



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE MEDICINA**

**Lariza Maza**

**Comparação da eficácia de dose diária do cotrimoxazol,  
administrada uma ou duas vezes, no tratamento da  
Paracoccidiodomicose murina.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Souza Cavalcante

**Botucatu**

**Janeiro de 2018**

Lariza Maza

Comparação da eficácia de dose diária do cotrimoxazol,  
administrada uma ou duas vezes, no tratamento da  
Paracoccidioidomicose murina

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina, Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de  
Botucatu, para obtenção do título de  
Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Dr. Ricardo de Souza Cavalcante

Botucatu  
Janeiro de 2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Maza, Lariza.

Comparação da eficácia de dose diária do cotrimoxazol, administrada uma ou duas vezes, no tratamento da Paracoccidioidomicose murina / Lariza Maza. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Ricardo de Souza Cavalcante

Capes: 21200009

1. Paracoccidioidomicose - Tratamento. 2. Combinação trimetoprima e sulfametoxazol. 3. Esquema de medicação.

Palavras-chave: Cotrimoxazol; Esquema de medicação; Paracoccidioidomicose.

*“Sou como você me vê. Posso ser leve como uma brisa, ou forte como uma ventania, depende de quando e como você me vê passar.”*

*Clarice Lispector*

# *DEDICATÓRIA*



*Aos meus pais Vera Lucia Correa Pinto Maza e Pedro Maza, que por meio da Luta e Dedicção, foram responsáveis por todas as conquistas e sempre me ensinaram a respeitar as pessoas, ser humilde e ter honestidade.*

*Ao meu irmão Renilson Henrique Maza (Tcheco), que sempre me apoiou em todas as etapas da minha vida. Obrigada por sempre ser um irmão companheiro, amigo e tão divertido.*

*Ao meu querido noivo (quase esposo!!!!) Willian Nunes, que sempre foi meu companheiro, amigo em todos os momentos. Só tenho a agradecer pela paciência, dedicação, conselhos, carinho, risados, choros, lamentos e muito amor.*

*A Deus que deu a oportunidade para o Willian e eu de viver novamente, após um acidente e nos mostrou o verdadeiro sentido da vida.*

# *AGRADECIMENTOS*



*Ao meu orientador Dr. Ricardo de Souza Cavalcante, por toda a ajuda, paciência, conselhos e confiança depositada em mim. Sua contribuição foi e sempre será muito importante, para o meu crescimento pessoal e profissional.*

*Ao Prof. Dr. Rinaldo Poncio Mendes "Dr Tietê", que é um homen muito sábio e muito preocupado com seus alunos. Só tenho a agradecer por todos os conselhos. Muito obrigada por tudo.*

*A Prof Dra. Julhiany de Fátima da Silva, que apareceu em minha vida, no momento em que eu mais precisava, passando todos os seus conhecimentos, experiências. Jamais me deixou na mão, e foi essencial para o término desse projeto. Muito obrigada Ju, por toda a sua ajuda.*

*Aos meus queridos amigos e companheiros do Laboratório de Doenças Tropicais, Beatriz, Camila, Tatiane, Adrielle, Vanessa, Priscila, Jéssica, Thayza, Luiz (Pinguim), Patricia, Fran, Mariana Gatto, Carol, Matheus, Nayore, Guilherme, Talita, Prof Rodrigo e a Dra Sueli Calvin (in memória), por todos os favores, risos, choros, alegrias, apoio e por sempre torcerem por mim a cada conquista. Com vocês tudo fica mais fácil!!!!*

*Aos meus amigos Carlos Roberto Gonçalves (Carlinhos), (Bardela), (PC), (RÔ), por me ensinarem a confiar em mim mesma e mostrar que eu era capaz de fazer tudo o que eu quisesse. Obrigada pela cobrança, conselhos, paciência e muitas risadas. Vocês foram fundamentais para o meu crescimento.*

*A todos do Laboratório do Lip (Unesp- Bauru), Babi, Amanda, Angela, Débora e Prof Dr. James, pela ajuda, paciência, por sempre me ajudarem todas as vezes que eu precisei (e não foram poucas!!!!) Muito*

*obrigada, adoro vocês!*

*Aos amigos que a vida me deu durante a minha trajetória, Flávia, Camila, Daniele, Viviane, aos Prof. Fatima, Michele e Rejane que me apoiaram a prestar a seleção do aprimoramento, que a partir desse passo me fez chegar onde eu estou hoje.*

*A minha família linda, Cristiane, Davi, Sonia e Valdir, que me ajudaram em todas as etapas e conquistas.*

*Aos funcionários da Unipex, Sueli, Marta, Lucas, Leandro, Diego, Florian (in memoria) e todos que me ajudaram de uma maneira especial. Muito obrigada.*

