

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (PPGCB)

JULIA DE CASTRO DUTRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIFÚNGICA *IN VITRO* E
EX VIVO DA PRÓPOLIS VERDE BRASILEIRA FRENTE A FUNGOS DO GÊNERO
PARACOCIDIOIDES spp.**

Alfenas/MG

2024

JULIA DE CASTRO DUTRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIFÚNGICA *IN VITRO* E
EX VIVO DA PRÓPOLIS VERDE BRASILEIRA FRENTE A FUNGOS DO GÊNERO
PARACOCCIDIOIDES spp.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Eva Burger
Coorientadora: Dr^a. Lauana Aparecida Santos.

Alfenas/MG

2024

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Dutra, Julia de Castro.

Avaliação da atividade anti-inflamatória e antifúngica *in vitro* e *ex vivo* da própolis verde brasileira frente a fungos do gênero *Paracoccidioides* spp.
/ Julia de Castro Dutra. - Alfenas, MG, 2024.

77 f. : il. -

Orientador(a): Eva Burger.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2024.

Bibliografia.

1. Paracoccidioidomicose. 2. Própolis verde brasileira. 3. Imunomodulação . I. Burger, Eva, orient. II. Título.

JULIA DE CASTRO DUTRA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIFÚNGICA IN VITRO E EX VIVO DA PRÓPOLIS VERDE BRASILEIRA FRENTE A FUNGOS DO GÊNERO PARACOCCIDIOIDES SPP.

A Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Interação Patógeno Hospedeiro.

Aprovada em: 21 de fevereiro de 2024.

Profa. Dra. Eva Burger

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

Profa. Dra. Hadassa Cristhina de Azevedo Soares dos Santos

Instituição: Universidade do Porto

Profa. Dra. Amanda Latércia Tranches Dias

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Eva Burger, Professor do Magistério Superior**, em 22/02/2024, às 10:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1191386** e o código CRC **9E62EB65**.

AGRADECIMENTOS

Nestes dois anos de estudo, durante o mestrado, vivenciei muitos momentos, com diversas pessoas às quais gostaria de agradecer pela transmissão de conhecimentos e demonstração de como é viver para ciência. Além destes, têm-se aqueles em que estiveram comigo, me dando forças e contribuindo para que esta etapa fosse alcançada.

Agradeço primeiramente a Deus, sem Ele nada aconteceria.

Agradeço à Profa. Dra. Eva Burger, orientadora, a qual confiou a mim para realização deste trabalho. Além disso, agradeço pelos conhecimentos passados, pela paciência e por transferir o exemplo de como seguir e honrar a ciência.

Agradeço à Dra. Lauana Aparecida Santos, co-orientadora, colega de profissão, a qual se tornou amiga e, com toda calma e dedicação me ensinou inúmeras coisas, demonstrando como é ser uma biomédica atuante na área da pesquisa e como isso agrega profissionalmente a nós e a população em geral.

Agradeço aos professores Dr. Masaharu Ikegaki e Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias pela contribuição e auxílios com experimentos e a Profa. Dra. Amanda Latércia Dias, a qual com toda generosidade enriqueceu este tempo de mestrado transferindo conhecimentos e oferecendo a oportunidade de cursar o estágio docente.

Agradeço aos meus companheiros de laboratório Enrico Pícolli Marinho, Thayana Dutra de Andrade e Otávio Augusto Carletto, os quais estiveram comigo em diversas fases da pesquisa.

Agradeço aos meus pais, Antônio Dutra Filho e Adriane Castro de Oliveira, meu irmão Eduardo Antônio de Castro Dutra por me acompanharem e motivarem durante este tempo, com todo auxílio e empenho necessário.

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

À Coordenação e Secretaria do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da UNIFAL-MG, obrigada pela prontidão e eficiência com que sempre me atenderam. Obrigada por lutarem para o crescimento do PPGCB.

Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia da UNIFAL-MG agradeço

pelo carinho e atenção com que sempre me trataram.

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

Muito obrigada a todos!

A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer, 1851)

RESUMO

A paracoccidiodomicose (PCM), micose sistêmica, granulomatosa, é ocasionada por fungos do gênero *Paracoccidioides* spp., com duas espécies patogênicas, *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) e *Paracoccidioides lutzii* (Pl), as quais são termicamente dimórficas variando em forma micelial e leveduriforme. A PCM demonstra em seus portadores graves consequências clínicas que requerem opções terapêuticas mais ampliadas, visto que, há números reduzidos de medicamentos e os disponíveis possuem tempo prolongado de tratamento, sendo assim, busca-se um tratamento complementar como uma forma de imunomodular o sistema imunológico. Sabe-se que pacientes com PCM possuem uma resposta imune deficiente frente a microrganismos patogênicos invasores, por este motivo, é proposto uma associação da Própolis Verde Brasileira (PVB), cujo intuito é modular o sistema imune. A própolis vem sendo mencionada na literatura devido suas atividades anti-inflamatórias, antimicrobianas e imunomoduladoras. Objetivo: estudar as propriedades anti-inflamatórias e antifúngicas do extrato da PVB frente ao curso geral da PCM, buscando encontrar uma redução dos níveis de infecção e uma resposta anti-Pb18 e Pl. Metodologia: Inicialmente foram realizados estudos *in vitro*. O teste de atividade antimicrobiana foi realizado sobre as cepas Pb18 e Pl para avaliar se a PVB apresentou atividade microbicida na concentração de 500 mg/mL. Posteriormente, células esplênicas de baço de camundongos *Swiss* foram utilizadas para avaliar a citotoxicidade da PVB, na concentração de 500 mg/mL. Em seguida, foram realizados os experimentos *ex vivo* utilizando a técnica de infecção subcutânea "air-pouch". Os animais foram infectados com suspensões fúngicas (Pb18 e Pl) a partir da técnica de "air pouch", espécie de uma bolsa de ar subcutânea, por 10 dias. O tratamento com o extrato de PVB foi realizado nos últimos três dias de infecção. No final do processo as células foram coletadas a partir da bolsa de ar e separadas em sedimento e sobrenadante para a realização dos seguintes testes: quantificação de óxido nítrico, proteínas totais, enzima catalase, peroxidase, dosagem de citocinas, viabilidade celular, quantificação de células e fungos viáveis e atividade fagocítica de PMNs. Resultados: Em resultados *in vitro* a PVB apresentou atividade antimicrobiana sobre as duas cepas. Na cultura de células esplênicas a concentração de PVB testada não apresentou toxicidade. Ao avaliar se a PVB melhora a capacidade de esplenócitos para a eliminação do fungo,

independente da cepa, os resultados do teste com a PVB mostraram-se significativos em relação ao controle. O tratamento em animais aumentou a viabilidade das células imunes, proteínas totais, catalase, peroxidase e produção das citocinas INF- γ e IL-12. O tratamento com a PVB também foi capaz de reduzir o número de fungos viáveis, quando comparados aos grupos controle (Pb18 e PI), além de demonstrar uma maior atividade fagocítica de PMNs. Conclusão: A PVB foi capaz de imunomodular o sistema imune, uma vez que, na população tratada houve maiores níveis de atividade de PMNs, além disso, reduziu o número de fungos viáveis e estimulou a produção de proteínas totais e citocinas ligadas a resposta do tipo Th1. Nesse sentido, a aplicação do extrato da PVB pode ser um fator promissor ao longo do tratamento e desfecho da micose.

Palavras-chave: Paracoccidiodomicose; Própolis Verde Brasileira; Imunomodulação.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic, granulomatous mycosis, is caused by fungi of the genus *Paracoccidioides* spp., with two pathogenic species, *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) and *Paracoccidioides lutzii* (PI), which are thermally dimorphic, varying in mycelial and yeast. PCM has severe clinical consequences in its sufferers that require more extensive therapeutic options, given that there are a reduced number of medications and those available have a prolonged treatment time, therefore, complementary treatment is sought as a way of immunomodulating the immune system. It is known that patients with PCM have a deficient immune response to invasive pathogenic microorganisms, for this reason, a combination of Brazilian Green Propolis (PVB) is proposed, the aim of which is to modulate the immune system. Propolis has been mentioned in the literature due to its anti-inflammatory, antimicrobial and immunomodulatory activities. Objective: to study the anti-inflammatory and antifungal properties of PVB extract against the general course of PCM, seeking to find a reduction in infection levels and an anti-Pb18 and PI response. Methodology: Initially, *in vitro* studies were carried out. The antimicrobial activity test was carried out on strains Pb18 and PI to evaluate whether PVB showed microbicidal activity at a concentration of 500 mg/mL. Subsequently, splenic cells from the spleen of *Swiss* mice were used to evaluate the cytotoxicity of PVB at a concentration of 500 mg/mL. The animals were infected with fungal suspensions (Pb18 and PI) using the “air pouch” technique, a type of subcutaneous air pocket, for 10 days. Treatment with PVB extract was carried out in the last three days of infection. At the end of the process, the cells were collected from the “air pouch” and separated into sediment and supernatant to carry out the following tests: quantification of nitric oxide, total proteins, catalase enzyme, peroxidase, cytokine dosage, cell viability, cell quantification and viable fungi and phagocytic activity of PMNs. Results: In *in vitro* results, PVB showed antimicrobial activity against both strains. In splenic cell culture, the PVB concentration tested did not show toxicity. When evaluating whether PVB improves the capacity of splenocytes to eliminate the fungus, regardless of the strain, the results of the PVB test were significant in relation to the control. Treatment in animals increased the viability of immune cells, total proteins, catalase, peroxidase and production of the cytokines INF- γ and IL-12. Treatment with PVB was also able to reduce the number of viable fungi, when

compared to the control groups (Pb18 and PI), in addition to demonstrating greater phagocytic activity of PMNs. Conclusion: PVB was able to immunomodulate the immune system, since in the treated population there were higher levels of PMN activity, in addition, it reduced the number of viable fungi and stimulated the production of total proteins and cytokines linked to the type of response. Th1. In this sense, the application of PVB extract may be a promising factor throughout the treatment and outcome of mycosis.

Keywords: Paracoccidioidomycosis; Brazilian Green Propolis; Immunomodulation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Etapas do processo realizado no modelo experimental <i>in vitro</i> : ação da PVB e atividade anti- <i>Paracoccidioides</i>	30
Figura 2 –	Etapas do processo realizado no modelo experimental <i>ex vivo</i> : modelo bolsa de ar.....	32
Figura 3 –	Fase leveduriforme de <i>Paracoccidioides</i> spp.....	33
Figura 4 –	Técnica de "air pouch"	34
Figura 5 –	Técnica de "air pouch" na região dorsal de camundongos da linhagem Swiss	34
Figura 6 –	Células fúngicas de <i>Paracoccidioides</i> spp.	36
Figura 7 –	Processo de quantificação de níveis de peróxido de hidrogênio.....	42
Figura 8 –	Processo de quantificação de óxido nítrico	43
Figura 9 –	Efeito do extrato da PVB sobre culturas de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e <i>Paracoccidioides lutzii</i>	45
Figura 10 –	Efeito do extrato da PVB sobre culturas de esplenócitos.....	46
Figura 11 –	Efeito da PVB sobre culturas de esplenócitos, <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e <i>Paracoccidioides lutzii</i>	47
Figura 12 –	Obtenção de células imunes provenientes da "air pouch"	48
Figura 13 –	Efeito do extrato da PVB sobre o número absoluto, percentual de células e viabilidade de PMNs em bolsa de ar subcutânea após a inoculação de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e <i>Paracoccidioides lutzii</i> .	49
Figura 14 –	Morfologia das células obtidas após infecção subcutânea com <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e <i>Paracoccidioides lutzii</i>	50
Figura 15 –	Efeito do extrato da PVB sobre a contagem diferencial de PMNs oriundos da bolsa de ar de camundongos infectados com <i>Paracoccidioides</i> spp.	51
Figura 16 –	Efeito do extrato de PVB sobre o número de fungos viáveis na "air pouch"	52
Figura 17 –	Efeito do extrato da PVB na produção da enzima catalase, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico de PMNs obtidos da bolsa de ar subcutânea.....	53
Figura 18 –	Efeito do extrato da PVB em relação a síntese de proteínas totais por PMNs em bolsa de ar subcutânea	54

Figura 19 – Efeito do extrato da PVB na atividade antioxidante por PMNs sobre ação do teste de ABTS.....	55
Figura 20 – Efeito do extrato da PVB na atividade antioxidante por PMNs sobre ação do teste DPPH.....	56
Figura 21 – Efeito do extrato de PVB sobre a atividade de citocinas INF- γ , IL-12, GM-CSF e KC secretadas por PMNs obtidos da bolsa de ar subcutânea.....	57
Figura 22 – Efeito do extrato de PVB sobre a atividade de citocinas IL-4, IL-6, e IL-10 secretadas por PMNs obtidos da bolsa de ar subcutânea.....	58
Figura 23 – Atividade fagocítica de PMNs estimulados com extrato da PVB em infecção de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	59
Figura 24 – Atividade fagocítica de PMNs estimulados com extrato da PVB em infecção de <i>Paracoccidioides lutzii</i>	60
Figura 25 – Efeito do veículo de diluição sobre cultura de esplenócitos.....	77
Figura 26 - Efeito do veículo de diluição sobre a quantificação de fungos viáveis.....	77

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Grupos experimentais de esplenócitos em co-cultivo com suspensões fúngicas de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e <i>Paracoccidioides lutzii</i> , em modelo <i>in vitro</i>	30
Quadro 2 – Grupos experimentais de animais infectados com suspensões fúngicas de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e <i>Paracoccidioides lutzii</i> , em modelo <i>ex vivo</i>	31
Quadro 3 – Análise físico química da PVB por meio do teste de espectrofotômetro	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Artepillin C –	Ácido 3,5-difenil-4-hidroxicinâmico
UNIFAL-MG -	Universidade Federal de Alfenas
PAMPS –	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
CAPES –	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.
CEUA –	Comissão de Ética no Uso de Animais.
DMSO –	Dimetilsulfóxido.
ABTS –	Ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico
DPPH –	Difenil-1-picril-hidraliza
PMNs –	Neutrófilos polimorfonucleares.
Pb18 –	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
USP –	Universidade de São Paulo.
PCM –	Paracoccidioidomicose.
FBS –	Soro Fetal Bovino.
UFC –	Unidades Formadoras de Colônias.
BSA –	Albumina de Sérica Bovina.
CAT –	Catalase.
MTT –	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
PVB –	Própolis Verde Brasileira
RPM –	Rotação por minuto
PI –	<i>Paracoccidioides lutzii</i> .
NK –	Células Natural Killer.
D.O –	Densidade óptica
NO –	Óxido nítrico.
K _k –	Constante de Killing.
K _P –	Constante de Fagocitose.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	PARACOCCIDIOIDOMICOSE	19
2.2	INCIDÊNCIA E EPIDEMIOLOGIA DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE	20
2.3	<i>PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS E PARACOCCIDIOIDES LUTZII</i>	21
2.4	IMUNOLOGIA DE FUNGOS	21
2.5	TRATAMENTO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE	24
2.6	APLICAÇÕES DA PRÓPOLIS NA MEDICINA	25
3	OBJETIVOS	27
3.1	OBJETIVOS GERAL.....	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3.2.1	<i>In vitro</i>	27
3.2.2	<i>Ex vivo</i>	27
4	METODOLOGIA	29
4.1	OBTENÇÃO DA PRÓPOLIS VERDE BRASILEIRA E PREPARO DAS AMOSTRAS	29
4.2	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	29
4.3	MODELO <i>IN VITRO</i>	29
4.3.1	Delineamento experimental	30
4.3.2	Grupos experimentais	30
4.3.3	Atividade anti-<i>Paracoccidioides</i>	31
4.4	MODELO <i>EX VIVO</i>	31
4.4.1	Grupos experimentais	31
4.4.2	Delineamento experimental	31
4.4.3	Animais	32
4.4.4	Isolados de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e <i>Paracoccidioides lutzii</i>	33
4.4.5	Técnica de “air pouch”	33
4.4.6	Indução de bolsa de ar subcutânea “air pouch”	34
4.4.7	Preparação de suspensões fúngicas de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e <i>Paracoccidioides lutzii</i>, para infecção dos camundongos	35
4.4.8	Tratamento com extrato da própolis verde brasileira	36
4.4.9	Obtenção e cultivo de células oriundas da bolsa de ar subcutânea	37
4.4.10	Contagem diferencial de células	37
4.4.11	Quantificação de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e <i>Paracoccidioides lutzii</i> viáveis	38
4.4.12	Avaliação da capacidade fagocítica de PMNs contra <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e <i>Paracoccidioides lutzii</i>	38
4.4.13	Quantificação de proteínas totais	39
4.4.14	Avaliação da viabilidade celular	39
4.4.15	Determinação da atividade antioxidante pela captura do Radical-Cátion -ABTS	40
4.4.16	Determinação da atividade antioxidante por meio do DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazila	40
4.4.17	Quantificação dos níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)	41

4.4.18	Quantificação dos níveis da enzima catalase	42
4.4.19	Dosagem dos níveis de Óxido Nítrico (NO).....	42
4.4.20	Análises estatísticas.....	43
5	RESULTADOS.....	44
5.1	REULTADOS <i>IN VITRO</i>	44
5.1.1	Ensaio <i>in vitro</i> da capacidade antimicrobiana da própolis verde brasileira (PVB) sobre <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i>	44
5.1.2	Análise da citotoxicidade da Própolis Verde Brasileira (PVB) sobre a cultura de células esplênicas.....	45
5.1.3	Atividade anti- <i>Paracoccidioides</i>	46
5.2	RESULTADOS <i>EX VIVO</i>	47
5.2.1	Número absoluto, percentual e viabilidade de PMNs da bolsa de ar subcutânea.....	48
5.2.2	Células recrutadas pela bolsa de ar subcutânea – “air pouch”	49
5.2.3	Contagem diferencial de PMNs obtidos da técnica de “air pouch”	50
5.2.4	Quantificação de fungos viáveis	51
5.2.5	Análise do estresse oxidativo celular	52
5.2.6	Dosagem de proteínas totais.....	54
5.2.7	ABTS - Determinação da atividade antioxidante pela Captura do Radical-Cátion.....	54
5.2.8	Determinação da atividade antioxidante por meio do DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazila	55
5.2.9	Dosagem de citocinas	56
5.2.10	Capacidade fagocítica de PMNs contra <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e <i>Paracoccidioides lutzii</i>	58
6	DISCUSSÃO	61
7	CONCLUSÕES	66
	REFERÊNCIAS.....	67
	ANEXOS	75

1 INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica, de caráter granulomatosa, ocasionada por fungos termicamente dimórficos, pertencentes ao gênero *Paracoccidioides* spp., o qual possui duas espécies patogênicas *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*. A patologia é predominantemente encontrada nas Américas, em regiões que se estendem do México à Argentina, além de países como o Brasil, Venezuela e Colômbia (Martínez, 2015). Apesar de ser encontrada em regiões com grandes populações a PCM atinge, em maiores números de casos, pacientes do sexo masculino, em idade produtiva com vínculos às atividades agrícolas. A forma de infecção pelo *Paracoccidioides* spp. está correlacionada tanto com a inalação de conídios fúngicos dispersos ao ar, quanto por meio da inoculação direta na pele ou mucosa oral do hospedeiro (Martínez, 2015; Moreira, 2008).

O percurso e o desfecho geral da micose estão correlacionados com fatores que envolvem características frente ao hospedeiro e ao *Paracoccidioides* spp. (Burger, 2021), como a idade, sexo, fatores genéticos, patologias secundárias associadas, indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos (Brito, 2012), por fim, fatores de virulência e via de infecção fúngica, respectivamente (Benard, 2008). A taxa de incidência é diversificada de acordo com as regiões endemicamente estáveis e hiper endêmicas (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). Ainda há certas dificuldades frente ao número fidedigno de indivíduos portadores, uma vez que a PCM não é uma doença de notificação compulsória (Cordova; Torres, 2021; Toyotani; Souza, 2021).

A interação do sistema imune do hospedeiro com *Paracoccidioides* spp. inicia-se após o processo de inalação ou inoculação direta, no qual o agente etiológico da PCM adentra o organismo. A partir deste momento acontecerá diversos mecanismos de imunidade protetora, tanto para o espaço extracelular como intracelular, visto que, o *Paracoccidioides* spp. possui a capacidade de prosperar em ambos espaços (Burger, 2021).

Sendo assim, em uma sequência de eventos, inicialmente começa o processo da ativação da imunidade inata. A qual possui uma grande representatividade inicial frente a PCM, dado que, está associada no controle da infecção pois, ativa o sistema complemento, a atividade de células Natural Killer (NK) e fagócitos com

ações microbidas que, por sinal, é uma resposta importante para o combate aos fungos denominados patogênicos. Além disso, as células NK, neutrófilos, monócitos e macrófagos possuem um papel relevante frente à resistência ao *Paracoccidioides brasiliensis* (Burger, 2021), já que, a participação destas células durante a resposta inflamatória e fungicida são induzidas pelo fungo e por citocinas provenientes de células inflamatórias durante a interação *Paracoccidioides*-fagócitos, que ocorre através de receptores como: Toll (TLRs, Toll-like receptors), e lectina tipo C- Like (CLR) (Bonfim; Mamoni; Blotta, 2009). Posteriormente, em relação a resposta imune adaptativa contra ao *Paracoccidioides* spp., esta tende manter o controle e limitação da multiplicação do fungo, isso ocorre por meio de células Th1/Th17 que irão ativar células fagocitárias (Burger, 2021), em casos de indivíduos portadores em que não ocorre a limitação do fungo outros mecanismos são desencadeados através de respostas celulares dos tipos Th2/Th9 (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). A resposta imune Th2/Th9 irá ocasionar altos títulos de anticorpos específicos, além da produção de interleucinas e outros componentes que ajudarão na gravidade e evolução da doença (Calich; Kashino, 1998).

