensaios como: determinação da carga fúngica, MPO, EPO, NAG, ELISA, perfil celular por citometria de fluxo, histologia, contagem total e diferencial de leucócitos no sangue.

Experimento 4: Caracterização da replicação do fungo nos tecidos e da resposta imunoinflamatória após tratamento tanto com VEs de *P. brasiliensis* como com o antifúngico itraconazol, ambos iniciados no pico de recuperação do fungo nos tecidos.

Procedimento: O experimento será realizado com o intuito de avaliar se o tratamento com VEs de *P. brasiliensis* iniciado no pico da infecção com o fungo reduz a carga fúngica de forma semelhante ao tratamento com o antifúngico itraconazol. Os tecidos a serem avaliados serão: pulmão (e lavado bronco-alveolar), fígado, baço e sangue. Nesse experimento os camundongos serão pré-tratados com VEs dose de 100 ng de VEs, e, no tempo ótimo de pré-tratamento serão infectados com o fungo *P. brasiliensis*. Os animais serão infectados por via intratraqueal com uma suspensão de células de *P. brasiliensis* na concentração de 1×10^6 células em um volume máximo de 30 μ L de solução por animal (C57BL/6 selvagens – WT). Para a infecção os camundongos serão anestesiados por meio da administração intraperitoneal de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg). No pico de recuperação da carga fúngica, os animais serão tratados tanto com a VEs dose de 100 ng, diariamente via intratraqueal, como com a antifúngico itraconazol, dose de 1mg/kg/animal, diariamente via intraperitoneal. Nos tempos determinados, inicialmente 7, 14 e 30 dias após início do tratamento os camundongos serão eutanasiados após sedação utilizando 3 vezes a dose utilizada para anestesia, seguido de deslocamento cervical. Desses animais será retirado o sangue total por punção da veia cava inferior e em seguida serão retirados os órgãos (Pulmão, Lavado-Bronco Alveolar, Baço, Fígado, Sangue e Soro) para ensaios como: determinação da carga fúngica, MPO, EPO, NAG, ELISA, perfil celular por citometria de fluxo, histologia, contagem total e diferencial de leucócitos no sangue.

Experimento 5: Análise da influência da restrição nutricional na vesiculogênese e de seus impactos na replicação fúngica nos tecidos e da resposta imunoinflamatória após pré-tratamento com VEs de *P. brasiliensis*. Procedimento: O experimento será realizado com o intuito de determinar se a restrição

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufg@gmail.com

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA**



nutricional do fungo *P. brasiliensis* influencia na vesiculogênese e também na resposta do hospedeiro após pré-tratamento com VEs derivadas de *P. brasiliensis* sem restrição nutricional e com restrição nutricional, seguido de infecção com o fungo. Os tecidos a serem avaliados serão: pulmão (e lavado bronco-alveolar), fígado, baço e sangue. Nesse experimento os camundongos serão pré-tratados com VEs dose de 100 ng de VEs derivadas de *P. brasiliensis* obtidas nas diferentes condições de crescimento, e, no tempo ótimo após o pré-tratamento, os camundongos serão infectados com o fungo *P. brasiliensis*. Os animais serão infectados por via intratraqueal com uma suspensão de células de *P. brasiliensis* na concentração de 1×10^6 células em um volume máximo de 30 μL de solução por animal (C57BL/6 selvagens – WT). Para a infecção os camundongos serão anestesiados por meio da administração intraperitoneal de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg). Nos tempos determinados, inicialmente 72 horas, 7 dias, 14 dias e 30 dias após a infecção os camundongos serão eutanasiados após sedação utilizando 3 vezes a dose utilizada para anestesia, seguido de deslocamento cervical. Desses animais será retirado o sangue total por punção da veia cava inferior e em seguida serão retirados os órgãos (Pulmão, Lavado-Bronco Alveolar, Baço, Fígado, Sangue e Soro) para ensaios como: determinação da carga fúngica, MPO, EPO, NAG, ELISA, perfil celular por citometria de fluxo, histologia, contagem total e diferencial de leucócitos no sangue.

Grau de invasividade: GI3

Material foi obtido ou será utilizado em outros projetos (informar protocolo CEUA quando houver): Lavado brônquicoalveolar, tecido pulmonar, baço, fígado, sangue e soro serão utilizados em aula prática/pesquisa.

Métodos utilizados para minimizar o sofrimento e aumentar o bem-estar dos animais antes, durante e após a pesquisa (Pontos Finais Humanitários): Todos os momentos em que houver manipulação dos animais para cirurgia, esses serão devidamente anestesiados e administrado analgésico para dor. Os animais serão manipulados e mantidos em ambientes preparados para evitar desconfortos e estresse. Após a infecção será avaliada a perda ponderal, piloereção e movimentos dos animais, os que apresentarem perda de peso superior a 20% serão retirados do experimento e eutanasiados.

Método de eutanásia: Deslocamento cervical após sedação/anestesia utilizando cetamina (80 mg/kg) e xilasina (8 mg/kg).

Destino do animal: As carcaças dos animais serão dispostas em sacos plásticos identificados como material biológico e acondicionados em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para a posterior incineração a ser realizada por uma empresa especializada.

V – Comentários do relator frente às orientações da CEUA:

Quanto aos documentos exigidos pela CEUA/UFG: todos os documentos foram apresentados.

Quanto aos cuidados e manejo dos animais e riscos aos pesquisadores: todos cuidados e manejo foram adequadamente descritos.

VI - Parecer da CEUA:

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, o projeto foi considerado **APROVADO** pela *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA* da Universidade Federal de Goiás.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufg@gmail.com

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPI-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para conclusão em 31/12/2025.

VII - Data da reunião: 04/07/2022.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Vesículas extracelulares: uma nova plataforma para o estudo dos mecanismos de patogenicidade e das interações patógeno-hospedeiro**”, registrada com o protocolo nº **065/22**, sob a responsabilidade de **Ludmila de Matos Baltazar** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (UFG), em reunião de **04/07/2022**.

- Finalidade: () Ensino (X) Pesquisa Científica
- Vigência da autorização (início e fim): 04/07/2022 a 31/12/2025
- Espécie/linhagem/raça: Camundongos *Mus musculus*, linhagem C57 BL/6
- Nº de animais autorizados: 993
- Peso/Idade: 23 gramas, 6 a 8 semanas
- Sexo: machos
- Instalação onde serão mantidos os animais: CMPEA/IPTESP/UFG
- Origem (fornecedor): Centro Multiusuário de Pesquisa e Experimentação Animal/UFG