*Ao Prof Alexandre e Patricia, que foram muito atenciosos e fundamentais para o meu trabalho. Muito obrigada.*

*Aos funcionários da biblioteca pela atenção, dedicação e por sempre estarem prontas a ajudar.*

*Aos funcionários da seção da pós-graduação, aos Professores que foram muito importantes e essenciais para o nosso crescimento e atenção a nós dedicada.*

## RESUMO

**Introdução.** A Paracoccidioidomicose (PCM) é micose sistêmica causada por fungos termodimórficos do gênero *Paracoccidioides*. A associação sulfametoxazol-trimetoprim, também denominada cotrimoxazol (CMX), é uma das principais opções terapêuticas. No atual tratamento da PCM, o CMX é utilizado na dose de 2400 mg de sulfametoxazol, o que corresponde a seis comprimidos, divididos em duas tomadas diárias, fato que tem levado a menor adesão do paciente à terapia antifúngica. Estudos experimentais têm observado que a dose única diária pode ser suficiente para tratar a PCM. **Objetivo.** Este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia do tratamento da PCM murina com CMX administrado em uma e duas doses diárias. **Material e métodos.** Utilizou-se camundongos machos, isogênicos da linhagem Balb/c e o isolado Pb 326, orinado de uma paciente atendida no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu em 2012 com a forma aguda e subaguda. Este estudo apresentou três experimentos. No experimento I, 100 animais foram sorteados em 4 grupos: controle saudável (G1), controle infectado (G2) e os grupos infectados que receberam CMX uma vez (G3) e duas vezes ao dia (G4). Após 28 dias da infecção, iniciou-se o tratamento, com avaliação da recuperação fúngica em pulmão e baço, exame histopatológico dos pulmões e pesquisa de anticorpos séricos específicos anti *P. brasiliensis*, pela imunodifusão dupla em gel de ágar (IDD) nas semanas 8, 12, 16 e 20 após a infecção. No experimento II, os mesmos animais foram avaliados quanto a sobrevida cumulativa em 140 dias. No experimento III, 40 camundongos infectados e tratados por 10 dias com dose única diária e com duas tomadas ao dia foram avaliados quanto ao perfil sérico de sulfametoxazol em quatro medidas durante o dia e foi determinado a concentração inibitória mínima deste isolado utilizado no estudo. Os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney foram utilizados para comparação de medianas, regressão linear para analisar os parâmetros nos sucessivos momentos de sacrifício e Kaplan-Meier para a avaliação de sobrevida. Foi considerado significativo os valores de p menores que 0,05. **Resultados.** Os dois grupos tratados com CMX (G3 e G4) apresentaram resposta ao tratamento, caracterizada pela melhora do aspecto e do comportamento do animal, queda dos níveis de anticorpos séricos pela IDD (G3:  $p=0,005$ ; G4:  $p=0,01$ ), redução da carga fúngica pulmonar, analisada pelo exame histopatológico, na 16ª e 20ª semanas comparadas com a 8ª e 12ª ( $p<0,01$ ) e menor porcentagem de fibras colágenas por área peribronquiolar na 20ª semana comparados com a 12ª semana ( $p<0,05$ ). Não houve diferença na recuperação fúngica em pulmões e baço, na carga fúngica contada pelo exame histopatológico de pulmão e nem na porcentagem de fibra colágena por área peribronquiolar entre G3 e G4 nas semanas 8, 12, 16 e 20. No entanto, os níveis de IDD tenderam a ser mais baixos no G4 do que no G3

na 8ª semana de tratamento (1:4 vs 1:16,  $p = 0,08$ ). O grupo G4 apresentou menor recuperação fúngica dos pulmões na 8ª e 12ª semanas e no baço nas semanas 16 e 20 quando comparado ao controle infectado.

Não houve diferença na mortalidade cumulativa entre G3 e G4 (0,0% vs 4,0%). **Conclusões.** Esses achados demonstram eficácia em ambos os esquemas de tratamento da PCM murina com CMX. Embora não se observou diferenças diretas entre os dois esquemas de tratamento com CMX, o grupo que recebeu duas doses ao dia apresentou maior resposta quando comparado com o controle infectado, fato que não ocorreu com o grupo tratado com dose única diária. Isto sugere que diferenças podem existir entre os dois esquemas e que estudo futuros são necessários para se conhecer melhor a eficácia destes esquemas terapêuticos.

