



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana

Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DO PAPEL IMUNOMODULADOR DE ÁCIDOS GRAXOS
DE CADEIA CURTA NA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS
POR *Paracoccidioides brasiliensis***

AIMÊ STEFANY ALVES DA FONSECA

**Brasília – DF
2025**

AIMÊ STEFANY ALVES DA FONSECA

**Avaliação do Papel Imunomodulador de Ácidos Graxos de Cadeia Curta na Infecção de
Macrófagos Murinos por *Paracoccidioides brasiliensis***

Dissertação apresentada à
Universidade de Brasília como parte dos
requisitos parciais para obtenção do título
de mestre pelo Programa de Pós-
Graduação em Biologia Microbiana.

Orientador (a):

Dr. Aldo Henrique Fonseca Pacheco Tavares

Brasília –DF

2025

FICHA CATALOGRÁFICA

Fonseca, A. S. A.

Avaliação do Papel Imunomodulador de Ácidos Graxos de Cadeia Curta na Infecção de Macrófagos Murinos por *Paracoccidioides brasiliensis*

Aimê Stefany Alves da Fonseca

Brasília, 2025.

Número de páginas: 53

Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana,
Universidade de Brasília, Brasília, DF.

I- Palavras chaves: *Fungos patogênicos; Imunidade inata; Paracoccidioidomicose; Tratamento; Microbiota*

II- Universidade de Brasília. PPG/BioMicro.

III- Avaliação do Papel Imunomodulador de Ácidos Graxos de Cadeia Curta na Infecção de Macrófagos Murinos por *Paracoccidioides brasiliensis*

*Dedico essa conquista ao vô Zulmiro,
meu maior exemplo e o primeiro a me
inspirar a fascinação pelo
conhecimento.*

Agradecimentos

A Deus, o Grande Arquiteto, Inteligência Suprema e causa primária de todas as coisas, pela minha existência, e por me enxergar além do que sou.

A Jesus, o Mestre por excelência, que todos os dias me ensina os caminhos que devo seguir e me dá forças para passar pelas provações.

Aos Espíritos que me acompanham e acompanharam até aqui – em especial, ao meu Mentor que, com muita paciência e boa vontade, me auxilia na minha jornada terrestre.

A minha família, fonte inesgotável de amor, carinho e compreensão, por me acompanhar em mais este desafio e me estender a mão nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador, professor Aldo, que brilhantemente realiza sua missão de, verdadeiramente, orientar, e com quem aprendi não apenas as teorias e técnicas científicas, mas a idoneidade e a simplicidade.

Ao meu melhor amigo Estevão, que tornou meus dias mais leves, no laboratório e na vida.

Aos amigos que fiz na Universidade de Brasília, todos os colaboradores desse projeto e aos Laboratórios de Biologia Molecular de Fungos Patogênicos (IB-UnB) e Microrganismos (FCTS-UnB); em especial, à professora Patrícia Albuquerque, que desde o início me acolheu em seu laboratório.

A todos os amigos que me auxiliaram nessa jornada, em especial, às famílias França e Reis, que me acolheram durante as minhas viagens a estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana (PPG-BioMicro).

Às agências de fomento: a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) e a Universidade de Brasília.

E, por fim, à Aimê do passado, que jamais imaginaria os rumos que a vida tomaria, mas teve força e coragem para seguir o seu sonho e amor pela Ciência.

Trabalho realizado junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do Dr. Aldo Henrique Fonseca Pacheco Tavares. Apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), da Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) e da Universidade de Brasília.

Avaliação do Papel Imunomodulador de Ácidos Graxos de Cadeia Curta na Infecção de Macrófagos Murinos por *Paracoccidioides brasiliensis*

AIMÊ STEFANY ALVES DA FONSECA

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: ____/____/____

Prof. Dr. Pedro Henrique Miranda Bürgel – Universidade de Brasília – UnB
(Membro interno)

Prof.^a Dr.^a Karen Spadari Ferreira – Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP
(Membro externo)

Prof.^a Dr.^a Larissa Fernandes Matos – Universidade de Brasília - UnB
Membro interno (Suplente)

Prof. Dr. Aldo Henrique Fonseca Pacheco Tavares (Orientador / Presidente)

**BRASÍLIA – DF
2025**

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS E QUADROS	10
RESUMO GERAL	11
GENERAL ABSTRACT.....	11
INTRODUÇÃO	13
HIPÓTESE(S).....	22
OBJETIVO GERAL	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
MATERIAIS E MÉTODOS	23
Cultivo do <i>P. brasiliensis</i>	23
Avaliação do efeito direto dos SCFAs na viabilidade fúngica	23
Cultura de células de linhagem imortalizada	23
Animais	24
Obtenção de células dendríticas (BMDC) e macrófagos (BMDM) derivados da medula óssea de camundongos	24
Estimulação dos fagócitos com SCFAs e infecção com leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	25
Dosagem de citocinas no sobrenadante das culturas de células	26
Dosagem do óxido nítrico do sobrenadante das culturas de células	26
Avaliação da capacidade fungicida de macrófagos e avaliação do papel da acidificação do fagolisossomo	26
Análise estatística	27
RESULTADOS	28
Avaliação do efeito direto dos SCFAs na viabilidade fúngica	28

Dosagem de citocinas na infecção dos fagócitos com leveduras de <i>P. brasiliensis</i> após tratamento com SCFAs	28
Avaliação da capacidade fungicida de macrófagos e avaliação da acidificação do fagolisossomo	30
DISCUSSÃO	34
CONCLUSÕES.....	41
REFERÊNCIAS.....	43

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1.** Fórmula e estrutura molecular simplificada do acetato, propionato e butirato..... 14
- Figura 2.** Efeito imunomodulatório dos ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs) em fagócitos..... 16

RESULTADOS

- Figura 1.** Crescimento de leveduras de *P. brasiliensis* estimuladas com SCFAs..... 28
- Figura 2.** Secreção de TNF- α por macrófagos estimulados com SCFAs e infectados por *P. brasiliensis*..... 29
- Figura 3.** Secreção de TNF- α (A-B), IL-10 (C-D) e IL-1 β (E-F) por BMDMs e BMDCs estimulados com SCFAs e infectados por *P. brasiliensis*..... 30
- Figura 4.** Capacidade fungicida de macrófagos estimulados com SCFAs e infectados por leveduras de *P. brasiliensis*, com ou sem a presença de bafilomicina..... 31
- Figura 5.** Secreção de óxido nítrico (NO) por macrófagos estimulados com SCFAs e infectados por leveduras de *P. brasiliensis*..... 32
- Figura 6.** Secreção de TNF- α por macrófagos estimulados com SCFAs e infectados por leveduras de *P. brasiliensis*, com ou sem a presença de bafilomicina..... 32

CONCLUSÕES

- Figura 1.** Efeito imunomodulatório dos SCFAs em macrófagos infectados por *P. brasiliensis*..... 41

LISTA DE TABELAS E QUADROS

INTRODUÇÃO

Quadro 1. Mecanismos de interação microbiota-hospedeiro.....	13
---	----

RESUMO GERAL

Fonseca, Aimê Stefany Alves da. **Avaliação do Papel Imunomodulador de Ácidos Graxos de Cadeia Curta na Infecção de Macrófagos Murinos por *Paracoccidioides brasiliensis***. 2025. 53p. Dissertação de mestrado (Biologia Microbiana) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

Os ácidos graxos de cadeia curta (*Short-Chain Fatty Acids* - SCFAs) são os principais metabólitos da microbiota intestinal e possuem repercussão na manutenção da homeostase sistêmica, a partir de efeitos que perpassam a modulação da expressão gênica e metabolismo celular. Seu papel nas relações patógeno-hospedeiro envolve efeitos imunomodulatórios especialmente nos fagócitos, promovendo o equilíbrio pró- e anti-inflamatório. Estudos preliminares sobre o papel dos SCFAs em infecções bacterianas e fúngicas sugerem que macrófagos e células dendríticas possuem capacidade fungicida aumentada. Entretanto, ainda não há registros do efeito de SCFAs em *Paracoccidioides brasiliensis*, uma das espécies responsáveis pela Paracoccidioidomicose (PCM), considerada a principal micose sistêmica no Brasil e América Latina, e cujo tratamento inclui eventos adversos, longa duração e resistência a antifúngicos, o que torna cada vez mais necessária a busca por alternativas terapêuticas para a patologia. Destarte, o objetivo da pesquisa é avaliar o potencial papel imunomodulador dos SCFAs na atividade de fagócitos infectados por leveduras de *P. brasiliensis*. Leveduras do isolado Pb18 foram tratadas com Acetato, Propionato ou Butirato de Sódio para avaliar seu efeito direto na viabilidade fúngica. Em seguida, macrófagos murinos de linhagem imortalizada e primários, e células dendríticas foram tratados com os SCFAs e infectados *in vitro* com Pb18. A produção de citocinas e óxido nítrico (NO) foi avaliada pelos ensaios ELISA e Griess, respectivamente, por 24 e 48 horas. Adicionalmente, avaliou-se a capacidade fungicida de macrófagos e o papel da acidificação do fagolisossomo nesse processo. Como resultados, foi possível apontar inibição na secreção de TNF- α e IL-10, e aumento na secreção de IL-1 β por fagócitos infectados tratados com SCFAs, em relação aos grupos não tratados. Além disso, o tratamento com SCFA promove uma aumentada capacidade fungicida dependente da acidificação do fagolisossomo. Não houve efeito dos SCFAs na viabilidade fúngica, nem na produção de NO e IL-12. Portanto, conclui-se que os SCFAs não afetam diretamente a viabilidade de *P. brasiliensis*, mas modulam a secreção de citocinas pró- e anti-inflamatórias na infecção de macrófagos e células dendríticas murinas pelo fungo. Além disso, a acidificação do fagolisossomo é necessária, mas não suficiente, para a atividade fungicida induzida por SCFAs. Os achados, portanto, sugerem um papel imunomodulador dos SCFAs nesses fagócitos.

Palavras chaves: Fungos patogênicos; Imunidade inata; Paracoccidioidomicose; Tratamento; Microbiota.

GENERAL ABSTRACT

Fonseca, Aimê Stefany Alves da. **Evaluation of Immunomodulatory Role of Short Chain Fatty Acids in the Infection of Murine Macrophages by *Paracoccidioides brasiliensis***. 2025. 53p. Master's dissertation (Microbial Biology) – University of Brasília, Brasília, DF.

Short-chain fatty acids (SCFAs) are the main metabolites produced by the gut microbiota and play a crucial role in maintaining systemic homeostasis through effects that encompass the modulation of gene expression and cellular metabolism. Their role in pathogen-host interactions involves immunomodulatory effects, particularly on phagocytic cells, promoting a balance between pro- and anti-inflammatory responses. Preliminary studies on the role of SCFAs in bacterial and fungal infections suggest that macrophages and dendritic cells exhibit enhanced fungicidal capacity. However, there are still no reports on the effects of SCFAs on *Paracoccidioides brasiliensis*, one of the species responsible for Paracoccidioidomycosis (PCM), which is considered the most prevalent systemic mycosis in Brazil and Latin America. The treatment of PCM includes adverse events, long durations, and antifungal resistance, making the search for alternative therapeutic strategies increasingly necessary. Therefore, the aim of this study is to evaluate the potential immunomodulatory role of SCFAs in the activity of phagocytes infected with *P. brasiliensis* yeasts. To assess the direct effect on fungal viability, yeasts from the Pb18 isolate were treated with Sodium Acetate, Propionate, or Butyrate. Subsequently, immortalized and primary murine macrophages, and dendritic cells were treated with SCFAs and infected *in vitro* with Pb18. Cytokines and nitric oxide (NO) production was assessed by ELISA and Griess assays, respectively, for 24 and 48 hours. Additionally, the fungicidal capacity of macrophages and the role of phagolysosome acidification in this process were evaluated. The results indicated inhibition of TNF- α and IL-10 secretion and increased IL-1 β secretion by infected phagocytes treated with SCFAs, compared to untreated groups. Treatment with SCFA also promoted increased fungicidal capacity dependent on phagolysosome acidification. There was no effect of SCFAs on fungal viability, nor on the production of NO and IL-12. It is concluded, therefore, that SCFAs do not directly affect the viability of *P. brasiliensis*, but modulate the secretion of pro- and anti-inflammatory cytokines during the infection of macrophages and murine dendritic cells by the fungus. Moreover, phagolysosome acidification is necessary, but not sufficient, for SCFA-induced fungicidal activity. The findings, therefore, suggest an immunomodulatory role for SCFAs in these phagocytes.

Keywords: Pathogenic fungi; Innate immunity; Paracoccidioidomycosis; Treatment; Microbiota.

INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal é composta por uma vasta comunidade simbiote e mutualística, formada por bactérias, arqueas, fungos e vírus, que interagem diretamente com o hospedeiro eucariótico (Lynch; Pedersen., 2017; Zheng *et al.*, 2020). A partir de uma complexa rede de mecanismos, a microbiota é capaz de modular e apoiar múltiplas funções fisiológicas, incluindo a manutenção da barreira intestinal, proteção exógena contra patógenos intestinais e extraintestinais, modulação do sistema imunitário e, em especial, o metabolismo de nutrientes (Tabela 1) (Adak; Khan, 2018; Maslowski *et al.*, 2009; Rodriguez *et al.*, 2015; Schulthess *et al.*, 2019; Tian *et al.*, 2019).

Interação	Descrição	Importância	Referências
Modulação do sistema imunitário	<ul style="list-style-type: none">- Interage com o sistema imunitário do hospedeiro, moldando as respostas imunes;- Ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs), como acetato, propionato e butirato, desempenham papéis na homeostase imunitária;- Os SCFAs têm um efeito anti-inflamatório global.	Essencial para a defesa contra patógenos e prevenção de doenças autoimunes.	Fachi <i>et al.</i> , 2020; Thorburn <i>et al.</i> , 2014; Zhan <i>et al.</i> , 2022
Proteção contra patógenos	<ul style="list-style-type: none">- Compete física e quimicamente com patógenos por colonização intestinal;- A disbiose pode levar à expansão de patobiontes e desenvolvimento de patologias.	Mantém o equilíbrio microbiano e previne infecções.	Fachi <i>et al.</i> , 2020; Ferreira <i>et al.</i> , 2014; Johanesen <i>et al.</i> , 2015; Theriot <i>et al.</i> , 2014
Metabolismo de nutrientes	<ul style="list-style-type: none">- Fermenta componentes não digeríveis da dieta, gerando nutrientes e metabólitos;- Produz metabólitos com efeitos sistêmicos no hospedeiro, como os SCFAs.	Fornecer nutrientes essenciais e influencia o metabolismo energético.	Ratajczak <i>et al.</i> , 2019; Thorburn <i>et al.</i> , 2014
Manutenção da barreira intestinal	<ul style="list-style-type: none">- Contribui para a integridade da barreira intestinal;- Influencia a camada de muco e a expressão de proteínas de junção de oclusão entre os enterócitos.	Previne a translocação bacteriana e a inflamação sistêmica.	Adak; Khan, 2018; Hansson; Johansson, 2010

Quadro 1 – Mecanismos de interação microbiota-hospedeiro. Fonte: autoria própria.

