

Patrícia Sammarco Rosa

**Avaliação de drogas antifúngicas no tratamento de
camundongos**

BALB/c inoculados com o *Lacazia loboi*

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Doenças
Tropicais (Modalidade Biologia
Tropical) da Faculdade de Medicina
de Botucatu - Universidade Estadual
Paulista - para obtenção do Título
de Doutor

Orientador: Prof. Dr. Diltor Vladimir Araujo Opromolla

Botucatu –SP

2003

*“Ninguém comete erro maior do que não fazer nada
porque só pode fazer um pouco.”*

Edmund Burke

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Elza Numata

Rosa, Patrícia Sammarco.

Avaliação de drogas antifúngicas no tratamento de camundongos BALB/c
inoculados com o *Lacazia loboi* / Patrícia Sammarco Rosa. – 2003.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista, 2003.

Orientador: Diltor Vladimir Araujo Opromolla

Assunto CAPES: 40101096

1. Blastomicose queloidiana - Tratamento - Estudos experimentais

CDD 616.969

Palavras-chave: Doença de Jorge Lobo; Terapêutica; Itraconazol; Terbinafina

Agradecimentos especiais

À minha família, pela liberdade que me deram para que eu fizesse minhas próprias escolhas e por me apoiarem sempre, mesmo quando a minha opção não foi a mais acertada.

Ao meu orientador e amigo querido, Prof. Dr. Opromolla, pelas oportunidades que me deu e por tudo que tem me ensinado nesses anos em que temos trabalhado juntos, fazendo com que as boas e más experiências valessem à pena.

É difícil enumerar todas as pessoas que tiveram uma participação, em diferentes momentos, no desenvolvimento desse trabalho. Aos que eu puder me lembrar, meu muito obrigado, aos que porventura não estiverem aqui citados, perdoem-me e considerem-se agradecidos.

- Aos meus colegas de trabalho e funcionários do Setor de Biotério do Instituto Lauro de Souza Lima, Mara, Sílvio, Luiz, Sandra, Dito e Dirce que têm sempre colaborado para o desenvolvimento do nosso setor.

- Aos funcionários do Setor de Anatomia Patológica do Instituto Lauro de Souza Lima, Fabiana, Osmar, Luíza, Maria Helena, Nelci, Gláucia, Edenilson, Adriana, Ana, Eduardo, pelo processamento das amostras e amizade demonstrados.

- Às funcionárias do Setor de Micologia do Instituto Lauro de Souza Lima, Carol e Izilda, pelo apoio no desenvolvimento do ensaio microbiológico.

- Aos funcionários do Setor de Treinamento e Ensino, Cleide, Ricardo e Karina, pelo excelente trabalho na documentação e elaboração das apresentações, e também a Célia, Fátima, Maria das Dores e Marilda, pelo apoio.

- Aos funcionários da Biblioteca do Instituto Lauro de Souza Lima, Maria Helena, Gorete, Leninha, Cidinha, Lucimara, Sidney, João, D. Maria, que nunca deixaram de atender a um pedido meu ou ajudar-me frente a alguma dúvida.

- Aos funcionários do Setor de Microbiologia do Instituto Lauro de Souza Lima, Lázara, Bia, Laércio, Valério, Ivete e Valéria, que estiveram sempre presentes durante a coleta de dados.

- À Andréa, por colaborar ativamente no desenvolvimento deste trabalho e pela grande amizade.

- À Paula, por tornar as coisas mais simples, pela revisão e formatação desse trabalho.

- À Diretoria do Instituto Lauro de Souza Lima, por me permitir desenvolver este trabalho na instituição.

- À Telma, do Centro de Processamento de Dados pela ajuda durante a impressão deste trabalho.

Agradecimentos

- Ao Toninho, do Setor de Órteses e Próteses do Instituto Lauro de Souza Lima, pelo feitiço dos comedouros para os animais.
- Aos meus colegas de trabalho, Fátima, Suzana, Elaine, Esther, Dr. Raul, Dr. Dirceu, Lúcia e Rose, pelo constante encorajamento e amizade.
- À Juliana Poloni, da Divisão de Pesquisa e Ensino do Instituto Lauro de Souza Lima, pela colaboração e carinho.
- À Ida Maria e à Eliane, que sempre estiveram presentes para trocar idéias e pela grande amizade.
- À minha prima-amiga Helô, pela paciência e estímulo durante esses últimos anos.
- Aos funcionários da Seção de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu e do Departamento de Moléstia Infecciosas e Diagnóstico por Imagem, por toda a ajuda e pronto atendimento durante todo o período do programa de pós-graduação.
- Aos docentes do programa de Pós-graduação da Faculdade de Medicina, pela qualidade dos cursos oferecidos.
- Ao Prof Dr. Padovani, pela realização da análise estatística deste trabalho.
- Às funcionárias de Biblioteca da Faculdade de Medicina de Botucatu, Elza e Meire, pela confecção da ficha catalográfica e formatação das referências bibliográficas.
- À CAPES, por ter me mantido como bolsista no início desse programa.
- Aos animais desse estudo, que se deixaram utilizar, na busca de soluções.

SUMÁRIO

Resumo

1. Introdução.....	12
1.1 Aspectos epidemiológicos.....	13
1.2 Etiologia e taxonomia.....	14
1.3 Aspectos morfológicos e tentativas de cultivo do <i>Lacazia</i> <i>loboi</i>	15
1.4 Aspectos histopatológicos da Doença de Jorge Lobo.....	17
1.5 Aspectos clínicos da Doença de Jorge Lobo.....	19
1.6 Experimentação animal.....	20
1.6.1 Doença de Jorge Lobo.....	20
1.6.2 Ensaio com drogas antifúngicas.....	22
1.7 Terapêutica antifúngica.....	26
2. Objetivos.....	36
3. Material e métodos.....	38
3.1 Animais.....	39
3.2 Métodos.....	39
3.2.1 Obtenção do inóculo infectante de <i>L.</i> <i>loboi</i>	39
3.2.2 Determinação do número de células fúngicas do inóculo.....	40

3.2.3	Determinação do índice de viabilidade.....	40
3.2.4	Inoculação.....	41
3.2.5	Preparo dos medicamentos antifúngicos.....	41
3.2.6	Tratamento dos camundongos após a inoculação.....	43
3.2.7	Avaliação histopatológica dos coxins plantares dos camundongos após tratamento.....	43
3.2.8	Avaliações do número de fungos e do índice de viabilidade nos animais após tratamento.....	44
3.2.9	Avaliação da absorção das drogas.....	44
3.2.10	Ensaio biológico.....	44
3.2.11	Documentação fotográfica.....	45
3.3	Análise estatística.....	45
4.	Resultados.....	46
4.1	Número de fungos obtidos nos diferentes períodos de sacrifício.....	47
4.2	Índices de viabilidade obtidos nos diferentes períodos de sacrifício.....	47
4.3	Lesões macroscópicas.....	51
4.4	Análise histopatológica.....	56
4.5	Ensaio microbiológico para verificar a absorção das drogas antifúngicas.....	57

5. Discussão.....	68
6. Conclusões.....	78
7. Referências bibliográficas.....	80
8. Abstract.....	95

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo testar o modelo experimental murino, o camundongo BALB/c, inoculado com o *L. loboi*, para sua utilização em ensaios terapêuticos, através da determinação de índices de viabilidade, número de fungos, análise histopatológica e aparecimento de lesões macroscópicas nos diferentes períodos pós-tratamento. Os medicamentos antifúngicos utilizados nesse trabalho foram itraconazol, terbinafina e terbinafina formulada com a β -ciclodextrina.

Inocularam-se 128 camundongos BALB/c com o *L. loboi* por via intradérmica, em ambos coxins plantares posteriores. Os animais foram divididos em quatro grupos de 32 animais. O tratamento com as três drogas foi iniciado 45 dias pós-inoculação e teve duração de 13 meses. Os medicamentos foram administrados por via oral, misturando-se à ração comercial moída. Os medicamentos foram utilizados nas doses de quatro mg/kg do itraconazol e cinco mg/kg da terbinafina. Oito animais de cada grupo foram sacrificados aos quatro, sete, dez e quinze meses após a inoculação. Em cada momento de sacrifício, os coxins plantares foram avaliados clinicamente a procura de alterações macroscópicas e, após essa verificação, coletados para análise histopatológica e determinação do número de fungos e índices de viabilidade.

Houve aumento progressivo no número de fungos em todos os grupos no decorrer do experimento, sugerindo multiplicação dos fungos nos coxins plantares e apesar de não haver diferença estatisticamente significativa, os menores números de fungos foram encontrados no grupo tratado com terbinafina e itraconazol. Em relação à viabilidade, no 10º mês após a inoculação, foi observada diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre os grupos tratados com a terbinafina comparados ao controle, o que não ocorreu com o grupo tratado com o itraconazol. As alterações macroscópicas começaram a aparecer sete meses pós-inoculação em todos os grupos. O número de animais que desenvolveu lesões macroscópicas não variou entre os grupos tratados e o grupo controle. Na análise histopatológica, em todos os grupos, foi observado um infiltrado granulomatoso

progressivo, constituído, predominantemente, por histiócitos e células gigante contendo fungos, muitos com características morfológicas de inviabilidade e células com citoplasma rendilhado. Não foi possível distinguir animais tratados e não tratados por esse parâmetro.

Uma atividade nítida dos medicamentos utilizados nesse modelo experimental não pôde ser observada, a não ser a ação demonstrada pela terbinafina sobre o *L. loboi*, evidenciada pelo baixo índice de viabilidade observado no grupo tratado com essa droga, frente ao grupo controle.

Diversas razões podem explicar os resultados obtidos, as características das drogas, seu mecanismo de ação, as dose utilizadas, o modo de administração, a composição bioquímica do *L. loboi*, ou ainda, fatores inerentes ao modelo. Mesmo assim, o camundongo BALB/c demonstrou ser um modelo útil para futuros estudos dessa natureza.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos Epidemiológicos

Em 1931, Jorge de Oliveira Lobo relatou a história de um amazonense que contraíra uma micose, com aspecto queiloideano, causada por um parasita redondo, com membrana de duplo contorno e que se reproduzia por gemulação¹. Fialho, ao descrever um novo caso, denominou a doença como blastomicose tipo Jorge Lobo e, da mesma forma; Fonseca Filho referiu a existência da nova blastomicose queloidiana, chamando-a de doença de Jorge Lobo^{2,3}. A partir daí, novos casos foram publicados e os estudos sobre essa doença foram se acumulando.

Há descrições da doença de Jorge Lobo em relativamente poucos países: nas regiões Central e Noroeste do Brasil, Suriname, Guiana Francesa, Colômbia, Venezuela, Panamá, Costa Rica, México, Guiana, Peru, Bolívia, Equador, Honduras, Estados Unidos, e um caso descrito no continente europeu^{4,5,6}. O Brasil registra o maior número de casos, os quais localizam-se na região Amazônica. A doença ocorre na maior parte em zonas rurais, e os pacientes são em geral seringueiros, garimpeiros e mateiros, que têm ou tiveram contato com matas tropicais, com clima quente e úmido.

Em 1996, Pradinaud & Talhari citaram 418 casos estimados da doença, sendo 255 brasileiros⁷. Opromolla et al. (2000) publicaram mais 40 casos, elevando para 295 o número de casos no Brasil⁸.

Lacaz et al. relatam que não há evidências de que haja maior susceptibilidade de um determinado grupo étnico à infecção pelo *L. loboi*⁹. É interessante, no entanto, a descoberta de casos entre indivíduos da tribo indígena Caiabis que adquiriram a moléstia durante sua permanência no atual estado do Mato Grosso, não sendo nenhum caso novo da moléstia diagnosticado entre esses índios após o seu ingresso no Parque Nacional do Xingu. O estudo da frequência de antígenos HLA de pacientes portadores da doença de Jorge Lobo no Acre, e

controles da população brasileira sugere o envolvimento dos antígenos HLA-DQ3 na susceptibilidade e resistência à doença¹⁰.

A idade de início da doença encontra-se na faixa de 21 a 40 anos. Há um predomínio de pacientes do sexo masculino, devido provavelmente às condições de trabalho extradomiciliar. Acredita-se que a transmissão da moléstia se faça através do contato com material infectante e solução de continuidade da pele, apontada como porta de entrada do fungo, pois as lesões se localizam quase exclusivamente no tecido cutâneo⁹. Não há relatos de transmissão natural de homem para homem. Até 1971, acreditava-se que a doença de Jorge Lobo ocorresse somente em seres humanos, no entanto, foram descritos alguns casos de infecção natural em golfinhos^{6,11,12,13,14,15,16}.

1.2. Etiologia e taxonomia

Fonseca Filho & Area Leão chamaram de *Gleronosporella lobo*, o fungo isolado por eles da lesão do paciente descrito por Jorge Lobo³. Almeida & Lacaz referem-se ao agente da blastomicose de Jorge Lobo como um organismo muito semelhante ao *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*), e sugeriram, então, que esse organismo fosse incluído no gênero *Paracoccidioides*¹⁷.

Ciferri et al., trabalhando supostamente com a mesma amostra do caso *princeps* de doença de Jorge Lobo, criaram o gênero *Loboa*¹⁸. Porém, Lacaz et al. consideraram esse gênero inválido⁹, e afirmaram que ambos os fungos, o *P. lobo* e o *P. brasiliensis*, deveriam figurar em um mesmo gênero devido a características tais como: semelhança na estrutura química da parede celular que é formada por complexos com polissacarídeos e oligossacarídeos; antígenos comuns detectados pelas técnicas de peroxidase anti-peroxidase (PAP), imunofluorescência e fixação de complemento e semelhança ultra-estrutural¹⁹.

Taborda et al. (1999) propuseram para o fungo, o gênero *Lacazia*, após detectarem melanina constitutiva na parede celular do *P. lobo*, quando corados pelo método histoquímico de Fontana-Masson²⁰.

Herr et al. (2001) após fazerem a análise filogenética usando a seqüência 18S da pequena unidade ribossomal do DNA do *L. loboi* e 600 pares de base (bp) da enzima quitina sintase-2 do DNA genômico, constataram que o *L. loboi* pertence à classe Onygenales dos fungos dimórficos patogênicos, e está filogeneticamente próximo ao *P. brasiliensis*²¹.

1.3. Aspectos morfológicos e tentativas de cultivo do *Lacazia loboi*

Jorge Lobo descreveu o *L. loboi* como um fungo de formas arredondadas medindo media oito a dezesseis μm , com membrana de duplo contorno e contendo em seu interior granulações²². Nos cortes corados pela hematoxilina-eosina (HE), os protoplasmas de alguns parasitas se apresentavam corados e outros não. Ao microscópio, no maior aumento, foram observadas formas em ampulheta ou em halteres.

Jorge Lobo acreditou ter isolado o fungo em meio de Sabouraud e relatou que as culturas se obtinham com muita dificuldade e na temperatura de 26 a 30°C²². Aos nove dias de semeadura, esse pesquisador relata ter observado, no tecido, fungos degenerados que correspondiam às formas que não completaram sua evolução; algumas dessas formas emitiam tubos germinativos.

No caso descrito por Fialho, os parasitas eram esféricos, com cerca de dez μm de diâmetro, possuíam uma cápsula espessa e reproduziam-se, em geral, por brotamento único². O citoplasma se adería à cápsula e, através de um pequeno orifício, o plasma fluía formando um outro elemento. Os dois elementos ficavam ligados por uma espécie de tubo, daí as formas em halteres. Verificou-se também que alguns parasitas formavam cadeias de quatro ou cinco elementos, sempre rodeados por histiócitos, e algumas vezes no interior de gigantócitos. Era freqüente observarem-se cápsulas vazias²³.

Wiersema notou que a parede do fungo era corada pelo PAS ao invés da hematoxilina-eosina; e com a coloração pela prata metenamina tornava-se cinzenta ou negra, dependendo do tempo de exposição à prata²⁴.

Sampaio semeou material da lesão de um paciente da micose de Lobo, em meio 199 com 5% de soro bovino fetal contendo penicilina, anfotericina B, 0,2% de fitoemaglutinina a 37° C²⁵. O autor refere que encontrou, 20 dias mais tarde, um material esbranquiçado com imensa quantidade de fungos e acreditou ter cultivado com êxito, pela primeira vez, o agente etiológico da doença de Jorge Lobo. Não se conseguiu referências sobre a continuação desse trabalho. Depois disso, com relação à cultura do *L. loboi*, consta na literatura somente um estudo experimental realizado por Silva, que colocou material, obtido de biópsia, rico em parasitas sobre lâmina escavada com soro fisiológico glicerinado a 30% e vitamina B a uma temperatura de 4° C²⁶. Segundo esse autor, houve crescimento acentuado de fungos com alterações em sua morfologia, aparecimento de tubos germinativos e micélios em septação.

Vilani-Moreno & Opromolla (1997) estudaram várias colorações vitais para determinar a viabilidade do *L. loboi*, e verificaram que a coloração pelo diacetato de fluoresceína-brometo de etídeo é a mais adequada²⁷. Foi estabelecido um índice de viabilidade que passou a ser utilizado em estudos com tentativas de cultivo do fungo e avaliações de inoculações experimentais. A sensibilidade e especificidade deste método foram avaliadas posteriormente por Vilani-Moreno et al.²⁸, no modelo experimental proposto por Madeira et al. (2000)²⁹.

Opromolla et al. (1999), ao estudarem a coloração pela prata metenamina de Grocott, verificaram que a coloração irregular das células fúngicas estava relacionada aos graus de degeneração delas e que o material granuloso argentofílico observado, nos cortes histológicos, correspondia aos restos de fungos³⁰, como descrito anteriormente por Chandler et al.³¹ e Sesso & Baruzzi³², à microscopia eletrônica. A contra coloração pela hematoxilina-eosina e prata metenamina também demonstrou restos de fungos no interior de células, representados pelo achado de poeira argentófila nesta localização.

1.4. Aspectos histopatológicos da doença de Jorge Lobo

Na primeira descrição do quadro histopatológico da doença de Jorge Lobo, notou-se que o processo era localizado na derme, caracterizado por um processo granulomatoso com presença de células plasmáticas, macrófagos, células gigantes e fibroblastos²². A epiderme era íntegra, adelgada em alguns pontos e sem papilas, devido à compressão do granuloma. Os parasitos estavam presentes nos interstícios celulares e no interior de alguns gigantócitos. Fialho assinalou que abaixo do estrato papilar encontrava-se intensa reação histiocitária, apresentando-se os histiócitos bem individualizados, com citoplasma bem corado². Notou também numerosas fibras colágenas e de reticulina. Os histiócitos continham uma grande quantidade de parasitas, muitos deles provavelmente mortos, e as células gigantes estavam presentes em grande número.

Nery-Guimarães & Macedo descreveram minuciosamente os aspectos histológicos da doença de Jorge Lobo, observando que a epiderme é delgada, com queratinização insuficiente²³. No derma, ocorrem as principais lesões, delas resultando o aspecto tumoral da dermatose. Em geral, o processo infiltrativo intenso e extenso faz limite com a camada basal, levando a epiderme ao adelgamento e à atrofia. De uma maneira geral, o processo é histiocitário difuso, com a presença de células epitelióides e células gigantes em todas as direções. Os gigantócitos ora tipo corpo estranho ora tipo Langhans são predominantes em certos trechos são resultantes da divisão nuclear e coalescência das células epitelióides, as quais, por sua vez, resultam dos histiócitos. De distribuição irregular, encontram-se polimorfonucleares, linfócitos e plasmócitos. No derma profundo e no hipoderma aparecem os elementos que mais caracterizam esta blastomicose histopatologicamente, grandes células poligonais, de citoplasma vacuolar, espumoso, e de núcleo compacto. Os autores relatam que essas células são elementos histiocitários e suas aréolas plasmáticas são, na verdade, imagens negativas de gotículas lipóides. As fibras colágenas estão grandemente aumentadas formando, às vezes, feixes que avançam no derma, dividindo-se e

subdividindo-se, separando campos celulares. Esse aspecto é mais notável no derma profundo.

Leite estabeleceu conclusões que são válidas até hoje: que embora a doença de Jorge Lobo se caracterize por uma reação histiocitária difusa, em alguns casos pode haver a formação de autênticos granulomas; que é freqüente a fibrose, com lobulação do infiltrado e formação de pseudotubérculos; que o quadro histológico é bastante típico para permitir sua distinção de qualquer outra lesão blastomicótica; que o número considerável dos parasitos, sua "imobilidade" e a ausência de exsudatos que possam deslocá-los são os principais fatores responsáveis pela doença; e que a ausência de inflamação aguda ou necrose, o caráter permanentemente produtivo das lesões e sua localização indicam ser esta doença produzida por parasito de baixa virulência³³.