Atualmente têm-se disponível uma baixa diversidade de métodos terapêuticos frente às micoses, de um modo geral. Além disso, o longo tempo associado a estes tratamentos, sendo de um a dois anos, faz com que indivíduos portadores percam as perspectivas frente a terapêutica da PCM (Santos *et al.*, 2020). Sendo assim, busca-se substâncias e terapias que possam auxiliar e imunomodular o sistema imune desses pacientes, proporcionando melhores expectativas de tratamento e visão geral da doença (Murad *et al.*, 2002).

A própolis, substância natural gerada a partir das abelhas, a qual pode variar de acordo com sua composição química, vem sendo utilizada pela medicina popular desde alguns tempos, estando associada com efeitos benéficos frente a imunomodulação de resposta imune em indivíduos, além de demonstrar outros efeitos, como anticancerígenos (Sforcin *et al.*, 2012; Salatino *et al.*, 2005).

Contudo, de acordo com os fatos mencionados acima, o trabalho tem como objetivo estudar e averiguar as propriedades anti-inflamatórias e antifúngicas do extrato de própolis verde frente ao curso geral da PCM, buscando encontrar uma redução dos níveis de infecção e uma resposta anti-*Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) e anti-*Paracoccidioides lutzii* (PI).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PARACOCCIDIOIDOMICOSE

A paracoccidiodomicose (PCM) é uma infecção fúngica sistêmica, ocasionada por fungos do gênero *Paracoccidioides* spp., com duas espécies patogênicas, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii* (Toyotani; Souza, 2021), ambas espécies são caracterizadas como organismos termicamente dimórficos, ou seja, que depende da temperatura para a demonstração da sua morfologia, podendo ser micelial ou leveduriforme. A forma constituída por leveduras contribui para a ação parasitária do fungo no organismo do hospedeiro (Burger, 2021).

Os agentes causadores da micose sistêmica PCM são as espécies *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*, pertencentes ao reino *Fungi*, filo *Ascomycota*, ordem *Onygenales*, família *Ajellomycetaceae* e gênero *Paracoccidioides* spp. (Lacaz *et al.*, 1994). Ainda nesta classificação, o gênero *Paracoccidioides* possui um complexo de espécies filogenéticas que são distribuídas na América Latina, sendo elas: S1a, S1b, PS2, PS3 e PS4 (Matute *et al.*, 2006).

A micose foi descrita pela primeira vez no Brasil em 1908, pelo médico e cientista Adolpho Lutz, após a presença de uma lesão de mucosa oral em um de seus pacientes (Brito, 2012). Conseqüentemente, Lutz promoveu o isolamento do microrganismo em cultura e descreveu que o mesmo obtinha formas diversas em tecidos e no cultivo. Relatou também que haviam diferenças nas questões de esporulação entre este determinado microrganismo e o fungo *Coccidioides immitis* (Burger, 2021). A denominação de *Paracoccidioides brasiliensis* ocorreu no ano de 1930, por Floriano Paulo de Almeida e perdurou até o surgimento de técnicas de biologia molecular, as quais auxiliaram para a conclusão do conceito definitivo. O termo paracoccidiodomicose é reconhecido oficialmente desde 1971 em Medellín, na Colômbia, quando ocorreu uma reunião de micologistas sob apoio da Organização Pan-Americana de Saúde (Burger, 2021).

A PCM, por ser uma micose sistêmica pode se manifestar em diversos órgãos do corpo humano, ocasionando formas clínicas que se diferem através do local das lesões, gravidade e idade do paciente portador (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2015). A micose possui duas formas clínicas, sendo aguda/subaguda (juvenil), crônica

(adulta) e residual. A forma juvenil é prevalente em crianças, adolescentes e adultos jovens, sua incidência ocorre em áreas endêmicas, no Brasil é predominante nos estados do Maranhão, Minas Gerais, Goiás, Pará e São Paulo e a prevalência não está associada apenas em único gênero biológico, a distribuição por gênero são iguais (Fabris *et al.*, 2014; Bellissimo-Rodrigues *et al.*, 2013). Além disso, o surgimento dos sinais é rápido e muitas vezes progressivo, caracterizado pela ampla disseminação do fungo (Barbosa; Daher; Oliveira, 1968; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). A forma crônica, também denominada como adulta, ocorre em adultos, em idade produtiva – 30 a 60 anos, tem maior prevalência pelo sexo biológico masculino e é responsável pela maioria dos casos de PCM (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2018). A micose, nessa forma, se manifesta de forma lenta e em alguns dos casos a instalação da doença é silenciosa, sua sintomatologia se manifesta de quatro a seis meses, podendo estender até doze meses (Mendes, 1994; Costa *et al.*, 2013).

2.2 INCIDÊNCIA E EPIDEMIOLOGIA DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE

Está distribuída nas regiões das Américas, sendo comumente encontrada do México à Argentina, porém com grande incidência especialmente no Brasil, Venezuela e Colômbia. Quando analisada a taxa de incidência há uma diversidade dentro das regiões (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). Em regiões denominadas endemicamente estáveis estima-se que ocorrem de 01 a 04 casos notificados a cada 100.000 habitantes, por ano. Nas regiões ditas hiper endêmicas os dados atingem de 09 a 40 casos notificados a cada 100.000 habitantes por ano, como é o caso do Brasil, por exemplo. No entanto, pode-se haver uma falta de precisão nestes dados, visto que, a paracoccidioidomicose não é uma doença com notificação compulsória (Toyotani; Souza, 2021).

Além disso, a taxa de indivíduos que venham a desenvolver aspectos sintomatológicos são de 1% a 2%, ou seja, felizmente uma pequena amostra exposta a PCM demonstra alguma fase clínica da patologia. O percentual de mortalidade é de 5%, sendo que, em média, quase 10 milhões de indivíduos – habitantes de áreas endêmicas, são infectados na América Latina por *Paracoccidioides* spp. (Cordova; Torres, 2021).

A PCM apresenta maior prevalência em indivíduos do sexo masculino, ligados a atividades agrícolas e em idade produtiva (Franco, 1987). Apesar das mulheres

também estarem igualmente susceptíveis ao agente etiológico (Moreira, 2008) as questões hormonais estão associadas a menor prevalência no sexo feminino (Burger, 2021), uma vez que, a presença de estrogênio circulante correlaciona-se com a inibição da transformação da morfologia micelial para leveduriforme, atuando como um protetor de fase reprodutiva (Cordova; Torres, 2021).

2.3 *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS* E *PARACOCCIDIOIDES LUTZII*

Acreditava-se que o agente etiológico da PCM se resumia apenas a espécie de *P. brasiliensis*, no entanto, com base em experimentos da literatura atual, considera-se também um novo agente, sendo o *Paracoccidioides lutzii* (Ramos; Saraiva, 2008).

Paracoccidioides brasiliensis, fungo termicamente dimórfico, foi inicialmente descrito como o principal causador da micose por meio da inalação de conídios, principalmente em atividades agrícolas, assim como pelo ar (Siqueira *et al.*, 2015). Também há forma direta da infecção através da pele e mucosa (Burger, 2021).

Paracoccidioides lutzii, foi recentemente adicionada ao grupo de *Paracoccidioides* spp. causadores da PCM. O nome da espécie é uma forma de homenagem a Adolpho Lutz, pesquisador brasileiro responsável pela primeira classificação do fungo no Brasil, em uma análise de seus pacientes (Siqueira *et al.*, 2015). Assim como, *P. brasiliensis*, esta espécie possui características semelhantes, no entanto existem algumas particularidades que os diferem, como a agressividade no curso da patologia, diversidade genética, mecanismos efetores da resposta imune e região geográfica (Soares *et al.*, 1995; Longo *et al.*, 2013).

2.4 IMUNOLOGIA DE FUNGOS

Hodiernamente acredita-se que todo o processo de infecção em humanos inicia-se quando há inalação dos conídios - ou seja, propágulos da fase micelial, principalmente por meio da via inalatória, mas também, pela inoculação direta na pele ou mucosa oral. A partir do momento que os conídios de *Paracoccidioides* spp. adentram o organismo humano, com auxílio da temperatura corporal, ocorre a transformação das formas infectantes dos microrganismos para a forma parasitária, dando origem ao ciclo. Este processo é tipicamente comum por fungos com

características termo-dimórficas (Cordova; Torres, 2021; Moreira, 2008). Logo após o estabelecimento da infecção, a PCM poderá vir a desenvolver de diversas formas, isso estará correlacionado com fatores individuais tanto do hospedeiro quanto do próprio fungo (Burger, 2021), sendo características relacionadas a fatores genéticos, sexo, idade, estados de saúde – presença ou não de patologias pré-existentes, sistema imune competente ou imunocomprometidos, virulência e via de infecção, respectivamente (Benard, 2008).

O sistema imune em si, a partir da interação hospedeiro humano-*Paracoccidioides* spp., tende a controlar a infecção por meio de uma resposta imune celular efetiva, iniciando com mecanismos iniciais de resposta imune inata e conseqüentemente adaptativa, que está associada ao padrão Th1/Th17 da resposta imunológica, ou seja, caracterizada pela liberação de citocinas que ativam macrófagos e linfócitos. Este tipo de mecanismo imune está relacionado ao controle e limitação da multiplicação do fungo.

Por fim, em pacientes em que não há a limitação do fungo e ocorre a evolução da patologia, estão associadas às respostas do Th2/Th9, na qual há maior ativação de linfócitos B, hipergamaglobulinemia e altos títulos de anticorpos específicos, cuja magnitude, em geral, correlaciona-se positivamente com a gravidade e disseminação da doença (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

No período da instalação do fungo dentro do organismo do hospedeiro e, conseqüentemente a disseminação da micose, estão presentes diversos fatores que correlacionam com a virulência, como: composição antigênica do fungo, fatores individuais do hospedeiro relacionados aos mecanismos de defesa e fatores patológicos secundários, possivelmente presentes no indivíduo (Burger, 2021; Benard, 2008).

Paracoccidioides spp. por ser um fungo que predomina tanto espaços intracelulares como extracelulares, têm a capacidade de desenvolver tanto a ativação do sistema imune inato quanto adaptativo, uma vez que, são parâmetros celulares e de secreção de substâncias que determinaram o curso geral da paracoccidiodomicose (Burger, 2021). Em relação as células da resposta imune inata - constituída por macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e as denominadas Natural Killer (NK), as quais possuem função frente às micoses, com o objetivo de desempenhar o controle e limitação da infecção, por meio de mecanismos de atividade microbicida das células Natural Killer e ativação do sistema complemento,

demonstram uma boa resposta frente a fungos ditos patogênicos, ou seja, capazes de ocasionar doença (Bonfim; Mamoni; Blotta, 2009).

A participação destas células da imunologia inata no decorrer das atividades inflamatórias e fungicidas da PCM ocorre por meio do contato direto com o agente etiológico – *Paracoccidioides* spp. e, por meio, das citocinas oriundas de células inflamatórias durante a interação do mesmo com fagócitos, neutrófilos, monócitos, NK e macrófagos. Sendo que, macrófagos possuem papel relevante frente a resistência do *Paracoccidioides brasiliensis* (Bonfim; Mamoni; Blotta, 2009).

Em relação a interação que ocorre entre patógeno e hospedeiro, diante da ativação de células fagocitárias, o processo é desencadeado através do contato e ligação dos receptores presente em membranas celulares e, também, por meio de estruturas moleculares de patógenos, encontradas na superfície de contato do fungo. Os principais receptores frente a esta interação são os receptores de classe Toll, sendo Toll-like e TLRs e, também receptores lectina do tipo C-Like. A principal característica dos TLRs é a capacidade de identificar os PAMPs, ou seja, padrões moleculares associados a patógenos, que é basicamente pequenas porções de moléculas oriundas de patógenos em que células do sistema imune do hospedeiro consegue reconhecer como um sinal de invasão, por um determinado agente estranho. Esses padrões ainda possuem a capacidade de estimular sinais que ocasionam a ativação da imunidade inata e, conseqüentemente a geração de citocinas inflamatórias que regularão a resposta imune humoral (Fortes *et al.*, 2011).

O processo do sistema imune adaptativo frente ao *Paracoccidioides* spp. consiste na liberação de anticorpos específicos anti-*Paracoccidioides* spp. que irão se ligar aos fungos com o intuito de impedir e limitar a proliferação do mesmo. Os anticorpos responsáveis por esta etapa são o IgG e C3, estes são encontrados desde as fases iniciais da infecção, nas paredes dos fungos presentes no granuloma (Biagioni *et al.*, 1987; Grisolia, 2020). Em relação a indivíduos e animais que são resistentes a PCM existe uma prevalência de resposta imune adquirida do tipo Th1, que tem como objetivo ativar as células fagocitárias. Além disso, por outro lado, é encontrado em casos graves da doença alto títulos de anticorpos específicos (anti-*Paracoccidioides* spp.) o que ocasiona a síntese de IL-10, também, casos de pacientes que possuem as formas aguda e crônicas da PCM há uma liberação de citocinas do padrão de resposta tipo Th2, ou seja, IL-4 e IL-5, por fim, em um estudo de Calich, Kashino (1998), descrito em modelo animal, os animais susceptíveis

possuem uma maior produção de IL-4, IL-5 e IL-10 e, conseqüentemente baixas quantidades de liberação de TNF- α (Mamoni; Blotta, 2005).

2.5 TRATAMENTO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE

O tratamento empregado na PCM consiste na administração de antifúngicos orais por um longo período de tempo, até a eliminação total e a negatividade por meio de testes imunológicos e micológicos correlacionados com critérios clínicos e radiológicos (Queiroz-Telles *et al.*, 2007; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2018). Tanto *Paracoccidioides brasiliensis* como *Paracoccidioides lutzii* apresentam-se sensíveis a maioria dos antifúngicos sistêmicos disponibilizados, como os derivados de azólicos e sulfamídicos, ambos possuem a capacidade de inibirem o crescimento de células fúngicas (Restrepo *et al.*, 1980; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2002).

De acordo com o II Consenso Brasileiro de Paracoccidioidomicose (2017), são empregados na terapêutica da PCM o uso de antifúngicos que, por sinal, são até bem aceitos, como: Itraconazol, Voriconazol, Cetoconazol, Anfotericina B, Trimetoprim-sulfametoxazol e Sulfadiazina. A escolha do fármaco para o tratamento está correlacionada com as formas clínicas da patologia que, podem variar entre aguda/subaguda e crônica, sabe-se que os aspectos sintomatológicos e progressão da micose se diferem entre ambas formas clínicas, por este motivo têm-se a determinação do método através dos sinais e sintomas do paciente (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2015).

Apesar de existirem estes medicamentos que auxiliam nos quadros e progressão da doença, de certa forma há um tempo longo de tratamento e conseqüentemente alguns efeitos frente a terapia. Nesse viés, ainda pode-se dizer que há uma baixa diversidade de medicamentos o que acarreta pontos negativos na perspectiva do indivíduo portador. Desta maneira, estudos vêm buscando novos métodos que possuem a capacidade de melhorar os quadros ou estimular a resposta imune frente a infecção por *Paracoccidioides* spp. Sendo assim, há uma perspectiva de associação de medicamentos com substâncias naturais, por exemplo a própolis, cujo intuito é imunomodular a resposta frente a infecções fúngicas (Santos *et al.*, 2020).

2.6 APLICAÇÕES DA PRÓPOLIS NA MEDICINA

A própolis é uma substância natural produzida pelas abelhas, sua composição química é dependente de diversos aspectos, que envolvem fatores geográficos e locais, clima, área de polinização, vegetação e flora local disponível, ou seja, são vastos aspectos associados que contribuem na composição, cor e estrutura da substância (Sforcin *et al.*, 2012). Em relação a composição, de forma geral, encontra-se substâncias químicas, como: ceras, bálsamos, pólen, resinas, óleos aromáticos e etéreos, dentre outros compostos orgânicos (Moise; Bobis, 2020).

A composição de uma própolis carrega as características das plantas em que as abelhas visitaram, cada espécie de planta selecionada pelas abelhas para coleta da resina possui metabólitos que são responsáveis pelas atividades biológicas encontradas em cada própolis (Park *et al.*, 2002). Nesse viés, o metabólito da PVB que mais se destaca é a artepilin C (ácido 3,5-difenil-4-hidroxicinâmico), sendo considerada um marcador deste tipo de própolis (Lugo *et al.*, 2009; Riani *et al.*, 2021).

A própolis verde brasileira, usada no presente estudo, é derivada de vegetação proveniente da espécie botânica *Baccharis dracunculifolia*, um arbusto popularmente conhecido por alecrim-do-campo, vassourinha e/ou alecrim de vassoura. A espécie, *Baccharis dracunculifolia*, por ser um arbusto que possui rápido desenvolvimento, está distribuído em diversas regiões, predominante no Sul do Brasil e, também, encontrado em países como Bolívia, Uruguai, Argentina e Paraguai.

Em relação as fases fenológicas do desenvolvimento da espécie, entre os meses de junho e novembro ocorre o período vegetativo e, a floração entre meses de dezembro a maio, ou também, após o período de chuva nas regiões determinadas (Bastos *et al.*, 2011; Moise; Bobis, 2020). As abelhas responsáveis pela formação da própolis, polinização dos arbustos e coleta de resinas nestas determinadas regiões são as *Apis mellifera*, também denominada como abelha-europeia, estas coletam as resinas entre o período de agosto a abril, ou seja, entre o período vegetativo e de floração (Lima, 2006).

O uso popular da própolis é relatado desde muitos tempos, sendo associada a questões medicinais, na qual muitas pessoas a relacionam como aliada à imunidade (Salatino *et al.*, 2005; Sforcin *et al.*, 2012). No Brasil, a principal fonte de

própolis verde é a vegetação oriunda *Baccharis dracunculifolia* e, vem sendo utilizada como adjuvante terapêutica para patologias, como a tuberculose, úlcera duodenal, distúrbios gástricos e hepáticos, controle da febre, além de obter atividades anti-inflamatórias, antimicrobianas, antigenotóxicas, imunomoduladoras e antimutagênicas, estando associada também a efeitos anticancerígenos (Akao *et al.*, 2003; Lemos *et al.*, 2007).

Contudo, ao juntar a interação própolis-*Paracoccidioides* spp. há grandes evidências de acordo com estudos de Santos *et al.*, (2020) e Murad *et al.*, (2002), os quais relatam que a própolis vermelha possui a capacidade de ativar células como neutrófilos e macrófagos, potencializando sua ação fungicida, sendo assim, é relevante continuar os estudos com outros tipos de própolis, como a verde, para que, novos dados e estudos sejam descobertos frente a interação própolis-*Paracoccidioides* spp.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito antifúngico e antimicrobiano do extrato da própolis verde brasileira (PVB), em modelo *in vitro* e *ex vivo*, frente a isolados fúngicos de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 *In vitro*

Avaliar, por meio do modelo *in vitro*, a atividade antimicrobiana do extrato da PVB sobre culturas de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*.

Avaliar, por meio do modelo *in vitro*, a citotoxicidade do extrato da PVB em esplenócitos;

Avaliar o efeito do antifúngico do extrato da PVB em co-cultivo de esplenócitos, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii* de forma conjunta;

3.2.2 *Ex vivo*

Avaliar a atividade antifúngica de PMNs estimulados ou não com extrato da PVB de animais infectados com Pb18 ou PI;

Avaliar a atividade fungicida de PMNs obtidos da bolsa subcutânea de animais infectados com Pb18 ou PI e tratados com extrato da PVB;

Avaliar a produção de catalase e peroxidase por PMNs obtidos de bolsa subcutânea de animais infectados com Pb18 ou PI e tratados com extrato da PVB;

Avaliar o efeito do tratamento com extrato da PVB na produção de proteínas totais por PMNs obtidos de bolsa subcutânea de animais infectados com Pb18 ou PI e tratados com extrato da PVB;

Avaliar o efeito do tratamento com extrato da PVB na atividade mitocondrial de PMNs obtidos de bolsa subcutânea de animais infectados com Pb18 ou PI e tratados com extrato da PVB;

Avaliar a geração de óxido nítrico por PMNs obtidos de bolsa subcutânea de animais infectados com Pb18 ou PI e tratados com extrato da PVB;

Avaliar a produção de citocinas por PMNs obtidos de bolsa subcutânea de animais infectados com Pb18 ou PI e tratados com extrato da PVB;

4 METODOLOGIA

4.1 OBTENÇÃO DA PRÓPOLIS VERDE BRASILEIRA E PREPARO DAS AMOSTRAS

A PVB foi coletada sob um sistema georreferenciado, por raspagem, dentro das colmeias de abelhas *Apis mellifera*, localizadas na cidade de Formiga, no estado de Minas Gerais, Sudeste do Brasil. A coleta foi realizada no mês de abril de 2021, em um período de floração da espécie *Baccharis dracunculifolia*.