Entre os diversos produtos gerados por essa comunidade microbiana, que incluem carboidratos, glicolípideos, ácidos biliares, vitaminas e outros cofatores, destacam-se os ácidos graxos de cadeia curta (*Short-Chain Fatty Acids* - SCFAs), gorduras com até 4 carbonos (C) formadas a partir da fermentação de componentes não digeríveis da dieta, como carboidratos complexos e fibras (Tian *et al.*, 2019). Esses metabólitos secundários, que incluem acetato (2C), propionato (3C) e butirato (4C) (Figura 1), são produzidos no cólon (20-140 mM) e, a partir da

transposição da barreira epitelial intestinal, uma pequena parte (0,1-1 mM) alcança a corrente sanguínea, onde desempenham uma série de funções essenciais para a manutenção da homeostase sistêmica do hospedeiro, atuando na modulação do metabolismo energético, digestivo e, especialmente, imunitário (Thorburn *et al.*, 2014; Yao *et al.*, 2022).

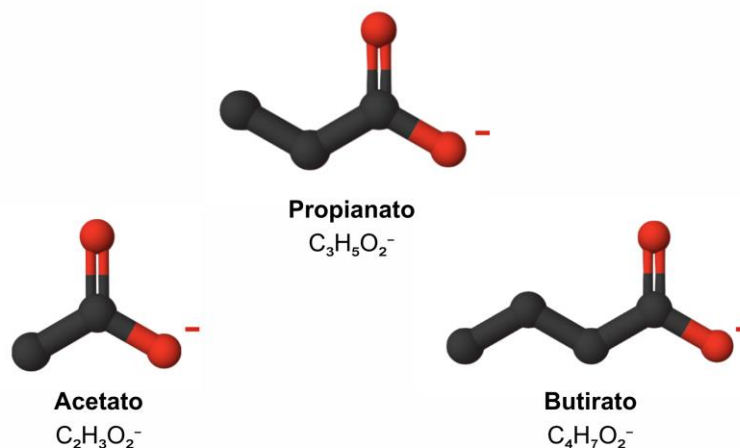


Figura 1 – Fórmula e estrutura molecular simplificada do acetato, propionato e butirato. Dados da NIST *Standard Reference Database 69: NIST Chemistry WebBook*. Cada esfera representa um átomo de um elemento químico identificado pela cor, sendo o preto referente ao carbono, e o vermelho, ao oxigênio. Os átomos estão ligados por ligações simples ou duplas. O sinal [-] indica íons negativos, ou ânions. Os átomos de hidrogênio não estão representados. Fonte: autoria própria.

Entre as múltiplas funções sistêmicas dos SCFAs está a sua ação imunomoduladora, que ocorre principalmente por meio da regulação das respostas inflamatórias. Esse processo envolve a ativação de receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e a inibição das histonas desacetilases dependentes de zinco (HDACs) – mecanismos que afetam diretamente a expressão gênica de fatores cruciais para a resposta imune, como os fatores de transcrição NF- κ B (*Nuclear factor- κ B*) e FoxP3 (*Forkhead box P3*), equilibrando respostas pró- e anti-inflamatórias e a produção de quimiocinas (Astakhova *et al.*, 2016; Ratajczak *et al.*, 2019).

Além disso, a influência dos SCFAs sobre o sistema imunitário se estende tanto a células da imunidade inata quanto à imunidade adaptativa. Além de regular diferenciação, recrutamento e ativação de células imunitárias, os SCFAs exercem efeitos imunomoduladores distintos nos diferentes tipos de leucócitos. A interação de SCFAs com neutrófilos pode modular sua função efetora e sobrevivência nos tecidos (Corrêa-Oliveira *et al.*, 2016; Kamada *et al.*, 2013). Além disso, o acetato pode aumentar o recrutamento de neutrófilos para o local

da infecção por *Clostridium difficile* através da ativação do receptor FFAR2 (Fachi *et al.*, 2019; Mirmoesef *et al.*, 2012).

Em linfócitos T (LT), butirato e propionato podem promover a diferenciação de LT virgens em reguladores (Tregs) ou auxiliares (Th), que desempenham um papel crucial na supressão da resposta e manutenção da tolerância imune (Corrêa-Oliveira *et al.*, 2016). Em algumas condições, os SCFAs podem promover a geração de linfócitos Th1 e Th17, e prejudicar a polarização Th2, apresentando um perfil menos inflamatório (Park *et al.*, 2015). Já em linfócitos B (LB), o butirato pode aumentar a produção de anticorpos, promovendo sua diferenciação em plasmócitos e apoiando a função de LB reguladores (Bregs), contribuindo para o controle da resposta imune e a prevenção de autoimunidade (Sanchez *et al.*, 2020; Yao *et al.*, 2022).

Especialmente nos fagócitos, os SCFAs desempenham um papel crucial na resposta imediata a patógenos. Macrófagos e células dendríticas (*dendritic cells* - DC), em particular, têm sua funcionalidade modulada na presença de SCFAs, que promovem alterações transcricionais e metabólicas nessas células, aumentando sua capacidade microbicida. Estudos demonstram que o butirato pode estimular a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) em macrófagos, além de regular vias metabólicas como a quinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*) e o processo de autofagia, promovendo uma resposta imunitária efetiva contra microrganismos invasores (Figura 2) (Schulthess *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2012).

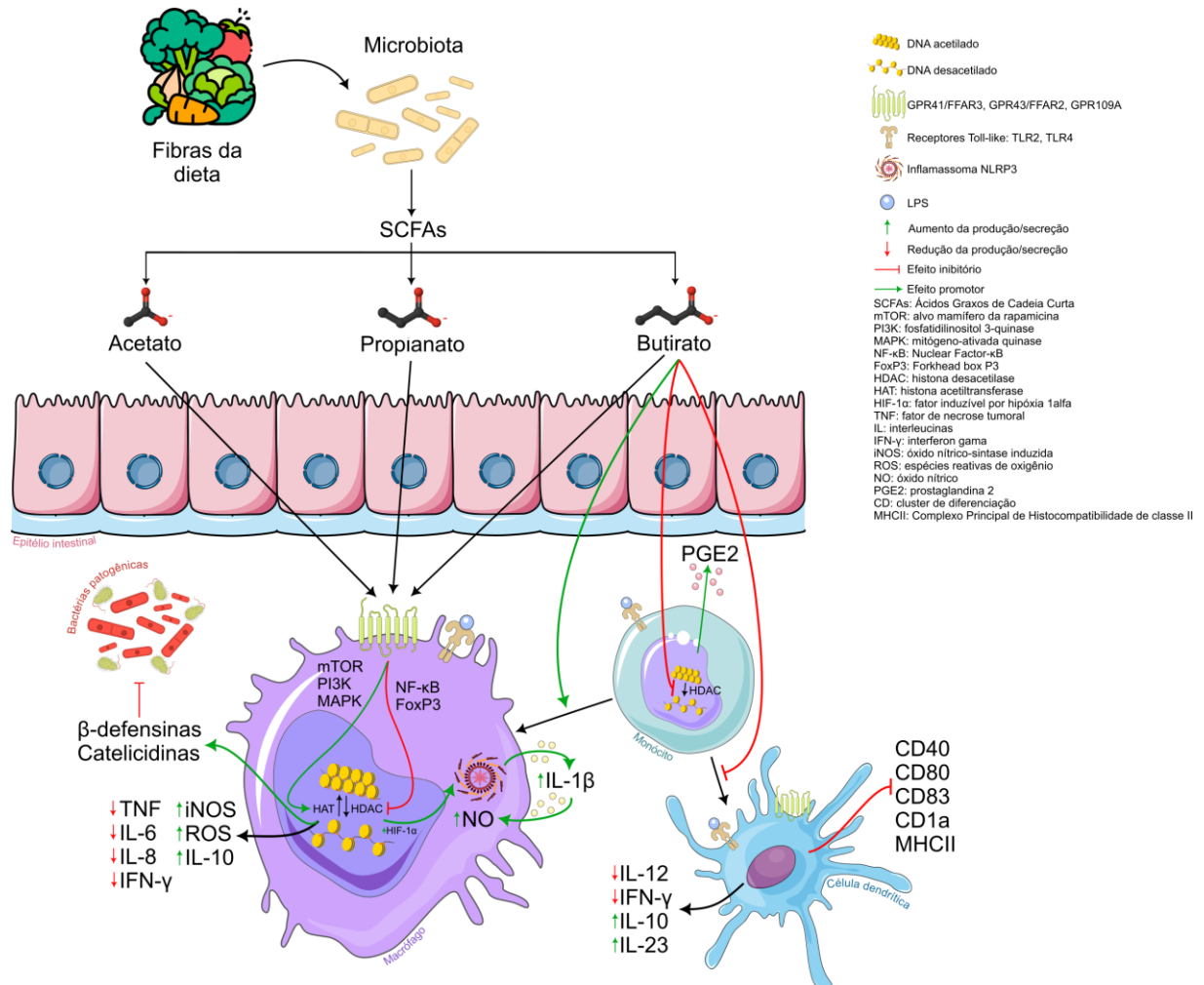


Figura 2 – Efeito imunomodulatório dos ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs) em fagócitos. Os SCFAs (acetato, propionato e butirato), produzidos pela microbiota intestinal a partir da fermentação de fibras e carboidratos complexos da dieta, ultrapassam o epitélio intestinal e influenciam as respostas imunitárias e a inflamação provocada por fagócitos (macrófagos e células dendríticas) a partir de diversos mecanismos, que se iniciam pela ligação a um receptor de membrana, tipicamente receptores acoplados a proteína G (GPRs). A partir do seu reconhecimento pela célula, duas vias de sinalização são moduladas: a promoção de mTOR, PI3K, MAPK aumenta a atividade da histona acetiltransferase (HAT), e a inibição de NF-κB e FoxP3 exibe atividade de inibição de histona desacetilases (HDAC), modulando a transcrição gênica de fatores pró- e anti-inflamatórios. Na presença de estímulo por lipopolissacarídeo (LPS) ativado por receptores *Toll-like* (TLR), em macrófagos e células dendríticas, há a inibição na produção de moléculas pró-inflamatórias (como TNF e PGE2) e aumento de IL-10 (anti-inflamatória) e aumento da capacidade microbicida pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (NOS), IL-1β (por ativação de inflamassoma NLRP3 via HIF-1α), β-defensinas e catelicidinas. Além disso, o butirato é capaz de estimular a diferenciação de monócitos em macrófagos, enquanto inibe a diferenciação de células dendríticas e a expressão de proteínas de membrana (como CD40 e MHCII). Fonte: autoria própria.

Interessantemente, butirato induz a diferenciação de monócitos para macrófagos por meio da inibição da histona desacetilase 3 (HDAC3), aumentando a capacidade microbicida dessas células (Schulthess *et al.*, 2019). Por outro lado, esse SCFA mostrou inibir a diferenciação de DCs, o que evidencia efeitos diversos diante de leucócitos singulares (Liu *et al.*, 2012a). Além disso, a presença de SCFAs pode modular a produção de citocinas por DCs

e aumentar a expressão de enzimas que atenuam a ativação imune, promovendo a geração de Tregs e suprimindo a conversão em LT pró-inflamatórios (Gurav *et al.*, 2015; Yao *et al.*, 2022).

Outros estudos também mostraram que o butirato facilita a produção da catepsina LL37, um dos mais eficazes peptídeos antimicrobianos que, ainda, foi capaz de reduzir a replicação intracelular e a patogenicidade de *Mycobacterium bovis* em camundongos (Liu *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2020). Notavelmente, o butirato também apresentou atividade imunomoduladora em macrófagos, aumentando a produção de ROS e NO e, conseqüentemente, sua capacidade microbicida (Ciarlo *et al.*, 2016). Macrófagos tratados com propianato antes ou durante infecção pela bactéria intracelular *Listeria monocytogenes* também apresentam capacidade microbicida aumentada, apesar do estudo em questão não esclarecer qual ou quais fatores são induzidos (Weis, 2019).

Em seres humanos, baixos níveis de SCFAs intestinais ocasionados por disbiose (seja por razões exógenas, como uso de antibióticos, ou genéticos) estão relacionados ao agravamento de doenças inflamatórias intestinais (como doença de Crohn e colite ulcerativa), maior suscetibilidade a reações alérgicas, inflamatórias e autoimunes (Imhann *et al.*, 2018; Lu *et al.*, 2023; Machiels *et al.*, 2014; Yilmaz *et al.*, 2019). O uso de prebióticos e probióticos para a modulação de inflamação intestinal tem sido aplicado em diversos estudos pré-clínicos, e o transplante fecal para reposição de microbiota tem mostrado resultados promissores no tratamento da colite provocada por *C. difficile* (Baunwall *et al.*, 2022; Mann *et al.*, 2024; Zhang *et al.*, 2022). O acetato também se mostrou um antisséptico tópico seguro e eficaz no tratamento de feridas crônicas infectadas por *Pseudomonas aeruginosa* (Madhusudhan, 2016).

A partir do eixo intestino-pulmão, SCFAs produzidos pela microbiota intestinal auxiliam na imunorregulação de leucócitos do trato respiratório (Özçam; Lynch, 2024). Butirato e propianato estão associados a redução no desenvolvimento de asma na infância e proteção contra a presença e severidade de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (Li *et al.*, 2021; Roduit *et al.*, 2019). Em infecções respiratórias virais e bacterianas, os SCFAs reduzem a ativação de DC pulmonares, inflamação, danos pulmonares e carga microbiana; aumentam a diferenciação de monócitos em macrófagos alternativamente ativados (M2, de perfil pró-resolutivo) e a sobrevivência de camundongos (Fonseca *et al.*, 2017; Sencio *et al.*, 2020; Tian *et al.*, 2019; Trompette *et al.*, 2018).

Além dos efeitos em fagócitos e em infecções bacterianas e virais, os SCFAs possuem efeito fungicida direto e indireto particularmente importante. O butirato demonstrou inibir diretamente o crescimento das leveduras patogênicas *Candida albicans*, *C. parapsilosis* e

Cryptococcus neoformans in vitro. Além disso, características de virulência fúngica como filamentação, formação de biofilme em *C. albicans*, e melanização e formação de cápsula em *C. neoformans* foram reduzidas, sugerindo efeito direto desse SCFA contra esses fungos patogênicos humanos (Ciarlo *et al.*, 2016). Em *C. albicans*, os principais impactos dos SCFAs, em especial do butirato, estão relacionados a sua atividade de inibição de HDACs e ativação de histona acetiltransferase (HAT), levando a modulação da transcrição gênica (Özçam; Lynch, 2024).

Em relação ao efeito dos SCFAs na microbiota, camundongos em uso de antibióticos (e consequente disbiose) apresentaram redução da colonização gastrointestinal por *C. albicans* quando suplementados com SCFAs (Guinan *et al.*, 2019). Especialmente em infecções fúngicas, além de inibir diretamente o crescimento e características de virulência, macrófagos murinos estimulados com butirato e propionato apresentam maior capacidade fungicida quando infectados por *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. neoformans*, além de aumentar a sobrevivência de camundongos quando associados a tratamentos antifúngicos convencionais, como vancomicina (Ciarlo *et al.*, 2016; Nguyen *et al.*, 2011).

Embora os SCFAs tenham mostrado eficácia em aumentar a atividade antifúngica de fagócitos e inibir o crescimento de fungos, o efeito desses metabólitos sobre *Paracoccidioides brasiliensis*, principal agente etiológico da Paracoccidioidomicose (PCM), ainda não foi explorado. A PCM é a principal micose sistêmica endêmica na América Latina, sendo o Brasil responsável por 80% dos casos relatados, com uma alta prevalência em estados como São Paulo, Goiás, Minas Gerais e Mato Grosso (Coutinho *et al.*, 2015; Martinez, 2017; Mendes *et al.*, 2017).