Rodriguez-Toro, em um artigo de revisão, descreve os aspectos histológicos observados na lobomicrose e cita que os macrófagos com citoplasma espumoso ou granular são um resultado da ingestão de fragmentos da parede celular dos fungos, que estão armazenados em lisossomas gigantes³⁴.

Opromolla et al., procurando correlacionar clínico-patologicamente 40 casos novos de lobomicrose, verificaram que apesar do freqüente acometimento do pavilhão auricular, não se demonstrou invasão de cartilagem por infiltrados inflamatórios ou células fúngicas⁸. Vasos, nervos e anexos permaneciam inalterados no interior dos granulomas. As células histiocitárias, presentes no infiltrado, foram classificadas como histiócitos isolados, contendo fungos; histiócitos agrupados em sincício, albergando muitas células fúngicas, muitas com formas catenuladas (92,5%); células gigantes tipo corpo estranho (100%); e células gigantes tipo Langhans (57,5%). No interior das células gigantes de corpo estranho os fungos eram numerosos. Tais células, com o Sudan negro, não evidenciaram lipídios, mesmo nas áreas clinicamente xantomizadas, como evidenciado por alguns autores. Os lipídios foram detectados somente no interior das células fúngicas. A prata metenamina detectava uma poeira argentófila nas células epitelióides que correspondia a restos de células fúngicas.

1.5. Aspectos Clínicos da Doença de Jorge Lobo

No primeiro relato sobre a doença de Jorge, o paciente apresentava lesões nodulares, salientes, confluentes e duras na região lombossacra, com 19 anos de evolução e sem qualquer evidência de disseminação²². As lesões eram vegetantes, resistentes à pressão, duras, de cor castanha claro, com uns pontos brancos nas partes mais elevadas. Desde então vários outros autores descreveram seus casos, a maioria deles vindo da região Amazônica, com lesões de aspecto queiloideano.

As lesões clínicas na doença de Jorge Lobo são muito polimorfas. Pode haver máculas, pápulas, placas, nódulos, gomas e também lesões verrucosas, cicatriciais e ulceradas⁹. Estas últimas, na maior parte das vezes, estão relacionadas com traumas. Vários tipos de lesões podem aparecer em um mesmo paciente. Há lesões com tendência à regressão espontânea que apresentam um certo grau de atrofia, mas as cicatrizes são devidas, geralmente, a soluções de continuidade em consequência de cirurgias prévias ou traumatismos.

Baruzzi & Azevedo (1991) propuseram uma classificação, baseada na distribuição das lesões, em formas isoladas ou localizadas e formas disseminadas³⁵. De acordo com os autores, a localização das lesões é variada, mas há uma predileção por extremidades. O comprometimento do pavilhão auricular é o mais freqüente em algumas casuísticas e em outras são os membros inferiores.

Segundo alguns autores, é raro o comprometimento ganglionar nessa micose e há poucos casos com descrição histopatológica das lesões nos linfonodos^{36, 37, 38, 39}. As vísceras não estão envolvidas nessa micose, mas há o relato de um caso com lesão testicular descrito por Trejos & Romero (1950) na Costa Rica⁴⁰.

Opromolla et al. observaram formas infiltrativas, verrucosas e queiloideanas⁸. Em vários casos, notaram-se lesões queloidiformes, lisas, exibindo finas teleangectasias e pequenas áreas de aspecto xantomatoso na superfície. Havia também lesões de aspecto involutivo, mais aplanadas do que o restante das lesões em torno. Com relação à sua distribuição, as lesões e os casos foram classificados como aqueles com lesões localizadas, aqueles com lesões

multifocais (em um membro ou segmento de membro) e casos com lesões disseminadas (envolvendo várias regiões anatômicas distintas). Segundo os autores, o intuito em classificar os pacientes dessa forma foi considerando a possibilidade de que a localização e ou a disseminação das lesões pudessem refletir o estado imunológico desses pacientes frente ao agente da lobomicose.

1.6. Experimentação animal

1.6.1. Doença de Jorge Lobo

Jorge Lobo inoculou triturado de pele parasitada de seu paciente em cobaios, ratos e macaco Rhesus, na tentativa de reproduzir experimentalmente a micose de Jorge Lobo, mas não obteve êxito²². Desde então, várias tentativas foram feitas de reproduzir a doença de Jorge Lobo nas mais diversas espécies animais tais como ratos, hamsters, camundongos, cobaios e até galos e sapos. Monteiro (1962) reproduziu lesões interessantes em ovos embrionados, diferentes das lesões usuais obtidas pela inoculação do *P. brasiliensis*⁴¹.

Lesões nodulares e isoladas foram obtidas por Sampaio et al. (1971), ao inocularem quelônios da Amazônia⁴². As lesões eram semelhantes às lesões humanas, formadas por um processo granulomatoso histiocitário, contendo células gigantes e fungos com formas bizarras.

Sampaio & Dias (1977) inocularam um tatu (*Euphractus sexcintus*), na região pélvica, por via subcutânea⁴³. Após 11 meses, foi observada lesão nodular rica em parasitas, mostrando intensas áreas de necrose. Esse trabalho fez com que os autores sugerissem que o tatu fosse um animal adequado para o estudo experimental da doença.

Ratos, cobaios, hamsters e camundongos foram inoculados por diversos pesquisadores, sem resultados satisfatórios^{40, 44, 45, 46, 47}.

Wiersema & Niemel (1965) inocularam exaustivamente os coxins plantares de camundongos, obtendo assim a formação de granulomas⁴⁸. Em dois hamsters, os autores obtiveram, nos coxins plantares, granulomas idênticos ao

humano, com parasitas em gemulação. Azulay et al. (1968) inocularam mais de 60 animais (cobaias, ratos, coelhos e camundongos), por via intradérmica e intratesticular⁴⁹. Foram observadas alterações microscópicas, semelhantes às observadas em seres humanos, no coxim plantar de um camundongo, 13 meses após a inoculação. Sete meses após a inoculação intratesticular, um rato apresentou vários granulomas localizados entre os tubos seminíferos. Alterações macroscópicas foram notadas, em outro rato inoculado intratesticularmente, depois de oito meses. No exame a fresco do material coletado do testículo, foram observadas formas do *L. loboi*.

Sampaio & Dias (1970), ao implantarem fragmentos de tecido humano parasitados na bolsa jugal de 22 hamsters, obtiveram nódulos constituídos por histiócitos e células gigantes contendo um grande número de parasitas⁵⁰. O material da bolsa jugal, resultante de primeira inoculação, foi reinoculado duas vezes em bolsas jugais de outros hamsters, produzindo lesões semelhantes às dos doadores. Contudo, utilizando inóculos com número de fungos e viabilidade conhecidos, Opromolla & Nogueira (1999) não obtiveram o mesmo resultado⁵¹. Houve formação de granulomas, mas as células fúngicas encontradas até 180 dias após a inoculação não se apresentavam viáveis.

Seguindo o mesmo método para preparo da suspensão fúngica, Opromolla et al. (1999) relatam os resultados das inoculações experimentais do *L. loboi* em camundongos Suíços⁵². Apesar de não terem sido observadas lesões macroscópicas nos 64 animais inoculados e observados, pelo período de 18 meses, grande número de fungos foi encontrado ao final do experimento, se bem que com baixos índices de viabilidade, indicando que esta linhagem não é a mais adequada ao estudo da doença de Jorge Lobo.

Madeira et al. (2000), ao inocularem a linhagem de camundongos BALB/c, obtiveram animais com lesões macroscópicas, oito meses após a inoculação²⁹. Nestes animais, aos sete meses foram observados extensos infiltrados, constituídos por histiócitos, células gigantes tipo corpo estranho e tipo Langhans, e um grande número de fungos, a maioria deles viável. O grande número de fungos encontrados, os altos índices de viabilidade, indicando

multiplicação do *L. loboi*, e as semelhanças entre os infiltrados com o de lesão encontrada em seres humanos, indicaram que a linhagem de camundongos BALB/c seria adequada a estudos controlados com o *L. loboi*, inclusive em testes terapêuticos.

1.6.2. Ensaio com drogas antifúngicas

Estudos terapêuticos utilizam vários modelos experimentais na fase pré-clínica, que está relacionada à verificação da atividade e da toxicidade das drogas testadas. Só depois disso, dependendo dos resultados, é que o medicamento é empregado em seres humanos, no início em grupos piloto, e depois em um número maior de pacientes, obedecendo a protocolos bem estabelecidos.

Muitas drogas antifúngicas para uso sistêmico já foram utilizadas em animais, tais como a anfotericina B, os compostos azólicos e a terbinafina (uma alilamina). Essas drogas foram testadas contra diversos organismos, isoladas ou em associação, e em alguns casos, utilizou-se administração oral do medicamento por períodos de tempo que variaram de poucos dias até quatro meses^{53, 54}. Nesta fase da experimentação, a eficácia e a toxicidade da droga foram avaliadas através da quantificação da carga fúngica no tecido alvo, pela taxa de sobrevivência dos animais infectados após o tratamento e por alterações de lesões estabelecidas^{55, 56}. Em muitos destes estudos, a absorção da droga foi determinada por método biológico ou pela cromatografia líquida de alta resolução (HPLC).

Um estudo, comparando a atividade antifúngica do itraconazol com a terbinafina *in vitro* e relacionando aos resultados *in vivo* em modelos experimentais para infecções superficiais (cobaias), demonstrou que a terbinafina foi mais eficaz do que o itraconazol no controle das dermatofitoses *in vitro*. O efeito das duas drogas *in vivo* foi equivalente, com boa tolerância e segurança⁵⁷. A terbinafina (um a seis mg/kg em polietilenoglicol (PEG) 200) demonstrou potência duas a três vezes superior ao itraconazol (6 a 40 mg/kg em PEG 200) e ao fluconazol (6 a 12 mg/kg em 10% Tween 80), no modelo da tricofitose, em

cobaios. As drogas foram dadas por via oral (gavagem) uma vez por dia durante nove dias consecutivos⁵⁸.

Na paracoccidiodomicose, camundongos BALB/c foram inoculados por via intranasal e tratados por via oral (gavagem) durante quatro semanas, com itraconazol nas doses de 10, 50 e 200 mg/kg/dia diluído em PEG 200. Os animais foram avaliados quanto à porcentagem de sobreviventes à infecção aguda e quanto ao envolvimento de órgãos. Observou-se maior proteção contra doses letais do *P. brasiliensis* em animais tratados com 200 mg/kg de itraconazol do que os tratados com ketoconazol. Os autores sugerem que o tratamento por períodos mais longos poderia prevenir a doença pulmonar⁵⁹.

Kan & Bennet estudaram a eficácia do itraconazol, terbinafina e anfotericina B na esporotricose sistêmica em camundongos BALB/c⁵⁴. Os animais foram tratados por 28 dias e avaliados quanto à sobrevivência, ao número de lesões e à carga fúngica em órgãos. O itraconazol (doses de 20 e 80 mg/kg, diluído em PEG 200) e terbinafina (doses de 50 e 200 mg/kg, diluída em 1% Tween 20 e 5% DMSO) foram ministrados por gavagem. A anfotericina B (dose de 4,5 mg/kg) foi dada por via intraperitoneal. As melhores taxas de sobrevivência foram obtidas com o itraconazol e anfotericina B; no entanto, a cultura positiva de cérebro, fígado e baço de animais sacrificados demonstrou que não houve proteção contra disseminação com nenhum dos esquemas de tratamento. Apesar da detecção de terbinafina no soro dos camundongos, sua eficácia não foi demonstrada na esporotricose sistêmica.

Van't Wout et al. compararam a eficácia oral do fluconazol (2,5 a 20 mg/kg), itraconazol (10 a 40 mg/kg) e anfotericina B intraperitoneal (0,1 a quatro mg/kg) contra a candidíase sistêmica, pela *Candida albicans*, em camundongos suíços normais e neutropênicos⁶⁰. Nenhuma droga teve efeito protetor em camundongos neutropênicos, no entanto, com a anfotericina B utilizada na dose de um µg/ml, houve uma diminuição na média de unidades formadoras de colônia (UFC) nos rins de camundongos normais.

Camundongos BALB/c e CFW foram utilizados como modelos para estudo da eficácia de diferentes antifúngicos orais (gavagem) contra a infecção

pelo *Blastomyces dermatitidis*. O itraconazol, diluído em PEG 200, mostrou aumento da sobrevivência de animais nas doses de 50 e 150 mg/kg/dia, mas não houve proteção contra infecção em animais tratados por quatro semanas. O ketoconazol, diluído em ágar 0,1%, na dose de 150 mg/kg foi tão eficaz quanto o itraconazol a 50 mg/kg. Sobrevivências de 60% de animais tratados com anfotericina B (um mg/kg) e 30% de animais tratados com itraconazol (25 mg/kg) foram observadas em camundongos inoculados com *B. dermatitidis*⁵⁵.

Na cromomicose experimental, Defaveri & Graybill avaliaram camundongos BALB/c atímicos inoculados com o fungo *Fonsecaea predosoi* por via subcutânea, e tratados com itraconazol e com o triazólico SCH39304, por 16 semanas⁵³. O itraconazol foi diluído inicialmente em PEG 200 e, devido à toxicidade causada pelo PEG 200, após seis semanas de uso, ambas as drogas foram diluídas em ágar 0,3%. As duas drogas, nas doses de 20 e 60 mg/kg, inibiram o crescimento do fungo *in vivo*, havendo evidente diminuição do tamanho das lesões.

Na coccidioidomicose pulmonar, o itraconazol e fluconazol foram superiores ao ketoconazol (doses de 25 mg/kg), ministrados por gavagem, na manutenção da sobrevivência de camundongos após a inoculação com o *Coccidioides immitis*. Na coccidioidomicose meningoencefálica, nenhum desses medicamentos preveniu a morte dos animais⁵⁵. O primeiro estudo comparativo, monitorado clinicamente, com cultura de líquido cefalorraquidiano e sorologia, foi relatado por Sorensen et al.⁶¹. Nesse modelo de coccidioidomicose meningoencefálica em coelhos, os animais foram tratados com itraconazol e fluconazol com a dose diária de 80 mg/kg por gavagem, durante 28 dias. Ambas as drogas reduziram o número de UFC do cérebro de animais sacrificados, melhoraram os sinais clínicos e neurológicos, mas nenhuma droga teve efeito curativo.

Vários experimentos foram desenvolvidos com o *Histoplasma capsulatum* para testar a eficácia de drogas antifúngicas. O uso de itraconazol (25 mg/kg) e anfotericina B (um mg/kg) preveniu a morte de camundongos infectados com doses letais do *H. capsulatum* e os resultados foram superiores ao fluconazol e

ketoconazol. Os três compostos azólicos reduziram a carga fúngica do fígado e baço de animais sacrificados após o tratamento por 21 dias⁵⁵.

A β -ciclodextrina é um oligossacarídeo cíclico, produto da degradação do amido pelo *Bacillus macerans*, e tem sido utilizada como molécula carreadora de drogas lipofílicas. Um estudo farmacológico, com compostos azólicos utilizando a hidroxipropil- β -ciclodextrina, uma ciclodextrina com melhor solubilidade em água, demonstrou um aumento da biodisponibilidade do itraconazol e saperconazol em soro de camundongos após uma única dose, quando comparadas às mesmas drogas solubilizadas em PEG 200⁶².

A formulação oral do itraconazol com a ciclodextrina (três mg/kg/dia) diminuiu a carga fúngica de tecidos de camundongos B6C3F₁ inoculados com cargas não letais do *H. capsulatum*. Goldberg et al. avaliaram a taxa de sobrevivência e carga fúngica em órgãos de camundongos B6C3F₁ inoculados com doses letais do *H. capsulatum* e tratados por dez dias⁶³. Os animais que receberam nikomicina Z (100 mg/dia/duas vezes ao dia), anfotericina (2 mg/kg/a cada dois dias) e itraconazol em hidroxipropil- β -ciclodextrina (75 mg/kg/duas vezes ao dia) sobreviveram até o final do experimento, no entanto, a taxa de sobrevivência diminuiu progressivamente quando as drogas foram ministradas em doses mais baixas. Recentemente, o ravuconazole, itraconazol e fluconazol foram testados no modelo para histoplasmose sistêmica murina. O ravuconazol e itraconazol foram igualmente efetivos na dose de 50 mg/kg, e mais eficazes que o fluconazol. Nesta dose, no entanto, não houve efeito curativo⁶⁴.

SCHMITT et al. relataram a inatividade da terbinafina na aspergilose broncopulmonar em ratos Sprague-Dawley⁶⁵. A terbinafina, na dose de 80 mg/kg/dia, diluída em 5% DMSO- 2% Tween 80, injetada por via intraperitoneal durante sete dias, não melhorou a taxa de sobrevivência dos animais, apesar de altas concentrações da droga terem sido detectadas em tecidos como pulmão, fígado e baço (cerca de seis μ g/g de tecido). Os autores concluem que a droga deve apresentar baixa biodisponibilidade no soro e alto metabolismo hepático nestes animais. Camundongos CD-1 normais e neutropênicos foram utilizados para testar a eficácia do itraconazol em hidroxi- β -ciclodextrina (5 a 50

mg/kg/duas vezes ao dia), anfotericina B (3,3 mg/kg) e D0870 em Tween 80 (5 a 100 mg/kg/dia), após 14 dias de tratamento. O itraconazol e anfotericina B reduziram mais a mortalidade em camundongos normais⁵⁶. O itraconazol diluído em hidróxi- β -ciclodextrina, utilizado por gavagem nas doses de 30 a 100 mg/kg, não reduziu a mortalidade de camundongos BALB/c nu/+, no modelo para aspergilose pulmonar. Os autores sugerem que o itraconazol deva ser utilizado em doses mais altas e mais freqüentes⁶⁶.

A terbinafina (40 e 80 mg/kg/dia por gavagem) foi utilizada em comparação com outras drogas, na infecção experimental pelo *Pneumocystis carinii* em ratos Sprague-Dawley. Um grau leve da infecção foi observado em 18% dos animais que receberam a dose de 80 mg/kg. Este resultado se comparou somente ao do tratamento com sulfametoxazol-trimetropin (15% de animais com infecção). A taxa de sobrevivência (90%) não variou entre os grupos até dez semanas após a inoculação⁶⁷.

1.7. Terapêutica antifúngica

Várias drogas têm sido testadas no tratamento da doença de Jorge Lobo. Já foram utilizadas sulfadimetoxina, sulfametoxipiridazina, clofazimina, anfotericina B, 5-fluorocitosina, fluconazol, ketoconazol, miconazol, itraconazol, terbinafina e a associação sulfametoxazol-trimetoprin, no entanto, nenhuma droga mostrou até agora resultados convincentes. A maioria delas foi utilizada de forma empírica, sem uma padronização na administração, sem protocolos bem definidos e nunca foram testadas, para a doença de Jorge Lobo, em modelos animais. O tratamento cirúrgico continua, portanto, sendo o tratamento de eleição para casos com lesões localizadas e não muito extensas.

Reyes et al. (1960-1961), na Venezuela, referem ter tratado um caso da doença de Jorge Lobo com sulfadimetoxina, inicialmente na dose de quatro comprimidos de 500 mg/dia, depois dois e, a seguir, um comprimido, com melhora da infiltração das lesões e desaparecimento de alguns nódulos menores⁶⁸.

Silverie et al. trataram um paciente com a sulfametoxipiridazina (500 mg por dia) sem resultados conclusivos³⁶.

As sulfonamidas foram os primeiros agentes quimioterápicos efetivos contra microorganismos gram positivos e negativos. As sulfonamidas previnem a utilização do ácido paraaminobenzóico (PABA) para síntese de ácido fólico⁶⁹.

Londoño, em 1968, usou a anfotericina B diluída em procaína para fazer infiltração de lesões queloidiformes, sem sucesso⁷⁰.

A anfotericina B tem sido utilizada até hoje em pacientes com candidíases, criptococose, histoplasmose, blastomicose, paracoccidioomicose, coccidioomicose, aspergilose, esporotricose extracutânea e mucormicose⁶⁹. A anfotericina B é um antibiótico poliênico derivado do actinomiceto *Streptomyces nodosus*. A atividade antifúngica depende da ligação da droga ao ergosterol, presente na membrana de fungos susceptíveis, formando poros ou canais cilíndricos que penetram na membrana dos fungos, alterando a permeabilidade da membrana e permitindo o extravasamento de pequenas moléculas do citoplasma, prejudicando o crescimento do fungo⁷¹.