A amostra de PVB (100g) foi extraída com etanol 80% (v/v) (450 mL) em banho-maria, a 70° C, por 30 min. Após a extração, a mistura foi filtrada e o etanol evaporado sob baixa pressão para obter (58,5g) o extrato etanólico de PVB (Alencar *et al.*, 2007). Foi realizada a suspensão da PVB na concentração de 500 mg/mL, usando álcool absoluto 10% em meio de cultura ou PBS (Santos *et al.*, 2021).

4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O trabalho inicialmente foi submetido ao Comitê de Ética em pesquisa com animais da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). Após aprovação iniciou os estudos experimentais, de acordo com as normas empregadas pelo CEUA da UNIFAL-MG e baseado nos procedimentos que vêm sendo realizados pelos integrantes do grupo de pesquisa, em projetos anteriores aprovados por comitês de ética da USP e da UNIFAL.

Proposta aprovada e registrada sob o número 0034/2022, de acordo com CEUA/UNIFAL.

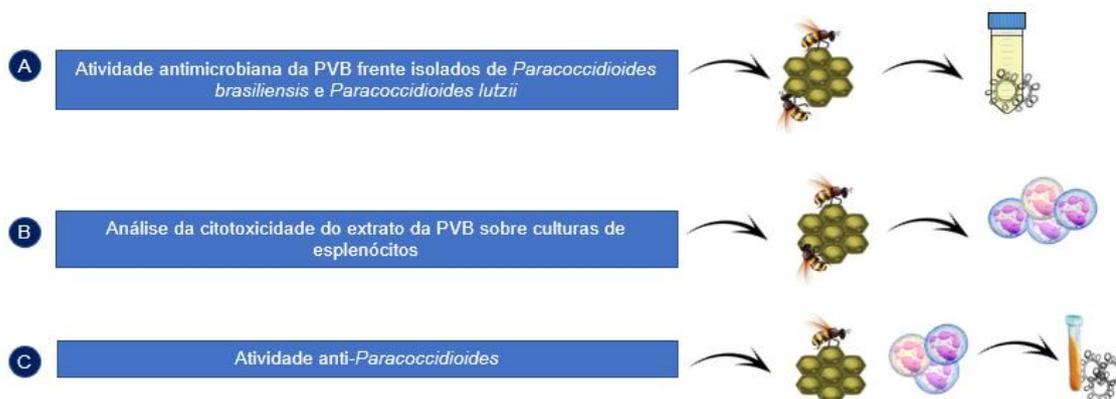
4.3 MODELO *IN VITRO*

Para a realização dos testes *in vitro*, a administração e concentração do extrato da PVB foi baseado na metodologia descrita por Santos *et al.*, (2021), onde houve a padronização de 500mg/mL. Inicialmente, o extrato foi adicionado em contato com culturas de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*. Após este procedimento foi realizado uma análise de citotoxicidade do extrato da PVB em co-cultivos de esplenócitos. A concentração de 500 mg/mL do extrato foi cultivada

juntamente com células esplênicas proveniente de baço de camundongos saudáveis da linhagem Swiss.

4.3.1 Delineamento experimental

Figura 1 – Etapas do processo realizado no modelo experimental *in vitro*: ação da PVB e atividade anti-*Paracoccidioides*



Fonte: da autora, 2024.

Legenda: Delineamento experimental em modelo *in vitro*, utilização de isolados fúngicos, extrato da PVB e co-cultivo de esplenócitos. (A) Teste da atividade antimicrobiana da PVB, (B) Análise de citotoxicidade do extrato da própolis verde brasileira, (C) atividade anti-*Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*. O modelo *in vitro* é totalmente necessário, uma vez que, através dele obtêm-se a quantificação e eficácia de um determinado produto, juntamente com sua toxicidade antes de ser administrado em modelo *ex vivo*.

4.3.2 Grupos experimentais

Quadro 1 - Grupos experimentais de esplenócitos em co-cultivo com suspensões fúngicas de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*, em modelo *in vitro*

<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	<i>Paracoccidioides lutzii</i>
<u>Grupo 01</u> : infectado com Pb18 e não tratado (esplenócitos obtidos por meio da eutanásia de 10 animais).	<u>Grupo 01</u> : infectado com PI e não tratado (esplenócitos obtidos por meio da eutanásia de 10 animais)
<u>Grupo 02</u> : infectado com Pb18 e tratado com extrato da própolis verde brasileira (esplenócitos obtidos por meio da eutanásia de 10 animais).	<u>Grupo 02</u> : infectado com PI e tratado com extrato da própolis verde brasileira (esplenócitos obtidos por meio da eutanásia de 10 animais).

Fonte: da autora, 2024.

Legenda: Demonstração dos grupos experimentais *in vitro* separados por isolados fúngicos de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*.

4.3.3 Atividade anti-*Paracoccidioides*

Para a realização do teste de susceptibilidade antifúngica, foi utilizado tanto o isolado virulento *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) como o *Paracoccidioides lutzii* (PI). Após esta etapa, realizou-se o ensaio da técnica de diluição do caldo, baseado nas normas do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008), com adaptações. O inóculo fúngico foi preparado a partir de colônias jovens (7 dias), ajustadas de acordo com a escala de 0,5 de Macfarland (100% de células viáveis) em tubos de falcon e cultivadas em caldo Fava Netto, suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS) por 24, 48 e 72 horas a 35°C. A concentração de extrato da própolis testada foi de 500 mg/mL e realizada no caldo FAVA NETTO.

4.4 MODELO *EX VIVO*

4.4.1 Grupos experimentais

Quadro 2 - Grupos experimentais de animais infectados com suspensões fúngicas de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*, em modelo *ex vivo*

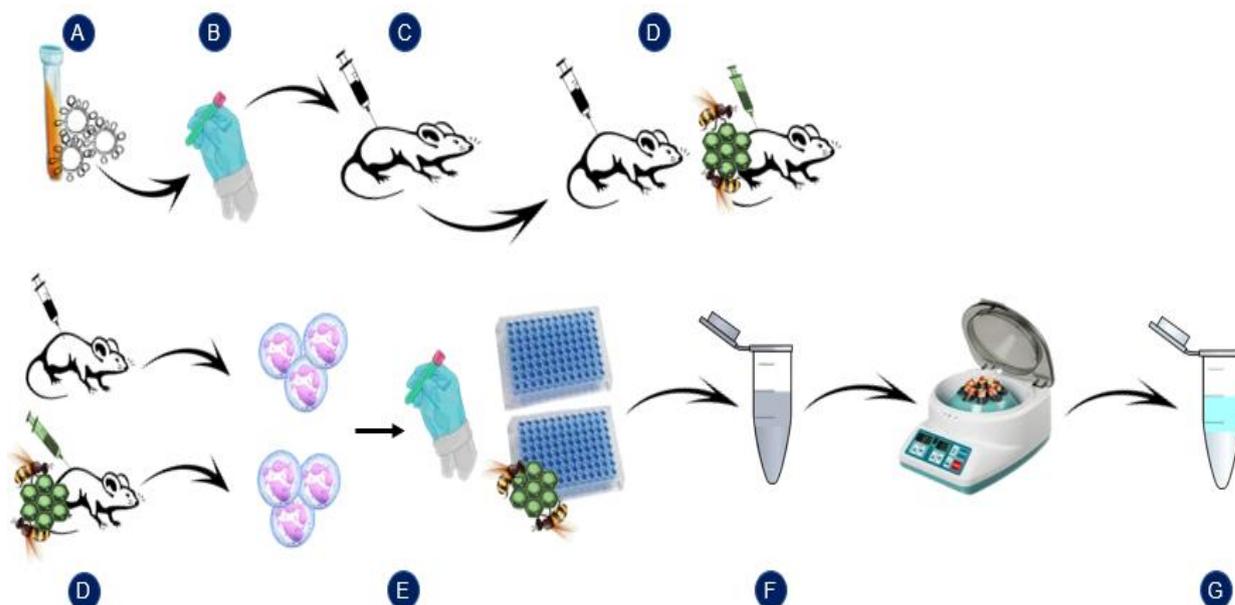
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	<i>Paracoccidioides lutzii</i>
<u>Grupo 01</u> : infectado com Pb18 e não tratado (10 animais).	<u>Grupo 01</u> : infectado com PI e não tratado (10 animais).
<u>Grupo 02</u> : infectado com Pb18 e tratado com extrato da própolis verde brasileira (10 animais).	<u>Grupo 02</u> : infectado com PI e tratado com extrato da própolis verde brasileira (10 animais).

Fonte: da autora, 2024.

Legenda: Demonstração dos grupos experimentais *ex vivo* separados por isolados fúngicos de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*.

4.4.2 Delineamento experimental

Figura 2 – Etapas do processo realizado no modelo experimental *ex vivo*: modelo bolsa de ar



Fonte: da autora, 2024.

Legenda: Delineamento experimental em modelo *ex vivo*, aplicação de isolados fúngicos em camundongos, posteriormente a indução do tratamento ou não e, coleta de células da “air pouch”. (A) isolados fúngicos, (B) suspensão fúngica, (C) inoculação das suspensões fúngicas (Pb18 e PI) em bolsa de ar subcutânea, na região dorsal dos camundongos, (D) grupos experimentais (*grupo 01*: infectados e não tratados; *grupo 02*: infectados e tratados com extrato da própolis verde brasileira), (E) PMNs de cada grupo experimental isolados e cultivados separadamente, (F) suspensão de PMNs coletados, (G) suspensão de PMNs centrifugados e coletados (sedimento e sobrenadante).

4.4.3 Animais

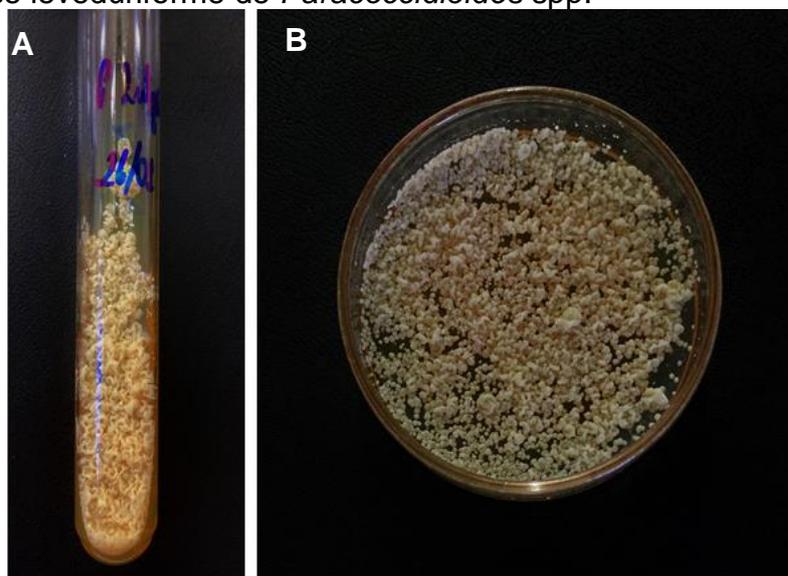
Os animais utilizados neste projeto foram camundongos fêmeas da linhagem Swiss “outbreak”, obtidos do Biotério da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). Os animais foram criados na Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), mantidos em salas com controle de temperatura, alimentados com comida esterilizada e água filtrada, *ad libitum*, mantidos em caixas grandes, com maravalhas, contendo dez animais (grupo), por um período de tempo de dez dias.

Nota: Apesar do grupo de animais estudados serem camundongos fêmeas e possuírem o hormônio com potencial inibitório da fase infectante, isso não acarreta resultados falsos positivos ou falsos negativos para pesquisa, uma vez que, trabalhamos diretamente com a forma parasitária da PCM, ou seja, é inoculado dentro da metodologia “air pouch” células leveduriformes altamente virulentas.

4.4.4 Isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*

Os isolados utilizados neste projeto foram mantidos na Universidade Federal de Alfenas, especificamente no Laboratório de Imunopatologia das Micoses (V001). Os fungos foram semeados e cultivados em tubos e/ou placas contendo meio de cultura semi-sólido, tipo FAVA NETTO, sendo mantidos em estufa a 35°C, repicados a cada 7 dias (Fava Netto, 1955).

Figura 3 – Fase leveduriforme de *Paracoccidioides* spp.



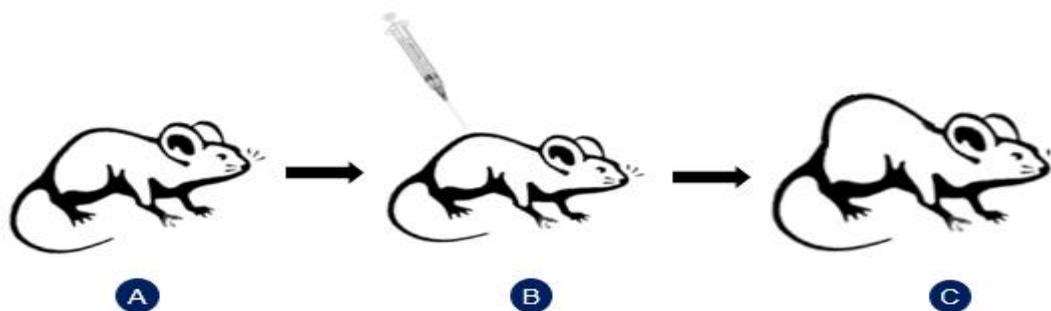
Fonte: da autora, 2024.

Legenda: Demonstração do cultivo de isolados de *Paracoccidioides* spp., a imagem ilustra o inóculo cultivado em sua fase leveduriforme. (A) Inóculo cultivado em tubos inclinados com meio FAVA NETTO, (B) Inóculo fúngico cultivado em placas de petri com meio FAVA NETTO.

4.4.5 Técnica de “air pouch”

A técnica de “air pouch” consiste na indução de uma bolsa de ar subcutânea na dorsal dos camundongos, sejam eles tratados ou não. A técnica é empregada uma vez que, simula o processo infeccioso local por meio do recrutamento de células imunes que são atraídas até a bolsa e, através da coleta e cultura de células oriundas da técnica é possível analisar como ocorre o processo agudo localizado e quais células estão presentes neste momento.

Figura 4 – Técnica de "air pouch"



Fonte: da autora, 2024

Legenda: Técnica de "air pouch", metodologia utilizada para a realização do tratamento e infecção de animais. Demonstração da técnica de "air pouch" sendo feita a realização do afluxo de ar. (A) Camundongo sem bolsa de ar subcutânea, (B) Momento de indução da bolsa de ar subcutânea, utilizando injeção subcutânea de ar estéril para formação do afluxo de ar, (C) Camundongo com modelo "air pouch".

4.4.6 Indução de bolsa de ar subcutânea "air pouch"

A técnica de "air pouch" empregada baseou-se na indução de uma bolsa de ar produzida na região dorsal de camundongos, por meio de injeção subcutânea de 2 mL de ar estéril, conforme descrito por Meloni-Bruneri *et al.*, (1996).

Após formação da bolsa de ar os animais foram inoculados com 0,1mL de suspensão fúngica de *Paracoccidioides brasiliensis* ou *Paracoccidioides lutzii*, respeitando cada grupo. As suspensões fúngicas são inoculadas dentro do afluxo de ar formado pela bolsa.

Figura 5 – Técnica de "air pouch" na região dorsal de camundongos da linhagem Swiss



Fonte: da autora, 2024

Legenda: Demonstração da técnica de "air pouch" realizada na dorsal do animal através de injeção subcutânea de ar estéril. É formado uma propensão de ar no dorso do animal.

4.4.7 Preparação de suspensões fúngicas de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*, para infecção dos camundongos

As células fúngicas foram lavadas com solução salina estéril a 0,9% e centrifugadas a 1300 RPM (Eppendorf *Centrifuge 5810R*), por três vezes. Além disso, estas mesmas células também foram utilizadas na preparação de suspensões para inoculação. A viabilidade das células de Pb18 e PI foram determinadas por meio da coloração, empregando o corante *Janus Green* (Berliner; Reça, 1966). As células que possuíam coloração púrpura foram consideradas não viáveis e aquelas células que possuíam características translúcidas foram denominadas como viáveis.

Em seguida as suspensões fúngicas foram ajustadas para a concentração de 5×10^6 células leveduriformes viáveis/mL (cél/mL) para a inoculação em bolsa de ar subcutânea “air pouch”.

Figura 6 – Células fúngicas de *Paracoccidioides* spp.



Fonte: da autora, 2024

Legenda: Demonstração de células fúngicas de *Paracoccidioides* spp. com aproximação de 40x, visualizadas por microscópio óptico, onde demonstra a morfologia celular do *Paracoccidioides* spp. Este achado é oriundo de isolados cultivados no laboratório de imunopatologia de micoses.

4.4.8 Tratamento com extrato da própolis verde brasileira

Os animais do grupo 02 (infectados e tratados), de ambas suspensões fúngicas, foram tratados com extrato da PVB na concentração de 500 mg/Kg. O tratamento foi realizado nos últimos três dias de infecção, por meio de injeção diretamente na “air pouch”, do respectivo grupo.

O objetivo da técnica “air pouch” é a formação de um afluxo de células para o local da infecção (bolsa de ar). Sendo assim, após o recrutamento destas células, as mesmas foram tratadas pelo extrato da PVB, por meio da injeção subcutânea na “air pouch”.

4.4.9 Obtenção e cultivo de células oriundas da bolsa de ar subcutânea

As células oriundas da técnica de “air pouch” foram coletadas após 10 dias da inoculação dos camundongos.

Técnica de eutanásia: os animais foram anestesiados com dose de 0,5 mL da solução de Cloridrato de Cetamina (10%) e Cloridrato de Xilazina (2%), preparadas na proporção de 1:1, considerada como uma dose excessiva, o que levará os animais a óbito, instantaneamente.

Técnica de obtenção/coleta de células: posteriormente a eutanásia é feito uma incisão na pele dos camundongos com o auxílio de materiais cirúrgicos e uma pipeta de Pauster estéril. As células foram coletadas e transferidas para um homogeneizador de vidro, estéril. As células coletadas foram maceradas e consequentemente armazenadas em tubos Falcon, contendo um volume conhecido de RPMI e 10% de Soro Fetal Bovino (SBF). As células devem ser mantidas refrigeradas a 8°C, neste momento. Após esta etapa foi realizado a contagem de células viáveis e não viáveis: as células são quantificadas com auxílio do hemocítmetro (dispositivo utilizado na contagem de células) e tiveram a viabilidade analisada por meio do corante *Trypan blue* (4%) em 0,2ml de suspensão de PMNs. A concentração das células foi ajustada para 1×10^6 células/mL de PMNs. Após este período as células foram plaqueadas e incubadas na estufa a 5% de CO₂ (VWR S/P by Sheldon MFG, INC), em uma temperatura de 37°C, por um período de 2, 6 e 18 horas. Em cada tempo de incubação descrito acima (2, 6 e 18 h), as células foram recolhidas com ajuda de uma pipeta automática monocanal, colocadas em microtubo (eppendorfs) que foram centrifugados a 1780 RPM. Após a centrifugação resultou na obtenção de sedimento e sobrenadante. Os sedimentos foram armazenados e refrigerados a -20°C para determinação da concentração de proteínas totais. Os sobrenadantes dessas culturas celulares também foram armazenados em -70°C para a realização de quantificação das enzimas peroxidase, catalase, óxido nítrico, atividade de desidrogenases mitocondriais, citocinas, ABTS e DPPH.

4.4.10 Contagem diferencial de células

Nesta etapa ocorre a contagem diferencial de células oriundas da bolsa de ar

subcutânea. Este processo ocorre após a obtenção e coleta das células. A princípio a amostra é separada, em seguida é aplicada sobre a lâmina de análise, em pequenas quantidades. Posteriormente é feita a coloração da amostra, utilizando o corante May Grunwald Giemsa, o qual é utilizado para coloração de células do sangue. Após o processo de coloração a lâmina é analisada em microscópio óptico, na objetiva de 100x.

Para a quantificação das células é utilizado um contador manual de células sanguíneas e feito a contagem absoluta de células polimorfonucleares. A análise gráfica é feita através do programa estatístico GraphPad Prism.

4.4.11 Quantificação de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii* viáveis

Após a incubação da placa de cultura de células em estufa a 5% de CO₂ (VWR S/P by Sheldon MFG, INC) a 37°C, por 2 horas para PMNs, as células foram centrifugadas a 1780 RPM e os sedimentos foram coletados e semeados em placas para contagem de unidades formadoras de colônia (CFU). Estes sedimentos foram semeados em placas de BHI suplementadas com 1% de glicose, 30% de fator de crescimento e 10% de soro fetal bovino, por ser mais eficiente para o crescimento de Pb18 e PI (Mendes *et al.*, 1994). Foram semeados 100µM das suspensões celulares de cada um dos subgrupos, nas placas contendo o meio BHI e espalhadas com auxílio da alça de Drigalski.