O gênero *Paracoccidioides* é composto por 5 espécies crípticas de fungos termodimórficos, encontrados na forma micelial ou filamentosa no solo (forma infectiva a aproximadamente 25 °C) e em forma de levedura a 37 °C (forma patogênica), o que permite sua sobrevivência no organismo (Chiyoda-Rodini *et al.*, 2020). Há registros de isolados de *Paracoccidioides* spp. em tatus, cães, e, entre outros animais, os seres humanos, sendo esses últimos infectados pelas espécies *P. americana* (ou PS2), *P. restrepiensis* (PS3), *P. venezuelensis* (PS4), *P. lutzii* e, principalmente, *P. brasiliensis sensu stricto* (variantes S1a e S1b) – espécie mais comum, encontrada em diversas regiões da América Latina e representada pelos isolados Pb18 (mais virulenta) e Pb339 (Cocio *et al.*, 2020; Martinez, 2017; Turissini *et al.*, 2017).

Desde 2022, o *Paracoccidioides* spp. está listado como patógeno fúngico prioritário pela Organização Mundial de Saúde (OMS), como um esforço de concentrar e impulsionar pesquisas e intervenções políticas que fortaleçam a resposta global às infecções fúngicas e à resistência antifúngica, responsáveis por mais de 1,5 milhão de mortes por ano, em sua maioria, em regiões negligenciadas (Rodrigues; Nosanchuk, 2023; WHO, 2022). No Brasil, estima-se que a PCM seja responsável pela hospitalização de 4,3/1.000.000 de habitantes e, embora a taxa de mortalidade seja baixa, a morbidade, sequelas debilitantes e disfunção orgânica podem ocorrer em até 50% dos casos, mesmo com tratamento (Hrycyk *et al.*, 2018).

Viver em áreas rurais ou na periferia de centros urbanos é um dos maiores fatores de risco para a infecção por *Paracoccidioides* spp., sendo que a PCM afeta principalmente trabalhadores rurais, onde o contato com o habitat do fungo é frequente (Peçanha-Pietrobon *et al.*, 2023). Outros fatores de risco para a PCM são: profissões com exposição ao solo, exploração de cavernas, sexo masculino, tabagismo e etilismo (de Sugiura; Ono, 2022; Morris *et al.*, 2024).

A infecção ocorre por inalação de propágulos ou fragmentos de micélio, que inicialmente colonizam o trato respiratório e, nos pulmões, fazem a transição de micélio para a forma leveduriforme patogênica. A partir da infecção pulmonar, as leveduras podem disseminar-se para outros órgãos, levando a duas formas clínicas principais da PCM: aguda (ou juvenil) ou crônica (ou adulta) (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2017).

A PCM aguda acomete principalmente jovens até os 25 anos de idade, possui progressão rápida (dias a semanas) e disseminada, com altos níveis de anticorpos específicos, ativação policlonal de LB e depressão da resposta imune celular, o que leva a comprometimentos de linfonodos, baço, fígado e disfunção medular óssea. Já a PCM crônica, que compreende de 74% a 96% dos casos da doença, é mais comum em indivíduos do sexo masculino com idade entre 30 e 60 anos. Essa forma clínica evolui com manifestações principalmente unifocais pulmonares, de progressão lenta (meses a anos), com imunidade celular preservada e baixos níveis de anticorpos específicos (Fortes *et al.*, 2011; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2017). É importante ressaltar, ainda, que a variedade de manifestações clínicas da PCM está relacionada à resposta do hospedeiro à infecção e à virulência do fungo, de forma multifatorial e complexa.

A resposta imune ao *P. brasiliensis* depende de uma coordenação eficaz entre as respostas inata e adaptativa, com destaque para o papel fundamental dos fagócitos, como macrófagos e DC, no controle inicial da infecção e na promoção de uma resposta imunitária adaptativa específica (Burger, 2021; Calich *et al.*, 2008). Nos pulmões, macrófagos alveolares

residentes reconhecem o fungo a partir de receptores de reconhecimento de padrão (*pattern recognition receptors* - PRRs) que interagem com padrões moleculares associados a microrganismos (*microorganism associated molecular patterns* - MAMPs). No caso do *P. brasiliensis*, os principais PRRs em fagócitos são dectina-1, dectina-2, TLR2 e TLR4 (*Toll-like receptors*), capazes de reconhecer MAMPs da parede fúngica como a β -1,3-glucana e diferentes mananas (Cardoso-Miguel *et al.*, 2023; Feriotti *et al.*, 2015; Ketelut-Carneiro *et al.*, 2018; Loures *et al.* 2009; Loures *et al.*, 2010; Loures *et al.*, 2014).

A depender do PRR ativado, distintas vias de sinalização intracelular são ativadas, modulando a resposta celular ao fungo a partir da codificação e secreção de citocinas, quimiocinas e genes associados à produção de moléculas microbidas (Burger, 2021; Calich *et al.*, 2008; Fernández-García; Cuellar-Rodríguez, 2021; Tavares *et al.*, 2013). Nesta etapa, os fagócitos são responsáveis por efeitos locais e sistêmicos a partir da liberação de mediadores pró- (como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-8 e IL-18) e anti-inflamatórios/regulatórios (TGF- β , IL-10 e PGE2) (Fortes *et al.*, 2011). O complexo multiproteico citoplasmático inflamassoma NLRP3 (*nucleotide oligomerisation domain-like receptor protein 3*) em macrófagos e DC também constitui uma estratégia de combate ao fungo, uma vez que sinais endógenos provocados pelo fungo (como dano fagolisossomal e produção de ROS) levam à ativação desse complexo que medeia, via atividade da protease de cisteína caspase-1, a secreção da forma bioativa de IL-1 β – interleucina essencial para a resposta inflamatória a infecções fúngicas (Bauernfeind; Hornung, 2013; Tavares *et al.*, 2015; van de Veerdonk *et al.*, 2011). Se a infecção pelo fungo não for eficientemente controlada pela imunidade inata nesse estágio, a resposta adaptativa é ativada a partir da apresentação antigênica de macrófagos, DC e LB a linfócitos Th – principal mecanismo envolvido na resposta celular ao *P. brasiliensis* (Burger, 2021).

A resposta imune adaptativa mediada por linfócitos Th influencia a evolução da doença e suas manifestações clínicas. Na PCM aguda, associada a maior suscetibilidade à infecção e resposta inflamatória deletéria, existe o predomínio na ativação de linfócitos Th2/Th9, com alta resposta humoral pela produção de interleucinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-27; TGF- β , redução na ativação de macrófagos, produção de imunoglobulinas IgG4, IgE e IgA por LB, além de baixa secreção de IFN- γ and TNF- α (Calich *et al.*, 2019; Mamoni; Blotta, 2005). Em contrapartida, a forma crônica da doença possui resposta celular predominante e maior resistência ao fungo, baseada em uma resposta predominantemente Th1 e Th17/22, alta produção de IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6, IL-12, IL-17 e IL-22; quantidades variáveis de IL-10 e IL-4, além de IgG1 por LB. Uma resposta Th1 está mais relacionada a infecção pulmonar

assintomática, enquanto em manifestações benignas da PCM-doença prevalece uma resposta mista Th1/Th17 (Calich *et al.*, 2019; de Castro *et al.*, 2013).

Ademais, linfócitos Tregs também participam do desenvolvimento e controle da PCM a partir: i) da indução da produção da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) por fagócitos via ligação do receptor CTLA-4 presente nos linfócitos Tregs, sendo responsável por inibir a atividade de LT e promover apoptose; e ii) da produção de citocinas supressoras como TGF- β e IL-10 por esses linfócitos. Ambos os mecanismos contribuem, sinergicamente, para a supressão da resposta imune celular, o que é benéfico para o hospedeiro com PCM (Calich *et al.*, 2019).

No entanto, a PCM ainda apresenta desafios consideráveis no tratamento, uma vez que os protocolos antifúngicos atuais são longos, com eventos adversos significativos, e há a possibilidade do estabelecimento de uma PCM latente e danos teciduais permanentes (Cruz, 2012; Figueiredo, 2012). Além disso, já foram identificados genes de resistência aos tratamentos disponíveis em isolados de *Paracoccidioides* spp., como homólogos do gene de multirresistência a drogas (MDR1) de *C. albicans*, e da resistência pleiotrópica a drogas (PDR5) de *Saccharomyces cerevisiae* (Costa *et al.*, 2005; Felipe *et al.*, 2005a; Felipe *et al.*, 2005b). Uma vez que esses genes estão ligados à resistência ao tratamento com azóis, e considerando que o tratamento atual da PCM é principalmente baseado em derivados de azóis, já foi identificada resistência de diversas espécies de *Paracoccidioides* a essas medicações *in vitro*, como cetoconazol e itraconazol, além de caspofungina, 5-flucitosina e anfotericina B (Cermeño *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2020).

Além disso, nas últimas décadas, tem havido um aumento no número de casos de PCM reportados em áreas não endêmicas, que pode estar relacionado a fatores ambientais como mudanças climáticas e ao aumento no número de diagnósticos de comorbidades associadas à imunodepressão (Peçanha-Pietrobon *et al.*, 2023). Esses fatores evidenciam a necessidade de novas abordagens terapêuticas que possam auxiliar no controle da doença de forma mais eficaz.

Nesse contexto, explorar o potencial dos SCFAs como agentes antifúngicos e moduladores da resposta imune contra *P. brasiliensis* se torna uma área promissora de pesquisa científica. Com base nas evidências de que os SCFAs melhoram a atividade microbida de fagócitos e inibem o crescimento de outros fungos patogênicos, investigações adicionais podem fornecer novas alternativas terapêuticas para o manejo da PCM, contribuindo para a redução das taxas de morbimortalidade associadas à patologia. Além disso, compreender os mecanismos

pelos quais os SCFAs interagem com o sistema imunitário durante a infecção fúngica pode abrir caminho para novas intervenções terapêuticas no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas.

HIPÓTESE(S)

A partir do exposto acima, pode-se sugerir que, se fagócitos, como macrófagos e células dendríticas, forem tratados com ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs), então a atividade dessas células contra a infecção por leveduras de *P. brasiliensis* será modulada. Esta hipótese se sustenta, principalmente: i) na inibição direta do crescimento de outros fungos e bactérias pelos SCFAs de forma dependente da concentração, a partir da modulação do metabolismo celular, expressão gênica e sinalização celular; ii) no aumento da capacidade fungicida de fagócitos na presença de SCFAs através de diferentes mecanismos, como aumento da fagocitose, produção de óxido nítrico e acidificação do fagolisossomo; e iii) na modulação da resposta inflamatória pelos fagócitos, como produção de citocinas, resultando em um perfil de resposta mais efetivo no controle da infecção, com potencial redução de danos teciduais.

OBJETIVO GERAL

O projeto tem como objetivo geral avaliar o potencial papel imunomodulador dos SCFAs na atividade de fagócitos murinos infectados por leveduras de *P. brasiliensis* (*in vitro*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito direto dos SCFAs (acetato, propionato e butirato) na viabilidade de leveduras de *P. brasiliensis*;
- Avaliar a produção de citocinas e óxido nítrico no sobrenadante de culturas de fagócitos (macrófagos e células dendríticas) infectados com leveduras de *P. brasiliensis* e tratados com SCFAs;
- Avaliar a capacidade fungicida de fagócitos infectados com leveduras de *P. brasiliensis* e tratados com SCFAs;
- Avaliar o papel da acidificação do fagolisossomo na atividade fungicida em macrófagos infectados com leveduras de *P. brasiliensis* e tratados com SCFAs.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivo do *P. brasiliensis*

O isolado Pb18 de *P. brasiliensis*, na forma de levedura, foi cultivado em meio infusão cérebro-coração BHI-ágar enriquecido (4% de dextrose, 5% de meio condicionado com sobrenadante de cultura de Pb192, 4% de soro de cavalo e gentamicina 50 µg/mL) semissólido a 37 °C. Os repiques foram realizados a cada 7 dias, sem passagem em animais.

Avaliação do efeito direto dos SCFAs na viabilidade fúngica

As leveduras de Pb18 entre 4 e 7 dias de repique foram incubadas (uma alça de inoculação de 10 µL/tubo de centrifugação, em concentração aproximada de $1,66 \times 10^7$ células/mL) em tubos de centrifugação tipo Falcon de 50 mL contendo 12,5 mL de BHI líquido enriquecido (4% de dextrose, 5% de meio condicionado com sobrenadante de cultura de Pb192, 4% de soro de cavalo e gentamicina 50 µg/mL) a 37 °C, com agitação a 200 rpm. As leveduras foram tratadas ou não com diferentes concentrações dos SCFAs: Butirato de sódio (20 mM), Acetato de sódio (40 mM) e Propionato de sódio (20 mM), todos da Sigma-Aldrich. Nos tempos de 0 e 24 horas, os tubos de centrifugação foram retirados do agitador e deixados em repouso por 5 minutos ou até que todo o fungo decantasse e o meio ficasse translúcido; a precipitação de fungos foi avaliada visualmente.

Em seguida, os tubos de centrifugação foram homogeneizados novamente, foram coletadas amostras de 20 µL em triplicata e plaqueadas em placas de Petri com BHI-ágar enriquecido. As placas de Petri foram incubadas a 37 °C por 7 dias, quando foram então contadas as Unidades Formadoras de Colônia (*Colony-forming unit* ou CFU).

Cultura de células de linhagem imortalizada

Macrófagos da linhagem RAW264.7 (ATCC TIB-71; derivados de ascite de tumor de Abelson induzido pelo vírus da leucemia murina de Abelson) foram obtidos do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células RAW264.7 eram mantidas criopreservadas a -80 °C com 95% de meio DMEM (Gibco *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de aminoácidos não essenciais (Mediatech, Manassas, VA, USA) e gentamicina 50 µg/mL; mais 5% de DMSO (dimetilsulfóxido). As células foram descongeladas, sendo realizados de 2 a 3 subcultivos na proporção 1:4 antes de cada experimento, quando foram, então, semeadas em placas de Petri para cultivo celular utilizando

meio DMEM suplementado. As células foram mantidas em incubadora a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO₂.

Animais

Foram utilizados camundongos selvagens (WT) da linhagem isogênica C57BL/6, que são susceptíveis à infecção com *P. brasiliensis*, fêmeas, entre 8 e 12 semanas de idade para obtenção de fagócitos (Calich *et al.*, 1985). Os animais foram mantidos no biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, em condições sanitárias com água e ração *ad libitum*. Os experimentos seguiram as normas do Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília (SEI n.º 23106.074021/2021-11).

Obtenção de células dendríticas (BMDC) e macrófagos (BMDM) derivados da medula óssea de camundongos

As células dendríticas e os macrófagos utilizados foram obtidos através de diferenciação de células provenientes de medula óssea de camundongos isogênicos C57BL/6, segundo protocolo de Lutz *et al.* (1999), com modificações. Para tal, células de medula óssea foram coletadas do fêmur e tíbia dos camundongos, a partir da técnica de lavagem com RPMI-1640 (Gibco Roswell Park Memorial Institute). 2 x 10⁶ células de medula óssea foram cultivadas em volume de 10 mL de meio RPMI suplementado (10% de SFB) com 20 ng/mL de GM-CSF (Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos) em incubadora (37 °C e 5% de CO₂).