A clofazimina, um composto rimino, derivado fenotiazínico lipossolúvel, que inibe o crescimento de alguns microorganismos e é utilizada no tratamento da hanseníase⁶⁹, foi utilizada, pela primeira vez no tratamento de três casos da doença de Jorge Lobo, por Silva (1978)⁷². A droga foi administrada na dose de 200 mg/dia, por períodos de três a seis meses com redução da quantidade de fungos e regressão de algumas lesões. Apesar dos resultados favoráveis, existe a possibilidade de recidivas. Talhari et al. (1981), referem o tratamento de 22 casos com a clofazimina sozinha ou em associação com a eletrocoagulação, por períodos que variaram de seis meses a três anos⁷³. Em um dos casos que completou três anos de tratamento somente com a clofazimina, houve involução quase completa das lesões e desaparecimento do fungo. Houve melhora considerável em outros seis casos com tratamento combinado. Os melhores resultados foram observados nos pacientes com lesões infiltrativas dos pavilhões auriculares e nas lesões em placa. Em lesões queloidiformes antigas, não ocorreram modificações. Baruzzi & Azevedo observaram 12 pacientes com a

doença de Jorge Lobo, tratados com a clofazimina por períodos de até dois anos, na dose de 100 a 200 mg/dia³⁵. Os pacientes, na sua maioria, apresentavam lesões extensas e disseminadas. Em vários casos observou-se, após alguns meses de tratamento, discreta redução no volume das lesões dermatológicas, mas os autores concluem que a clofazimina ainda não representa a droga ideal para o tratamento da doença de Jorge Lobo.

Nos últimos 30 anos, devido ao aumento da incidência de infecções fúngicas em pacientes imunodeprimidos devido à terapia antineoplásica, imunossupressão em indivíduos transplantados ou infecção pelo vírus HIV, houve o desenvolvimento de medicamentos com melhor potência, amplo espectro de ação e segurança, e com menos efeitos adversos, dentre eles os imidazólicos, as alilaminas e a fluorcitosina.

Os imidazólicos contêm dois nitrogênios no anel azólico, os triazóis contêm três átomos de nitrogênio no anel e são mais estáveis no corpo humano. Os antifúngicos azólicos se ligam à fração heme do citocromo P450 e interferem na função mista de algumas oxidases. A 14- α -desmetilação do lanosterol dos fungos é inibida, bloqueando a formação do ergosterol e levando ao acúmulo de 14- α -metilesteróis. Ocorre então alteração da membrana citoplasmática e inibição do crescimento do fungo⁶⁹.

A família das enzimas citocromo P450 está presente em todos os tecidos, particularmente em grandes quantidades no retículo endoplasmático das células hepáticas. Essas enzimas catalisam a biotransformação de drogas lipofílicas, exercendo um efeito limitante na taxa de metabolismo. A indução ou inibição dessas enzimas, por medicamentos ou compostos químicos, tem importantes implicações na prática terapêutica com os imidazólicos. A indução da enzima P450 pode levar à rápida metabolização da droga e resultar em falha terapêutica. A inibição da enzima pode levar ao acúmulo da droga nativa, causando toxicidade⁷⁴.

O ketoconazol foi o primeiro azólico oral utilizado com sucesso em micoses sistêmicas e se tornou um modelo para o desenvolvimento de outros compostos azólicos. O miconazol é pouco utilizado por via endovenosa devido à

sua toxicidade e à eficácia limitada. Essa droga é mais utilizada hoje em sua formulação para uso tópico⁶⁹. O fluconazol, outro composto azólico, é efetivo nas candidíases oral e esofagiana, e na criptococose, em pacientes aidéticos. Esse composto tem sido utilizado na manutenção de pacientes clinicamente estáveis, após a terapia com a anfotericina B. O itraconazol é indicado no tratamento de micoses profundas tais como a histoplasmose, blastomicose, coccidioidomicose, candidíases oral, esofagiana e vaginal, e também nas dermatofitoses. Em pacientes aidéticos, esse medicamento tem sido utilizado na aspergilose, esporotricose e criptococose⁷⁵.

O itraconazol é um composto triazólico estruturalmente semelhante ao ketoconazol, mas que parece ter um maior espectro de atividade em micoses profundas. O acúmulo de α -14 metilesteróis exerce efeitos deletérios às propriedades e atividade enzimática ligada à membrana, havendo alteração da função da enzima quitina sintetase. Outro mecanismo de ação é a inibição das enzimas citocromo C oxidase e peroxidase, resultando em acúmulo de peróxidos intracelulares que alteram a dupla camada de fosfolipídios da membrana celular dos fungos, havendo aumento da permeabilidade da membrana. Esses efeitos provocam inibição da reprodução do fungo e morte da célula. O itraconazol é altamente lipofílico, sua absorção em jejum é de 30% da absorção quando ingerido junto com alimentos. A dissolução é dependente de baixo pH, após a absorção, o itraconazol é rapidamente distribuído para os tecidos. O estado de equilíbrio é atingido 13 dias após a ingestão da dose de 200 mg/dia. A meia vida de eliminação é de cerca de 24 horas. O pico da concentração plasmática atinge 0,5 μ g/ml cerca de quatro horas após ingestão com alimentos, de 100 mg do itraconazol, dosado por HPLC⁷⁶. A dosagem por ensaio biológico pode ser três vezes maior, pois dos 30 metabólitos resultantes da biotransformação do itraconazol, o principal deles, o hidroxí-itraconazol, apresenta a mesma atividade biológica da droga nativa⁷⁷. Cerca de 99,8% do composto se liga a proteínas plasmáticas, primariamente à albumina. Pouca ou nenhuma droga bioativa é encontrada na urina, no líquido cefalorraquidiano e na saliva. Os níveis teciduais do itraconazol são duas a três vezes mais altos do que os plasmáticos e há uma

grande afinidade da droga por tecido adiposo e tecidos queratinizados, podendo-se detectar a droga na unha de pacientes até seis meses após o término do tratamento com 200 mg/dia durante três meses⁷⁸. A maior parte dos metabólitos é eliminada pela bile e a excreção da droga em sua forma nativa ocorre de 3 a 18% nas fezes e em menor parte na urina. A supressão da adrenal foi observada em pacientes recebendo doses de 600 mg/dia⁶⁹.

Na doença de Jorge Lobo, já foram testados diversos compostos imidazólicos. Heel relata o sucesso do tratamento de dois golfinhos naturalmente infectados pelo *L. loboi*, com o miconazol na doses de 18 mg/kg de peso, durante sete meses¹⁴. A droga foi oferecida aos animais, dividida em quatro doses diárias. Houve melhora progressiva das lesões e desaparecimento de fungos aos sete meses de tratamento.

Cucê et al.(1980) trataram um paciente acometido da doença de Jorge Lobo, com ketoconazol oral na dose de 400 mg/dia, durante 90 dias, obtendo resultados que consideraram moderados⁷⁹. Resultados também moderados foram relatados por Heel em dois pacientes tratados com a mesma droga⁸⁰. Baruzzi et al. relataram o tratamento de quatro pacientes com ketoconazol durante vários meses, na dose de 400mg/dia⁸¹. Um dos pacientes foi tratado durante um ano. Os resultados foram pouco satisfatórios. Lawrence & Ajello também relatam o tratamento de um paciente por seis meses com ketoconazol oral, 200 mg/dia, sem evidências de melhora⁸².

Mais recentemente, Opromolla et al. (1996) apresentaram os resultados do tratamento de 40 pacientes portadores da doença de Jorge Lobo, residentes em Rio Branco, no estado do Acre, com o itraconazol⁸³. Os pacientes foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos. Um grupo recebeu o medicamento na dose de 100 mg/dia e o outro recebeu o itraconazol na dose de 200 mg/dia durante uma semana em cada mês, durante seis meses. Não foram observados resultados satisfatórios após esse período, mas esse foi o primeiro trabalho sobre a terapêutica da doença de Jorge Lobo que obedeceu a um protocolo mais rígido, com controle dos pacientes com documentação fotográfica e biópsias.

Pradinou & Talhari (1996) empregaram duas vezes a 5-fluorocitosina na doença de Jorge Lobo⁷. A fluorocitosina é uma base pirimidina fluorada, solúvel em água em pH neutro e que apresenta atividade em candidíases, criptococose e na cromomicose⁷¹. Os autores trataram um paciente durante 50 dias (100 mg/kg) e notaram um discreto amolecimento das lesões. O tratamento não pôde ser continuado pela falta de perseverança do paciente. Em um segundo paciente tratado com doses de 100 a 200 mg/kg durante quatro meses, os resultados foram insatisfatórios, em comparação com os efeitos muito favoráveis constatados nas cromomicoses.

Opromolla (2000) experimentou, em alguns pacientes portadores da doença de Jorge Lobo, o fluconazol, a anfotericina B, o 5-Fluoruracil, a clofazimina, a terbinafina e sulfonamidas, e utilizou, para controle do tratamento, além do exame clínico, exame histopatológico, documentação fotográfica e o índice de viabilidade do *L. loboi*⁸⁴. As drogas foram utilizadas em várias combinações, e diminuição importante do índice de viabilidade foi vista com a associação da clofazimina com a sulfona em um paciente, e, em um outro, a combinação de 5-Fluoruracil e itraconazol. O número extremamente reduzido de pacientes não permitiu conclusões definitivas, contudo, foi possível avaliar o efeito terapêutico das drogas utilizando-se pela primeira vez o índice de viabilidade dos fungos, na doença de Jorge Lobo.

Fischer et al. (2002) relatam o resultado do tratamento de um paciente da doença de Jorge Lobo com a associação itraconazol e clofazimina, ambos a 100 mg/dia, pelo período de um ano. Os autores relatam que houve cura clínica e histopatológica do paciente⁸⁵.

As alilaminas são compostos sintéticos com anel naftaleno substituído na posição um por uma cadeia alifática contendo ligações duplas e uma amina terciária. O composto age inibindo a enzima esqualeno epoxidase, sistema enzimático ligado à membrana plasmática, essencial na síntese do ergosterol. Isto leva à deficiência de ergosterol na parede celular e acúmulo de esqualeno intracelularmente. O acúmulo do esqualeno é responsável pelo efeito fungicida da terbinafina.

Devido à sua rápida difusão para epiderme⁷⁸, a terbinafina mostrou ser uma droga efetiva para o tratamento de dermatofitoses⁸⁶. A atividade *in vitro* da droga foi observada contra algumas cepas de *Candida*, dermatófitos, *Aspergillus* e também contra alguns fungos dimórficos como o *B. dermatitidis*, *H. capsulatum* e *Sporothrix schenckii*. O efeito sinérgico da terbinafina com o fluconazol foi demonstrado em experimentos *in vitro* utilizando-se cepas multirresistentes de *C. albicans*, o que demonstra o potencial da terbinafina para uso combinado com outros antifúngicos no tratamento de infecções mais graves⁸⁷. Um recente estudo, utilizando o método de microdiluição, demonstrou a susceptibilidade *in vitro* da terbinafina contra diversas cepas de fungos, sendo a média da concentração inibitória mínima (MIC) de $6,60 \pm 0,73 \mu\text{g/ml}$ para cepas leveduriformes e $1,04 \pm 0,28 \mu\text{g/ml}$ para cepas miceliais⁸⁸.

A absorção da terbinafina, independentemente do pH, é boa, não havendo necessidade de ingestão concomitante de alimento. A terbinafina é altamente lipofílica e queratinofílica e pode ser encontrada em grandes quantidades também no tecido adiposo. O nível plasmático de um $\mu\text{g/ml}$ pode ser detectado após doses de 250 mg a cada 12 horas. São encontrados cerca de 15 metabólitos no plasma em quantidades superiores à droga nativa, o principal é o N-desmetilterbinafina, que apresenta 10% da atividade biológica da terbinafina. A meia vida de eliminação da droga nativa do plasma após quatro semanas de tratamento é de 22 horas e de tecidos queratinizados é de 24 a 28 dias⁸⁹. Níveis fungicidas da droga podem ser encontrados no extrato córneo após uma semana de tratamento com doses de 250 mg/dia. A terbinafina mostrou concentrações inibitória e fungicida mínimas, semelhantes entre si, e mais baixas do que às do itraconazol⁷⁸. A terbinafina é extensivamente metabolizada no fígado, mas não é metabolizada pela enzima P450, havendo pouca interação com outras drogas. A excreção é feita 70% pela urina e 20% pelas fezes.

Apesar da baixa prevalência da doença de Jorge Lobo, o número de casos tem aumentado e, sendo a evolução desta micose crônica, casos com lesões mais recentes, pequenas e assintomáticas podem passar despercebidos, principalmente em regiões endêmicas da doença.

É difícil a experimentação terapêutica em uma doença de evolução tão crônica como é o caso da doença de Jorge Lobo. Em suas lesões, observa-se grande quantidade de fungos, mas muitos deles não apresentam nenhuma estrutura intracitoplasmática, apresentando-se como cápsulas vazias², sugerindo que estejam mortos. Esse aspecto faz pensar, primeiro, que o fungo se multiplica lentamente e, segundo, que o fungo vai sendo fagocitado por macrófagos, mas demora bastante tempo para ser eliminado, devido provavelmente a alguma deficiência imunológica, sendo o hospedeiro incapaz de realizar uma digestão mais rápida do fungo. Apesar de a doença de Jorge Lobo ser localizada, se assemelha à hanseníase na sua forma virchoviana. Nessa doença micobacteriana, cujo agente etiológico também ainda não foi cultivado em meios livres de células, observa-se, assim como na micose de Jorge Lobo, mesmo antes de o tratamento ter sido iniciado, uma grande quantidade de bacilos mortos que é eliminada em uma taxa muito lenta (cerca de 0,62 log por ano), devido à deficiência imunológica do hospedeiro.. Isso mostra que um paciente virchoviano, no qual a população inicial é de 10^{11} bacilos/g de tecido, somente ficará livre de bacilos após três a cinco anos⁹⁰.

LACAZ et al., estimando as dificuldades na avaliação terapêutica de uma droga para o tratamento da doença de Jorge Lobo, referiram: impossibilidade de testes terapêuticos *in vitro* por não se poder, até o momento cultivar o *L. loboi*; impossibilidade de se proceder a testes em animais de laboratório, devido à grande dificuldade em se obter lesões experimentais; reduzido número de casos tratados por uma dada droga não sendo possível o acúmulo de experiência terapêutica suficiente sobre a ação dos fármacos até então utilizados⁹.

Hoje se pode considerar que algumas das dificuldades mencionadas por Lacaz et al., em 1986, em relação a estudos terapêuticos com a doença de Jorge Lobo, estão sendo superadas⁹. Apesar de o fungo ainda não ter sido cultivado em laboratório, já se tem um modelo experimental adequado a testes terapêuticos, inclusive com desenvolvimento de lesões macroscópicas e de fácil manutenção. A viabilidade do *L. loboi* já pode ser avaliada pela coloração com o brometo de etídio e diacetato de fluoresceína²⁷. O índice de viabilidade é um elemento útil

para se verificar se uma determinada droga está exercendo atividade fungicida ou fungistática sobre o fungo.

O *Mycobacterium leprae*, que ainda não foi cultivado, apresenta crescimento regular quando inoculado na pata de camundongos BALB/c, observado com a técnica desenvolvida por Shepard⁹¹. Nesse trabalho, o autor demonstrou uma correlação positiva entre o número de bacilos inoculados e o tempo de aparecimento das lesões, sendo seis meses o período de incubação quando 10^3 bacilos são inoculados por via intradérmica no coxim plantar de camundongos. Foi demonstrado que o aspecto microscópico da doença experimental é compatível com a doença em seres humanos. Esse modelo possibilitou, portanto, o estudo de drogas com atividade anti-hansênica, se elas são bactericidas ou bacteriostáticas e a resistência a elas desenvolvida pelo microorganismo^{92,93}. O mesmo método pode ser utilizado para a doença de Jorge Lobo, com o objetivo de selecionar drogas para o tratamento dessa enfermidade.

Apesar de não se conhecer a constituição bioquímica do *L. loboi*, da mesma maneira que se conhece a de outros fungos, como é o caso do *P. brasiliensis*, cuja semelhança bioquímica e proximidade filogenética com o *L. loboi* já foram demonstradas, é possível que ele possua ergosterol em sua membrana celular e sua parede seja também formada por camadas contendo manose, glicoproteínas com manose, quitina e alfa e beta glucanas, que são alvos para os medicamentos já existentes e para os que ainda estão em fase um de estudo.

Na impossibilidade de realizar estudos *in vitro* com o *L. loboi*, os medicamentos antifúngicos podem, inicialmente, ser testados contra o agente da micose de Jorge Lobo, utilizando-se o modelo recentemente desenvolvido com camundongos da linhagem BALB/c, utilizando-se a experiência da hanseniase experimental para o desenvolvimento de protocolos bem definidos. Hoje, na hanseniase, a experimentação é utilizada principalmente para teste de resistência medicamentosa. Para testar resistência à dapsona, os animais são inoculados e recebem o medicamento incorporado à ração comercial moída continuamente em diferentes concentrações por grupo, até o crescimento do *M. leprae* atingir o

plateau, por volta dos nove meses. Os animais são então sacrificados e comparados aos controles não tratados, para verificação da multiplicação de bacilos⁹².

As drogas antifúngicas, antes de ensaios clínicos, foram testadas em animais, principalmente em camundongos. A maioria dos ensaios terapêuticos experimentais utilizou a administração de drogas por via oral (gavagem) e por curtos períodos de tempo. No caso de uma doença crônica, como é a doença de Jorge Lobo, a administração de drogas por gavagem e durante períodos longos não são apropriadas, devido ao risco de mortalidade dos animais. Pelas similaridades já mencionadas entre a doença de Jorge Lobo e a hanseníase, decidiu-se seguir o modelo de tratamento já utilizado contra a infecção pelo *M. leprae*, isto é, incorporar medicamentos à ração dos animais por duração prolongada, de até mais de seis meses. Dos medicamentos antifúngicos, destacam-se o itraconazol e a terbinafina, por seu amplo espectro de atividade e baixa toxicidade, tendo sido utilizadas pela sua disponibilidade e experiência prévia com uso destas drogas na terapêutica de várias micoses.

2. OBJETIVOS

Sendo recente a descoberta de um modelo experimental para estudo da doença de Jorge Lobo, e havendo, mesmo em seres humanos, poucos resultados favoráveis nos ensaios terapêuticos realizados até o momento, este estudo visou:

- Testar o modelo experimental do camundongo BALB/c, infectado pelo *L. loboi*, para ensaios terapêuticos.
- Testar o efeito terapêutico do itraconazol e da terbinafina, na infecção experimental de camundongos BALB/c, pelo *L. loboi*, através da avaliação da viabilidade, do número de fungos e de alterações macroscópicas nos coxins plantares de camundongos inoculados com o *L. loboi*.
- Comparar o efeito terapêutico do itraconazol e terbinafina na infecção experimental de camundongos BALB/c pelo *L. loboi*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Com o objetivo de verificar a eficácia de três drogas antifúngicas, foram utilizados 128 camundongos BALB/c, de ambos os sexos, com oito semanas de idade, obtidos no biotério do ILSL. Os animais foram inoculados com o *L. loboi*, mantidos com água e ração *ad libitum* e acomodados em número de quatro animais por caixa.

Para verificar a absorção das drogas antifúngicas no soro de animais tratados, foram utilizados 35 camundongos BALB/c normais, de ambos os sexos, com dez semanas de idade, obtidos no biotério do ILSL. Os animais foram mantidos com água e ração *ad libitum* e acomodados em número de cinco animais por caixa.

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, protocolo nº 194, da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp.

3.2. Métodos

3.2.1. Obtenção do inóculo infectante de *L. loboi*

Nesse experimento, foi utilizada biópsia coletada de um paciente do sexo masculino, 47 anos, portador da doença de Jorge Lobo, proveniente do Estado do Acre, que apresentava lesão localizada no pavilhão auricular há 13 anos.

O paciente recebeu esclarecimentos quanto aos objetivos desse estudo e assinou o termo de consentimento livre e esclarecido, para a realização da coleta da biópsia. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL), Of. 06/2000.

Retirou-se, por excisão cirúrgica, uma lesão de cerca de 0,5 cm², localizada no pavilhão auricular do paciente e preparou-se uma suspensão de fungos.