Esse experimento foi realizado em triplicata e o crescimento das colônias foi acompanhado e quantificados por um período de 15 dias.

4.4.12 Avaliação da capacidade fagocítica de PMNs contra *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*

Para avaliação da capacidade fagocítica e fungicida de PMNs foi realizada a metodologia proposta por Green *et al.* (2007) e Magon *et al.* (2020) e adaptado por Cerdeira *et al.* (2016), com algumas modificações. Essa técnica tem como função avaliar a capacidade de fagocitose e de destruição de microrganismos por meio da atuação de PMNs. As suspensões fúngicas na concentração de 4x10⁴/mL não opsonizadas foram incubadas juntamente com os PMNs a 10⁶cel/mL a 37°C, por 10,

30 e 90 minutos, juntamente com solução salina balanceada de Hank (HBSS).

Após cada período de incubação (10, 30 e 90 min), tratou-se cada grupo com PBS gelado (pH 7,0), com intuito de cessar a atividade dos neutrófilos. Em seguida, as amostras foram submetidas a uma centrifugação diferencial a 1780xg por 10 minutos. Os pellets, onde se encontram as leveduras intracelulares e os sobrenadantes, local das leveduras extracelulares, foram diluídos em H₂O com pH 11, para lisar os PMNs. Após sucessivas diluições em H₂O, pH 11 (10³, 10⁶, 10⁹), as amostras foram distribuídas sobre placas de Petri contendo meio BHI, suplementado com 1% de glicose, 30% de fator de crescimento e 10% de soro fetal bovino. Por fim, as placas foram incubadas a 37°C e o crescimento das colônias foi quantificado por um período de 15 dias.

Os resultados obtidos foram expressos através de gráficos de constante de fagocitose (k_p) e constante de killing (k_k), uma vez que, tanto a fagocitose quanto o killing pelos PNMs obedecem a uma cinética de primeira ordem, que pode ser calculada através de uma Função W de Lambert, que foi calculada através de tabela disponibilizada por Magon *et al.* (2020) nos materiais suplementares (Hampton *et al.*, 1994).

4.4.13 Quantificação de proteínas totais

A quantificação das proteínas totais ocorreu por meio das amostras de sedimento, utilizando o método do ácido bicinconínico (BCA). Estes ensaios foram realizados em triplicata e a leitura das densidades ópticas foram medidas em microleitor de ELISA em comprimento de onda de 560 nm.

Os resultados foram expressos em µg de proteína/mL, comparando-se a densidade óptica com uma curva padrão contendo concentrações conhecidas de proteína sérica bovina (BSA).

4.4.14 Avaliação da viabilidade celular

Em uma placa de ELISA de 96 poços, foram pipetados 180 µL da suspensão de PMNs, na concentração de 1x10⁶ cél/mL e 20 µL do reagente de MTT (20%). Todas as amostras foram pipetadas em triplicatas. As placas foram mantidas em estufa com 5% de CO₂ em uma temperatura de 37° C. Após 4 horas, todo o

sobrenadante foi retirado, deixando apenas o pellet no fundo de cada poço, que foi utilizado para a análise. Para a análise adicionou-se 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e em seguida fez a realização da leitura da placa em leitor de ELISA, a 540 nm.

4.4.15 Determinação da atividade antioxidante pela captura do Radical-Cátion - ABTS

Teste de atividade antioxidante realizado por meio do método de ABTS+ foi realizado por meio do processo descrito por Al-Duais *et al* (2009), com modificações. Para a realização do radical ABTS+ foi realizado a adição de 88 µL de persulfato de potássio juntamente com 5 mL de solução ABTS 7 mM. A reação ocorre no escuro, por um tempo de 16 horas. Posteriormente, a solução do radical ABTS+ foi corrigida para uma absorvância de $0,7 \pm 0,02$ a 734 nm, através do tampão fosfato de potássio (75 mM e pH 7,4).

O teste é realizado em microplaca de 96 poços. Na placa, em cada poço, são adicionados 20 µL de amostras e 220 µL da solução contendo ABTS+, a reação, neste período ocorre em um tempo de 6 minutos, no escuro. Para a revelação do teste, a absorvância é realizada no leitor de microplacas em um comprimento de onda de 734nm. Na análise e resultados das amostras uma curva padrão de Trolox foi realizada, a qual os pontos da curva analítica foram construídos por meio de diversas concentrações de Trolox (12,5 a 200mM). Todas as amostras foram feitas em triplicata e os resultados expressos em Trolox µmol por mg de amostra (µmol TE/mg).

4.4.16 Determinação da atividade antioxidante por meio do DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

O teste consiste no sequestro de radicais livres de DPPH, o qual em sua forma livre estável é intensamente colorido, porém sobre a presença de antioxidante de uma amostra, o DPPH é reduzido em hidrazida, cujo é um composto de coloração amarelo pálido, ou seja, ocorre uma transformação na reação, onde há uma diminuição da absorvância. Para a análise utilizou a técnica descrita por Tiveron *et al.*, (2016), com adaptações.

O teste é realizado em microplaca de 96 poços. Na placa, em cada poço, são adicionados 66 μ L de amostras juntamente com 134 μ L da solução de etanol do DPPH a 150 μ M. A amostra branco é constituída de 200 μ L de etanol PA ou água. A reação ocorre em um tempo de 40 minutos, no escuro e a revelação do teste é realizada no leitor de microplacas em um comprimento de onda de 517nm. Na análise e resultados das amostras uma curva padrão de Trolox foi realizada, a qual os pontos da curva analítica foram construídos por meio de diversas concentrações de Trolox (12,5 a 200mM). Todas as amostras foram feitas em triplicada e os resultados expressos em Trolox μ mol por mg de amostra (μ mol TE/mg).

4.4.17 Quantificação dos níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

A quantificação dos níveis de peróxido de hidrogênio ocorreu em amostras de sobrenadantes. A liberação de H₂O₂ foi medida por meio do ensaio de oxidação do vermelho de fenol dependente de peroxidase de rábano, descrito por PICK; MIZEL, 1981.

O experimento foi realizado em uma microplaca de 96 poços. A solução de vermelho de fenol foi preparada com PBS gelado, contendo: dextrose 5,5 mM, vermelho de fenol 0,56 mM e 8,5 U/mL de peroxidase de rábano tipo II.

Posteriormente as células foram suspensas em solução fresca de vermelho de fenol e incubadas por 1 hora em uma temperatura de 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂-95%. A reação é interrompida com 10 μ L de NaOH 1M.

A absorbância foi medida por meio de um leitor de microplaca e a conversão da absorbância em μ M de H₂O₂ foi deduzida a partir de uma curva padrão obtida com concentrações conhecidas de H₂O₂ (5 a 40 μ M), conforme descrito por PICK; KEISARI, 1980.

Figura 7 – Processo de quantificação de níveis de peróxido de hidrogênio



Fonte: da autora, 2024.

Legenda: Demonstração do teste de peroxidase em placa. A imagem ilustra através do degradê de cores a atividade e quantificação de peróxido de hidrogênio, em placa de 96 poços, no processo de revelação.

4.4.18 Quantificação dos níveis da enzima catalase

A quantificação de dos níveis da enzima catalase (CAT) foi realizado em amostras de sobrenadantes. A atividade da enzima CAT foi determinada utilizando a metodologia proposta por Aebi (1984).

O princípio da técnica consiste em medir a decomposição de H_2O_2 por minuto a 240 nm. Frações dos sedimentos oriundos do cultivo dos PNMs (35µg de proteínas) foram incubadas em PBS com pH 7,0. Conseqüentemente, o peróxido de hidrogênio 10 mM foi adicionado dando início à reação e absorvância, que foi monitorado durante um minuto.

O cálculo da cinética da decomposição de H_2O_2 foi realizado utilizando-se do coeficiente de extinção molar a 240nm (43,6 M⁻¹ cm⁻¹). Os resultados foram expressos em U/mg de proteína, sendo U correspondente a atividade enzimática capaz de promover a hidrólise de 1 µmol de H_2O_2 por minuto.

4.4.19 Dosagem dos níveis de Óxido Nítrico (NO)

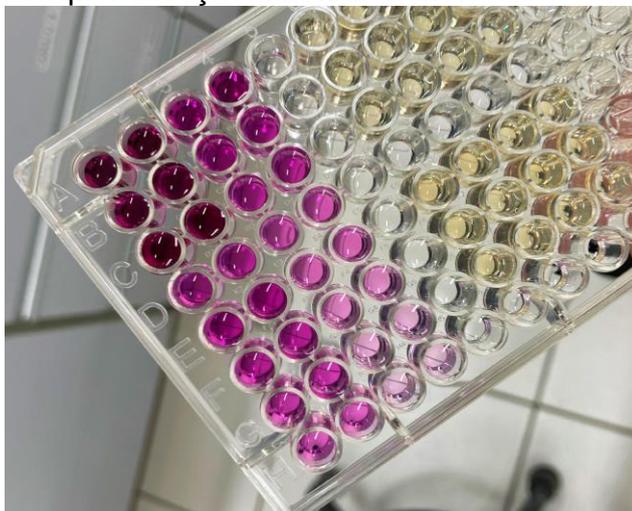
As concentrações de óxido nítrico (NO) foram medidas nos sobrenadantes das culturas de células provenientes da infecção por “air pouch”. Sendo assim, foram pipetados 100 µL dos sobrenadantes e 100µL do reagente Griess em placas

de 96 poços (todas as amostras foram realizadas por triplicatas) e incubados à temperatura ambiente, durante 10 minutos.

A absorbância foi medida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. Posteriormente, os resultados foram expressos em μM pela conversão dos valores a partir de uma curva padrão realizada com nitrito de sódio nas concentrações de 100 a 78 μM , para cada placa.

O reagente de Griess foi preparado no momento da utilização, empregando partes iguais da solução de A-sulfanilamida a 1% em H_3PO_4 a 2,5% e, solução de B-naftilenodiamina a 0,1%, em água destilada (Green *et al.*, 1982).

Figura 8 – Processo de quantificação de óxido nítrico



Fonte: da autora, 2024.

Legenda: Demonstração do teste de óxido nítrico em placa. A imagem ilustra através do degradê de cores a atividade e quantificação de óxido nítrico, em placa de 96 poços, no processo de revelação.

4.4.20 Análises estatísticas

Todos os resultados foram expressos como média e desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste T, One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey, através do programa GraphPad Prism® considerando 5% de significância (p).

5 RESULTADOS

O conjunto de resultados da pesquisa foram oriundos a partir dos modelos experimentais *in vitro* e *ex vivo*. No modelo *in vitro* foi empregado a técnica da atividade antimicrobiana sobre a PVB e análise da citotoxicidade sobre o cultivo de células esplênicas murinas. No modelo experimental *ex vivo* foi empregado a técnica de recrutamento de células por meio da técnica de “air pouch”.

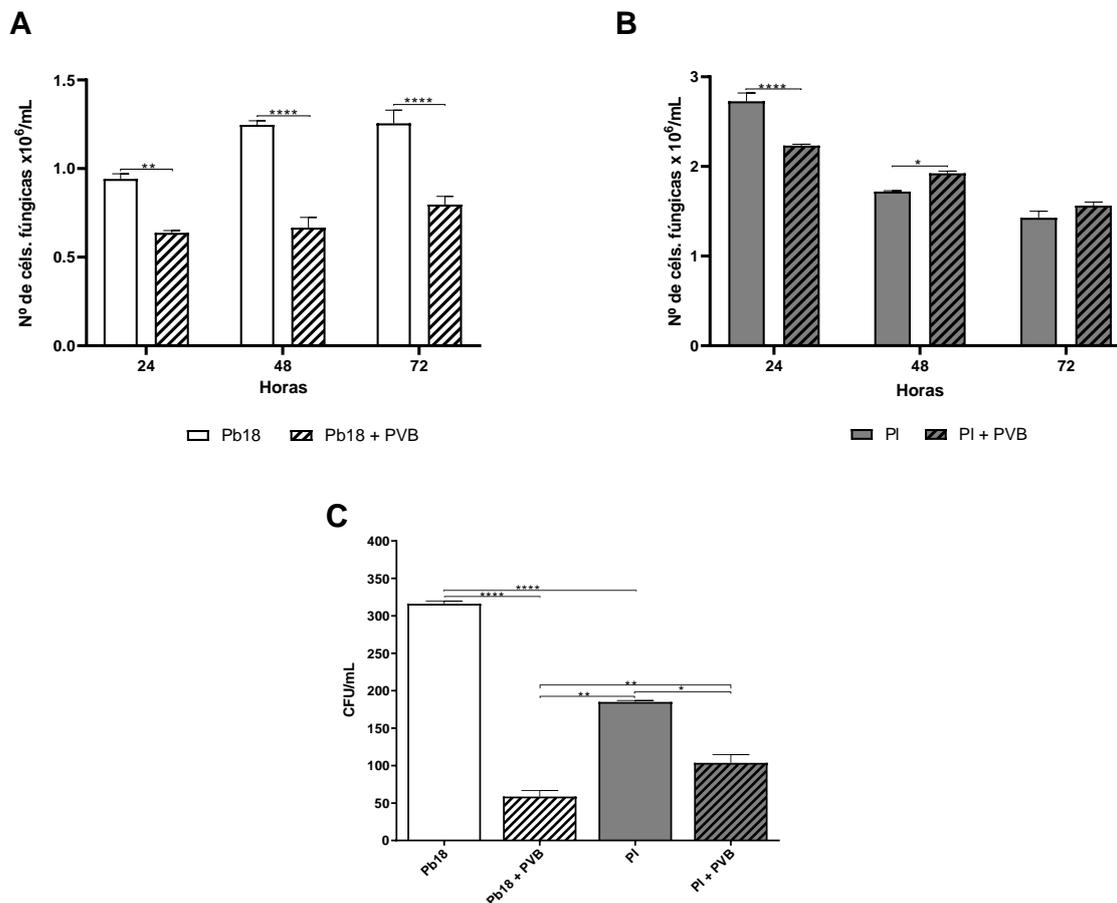
5.1 RESULTADOS *IN VITRO*

Nesta etapa foram realizados testes que consistem em investigar a efetividade de ação da PVB sobre células esplênicas e cepas de *Paracoccidioides* spp. Foram realizadas técnicas de análise de citotoxicidade e efeito antimicrobiano do extrato da PVB.

5.1.1 Ensaio *in vitro* da capacidade antimicrobiana da própolis verde brasileira (PVB) sobre *P. brasiliensis* e *P. lutzii*

Em experimentos *in vitro* foi possível avaliar se a PVB apresenta efeito microbicida sobre as diferentes cepas de *Paracoccidioides* spp. A figura 9 mostra a cinética do número absoluto de células fúngicas viáveis frente a concentração de 500 mg/mL da PVB. O efeito da PVB sobre a cepa de *P. brasiliensis* foi capaz de reduzir significativamente o número de fungos viáveis no tempo de 24, 48 e 72 horas (figura 9A). Ainda sobre o efeito da própolis frente a *P. brasiliensis*, os resultados mostraram que houve uma redução significativa do número de CFU quando tratadas com PVB. (figura 9C). Já utilizando sobre a cepa *P. lutzii* há uma redução de CFU e sobre o número absoluto de células fúngicas, no tempo de 24 horas (figura 9C, B).

Figura 9 – Efeito do extrato da PVB sobre culturas de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*



Fonte: Da autora, 2024.

Legenda: Efeito do extrato da PVB sobre culturas de isolados fúngicos de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*. (A) Cinética do número absoluto de células fúngicas - *P. brasiliensis*; (B) Cinética do número absoluto de células fúngicas - *P. lutzii*; (C) Número de unidade formadoras de colônias (CFU).

Nota: Os resultados de cada grupo estão representados como médias \pm desvio padrão. Diferença estatística entre os grupos (*) $p < 0,5$ (***) $p < 0,001$, foram realizados os testes One way Anova e Two way Anova com pós teste de Tukey.

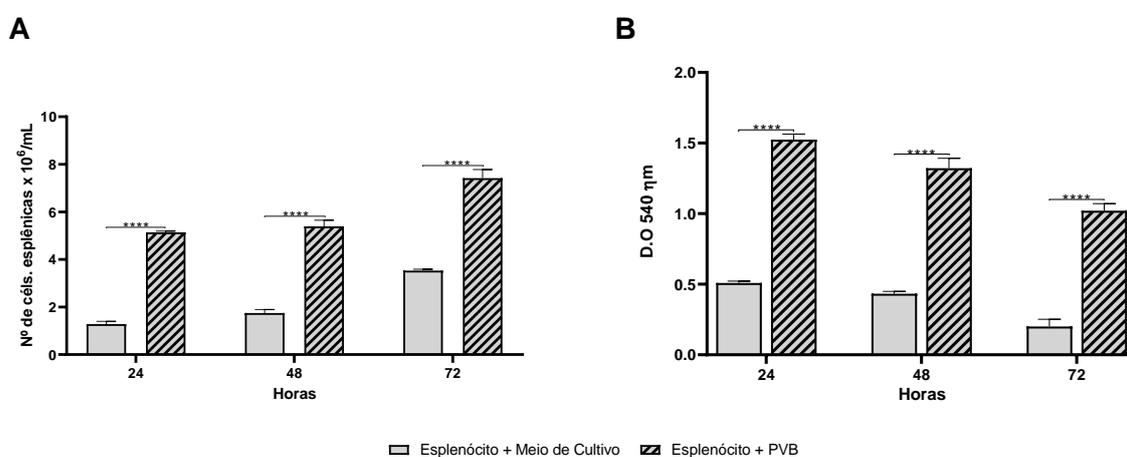
5.1.2 Análise da citotoxicidade da Própolis Verde Brasileira (PVB) sobre a cultura de células esplênicas

A avaliação da citotoxicidade da PVB foi realizada por meio da exposição de células esplênicas, por um período de 24, 48 e 72 horas. Neste período foi analisado o número de células esplênicas e a viabilidade celular, por meio da metabolização do MTT. Para o número de células esplênicas foram quantificadas apenas aquelas que se apresentavam viáveis, ou seja, com aspecto translúcido. A análise de

viabilidade celular foi necessária neste momento, uma vez que, este índice demonstra o quão ativa metabolicamente estão as células esplênicas.

A figura 10 mostra o número absoluto de células esplênicas viáveis e a viabilidade celular destas células. Os resultados mostraram que o número de células esplênicas viáveis (figura 10A) foi maior quando tratadas com PVB, este resultado sugere que a PVB pode ser um estimulante para estas células. Em relação a viabilidade celular (figura 10B) os índices são maiores nas amostras submetidas a PVB.

Figura 10 – Efeito do extrato da PVB sobre culturas de esplenócitos



Fonte: Da autora, 2024.

Legenda: Efeito do extrato da PVB sobre culturas de esplenócitos, em um processo de co-cultivo, cujo objetivo é investigar a citotoxicidade do tratamento. (A) viabilidade de células esplênicas; (B) viabilidade celular por meio da metabolização de atividades desidrogenases mitocondriais.

Nota: Os resultados de cada grupo estão representados como médias \pm desvio padrão. Diferença estatística entre os grupos (**) $p < 0,01$ (***) $p < 0,001$ (****) $p < 0,0001$.

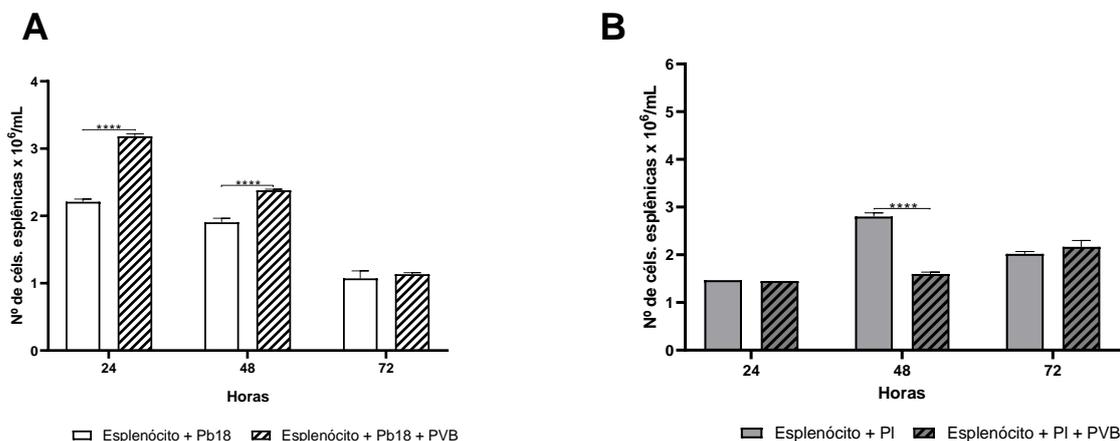
5.1.3 Atividade anti-*Paracoccidioides*

A análise anti-*Paracoccidioides* é realizada a partir da exposição única de células esplênicas e células fúngicas em uma determinada concentração do extrato da PVB. Nesta etapa acontece a contraprova, cujo intuito é analisar quem realiza a redução do número de células fúngicas: a célula esplênica, por meio da ativação de mecanismos de defesa frente ao *Paracoccidioides* spp., ou a ação é realizada exclusivamente por meio de propriedades biológicas da própolis.