No terceiro dia de cultivo, foram acrescentados mais 10 mL de meio RPMI suplementado contendo 200 ng de GM-CSF. No sexto dia de cultivo, metade do volume (10 mL) foi retirado e centrifugado, sendo o precipitado celular obtido ressuspensionado em 10 mL de meio RPMI suplementado e recolocado novamente no meio de cultura original. No oitavo dia de cultivo, células que não se apresentaram aderidas ao fundo da placa (BMDCs) foram removidas do meio de cultura a partir da remoção do sobrenadante e lavagens consecutivas com meio RPMI simples aquecido. Os macrófagos diferenciados (BMDMs), fortemente aderidos à placa, foram desaderidos utilizando TrypLE (Life Technologies).

A eficácia da diferenciação deste protocolo é rotineiramente avaliada pelo Laboratório de Imunologia Aplicada (LIA) da Universidade de Brasília, por meio de análises de citometria de fluxo, que mostram que entre 80-85% das células obtidas no cultivo de células não

aderentes/pouco aderentes são células CD11c+/MHCII (caracterizando BMDC) e 85-91% das células aderentes são F4/80+/CD11b (caracterizando BMDM).

Estimulação dos fagócitos com SCFAs e infecção com leveduras de *P. brasiliensis*

Para a infecção das células, as leveduras com tempo de repique entre 5 e 10 dias foram transferidas para um tubo de centrifugação tipo Falcon de 15 ml contendo pérolas de vidro em meio DMEM suplementado (5 mL) e agitadas (vórtex) três vezes, por 10 segundos. Após 5 minutos de repouso, 1 mL da suspensão (da porção superficial) foi transferido para um microtubo de centrifugação e passou sucessivamente através de agulha (U-100) para desfazer possíveis grumos formados pelo fungo. Após esse procedimento, as leveduras foram contadas em hemocítmetro para ajustes de concentração.

Os macrófagos RAW264.7 (3×10^5 /poço) foram infectados por *P. brasiliensis* na proporção 1 fungo:1 macrófago (MOI = 1) em meio DMEM suplementado (10% de SFB, 1% de aminoácidos não essenciais e gentamicina 50 µg/mL) e cultivadas em incubadora a 37 °C e 5% de CO₂ em placa de cultivo de 24 poços. Após 24 e 48 horas de infecção, foi coletado o sobrenadante dos poços em microtubos de centrifugação e armazenados a -20 °C, para execução de ensaios da cinética de produção de citocinas, efeito da acidificação de fagolisossomos e produção de NO.

Os BMDMs ($2,5 \times 10^5$ /poço) e BMDCs ($1,5 \times 10^5$ /poço) foram cultivados em placas de cultivo de 24 poços e, após 24 horas, foram infectados por leveduras de *P. brasiliensis* com MOI = 2 (para BMDM) e MOI = 1 (para BMDC) em meio RPMI suplementado (10% de SFB), e cultivados em incubadora a 37 °C e 5% de CO₂. O sobrenadante dos poços foi coletado após 24, 48 e 72 horas de infecção e armazenado a -20 °C. para ensaio da cinética de produção de citocinas e produção de NO.

Em todos os experimentos acima, os fagócitos foram tratados ou não com diferentes concentrações dos SCFAs (0, 20 e 40 mM): Butirato de sódio, Acetato de sódio, Propionato de sódio, todos da Sigma-Aldrich, 1 hora antes da infecção experimental com Pb18. Como controle positivo para ativação de ambas as linhagens de fagócitos, utilizou-se lipopolissacarídeo (LPS de *Escherichia coli* 055:B5, InvivoGen) 1 µg/mL na presença ou ausência da infecção experimental das células por Pb18.

Dosagem de citocinas no sobrenadante das culturas de células

O sobrenadante retirado das culturas de macrófagos e células dendríticas, tratados ou não com diferentes concentrações dos SCFAs e infectados ou não com *P. brasiliensis*, foi estocado a -20 °C e posteriormente utilizado para dosagem de citocinas, pelo ensaio ELISA-Sanduíche (*Enzyme-Linked Immunosorbent*), empregando as recomendações do fabricante (Invitrogen). Nos sobrenadantes, foram analisadas as citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-12/23. A absorbância das amostras foi analisada em leitor de microplacas BioTek ELx800 (BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA), com comprimento de onda de leitura de 450 nm, a partir do software Gen5 Data Analysis versão 2.05 (BioTek Gen5 Software, Winooski, VT, EUA). Os dados foram analisados pelo software SoftMax Pro versão 5.2 (SoftMax Pro Software, Sunnyvale, CA, EUA).

Dosagem do óxido nítrico do sobrenadante das culturas de células

O óxido nítrico (NO) se decompõe em nitritos e nitratos em meio de cultura celular. A concentração de nitrito é determinada por uma reação colorimétrica utilizando o reagente de Griess, composto por diamina di-hidroclorido naftaleno (NEED) 0,1% diluído em água destilada, sulfanilamida 1% diluída em ácido fosfórico a 5%, ácido fosfórico a 5% diluído em água destilada e água destilada pura, os quais são misturados em partes iguais no momento do uso. Nesse sentido, combinou-se 50 μ L da amostra com 50 μ L do reagente de Griess, por 10 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, foi determinada a absorbância em leitor de microplacas BioTek ELx800 (BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA) a 550 nm. Os dados foram analisados pelos softwares Gen5 Data Analysis versão 2.05 (BioTek Gen5 Software, Winooski, VT, EUA) e SoftMax Pro versão 5.2 (SoftMax Pro Software, Sunnyvale, CA, EUA).

Avaliação da capacidade fungicida de macrófagos e avaliação do papel da acidificação do fagolisossomo

Para avaliação do papel da acidificação do fagolisossomo na capacidade microbicida de macrófagos, foi utilizado Bafilomicina A1 a 0,5 μ M (InvivoGen). A Bafilomicina é um inibidor de V-ATPase e da fusão de autofagossomo-lisossomo. Esse inibidor foi adicionado às culturas de RAW264.7 1 hora antes da infecção por leveduras de *P. brasiliensis* e concomitante ao tratamento com os SCFAs.

Após 24 e 48 h de co-cultivo de macrófagos RAW264.7 e leveduras de Pb18 em MOI = 1, a 37 °C em estufa contendo 5% de CO₂, o sobrenadante dos poços de cultivo foi retirado e

armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para dosagem de citocinas; e as monocamadas foram tratadas com água destilada gelada para lise dos macrófagos. O material foi, então, plaqueado ($100\text{ }\mu\text{L}$ /secção de placa de Petri) em meio BHI-ágar enriquecido (4% de dextrose e gentamicina $50\text{ }\mu\text{g/mL}$). As placas de Petri foram incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por até 8 dias, quando foi então contado o CFU.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o GraphPad Prism versão 9.5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Análise de variância unidirecional (ANOVA one-way) foi usada para comparar as diferenças entre os grupos, e as comparações individuais dos grupos foram feitas usando o pós-teste de Tukey. O intervalo de confiança de 95% foi determinado para todos os experimentos.

RESULTADOS

Avaliação do efeito direto dos SCFAs na viabilidade fúngica

Com o objetivo de avaliar o efeito direto dos SCFAs na viabilidade de leveduras de *P. brasiliensis*, isolados de Pb18 foram cultivados em meio de cultivo e tratados com acetato (40 mM), butirato e propionato (20 mM) a partir de valores extraídos da literatura e testados por nosso grupo de pesquisa (Machado *et al.*, 2022; Mirmonsef *et al.*, 2012; Nguyen *et al.*, 2011). Foi possível observar que não existe diferença significativa na viabilidade fúngica quando avaliamos a diferença na contagem de CFU de 24h com o inóculo inicial (0h) para nenhuma das concentrações de SCFAs avaliadas, em comparação ao grupo controle (Pb) (Figura 1).

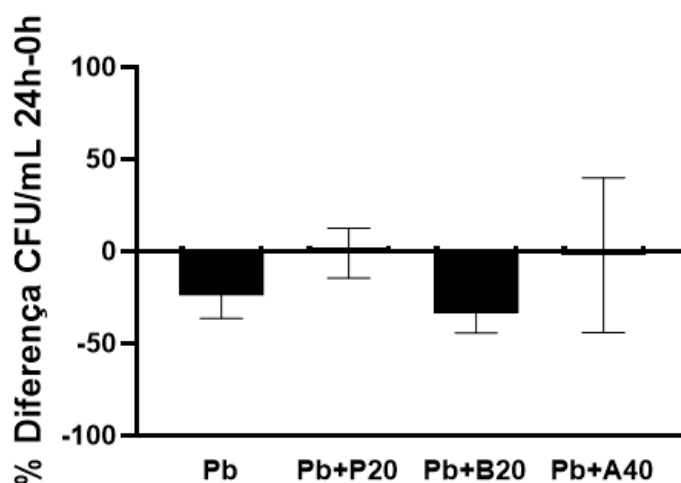


Figura 1 - Crescimento de leveduras de *P. brasiliensis* estimuladas com SCFAs. Isolados de Pb18 (Pb) foram cultivados em meio de cultivo tratado com propionato a 20 mM (P20), butirato a 20 mM (B20) e acetato a 40 mM (A40). Após 0 e 24 horas, foram coletadas alíquotas e o conteúdo foi semeado em placa de Petri com BHI-ágar suplementado. As Unidades Formadoras de Colônia (CFU/mL) foram contadas após 7 dias de semeadura. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão da diferença percentual de CFU/mL em [24h-0h], para cada grupo. Os resultados são representativos de um experimento independente conduzido em triplicata.

Dosagem de citocinas na infecção dos fagócitos com leveduras de *P. brasiliensis* após tratamento com SCFAs

A fim de avaliar o efeito dos SCFAs na modulação da produção de citocinas por fagócitos, foi realizado tratamento prévio com esses ácidos graxos e, em seguida, a infecção por leveduras de Pb18. Foi possível observar que macrófagos murinos de linhagem imortalizada (RAW264.7) tiveram inibição da secreção de TNF- α – principal citocina pró-inflamatória produzida por macrófagos – estimulados por acetato 20 e 40 mM, propionato 10 e 20 mM e butirato 10 e 20 mM, em 24 e 48 horas de infecção por leveduras de *P. brasiliensis* (Fig. 2).

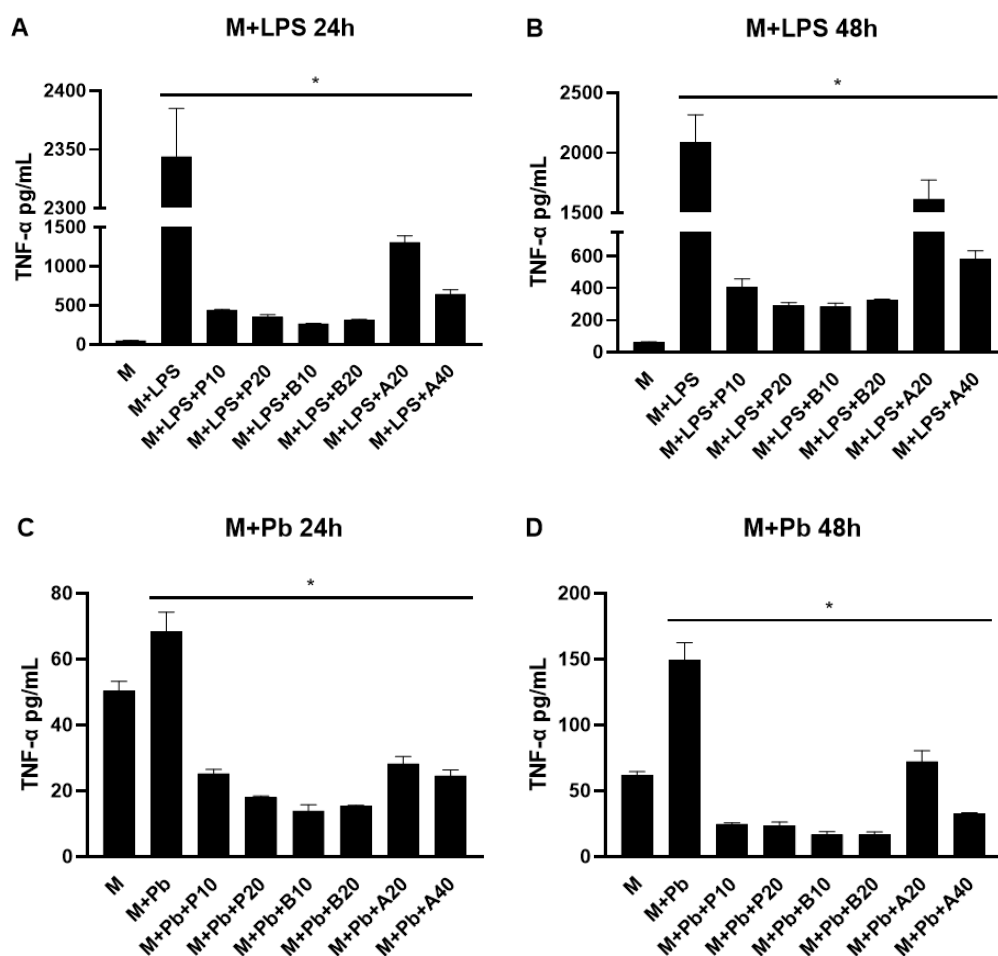


Figura 2 - Secreção de TNF- α por macrófagos estimulados com SCFAs e infectados por *P. brasiliensis*. Macrófagos RAW264.7 (M) foram estimulados com propionato a 10 mM (P10) e 20 mM (P20), butirato a 10 mM (B10) e 20 mM (B20) e acetato a 20 mM (A20) e 40 mM (A40) 1 hora antes da estimulação por LPS (1 μ g/ml) (A e B) ou infecção com *P. brasiliensis* (Pb) (C e D) em MOI = 1. Após 24 e 48 horas, o sobrenadante foi coletado e utilizado para dosagem de TNF- α por ensaio de ELISA. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes conduzidos em triplicata. * $p < 0,05$.

Experimentos-piloto demonstraram que a adição dos SCFAs não induz a produção de citocinas, como TNF- α , em macrófagos não infectados. Importante notar, ainda, o efeito anti-inflamatório similar dos SCFAs em macrófagos não infectados estimulados com LPS (Fig. 2A-B), como descrito na literatura (Chen *et al.*, 2018; Ciarlo *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2012b; Usami *et al.*, 2008). Diante dos resultados obtidos com essas células, optou-se por prosseguir com as concentrações de 20 mM para butirato e propionato, e 40 mM para acetato.

Para expandir nossas análises, avaliamos se o efeito regulatório dos SCFAs na produção de citocinas também ocorreria em fagócitos primários derivados de medula óssea murina. Foi observado que, em BMDMs e BMDCs, os SCFAs, nas concentrações testadas, inibem a produção de TNF- α (Fig. 3A-B). Ademais, em BMDMs e BMDCs, os SCFAs, especialmente

propianato (20 mM) e butirato (20 mM), também inibiram a secreção de IL-10 (Fig. 3C-D), citocina de papel anti-inflamatório e pró-resolutivo em processos inflamatórios, o que mostra um papel duplo de inibição de citocinas pró- e anti-inflamatórias pelos SCFAs nesses fagócitos.

Em contrapartida, a citocina IL-1 β , em sua forma bioativa, apresentou aumento de secreção em BMDMs e BMDCs infectados por *P. brasiliensis* e tratados com propianato e butirato a 20 mM (Fig. 3E-F) e não houve produção significativa de IL-12p70 por BMDMs ou BMDCs infectados por *P. brasiliensis* e tratados ou não com SCFAs, em 24 e 48 horas.