O tecido retirado do paciente foi lavado com solução salina estéril 0,85% (SS), transferido para uma placa de Petri e processado em condições assépticas em câmara de fluxo laminar, no laboratório da Equipe Técnica de Microbiologia do ILSL. Um fragmento do tecido foi retirado, colocado em um tubo contendo solução de formalina tamponada 10% e enviado ao setor de Anatomia Patológica do ILSL para realização de exame histopatológico. O restante do tecido foi cortado em fragmentos pequenos com auxílio de pinça e tesoura curva, e então macerado em um homogeneizador de tecidos contendo dois ml de SS. Após a sedimentação dos restos de tecido, o sobrenadante foi transferido para um tubo de ensaio estéril e a suspensão de fungos ressuspendida em um volume final de dez ml.

3.2.2. Determinação do número de células fúngicas do inóculo.

Após homogeneização da suspensão fúngica, dez µl foram colocados em uma câmara hemocitométrica de Neubauer para contagem de células fúngicas. O valor obtido, com a contagem dos fungos, foi expresso em números absolutos. A suspensão fúngica utilizada para inoculação dos animais possuía 2,7 x 10⁶ fungos/ml.

3.2.3. Determinação do índice de viabilidade

Utilizou-se o método de coloração vital com diacetato de fluoresceína e brometo de etídeo (DF-BE)⁹⁴, padronizado por Vilani-Moreno & Opromolla²⁷ para o *L. loboi*. Foram preparadas soluções estoque de DF (cinco mg/ml de acetona) e BE (cinco mg/ml SS). O DF foi mantido a -20°C e o BE a 4°C até o uso. Para determinação da viabilidade, ambas soluções foram diluídas separadamente a 1:100 em SS e 100 µl de cada solução foram colocadas em um

tubo contendo 200 µl da suspensão fúngica. A mistura foi agitada e incubada a 37°C por 15 minutos. Após a incubação, dez µl da mistura foram examinados em microscópio de fluorescência. Foram considerados viáveis os fungos que apresentavam coloração verde fluorescente, e depois de contadas 100 células fúngicas, o resultado foi expresso em porcentagem de fungos viáveis. O índice de viabilidade da suspensão fúngica utilizada para inoculação dos animais foi 59%.

3.2.4. Inoculação

Imediatamente após a determinação do número de fungos e índice de viabilidade, realizou-se a inoculação dos 128 camundongos BALB/c.

Os animais foram inoculados, com auxílio de uma seringa de insulina, por via intradérmica, em ambos coxins plantares posteriores, com 30 µl da suspensão contendo $7,1 \times 10^4$ fungos/0,03 ml de suspensão. A suspensão fúngica era agitada antes de cada animal ser inoculado.

3.2.5. Preparo dos medicamentos antifúngicos

Foram utilizadas três drogas adicionadas à dieta dos animais, segundo a técnica descrita por Shepard, em estudos de resistência medicamentosa do *M. leprae* em animais de experimentação⁹³. As drogas utilizadas neste estudo foram o itraconazol (D1), a terbinafina (D2) e a terbinafina formulada com a β-ciclodextrina (D3). Iniciou-se o tratamento com estes medicamentos antifúngicos 45 dias após a inoculação e o período de tratamento teve duração de 13 meses.

A concentração de cada droga utilizada foi calculada de acordo com a dosagem diária utilizada em seres humanos (Tabela 1). Estimou-se o consumo diário de ração por animal (cinco gramas ração/animal/dia) e então se calculou a dose total de cada medicamento a ser incorporado a cinco kg da ração comercial moída. A ração com itraconazol continha 100 mg de itraconazol/ 5 kg de ração e a ração com terbinafina 125 mg da terbinafina/ 5 kg de ração. As rações com os

medicamentos foram preparadas mensalmente e estocadas a 4°C em caixas plásticas com tampa.

Para o preparo da ração com itraconazol, foi utilizado o conteúdo da cápsula (100 mg em forma de microesferas) do medicamento comercial macerado e então misturado à ração em um homogeneizador de medicamentos por 15 minutos. O mesmo procedimento foi utilizado para o comprimido de terbinafina (comprimido de 125 mg).

Para o preparo da terbinafina formulada com a β -ciclodextrina (β cd), foi utilizado o sal puro cedido pelo laboratório Novartis. A quantidade de β -ciclodextrina a ser misturada à terbinafina foi calculada através do número de moles da terbinafina ($\eta=m/PM$), portanto, foram misturados 0,430 g da β -ciclodextrina e 0,125 g da terbinafina. Foi feita homogeneização da mistura em gral com algumas gotas de etanol 50% até a formação de uma pasta. Após a evaporação do etanol em estufa a 37°C por cerca de duas horas, a mistura foi incorporada à ração moída, e homogeneizada por 15 minutos.

Os animais do grupo controle receberam a ração comercial moída sem adição de qualquer medicamento.

Os animais receberam a ração moída *ad libitum* em comedouros adaptados às gaiolas de camundongos. Os comedouros eram reabastecidos com a ração moída três vezes por semana.

Tabela 1 – Estimativa das doses diárias das drogas antifúngicas para tratamento de camundongos inoculados com o *L. loboi*.

Dose diária indicada	Itraconazol	Terbinafina
Seres humanos (50 Kg PV)*	200 mg	250 mg
Camundongos BALB/c (Kg PV)* ¹	4 mg	5 mg

*PV= peso vivo

*¹= cada camundongo recebeu o equivalente a 0,1 mg do itraconazol e 0,125 mg da terbinafina diariamente

3.2.6. Tratamento dos camundongos após a inoculação

Após a inoculação, os animais foram divididos por sorteio em quatro grupos. Os tratamentos e coletas foram feitos de acordo com cronograma demonstrado na tabela 2.

Tabela 2 – Cronograma de procedimentos realizados com camundongos inoculados com o *L. loboi*.

Procedimento	Tratamento (N)			
	Controle	D1	D2	D3
Inoculação	32	32	32	32
Início tratamento 45 dias pi*	32	32	32	32
Sacrifício 4 meses pi*	8	8	8	8
Sacrifício 7 meses pi*	8	8	8	8
Sacrifício 10 meses pi*	8	8	8	8
Sacrifício 15 meses pi*	8	8	8	8

*pi = após a inoculação

3.2.7. Avaliação histopatológica dos coxins plantares dos camundongos após o tratamento

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico a 20 mg/kg PV e então sacrificados por deslocamento cervical. Em cada sacrifício, com auxílio de um bisturi, o coxim plantar esquerdo de cada animal foi excisado, colocado em solução de formalina tamponada 10% e enviado ao setor de Anatomia Patológica do ILSL para exame histopatológico. Os cortes foram corados pela hematoxilina-eosina (HE) e prata metenamina (MS), e avaliados quanto ao tamanho do infiltrado, constituição celular do infiltrado e presença de células fúngicas.

3.2.8. Avaliações do número de fungos e do índice de viabilidade nos animais após o tratamento

Em cada sacrifício, o coxim plantar direito de cada animal foi processado como descrito anteriormente (3.2.1.) para preparo do inóculo. O tecido foi macerado em um ml de SS e a suspensão obtida foi utilizada para contagem do número de fungos e determinação do índice viabilidade.

3.2.9. Avaliação da absorção de drogas

Dos 35 animais utilizados para avaliação das drogas utilizadas no tratamento, 30 receberam as drogas antifúngicas adicionadas à ração como descrito anteriormente (3.2.5.) e cinco animais receberam apenas ração moída sem medicamento (grupo controle).

Foi retirado o sangue de cinco animais de cada grupo 12 horas e 15 dias após o início da ingestão da ração. No momento da coleta, os camundongos foram anestesiados com pentobarbital sódico a 20 mg/kg PV. O volume de 500 µl de sangue foi coletado por punção cardíaca de cada animal e estes foram então sacrificados por deslocamento cervical. O sangue foi colocado em microtubos plásticos de 1,5 ml com tampa. Após a coagulação, o sangue foi centrifugado a 1500 x g por 10 minutos a 25°C. O soro obtido foi então transferido para um novo microtubo e estocado a -20°C.

3.2.10. Ensaio biológico

Foram preparadas soluções padrão das drogas itraconazol, terbinafina e terbinafina/ β -ciclodextrina, diluídas em soro normal de camundongos nas concentrações 0,1 mg/ml, 0,01mg/ml e 0.001 mg/ml. Discos de papel, para antibiograma, foram embebidos com dez µl das soluções padrão de cada droga e com os soros dos 35 camundongos não inoculados e tratados com as diferentes drogas. Os discos foram secos em estufa a 37°C por três horas, e então foram

mantidos separadamente em frascos de vidro tampados e estocados a 4°C até o uso.

O ensaio biológico foi realizado em placas de Petri grandes (15 cm de diâmetro), com 60 ml de meio agar Sabouraud-dextrose. Foi utilizada uma cepa padrão de *Candida albicans* (ATCC 10231) semeada em meio sólido Sabouraud-dextrose. A cultura de *C. albicans* foi ajustada em SS estéril para um padrão de turbidez 0,5 pela escala de McFarland e então foi semeada na placa com *swab* de algodão, em condições estéreis. Os discos de papel para antibiograma, previamente embebidos com soros a serem testados, foram colocados em duplicatas sobre a superfície recém-semeada da placa e incubados em estufa a 37°C. Após 24 e 48 horas de incubação das placas, foram feitas leituras para verificar a formação de halos de inibição de crescimento da cepa de *C. albicans*.

3.2.11. Documentação fotográfica

Após o aparecimento de lesão macroscópica, os camundongos foram fotografados com uma câmera Pentax® MZ-M, auto-exposição TTL multimodo 35mm SLR em cada sacrifício. Os cortes histológicos foram fotografados em um fotomicroscópio Zeiss®, modelo Axiolab MC 80.

Todas as fotos obtidas foram digitalizadas pelo sistema Scantouch AX 210 Nikon®, as imagens foram arquivadas no programa ADOBE Photoshop 4.0 e então foi feita impressão.

3.3. Análise estatística

Os estudos do número de fungos e da porcentagem de fungos viáveis foram realizados, considerando-se a técnica da análise de variância não-paramétrica para o modelo com dois fatores, complementada com os respectivos testes de comparações múltiplas⁹⁵. Todas as conclusões foram realizadas em nível de 5% de significância.

4. RESULTADOS

4.1. Número de fungos obtidos nos diferentes períodos de sacrifício

Os números de fungos obtidos nos diversos períodos de sacrifício estão demonstrados na tabela 3. A quantidade de fungos está expressa pela mediana dos oito animais sacrificados em cada grupo, em cada momento de sacrifício. Pode-se observar que apesar da grande variabilidade dentro de cada grupo de tratamento, houve um aumento progressivo no número de fungos no decorrer do experimento, no entanto em apenas alguns animais, dez meses após a inoculação, o número de fungos obtidos foi superior ao inoculado. Este aumento no número de fungos indica que houve multiplicação dos fungos nos coxins plantares, o que é esperado no grupo controle.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os números de fungos obtidos pelos diferentes grupos em cada momento de sacrifício ($P>0,05$). Diferenças significativas nas quantidades de fungos obtidas nos diferentes tempos foram encontradas no grupo controle ($P<0,05$) e no grupo D3 ($P<0,01$). A ausência de significância encontrada nos outros dois grupos, D1 e D2 ($P>0,05$), pode indicar um efeito das drogas utilizadas sobre a multiplicação do *L. loboi*, já que um pico de multiplicação dos fungos é esperado a partir de dez meses pós-inoculação. No grupo D2, principalmente, pode-se notar que os valores das medianas nos diferentes tempos de sacrifício permaneceram relativamente constantes até o final do experimento.

4.2. Índices de viabilidade obtidos nos diferentes períodos de sacrifício

Os índices de viabilidade obtidos nos diferentes períodos de sacrifício estão demonstrados na tabela 4. Os valores foram calculados pela mediana dos oito animais sacrificados em cada momento de sacrifício para cada grupo tratado.

Foi observada diferença significativa entre os grupos no 10º mês após a inoculação ($P<0,05$), sendo que neste período os índices de viabilidade do grupo

controle e do D1 eram mais altos do que nos outros grupos. Nos grupos D2 e D3 a viabilidade não foi significativamente diferente no decorrer do experimento ($P>0,05$).

Tabela 3 - Medidas descritivas do número de *L. loboi* obtido de coxim plantar de camundongos BALB/c infectados, segundo droga e momento de avaliação, com respectivo resultado do teste estatístico.

Droga	Momento de avaliação**				Resultado do teste estatístico de tempo, no grupo
	4 meses	7 meses	10 meses	15 meses	
C	37500±41875 (6000; 130000)	57500±90625 (10000; 255000)	360000±170000 (75000; 450000)	120000±115000 (50000; 1590000)	11,23 (P<0,05)
D1	53750±28750 (10000; 100000)	45000±10940 (25000; 145000)	90000±50000 (20000; 330000)	241500±811250 (10000; 2480000)	6,72 (P>0,05)
D2	100000±40000 (15000; 150000)	98500±36250 (15000; 575000)	130000±65000 (30000; 2110000)	180000±118500 (60000; 510000)	2,72 (P>0,05)
D3	40000±17500 (20000; 100000)	27500±26375 (10000; 105000)	190000±265000 (50000; 2640000)	80000±60000 (10000; 69200000)	11,69 (P<0,01)
Resultado do teste estatístico de droga	4,34 (P>0,05)	4,76 (P>0,05)	6,07 (P>0,05)	2,20 (P>0,05)	

C= grupo controle, D1=itraconazol, D2=terbinafina, D3=terbinafina/β-ciclodextrina

** Mediana ± Semi-amplitude interquartílica (Valor mínimo; Valor máximo)

N= oito animais por grupo em cada momento de avaliação

Tabela 4 - Medidas descritivas da porcentagem de fungos viáveis segundo droga e momento de avaliação com respectivo resultado do teste estatístico, em camundongos BALB/c infectados com *L. loboi*.

Droga	Momento de avaliação**			Resultado do teste estatístico de grupo
	7 meses	10 meses	15 meses	
C	0±3 (0-11)	16±4 (5-24)	7±4 (5-15)	9,42 (P<0,01)
D1	0±2 (0-17)	11±5 (0-20)	11±6 (8-26)	5,99 (P<0,05)
D2	13±13 (0-26)	1±4 (0-12)	3±6 (0-19)	0,41 (P>0,05)
D3	0±0 (0-0)	3±4 (0-16)	5±6 (0-19)	4,76 (P>0,05)
Resultado do teste estatístico de droga	1,97 (P>0,05)	10,73 (P<0,05)	5,41 (P>0,05)	

C= grupo controle, D1=itraconazol, D2=terbinafina, D3=terbinafina/ β -ciclodextrina

** Mediana \pm Semiamplitude interquantílica (Valor mínimo; Valor máximo)

N= 8 animais por grupo em cada momento de avaliação

4.3. Lesões macroscópicas

As alterações macroscópicas dos coxins plantares foram observadas a partir do sétimo mês pós-inoculação. Estas alterações se caracterizaram pelo aparecimento de pequenos nódulos, de consistência firme e superfície lisa na região plantar ou em alguns casos no dorso ou lateral da pata dos animais (Figura 1). Estes nódulos evoluíram devagar em tamanho, sendo que no final do período experimental (13 meses pós-tratamento) apenas alguns animais apresentavam lesões exuberantes, deformando o coxim plantar e a pata dos animais (Figuras 2 e 3). As lesões com maior tempo de evolução se apresentaram com consistência menos firme. Foi observada nestes casos dilatação dos vasos superficiais.

Além das lesões nas patas, não foram observadas outras alterações sistêmicas dos animais durante o período experimental e nos momentos de sacrifício.

Não houve diferença significativa no número de animais que desenvolveram lesões macroscópicas nos diferentes grupos durante o período experimental, apesar de o número de animais tratados com o itraconazol e com a terbinafina- β -ciclodextrina ter sido um pouco menor que nos outros grupos (Tabela 5). A porcentagem de animais que desenvolveram lesões nos grupos tratados e nos controles está demonstrada no gráfico 1.



Figura 1 – Lesão macroscópica em coxim plantar de camundongo BALB/c, grupo controle, dez meses após a inoculação.



Figura 2 – Lesão macroscópica em coxim plantar, evidenciando nódulos grandes. Camundongo BALB/c, grupo controle, 15 meses após a inoculação.



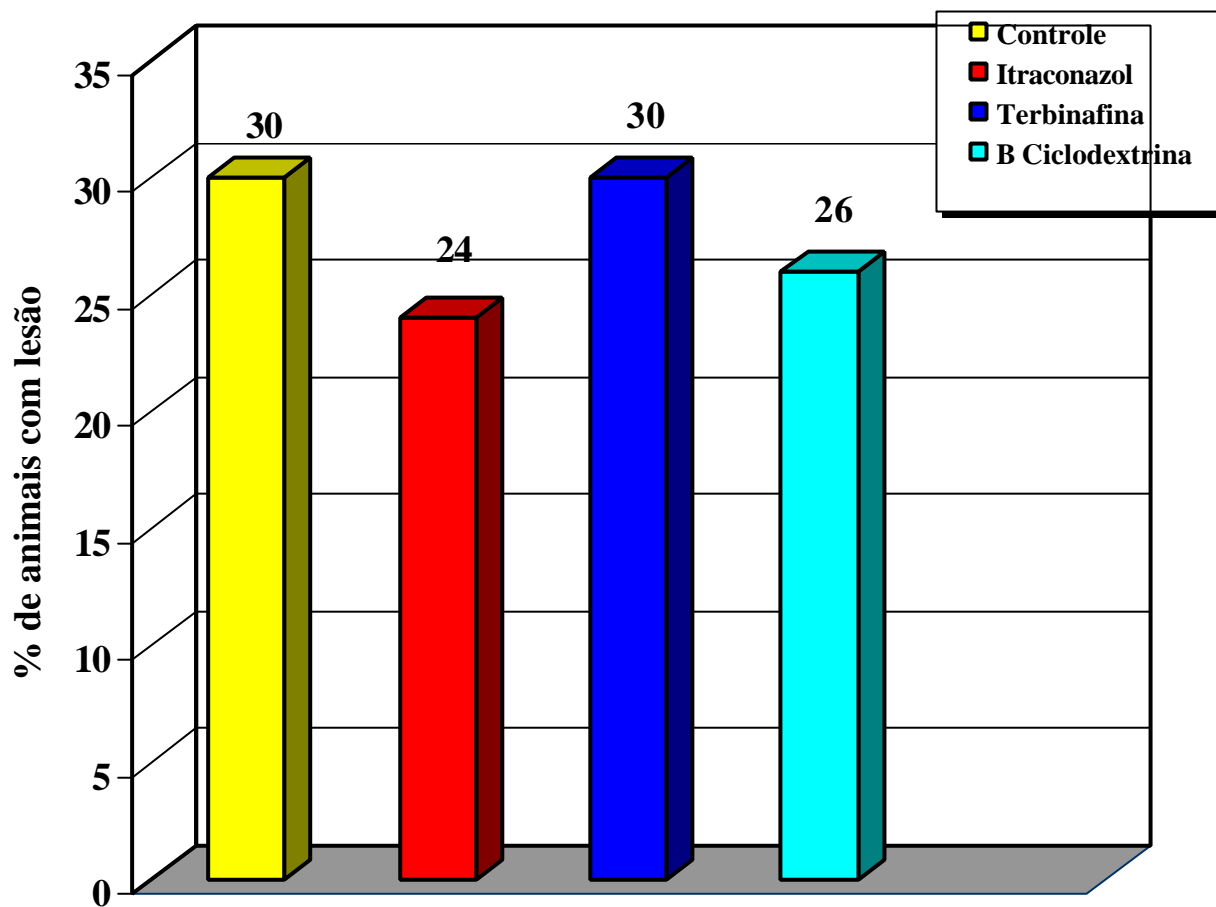
Figura 3 – Lesão macroscópica em coxim plantar de camundongo BALB/c 13 meses após o início do tratamento com a terbinafina.

Tabela 5 – Número de camundongos BALB/c infectados nos coxins plantares com *L. loboi*, e que desenvolveram lesões macroscópicas em cada grupo tratado nos diferentes períodos de sacrifício.

Período de sacrifício	Grupo tratado*	Nº animais	Frequência acumulativa
4 meses pi	C	0	0
	D1	0	0
	D2	0	0
	D3	0	0
7 meses pi	C	1	1
	D1	1	1
	D2	2	2
	D3	0	0
10 meses pi	C	3	4
	D1	3	4
	D2	3	5
	D3	6	6
15 meses pi	C	5	9
	D1	3	7
	D2	4	9
	D3	2	8

C= grupo controle, D1=itraconazol, D2=terbinafina, D3=terbinafina/ β -ciclodextrina

Gráfico 1 - Porcentagem de camundongos BALB/c infectados nos coxins plantares com *L. loboi*, e que desenvolveram lesões macroscópicas em cada grupo tratado, até o término do experimento.