A figura 11 mostra a quantidade de células esplênicas quando expostas ao Pb18 e Pl, respectivamente. Em *P. brasiliensis*, há maior número de células quando

expostas a PVB em tempos de 24, 48 e 72 horas. Em *P. lutzii* há uma maior viabilidade de células expostas ao PVB apenas em 72 horas.

Figura 11 – Efeito da PVB sobre culturas de esplenócitos, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*



Fonte: Da autora, 2024.

Legenda: Efeito da PVB sobre co-cultivo de esplenócitos, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*. A figura demonstra a atividade anti-*Paracoccidioides* spp., sobre o co-cultivo de esplenócitos e exposição ao extrato da PVB. (A) Número absoluto de esplenócitos e *Paracoccidioides brasiliensis* quando expostos ao extrato da PVB, (B) Número absoluto de esplenócitos e *Paracoccidioides lutzii* quando expostos ao extrato da PVB.

Nota: Os resultados de cada grupo estão representados como médias \pm desvio padrão, por meio do teste Two way ANOVA. Diferença estatística entre os grupos (*) $p < 0,5$ (**) $p < 0,01$ (***) $p < 0,001$ (****) $p < 0,0001$.

5.2 RESULTADOS EX VIVO

Nesse momento foram realizados testes que consistem em investigar as reações bioquímicas que acontecem em PMNs sob ação do extrato da PVB frente às cepas *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*. Foram mensurados os seguintes resultados obtidos a partir de substâncias secretadas por PMNs: dosagem de enzima catalase, peroxidase, óxido nítrico, proteínas totais, índices antioxidantes e antimicrobianos e citocinas.

Figura 12 – Obtenção de células imunes provenientes da "air pouch"



Fonte: da autora, 2024.

Legenda: Demonstração da "air pouch" no processo de obtenção de células, tais células são coletadas após 07 dias da inoculação de suspensões fúngicas por meio de uma incisura na dorsal dos camundongos, feita após a eutanásia do animal.

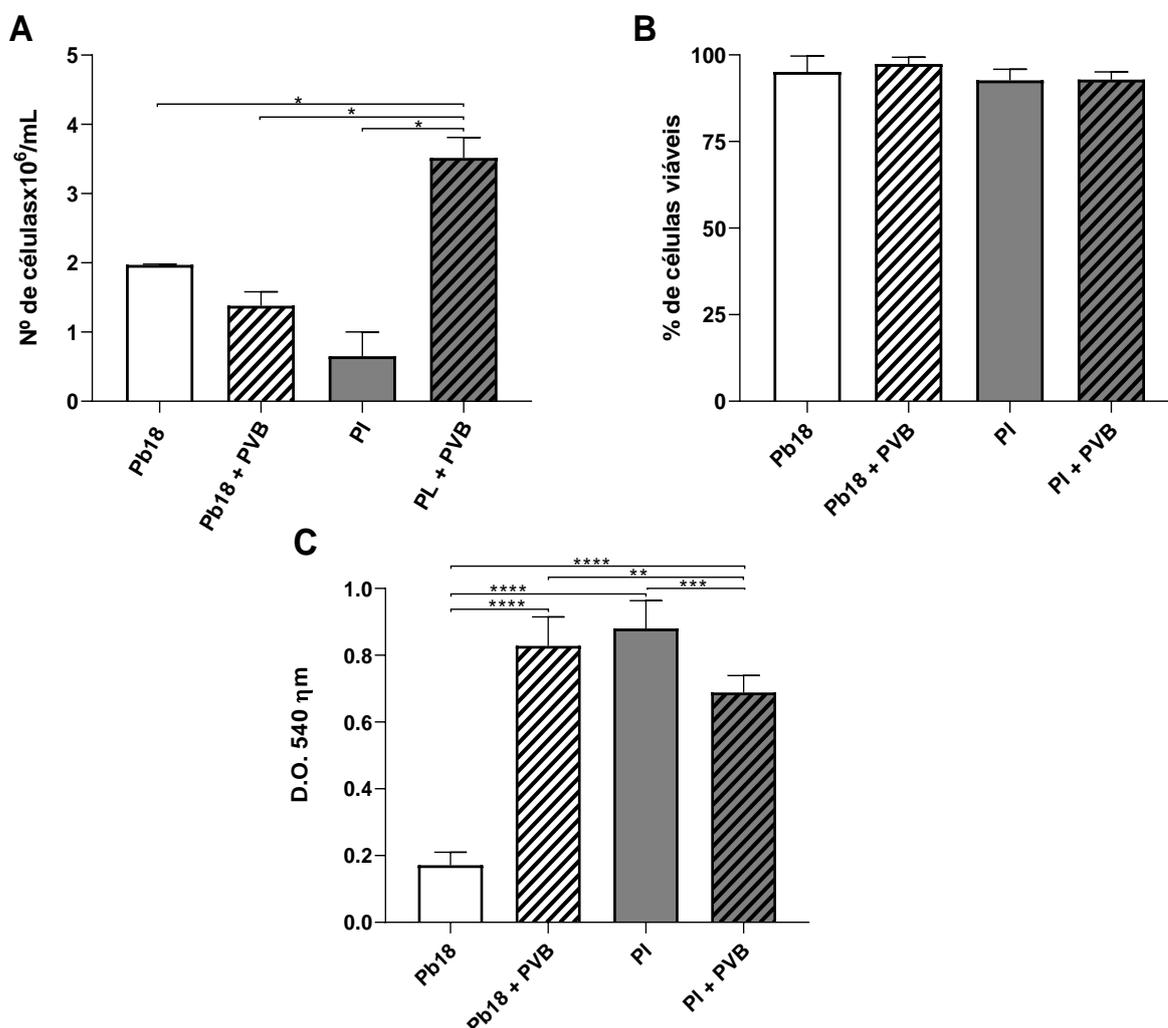
5.2.1 Número absoluto, percentual e viabilidade de PMNs da bolsa de ar subcutânea

A figura 13 mostra o número absoluto, percentual de células e a viabilidade de PMNs oriundos da bolsa de ar subcutânea, evidenciando o grupo de camundongos infectados com *P. brasiliensis* ou *P. lutzii*, tratados e não tratados com PVB.

Os resultados mostraram que houve uma redução do número de PMNs absolutos de camundongos infectados com *P. brasiliensis* e tratados com PVB, em contrapartida houve um aumento de PMNs de camundongos infectados com *P. lutzii* e tratados com PVB (figura 13A).

O percentual de PMNs não foi alterado independente da cepa e exposição ao tratamento com PVB (figura 13B). A viabilidade celular mostrou um resultado extremamente interessante, em PMNs de camundongos infectados com *P. brasiliensis* e tratados houve um aumento significativo, em relação ao controle (figura 13C). Por outro lado, a viabilidade de PMNs de camundongos infectados com *P. lutzii*, foi menor no grupo de animais que receberam tratamento do extrato de PVB (figura 13C).

Figura 13 – Efeito do extrato da PVB sobre o número absoluto, percentual de células e viabilidade de PMNs em bolsa de ar subcutânea após a inoculação de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*



Fonte: da autora, 2024.

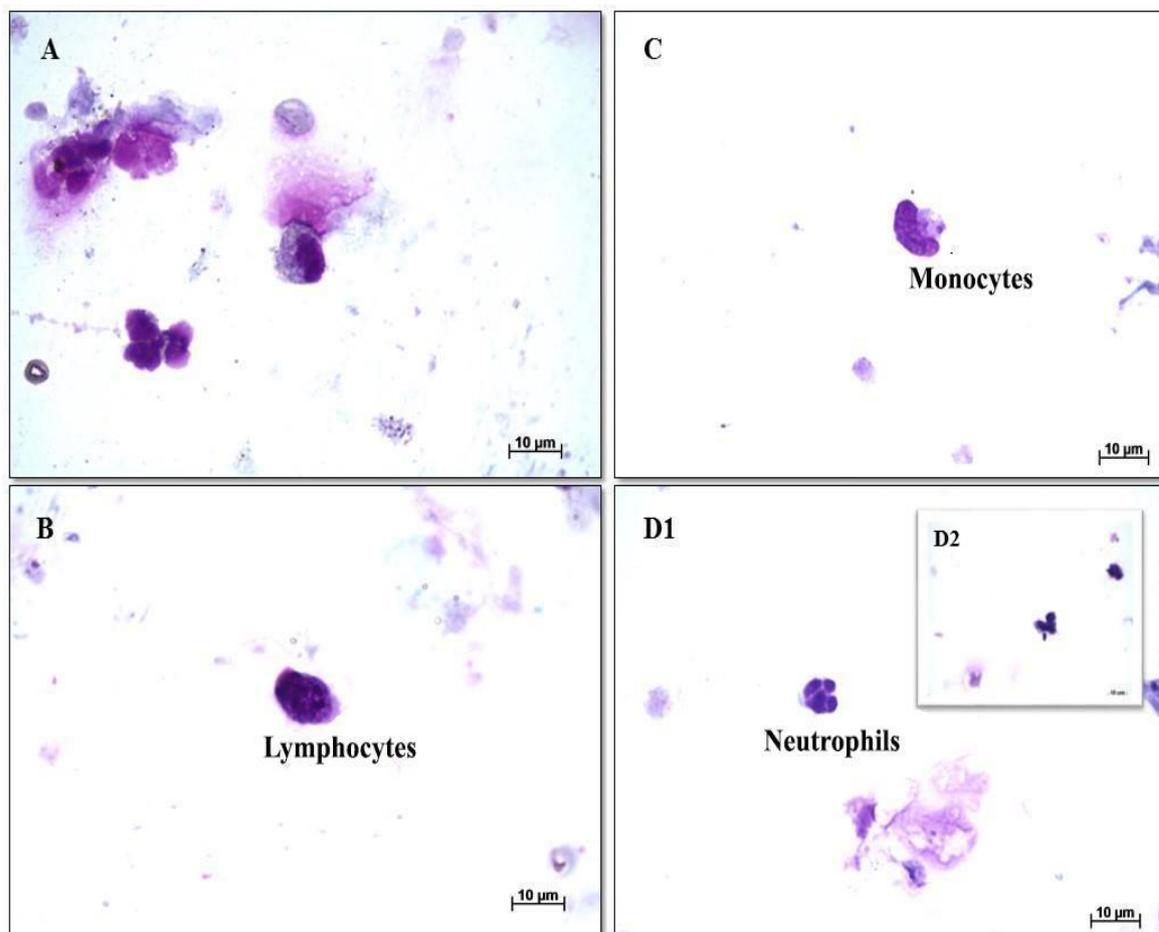
Legenda: Efeito do extrato da PVB sobre o número absoluto de PMNs, porcentagem e metabolização de atividades desidrogenases mitocondriais. O resultado busca identificar se há uma redução ou aumento de PMNs, se eles mantêm viáveis e ativos metabolicamente. (A) número absoluto de PMNs; (B) Porcentagem de PMNs; (C) Viabilidade de PMNs.

Nota: Os resultados de cada grupo estão representados como médias \pm desvio padrão. Diferença estatística entre os grupos (*) $p < 0,5$ (**) $p < 0,01$ (***) $p < 0,001$ (****) $p < 0,0001$.

5.2.2 Células recrutadas pela bolsa de ar subcutânea – “air pouch”

A figura 14 demonstra a morfologia das células obtidas através da bolsa de ar subcutânea de animais expostos ou não ao tratamento da PVB, a lâmina mostra a presença de neutrófilos, monócitos e linfócitos.

Figura 14 – Morfologia das células obtidas após infecção subcutânea com *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*



Fonte: Laboratório de Imunopatologia das micoses, 2024.

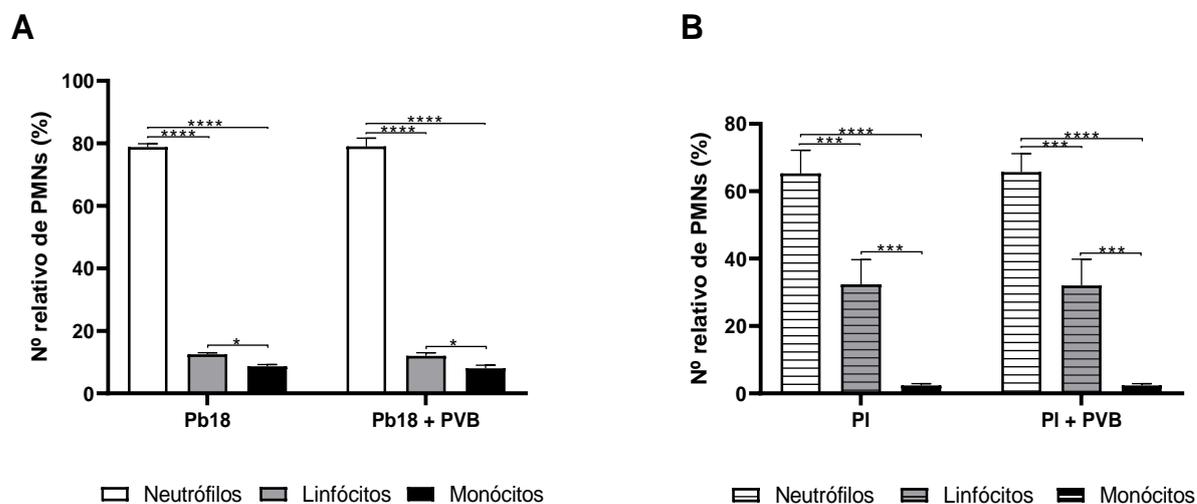
Legenda: Morfologia das células obtidas pela bolsa de ar subcutânea de camundongos infectados com *P. brasiliensis* e *P. lutzii* e tratados com PVB. (A) Aspecto geral das células obtidas da “air pouch”, (B) presença de linfócito, (C) presença de monócito, (D1) presença de neutrófilo e (D2) presença de neutrófilo e monócito.

Nota: Coloração utilizada por May Grunwald Giemsa, todas as fotografias foram obtidas em objetiva de 100x em microscopia de campo claro.

5.2.3 Contagem diferencial de PMNs obtidos da técnica de “air pouch”

A figura 15 demonstra a contagem diferencial de PMNs, expostos ou não ao tratamento. Observa-se tanto em *Paracoccidioides brasiliensis* quanto *Paracoccidioides lutzii* que as populações celulares são similares, sendo predominante os neutrófilos (figura 15 A, B). Além disso, não houve diferença em relação aos grupos tratados.

Figura 15 – Efeito do extrato da PVB sobre a contagem diferencial de PMNs oriundos da bolsa de ar de camundongos infectados com *Paracoccidioides* spp.



Fonte: da autora, 2024.

Legenda: Efeito do extrato da PVB sobre a contagem diferencial de PMNs oriundos da bolsa de ar de camundongos infectados com *Paracoccidioides* spp. A imagem demonstra a população celular, em porcentagem, evidenciando maior prevalência de neutrófilos.

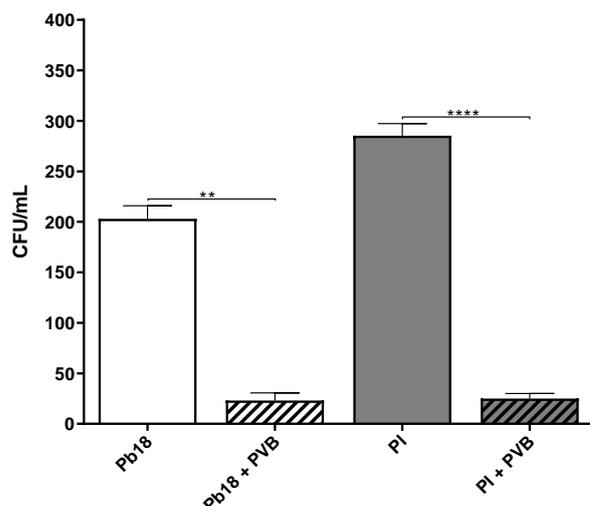
Nota: Os resultados de cada grupo estão representados como médias \pm desvio padrão, pelo teste Two way ANOVA. Diferença estatística entre os grupos (***) $p < 0,001$ (****) $p < 0,0001$.

5.2.4 Quantificação de fungos viáveis

A análise de unidades formadoras de colônias (CFU) é utilizada para averiguar o crescimento fúngico das amostras. Nesta etapa são contadas as colônias, individualmente, determinando o número de colônias totais. Assim, como mostrado na figura 16, o tratamento com PVB sobre as cepas *P. brasiliensis* e *P. lutzii* apresentou uma redução na quantidade de fungos viáveis.

Este resultado sugere que a PVB apresentou atividade fungicida na concentração de 500 mg/Kg.

Figura 16 – Efeito do extrato de PVB sobre o número de fungos viáveis na “air pouch”



Fonte: da autora, 2024.

Legenda: Efeito do extrato da PVB sobre o número de fungos viáveis, o resultado é descrito por meio da análise de colônias no teste de CFU. (A) Unidades Formadoras de colônias de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii* expostos ou não ao extrato da PVB.

Nota: Os resultados de cada grupo estão representados como médias \pm desvio padrão. Diferença estatística entre os grupos (**) $p < 0,01$ (****) $p < 0,0001$.

5.2.5 Análise do estresse oxidativo celular

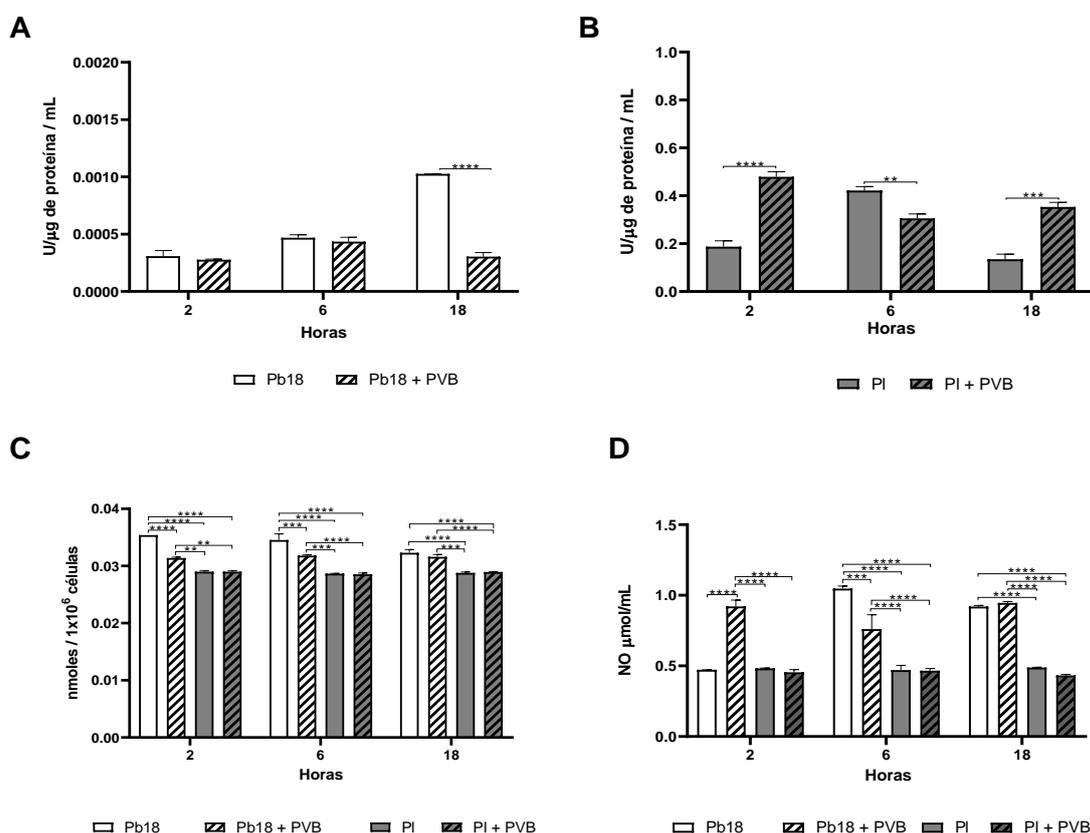
O estresse oxidativo é um evento que ocorre quando há uma desregulação no organismo, seja por um evento fisiológico derivado do metabolismo celular ou por algum processo patológico capaz de liberar radicais livres (Machado *et al.*, 2009; Duda, 2013).

A oxidação e a formação de radicais livres se enquadram em dois grandes grupos, sendo as espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (NOS) (Duda, 2013; Oliveira; Schoffen, 2010). Tanto ROS quando NOS participam de diversos processos fisiológicos e patológicos dentro do organismo humano, como: infecções, lesões teciduais, toxinas, dentre outros (Rock *et al.*, 1996).

Após a geração do estresse oxidativo e conseqüentemente a liberação de radicais livres, tendo a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, acontece o processo de quebra de cascata, na qual, consiste na conversão de peróxido de hidrogênio, posteriormente enzimas catalase, glutathiona peroxidase e peroxidases ligadas à tioredoxina, tal ação acontece na intenção de reduzir os danos gerados por este processo. (Barreiros *et al.*, 2006).