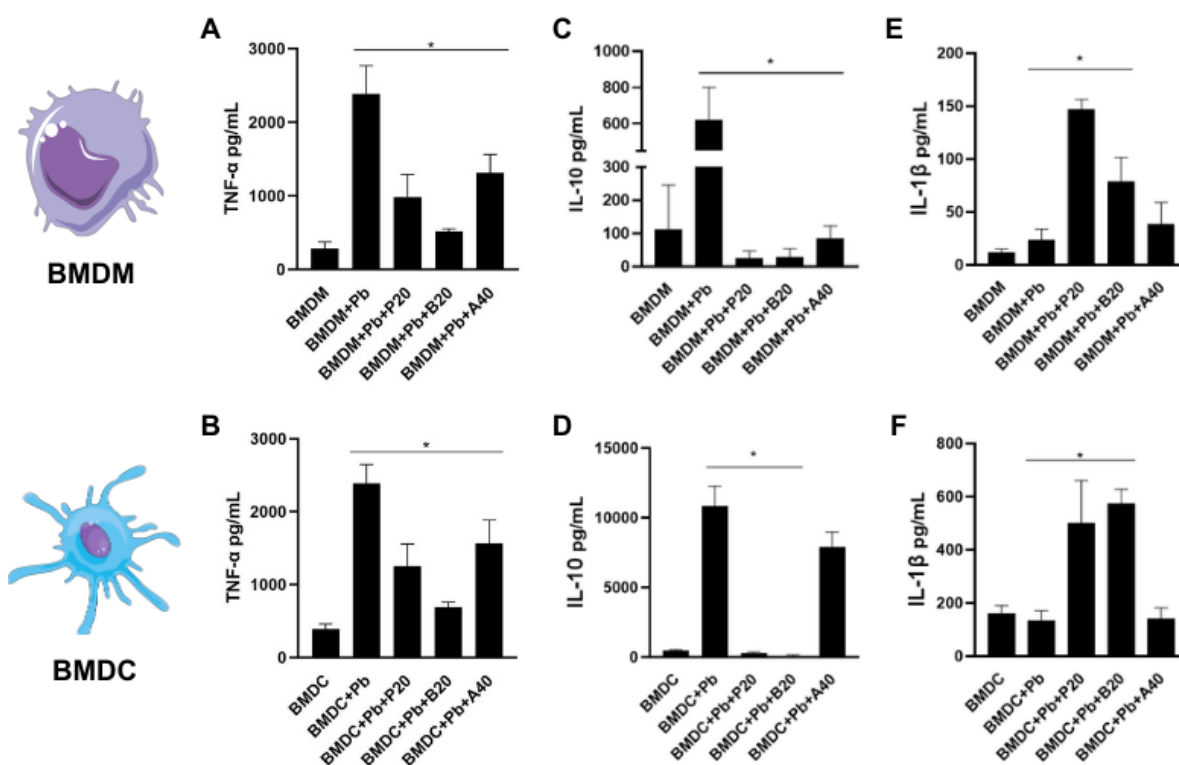


Figura 3 - Seção de TNF- α (A-B), IL-10 (C-D) e IL-1 β (E-F) por BMDMs e BMDCs estimulados com SCFAs e infectados por *P. brasiliensis*. Células BMDM e BMDC foram estimuladas com propianato a 20 mM (P20), butirato a 20 mM (B20) e acetato a 40 mM (A40) 1 hora antes da infecção com *P. brasiliensis* (Pb) em MOI = 1 ou 2. Após 24 horas, o sobrenadante foi coletado e utilizado para dosagem de citocinas por ensaio de ELISA. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes conduzidos em triplicata. *p < 0,05.

Avaliação da capacidade fungicida de macrófagos e avaliação da acidificação do fagolisossomo

Considerando que não ocorreu efeito fungicida direto dos SCFAs em *P. brasiliensis* e que SCFAs regulam a produção de citocinas de fagócitos, buscou-se avaliar a capacidade fungicida de macrófagos RAW264.7 previamente tratados com os SCFAs e o possível papel da acidificação do fagolisossomo, essencial processo associado à capacidade microbicida de

fagócitos. Nesse sentido, foi observado que macrófagos estimulados com butirato (20 mM) e acetato (40 mM) apresentaram maior capacidade fungicida quando comparados a células não tratadas (Fig. 4), evidenciado pela significativa redução das CFU. Os experimentos utilizando propianato foram inconclusivos.

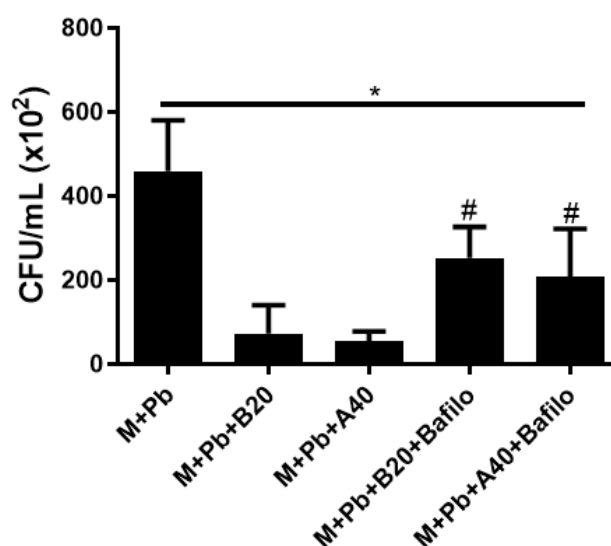


Figura 4 - Capacidade fungicida de macrófagos estimulados com SCFAs e infectados por leveduras de *P. brasiliensis*, com ou sem a presença de bafilomicina. Macrófagos RAW264.7 (M) foram estimulados ou não com butirato a 20 mM (B20), acetato a 40 mM (A40) e Bafilomicina A1 a 0,5 μ M (Bafilo) 1 hora antes da infecção por *P. brasiliensis* (Pb) em MOI = 1. Após 48 horas de infecção, os macrófagos foram lisados com água destilada estéril gelada, e o conteúdo, plaqueado em placa de Petri com BHI-ágar suplementado. As Unidades Formadoras de Colônia (CFU) foram contadas após 8 dias de plaqueamento. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão, representativos de um experimento independente conduzido em quadruplicata. * $p < 0,05$ comparado a M+Pb. # $p < 0,05$ comparado com cada grupo respectivo sem adição de bafilomicina.

Interessantemente, o efeito fungicida de macrófagos estimulados com SCFAs é parcialmente revertido na presença de bafilomicina, um inibidor de V-ATPase e da fusão de autofagossomo-lisossomo, sugerindo que a aumentada capacidade fungicida associada aos SCFAs depende não somente da indução da acidificação do fagolisossomo, mas também de outros mecanismos (Fig. 4).

Nesse contexto, considerando o papel fungicida do NO na infecção de macrófagos com *P. brasiliensis*, avaliamos a produção desse reativo de nitrogênio na forma de nitrito no sobrenadante dos cultivos celulares na presença dos SCFAs (Gonzalez *et al.*, 2000). Interessantemente, não ocorreu alteração significativa na produção de NO pelos grupos tratados em relação ao grupo infectado (M+Pb) (Fig. 5).

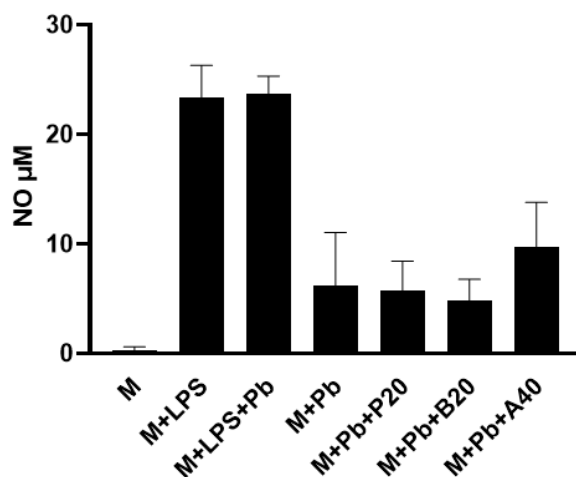
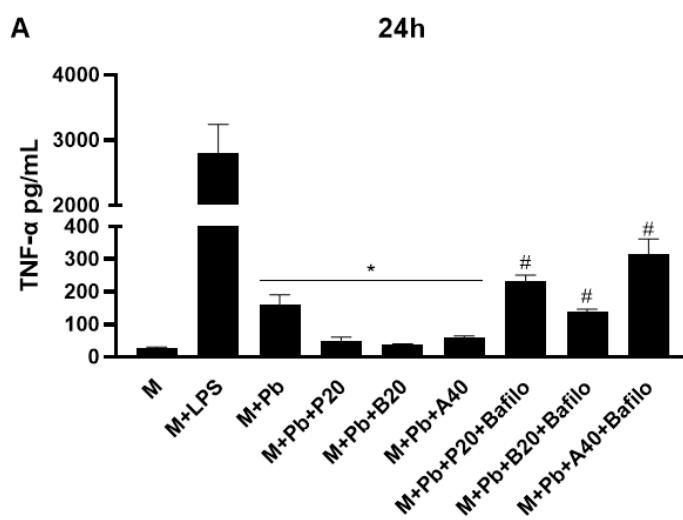


Figura 5 - Secreção de óxido nítrico (NO) por macrófagos estimulados com SCFAs e infectados por leveduras de *P. brasiliensis*. Macrófagos RAW264.7 (M) foram estimulados com propionato a 20 mM (P20), butirato a 20 mM (B20), acetato a 40 mM (A40) 1 hora antes da estimulação por LPS (1 μg/ml) ou infecção com *P. brasiliensis* (Pb) em MOI = 1. Após 48 horas, o sobrenadante foi coletado e utilizado para dosagem de nitrito por ensaio de Griess. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão, representativos de dois experimentos independentes conduzidos em quadruplicata.

Além disso, em macrófagos RAW264.7, o tratamento com bafilomicina inibiu o efeito imunomodulador dos SCFAs na produção de TNF- α em 24 e 48 horas (Fig. 6). Diante disso, pode-se inferir que a acidificação do fagolisossomo possui papel importante na resposta anti-inflamatória induzida por SCFAs, na infecção por *P. brasiliensis*, uma vez que inibe a produção dessa citocina pró-inflamatória.



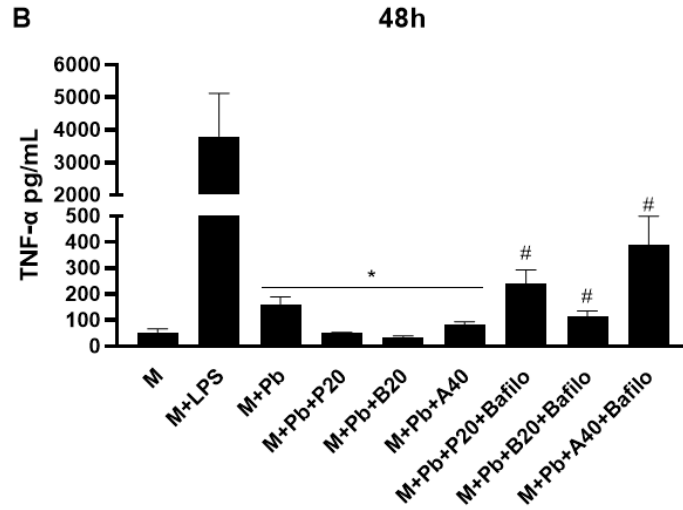


Figura 6 - Secreção de TNF- α por macrófagos estimulados com SCFAs e infectados por leveduras de *P. brasiliensis*, com ou sem a presença de bafilomicina. Macrófagos RAW264.7 (M) foram estimulados com propionato a 20 mM (P20), butirato a 20 mM (B20), acetato a 40 mM (A40) e Bafilomicina A1 a 0,5 μ M (Bafilo) 1 hora antes da estimulação por LPS (1 μ g/ml) ou infecção com *P. brasiliensis* (Pb) em MOI = 1. Após 24 (**A**) e 48 horas (**B**), o sobrenadante foi coletado e utilizado para dosagem de TNF- α por ensaio de ELISA. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão, representativos de dois experimentos independentes conduzidos em quadruplicata. * $p < 0,05$ comparado a M+Pb. # $p < 0,05$ comparado com cada grupo respectivo sem adição de Bafilomicina.

DISCUSSÃO

Os SCFAs (butirato, propionato e acetato), subprodutos da fermentação de fibras e carboidratos da dieta, podem modificar diversos processos celulares intra- e extraintestinais, como a manutenção da integridade da barreira epitelial e da homeostase da microbiota intestinal (Bongiovanni *et al.*, 2021; Hockenberry *et al.*, 2021; Kasubuchi *et al.*, 2015; Zhan *et al.*, 2022). Em processos inflamatórios e imunitários, são múltiplos os mecanismos que contribuem para o controle de patógenos, incluindo o efeito direto em microrganismos patogênicos. Nesse contexto, em nosso estudo, não foi observado impacto direto na viabilidade de *P. brasiliensis* por nenhum dos SCFAs, nas concentrações testadas, quando comparados à levedura não tratada (Resultados, Figura 1).

Em contraste, a literatura sugere que o butirato reduz tanto o crescimento quanto características de virulência de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e fungos como *C. albicans* e *C. neoformans* a partir da perturbação do balanço osmótico e aumento da permeabilização da membrana celular, de forma concentração-dependente (Du *et al.*, 2021; Kennedy *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2018; Nguyen *et al.*, 2011). Além disso, os SCFAs inibem o metabolismo energético fúngico e seus derivados atuam como doadores de acilações de lisina, impactando significativamente a função das proteínas e o proteoma fúngico, consequentemente alterando a morfologia de *C. albicans* (McCroory *et al.*, 2024; Xie *et al.*, 2024).

Ainda sobre *C. albicans*, o acetato mostrou aumentar a exposição de β -1,3-glucana na parede celular; cabe considerar que essa estrutura é reconhecida por receptores delectina-1 e induzem a ativação de fagócitos, e seu mascaramento por parte do fungo é um importante mecanismo de virulência para diversos fungos, como *C. neoformans*, *Aspergillus fumigatus* e o próprio *P. brasiliensis* (Ballou *et al.*, 2016; Carrion *et al.*, 2013; Hardison; Brown, 2012; O'Meara; Alspaugh, 2012; Puccia *et al.*, 2016). Portanto, apesar da ausência de efeito direto sobre a viabilidade fúngica, outros mecanismos devem ser explorados, como alteração da parede celular modulando o reconhecimento por macrófagos tratados com SCFAs.

Na infecção pulmonar por *P. brasiliensis*, células fagocíticas apresentam grande importância na contenção inicial do fungo, sendo que a resistência contra a infecção depende principalmente da ativação, capacidade de ingestão e fungicida de macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (Burger, 2021; Giusiano, 2021). Em relação à imunomodulação de fagócitos tratados com SCFAs, foi observada a inibição da secreção de citocinas tanto pró-quanto anti-inflamatórias em macrófagos e células dendríticas, tanto de linhagem imortalizada quanto primários derivados da medula óssea de camundongos (Resultados, Fig. 2 e 3A-B).

Pode-se sugerir que esse efeito ocorre devido à regulação da inflamação pelo equilíbrio na produção de citocinas pelos leucócitos, seja pelo controle da expressão gênica celular via inibição direta de HDACs, seja pela regulação de vias de sinalização intracelular (Yao *et al.*, 2022). Além disso, acredita-se que o efeito pró- ou anti-inflamatório dos SCFAs dependa de fatores como tipo da célula estimulada, condições, ambiente e tipo de estímulo, assim como a dose aplicada e os receptores celulares ativados (Corrêa-Oliveira *et al.*, 2016).