4.4. Análise histopatológica

O exame histopatológico dos coxins plantares dos camundongos BALB/c inoculados com o *L. loboi*, tratados com drogas antifúngicas e controles, sacrificados em diferentes períodos após o tratamento, demonstrou a presença de um infiltrado inflamatório localizado entre a epiderme e os feixes de fibras musculares, algumas vezes ao redor de nervos e vasos. Não foram observadas alterações na epiderme dos coxins plantares.

A constituição do infiltrado inflamatório não variou no decorrer do experimento e entre os diferentes grupos tratados. A análise histopatológica dos diferentes grupos mostrou que eram encontrados nos infiltrados: histiócitos englobando fungos, histiócitos com citoplasma rendilhado, células gigantes tipo corpo estranho e tipo Langhans, linfócitos, neutrófilos, fibroblastos, mastócitos, plasmócitos e células fúngicas. Houve variação no número de células encontradas durante os vários períodos de sacrifício.

Quatro meses após a inoculação (dois meses após o início do tratamento), o infiltrado granulomatoso era pequeno, constituído predominantemente por histiócitos com citoplasma rendilhado e histiócitos englobando fungos. As células fúngicas apresentavam-se de duas formas, como cápsulas vazias ou com conteúdo intracitoplasmático característico de células viáveis. Foram observados esparsos linfócitos, alguns fibroblastos e raras células gigantes tipo corpo estranho, além de raros mastócitos (Figuras 4 e 5). Em toda extensão do infiltrado, podem-se observar alguns focos de neutrófilos. Na coloração pela prata metenamina, foram observadas células fúngicas isoladas, algumas bem coradas em marrom escuras ou quase negras, indicando que as células estavam em sua maioria inviáveis.

Aos sete meses pós-inoculação (cinco meses pós-tratamento) foi observado um aumento do granuloma, que agora se apresentava dividido em blocos separados por feixes de fibras colágenas. O infiltrado era constituído principalmente por histiócitos contendo fungos, muitos com características morfológicas de viabilidade. Observou-se também um grande número de células rendilhadas. Houve um aumento no número de células gigantes tipo corpo

estranho. Foram observados alguns focos de linfócitos e esparsos neutrófilos (Figuras 6 e 7). Na coloração pela prata metenamina, foram vistas muitas células fúngicas isoladas, algumas formas catenuladas e muita poeira argentófila.

No 10º mês pós-inoculação (oito meses pós-tratamento), o infiltrado observado era grande, septado, dividido por fibroblastos e feixes de fibras colágenas. A constituição do infiltrado aos 10 meses era muito semelhante a do encontrado no sétimo mês, exceto pelo aumento do número de células gigantes e pelo aumento do número de fungos encontrados (Figuras 8 e 9). Na coloração pela prata metenamina foram observados muitos fungos, isolados, fungos formando cachos e formas catenuladas. Muitos fungos se apresentavam bem corados, e havia uma grande quantidade de poeira argentófila.

No último sacrifício, aos 15 meses pós-inoculação (13 meses de tratamento), o infiltrado granulomatoso era extenso, dividido em blocos por largos feixes de fibras colágenas. Havia um predomínio de células gigantes contendo fungos (muitos com características morfológicas de viabilidade) e células gigantes com citoplasma rendilhado. A maioria das células gigantes presentes era do tipo corpo estranho e poucas do tipo Langhans. Foram encontrados também histiócitos com citoplasma rendilhado, alguns focos de linfócitos e de neutrófilos (Figuras 10 e 11). Alguns focos de necrose foram observados neste período. Na coloração pela prata metenamina, evidenciou-se um grande número de células fúngicas, algumas bem coradas, outras com aspecto degenerado, e uma grande quantidade de poeira argentófila (Figuras 12 e 13).

O quadro histopatológico dos coxins plantares dos camundongos tratados com drogas antifúngicas e controles não foi diferente entre os grupos até o final do experimento (Figuras 14, 15 e 16).

4.5. Ensaio microbiológico para verificar a absorção das drogas antifúngicas

Após 24 horas, foi observada formação de halo de inibição de crescimento da *C. albicans* ao redor dos discos contendo as soluções padrão de itraconazol nas

concentrações de 0,1 mg/ml, 0,01 mg/ml e 0,001 mg/ml somente (Figura 17). Ao redor do disco contendo 0,0001 mg/ml houve crescimento da cepa de *C. albicans*.

Para a terbinafina e terbinafina/ β -cyclodextrina, foi observada inibição do crescimento somente ao redor dos discos contendo 0,1 mg/ml e 0,01 mg/ml.

Não houve formação de halo de inibição ao redor dos discos contendo o soro controle negativo (soro normal de camundongo) e nem ao redor de nenhum soro teste.

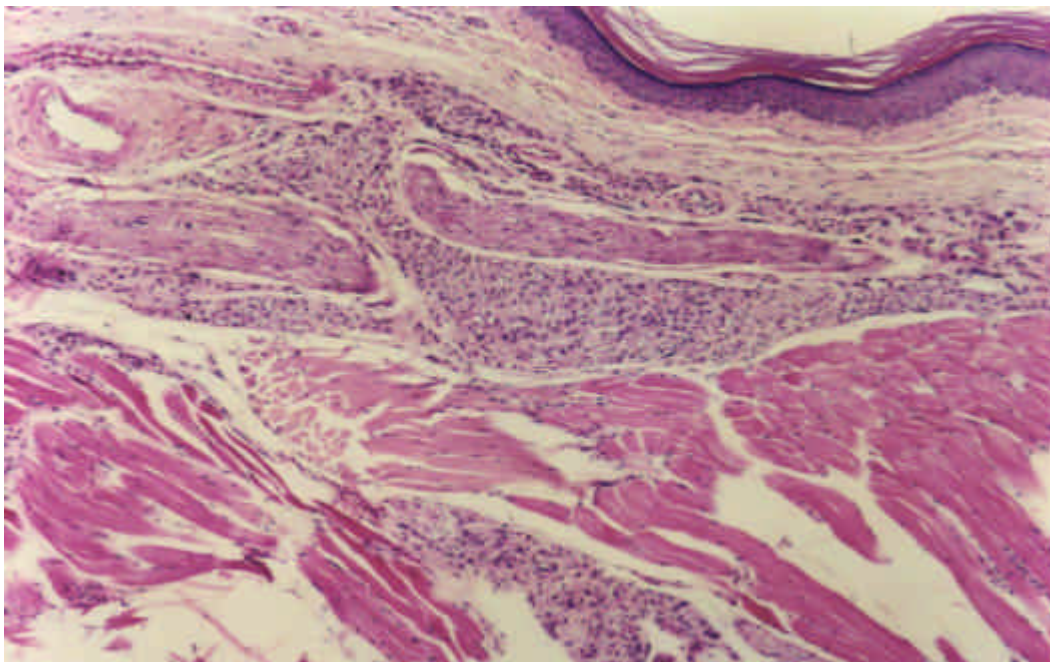


Figura 4 – Pele do coxim plantar de camundongo BALB/c quatro meses após inoculação. Aspecto geral do infiltrado histiocitário subepidérmico entre feixes de fibras musculares. (HE – 10X).

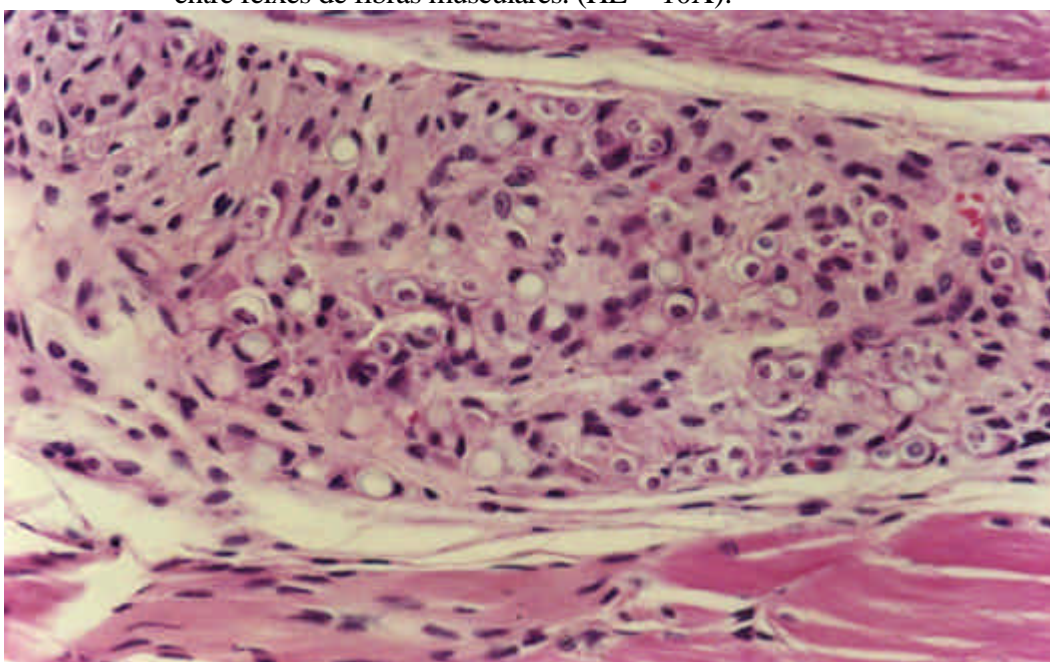


Figura 5 – Pele do coxim plantar de camundongo BALB/c quatro meses após inoculação. Infiltrado granulomatoso moderado constituído por histiócitos englobando células fúngicas, esparsos linfócitos e fibroblastos. (HE – 40X).

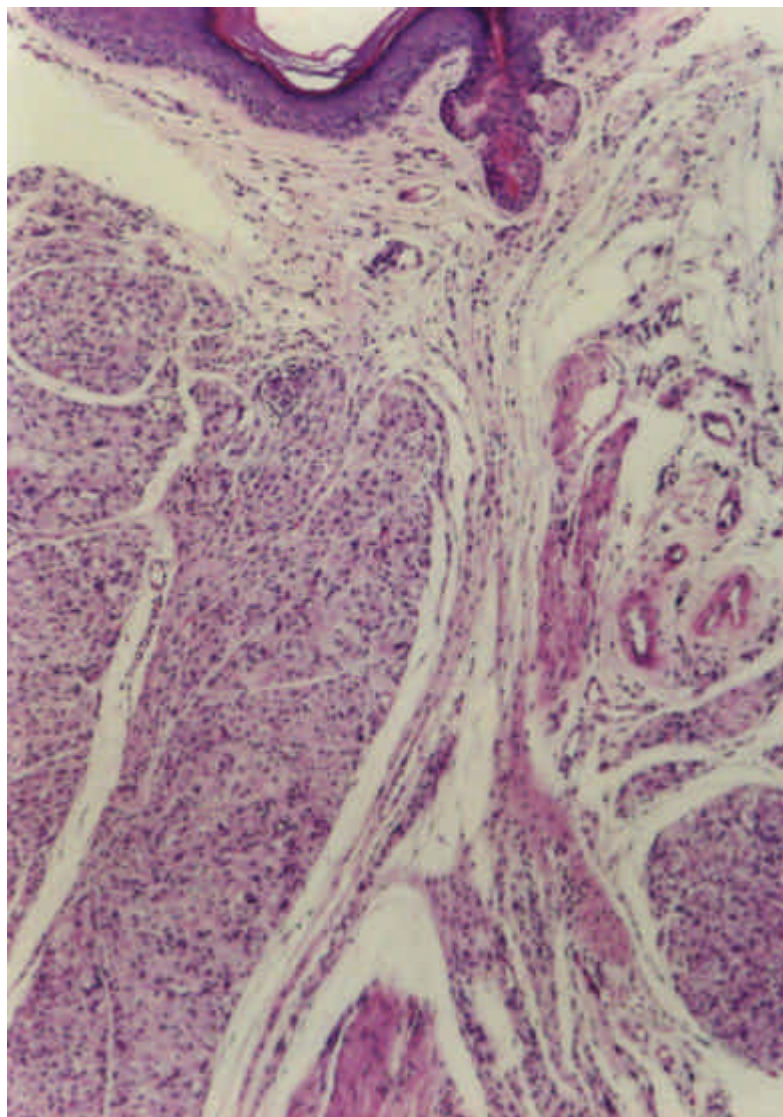


Figura 6 – Pele do coxim plantar de camundongo BALB/c sete meses após inoculação. Aspecto geral do infiltrado histiocitário subepidérmico. (HE – 10X).

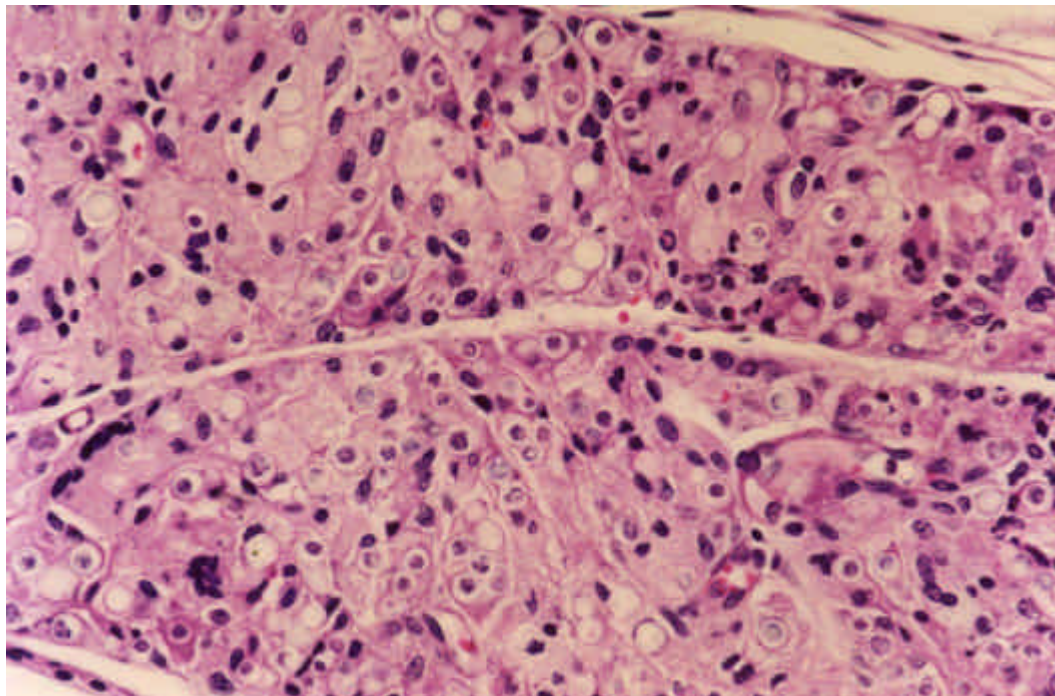


Figura 7 – Pele do coxim plantar de camundongo BALB/c sete meses após inoculação. Infiltrado granulomatoso constituído por histiócitos englobando células fúngicas, histiócitos com citoplasma rendilhado, focos de neutrófilos e esparsos linfócitos. (HE – 40X).

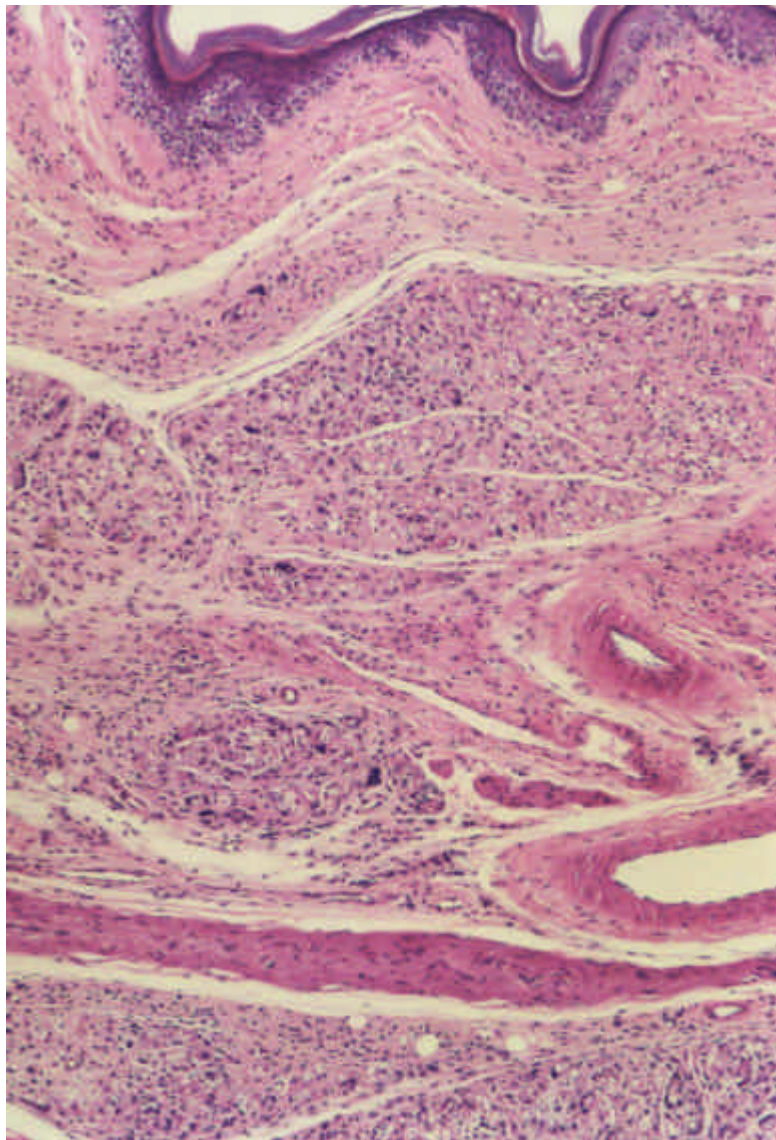


Figura 8 – Pele do coxim plantar de camundongo BALB/c 10 meses após inoculação. Aspecto geral do extenso infiltrado granulomatoso ocupando o derma superficial e profundo. (HE – 10X).

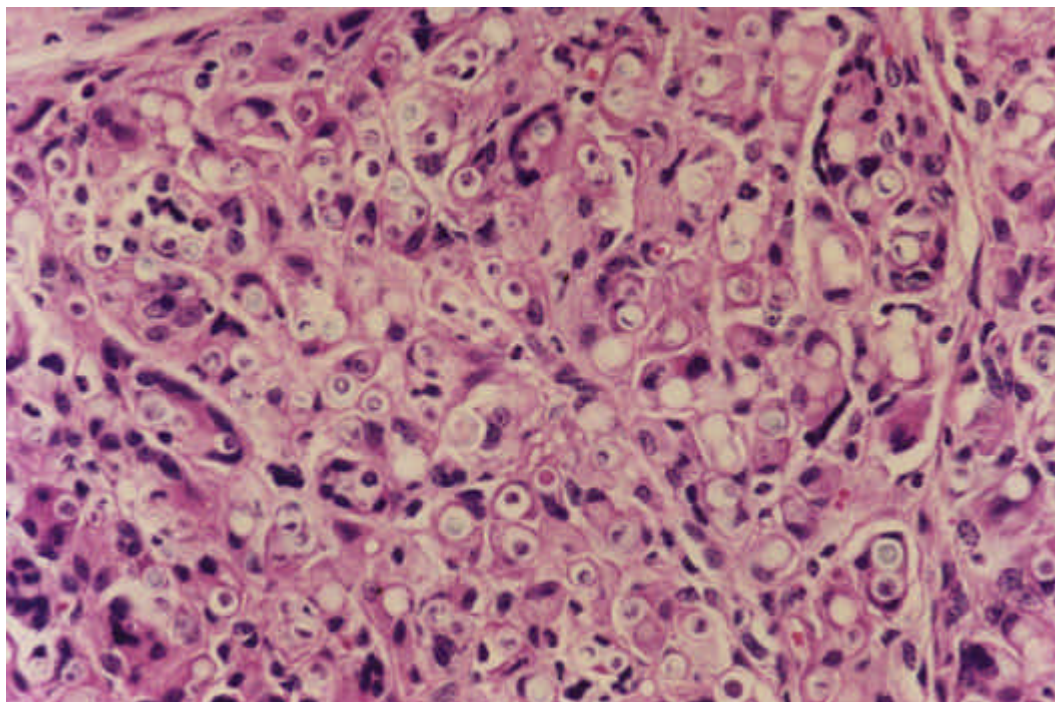


Figura 9 – Pele do coxim plantar de camundongo BALB/c 10 meses após inoculação. Infiltrado granulomatoso extenso constituído por histiócitos, células gigantes e muitos fungos. (HE – 40X).