**Palavras-chave:** paracoccidioidomicose, cotrimoxazol, esquema de medicação

## Abstract

**Introduction.** Paracoccidioidomycosis (PCM) is systemic mycosis caused by thermomorphogenic fungi of the genus *Paracoccidioides*. The association of sulfamethoxazole-trimethoprim, also called cotrimoxazole (CMX), is one of the main therapeutic options. In the current treatment of PCM, CMX is used in the dose of 2,400 mg of sulfamethoxazole, which corresponds to six tablets divided into two daily doses, a fact that has led to the patient's lesser adherence to antifungal therapy. Experimental studies have observed that the single daily dose may be sufficient to treat PCM. **Goal.** This study aimed to evaluate the efficacy of murine PCM treatment with CMX administered in one and two daily doses. **Material and methods.** Male, isogenic mice of the Balb / c gem line and Pb 326 isolate were collected from a patient attended at the Hospital das Clínicas of the Faculty of Medicine of Botucatu in 2012 with the acute and subacute form. This study presented three experiments. In the experiment I, 100 animals were randomly assigned to 4 groups: healthy control (G1), infected control (G2) and infected groups receiving CMX once (G3) and twice daily (G4). After 28 days of infection, treatment with the evaluation of fungal recovery in the lung and spleen, histopathological examination of the lungs and the detection of specific serum antibodies to *P. brasiliensis* by double agar gel immunodiffusion (IDD) in the weeks 8, 12, 16 and 20 after infection. In Experiment II, the same animals were evaluated for cumulative survival at 140 days. In Experiment III, 40 mice infected and treated for 10 days with single daily dose and with two intakes per day were evaluated for the serum sulfamethoxazole profile in four measures during the day and the minimum inbred concentration of this isolate used in the study. The Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were used for comparison of medians, linear regression to analyze the parameters in the successive moments of sacrifice and Kaplan-Meier for the evaluation of survival. P value of less than 0.05 was considered significant. **Results.** The two groups treated with CMX (G3 and G4) presented a response to treatment, characterized by an improvement in the appearance and behavior of the animal, a decrease in serum antibody levels by IDD (G3:  $p = 0.005$ , G4:  $p = 0.01$ ), reduction of lung fungal load, analyzed by histopathological examination, at the 16th and 20th week periods compared with the 8th and 12th days ( $p < 0.01$ ), and a lower percentage of collagen fibers by peribronchiolar area at week 20 compared to at week 12 ( $p < 0.05$ ). There was no difference in fungal recovery in the lungs and spleen, in the fungal load counted by histopathological examination of the lung, nor in the percentage of collagen fiber per peri-brachial area between G3 and G4 at weeks 8, 12, 16 and 20. However, levels of IDD tended to be lower in G4 than in G3 at week 8 of treatment (1: 4 vs. 1:16,  $p = 0.08$ ). The G4 group presented lower fungal recovery of the lungs at the 8th and 12th weeks and in the spleen at weeks 16 and 20 when compared to the infected control.

There was no difference in cumulative mortality between G3 and G4 (0.0% vs 4.0%). Conclusions. These findings demonstrate efficacy in both murine PCM treatment regimens with CMX. Although there were no direct differences between the two treatment regimens with CMX, the group receiving two doses per day presented a higher response when compared to the infected control, a fact that did not occur with the single daily dose group. This suggests that differences may exist between the two schemes and that future studies are needed to better understand the efficacy of these therapeutic regimens

**Key words:** paracoccidioidomycosis, cotrimoxazole, medication regimen

# *SUMÁRIO*



## Sumário

<b>I) INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. Aspectos gerais da Paracoccidiodomicose.....	1
1.2. Tratamento da PCM Experimental com Cotrimoxazol.....	5
1.3. Justificativa do Estudo.....	7
<b>1.4 Objetivos.....</b>	<b>9</b>
1.4.1. Objetivo geral.....	9
1.4.2. Objetivos específicos.....	9
<b>2) Referências bibliográficas.....</b>	<b>10</b>
<b>II) Capítulo II</b>	
Comparação da eficácia de dose diária do cotrimoxazol, administrada uma ou duas vezes, no tratamento da Paracoccidiodomicose murina.....	<b>15</b>
1. Introdução.....	15
2. Material e Métodos.....	15
3. Resultados.....	22
4. Discussão.....	34
5. Referências bibliográficas.....	40

*Capítulo I*  
*Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Aspectos gerais da paracoccidioidomicose

Paracoccidioidomicose (PCM) é micose de natureza sistêmica, causada por fungos termodimórficos do complexo *Paracoccidioides brasiliensis*, pelo *Paracoccidioides lutzii*, anteriormente identificada como Pb01 e por fungos Pb01-like. <sup>(1)</sup> Confinada à América Latina, é endêmica em área que se estende do México à Argentina. <sup>(2)</sup> Apesar de incompletos, os dados indicam maior incidência dessa micose no Brasil, onde é diagnosticada, com grande frequência, no estado de São Paulo. <sup>(3)</sup>

Foi descrita pela primeira vez por Adolpho Lutz, <sup>(4)</sup> em 1908, que encontrou, em lesões bucais de dois pacientes de São Paulo, fungos esféricos com morfologia diferente da revelada pelo *Coccidioides immitis*. As principais manifestações clínicas dos pacientes incluíam amolecimento dos dentes e comprometimento de mucosa oral, laringe, linfonodos, glândula salivar e traqueia. Lutz registrou que o exame histopatológico daqueles pacientes revelava reação tuberculoide com fungos, células gigantes, células epitelióides e fungos com exoesporulação. Ele também isolou o fungo em cultivo, demonstrou a existência das fases micelial em cultivo à temperatura ambiente e leveduriforme em pacientes infectados, reproduzindo a doença em cobaios.