Corroborando com nossos achados de inibição da secreção de TNF- α por macrófagos e células dendríticas murinas, diversos estudos mostram a inibição da secreção de citocinas pró-inflamatórias em fagócitos estimulados com LPS, ou infectados por bactérias, e tratados com SCFAs (Cox *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2012b; Ohira *et al.*, 2013; Vinolo *et al.*, 2012). Na infecção por *P. brasiliensis*, a produção de TNF- α por macrófagos atua modulando e amplificando a resposta imunitária, estimulando reação granulomatosa na PCM experimental e promovendo atividade fungicida. A produção de IL-6, outra interleucina pró-inflamatória importante, possui atividade autócrina que estimula a produção de outras citocinas pró-inflamatórias e peptídeos antimicrobianos, além de induzir uma resposta adaptativa do tipo Th17, conferindo resistência parcial à PCM pulmonar experimental (Calvi *et al.*, 2003; Souto *et al.*, 2000; Tristão *et al.*, 2017).

Entretanto, estudos utilizando linhagens de camundongos resistentes (A/J) e suscetíveis (B10.A) para *P. brasiliensis* sugerem que altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6, por macrófagos ou células dendríticas estão relacionadas à suscetibilidade (Pina *et al.*, 2008; De-Souza-Silva *et al.*, 2020; Burger, 2021). Especificamente, avaliando o transcriptoma de BMDCs de camundongos A/J e B10.A à infecção por *P. brasiliensis*, foi demonstrado que BMDCs de camundongos suscetíveis apresentaram resposta mais intensa à infecção, com maior produção de TNF- α e IL-6 quando comparadas a BMDCs da linhagem resistente, sugerindo e corroborando que uma reação imunitária inflamatória exagerada e precoce a esse fungo pode estar ligada à suscetibilidade do hospedeiro. Associados a essa resposta de BMDCs da linhagem suscetível, foram observados repressão da acidificação lisossômica, da atividade catalítica e da função autofágica, o que pode afetar negativamente o processamento e apresentação de antígenos por BMDCs de camundongos suscetíveis, levando à ativação ineficaz da resposta imunitária adaptativa e maior suscetibilidade à infecção por *P. brasiliensis* (De-Souza-Silva *et al.*, 2020). Infere-se, portanto, que a secreção exacerbada de TNF- α e IL-6 por fagócitos é responsável pelo crescimento fúngico, estabelecimento da infecção por *P. brasiliensis* e intensificação da resposta inflamatória deletéria e, assim, sua inibição é benéfica para o controle da PCM.

Ademais, em BMDMs e BMDCs, os SCFAs, mais marcadamente o butirato e o propionato, também inibiram a secreção de IL-10, citocina de papel anti-inflamatório e pró-resolutivo em processos inflamatórios (Resultados, Fig. 3C-D). Embora os achados da literatura sejam divergentes, o estudo de Cox *et al.* (2009) com monócitos humanos *in vitro* estimulados com LPS mostrou redução na produção de diversas citocinas, incluindo IL-10, na presença de SCFAs; além disso, macrófagos tratados com butirato e infectados por *Salmonella enterica* apresentaram redução na expressão de RNA mensageiro (RNAm) *IL10* (Schulthess *et al.*, 2019).

Células dendríticas murinas expostas a antígenos particulados de *P. brasiliensis* são capazes de reduzir a produção de IL-10 por linfócitos T CD8⁺ (citotóxicos), além de reduzir a carga fúngica *in vivo* e estimular a indução de tolerância (Costa *et al.*, 2015). A deficiência de IL-10 em camundongos tem sido relacionada a resistência à infecção pulmonar por *P. brasiliensis*, por redução na produção de citocinas pró-inflamatórias e NO, promoção de imunidade humoral precoce e dano pulmonar controlado (Costa *et al.*, 2013). Portanto, a redução na produção de IL-10 por fagócitos infectados por *P. brasiliensis*, assim como a observada no tratamento com os SCFAs, deve ser benéfica para o controle da infecção.

Com relação a IL-12, sua secreção é considerada um dos principais mecanismos de defesa de fagócitos ativados na infecção por *P. brasiliensis*, por ser responsável pela polarização de uma resposta imunitária adaptativa do tipo Th1, protetora contra a PCM (Burger 2021; de Castro *et al.*, 2013). Da mesma forma, o tratamento de camundongos com IL-12 impede a disseminação extrapulmonar de fungos (Calich; Kashino, 1998; Livonesi *et al.*, 2008). No presente trabalho, não foi detectado produção significativa de IL-12 em qualquer grupo infectado com *P. brasiliensis*, tratado ou não com SCFAs.

De fato, o isolado Pb18 atua inibindo a produção de IL-12, especialmente em células dendríticas, mesmo na presença de zymosan (ligante do receptor dectina-1) ou LPS, por meio da inibição da transcrição do gene *IL12A* que codifica a subunidade p35 da IL-12 (Ferreira *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2021). Além disso, O butirato tem se demonstrado capaz de inibir a produção de IL-12 de forma dose-dependente em macrófagos murinos e em células dendríticas humanas, induzida por tanto por LPS quanto por outros estímulos pró-inflamatórios, como prostaglandinas e IL-1 β (Chang *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2012a; Millard *et al.*, 2002). Na infecção bacteriana por *E. coli*, macrófagos humanos e murinos também tiveram sua produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IL-6 e TNF diminuída quando estimulados com propionato (Ciarlo *et al.*, 2016).

A citocina IL-1 β , no contexto da infecção de fagócitos por *P. brasiliensis*, tem sua secreção da forma bioativa dependente do inflamassoma NLRP3 e está associada à proteção do hospedeiro contra o fungo *in vitro* e *in vivo* (Feriotti *et al.*, 2015; Ketelut-Carneiro *et al.*, 2018; Kurokawa *et al.*, 2007; Tavares *et al.*, 2013). Além de outros efeitos imunomodulatórios relevantes, os SCFAs também atuam na ativação do inflamassoma NLRP3 quando associado a estímulos de TLRs e, conseqüentemente, no aumento da produção de IL-1 β em fagócitos (Ratajczak *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2024).

Importante notar que o *P. brasiliensis* é reconhecido pelos receptores TLR2 e TLR4 (Loures *et al.*, 2009; Loures *et al.*, 2010). De forma similar ao encontrado no presente trabalho, Wang e colaboradores (2024) mostraram que, em macrófagos humanos tratados com propionato ou butirato, a ativação de inflamassoma NLRP3 reduz a resposta inflamatória promovida por LPS – um ligante de TLR4 – com inibição da produção de citocinas como TNF- α e IL-10, e indução de IL-1 β dose-dependente dos SCFAs. Interessantemente, a inibição da secreção de IL-10 é necessária para a ativação do inflamassoma, uma vez que sua secreção é parcialmente mediada pela inibição da ativação de NLRP3. Esse efeito é consistente com o encontrado em nosso estudo, uma vez que os SCFAs promoveram, simultaneamente, a inibição de IL-10 e TNF- α e o aumento na secreção da forma bioativa de IL-1 β (Resultados, Fig. 3). Em conjunto, os resultados associados à secreção de citocinas sugerem que os SCFAs são capazes de promover o equilíbrio na produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias por fagócitos diante da infecção por *P. brasiliensis*, o que deve favorecer a resistência à infecção.

Além do perfil da produção de citocinas pelos fagócitos, é essencial avaliar o impacto do tratamento com SCFAs na capacidade fungicida dessas células. Macrófagos murinos estimulados com butirato e acetato anteriormente à infecção por *P. brasiliensis* apresentaram maior capacidade fungicida quando comparados a células não tratadas (Resultados, Fig. 4). Esse efeito também pode ser visto na infecção experimental de macrófagos por fungos patogênicos *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. neoformans*; e bactérias (*E. coli*, *C. difficile*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, entre outras) tratados com SCFAs (Fachi *et al.*, 2019; Nguyen *et al.*, 2011; Xiong *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2019).

Para que a degradação de partículas fúngicas ou bacterianas ocorra, é necessária a fusão entre lisossomos e o fagossomo contendo o fungo, formando o fagolisossomo. Esse processo, denominado de maturação do fagolisossomo, é caracterizado pela acidificação progressiva dessa organela via V-ATPase e é essencial para atuação das enzimas lisossomais e otimização da capacidade microbicida de fagócitos (Jia *et al.*, 2024). Nesse contexto, utilizamos

Bafilomicina A1 para inibir a acidificação fagolisossomal e mostramos que o efeito fungicida induzido pelos SCFA era significativamente reduzido (Resultados, Fig. 4).

De fato, há evidências tanto da formação quanto da acidificação do fagolisossomo serem moduladas pelos SCFAs, uma vez que esses ácidos graxos também promovem a formação dessa estrutura a partir de seu reconhecimento por receptores de membrana GPCR43 e consequente aumento na expressão da via quinase mTOR, associada ao sucesso da fusão fagossomo-lisossomo levando, por exemplo, a eliminação eficiente de *Klebsiella pneumoniae* em macrófagos RAW264.7 e alveolares de camundongos (Wu *et al.*, 2020).

Em *P. brasiliensis*, a acidificação do fagolisossomo também tem sido mostrada como um fator necessário na ativação de inflamassoma NLRP3 em fagócitos infectados por esse fungo, e que a sinalização mediada por IL-1R1, o receptor de IL-1 β , é necessária para atividade fungicida de macrófagos (Tavares *et al.*, 2013). Ainda, a sinalização de IL-1R1 é necessária para a maturação fagolisossomal e atividade microbida de macrófagos infectados com *Mycobacterium tuberculosis* (Fremond *et al.*, 2007; Lazarevic; Martinon, 2008). Nesse sentido, pode-se sugerir que o impedimento da acidificação do fagolisossomo comprometeu a ativação de NLRP3 e, conseqüentemente, a capacidade fungicida de macrófagos, ainda que tratados com SCFAs.

Importante notar que os resultados do CFU sugerem que a inibição da acidificação do fagolisossomo pela bafilomicina não compromete completamente a capacidade fungicida de macrófagos estimulados por SCFAs, uma vez que os grupos tratados com bafilomicina ainda apresentam redução significativa do crescimento fúngico em relação ao grupo controle (M+Pb). A partir disso, infere-se que os SCFAs interferem na capacidade fungicida de macrófagos por mais de um mecanismo.

Assim, consideramos a modulação da produção de NO pelos SCFAs nos macrófagos infectados por *P. brasiliensis*. O NO é uma importante molécula microbida geradas no interior de fagolisossomos de fagócitos, e possui atividade sinérgica a ROS na formação de compostos oxidantes que resultam em dano e morte celular, sendo considerado um importante fator fungicida em fagócitos infectados por *P. brasiliensis* (Feriotti *et al.*, 2013; Giusiano, 2021; Gonzalez *et al.*, 2000; Moscardi-Bacchi *et al.*, 1994). Entretanto, o tratamento com SCFA não resultou em aumento da produção de NO (Resultados, Fig. 5).

Importante notar que a eliminação eficiente de outros fungos patogênicos, como *C. albicans* e *Histoplasma capsulatum*, requer maturação fagolisossomal independente da função de NO, como sugerido no presente trabalho (Newman *et al.*, 2005; Strasser *et al.*, 1999). Além

disso, ROS também podem estar atuando, como já descrito para *P. brasiliensis* (Carmo *et al.*, 2006; Souto *et al.*, 2000). Na infecção por *P. brasiliensis*, o NO possui um papel duplo: apesar de mediar o aumento da capacidade fungicida de macrófagos ativados por citocinas (como IFN- γ), existe uma correlação inversa entre as produções de TNF- α e NO em macrófagos alveolares e peritoneais de camundongos resistentes A/J (Nascimento *et al.*, 2002). Nesse sentido, altos níveis de NO produzidos por monócitos murinos estão associados a efeito deletério na PCM pulmonar, com redução na formação de granulomas e aumento da disseminação fúngica e de metaloproteinases, o que indica que sua modulação pode melhorar o prognóstico clínico da PCM (Bernardino *et al.*, 2013; Bocca *et al.*, 1998; Nishikaku *et al.*, 2009).

Os SCFAs demonstram efeitos complexos e, muitas vezes, contraditórios na modulação da produção de NO por fagócitos. Machado e colaboradores (2022) mostraram que o acetato aumenta a produção de NO por macrófagos alveolares estimulados por *Streptococcus pneumoniae*. Esse efeito é dependente da produção de IL-1 β , que atua de forma autócrina promovendo a produção desse óxido. No estudo de Nguyen e colaboradores (2011), macrófagos J774.16 infectados por *C. albicans* e *C. neoformans* aumentaram a secreção de NO quando tratados com butirato a 20 e 40 mM; interessantemente, ambos SCFAs reduziram a secreção de NO por macrófagos estimulados com LPS.

Esse efeito pode ser explicado pela supressão da via de sinalização NF- κ B e pela inibição direta de HDACs desses SCFAs, com consequente repressão da transcrição do gene *Nos2* (codificador da enzima iNOS, ou óxido nítrico-sintase induzida) e então redução na produção de NO (Chang *et al.*, 2014; Corrêa-Oliveira *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2012b). Além disso, a polarização de macrófagos para um fenótipo M2 promovida por butirato e propionato também é caracterizada por uma menor produção de NO em comparação ao fenótipo M1 (de maior atividade microbicida) (Xie *et al.*, 2024; Ji *et al.*, 2016).

Estudos posteriores devem ser conduzidos para avaliar o papel dos SCFAs na modulação da produção de ROS na infecção por *P. brasiliensis*. Macrófagos infectados por *S. enterica* mostraram aumento na produção de ROS quando previamente estimulados com butirato e propionato a partir do aumento da atividade da enzima NADPH oxidase; em contrapartida, na infecção por *C. albicans* e *C. neoformans*, houve redução na concentração de superóxido, embora o mecanismo envolvido ainda não seja bem elucidado (Nguyen *et al.*, 2011; Schulthess *et al.*, 2019).

Finalmente, a acidificação do fagolisossomo parece ter relação com o efeito anti-inflamatório dos SCFAs, especialmente na produção de TNF- α por macrófagos diante da

infecção por *P. brasiliensis* (Resultados, Fig. 6), estando o aumento da produção de TNF- α , quando no tratamento com bafilomicina, associado a menor capacidade fungicida dos macrófagos, como observado nos ensaios de CFU. Entretanto, os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não foram descritos na literatura e, portanto, devem ser mais bem explorados.

CONCLUSÕES

Em síntese, os SCFAs não mostraram efeito direto na viabilidade de *P. brasiliensis*, porém inibiram a secreção de citocinas pró- e anti-inflamatórias na infecção de macrófagos e células dendríticas murinas por *P. brasiliensis in vitro*. Além disso, a acidificação do fagolisossomo é necessária — mas não suficiente — para a atividade fungicida induzida por SCFAs. Os achados, portanto, sugerem um papel imunomodulador dos SCFAs nesses fagócitos (Fig. 1).