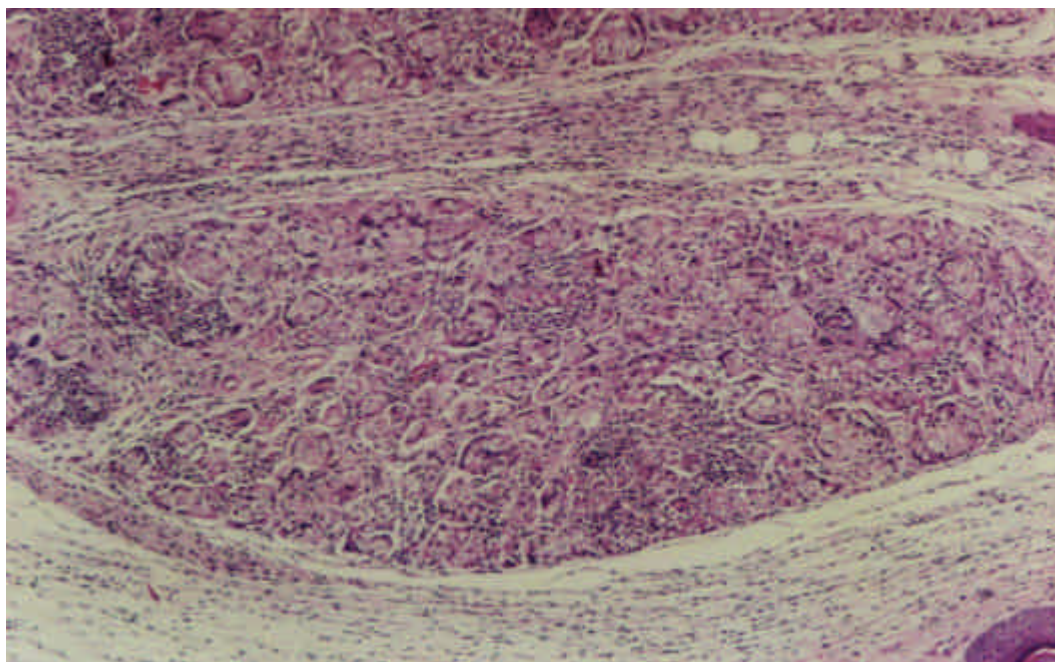


Figura 10 – Pele do coxim plantar de camundongo BALB/c 15 meses após inoculação. Aspecto geral do extenso infiltrado granulomatoso contendo inúmeras células gigantes. (HE – 10X).

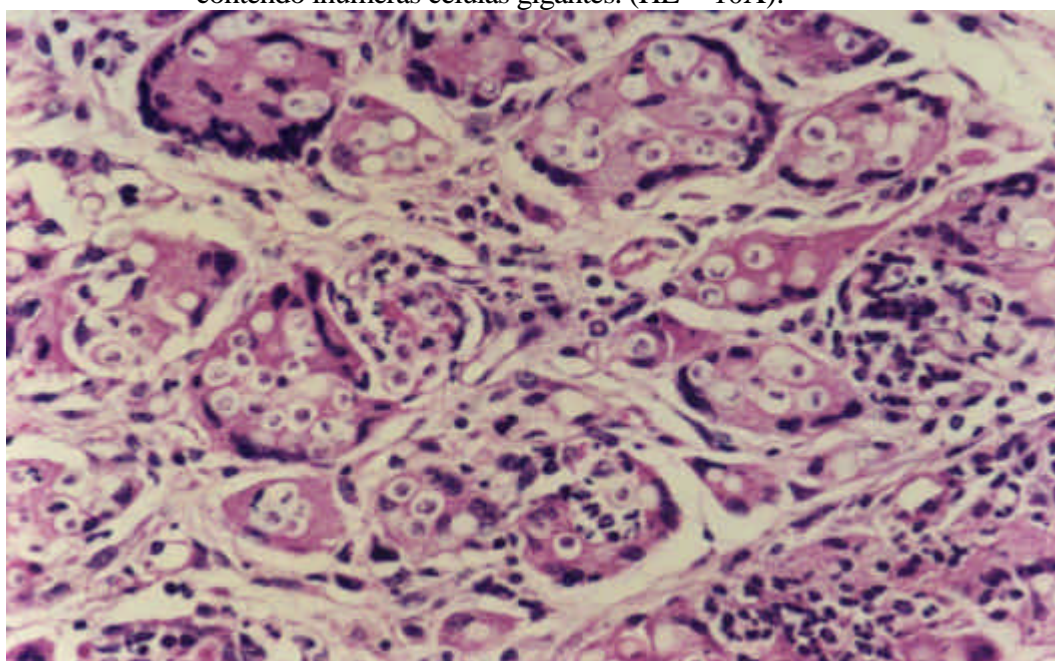


Figura 11 – Pele do coxim plantar de camundongo BALB/c 15 meses após inoculação. Infiltrado granulomatoso com predomínio de células gigantes com numerosos fungos em seu interior e focos de neutrófilos. (HE – 40X).

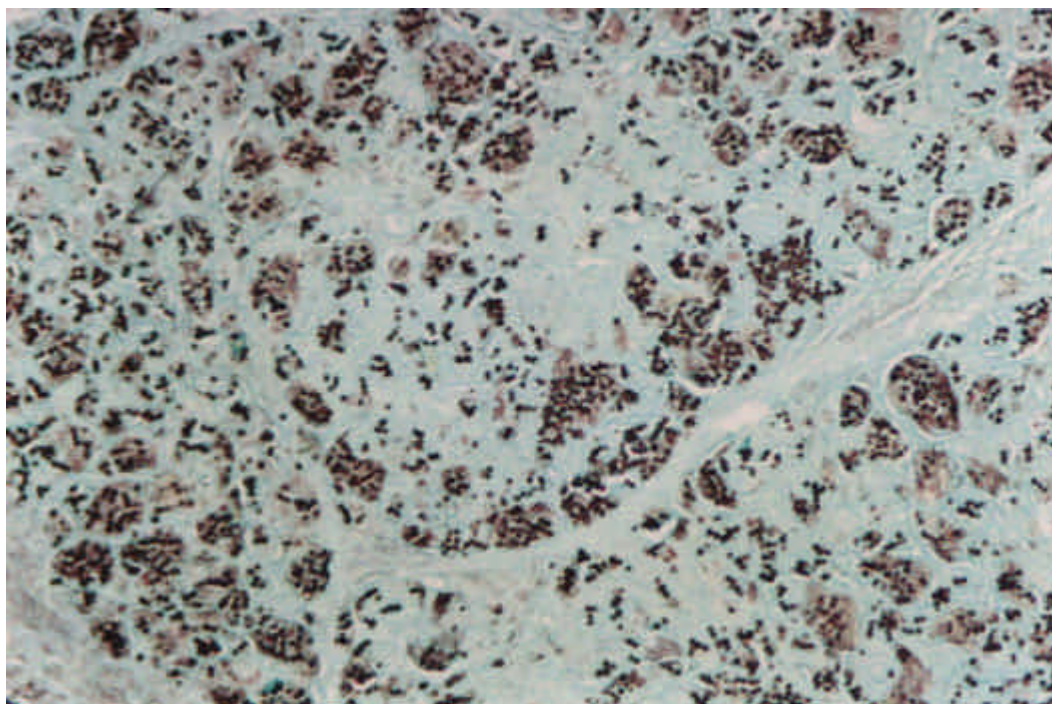


Figura 12 – Coloração pela prata metenamina evidenciando grande número de fungos e uma grande quantidade de poeira argentófila. Camundongo BALB/c 15 meses após inoculação. (10X)

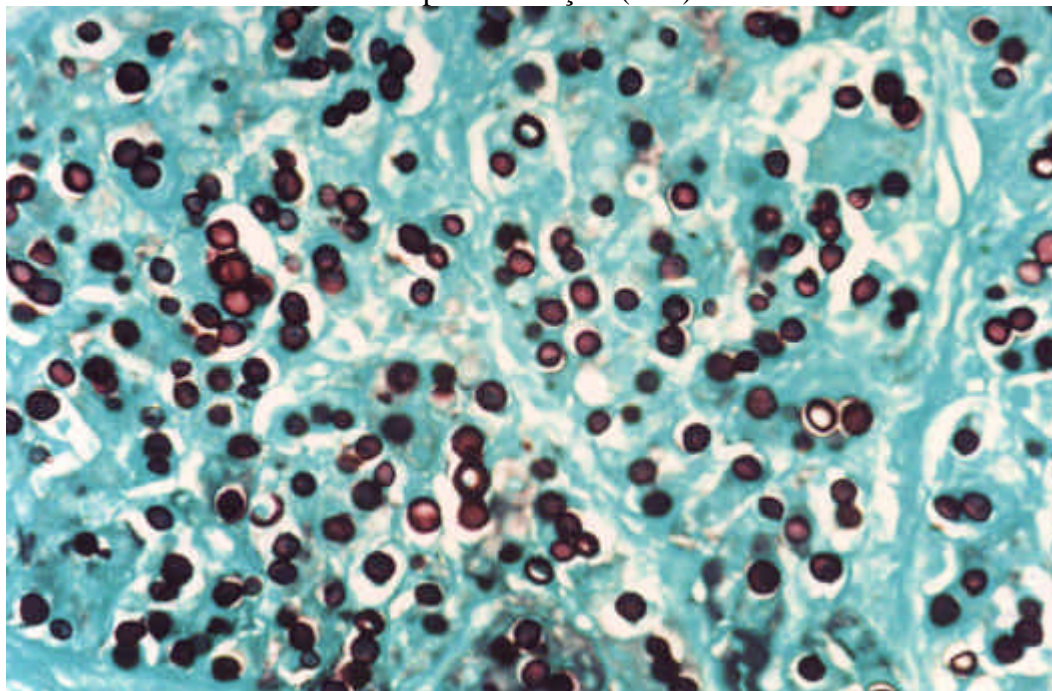


Figura 13 - Coloração pela prata metenamina evidenciando numerosos fungos, a maioria deles mal corados. Camundongo BALB/c 15 meses após inoculação. (40X).

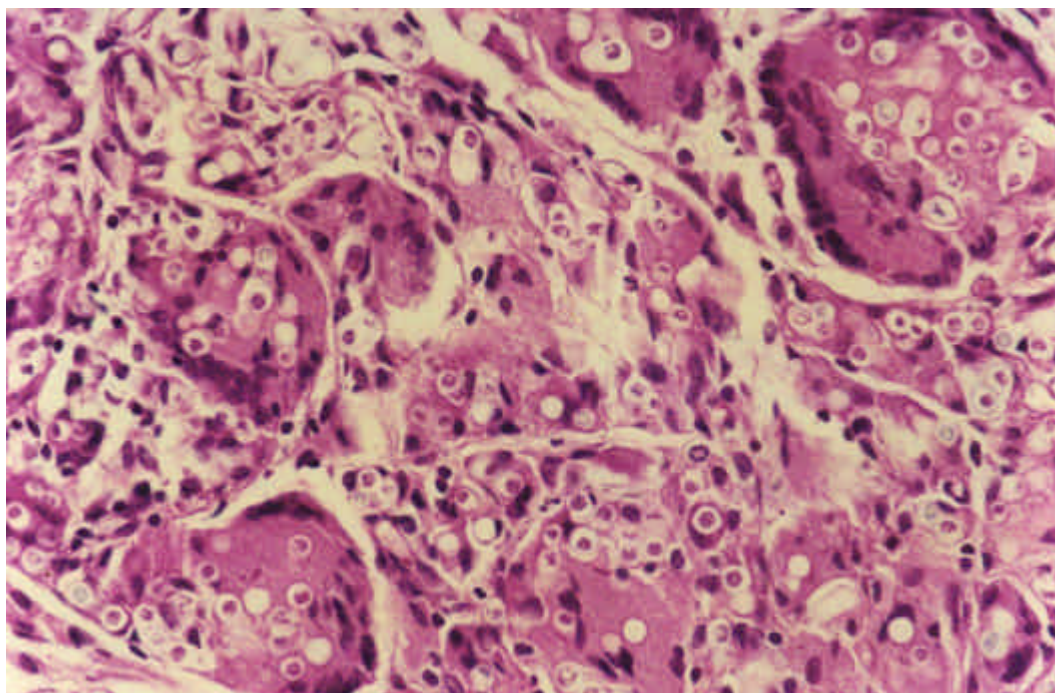


Figura 14 – Pele do coxim plantar de camundongo BALB/c tratado com itraconazol, 15 meses após inoculação. Infiltrado granulomatoso constituído por células gigantes contendo numerosos fungos em seu interior e células com citoplasma rendilhado. (HE – 40X).

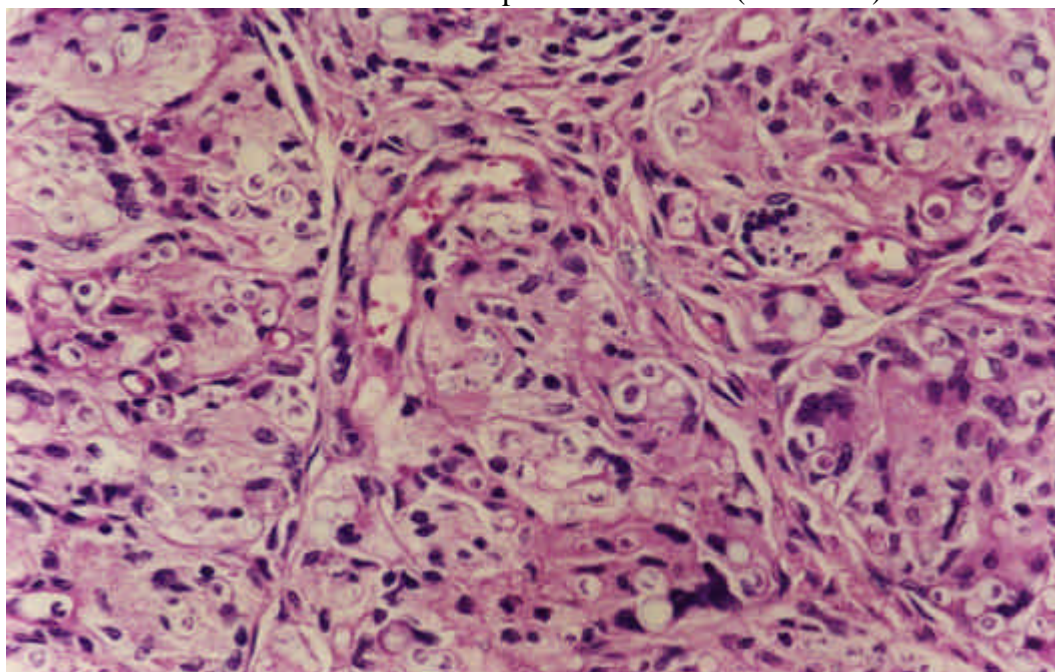


Figura 15 – Pele do coxim plantar de camundongo BALB/c tratado com a terbinafina, 15 meses após inoculação. Infiltrado granulomatoso com predomínio de células gigantes contendo numerosos fungos em seu interior. (HE – 40X).

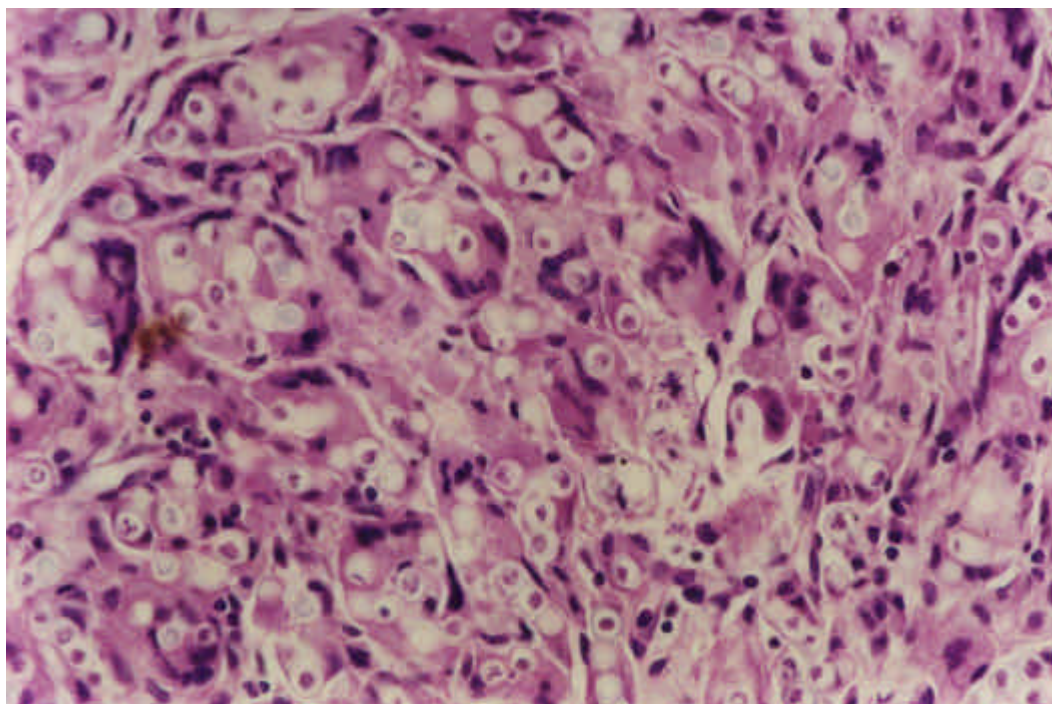


Figura 16 – Pele do coxim plantar de camundongo BALB/c tratado com a terbinafina/ β ciclodextrina, 15 meses após inoculação. Infiltrado granulomatoso com predomínio de células gigantes com numerosos fungos em seu interior. (HE – 40X).

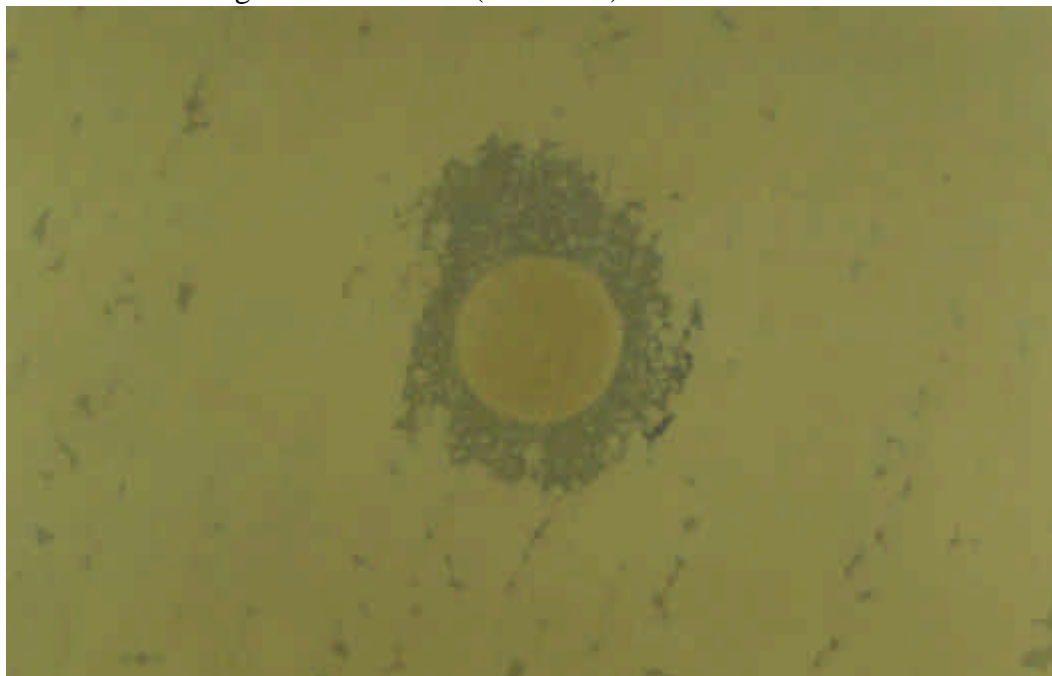


Figura 17 – Halo de inibição do crescimento de cepa de *Candida albicans*. Disco embebido com itraconazol 0,1 mg/ml.