Essa micose foi inicialmente denominada Blastomicose Sul-Americana (BSA) ou Doença de Lutz, Splendore e Almeida. <sup>(5)</sup> No entanto, a oficialização do termo paracoccidioidomicose se deu em 1972, no *First Pan American Symposium on Paracoccidioidomycosis*, realizado em Medellín, Colômbia. Foi a única denominação utilizada por Ayello em sua conferência de abertura, na qual abordou aspectos históricos daquela micose sistêmica <sup>(6)</sup>. Essa denominação se justifica, pois já tinham sido descritos casos na América Central e no México, motivo pelo qual deixava de ser unicamente sul-americana.

Uma das principais características desse fungo imperfeito é o dimorfismo térmico. Em temperatura ambiente, apresenta-se na fase filamentosa, sua forma infectante, que ocorre em natureza, com parede rica em  $\beta$  glucana. Em tecidos humanos e em culturas mantidas a 37°C, apresenta-se na fase leveduriforme, sua forma patogênica, com parede rica em  $\alpha$  glucana. <sup>(2)</sup>

Apesar de existirem áreas endêmicas bem definidas para esse patógeno, o nicho ecológico de sua fase sapróbia continua mal caracterizado, devido ao pequeno número de vezes em que o fungo foi isolado do ambiente <sup>(7, 8)</sup>, ao longo período de latência da doença <sup>(9)</sup> e ao pequeno número de relatos da doença em animais domésticos <sup>(10)</sup> ou selvagens. <sup>(11, 12)</sup> Em 1986, Naiff et al. <sup>(13)</sup> relataram o isolamento de *P. brasiliensis* em tatus (*Dasypus novemcinctus*) estudados em Tucuruí (PA), área considerada não-endêmica para referida doença.

Admite-se que a infecção seja adquirida quando propágulos da fase micelial do fungo são inalados, instalando-se nos alvéolos pulmonares. A seguir, o fungo passa à fase leveduriforme, transformação considerada fundamental para que se estabeleça a infecção. <sup>(14, 15)</sup> O fungo pode, então, se disseminar-se por via hematogênica e linfática para qualquer parte do organismo. <sup>(14)</sup> A penetração cutânea direta do fungo é muito rara, apesar de ter sido documentada em alguns casos, em acidentes com espinhos e em laboratório.

Ao entrar no organismo, *P. brasiliensis* pode ser destruído imediatamente ou multiplicar-se, produzindo uma lesão de inoculação, disseminando-se para linfonodos regionais. A infecção paracoccidióidica pode regredir ou progredir, dependendo de fatores ligados ao fungo e ao hospedeiro. A regressão pode ser acompanhada de destruição de todos os fungos, formando-se cicatriz local estéril ou se acompanhar da persistência de focos quiescentes, com fungos viáveis. A progressão da infecção determina o aparecimento de sinais e sintomas, o que caracteriza a doença ativa. <sup>(16)</sup> Os focos latentes podem apresentar reativação posterior, denominada reinfecção endógena, e levar à doença ativa.

As manifestações clínicas da PCM relacionam - se, em geral, ao comprometimento de pulmões, pele, mucosa das vias aerodigestivas superiores, adrenais e de órgãos ricos no sistema fagocítico mononuclear, tais como fígado, baço linfonodos, pele e medula óssea. <sup>(14)</sup> No entanto, deve-se registrar que a PCM pode comprometer qualquer órgão, aparelho ou sistema.

A PCM se apresenta sob três formas clínicas principais: aguda ou subaguda, crônica e residual. A forma aguda ou subaguda, também chamada juvenil, é responsável por 20 a 25% dos casos. Acomete, em geral, crianças, adolescentes e adultos jovens, caracterizando-se por apresentar instalação mais rápida, de algumas semanas a poucos meses, e evidenciar envolvimento predominante do sistema retículo endotelial, isto é, baço, fígado, nódulos linfáticos e medula óssea. Nessa forma clínica, as manifestações pulmonares são raras e a presença de lesões de mucosa das vias aero digestivas superiores é pouco frequente. Nos tecidos, são encontrados muitos fungos em multiplicação e granulomas em geral frouxos. A forma crônica ou do adulto ocorre em 75% a 80% dos casos. Geralmente acomete indivíduos com idade superior a 30 anos e que apresentam história clínica de longa duração, com frequência acima de seis meses. As manifestações pulmonares são muito frequentes e em geral associadas ao comprometimento de outros órgãos, tais como mucosa das vias aerodigestivas superiores, pele e, por vezes, adrenais.