Na análise dos radicais livres liberados por PMNs oriundos da bolsa de ar subcutânea infectados com *P. brasiliensis* ou *P. lutzii*, tratados ou não tratados com PVB; foi analisado a produção de enzima catalase, liberação de peróxido e óxido nítrico (figura 17). Nos PMNs infectados com *P. brasiliensis* e tratados com PVB há uma queda na produção da enzima catalase e produção de H₂O₂, porém há aumento de NO em 2 e 18 horas (figura 17A, C, D). Por outro lado, em PMNs infectados com *P. lutzii* e tratados com PVB houve uma maior liberação de enzima catalase nos tempos de 2 e 18 horas e, a produção de H₂O₂ e NO se manteve constante em relação ao controle (figura 17 B, C, D).

Figura 17 – Efeito do extrato da PVB na produção da enzima catalase, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico de PMNs obtidos da bolsa de ar subcutânea



Fonte: Da autora, 2024.

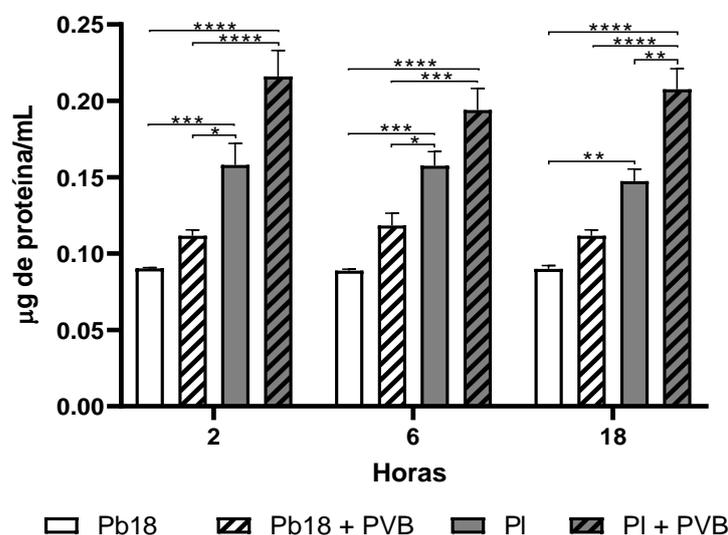
Legenda: Efeito do extrato da PVB sobre a produção de enzima catalase, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico, tais resultados são úteis para a demonstração do estresse oxidativo que ocorre na PCM. (A) Produção de enzima catalase sobre PMNs com Pb18; (B) Produção da enzima catalase sobre PMNs com PI; (C) Produção de peróxido de hidrogênio de PMNs; (D) Produção de óxido nítrico de PMNs.

Nota: Os resultados de cada grupo estão representados como médias \pm desvio padrão. Diferença estatística entre os grupos (**) $p < 0,01$ (***) $p < 0,001$ (****) $p < 0,0001$.

5.2.6 Dosagem de proteínas totais

Na figura 18 mostra a síntese de proteínas totais produzidas por PMNs da “air pouch” de camundongos infectados com *P. brasiliensis* ou *P. lutzii*, tratados ou não tratados com PVB. Os resultados revelaram que há uma maior produção de proteínas totais, sendo mais significativo em PI. Em PMNs infectados e tratados com PVB houve uma maior produção de proteínas totais independente da cepa e o tempo de cultivo das células.

Figura 18 – Efeito do extrato da PVB em relação a síntese de proteínas totais por PMNs em bolsa de ar subcutânea



Fonte: da autora, 2024.

Legenda: Efeito do extrato da PVB sobre a síntese de proteínas totais, o resultado é útil para identificar a produção de proteínas produzidas por PMNs infectados com *Paracoccidoides brasiliensis* ou *Paracoccidoides lutzii*, expostos ou não ao tratamento de PVB.

Nota: Os resultados de cada grupo estão representados como médias \pm desvio padrão. Diferença estatística entre os grupos (*) $p < 0,5$ (**) $p < 0,01$ (***) $p < 0,001$ (****) $p < 0,0001$.

5.2.7 ABTS - Determinação da atividade antioxidante pela Captura do Radical-Cátion

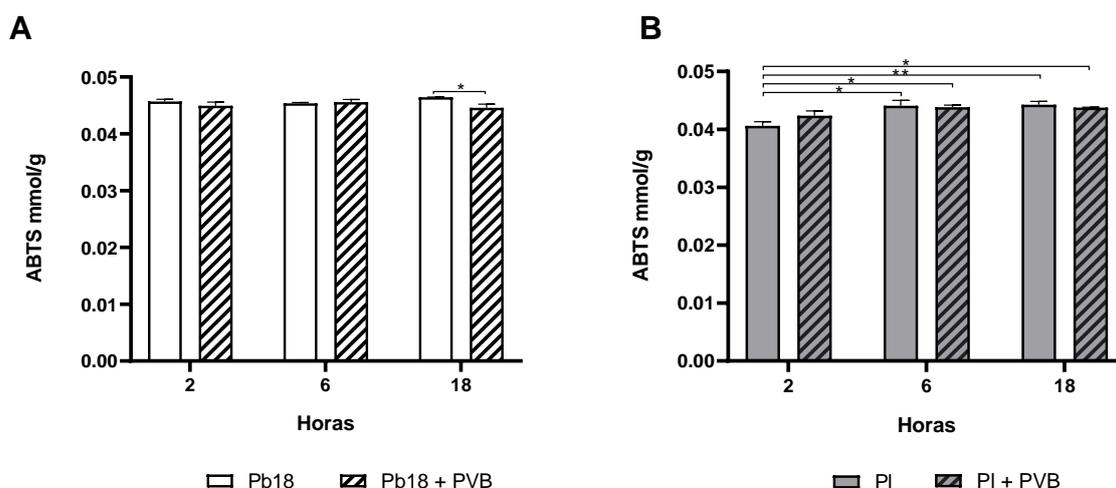
O teste de ABTS é utilizado para quantificar em uma amostra, seja ela de natureza hidrofílica ou lipofílica, a atividade antioxidante (Gouveia; Lima, 2018).

Os resultados mostraram que PMNs infectados com *P. brasiliensis* e não tratados com PVB (figura 19 A) por si só apresentam uma capacidade antioxidante

maior em relação aos PMNs infectados com *P. lutzii* e não tratados com PVB (figura 19 B).

Em relação aos grupos que receberam o tratamento com PVB, os resultados mostraram que não houve significância estatística independente do tempo de cultivo destas células.

Figura 19 – Efeito do extrato da PVB na atividade antioxidante por PMNs sobre ação do teste de ABTS



Fonte: Da autora, 2024.

Legenda: Efeito do extrato da PVB na atividade antioxidante de PMNs, neste momento é analisado a mmol/g de ABTS. (A) Níveis de ABTS na população de PMNs de *Paracoccidioides brasiliensis* quando expostos ou não ao tratamento da PVB, (B) Níveis de ABTS na população de PMNs de *Paracoccidioides lutzii* quando expostos ou não ao tratamento da PVB.

Nota: Os resultados de cada grupo estão representados como médias \pm desvio padrão. Diferença estatística entre os grupos (*) $p < 0,5$ (**) $p < 0,01$.

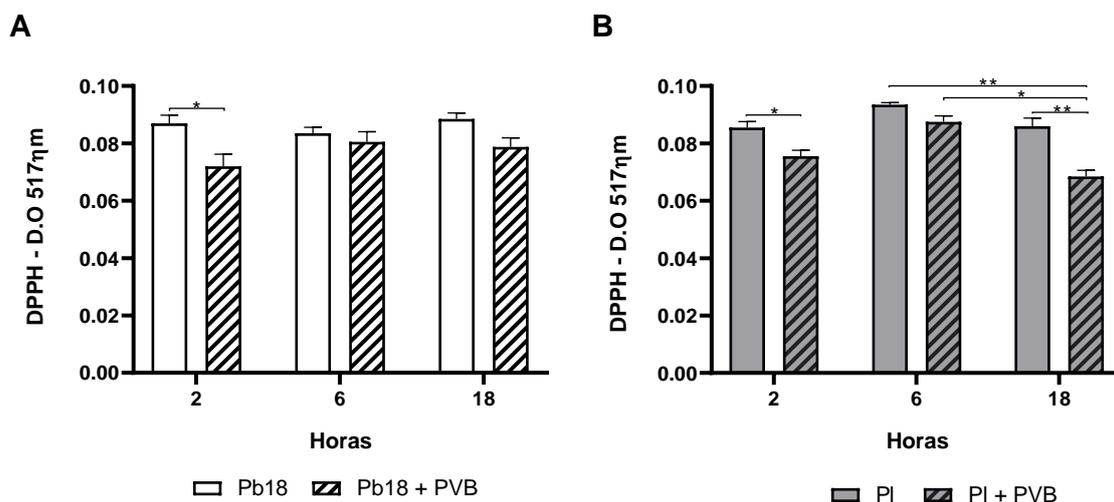
5.2.8 Determinação da atividade antioxidante por meio do DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

A análise do método antioxidante por meio do DPPH é revelada através da densidade óptica (D.O) da amostra. O DPPH possui cor forte e vibrante e após a reação com uma amostra que contém compostos antioxidantes a absorvância reduz para amarelo pálido.

A figura 20 mostra a análise de um método antioxidante, utilizando o teste de DPPH. Na figura 20A é analisada a atividade antioxidante da PVB em animais controles e expostos ao tratamento, do grupo de *Paracoccidioides brasiliensis*. No entanto, observa-se que há uma queda da D.O no grupo de animais tratados, o que

evidencia uma redução da absorvância e conseqüentemente um teor antioxidante na amostra. O mesmo fato é observado na figura 20B, com isolado fúngico de *Paracoccidioides lutzii*.

Figura 20 – Efeito do extrato da PVB na atividade antioxidante por PMNs sobre ação do teste DPPH



Fonte: da autora, 2024.

Legenda: Determinação da atividade antioxidante da PVB com base no teste de DPPH. (A) Níveis de atividade antioxidante através do DPPH secretados por PMNs de *Paracoccidioides brasiliensis* quando expostos ou não ao tratamento da PVB, (B) Níveis de atividade antioxidante através do DPPH secretados por PMNs de *Paracoccidioides lutzii* quando expostos ou não ao tratamento da PVB.

Nota: Os resultados de cada grupo estão representados como médias \pm desvio padrão. Diferença estatística entre os grupos (*) $p < 0,5$ (**) $p < 0,01$.

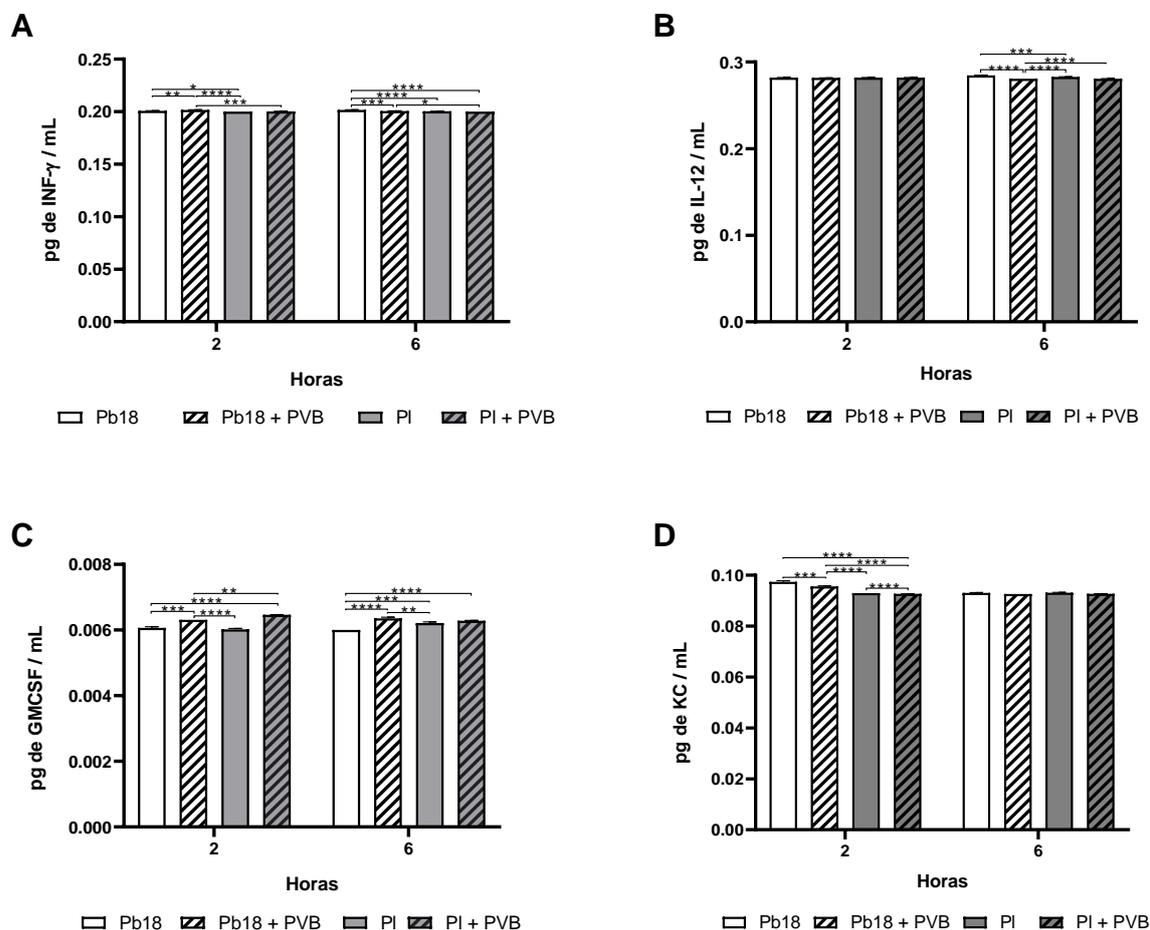
5.2.9 Dosagem de citocinas

Há uma vasta diversidade de citocinas que agem em associação às células do sistema imune, de forma a estimular, inibir ou imunomodular. As citocinas podem ser denominadas como citocinas estimuladoras ou não estimuladoras de inflamação (Varella; Forte, 2001).

As figuras 21 e 22 mostram os níveis de citocinas secretados por PMNs obtidos da bolsa de ar subcutânea tanto de camundongos infectados com *P. brasiliensis* ou *P. lutzii*, tratados ou não tratados com PVB. Em PMNs obtidos da bolsa de ar subcutânea de camundongos infectados com *P. brasiliensis* e tratados com PVB notou-se que há uma maior secreção de citocinas IL-12 e INF- γ e menor secreção de KC, GMCSF, IL-4, IL-6 e IL-10 (figura 21 A, B, C, D e 22 E, F, G). Já em

P. lutzii e também tratados com PVB há maior concentração de INF- γ e IL-12 e menor secreção de GMCSF, KC, IL-4, IL-6 e IL-10 (figura 21 A, B, C, D e 22 E, F, G).

Figura 21 – Efeito do extrato de PVB sobre a atividade de citocinas INF- γ , IL-12, GMCSF e KC secretadas por PMNs obtidos da bolsa de ar subcutânea

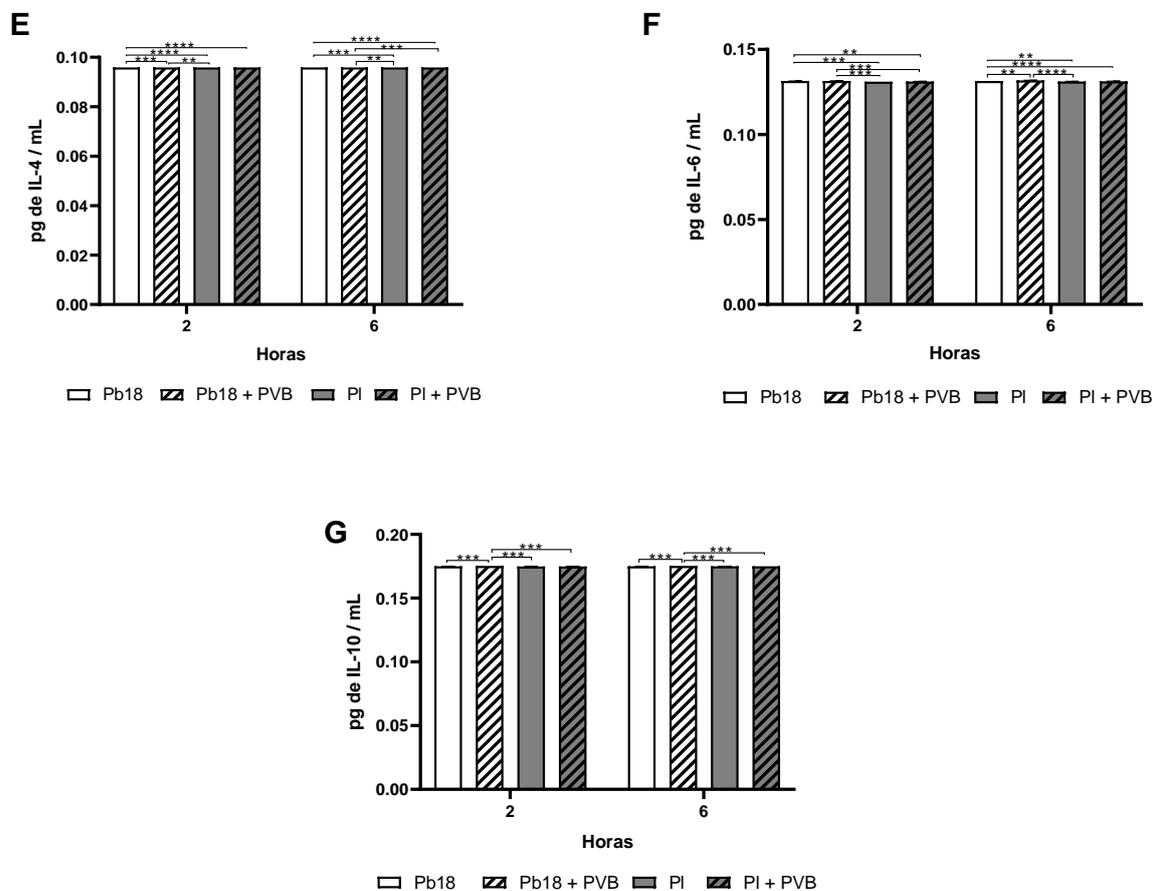


Fonte: da autora, 2024.

Legenda: Efeito do extrato da PVB sobre a atividade de citocinas produzidas por PMNs. (A) Produção de INF- γ de PMNs; (B) Produção de IL-12 de PMNs; (C) Produção de GMCSF de PMNs; (D) Produção de KC de PMNs.

Nota: Os resultados de cada grupo estão representados como médias \pm desvio padrão. Diferença estatística entre os grupos (*) $p < 0,5$ (**) $p < 0,01$ (***) $p < 0,001$ (****) $p < 0,0001$.

Figura 22 – Efeito do extrato de PVB sobre a atividade de citocinas IL-4, IL-6, e IL-10 secretadas por PMNs obtidos da bolsa de ar subcutânea



Fonte: da autora, 2024.

Legenda: Efeito do extrato da PVB sobre a atividade de citocinas produzidas por PMNs. (E) Produção de IL-4 de PMNs; (F) Produção de IL-6 de PMNs; (G) Produção de IL-10 de PMNs.

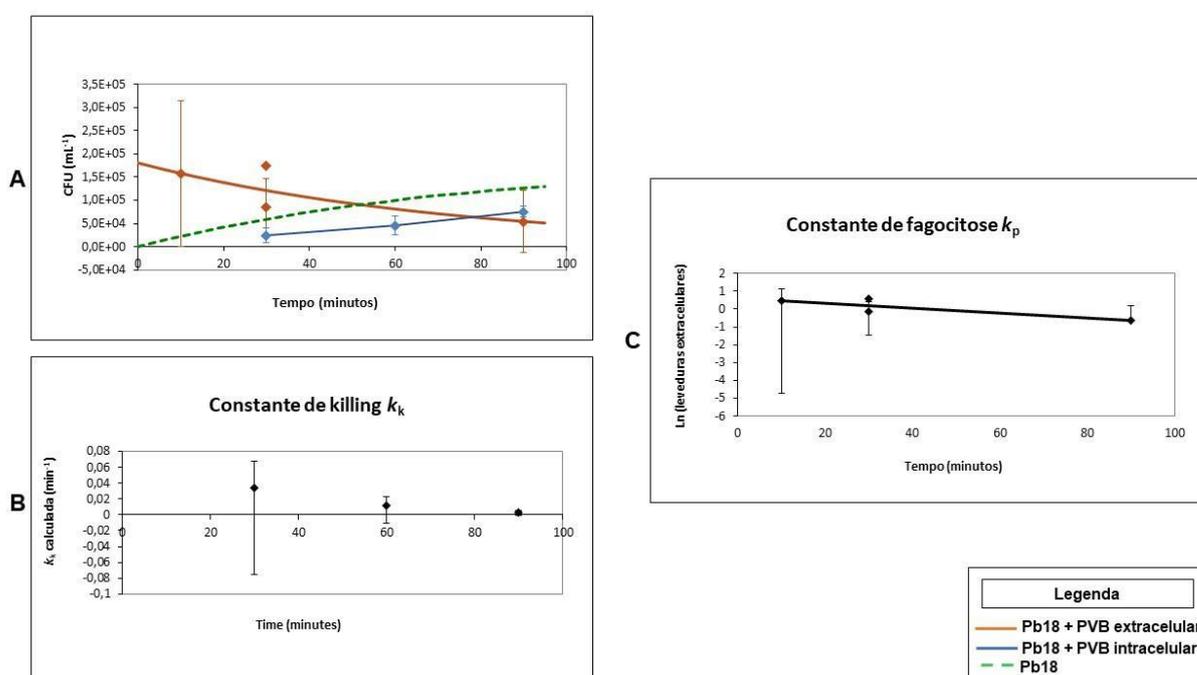
Os resultados de cada grupo estão representados como médias \pm desvio padrão. Diferença estatística entre os grupos (***) $p < 0,001$ (****) $p < 0,0001$.