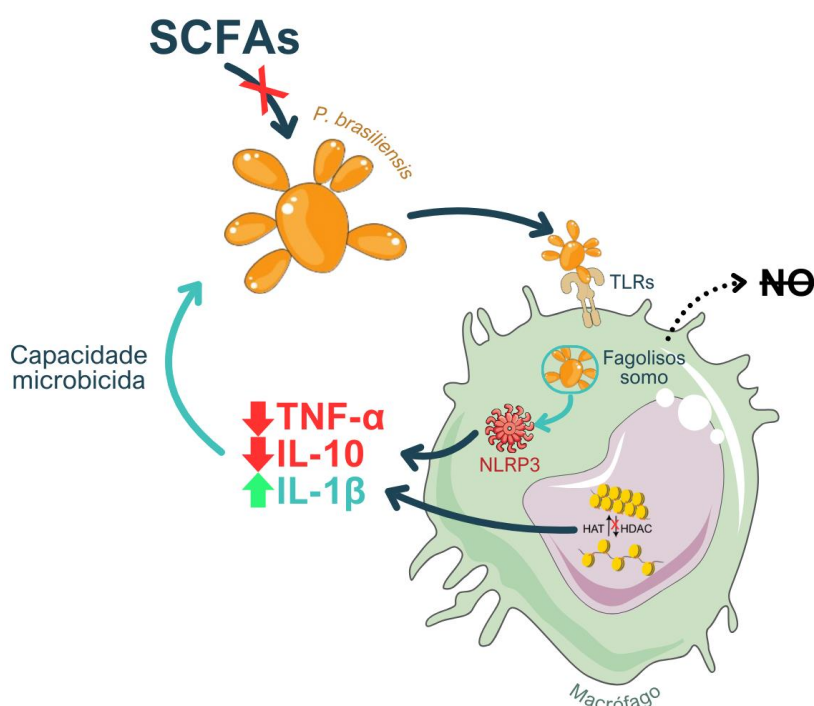


Figura 1 - Efeito imunomodulatório dos SCFAs em macrófagos infectados por *P. brasiliensis*. Os SCFAs acetato, butirato e propianato não mostraram efeito direto na viabilidade fúngica. Entretanto, a partir do reconhecimento de padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs) da parede fúngica por receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) de macrófagos (ou células dendríticas), possivelmente TLRs (receptores *Toll-like*), ocorre a fagocitose da levedura e a fusão/maturação do fagolisossomo, estrutura cuja acidificação interfere parcialmente no efeito fungicida dos SCFAs, porém sem modulação na concentração de óxido nítrico (NO). Acredita-se que, a partir da acidificação do fagolisossomo, há ativação do complexo multiproteico citoplasmático inflamassoma NLRP3 que, em sinergia com o efeito direto de inibição de histona desacetilases (HDAC) dos SCFAs, promove a inibição na secreção de citocinas pró- (TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-10), e aumento na secreção de IL-1 β em sua forma bioativa, com consequente aumento da capacidade microbicida desses fagócitos. Fonte: autoria própria.

Os achados desse trabalho apresentam, naturalmente, limitações dos resultados *in vitro* em relação a reprodutibilidade da complexidade da infecção *in vivo*, dificuldade na definição da concentração ideal de SCFAs para a modulação da resposta imune em tipos celulares e

modelos experimentais distintos e envolvimento de mecanismos de ação não mencionados. No entanto, a comprovação da atividade imunomodulatória dos SCFAs em fagócitos infectados por *P. brasiliensis in vitro* representa um importante passo na pesquisa básica com perspectivas para o desenvolvimento de novas terapias.

Haja vista o pioneirismo do presente trabalho em relação ao efeito imunomodulatório dos SCFAs na infecção por *P. brasiliensis*, diversas questões ainda necessitam ser elucidadas, como o efeito desses SCFAs na morfologia e composição da parede celular fúngica, interação com *P. brasiliensis* e função fagocítica dos fagócitos, modulação e papel da produção de ROS na capacidade fungicida, além de detalhar o papel da fusão e acidificação do fagolisossomo e elucidar o potencial papel imunomodulador dos SCFAs na PCM experimental pulmonar em camundongos (*in vivo*).

REFERÊNCIAS

- Adak, Atanu; Khan, Mojibur R. An insight into gut microbiota and its functionalities. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, p. 473-493, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2943-4>
- Astakhova, Lidiia *et al.* Short chain fatty acids (SCFA) reprogram gene expression in human malignant epithelial and lymphoid cells. **PLoS One**, v. 11, n. 7, p. e0154102, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154102>
- Ballou, Elizabeth R. *et al.* Lactate signalling regulates fungal β -glucan masking and immune evasion. **Nature Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 1-9, 2016. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.238>
- Bauernfeind, Franz; Hornung, Veit. Of inflammasomes and pathogens-sensing of microbes by the inflammasome. **EMBO Molecular Medicine**, v. 5, p. 814–826, 2013. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201771>
- Baunwall, Simon Mark Dahl *et al.* Faecal microbiota transplantation for first or second *Clostridioides difficile* infection (EarlyFMT): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **The Lancet Gastroenterology & Hepatology**, v. 7, n. 12, p. 1083-1091, 2022. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(22\)00276-X](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(22)00276-X)
- Bernardino, Simone *et al.* TNF- α and CD8+ T cells mediate the beneficial effects of nitric oxide synthase-2 deficiency in pulmonary paracoccidioidomycosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 8, p. e2325, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002325>
- Bocca, Anamélia L. *et al.* Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. **The Journal of Immunology**, v. 161, n. 6, p. 3056-3063, 1998. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.161.6.30566>
- Bongiovanni, Tindaro *et al.* The athlete and gut microbiome: Short-chain fatty acids as potential ergogenic aids for exercise and training. **International Journal of Sports Medicine**, v. 42, n. 13, p. 1143-1158, 2021. <https://doi.org/10.1055/a-1524-2095>
- Burger, Eva. Paracoccidioidomycosis protective immunity. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 137, 2021. <https://doi.org/10.3390/JOF7020137>
- Calich, Vera Lúcia Garcia; Kashino, Suely Sanae. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 615-623, 1998. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X1998000500003>
- Calich, Vera Lúcia Garcia *et al.* Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 66, n. 5, p. 585, 1985.
- _____. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Mycopathologia**, v. 165, p. 223-236, 2008. <https://doi.org/10.1007/s11046-007-9048-1>

_____. Regulatory T cells in paracoccidioidomycosis. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 810–821, 2019. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1483674>

Calvi, Sueli A. *et al.* Effect of cytokines on the in vitro fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 2, p. 107-113, 2003. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(02\)00078-3](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(02)00078-3)

Cardoso-Miguel, Mariana de Resende Damas *et al.* Dectin-2 is critical for phagocyte function and resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* in mice. **Medical Mycology**, v. 61, n. 11, p. myad117, 2023. <https://doi.org/10.1093/mmy/myad117>

Carmo, J. P. M. *et al.* TNF- α activates human monocytes for *Paracoccidioides brasiliensis* killing by an H₂O₂-dependent mechanism. **Medical Mycology**, v. 44, n. 4, p. 363-368, 2006. <https://doi.org/10.1080/13693780500536885>

Carrion, Steven de Jesus *et al.* The rodA hydrophobin on *Aspergillus fumigatus* spores masks dectin-1–and dectin-2–dependent responses and enhances fungal survival *in vivo*. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 5, p. 2581-2588, 2013. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300748>

Cermeño, Julman R. *et al.* *In vitro* susceptibility of isolates of *Paracoccidioides* spp complex to systemic antifungals using the microdilution method. **Investigación Clínica**, v. 56, n. 3, p. 243-264, 2015. ISSN 0535-5133

Chang, Pamela V. *et al.* The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 6, p. 2247-2252, 2014. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322269111>

Chen, Guangxin *et al.* Sodium butyrate inhibits inflammation and maintains epithelium barrier integrity in a TNBS-induced inflammatory bowel disease mice model. **EBioMedicine**, v. 30, p. 317-325, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.03.030>

Chiyoda-Rodini, Franciele Ayumi Semêncio *et al.* Aspectos imunológicos da paracoccidioidomicose. **Biosaúde**, v. 22, n. 1, p. 34-47, 2020.

Ciarlo, Eleonora *et al.* Impact of the microbial derived short chain fatty acid propionate on host susceptibility to bacterial and fungal infections *in vivo*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 37944, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep37944>

Cocio, Tiago A. *et al.* Phylogenetic species of *Paracoccidioides* spp. isolated from clinical and environmental samples in a hyperendemic area of paracoccidioidomycosis in Southeastern Brazil. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 3, p. 132, 2020. <https://doi.org/10.3390%2Fjof6030132>

Costa, Christiane da Silva *et al.* Transporters in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome: insights on drug resistance. **Genetics and Molecular Research**, v. 4, n. 2, p. 390-408, 2005. PMID: 16110453

Costa, Tania A. *et al.* In pulmonary paracoccidioidomycosis IL-10 deficiency leads to increased immunity and regressive infection without enhancing tissue pathology. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 10, p. e2512, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002512>

Costa, Thiago Alves da *et al.* Protection against *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice treated with modulated dendritic cells relies on inhibition of interleukin-10 production by CD 8+ T cells. **Immunology**, v. 146, n. 3, p. 486-495, 2015. <https://doi.org/10.1111/imm.12526>

Cox, Mary Ann *et al.* Short-chain fatty acids act as antiinflammatory mediators by regulating prostaglandin E2 and cytokines. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 15, n. 44, p. 5549, 2009. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.5549>

Corrêa-Oliveira, Renan *et al.* Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. **Clinical & Translational Immunology**, v. 5, n. 4, p. e73, 2016. <https://doi.org/10.1038/cti.2016.17>

Coutinho, Ziadir Francisco *et al.* Hospital morbidity due to paracoccidioidomycosis in Brazil (1998–2006). **Tropical Medicine & International Health**, v. 20, n. 5, p. 673-680, 2015. <https://doi.org/10.1111/tmi.12472>

Cruz, Rosana de Carvalho. Condições experimentais para a determinação da susceptibilidade de *Paracoccidioides brasiliensis* e seleção de subpopulações menos sensíveis a antifúngicos. 2012. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais.

de Castro, Lívia Furquim *et al.* Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. **Journal of Infection**, v. 67, n. 5, p. 470-485, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2013.07.019>

De-Souza-Silva, Calliandra M. *et al.* Transcriptional remodeling patterns in Murine Dendritic Cells Infected with *Paracoccidioides brasiliensis*: more is not necessarily better. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 311, 2020. <https://doi.org/10.3390/jof6040311>

de Sugiura, Igor Massahiro Souza; Ono, Mario Augusto. Compulsory notification of paracoccidioidomycosis: A 14-year retrospective study of the disease in the state of Paraná, Brazil. **Mycoses**, v. 65, n. 3, p. 354-361, 2022. <https://doi.org/10.1111/myc.13417>

Du, Ke *et al.* A literature survey on antimicrobial and immune-modulatory effects of butyrate revealing non-antibiotic approaches to tackle bacterial infections. **European Journal of Microbiology and Immunology**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2021. <https://doi.org/10.1556/1886.2021.00001>

Fachi, José Luís *et al.* Acetate coordinates neutrophil and ILC3 responses against *C. difficile* through FFAR2. **Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 3, 2019. <https://doi.org/10.1084/jem.20190489>

Felipe, Maria Sueli S. *et al.* Functional genome of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 369-381, 2005a. <https://doi.org/10.1016/j.femsim.2005.05.013>

Felipe, Maria Sueli S. *et al.* Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 26, p. 24706-24714, 2005b. <https://doi.org/10.1074/jbc.m500625200>

Feriotti, Claudia *et al.* Expression of dectin-1 and enhanced activation of NALP3 inflammasome are associated with resistance to paracoccidioidomycosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 913, 2015. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00913>

Feriotti, Claudia *et al.* Mannosyl-recognizing receptors induce an M1-like phenotype in macrophages of susceptible mice but an M2-like phenotype in mice resistant to a fungal infection. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e54845, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054845>

Fernández-García, Oscar A.; Cuellar-Rodríguez, Jennifer M. Immunology of fungal infections. **Infectious Disease Clinics**, v. 35, n. 2, p. 373-388, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2021.03.006>

Ferreira, Caroline Marcantonio *et al.* The central role of the gut microbiota in chronic inflammatory diseases. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, n. 1, p. 689492, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/689492>

Ferreira, Karen Spadari *et al.* Down-regulation of dendritic cell activation induced by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Immunology letters**, v. 94, n. 1-2, p. 107-114, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2004.04.005>

Figueiredo, Mediã Barbosa. Inquérito com paracoccidioidina em cinco cidades do Estado do Acre. 2012. Tese (Doutorado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) - Universidade Federal do Pará.

Fonseca, Wendy *et al.* *Lactobacillus johnsonii* supplementation attenuates respiratory viral infection via metabolic reprogramming and immune cell modulation. **Mucosal Immunology**, v. 10, n. 6, p. 1569-1580, 2017. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.13>

Fortes, Maria Rita Parise *et al.* Immunology of paracoccidioidomycosis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, p. 516-524, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962011000300014>

Fremond, Cecile M. *et al.* IL-1 receptor-mediated signal is an essential component of MyD88-dependent innate response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 2, p. 1178-1189, 2007. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.2.1178>

Giusiano, Gustavo. The Trojan horse model in *Paracoccidioides*: a fantastic pathway to survive infecting human cells. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 605679, 2021. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.605679/>

Gonzalez, Angel *et al.* Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 5, p. 2546-2552, 2000. <https://doi.org/10.1128/iai.68.5.2546-2552.2000>

Guinan, Jack *et al.* Antibiotic-induced decreases in the levels of microbial-derived short-chain fatty acids correlate with increased gastrointestinal colonization of *Candida albicans*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 8872, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45467-7>

Gurav, Ashish *et al.* Slc5a8, a Na⁺-coupled high-affinity transporter for short-chain fatty acids, is a conditional tumour suppressor in colon that protects against colitis and colon cancer

under low-fibre dietary conditions. **Biochemical Journal**, v. 469, n. 2, p. 267-278, 2015. <https://doi.org/10.1042/BJ20150242>

Hansson, Gunnar C.; Johansson, Malin E. V. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. **Gut Microbes**, v. 1, n. 1, p. 51-54, 2010. <https://doi.org/10.4161/gmic.1.1.10470>

Hardison, Sarah E.; Brown, Gordon D. C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. **Nature Immunology**, v. 13, n. 9, p. 817-822, 2012. <https://doi.org/10.1038/ni.2369>

Hockenberry, Alyson M. *et al.* Microbiota-derived metabolites inhibit *Salmonella* virulent subpopulation development by acting on single-cell behaviors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 31, p. e2103027118, 2021. <https://doi.org/10.1073/pnas.2103027118>

Hrycyk, Marluce Francisca *et al.* Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*, *P. lutzii* and related species: infection in armadillos, soil occurrence and mycological aspects. **Medical Mycology**, v. 56, n. 8, p. 950-962, 2018. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx142>

Imhann, Floris *et al.* Interplay of host genetics and gut microbiota underlying the onset and clinical presentation of inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 67, n. 1, p. 108-119, 2018. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312135>

Ji, Jian *et al.* Microbial metabolite butyrate facilitates M2 macrophage polarization and function. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 24838, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep24838>

Jia, Lei-Jie *et al.* Manipulation of host phagocytosis by fungal pathogens and therapeutic opportunities. **Nature Microbiology**, p. 1-16, 2024. <https://doi.org/10.1038/s41564-024-01780-0>

Johanesen, Priscilla A. *et al.* Disruption of the gut microbiome: *Clostridium difficile* infection and the threat of antibiotic resistance. **Genes**, v. 6, n. 4, p. 1347-1360, 2015. <https://doi.org/10.3390/genes6041347>

Kamada, Nobuhiko *et al.* Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 5, p. 321-335, 2013. <https://doi.org/10.1038/nri3430>

Kasubuchi, Mayu *et al.* Dietary gut microbial metabolites, short-chain fatty acids, and host metabolic regulation. **Nutrients**, v. 7, n. 4, p. 2839-2849, 2015. <https://doi.org/10.3390/nu7042839>