As formas residuais, também denominadas sequelas, são observadas após tratamento e se caracterizam pelas manifestações clínicas ligadas à fibrose de lesões prévias. Entre elas se destacam as pulmonares, frequentemente acompanhadas de enfisema e síndrome de Addison. <sup>(17, 18)</sup>

Como não é doença de notificação compulsória no Brasil, a real prevalência da PCM

não pode ser calculada. Coutinho et al. <sup>(19)</sup> estudaram 3181 óbitos por PCM no Brasil, entre 1980 e 1995, e demonstraram a grande magnitude e a baixa visibilidade daquela micose. Destacaram que constituía a oitava causa de mortalidade por doença predominantemente crônica ou repetitiva, entre as infecciosas e parasitárias, e a mais elevada taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas, entre os pacientes imonocompetentes. Os autores também relataram que a taxa média de mortalidade anual era de 1,45 para um milhão de habitantes.

A infecção é muito mais frequente que a doença, pois muitos indivíduos infectam -se com o fungo, mantêm focos latentes por toda a vida e nunca adoecem. Inquérito realizado em Pratânia (SP), por meio de reações intradérmicas com paracoccidioidina e histoplasmino, no mesmo indivíduo, revelou que 51,2% da população eram, ao mesmo tempo, paracoccidioidina-positivos e histoplasmino-negativos. O que evidencia a elevada prevalência de infecção paracoccidióidica, pois os outros fungos, que poderiam propiciar reação cruzada com antígenos de *P. brasiliensis*, não têm sido identificados na região. Esse mesmo estudo revelou que, entre crianças de 5 a 13 anos de idade, essa prevalência era igual a 32,5%, o que demonstra contato precoce com o fungo. <sup>(20)</sup>

A PCM é observada em pacientes que tiveram ou se encontram em contato direto e prolongado com o solo, como os trabalhadores rurais. <sup>(3, 14, 21, 22)</sup> Predomina em indivíduos do sexo masculino, com razão de masculinidade de 1,7:1, na forma aguda/subaguda e 22,0:1, na forma crônica e é mais prevalente na faixa etária entre 30 e 59 anos. <sup>(3, 21-23,24)</sup> O estrogênio pode explicar a menor prevalência de PCM em pacientes do sexo feminino, pois retarda ou impede as transições micélio-levedura e conídio-levedura, necessárias para que o fungo atinja a fase patogênica. Isso pode explicar o reduzido número de mulheres afetadas pela doença na idade adulta e a observação da mesma prevalência em ambos os sexos em pacientes com idade inferior a 13 anos. <sup>(22, 24)</sup>

Os doentes com PCM revelam comprometimento imune celular específico, isto é, resposta deficiente a antígenos de *P. brasiliensis*, mas não à de outros agentes infecciosos. <sup>(25)</sup> Falhas na apresentação do antígeno, excesso de antígenos e de imunocomplexos circulantes e deficiência de receptores para interleucina-2 (IL-2) parecem estar ligados a uma resposta insatisfatória das células T. O comprometimento da resposta das células T se acompanha de diminuição da atividade fungicida dos macrófagos. Portanto, os pacientes apresentam comprometimento do braço Th1 da resposta imune celular, com baixos níveis de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-2, associado à manutenção ou à elevação da produção de IL-5, IL-10 e TGF- $\beta$ , que caracteriza a exacerbação do perfil Th2. <sup>(26)</sup>

A produção de anticorpos específicos se encontra aumentada em pacientes com as formas aguda e crônica da PCM. <sup>(27)</sup> No entanto, além de facilitar a opsonização de células fúngicas, não se conhece outra ação dos anticorpos na defesa do hospedeiro. Além disso, deve-se registrar que a gravidade da doença guarda relação inversa com a resposta imune

celular e direta com os níveis séricos de anticorpos específicos. <sup>(28, 29)</sup>

O diagnóstico de PCM é estabelecido a partir da demonstração do *P. brasiliensis* em materiais biológicos. O exame direto realizado ao microscópio óptico, com escarro homogeneizado <sup>(30)</sup>, permite a identificação do fungo, devido à sua morfologia e à presença de exo-esporulações. Resultados falsos positivos podem ocorrer nas formas diminutas, que são confundidas com o *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* e *Cryptococcus* spp. Outros materiais clínicos, como o raspado de lesões tegumentares ou mucosas, bem como material clínico de linfonodos comprometidos, também podem ser analisados por exame direto, apresentando elevada sensibilidade, devido à grande quantidade de fungos neles presentes.