5.2.10 Capacidade fagocítica de PMNs contra *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*

Os gráficos representantes da capacidade antifúngica de PMNs, de ambas cepas, é ilustrado nas figuras 23A e 24A. As curvas teóricas dos números de CFU presentes nas figuras foram geradas a partir do cálculo da constante de killing (K_k), cujo mede a capacidade dos PMNs em promover a morte das leveduras de Pb18 e PI. A constante de fagocitose (K_p), tem como função medir a atividade fagocíticas de PMNs, em tempos de 30, 60 e 90 minutos.

Analisando a cepa de *Paracoccidioides brasiliensis*, os resultados do gráfico da figura 23A mostram a curva extracelular de Pb18 (linha laranja), a qual cai discrepante ao passar do tempo, em contrapartida, o número de fungos intracelulares aumentaram (linha azul), a partir de 60 minutos. Tais fatos são evidenciados, uma vez que, grande parte das leveduras extracelulares são fagocitadas (figura 23C) e sofrem morte (figura 23B), no tempo de 30 minutos, ou seja, demonstrando um efeito satisfatório na redução de Pb18 viáveis.

Figura 23 – Atividade fagocítica de PMNs estimulados com extrato da PVB em infecção de *Paracoccidioides brasiliensis*



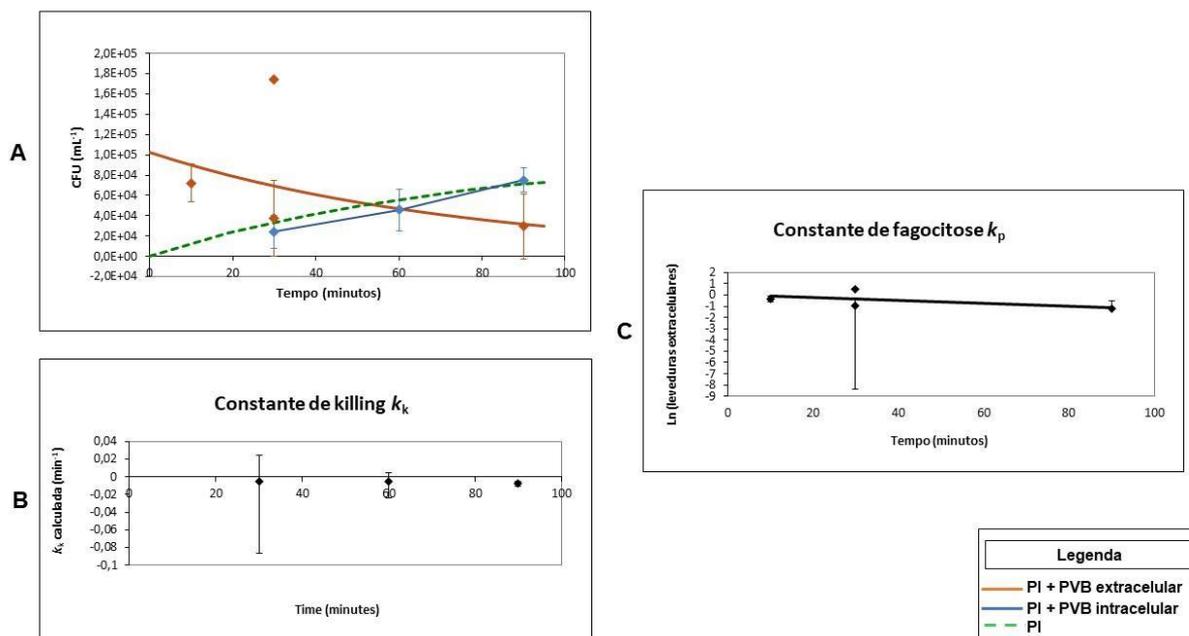
Fonte: da autora, 2024.

Legenda: Análise do perfil fagocítico de PMNs. (A) Sumário dos resultados dos testes de capacidade de fagocitose e killing de PMNs. (B) Gráfico da Constante de Killing k_k , mede a capacidade de eliminação de leveduras pelos PMNs, é um gráfico semi-logarítmico de levedura extracelulares vs. tempo. (C) Gráfico da Constante de fagocitose k_p , afere o índice de leveduras fagocitadas pelos PMNs, o cálculo para cada ponto de tempo é traçado, as barras de erro representam os desvios padrão para leveduras intracelulares. Linha verde tracejada representa a concentração de leveduras do grupo controle Pb18, que não foi tratado com PVB, linha laranja corresponde a concentração de leveduras extracelulares do grupo tratado com PVB e a linha azul a quantidade de leveduras extracelulares deste grupo.

Observando a cepa de *Paracoccidioides lutzii*, os resultados do gráfico da figura 24A demonstram ao passar do tempo uma queda significativa de PI extracelular (linha laranja) e um aumento no número de fungos intracelulares, a partir de 60 minutos. Isso ocorre, visto que, grande parte dos números de PI são fagocitados, assim como é encontrado no tempo de 30 minutos pela K_p (figura 24C),

onde ocorre a morte das leveduras, como expresso em K_k (figura 24B), ou seja, a partir do momento em que níveis de extracelulares diminuem, ocorre a fagocitose e posteriormente a morte de fungos viáveis.

Figura 24 – Atividade fagocítica de PMNs estimulados com extrato da PVB em infecção de *Paracoccidioides lutzii*



Fonte: da autora, 2024.

Legenda: Análise do perfil fagocítico de PMNs. (A) Sumário dos resultados dos testes de capacidade de fagocitose e killing de PMNs. (B) Gráfico da Constante de Killing k_k , mede a capacidade de eliminação de leveduras pelos PMNs, é um gráfico semi-logarítmico de levedura extracelulares vs. tempo. (C) Gráfico da Constante de fagocitose k_p , afere o índice de leveduras fagocitadas pelos PMNs, o cálculo para cada ponto de tempo é traçado, as barras de erro representam os desvios padrão para leveduras intracelulares. Linha verde tracejada representa a concentração de leveduras do grupo controle PI, que não foi tratado com PVB, linha laranja corresponde a concentração de leveduras extracelulares do grupo tratado com PVB e a linha azul a quantidade de leveduras extracelulares deste grupo.

6 DISCUSSÃO

A PCM é uma infecção fúngica prevalente nas Américas e com alta incidência, em especial no Brasil (Ferreira, 2009). Apesar de ser uma doença fúngica sem índice de notificação compulsória, sabe-se que esta micose atinge diversos indivíduos anualmente, em nosso país. A epidemiologia mostra que há um aumento do número de indivíduos portadores, além disso, há um arsenal terapêutico com números reduzidos de fármacos em relação ao que é disponível no tratamento das infecções bacterianas. É válido ressaltar que é longo o prazo de tratamento, o que é relatado por Santos *et al* (2020). Pensando neste fato, a utilização do extrato da PVB pode ser uma terapia complementar associado ao tratamento medicamentoso, justamente, por se tratar de um produto natural descrito na literatura por obter compostos capazes de manifestar atividades biológicas como anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante e outras.

A PVB é um tipo de própolis exclusiva no Brasil. A composição de uma própolis é determinada principalmente pelas características fitogeográficas existentes ao redor da colmeia. Entretanto, a composição da própolis também varia sazonalmente em uma mesma localidade (Sforcin; Bankova, 2011).

A amplitude das atividades farmacológicas da própolis é maior em regiões tropicais do planeta e menor nas regiões temperadas, refletindo a diversidade vegetal destas regiões: nas regiões tropicais a diversidade vegetal é muito superior à diversidade observada nas regiões temperadas. Embora a composição química da própolis seja um dado extremamente importante, suas distintas atividades farmacológicas podem também decorrer do sinergismo entre seus diversos compostos químicos. Os principais compostos químicos isolados da própolis, até o momento, podem ser organizados em alguns grupos principais como: ácidos e ésteres alifáticos, ácidos e ésteres aromáticos, açúcares, álcoois, aldeídos, ácidos graxos, aminoácidos, esteróides, cetonas, charconas e di-hidrocharconas, flavonóides (flavonas, flavonóis e flavononas), terpenóides, proteínas, vitaminas B1, B2, B6, C, e também, diversos minerais (Moise; Bobis, 2020; Sforcin *et al.*, 2012).

Os resultados iniciais *in vitro* foram de extrema importância para elucidar o efeito da PVB sobre diferentes cepas de *Paracoccidioides* spp. (figura 9, 10 e 11). Estes dados são inéditos, uma vez que, há poucos relatos sobre a descrição da interação de *P. lutzii* com o sistema imune e avaliação microbicida. Os resultados *in*

vitro se mostraram promissores, pois foi evidenciado que há uma redução do número de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* viáveis quando tratados com PVB na concentração de 500mg/mL (figura 9).

Ao analisar se a concentração testada de PVB apresentava toxicidade sobre cultura de células esplênicas, os resultados mostraram que há um maior número e viabilidade das células (figura 10). Os achados acima citados podem ser correlacionados de maneira satisfatória com os resultados de Kucharzewski *et al.*, (2013), o qual evidenciou que a própolis possui propriedades imunomoduladoras capazes de estimular a regeneração de tecidos, fatores antioxidantes e radioprotetores. Também Sforcin e Bankova (2011) descrevem que a própolis está associada em estimular o sistema imunológico *in vitro*, além de ativar os mecanismos envolvidos na morte de microrganismos (Sfocin, 2016). Além destes autores, há também Orsi *et al.*, (2012) e Piana e Sforcin, (2016), ambos vêm estudando os efeitos do extrato da própolis juntamente com medicamentos, em uma ação combinatória, estes estudos são realizados a fim de investigar uma futura redução do tempo de tratamento e consequentemente os efeitos colaterais em pacientes, em fase de tratamento.

Neste trabalho foi utilizado o extrato etanólico da PVB. Autores como Fosqueira *et al.*, 2008, na busca pelo efeito da própolis sobre microrganismos, menciona a obtenção de resultados satisfatórios quando aplicado o extrato etanólico sobre microrganismos como *Candida albicans*, estes achados são similares aos apresentados em nossa pesquisa, visto que, foi capaz de reduzir significativamente as unidades formadoras de colônias, tanto de *Paracoccidioides brasiliensis* assim como de *Paracoccidioides lutzii*.

O extrato da própolis utilizado durante a pesquisa foi diluído por meio do veículo álcool etílico. O diluente utilizado não afetou a viabilidade de esplenócitos e células fúngicas, o que também foi correlacionado com a pesquisa de Pietta *et al.*, (2002), no qual o álcool etílico é o solvente mais utilizado para a diluição da própolis justamente por não interferir na ação dos ativos biológicos.

O segundo passo deste trabalho foi avaliar o efeito de PVB no modelo de infecção *ex vivo*. Ao avaliar a população celular que migrou para "air pouch", foi possível constatar a presença de um número significativo de PMNs. O número absoluto de células presentes nas bolsas de camundongos infectados com Pb18 e tratados com PVB foi menor em relação aos que não receberam tratamento (figura

13A), o que se difere de PI (figura 13A). A literatura descreve que PMNs de pacientes infectados com *Paracoccidioides* spp. são deficientes em eliminar o fungo, porém observa-se nestes resultados que, embora tenham uma menor migração de PMNs para a “air pouch”; aparentemente estes estão metabolicamente mais ativos nos camundongos que receberam o tratamento com PVB (figura 13C).

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são fatores que demarcam o estresse celular juntamente com os níveis de radicais livres que são tóxicos para o organismo. No entanto, a avaliação de enzima catalase e liberação de peróxido de hidrogênio nesta etapa demonstram uma quebra da cascata do estresse oxidativo às células, ocasionado no ambiente celular (Barreiros *et al.*, 2006; Duda, 2013). Na amostragem de PMNs obtidos de “air pouch”, do grupo infectado com *Paracoccidioides brasiliensis* e tratados com PVB, há uma maior liberação de óxido nítrico (NO) nos tempos de 2 e 18 horas (figura 17D). Ainda sobre este grupo experimental foi possível observar uma menor liberação de peróxido de hidrogênio e enzima catalase (figura 17A e 17C). Este fato demonstra que existe um dano celular, já que não apresentam níveis maiores de H₂O₂ e CAT. Nos camundongos infectados com *Paracoccidioides lutzii* e tratados com PVB existe uma queda na liberação de NO e maior síntese de enzima catalase em 2 e 18 horas (figura 17D, 17B). Isto demonstra uma conversão do estado de estresse oxidativo em um ambiente menos agressor para célula. Este mesmo resultado é evidenciado por Orsi *et al.*, (2000) o qual relata que a própolis possui a capacidade de inibir a produção de óxido nítrico.

O índice de ABTS, consiste na determinação da atividade antioxidante pela captura do radical-cátion. Está técnica é utilizada para identificar o nível de atividade antioxidante total de uma amostra (De Melo *et al.*, 2014; Gouveia; Lima, 2018). Sendo assim, são denominados antioxidantes aquelas substâncias capazes de reduzir ou inibir a oxidação (Thomas, 2000; De Melo *et al.*, 2014). De acordo com os dados obtidos no presente estudo, a PVB possui propriedade biológica antioxidante principalmente em no tempo de 2 horas, sobre PMNs obtidos de camundongos infectados com *P. lutzii* (figura 19B). Este achado corrobora com diversos autores, como: Ito *et al.*, (2001), Alencar *et al.*, (2007), Sawaya *et al.*, (2011) e, por fim, De Melo *et al.*, (2014), os quais citam a presença de atividade antioxidante neste produto natural. Além destes estudos, Fabris *et al.*, analisou e comparou as propriedades das própolis italiana, russa e brasileira e os resultados observados é que o extrato etanólico da própolis de origem italiana e russa possui atividades

antioxidantes iguais, pelo fato de possuírem composição polifenólica iguais, por outro lado, a própolis de origem brasileira possui uma menor composição polifenólica, gerando uma atividade biológica antioxidante fraca. Este achado pode explicar o fato da presença antioxidante da PVB ter sido apenas no tempo de 2 horas de tratamento (Fabris *et al.*, 2013; Silva-Carvalho; Baltazar; Almeida-Aguiar, 2015).

Ao observar a concentração de proteínas totais encontradas na cultura de PMNs obtidos da “air pouch”; observa-se um aumento na quantidade de proteínas secretadas tanto nos camundongos infectados com *P. brasiliensis* quanto *P. lutzii*, tratados com o extrato de PVB (figura 18). No entanto, observa-se que há uma produção maior de proteínas totais de PMNs infectados com *P. lutzii*, achados como estes são similares aos estudos de Felipe *et al.*, (2005) e da Silva Neto *et al.*, (2014), os quais, descrevem que, enquanto a resposta imune celular contra *P. brasiliensis* é comumente conhecida por reações inflamatórias de característica granulomatosa, lesões disseminadas e altos índices de anticorpos, o *P. lutzii* têm demonstrado uma resposta imune celular específica com uma expressão gênica e foco na secreção de proteínas (Siqueira *et al.*, 2015).

A primeira célula a migrar para o local da lesão é o neutrófilo. Os neutrófilos têm uma participação importante no controle da disseminação do *Paracoccidioides* spp., as funções exercidas pelo neutrófilo como morte do fungo, faz-se necessário a secreção de citocinas. Para isso, neste estudo foi realizado a dosagem da concentração de citocinas secretadas por PMNs recrutados da bolsa de ar subcutânea, infectados com *P. brasiliensis* ou *P. lutzii*; para evidenciar quais são secretadas na presença de PVB (figura 21 e 22). Existem citocinas, classificadas entre estimuladoras ou não estimuladoras, também conhecidas como pró e anti-inflamatórias (Varella; Forte, 2001). De acordo com Sforcin (2016) a PVB possui mecanismos capazes de modular o sistema imune, especialmente a imunidade específica. Isto também é citado por Búfalo *et al.*, (2014) o qual menciona a própolis com efeito imunomodulador em receptores celulares, ações fungicidas e sendo capaz de exercer atividade sobre a produção de citocinas, em humanos, a depender da dose.

Em relação a síntese de proteínas, PMNs infectados com *Paracoccidioides brasiliensis* e tratados com PVB há uma maior secreção de citocinas IL-12 e INF- γ e menor secreção de GMCSF, KC, IL-4, IL-6 e IL-10. Já em PMNs infectados com

Paracoccidioides lutzii e tratados com extrato da PVB também há maior concentração de IL-12 e INF- γ . Estes resultados são opostos ao reportado por Sforcin (2016), na qual a própolis foi capaz de ativar células dendríticas e a produção de IL-6 e IL-10. Além disso, Szliszka *et al.*, (2013) em uma análise sobre o efeito da Artepilin C (composto químico presente na PVB) em macrófagos RAW264.7 evidenciou que há uma inibição na produção de algumas citocinas, dentre elas a KC (quimiocina derivada de queratinócitos) (Sforcin, 2016), o que se associa ao achado.

Ainda sobre a participação dos PMNs, a atividade fagocítica destas células foram melhoradas com o tratamento de PVB (figura 23 e 24). O extrato de PVB foi capaz de imunoestimular estas células. Tal atividade biológica pode ser atribuída a este composto natural, visto que, apresenta compostos biológicos que podem estar atuando na estimulação celular. Este resultado pode ser comprovado por meio da viabilidade celular, pois há uma maior ativação das células tratadas (figura 13C). Também, a PVB pode estar ajudando as células a se tornarem mais eficientes mesmo estando em menor quantidade (figura 13A, 13B).

Contudo, de acordo com os resultados apresentados, os mesmos são promissores, pois a literatura descreve que os neutrófilos de pacientes acometidos com ambas espécies patogênicas, *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, não apresentam uma resposta satisfatória na eliminação do fungo (Burger *et al.*, 2021). Portanto, o uso da PVB pode ser uma nova terapia complementar para o tratamento da PCM.

7 CONCLUSÕES

A partir do modelo *in vitro* é possível confirmar que o extrato da PVB possui efeito diretamente sobre células do sistema imune, uma vez que, há maior viabilidade celular quando submetidas ao tratamento. Também, a PVB demonstrou ação sobre culturas de *Paracoccidioides* spp., reduzindo a quantidade de células fúngicas viáveis.

Na análise do modelo *ex vivo* é identificado a ação da PVB sobre os PMNs recrutados na bolsa de ar subcutânea, evidenciando que o extrato possui um poder de estimular a ação dos PMNs, uma vez que, há o aumento da viabilidade e de citocinas que conferem a resistência do organismo ao fungo. Além disso, a PVB reduziu células leveduriformes no teste de unidades formadoras de colônias, em ambos grupos.

Contudo, a própolis verde brasileira foi capaz de imunomodular o sistema imune, uma vez que, animais tratados possuem maior atividade de PMNs, além disso, reduziu o número de fungos viáveis e estimulou a produção de proteínas totais e citocinas ligadas a resposta do tipo Th1. Nesse sentido, a aplicação do extrato da PVB pode ser um fator promissor ao longo do tratamento e desfecho da micose.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. C, p. 121-126, 1984.
- AKAO Y. *et al.* Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 26, n. 7, p. 1057-1059, 2003.
- AL-DUAIS, M. *et al.* Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: use of different assays. **European Food Research and Technology**, v. 228, n. 5, p. 813–821, 2009.
- ALENCAR, S. M. *et al.* Chemical composition and biological activity of a new type of brazilian propolis: red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278-283, 2007.
- BARBOSA, W.; DAHER, R.; OLIVEIRA, A. R. Forma linfático-abdominal da blastomicose sul-americana. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 10, n. 1, p. 16-27, 1968.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, n.1, v. 29, p. 113-123, 2006.
- BASTOS, E. M. A. F. *et al.* Interação entre *Apis mellifera L* e *Baccharis dracunculifolia DC*, que favorece a produção de própolis verde em Minas Gerais. **Braz. J. Biol.**, v. 71, n. 3, p. 727-734, 2011.
- BELLISSIMO-RODRIGUES, F. *et al.* Endemic paracoccidioidomycosis: relationship between clinical presentation and patients' demographic features. **Med. Mycol.**, v. 51, n. 3, p. 313-318, 2013.
- BENARD, G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4, p.209-221, 2008.
- BIAGIONI, L. M. V. *et al.* Imunoglobulinas e C3 no granuloma paracoccidióidico. **Rev. Ist. Med. Trop.**, v. 29, n. 2, p. 97-103, 1987.
- BOCCA, A. L. *et al.* Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. **J. Immunol.**, v. 6, n. 161, p. 3056-3063, 1998.
- BONFIM, C. V.; MAMONI, L. R.; BLOTTA, M. H. S. L. TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medical Mycology**, v. 47, p. 722–733, 2009.