5. DISCUSSÃO

A doença de Jorge Lobo ocorre principalmente na América do Sul. O Brasil registra o maior número de casos, sendo a incidência principal na região Amazônica, seguido por Suriname, Guiana Francesa, Colômbia, Venezuela, Panamá, entre outros países^{4,5}. O número de pacientes acometido pela doença de Jorge Lobo não é muito grande. Em 1996, Pradinaud & Talhari citaram 418 casos estimados⁷. Em 2000, Opromolla et al publicaram mais 40 casos, totalizando 295 casos descritos no Brasil⁸. Apesar da baixa prevalência, em um grande número desses pacientes as lesões são bastante extensas, e sua localização, muitas vezes em membros superiores e/ou inferiores, torna o indivíduo acometido incapacitado de realizar suas atividades laborativas⁹. Deve-se levar também em consideração o aspecto psicossocial de pacientes com lesões crônicas, às vezes progressivas, e que até o momento são incuráveis. Sabe-se que, apesar do resultado positivo de algumas tentativas terapêuticas, como, por exemplo, o uso da clofazimina isolada⁷² ou em associação com outras drogas como o itraconazol⁸⁵ e com a sulfona⁸⁴, o tratamento mais eficaz para a doença de Jorge Lobo ainda é o cirúrgico, sendo muitas vezes necessárias várias intervenções cirúrgicas e realização de enxertos, com um pós-operatório prolongado. Ainda assim, vários casos apresentam recidivas após períodos variáveis de tratamento^{8,9}.

As tentativas de tratamento realizadas até hoje foram feitas empiricamente utilizando-se as drogas existentes no mercado, com eficácia comprovada contra outros fungos. Mas os resultados foram inconclusivos com a doença de Jorge Lobo. Isso pode estar relacionado à ausência de eficácia. Ou as drogas podem não ter funcionado porque esses trabalhos foram realizados sem uma metodologia definida, a casuística pode ter sido muito pequena, as drogas podem ter sido utilizadas por intervalos curtos demais para se tentar obter efeito terapêutico em uma doença de evolução crônica, como é a doença de Jorge Lobo, e, além disso, não se tem certeza da regularidade de ingestão dos medicamentos pelos pacientes.

Ao procurar uma droga contra uma micose profunda, o ideal seria que as drogas antifúngicas, já existentes no mercado e as drogas novas que porventura

surgissem, fossem testadas *in vitro* ou em animais de experimentação, e uma vez demonstrado o seu efeito terapêutico, elas seriam utilizadas primeiramente em estudos piloto e depois em estudos clínicos em pacientes.

No caso da doença de Jorge Lobo, um grande entrave na experimentação terapêutica é a ausência de crescimento do fungo *in vitro*, que não permite nem a seleção prévia de drogas antifúngicas e nem a padronização de concentrações inibitórias mínimas, como têm sido feito com outros fungos. Hoje, porém, já contamos com a reprodução dessa doença em camundongos BALB/c e também já se padronizou um método para determinação de índices de viabilidade do fungo. Com isso, novas perspectivas se abriram para o estudo dessa enfermidade.

Por essa razão, propôs-se utilizar o camundongo BALB/c inoculado com o *L. loboi* para realização de estudos com drogas antifúngicas. Alguns aspectos da infecção experimental em camundongos BALB/c ainda não estão totalmente esclarecidos, tais como dose mínima infectante e a relação parasita-hospedeiro, mas a curva de crescimento do *L. loboi* já foi demonstrada e o tempo médio de aparecimento de lesões macroscópicas já foi estimado nesta linhagem de camundongos²⁹. Desse modo, utilizando esses parâmetros, mais o índice de viabilidade dos fungos, foi possível montar um modelo para estudos terapêuticos.

Apesar de os resultados das drogas, até então, testadas na doença de Jorge Lobo, serem discutíveis, foram escolhidas duas delas, o itraconazol e a terbinafina, para ver se neste modelo os resultados seriam mais concretos, já que estes mesmos medicamentos foram utilizados em protocolos mais bem definidos. O itraconazol, que apresenta bons resultados no tratamento da histoplasmose, paracoccidiodomicose, esporotricose e candidíase⁷¹, não demonstrou efeito terapêutico em pacientes portadores da doença de Jorge Lobo, quando utilizado como monoterapia por seis meses⁸³. Mas há dois relatos nos quais a associação do itraconazol com a 5-fluorocitosina⁸⁴, e a sua associação com a clofazimina⁸⁵, demonstraram uma resposta promissora para o futuro da terapêutica da doença de Jorge Lobo. No primeiro caso, não houve melhora clínica, mas houve diminuição do índice de viabilidade do fungo e, no segundo caso, os autores relatam a cura clínica e histopatológica de um paciente após um ano de tratamento. Quanto à

terbinafina, essa é uma droga mais nova, com espectro de ação comprovado contra alguns fungos dimórficos como o *B. dermatitidis*, *H. capsulatum* e *Sporothrix schenckii*⁸⁷, foi utilizada somente uma vez em pacientes com a doença de Jorge Lobo, por um intervalo curto de tratamento, não mostrando nenhum efeito terapêutico⁸⁴.

O desenvolvimento do modelo experimental utilizado baseou-se na experiência de Shepard com a hanseníase experimental⁹¹. Esse autor, após várias inoculações de concentrações diferentes de bacilos, no coxim plantar de camundongos, montou uma curva de crescimento do *M. leprae* até atingir um plateau onde o número de bacilos permanecia constante até nove a doze meses, padronizando assim um modelo de inoculação do *M. leprae*. Tendo em mãos essa curva, diversos trabalhos puderam então ser realizados para testar a cinética de drogas com atividade anti-hansênica^{92,93}. A multiplicação de bacilos em camundongos imunocompetentes está limitada à pata e não há desenvolvimento de lesões macroscópicas, mas as alterações da curva de crescimento dos bacilos podem servir para detectar a ação de drogas. Uma grande vantagem da doença de Jorge Lobo sobre a hanseníase é que, além da curva de crescimento do fungo na pata do camundongo, têm-se à disposição dois outros parâmetros importantes para avaliação do tratamento, o índice de viabilidade dos fungos e o desenvolvimento de lesões macroscópicas na pata inoculada com o *L. loboi*.

Tendo agora um modelo à disposição, e baseando-se na curva de crescimento do *L. loboi* na pata do camundongo BALB/c, verificou-se que o período de tratamento teria que ser longo, pois, por volta de dez meses pós-inoculação, é que se observou um pico da curva de multiplicação dos fungos nas patas. As lesões macroscópicas também começaram a aparecer ao redor do sétimo mês pós-inoculação. Nos estudos em animais, tanto o itraconazol como a terbinafina foram administrados por gavagem, para detectar sua atividade em diversas infecções fúngicas, mas por períodos curtos de tratamento. No presente estudo, optou-se por não submeter os camundongos à realização diária de gavagem, para evitar o risco de perda dos camundongos devido à repetição desse procedimento durante muitos meses. Pelo fato de pesquisadores terem utilizado,

na hanseníase experimental, a administração do medicamento junto com a dieta, por vários meses, preferiu-se empregar essa via. Com relação ao início da administração dos medicamentos na hanseníase, o medicamento foi oferecido aos camundongos logo após a inoculação deles com o *M. leprae*, e os animais foram acompanhados até o aparecimento do *plateau* no grupo controle, cerca de seis a nove meses após a inoculação. A ausência de multiplicação de bacilos nos animais tratados indica a sensibilidade do *M. leprae* ao medicamento utilizado⁹².

Esse protocolo foi adaptado para sua utilização na doença de Jorge Lobo, pois os animais receberam os medicamentos 45 dias após a inoculação com o *L. loboi*. O tratamento foi iniciado após um determinado período, para que os fungos recém-inoculados tivessem tempo para se adaptarem ao novo hospedeiro, e começassem a se multiplicar, para que, ao final do tratamento, fossem observados ou não atraso da multiplicação do fungo e impedimento do desenvolvimento de lesões.

Os camundongos foram tratados por 13 meses e avaliados durante o tratamento quanto ao número de fungos, índice de viabilidade e aspecto macroscópico e microscópico das lesões.

As alterações macroscópicas começaram a aparecer após sete meses de inoculação em todos os grupos. O número de animais que desenvolveu lesões macroscópicas não variou no decorrer do experimento, entre os grupos tratados e o grupo controle.

Do ponto de vista histopatológico, observou-se o desenvolvimento de reação granulomatosa, característica de granulomas tipo corpo estranho, com predomínio de células gigantes tipo corpo estranho e tipo Langhans, com uma grande quantidade de parasitas no seu interior. Foram observados linfócitos e neutrófilos esparsos ou agrupados, mas em pequeno número no infiltrado. Em todos os grupos avaliados, não foi possível se fazer uma distinção entre animais tratados e não tratados pelo quadro histopatológico.

Quanto ao número de células fúngicas, os valores foram expressos pelas medianas do grupo em cada momento de sacrifício. Observou-se em todos os grupos um aumento progressivo no número de células fúngicas, sugerindo que

houve multiplicação dos fungos em todos os grupos avaliados. Os valores das medianas foram um pouco diferentes, mas não houve diferença estatisticamente significativa entre o número de fungos obtidos em cada momento de sacrifício, nos diferentes grupos tratados e no grupo controle. Apesar disso, pôde-se observar que houve diferença entre os animais tratados e não tratados. O menor número de fungos foi encontrado no grupo tratado com a terbinafina e com o itraconazol.

Além disso, apesar de o aumento do número de células fúngicas indicar que está havendo multiplicação do fungo no coxim plantar dos camundongos, o grande número de células fúngicas com características morfológicas de células inviáveis, apresentando-se como cápsulas vazias, presentes no interior de macrófagos e células gigantes, dificulta a avaliação dos resultados terapêuticos e pode comprometer o resultado da análise estatística, pois apesar dos valores não serem significativos, deve-se levar em consideração a interpretação biológica do resultado. Não é possível identificar se os fungos estão se multiplicando e morrendo rapidamente, em resposta ao tratamento com as drogas antifúngicas, ou se já estão mortos e demoram muito tempo para serem eliminados, como já foi demonstrado por Vilani-Moreno et al., em um estudo no qual camundongos foram inoculados com fungos inviáveis e acompanhados até 18 meses pós-inoculação²⁸. Nesse estudo, não houve nem aparecimento de lesões macroscópicas e nem multiplicação dos fungos, que apesar de mortos, continuaram sendo encontrados até quatro meses. Nos momentos seguintes, só foi detectada a presença de poeira argentófila.

Com relação ao índice de viabilidade, os do grupo controle e do grupo tratado com o itraconazol se comportaram de maneira semelhante. Foi observado que a viabilidade aumentou aos sete e dez meses, baixando após 15 meses de inoculação, indicando que o medicamento não alterou a viabilidade do fungo nas condições estudadas. O resultado encontrado no grupo controle foi significativamente diferente dos grupos tratados com a terbinafina e terbinafina/ β ciclodextrina. Esperava-se que os índices de viabilidade fossem aumentando gradativamente, porque o número de fungos havia aumentado em todos os grupos no decorrer do experimento. Mas o que se observou foi que, nos grupos tratados

com terbinafina e terbinafina/ β ciclodextrina, o índice de viabilidade se manteve constante durante todo o período. Pode-se inferir daí que, possivelmente, tenha havido um efeito terapêutico da terbinafina.

Se for verdade que a terbinafina apresenta efeito terapêutico melhor do que o itraconazol, várias razões poderiam ser responsáveis por esses achados. Ambas as drogas agem inibindo a síntese de ergosterol presente na membrana de fungos. A terbinafina, no entanto, atua mais precocemente, inibindo a síntese da enzima esqualeno epoxidase, havendo acúmulo do esqualeno, que é tóxico a células fúngicas, causando morte celular rápida. Os compostos azólicos impedem a transformação do lanosterol em ergosterol, alterando assim a permeabilidade da membrana celular, levando à morte celular mais lenta⁷⁸. Poder-se-ia pensar que o efeito da terbinafina seria detectado antes do efeito do itraconazol, quando utilizado nas mesmas condições. O diferente modo de ação dos dois medicamentos explicaria as diferenças entre as concentrações mínimas, inibitórias e fungicidas, da terbinafina em comparação com o itraconazol. *In vitro*, foi demonstrado que a terbinafina é capaz de causar morte de fungos na forma leveduriforme, em concentrações mais baixas que o itraconazol^{78,96}.

No conjunto, o resultado obtido, com as drogas utilizadas nesse modelo, não foram muito consistentes. Conhecendo-se a farmacocinética das duas drogas utilizadas, pode-se sugerir que as doses dos medicamentos não tenham sido suficientes para causar o efeito terapêutico desejado em camundongos. De maneira geral, ainda existem questionamentos quanto à farmacodinâmica e farmacocinética de algumas drogas antifúngicas, quando utilizadas em animais, tais como, qual a melhor via de administração, como é a absorção e qual a taxa de metabolização. O itraconazol, que em estudos pré-clínicos em animais, teve seu efeito comparado com várias drogas antifúngicas em infecções como a esporotricose, paracoccidiodomicose, cromomicose e coccidiodomicose, foi utilizado em doses que variaram de 10 a 200 mg/kg e apresentou eficácia variável contra diversos fungos^{53,54,55,59}. Por outro lado, a terbinafina utilizada no modelo da aspergilose pulmonar em ratos, mostrou inatividade devido à rápida metabolização nesses roedores, sugerindo que mais estudos devam ser feitos com

drogas antifúngicas em modelos animais, pois é difícil comparar os resultados obtidos com uma droga entre diferentes espécies animais⁶⁵.

No homem o itraconazol é bem absorvido quando administrado junto com a dieta, mas essa droga pode não ter sido bem absorvida por via oral no camundongo, quando administrada na ração. Os estudos experimentais que utilizam drogas lipossolúveis administram, em geral, os medicamentos por gavagem, após a diluição da droga em compostos orgânicos. Para saber se ocorre absorção, as drogas têm que ser dosadas no soro. O HPLC tem sido amplamente utilizado em estudos farmacológicos para dosagem plasmática e tecidual de diversas drogas. O nível mínimo de detecção do HPLC para o itraconazol é de cerca de 1 ng/ml e 2 ng/ml para a terbinafina^{97,98}. Na impossibilidade de utilizar o HPLC, pode-se realizar um ensaio microbiológico para dosagem plasmática de drogas. Esse método consiste em testar soros de animais ou seres humanos que receberam medicamentos antifúngicos, para ver se há níveis detectáveis da droga no soro. Os soros são testados em meios de cultura contendo uma cepa sensível ao medicamento que está sendo dosado. Se houve absorção, o medicamento presente no soro inibirá a multiplicação da cepa de fungo. Esse método não é tão específico e sensível quanto o HPLC, uma vez que metabólitos que apresentem atividade antifúngica podem ser também detectados no soro e os limites de detecção são maiores que do HPLC. O método microbiológico tem sido utilizado com cepas de *Trichophyton mentagrophytes*, com limite mínimo de detecção da terbinafina de 1µg/ml⁹⁹. Utilizando-se uma cepa de *C. albicans* detectou-se uma concentração plasmática mínima do itraconazol de 100 ng/ml¹⁰⁰. Em outro estudo, que utilizou uma cepa de *Candida pseudotropicalis*, o limite mínimo de detecção do itraconazol foi de 0,03 µg/ml⁵⁹.

No presente estudo, por não se dispor do método HPLC, utilizou-se uma cepa de *C. albicans* no ensaio microbiológico. O resultado negativo obtido nesse ensaio mostrou que esse método não foi capaz de detectar traços dos medicamentos no soro dos camundongos. Isso sugere ou que os medicamentos não foram absorvidos ou que a administração do medicamento na ração pode resultar em baixos níveis plasmáticos, uma vez que os animais não receberam a

dose total num único momento, e sim em várias subdoses durante o período de atividade dos roedores, quando eles se alimentavam. Ainda que essa dosagem tivesse sido realizada e se não fossem detectados níveis plasmáticos, isso não significaria que a droga foi absorvida ou não. Na hanseníase experimental, Shepard (1966), mesmo sem obter níveis plasmáticos da sulfona em camundongos inoculados, conseguiu detectar a ação da droga, evidenciada pela ausência de multiplicação do *M. leprae*. Em seu relato, doses diárias de sulfona de 10 µg/kg, incorporadas à ração comercial moída, foram suficientes para suprimir a multiplicação do *M. leprae* inoculado no coxim plantar de camundongos, porém, nessa concentração, o medicamento não atingiu níveis plasmáticos detectáveis por espectrofotometria¹⁰¹.

A composição bioquímica do *L. loboi* ainda não é bem conhecida. Apesar de pouco provável, é possível que ele apresente componentes estruturais incomuns a outros fungos, sendo necessário utilizar medicamentos com distintos mecanismos de ação diferentes do itraconazol e da terbinafina. Ou então é possível que o *L. loboi*, assim como outras células leveduriformes, sob condições de estresse, sofra alterações dos componentes da parede celular, β 1,6-glucana, β 1,3-glucana, quitina e proteínas. Mudanças de temperatura, efeitos de drogas ou mesmo fatores genéticos podem alterar a via para a biossíntese e montagem desses componentes da parede, garantindo assim a manutenção da integridade da célula fúngica e impedindo a ação de medicamentos^{102,103}. Esse mecanismo está envolvido no aparecimento de organismos resistentes a fármacos¹⁰⁴.

O fungo que deu origem ao inóculo utilizado nesse experimento pode ser proveniente de paciente que tenha sido submetido a tratamento prévio com os medicamentos utilizados e ter se tornado resistente. Estar-se-ia, então, lidando com uma cepa com resistência adquirida. A resistência, principalmente a compostos triazólicos, tem sido relatada em cepas de *Candida sp.* e *Cryptococcus sp.*¹⁰⁴. Essa seria mais uma hipótese para explicar o que foi observado no modelo que foi testado, cujo mecanismo foi mencionado acima.

Pela análise dos resultados, não foi possível observar uma atividade nítida dos fármacos utilizados no modelo experimental, mas um fato que não pode ser

desprezado é a ação demonstrada pela terbinafina sobre o *L. loboi*, evidenciada pelo baixo índice de viabilidade observado no grupo tratado com esta droga, frente ao grupo controle, sugerindo a possibilidade de algum efeito terapêutico. De tudo que foi discutido, depreende-se a necessidade de se levar em conta todas as variáveis envolvidas na experimentação de drogas em animais, procurando-se, por exemplo, utilizar métodos mais precisos para dosagens plasmáticas e teciduais delas. Só assim conseguir-se-á resultados mais consistentes na busca de um medicamento para a doença de Jorge Lobo. De qualquer modo, o modelo animal que foi utilizado demonstrou ter um papel garantido no futuro desse tipo de estudo.

6. CONCLUSÕES

Os resultados desse primeiro estudo experimental com a terapêutica da doença de Jorge Lobo permitiram concluir que:

1. O camundongo BALB/c, infectado pelo *L. loboi*, é um modelo apropriado para ensaios terapêuticos contra a doença de Jorge Lobo.

2. O índice de viabilidade permitiu avaliar o efeito terapêutico das drogas testadas, o que não foi possível pelo aparecimento de lesões macroscópicas e contagem do número de fungos.

3. A diferença dos índices de viabilidade entre os grupos tratados e o controle sugere que houve efeito terapêutico da terbinafina na infecção experimental pelo *L. loboi*.

Seria muito útil consolidar os resultados terapêuticos nesse modelo animal, para que os medicamentos testados pudessem ser empregados no tratamento dos pacientes com essa doença que causa tanto dano a uma parcela importante de indivíduos na região norte do Brasil.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Lobo J. Um caso de blastomicose produzido por uma espécie nova encontrada em Recife. Rev Med Pernamb 1931; 1: 763-75.
- 2 Fialho AS. Blastomicose tipo “Jorge Lobo”. Rev Assoc Med Argent 1938; 52: 299-306.
- 3 Fonseca-Filho O, Arêa Leão AE. Contribuição para o conhecimento das granulomatoses blastomycoides. O agente etiológico da doença de Jorge Lobo. Rev Med Cir Bras 1940; 48: 147-58.
- 4 Kwon-Chung, KJ, Bennet, JE, editors. Medical Mycology. Philadelphia: Lea & Fabiger, 1992.
- 5 Burns RA, Roy JS, Woods C, Padhye AA, Warnock DW. Report of the first human case of lobomycosis in the United States. J Clin Microbiol 2000; 38: 1283-5.
- 6 Symmers WSC. A possible case of Lobo’s disease acquired in Europe from a bottle-nosed dolphin (*Tursiops runcaus*). Bull Soc Pathol Exot 1983; 76: 777-84.
- 7 Pradinaud R, Talhari S. Lobomycose. In: Encyclopédie Médico-Chirurgicale: Maladies infectieuses. Paris: sn; 1996. 8608 A10, 5p.
- 8 Opromolla DVA, Belone AFF, Taborda PRO, Taborda VBA. Correlação clínico-patológica em 40 casos novos de lobomicose. An Bras Dermatol 2000; 75: 425-34.