A citoinclusão do escarro em parafina também é utilizada com coloração pela hematoxilina-eosina (HE) e pela prata (Gomori-Grocott), com elevada sensibilidade. <sup>(31)</sup> *P. brasiliensis* também pode ser identificado através do seu cultivo em meios como o Mycosel (BBL) ou Mycobiotic ágar (Difco), SAHBHI (Difco), ágar-Sabouraud ou ágar extrato de levedura.

Além disso, o exame histopatológico de tecidos biopsiados permite o reconhecimento do fungo, empregando-se as colorações pela HE e prata.

Métodos sorológicos também são utilizados para o diagnóstico da PCM. O teste padronizado é a reação de imunodifusão dupla em gel de ágar (IDD), uma prova semi-quantitativa. <sup>(32)</sup> Apresenta sensibilidade de 90% e especificidade de 100%, empregando um preparado antigênico rico em gp 43. Poucos são os casos de reação cruzada, principalmente com o *H. capsulatum*. Este método também permite avaliar a gravidade dos casos, pois títulos elevados são observados em pacientes mais graves. <sup>(33)</sup> A IDD também é muito útil no seguimento dos pacientes com PCM, verificando-se diminuição gradual dos títulos de anticorpos, durante a terapia antifúngica, até sua negatização. A contra-imunoeletoforese é outro método sorológico de precipitação em gel, que é empregado utilizando-se os mesmos preparados antigênicos que a IDD; é mais sensível que a IDD, mas apresenta a mesma especificidade. Pode ser realizado de maneira semi-quantitativa. Outros métodos sorológicos como a reação de fixação do complemento, reação de precipitação em tubos, reação de imunofluorescência indireta e os métodos imunoenzimáticos também podem ser utilizados.

O tratamento da PCM contempla duas fases – inicial ou ataque e complementar. O tratamento inicial deve ser mantido até que se observe cura clínica e normalização da velocidade de hemossedimentação. O tratamento de consolidação deve ser feito até um ano após a observação da cura sorológica. <sup>(34)</sup>

Diversas drogas demonstraram ser eficazes no tratamento da PCM, incluindo os derivados sulfamídicos, a associação sulfametoxazol-trimeotprim, também denominada cotrimoxazol (CMX), Anfotericina B (AmB), e derivados azólicos, tais como cetoconazol (CTC) e itraconazol (ITC). Atualmente, as drogas mais utilizadas no tratamento são o itraconazol e

o cotrimoxazol.

Entre os derivados azólicos, o CTC revelou-se eficaz contra o *P. brasiliensis*.<sup>(35-37)</sup> A seguir, introduziu-se o ITC, que se revelou 10 a 50 vezes mais potente que o cetoconazol no tratamento da PCM<sup>(38)</sup>. A avaliação de 47 pacientes revelou uma melhora clínica em 89% dos casos, com média de seguimento de seis meses.<sup>(39)</sup> É droga bem tolerada e sua administração oral, uma vez ao dia, garante maior adesão ao tratamento, sendo considerada a droga de escolha na terapia da PCM. Embora não liberada para tratamento da PCM no Brasil, outra opção terapêutica é o fluconazol (FCZ).

O CMX é outra opção de tratamento. Foi demonstrado ser eficaz e bem tolerado. Em uma avaliação de 35 pacientes, todos tiveram a resolução completa dos sintomas em até 35 dias.<sup>(40)</sup> Outro estudo encontrou boa resposta terapêutica em 82% dos 34 casos analisados.<sup>(41)</sup> Foram poucos os efeitos colaterais descritos nos dois estudos. Um deles, comparando 130 pacientes tratados com CMX e 47 com ITC, demonstrou eficácia semelhante entre aquelas duas drogas no tratamento de ataque (98% vs 100% respectivamente) e no de complementar (90% vs 100%, respectivamente). O ITC apresentou cura clínica mais rápida que o CMX e menor incidência de efeitos colaterais.<sup>(34)</sup>

O (ITC) e o (CMX) são as principais drogas utilizadas no tratamento da PCM. Foram relatadas queixas de intolerância gástrica com o uso de CMX em alguns casos, mas raramente é necessária a substituição da medicação. Estudo realizado em 200 pacientes com PCM revelou que o risco de hepatotoxicidade é maior com o uso de ITC quando comparado com CMX, com persistente elevação dos níveis séricos de bilirrubina direta, bilirrubina total e fosfatase alcalina.<sup>(36)</sup>

## 1.2 Tratamento da PCM experimental com cotrimoxazol

Os modelos experimentais utilizados na PCM têm trazido grande contribuição para o entendimento desta importante micose sistêmica. O modelo animal permite avaliar o estudo da resposta imune celular e humoral a interação parasita-hospedeiro, a morfologia do fungo nos tecidos, a progressão da doença desde o momento da infecção, até sua disseminação, ação de medicamentos e o dimorfismo do fungo.<sup>(42)</sup>

O primeiro estudo experimental na PCM foi realizado por Lacaz na própria descrição da doença. Lacaz,<sup>(42,43,44)</sup> reproduziu a PCM em camundongos, após infecção por via intravenosa e intraperitoneal, causando doença disseminada em pulmões, fígado, baço, linfonodos, cavidade peritoneal e coração. Observou-se que animais infectados pela via intravenosa apresentavam lesões mais extensas.