Kennedy, George M. *et al.* Inactivation of the bacterial pathogens *Staphylococcus pseudintermedius* and *Acinetobacter baumannii* by butanoic acid. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 3, p. 752-763, 2019. <https://doi.org/10.1111/jam.14180>

Ketelut-Carneiro, Natália *et al.* A dectin-1-caspase-8 pathway licenses canonical caspase-1 inflammasome activation and interleukin-1 β release in response to a pathogenic fungus. **Journal of Infectious Diseases**, n. 217, v. 2, p. 329-339, 2018. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix568>

Kurokawa, Cilmery Suemi *et al.* Pro-and anti-inflammatory cytokines produced by human monocytes challenged *in vitro* with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbiology and Immunology**, v. 51, n. 4, p. 421-428, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2007.tb03929.x>

Lazarevic, Vanja; Martinon, Fabio. Linking inflammasome activation and phagosome maturation. **Cell Host & Microbe**, v. 3, n. 4, p. 199-200, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2008.03.006>

Li, Naijian *et al.* Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of chronic obstructive pulmonary disease. **Respiratory Research**, v. 22, p. 1-15, 2021. <https://doi.org/10.1186/s12931-021-01872-z>

Liu, Lu *et al.* Butyrate interferes with the differentiation and function of human monocyte-derived dendritic cells. **Cellular Immunology**, v. 277, n. 1-2, p. 66-73, 2012a. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.05.011>

Liu, Quan *et al.* Histone deacetylase inhibitors up-regulate LL-37 expression independent of toll-like receptor mediated signalling in airway epithelial cells. **Journal of Inflammation**, v. 10, p. 1-6, 2013. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-10-15>

Liu, Tengfei *et al.* Short-chain fatty acids suppress lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and proinflammatory cytokines through inhibition of NF- κ B pathway in RAW264. 7 cells. **Inflammation**, v. 35, p. 1676-1684, 2012b. <https://doi.org/10.1007/s10753-012-9484-z>

Livonesi, Márcia Cristina *et al.* Deficiency of IL-12p40 subunit determines severe paracoccidioidomycosis in mice. **Medical Mycology**, v. 46, n. 7, p. 637-646, 2008. <https://doi.org/10.1080/13693780801982762>

Loures, Flávio V. *et al.* Dectin-1 induces M1 macrophages and prominent expansion of CD8+ IL-17+ cells in pulmonary Paracoccidioidomycosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 5, p. 762-773, 2014. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu136>

_____. TLR2 is a negative regulator of Th17 cells and tissue pathology in a pulmonary model of fungal infection. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 2, p. 1279-1290, 2009. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0801599>

_____. Toll-like receptor 4 signaling leads to severe fungal infection associated with enhanced proinflammatory immunity and impaired expansion of regulatory T cells. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 3, p. 1078-1088, 2010. <https://doi.org/10.1128/iai.01198-09>

Lu, Yankun *et al.* Early-life antibiotic exposure and childhood asthma trajectories: a National Population-Based Birth Cohort. **Antibiotics**, v. 12, n. 2, p. 314, 2023. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020314>

Lutz, Manfred B. *et al.* An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. **Journal of Immunological Methods**, v. 223, n. 1, p. 77-92, 1999. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(98\)00204-x](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(98)00204-x)

Lynch, Susan V.; Pedersen, Oluf. The human intestinal microbiome in health and disease. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 24, p. 2369-2379, 2016. <https://doi.org/10.1056/nejmra1600266>

Machado, Marina Gomes *et al.* Acetate improves the killing of *Streptococcus pneumoniae* by alveolar macrophages via NLRP3 inflammasome and glycolysis-HIF-1 α axis. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 773261, 2022. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.773261>

Machiels, Kathleen *et al.* A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. **Gut**, v. 63, n. 8, p. 1275-1283, 2014. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-304833>

Madhusudhan, V. L. Efficacy of 1% acetic acid in the treatment of chronic wounds infected with *Pseudomonas aeruginosa*: prospective randomised controlled clinical trial. **International wound journal**, v. 13, n. 6, p. 1129-1136, 2016. <https://doi.org/10.1111/iwj.12428>

Mamoni, Ronei Luciano; Blotta, Maria Heloisa Souza Lima. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. **Cytokine**, v. 32, n. 1, p. 20-29, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2005.07.006>

Mann, Elizabeth R. *et al.* Short-chain fatty acids: linking diet, the microbiome and immunity. **Nature Reviews Immunology**, p. 1-19, 2024. <https://doi.org/10.1038/s41577-024-01014-8>

Martinez, Roberto. New trends in paracoccidioidomycosis epidemiology. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p. 1, 2017. <https://doi.org/10.3390/jof3010001>

Maslowski, Kendle M. *et al.* Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. **Nature**, v. 461, n. 7268, p. 1282-1286, 2009. <https://doi.org/10.1038/nature08530>

McCrary, Christopher *et al.* Bacteria-derived short-chain fatty acids as potential regulators of fungal commensalism and pathogenesis. **Trends in Microbiology**, v. 32, n. 11, p. 1106-1118, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2024.04.004>

Mendes, Rinaldo Poncio *et al.* Paracoccidioidomycosis: current perspectives from Brazil. **The Open Microbiology Journal**, v. 11, p. 224, 2017. <https://doi.org/10.2174/1874285801711010224>

Millard, A. L. *et al.* Butyrate affects differentiation, maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells and macrophages. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 130, n. 2, p. 245-255, 2002. <https://doi.org/10.1046/j.0009-9104.2002.01977.x>

Mirmonsef, Paria *et al.* Short-chain fatty acids induce pro-inflammatory cytokine production alone and in combination with toll-like receptor ligands. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 67, n. 5, p. 391-400, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2011.01089.x>

Morris, Arthur J. *et al.* *Talaromyces marneffeii*, *Coccidioides* species, and *Paracoccidioides* species—a systematic review to inform the World Health Organization priority list of fungal pathogens. **Medical Mycology**, v. 62, n. 6, 2024. <https://doi.org/10.1093/mmy/myad133>

- Moscardi-Bacchi, Maura *et al.* Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. **Journal of Medical Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 159-164, 1994. <http://dx.doi.org/10.1099/00222615-40-3-159>
- Nascimento, Flávia R. F. *et al.* Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 9, p. 4593-4600, 2002. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.9.4593>
- Newman, Simon L. *et al.* Enhanced killing of *Candida albicans* by human macrophages adherent to type 1 collagen matrices via induction of phagolysosomal fusion. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 2, p. 770-777, 2005. <https://doi.org/10.1128/iai.73.2.770-777.2005>
- Nishikaku, Angela Satie *et al.* Nitric oxide participation in granulomatous response induced by *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 198, p. 123-135, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00430-009-0113-x>
- Nguyen, Long Nam *et al.* Sodium butyrate inhibits pathogenic yeast growth and enhances the functions of macrophages. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 11, p. 2573-2580, 2011. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr358>
- Ohira, Hideo *et al.* Butyrate attenuates inflammation and lipolysis generated by the interaction of adipocytes and macrophages. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 20, n. 5, p. 425-442, 2013. <https://doi.org/10.5551/jat.15065>
- O'Meara, Teresa R.; Alspaugh, J. Andrew. The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 3, p. 387-408, 2012. <https://doi.org/10.1128/cmr.00001-12>
- Özçam, Mustafa; Lynch, Susan V. The gut–airway microbiome axis in health and respiratory diseases. **Nature Reviews Microbiology**, p. 1-15, 2024. <https://doi.org/10.1038/s41579-024-01048-8>
- Park, Jeongho *et al.* Short-chain fatty acids induce both effector and regulatory T cells by suppression of histone deacetylases and regulation of the mTOR–S6K pathway. **Mucosal Immunology**, v. 8, n. 1, p. 80-93, 2015. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.44>
- Peçanha-Pietrobon, Paula Massaroni *et al.* Diagnosis and treatment of pulmonary coccidioidomycosis and paracoccidioidomycosis. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 2, p. 218, 2023. <https://doi.org/10.3390/jof9020218>
- Pina, Adriana *et al.* Alveolar macrophages from susceptible mice are more competent than those of resistant mice to control initial *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Journal of Leucocyte Biology**, v. 83, n. 5, p. 1088-1099, 2008. <https://doi.org/10.1189/jlb.1107738>
- Puccia, Rosana *et al.* The cell wall-associated proteins in the dimorphic pathogenic species of *Paracoccidioides*. **Current Protein and Peptide Science**, v. 18, n. 11, p. 1074-1089, 2017. <https://doi.org/10.2174/1389203717666160812233437>
- Ratajczak, Weronika *et al.* Immunomodulatory potential of gut microbiome-derived short-chain fatty acids (SCFAs). **Acta Biochimica Polonica**, v. 66, n. 1, p. 1-12, 2019. https://doi.org/10.18388/abp.2018_2648

Rodrigues, Marcio L.; Nosanchuk, Joshua D. Recognition of fungal priority pathogens: What next?. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 17, n. 3, p. e0011136, 2023. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011136>

Rodriguez, Cristina *et al.* *Clostridium difficile* infection and intestinal microbiota interactions. **Microbial Pathogenesis**, v. 89, p. 201-209, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.10.018>

Roduit, Caroline *et al.* High levels of butyrate and propionate in early life are associated with protection against atopy. **Allergy**, v. 74, n. 4, p. 799-809, 2019. <https://doi.org/10.1111/all.13660>

Sanchez, Helia N. *et al.* B cell-intrinsic epigenetic modulation of antibody responses by dietary fiber-derived short-chain fatty acids. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 60, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13603-6>

Schulthess, Julie *et al.* The short chain fatty acid butyrate imprints an antimicrobial program in macrophages. **Immunity**, v. 50, n. 2, p. 432-445. e7, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.12.018>

Sencio, Valentin *et al.* Gut dysbiosis during influenza contributes to pulmonary pneumococcal superinfection through altered short-chain fatty acid production. **Cell Reports**, v. 30, n. 9, p. 2934-2947. e6, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.013>

Shikanai-Yasuda, Maria Aparecida *et al.* Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 715-740, 2017. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0230-2017>

Silva, G. S. *et al.* Zymosan enhances *in vitro* phagocyte function and the immune response of mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medical Mycology**, v. 59, n. 8, p. 749-762, 2021. <https://doi.org/10.1093/mmy/myaa117>

Silva, Livia do Carmo *et al.* Overview of antifungal drugs against paracoccidioidomycosis: how do we start, where are we, and where are we going?. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 300, 2020. <https://doi.org/10.3390/jof6040300>

Souto, Janeusa T. *et al.* Interferon- γ and tumor necrosis factor- α determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **The American Journal of Pathology**, v. 156, n. 5, p. 1811-1820, 2000. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)65053-5](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)65053-5)

Strasser, Jane E. *et al.* Regulation of the macrophage vacuolar ATPase and phagosomal-lysosome fusion by *Histoplasma capsulatum*. **The Journal of Immunology**, v. 162, n. 10, p. 6148-6154, 1999. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.162.10.6148>

Tavares, Aldo Henrique *et al.* NLRP3 inflammasome activation by *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 12, p. e2595, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002595>

Tavares, Aldo Henrique *et al.* Transcriptomic reprogramming of genus *Paracoccidioides* in dimorphism and host niches. **Fungal Genetics and Biology**, v. 81, p. 98-109, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.01.008>

- Theriot, Casey M. *et al.* Antibiotic-induced shifts in the mouse gut microbiome and metabolome increase susceptibility to *Clostridium difficile* infection. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 3114, 2014. <https://doi.org/10.1038/ncomms4114>
- Thorburn, Alison N. *et al.* Diet, metabolites, and “western-lifestyle” inflammatory diseases. **Immunity**, v. 40, n. 6, p. 833-842, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.05.014>
- Tian, Xiaoli *et al.* Elevated gut microbiome-derived propionate levels are associated with reduced sterile lung inflammation and bacterial immunity in mice. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. FEB, p. 159, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00159>
- Tristão, Fabrine Sales Massafra *et al.* Th17-inducing cytokines IL-6 and IL-23 are crucial for granuloma formation during experimental paracoccidioidomycosis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 949, 2017. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00949>
- Trompette, Aurélien *et al.* Dietary fiber confers protection against flu by shaping Ly6c⁺ patrolling monocyte hematopoiesis and CD8⁺ T cell metabolism. **Immunity**, v. 48, n. 5, p. 992-1005. e8, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.04.022>
- Turissini, David A. *et al.* Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 106, p. 9-25, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.05.007>
- Usami, Makoto *et al.* Butyrate and trichostatin A attenuate nuclear factor κ B activation and tumor necrosis factor α secretion and increase prostaglandin E2 secretion in human peripheral blood mononuclear cells. **Nutrition Research**, v. 28, n. 5, p. 321-328, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2008.02.012>
- van de Veerdonk, Franz L. *et al.* Inflammasome activation and IL-1 β and IL-18 processing during infection. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 3, p. 110–116, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.01.003>
- Vinolo, Marco Aurélio Ramirez *et al.* Tributyrin attenuates obesity-associated inflammation and insulin resistance in high-fat-fed mice. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 303, n. 2, p. E272-E282, 2012. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00053.2012>
- Wang, Wei *et al.* Butyrate and propionate are microbial danger signals that activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages upon TLR stimulation. **Cell Reports**, v. 43, n. 9, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114736>
- Weis, John. Propionate Enhances the Antimicrobial Defenses in Macrophages Against *Listeria monocytogenes*. Honors Theses. 241, 2019. https://ecommons.udayton.edu/uhp_theses/241
- WHO. World Health Organization. **WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action**. Geneva: World Health Organization, 2022.
- Wu, Ting *et al.* Microbiota-derived short-chain fatty acids promote LAMTOR2-mediated immune responses in macrophages. **Msystems**, v. 5, n. 6, p. 10.1128/msystems.00587-20, 2020. <https://doi.org/10.1128/msystems.00587-20>

Xie, Qian *et al.* Gut-Derived Short-Chain Fatty Acids and Macrophage Modulation: Exploring Therapeutic Potentials in Pulmonary Fungal Infections. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, p. 1-12, 2024. <https://doi.org/10.1007/s12016-024-08999-z>

Xiong, Haitao *et al.* Butyrate upregulates endogenous host defense peptides to enhance disease resistance in piglets via histone deacetylase inhibition. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 27070, 2016. <http://dx.doi.org/10.1038/srep27070>

Yao, Yao *et al.* The role of short-chain fatty acids in immunity, inflammation and metabolism. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 1, p. 1-12, 2022. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1854675>

Yilmaz, Bahtiyar *et al.* Microbial network disturbances in relapsing refractory Crohn's disease. **Nature Medicine**, v. 25, n. 2, p. 323-336, 2019. <https://doi.org/10.1038%2Fs41591-018-0308-z>

Zhan, Ziyang *et al.* Potential of gut-derived short-chain fatty acids to control enteric pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 976406, 2022. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.976406>

Zhang, Huanchang *et al.* Next-Generation Probiotics: Microflora Intervention to Human Diseases. **BioMed Research International**, v. 2022, n. 1, p. 5633403, 2022. <https://doi.org/10.1155%2F2022%2F5633403>

Zheng, Danping *et al.* Interaction between microbiota and immunity in health and disease. **Cell Research**, v. 30, n. 6, p. 492-506, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0332-7>

Zhou, Zuoyong *et al.* Sodium butyrate ameliorates *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in RAW264. 7 macrophages and C57BL/6 mice. **Microbial Pathogenesis**, v. 131, p. 144-149, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.04.008>