Referências Bibliográficas

- 9 Lacaz CS, Baruzzi RG, Rosa MCB. Doença de Jorge Lobo. São Paulo: USP-IPSIS; 1986.
- 10 Marcos EVC. Doença de Jorge Lobo e sua relação com os antígenos do sistema HLA. [Dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2001.
- 11 Migaki G, Valerio MG, Irvine B, Garner FM. Lobo's Disease in an Atlantic Bottle-Nosed Dolphin. J Am Vet Med Assoc 1971; 159: 578-582.
- 12 Woodard JC. Electron microscopic study of lobomycosis (*Loboa lobi*). Lab Invest 1972; 27: 606-12.
- 13 Caldwell DK, Caldwell MC, Woodard JC, Ajello L, Kaplan W, McClure HM. Lobomycosis as a disease of the Atlantic Bottle-Nosed dolphin (*Tursiops truncatus* Montagu, 1821). Am J Trop Med Hyg 1975; 24: 105-14.
- 14 Heel WHD. Successful treatment in a case of lobomycosis (Lobo's disease) in *Tursiops truncatus* (Mont.) at the Dolphinarium, Harderwijk. Aquat Mammals 1977; 5: 8-15.
- 15 Bossart GD. Suspected acquired immunodeficiency in an Atlantic Bottlenosed dolphin with chronic-active hepatitis and lobomycosis. J Am Vet Med Assoc 1984; 185: 1413-4.
- 16 De Vries GA, Laarman JJ. A case of Lobo's disease in the dolphin *Sotalia guianensis*. J Aquat Mammals 1973; 1: 26-33.

Referências Bibliográficas

- 17 Almeida FP, Lacaz CS. Blastomicose “tipo Jorge Lobo”. An Fac Med S Paulo 1949; 24: 5-37.
- 18 Ciferri R, Azevedo PC, Campos S, Carneiro LS. Taxonomy of Jorge Lobo's disease fungus. Publ Inst Micol Univ Recife 1956; 53.
- 19 Lacaz CS. Doença de Jorge Lobo (Lobo's Disease). Rev Iberoamer Micol 1994; 13: 107-13.
- 20 Taborda PR, Taborda VA, McGinnis MR. *Lacazia loboi* gen. nov., comb. nov., the etiologic agent of lobomycosis. J Clin Microbiol 1999; 37: 2031-3.
- 21 Herr RA, Tarcha EJ, Taborda PR, Taylor JW, Ajello L, Mendoza L. Phylogenetic analysis of *Lacazia loboi* places this previously uncharacterized pathogen within the dimorphic Onygenales. J Clin Microbiol 2001; 39: 309-14.
- 22 Lobo J. Contribuição ao estudo das blastomicoses. An Bras Dermatol Siphilol 1933; 8: 43-57.
- 23 Nery-Guimarães F, Macedo DG. Contribuição ao estudo das blastomicoses na Amazônia (blastomicose queloidiana e blastomicose sul-americana). Hospital 1950; 38: 223-53.
- 24 Wiersema JP. Lobo's disease (keloidal blastomycosis). In: Baker RD, editor. The pathologic anatomy of mycoses. Human infection with fungi, actinomycetes and algae. Berlin: Springer Verlag; 1971. p. 577-88.

Referências Bibliográficas

- 25 Sampaio MM. A note on the cultivation of the aetiological agent of Jorge Lobo's disease in 199 T.C. medium containing phytohaemagglutinin. Preliminary report. Rev Inst Med Trop S Paulo 1974; 16: 121-2.
- 26 Silva D. Estudo experimental da micose de Lobo. An Bras Dermatol 1994; 69: 88-91.
- 27 Vilani-Moreno FR, Opromolla DVA. Determinação da viabilidade do *Paracoccidioides lobo* em biópsias de pacientes portadores de doença de Jorge Lobo. An Bras Dermatol 1997; 72: 433-7.
- 28 Vilani-Moreno FR, Opromolla DVA, Belone AFF, Rosa PS, Madeira S. Evaluation of the vital staining method for *Lacazia lobo* through experimental inoculation of BALB/c mice. Med Mycol. in press 2002.
- 29 Madeira S, Opromolla DVA, Belone AFF. *Paracoccidioides lobo* inoculation in BALB/c mice. Rev Inst Med Trop S Paulo 2000; 42: 239-43.
- 30 Opromolla DVA, Vilani-Moreno FR, Belone AFF. A doença de Jorge Lobo e a coloração pela prata metenamina. An Bras Dermatol 1999; 74: 345-9.
- 31 Chandler FW, Kaplan W, Ajello L. Color atlas and text of the histopathology of mycotic diseases. 1st ed. Chicago: Year Book Medical Publishers, 1980.
- 32 Sesso A, Baruzzi RG. Interaction between macrophage and parasite cells in lobomycosis. The thickened cell wall of *Paracoccidioides*

Referências Bibliográficas

- loboi* exhibits apertures to the extracellular milieu. J Submicrosc Cytol Pathol 1988; 20: 537-48.
- 33 Leite JM. Doença de Jorge Lobo. Contribuição ao seu estudo anátomo-patológico. [tese]. Belém: Faculdade de Medicina e Cirurgia do Pará; 1954.
- 34 Rodriguez-Toro G. Lobomycosis. Int J Dermatol 1993; 32: 324-32.
- 35 Baruzzi RG, Azevedo RA. Doença de Jorge Lobo. In: Meira DA. Clínica de doenças tropicais e infecciosas. Rio de Janeiro: Interlivros, 1991; p. 299-306.
- 36 Silverie R, Ravisse P, Villar JP, Moulins C. La blastomycose chéloidienne ou maladie de Jorge Lobo en Guyane Française. Bull Soc Path Exot 1963; 56: 29-35.
- 37 Destombes P, Ravisse P. Étude histologique de 2 cas guyanais de blastomycose chéloidienne (maladie de J. Lobo). Bull Soc Pathol Exot 1964; 57: 1018-24.
- 38 Dias LB, Sampaio MM, Silva D. Jorge Lobo's disease. Observations on its epidemiology and some unusual morphological forms of the fungus. Rev Inst Med Trop S Paulo 1970; 12: 8-15.
- 39 Azulay RD, Carneiro JA, Cunha MGS, Reis LT. Keloidal blastomycosis (Lobo's disease) with lymphatic involvement: a case report. Int J Dermatol 1976; 15: 40-2.

Referências Bibliográficas

- 40 Trejos A, Romero A. Contribuição ao estudo das blastomicoses em Costa Rica. In: Resumos do 5º Congresso Internacional de Microbiologia; 1950; Rio de Janeiro.
- 41 Monteiro EVL. Experimental behaviour of the etiologic agents of South American blastomycosis and keloid blastomycosis in the chick embryo. *Sabouraudia* 1962; 2: 12-13.
- 42 Sampaio MM, Dias LB, Scaff L. Bizarre forms of the aetiologic agent in experimental Jorge Lobo's disease in tortoises. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1971; 13: 191-3.
- 43 Sampaio MM, Dias LB. The armadillo *Euphractus sexcintus* as a suitable animal for experimental studies of Jorge Lobo's disease. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1977; 19: 215-20.
- 44 Cerruti H, Zamith VA. Doença de Jorge Lobo. (Comunicação à Sociedade Paulista de Medicina em 1948).
- 45 Campo-Aasen I. Blastomycosis queloidiana o enfermedad de Jorge Lobo en Venezuela. *Derm Venez* 1958; 1: 215-40.
- 46 Nery-Guimarães F. Inoculações em hamsters da blastomicose sul-americana (doença de Lutz), da blastomicose queloidiforme (doença de Lobo) e da blastomicose dos índios do Tapajós-Xingu. *Hospital* 1964; 66: 27-39.
- 47 Azulay RD, Carneiro JA, Andrade LC. Blastomicose de Jorge Lobo. Contribuição ao estudo da etiologia, inoculação experimental, imunologia e patologia da doença. *An Bras Dermatol* 1970; 45: 47-66.

Referências Bibliográficas

- 48 Wiersema JP, Niemel PL. Lobo's disease in Surinam patients. *Trop Geogr Med* 1965; 17: 89-111.
- 49 Azulay RD, Andrade LC, Silva D, Carneiro J. Reprodução experimental da blastomicose de Jorge Lobo. *An Bras Dermatol* 1968; 43: 261-266.
- 50 Sampaio MM, Dias LB. Experimental infection of Jorge Lobo's disease in the cheek-pouch of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1970; 12: 115-20.
- 51 Opromolla DVA, Nogueira MES. Inoculation of *Paracoccidioides lobo* into the subcutaneous tissue of the hamster cheek pouch. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2000; 42: 119-23.
- 52 Opromolla DVA, Madeira S, Belone AFF, Vilani-Moreno FR. Jorge Lobo's disease: experimental inoculation in Swiss mice. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1999; 41: 359-64.
- 53 Defaveri J, Graybill JR. Treatment of chronic murine chromoblastomycosis with the triazole SCH39304. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 42: 601-6.
- 54 Kan VL, Bennet JE. Efficacies of four antifungal agents in experimental murine sporotrichosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 1619-23.
- 55 Pappagianis D, Zimmer BL, Theodoropoulos G, Plempel M, Hector RF. Therapeutic effect of the triazol Bay R 3783 in a mouse

Referências Bibliográficas

- model of coccidioidomycosis, blastomycosis and histoplasmosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 1132-38.
- 56 Denning DW, Hall L, Jackson M, Hollis S. Efficacy of D0870 compared with those of itraconazole and amphotericin B in two murine models of invasive aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1809-14.
- 57 De Doncker P. Itraconazol and terbinafine in perspective: from Petri dish to patient. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1999; 12(suppl 1): S10-7.
- 58 Mieth H, Leitner I, Meingassner JG. The efficacy of orally applied terbinafine, itraconazol and fluconazole in models of experimental trichophytosis. *J Med Vet Mycol* 1994; 32: 181-88.
- 59 McEwen JG, Peters GR, Blaschke TF, Brummer E, Perlman AM, Restrepo A, Stevens DA. Treatment of paracoccidioidomycosis with itraconazol in a murine model. *J Trop Med Hyg* 1985; 88: 295-299.
- 60 Van't Wout JW, Mattie H, Furth RV. Comparison of the efficacies of amphotericin B, fluconazole, and itraconazole against a systemic *Candida Albicans* infection in normal and neutropenic mice. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 147-151.
- 61 Sorensen KN, Sobel RA, Clemons KV, Pappagianis D, Stevens DA, Willians PL. Comparison of fluconazol and itraconazol in a rabbit model of coccidioidal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1512-17.

Referências Bibliográficas

- 62 Hostetler JS, Hanson LH, Stevens DA. Effect of cyclodextrin on the pharmacology of antifungal oral azoles. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 477-80.
- 63 Goldberg J, Connolly P, Bick CS, Durkin M, Kholer S., Smedema M, Brizendine E, Hector R, Wheat J. Comparison of nikkomycin Z with amphotericin B and itraconazol for treatment of histoplasmosis in a murine model. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1624-29.
- 64 Clemons KV, Martinez M, Calderon L, Stevens DA. Efficacy of ravuconazol in treatment of systemic murine histoplasmosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 922-4.
- 65 Schmitt HJ, Andrade J, Edwards F, Niki Y, Bernard E, Amstrong D. Inactivity of terbinafine in a rat model of pulmonary aspergillosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; 9: 832-35.
- 66 Allendoerfer R, Loebenberg D, Rinaldi MG, Graybill JR. Evaluation of SCH51048 in an experimental model of pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1345-48.
- 67 Contini C, Marzola A, Cultrera R, Colombo D. potential use of terbinafine in the treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Rev Contemp Pharmacother* 1997; 8: 363-372.
- 68 Reyes O, Goihman M, Goldstein C. Blastomycosis queloidiana o enfermedad de Jorge Lobo. *Dermatol Venez* 1960; 2: 245-55.
- 69 Sande MA, Mandell GL. Agentes antimicrobianos. Agentes antimicóticos y antivirales. In: Gilman AG, editor. *Las Bases*

Referências Bibliográficas

- Farmacológicas de la Terapéutica. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana; 1986. p. 1160-78.
- 70 Londoño F. Blastomicose queloidiana. A propósito de um caso tratado com anfotericina B. *Med Cutânea* 1968; 2: 521-24.
- 71 Bennett JE. Fármacos Antimicrobianos (continuação): Fármacos Antifúngicos. In: Goodman LS, Gilman AG, editors. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. México: McGraw-Hill; 1996. p 864-75.
- 72 Silva D. Traitement de la maladie de Jorge Lobo par la clofazimine (B663). *Bull Soc Path Exot* 1978; 71: 409-12.
- 73 Talhari S, Cunha MGS, Barros MLB, Gadelha AR. Doença de Jorge Lobo. Estudo de 22 casos novos. *Med Cutan Ibero Lat Am* 1981; 9: 87-96.
- 74 Katz HI. Systemic antifungal agents used to treat onychomycosis. *J Am Acad Dermatol* 1998; 38: S48-52.
- 75 Neto VA, Lopes HV, Baldy JLS, Levi GC, Mendonça JS. *Antibióticos na Prática*. São Paulo: Roca, 2000.
- 76 Heykants J, Van Peer A, Van De Velde V, Van Rooy P, Meuldermans W, Lavrijsen K, Woestenborghs R, Van Cutsem J, Cauwenbergh G. The clinical pharmacokinetics of itraconazol: An overview. *Mycoses* 1989; 32(suppl. 1): 67-87.

Referências Bibliográficas

- 77 Yoo SD, Kang E, Jun H, Shin BS, Lee KC, Lee KH. Absorption, first-pass metabolism and disposition of itraconazol in rats. *Chem Pharm Bull* 2000; 48: 798-801.
- 78 Leyden J. Pharmacokinetics and pharmacology of terbinafine and itraconazol. *J Am Acad Dermatol* 1998; 38: S41-7.
- 79 Cucê LC, Wroclawski EL, Sampaio SAP. Treatment of paracoccidioidomycosis, candidosis, chromomycosis, lobomycosis and mycetoma with ketoconazole. *Int J Derm* 1980; 19: 405-8.
- 80 Heel RC. Subcutaneous mycoses. In: Levine HB. *Ketoconazole in the management of fungal diseases*. New York: Adis Press, 1982. p. 136-40.
- 81 Baruzzi RG, Marcopito LF, Pascalicchio FV. Emprego do ketoconazole no tratamento da doença de Jorge Lobo. In: *Resumos do 16º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*; 1980; Natal. nº 350.
- 82 Lawrence DN, Ajello L. Lobomycosis in Western Brazil: report of a clinical trial with ketoconazole. *Am J Trop Med Hyg* 1986; 35: 162-66.
- 83 Opromolla DVA. Experimentação terapêutica com o itraconazol na lobomicose. In: *Resumos do 51º Congresso Brasileiro de Dermatologia*; 1996; Recife, Pernambuco.
- 84 Opromolla DVA. Estudos terapêuticos na doença de Jorge Lobo. In: *Resumos do 55º Congresso Brasileiro de Dermatologia*; 2000; Salvador, Bahia.

- 85 Fischer M, Chrusciak-Talhari A, Reinel D, Talhari S. Successful treatment with clofazimine and itraconazol in a 4 year old patient after 32 years duration of disease. *Hautarzt* 2002; 53: 677-81.
- 86 Finlay AY. Global overview of Lamisil®. *Br J Dermatol* 1994; 130(suppl 43): 1-3.
- 87 Ryder NS. Activity of terbinafine against serious fungal pathogens. *Mycoses* 1999; 42(suppl 2): 115-19.
- 88 Jessup CJ, Ryder NS, Ghannoum MA. An evaluation of the in vitro activity of terbinafine. *Med Mycol* 2000; 38: 155-59.
- 89 Gupta AK, Shear NH. Terbinafine: An update. *J Am Acad Dermatol* 1997; 37: 979-88.
- 90 Hastings RC, Morales MJ. Observações, cálculos e especulações sobre o crescimento e morte do *Mycobacterium leprae* in vivo. *An Bras Dermatol* 1988; 63(supl. 1): 270-283.
- 91 Shepard CC. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot-pads of mice. *J Exp Med* 1960; 112: 445- 54.
- 92 Pettit JHS, Rees RJW. Sulphone resistance in leprosy. An experimental and clinical study. *Lancet* 1964; 2: 673-4.
- 93 Shepard CC. A kinetic method for the study of activity of drugs against *Mycobacterium leprae* in mice. *Int J Lepr* 1967; 35: 429-435.

Referências Bibliográficas

- 94 Calich VLG, Purchio A, Paula CR. A new fluorescent viability test for fungi cells. *Mycopathologia* 1978; 66: 175-7.
- 95 Norman GR, Streiner DL. *Biostatistics: the bare essentials*. St Louis: Mosby Year Book; 1994.
- 96 Hazen KC. Fungicidal versus fungistatic activity of terbinafine and itraconazol: An in vitro comparison. *J Am Acad Dermatol* 1988; 38: S37-41.
- 97 Denoüel J, Keller HP, Schaub P, Delaborde C, Humbert H. Determination of terbinafine and its desmethyl metabolite in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1995; 663: 353-59.
- 98 Woestenborghs R, Lorreyne W, Heykants J. Determination of itraconazol in plasma and animal tissues by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1987; 413: 332-37.
- 99 Kan VL, Henderson DK, Bennet JE. Bioassay for SF 86-327, a New Antifungal Agent. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 30: 628-29.
- 100 Warnock DW, Turner A, Burke J. Comparison of high performance liquid chromatographic and microbiological methods for determination of itraconazol. *J Antimicrob Chemother* 1988; 21: 93-100.

Referências Bibliográficas

- 101 Shepard CC, McRae DH, Habas JA. Sensitivity of *Mycobacterium leprae* to Low Levels of 4,4'-Diaminodiphenyl Sulfone.* (31282). Proc Soc Exp Biol Med 1966; 122: 893-96.
- 102 Nobel H, Ende H, Klis FM. Cell wall maintenance in fungi. Trends Microbiol 2000; 8: 344-45.
- 103 Popolo L, Gualtieri T, Ragni E. The yeast cell-wall salvage pathway. Med Mycol 2001; 39(suppl 1): 111-21.
- 104 Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. Lancet Infect Dis 2002; 2: 73-85.

8. ABSTRACT

The objective of the present study was to test the murine model, the BALB/c mice inoculated with the *Lacazia loboi*, for its use in therapeutic essays, using the viability index of the fungi, the number of fungi, the histopathological examination and the appearance of microscopic lesions, as evaluation parameters at different times post-treatment. Itraconazol, terbinafine and terbinafine formulated with β -cyclodextrin, were the antifungal medications tested.

One hundred twenty eight BALB/c mice were intradermally inoculated with *L. loboi*, into both hind foot pads. The animals were divided in four groups of 32 animals. Treatment was started 45 days post-inoculation and lasted 13 months. The medications were administered orally, mixed to the powdered commercial feed. The itraconazol was used at the dose of 4 mg/kg and the terbinafine at 5 mg/kg. Eight animals of each group were randomly sacrificed at four, seven, ten and fifteen months after inoculation. At each time, both foot pads were clinically evaluated for development of macroscopic lesions and then excised for histopathological examination, viability index determination and fungal count.

All groups showed a progressive increase in the number of fungi throughout the experiment, which suggests fungal multiplication in the foot pads. Despite there hasn't been statistical difference among the groups, the lowest number of fungi were found in the groups treated with terbinafine and itraconazol. In regard to the viability index, ten months after inoculation, a significant difference was found ($P < 0.05$) between the group treated with terbinafine compared to the control. The same did not happen to the group treated with itraconazol. All groups started to show macroscopic alterations after seven months of inoculation. The number of animal which develop lesions did not vary between control and treated mice. The histopathological examination showed a granulomatous infiltrate constituted predominantly by histiocytes and giant cells containing a large number of fungi, many of them with characteristics of non-viable fungal cells. It was not possible to distinguish between treated and non-treated animals using the histopathological aspect of the lesions.

A clear action of the medications used in this mouse model could not be observed, except for the effect shown by terbinafine over the *L. loboi*, demonstrated by the low viability index obtained in the group treated with this drug compared to the control.

Several factors may explain such results, the characteristics of the drugs, its pharmacokinetics, the doses utilized, the route of administration, the biochemical structure of the fungus, or even factor inherent to the mouse model. Nevertheless, the BALB/c showed to be suitable model for future studies in this field.