Vários fatores podem interferir nos resultados das pesquisas com animais tais como sexo, idade, local onde vive, linhagem, tamanho do inóculo e via de inoculação. O

camundongo é um bom modelo experimental para o estudo da PCM, pois apresenta lesões disseminadas com quadro histopatológico muito semelhante ao do homem. Tanto a via intravenosa como a intra - peritoneal e a intratraqueal são adequadas para obtenção de infecção disseminada. <sup>(45,46)</sup>

A avaliação do CMX no tratamento da PCM experimental murina foi feita por Scavone & Burger que estudaram o efeito da dose diária de 30 e de 150mg/kg de peso corporal em fêmeas de camundongos isogênicos B <sup>(47)</sup>, inoculadas com  $5,0 \times 10^6$  células leveduriforme da cepa 18 de *P. brasiliensis*, por via intraperitoneal.

O CMX foi diluído em água, em doses calculadas com base no peso de cada animal. O tratamento foi dividido em precoce, e iniciado 24 horas após a infecção e também mantidos até o 180º dia, e tardio, 7, 15, 30, 60 e 90 dias após a infecção e também mantidos até o 180º dia.

Observou-se que não ocorreram mortes durante o período do estudo. Os camundongos, tratados com CMX na dose 30mg/kg de peso corporal revelaram maior resposta ao teste intradérmico que os controles não tratados, aos 7, 60, 90, 120, 150 e 180 dias pós-infecção, enquanto os que receberam 150mg/kg de peso corporal revelaram resposta aumentada aos sete, 60, 90 e 150 dias, em relação ao controle. Na avaliação feita aos 150 dias de infecção, observou-se redução da carga fúngica em baço e pulmões dos camundongos tratados com 150mg/kg/dia de CMX, enquanto os que receberam 30mg/kg/dia só revelaram essa diminuição nos pulmões. Esses resultados sugerem que a dose diária de 150mg/kg é mais eficaz que a de 30mg/kg. A ação nos pulmões foi melhor que no baço.

Lourenço et al. <sup>(48)</sup> compararam o efeito de CTZ na dose de 8mg/kg/dia, FCZ na dose 6mg/Kg/dia, ITC na dose 4mg/Kg/dia e CMX na dose de 60mg/Kg/dia no tratamento da infecção de fêmeas infectadas com  $0,64 \times 10^7$  células leveduriformes de *P. brasiliensis*, por via venosa. Foi feito em dose única diária, por gavagem, enquanto o CMX foi diluído na água de bebedouro. O tratamento foi introduzido sete dias após a infecção e mantido por 13 dias. Os animais foram avaliados logo após o término da terapia e três semanas depois de sua interrupção.

Todos os tratamentos revelaram redução da carga fúngica de pulmões e baço após seu término. A avaliação, realizada três semanas após interrupção do procedimento, demonstrou menor carga fúngica em pulmões. No baço, a segunda análise demonstrou redução da carga fúngica em relação ao grupo controle. A mais persistente foi observada com ITC nos pulmões e FCZ no baço.

Lourenço et al. <sup>(49)</sup> compararam a eficácia CTZ nas doses 4 e 16mg/Kg/dia, FCZ nas doses 4 e 16mg/kg/dia, ITC nas doses 2 e 8mg/kg/dia e CMX nas doses 10 e 40mg/kg/dia, para reduzir a carga fúngica de pulmões e baço de ratos fêmeas infectadas com  $1 \times 10^6$  células leveduriformes de *P. brasiliensis*, por via venosa. O tratamento foi realizado em dose única,

diária por gavagem, iniciado sete dias após a infecção e mantido por quatro semanas.

Todos os tratamentos reduziram a carga fúngica nos pulmões, exceto o tratamento com CMX a dose de 40mg/kg de CTZ. No baço, observou-se redução da carga fúngica em todos os grupos tratados, exceto no grupo com CMX 40mg/kg/dia.

Carvalho FM <sup>(50)</sup> avaliou a ação do CMX no tratamento da *P. brasiliensis* em 168 camundongos isogênicos albinos, da linhagem BALB/c, machos, com cinco a sete semanas de idade, pesando em média 26g. Os animais foram infectados pela cepa 18 *P. brasiliensis*, por via intravenosa, contendo  $1 \times 10^6$  células leveduriformes, utilizando-se a veia da cauda. A administração do CMX foi realizada, por gavagem, na dose diária de 200mg/kg de peso corporal, numa única tomada diária, sempre no mesmo horário.