BRITO, M. M. S. **Morfologia, virulência e perfil genético de *Paracoccidioides brasiliensis*: avaliação pré e pós-passagem em modelo murino de isolados provenientes de forma clínica crônica humana da paracoccidioidomicose.** 2012. 118f. Tese (Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2012.

BÚFALO, M. C. *et al.* O efeito imunomodulador da própolis na expressão de receptores, produção de citocinas e atividade fungicida de monócitos humanos. **J. Pharm. Pharmacol**, v. 66, p.1497-1504, 2014.

BURGER, E. Paracoccidioidomycosis protective immunity. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 1–26, 2021.

CALICH, V. L. G.; KASHINO, S. S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, n. 5, p. 615-623, 1998.

CORDOVA, L. A.; TORRES, J. **Paracoccidioidomicose.** Ilha do Tesouro: Publicação StatPearls, 2021. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563188/?report=reader#_NBK563188_pubd_et_. Acesso em: 13 dez. 2022.

COSTA, D. L. *et al.* Effect of interleukin-10 on the *Paracoccidioides brasiliensis* killing by gamma-interferon activated human neutrophils. **Microbiol Immunol**, v. 1, n. 51, p. 73-80, 2007.

DA SILVA NETO, B. R. *et al.* Transcriptional profile of *Paracoccidioides* spp. in response to itraconazole. **BMC Genomics**, v. 1, n. 15, p. 1-15, 2014.

DE-MELO, A. A. M. *et al.* Capacidade antioxidante da própolis. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, n. 3, p. 341-348, 2014.

DIAZ, M. *et al.* A Pan-American 5-year study of fluconazole therapy for deep mycoses in the immunocompetent host. Pan-American Study Group. **Clin. Infect. Dis.**, v. 14, n. 1, p. 68-76, 1992.

DUDA, N. C. B. **Estresse oxidativo.** Porto Alegre: Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/lacvet/site/wp-content/uploads/2013/10/estresse-oxidativo-Naila.pdf>. Acesso em: 5 jan. 2023.

FABRIS, L. R. *et al.* Diminuição da prevalência da forma clínica aguda/subaguda da paracoccidioidomicose no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 2, n. 56, p. 121-125, 2014.

FABRIS, S. *et al.* Propriedades antioxidantes e relação com a composição química da própolis europeia e brasileira. **Farmacologia e Farmácia**, v. 1, n. 4, p. 46-51, 2013.

FAVA NETTO, C. Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na blastomicose sulamericana, com antígeno polissacarídico. **Arq. Cir. Clin. Exp. S. Paulo**, v. 18, p. 1997-2254, 1955.

FERREIRA, M. S. Paracoccidioidomycosis. **Pediatric Respiratory Reviews**, v. 10, n. 4, p. 161-165, 2009.

FORTES, M. R. P. *et al.* Immunology of paracoccidioidomycosis. **An. Bras. Dermatol.**, v. 86, n. 3, p. 516-525, 2011.

FOSQUEIRA, E. C. *et al.* Efeito da própolis no crescimento *in vitro* de microrganismos associados à periodontite em pacientes HIV-positivo. **Periodontia**, v. 18, n. 3, p. 77-82, 2008.

FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **Medical Mycology**, v. 25, n. 1, p. 5-18, 1987.

GHISALBERTI, L. E. Propolis: a review. **Bee World**, v. 2, n. 60, p. 59–84, 1979.

GOUVEIA, A. M. S.; LIMA, G. P. P. **ABTS**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2018. Disponível em: <https://www.ibb.unesp.br/Home/ensino/departamentos/quimicaebioquimica/metodo-de-atividade-antioxidante-abts.pdf>. Acesso em: 22 maio 2023.

GREEN, L. C. *et al.* Analyses of nitrate, nitrite and nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v.126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GRISOLIA, J. C. **Avaliação do tratamento da paracoccidioidomicose experimental com uso do antifúngico itraconazol associado com aplicação de laser de baixa potência**. 2020. 114f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2020. Disponível em: <https://btd.unifal-mg.edu.br:8443/handle/tede/1583>. Acesso em: 04 abr. 2023.

ITO, J. *et al.* Atividade anti-HIV de derivados do ácido morônico e do novo triterpenóide relacionado à meliferona isolado da própolis brasileira. **J. Nat. Prod.**, v. 64, p. 1278-1281, 2001.

KUCHARZEWSKI, M. S. *et al.* Stan scheller: the forerunner of clinical studies on using propolis for poor and chronic nonhealing wounds. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-5, 2013.

LACAZ, C. S. Evolução histórica do conhecimento sobre a paracoccidioidomicose e seu agente etiológico, *Paracoccidioides brasiliensis*. In: FRANCO, M. *et al.* (Ed.). **Paracoccidioidomicose**. 1. ed. Boca Raton: Imprensa CRC, 1994.

LEMONS, M. *et al.* *Baccharis dracunculifolia*, the main botanical source of Brazilian green propolis, displays antiulcer activity. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 59, n. 4, p. 603-608, 2007.

LIMA, M. G. **A produção de própolis no Brasil**. São Sebastião da Gramma: Impressos São João Editora e Gráfica, 2006.

LONGO, L. V. *et al.* Characterization of cell wall lipids from the pathogenic phase of *Paracoccidioides brasiliensis* cultivated in the presence or absence of human plasma. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. 1-12, 2013.

LUGO, E. *et al.* Determinación del origen botánico de los propóleos sonorenses (CABORCA) mediante HPLC. **Invurnus**, v. 4, n. 2, p. 24-30, 2009.

MACHADO, G. C. *et al.* Cryptic species of *Paracoccidioides brasiliensis*: impact on paracoccidioidomycosis immunodiagnosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 5, n. 108, p. 637-643, 2013.

MACHADO, L. P. *et al.* Lesão oxidativa eritrocitária e mecanismos antioxidantes de interesse em Medicina Veterinária. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 8, n. 1, p. 84-94, 2009.

MAMONI, R. L.; BLOTTA, M. H. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. **Cytokine**, v. 32, n. 1, p. 20-29, 2005.

MARQUES, S. A. Paracoccidioidomycosis. **Clin. Dermatol.**, v. 6, n. 30, p. 610-615, 2012.

MARTÍNEZ, R. Epidemiology of paracoccidioidomycosis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 19, n. 57, p. 11 - 20, 2015.

MATUTE, D. R. *et al.* Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol. Biol. Evol.**, v. 23, n. 1, p. 65-73, 2006.

MELONI-BRUNERI, L. H. *et al.* Neutrophil oxidative metabolism and killing of *P. brasiliensis* after “air pouch” infection of susceptible and resistant mice. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 59, n. 4, p. 526–533, 1996.

MENDES, R. P.; NEGRONI, R.; ARECHAVALA, A. Treatment and control of cure. **Paracoccidioidomycosis**, p. 373-391, 1994.

MENEZES, H. Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato aquoso de *Baccharis dracunculifolia*. **Arq. Inst. Biol.** v. 72, n. 2, p. 1-64, 2005.

MIHAI, C. M. *et al.* Correlação entre o perfil polifenólico e a atividade antioxidante da própolis da Transilvânia. **Ciência Animal e Biotecnologias**, v. 44, n. 2, p. 100-103, 2011.

MOISE, A. R.; BOBIS, O. *Baccharis dracunculifolia* e *Dalbergia ecastophyllum*, main plant sources for bioactive properties in green and red Brazilian propolis. **Plants**, v. 9, n. 11, p. 16-19, 2020.

- MOREIRA, A. P. V. Paracoccidioidomycosis: historical, etiologic agent, epidemiology, pathogenesis, clinical forms, laboratory diagnosis and antigens. **Bol. Epidemiol. Paul.**, v. 5, n. 51, p. 11–23, 2008.
- MURAD, J. M. *et al.* Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, n. 3, p. 331-334, 2002.
- NARANJO, M. S. *et al.* Treatment of paracoccidioidomycosis with itraconazole. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 28, n. 1, p. 67-76, 1990.
- OLIVEIRA, M. C.; SCHOFFEN, J. P. F. Oxidative stress action in cellular aging. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 6, p. 1333-1342, 2010.
- ORSI, R. O. *et al.* Ação imunomoduladora da própolis na ativação de macrófagos. **J. Venom. Anim. Toxins.**, v. 6, n. C., p. 205-2019, 2000.
- ORSI, R. O. *et al.* Efeitos antibacterianos da própolis brasileira e búlgara e efeitos sinérgicos com antibióticos atuando no DNA bacteriano e ácido fólico. **Nat. Prod. Res.**, v. 26, n. C, p. 344–349, 2012.
- ORSI, R. O. *et al.* Os efeitos da própolis brasileira e búlgara *in vitro* contra *Salmonella Typhi* e seu sinergismo com antibióticos de ação ribossomal. **Nat Prod Res**, v. 26, n. 5, p. 430–437, 2012.
- PALMEIRO, M.; CHERUBINI, K.; YURGEL, L. S. Paracoccidioidomicose–revisão da literatura. **Scientia Medica**, v. 15, n. 4, p. 274-278, 2005.
- PARK, Y. K. *et al.* Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v. 2, p. 997-1003, 2002.
- PIANA, G. M.; SFORCIN, J. M. **Composição odontológica para controle da placa bacteriana**. Depositante: José Maurício Sforcin e Gilce Maria Piana. Patente: BR102015003982-4. Data de depósito: 25/02/2015. Data da publicação: 20/09/2016. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/items/1f6d126d-a158-4573-9c59-f1017991ba85>. Acesso: 27 jun. 2023.
- PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **Journal of Immunological Methods**, v. 38, n. 1–2, p. 161–170, 1980.
- PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **Journal of Immunological Methods**, v. 46, n. 2, p. 211–226, 1981.
- PIETTA, P. G.; GARDANA, C.; PIETTA, A. M. Analytical methods for quality control of propolis. **Fitoterapia**, v. 73, n. 1, p. 7-20, 2002.

PINA, A.; BERNARDINO, S.; CALICH, V. L. G. Alveolar macrophages from susceptible mice are more competent than those of resistant mice to control initial *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **J. Leukoc. Biol.**, v. 83, n. 5, p. 1088-1099, 2008.

QUEIROZ-TELLES, F. *et al.* An open-label comparative pilot study of oral voriconazole and itraconazole for long-term treatment of paracoccidioidomycosis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 45, n. 11, p. 1462-1469, 2007.

RAMOS, S. M.; SARAIVA, L. E. Paracoccidioidomycosis. **Dermatol Clin**, v. 26, n. 2, p. 257-269, 2008.

RESTREPO, A. *et al.* Ketoconazole: a new drug for the treatment of paracoccidioidomycosis. **Rev. Infect. Dis.**, v. 2, n. 4, p. 633-642, 1980.

RIANI, L. R. *et al.* Desenvolvimento e validação de método uhplc-esi-ms/ms para quantificação de artepillin c em própolis verde brasileira. **Rev. Fazenda. Básico e Appl.**, v. 42, n. C., p. 1-13, 2021.

ROCK, C. L.; JACOB, R. A.; BOWEN, P. E. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrientes: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 96, p. 693-702, 1996.

RODRIGUES, A. M. *et al.* *Paracoccidioides* e paracoccidioidomicose no século XXI. **Micopatologia**, v. 188, n. 1-2, p. 129-133, 2023.

SALATINO, A. *et al.* Origin and chemical variation of brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 33-38, 2005.

SANTOS, L. A. *et al.* Brazilian red propolis shows antifungal and immunomodulatory activities against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 277, p. 114-181, 2021.

SANTOS, L. A. *et al.* Medication association and immunomodulation: an approach in fungal diseases and in particular in the treatment of paracoccidioidomycosis. **Acta Tropica**, v. 206, p. 1-8, 2020.

SAWAYA, A. C. H. F.; CUNHA, I. B. S.; MARCUCCI, M. C. Analytical methods applied to diverse types of brazilian propolis. **Chemistry Central Journal**, v. 5, n. 27, 10p., 2011.

SFORCIN, J. M. Biological properties and therapeutic applications of propolis. **Phytother Res.**, v. 30, n. 6, p. 894-905, 2016.

SFORCIN, J. M. *et al.* **Baccharis dracunculifolia: uma das principais fontes vegetais da própolis brasileira**. 1. ed. São Paulo: Editora Unesp, 2012.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs?. **J. Ethnopharmacol**, v. 133, n. 2, p. 253-260, 2011.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. *et al.* Consenso em paracoccidiodomicose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 297-310, 2006.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. *et al.* II consenso brasileiro em paracoccidiodomicose-2017. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 27, p. 1-34, 2018.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. *et al.* Guidelines in paracoccidiodomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 297-310, 2006.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. Paracoccidiodomycosis treatment. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 19, p.31-37, 2015.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. *et al.* Randomized trial with itraconazole, ketoconazole and sulfadiazine in paracoccidiodomycosis. **Med. Mycol.**, v. 40, n. 4, p. 411-417, 2002.

SILVA, A. A. F. *et al.* In-vitro trypanocidal activity evaluation of crude extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* DC (*Asteraceae*) **J. Pharm. Pharmacol.**, v.56, p. 1195-1199, 2004.

SILVA-CARVALHO, R.; BALTAZAR, F.; ALMEIDA-AGUIAR, C. Própolis: um produto natural complexo com uma infinidade de atividades biológicas que podem ser exploradas para o desenvolvimento de medicamentos. **Medicina Complementar e Alternativa Baseada em Evidências**, v. 2015, n. 8, p. 29, 2015.

SIQUEIRA, I. M. *et al.* Distinct patterns of yeast cell morphology and host responses induced by representative strains of *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) and *Paracoccidioides lutzii* (Pb01). **Sabouraudia**, v. 54, n. 2, p. 177-188, 2015.

SOARES, C. M. *et al.* Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 2, p. 505-507, 1995.

SZLISZKA, E. *et al.* Inibição da resposta inflamatória por artepilin C em macrófagos RAW264.7 ativados. **Evid. Alternat. Med.**, v. 13, p. 1-7, 2013.

TAVARES, A. H. F. P. *et al.* Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages **Microbes Infect**, v. 9, n. 5, p. 583-590, 2007.

THOMAS, M. J. The role of free radicals and antioxidants. **Nutrition**, v. 16, n. 7-8, p. 8-16, 2000.

TIVERON, A. P. *et al.* Chemical characterization and antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of South Brazilian organic propolis. **PLoS ONE**, v. 11, p. 1-18, 2016.

TOYOTANI, B. J. S.; DE SOUZA, E. B. A. Incidência da paracoccidiodomicose no estado de Rondônia-2011 a 2014. **Saber Científico**, v. 8, n. 2, p. 104-113, 2021.

VARELLA, P.; FORTE, W. C. N. Citokines: a review. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 24, n. 4, p. 146-154, 2001.

ANEXOS

Neste campo, será anexado documentos relacionados a regularização do uso de animais na pesquisa, por meio do Comitê de Ética no Uso de Animais, da Universidade Federal de Alfenas. Além disso, a apresentação de materiais suplementares do projeto.

ANEXO A – CERTIFICADO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG
Lei nº 11.154, de 29 de julho de 2005
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIFAL-MG

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIFÚNGICA DA PRÓPOLIS VERDE**, registrada com o nº **0034/2022**, sob a responsabilidade de **Eva Burger**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica**, com vigência de **02/09/2022 a 02/09/2023**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Espécie/linhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem
Camundongo / Swiss	40	0	40	Biotério central da unifal

Alfenas, 29 de Setembro de 2022

Prof(a). Dr(a). Pollyanna Francielli de Oliveira
Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG

Para verificar autenticidade acesse: <http://sistemas.unifal-mg.edu.br/cepa/ceua/autenticidadecertificado/> e digite a chave: 6672407068161561bd32457173ee53

ANEXO B – MATERIAL SUPLEMENTAR

1 Análise da própolis verde brasileira

Para análise físico química da própolis verde brasileira foi realizado, por meio do espectrofotômetro, a determinação dos compostos fenólicos totais. O teste demonstra a quantidade de compostos fenólicos, de modo geral.

Quadro 3 – Análise físico química da PVB por meio do teste de espectrofotômetro

Resultados físico químicos			
Ensaio	Resultado	Unidade	Referência
Compostos fenólicos (Espectrofotometria) (g/100g) (LQ <1,50 g/100g)	4,03	g/100g	MTFQ-046
<small>Legenda: LQ - Limite de Quantificação / VR - Valor de Referência / NA - Não Aplicável</small>			

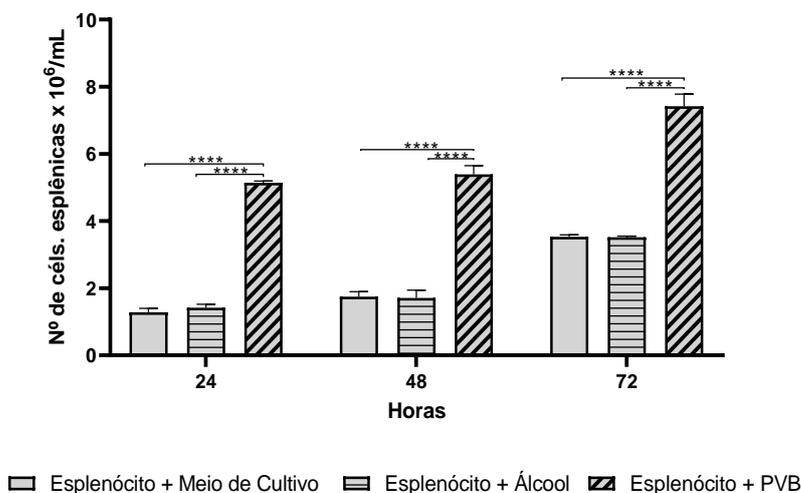
Fonte: da autora, 2024.

2 Análise da citotoxicidade do veículo de diluição

O veículo de diluição utilizado no preparo do extrato da PVB foi o álcool absoluto, na concentração de 10% (1:10). Para a análise da citotoxicidade do álcool, o mesmo foi adicionado sobre esplenócitos, em co-cultivo. Após este processo foi feito a quantificação de esplenócitos viáveis, níveis de metabolização de desidrogenases mitocondriais e o número de CFU. No entanto, foi observado que o veículo de diluição não apresentou citotoxicidade aos esplenócitos (figura 25) e, também, não foi capaz de reduzir os números de fungos viáveis, uma vez que, amostra o qual continha o veículo se manteve similar ao controle (figura 26).

Vale ressaltar que, o extrato da PVB possui coloração forte em tons verde exército, nesse viés ao ser manuseada e adicionada em placas de leitura de D.O a mesma possui maior absorbância devido a intensidade de sua cor.

Figura 25 – Efeito do veículo de diluição sobre cultura de esplenócitos

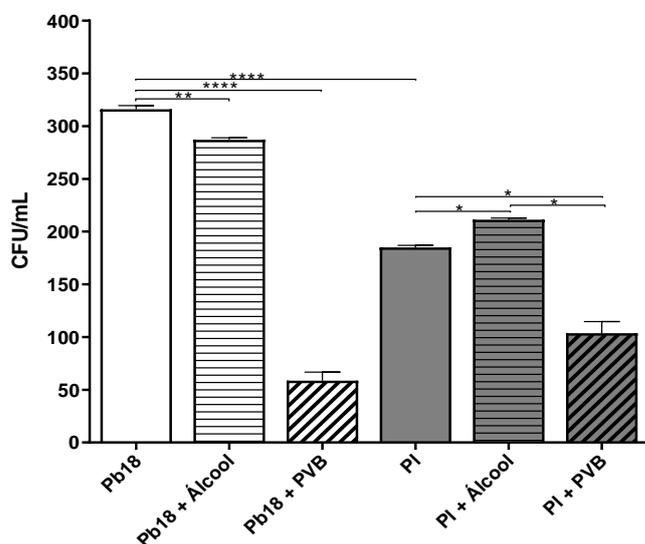


Fonte: da autora, 2024.

Legenda: Efeito do veículo de diluição sobre culturas de esplenócitos, em um processo de co-cultivo, cujo objetivo é investigar a citotoxicidade do álcool por meio da quantificação das células esplênicas.

Nota: Os resultados de cada grupo estão representados como médias \pm desvio padrão. Diferença estatística entre os grupos (**) $p < 0,01$ (***) $p < 0,001$ (****) $p < 0,0001$.

Figura 26: Efeito do veículo de diluição sobre a quantificação de fungos viáveis



Fonte: da autora, 2024.

Legenda: Efeito do veículo de diluição sobre a quantificação de fungos viáveis, cujo objetivo é identificar por meio do número de unidade formadoras de colônias (CFU) o efeito do álcool na no número de fungos viáveis.

Nota: Os resultados de cada grupo estão representados como médias \pm desvio padrão. Diferença estatística entre os grupos (*) $p < 0,5$ (**) $p < 0,01$ (****) $p < 0,0001$. Teste one way Anova e Two way Anova com pós teste de Tukey.