A pesquisa foi constituída de quatro experimentos, dentre eles, avaliação de sobrevivência dos animais, eficácia do tratamento com CMX, perfil sérico do CMX e recuperação de fungos, em função do tempo de cultivo. Os animais foram divididos em grupo controle saudável, infectado, tratamento precoce e prolongado, precoce, mas por curto período, e tratamento tardio, mas por período prolongado.

Foi observada menor tendência de mortalidade cumulativa nos camundongos tratados, enquanto a porcentagem de mortes espontâneas foi menor naqueles que receberam tratamento por tempo prolongado e com início precoce ou tardio. Nos grupos tratados, a recuperação de fungos de pulmões e de baço foi menor que no grupo controle infectados. As análises da recuperação de fungos, em função do tempo de tratamento e da porcentagem de culturas negativas revelaram que os tratamentos prolongados e de início precoce foram mais eficazes. Os níveis de anticorpos séricos, determinados pela IDD, não apresentaram variações ao longo dos 140 dias de seguimento. O CMX apresentou o mesmo efeito em pulmões e baço. O CMX, administrado por gavagem, na dose diária de 200mg/kg de peso corporal, alcançou níveis séricos adequados para o tratamento. No entanto, em dose diária única, as concentrações não se mantiveram por 24 horas.

### **1.3 Justificativa do estudo**

Um dos fatores que interferem na adesão ao tratamento da PCM é a posologia do antifúngico utilizado. Um estudo realizado por Queiroz-Telles e colaboradores revelou que os pacientes que utilizavam CMX abandonavam mais o tratamento que aqueles que recebiam ITC <sup>(51)</sup>. Dois fatores podem estar interferindo neste fenômeno. Um deles está relacionado aos efeitos colaterais, pois pacientes que usam CMX apresentam mais queixas dos eventos adversos <sup>(33)</sup>. O outro refere-se à posologia da droga. Habitualmente, o CMX é utilizado na dose de 2400 mg de sulfametoxazol ao dia, o que corresponde a 6 comprimidos, divididos em duas ou três tomadas diárias.

Não existem estudos clínicos que avaliem a utilização de dose única diária do CMX para tratamento da PCM. Os estudos experimentais acima descritos utilizaram a dose única diária e verificaram efeito terapêutico. No entanto, ainda não existe na literatura estudo que tenha comparado a dose única com duas tomadas diárias para avaliar se existe diferença entre estes dois esquemas. Portanto, este estudo teve a intenção de comparar estes dois esquemas terapêuticos do CMX em modelo murino, para verificar se o uso uma vez ao dia da droga pode ser empregado em pacientes com PCM.

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo geral**

O objetivo geral deste trabalho foi comparar a eficácia do cotrimoxazol no tratamento da PCM murina quando a mesma dose diária foi administrada em uma ou duas doses diárias.

### **1.4.2 Objetivos específicos**

Os objetivos específicos deste estudo foram:

- 1) Avaliar as alterações dos esquemas de tratamento com CMX sobre danos teciduais de pulmões e baço;
- 2) Conhecer a sobrevivência dos camundongos submetidos a tratamento com cotrimoxazol;
- 3) Verificar a evolução sorológica durante o tratamento com CMX em uma e duas doses diárias;

## 2. Referências bibliográficas

1. Teixeira MM, Theodoro RC, Carvalho MJA, Fernandes L, Paes HC et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylo Evol.* 2009; 52: 273-83.
2. Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia. Journal of Medical and Veterinary Mycology.* 1985; 23: 323-34.
3. Marques SA, Franco MF, Mendes RP, Silva NCA, Baccili C, Curcelli ED, et al. Aspectos epidemiológicos da paracoccidioidomicose na área endêmica de Botucatu (São Paulo-Brasil). *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1983; 25(2):87-92.
4. Lutz A. Uma mycose pseudococcidica localizada na bocca e observada no Brazil. *Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas. Brazil-Med.* 1908; 13: 121-24.
5. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. *Micologia Médica. In: Paracoccidioidomicose.* 8ª ed. São Paulo, Brasil: Editora Sarvier, 1991; p. 248-61.
6. Ajello L. Paracoccidioidomycosis: a historical review. *In: Paracoccidioidomycosis. PAHO Sci. Publ.;* 1972. p.254.
7. Albornoz MB. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Sabouraudia.* 1971; 9: 248-53.
8. Franco M, Bagagli E, Scapolio S, Lacaz CS. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. *Med Mycol* 2000; 38: 185 – 91.
9. Restrepo A. Morphological aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* in lymph nodes: implications for the prolonged latency of Paracoccidioidomycosis? *Med Mycol.* 2000; 38: 317-22.
10. Ricci G, Mota FT, Wakamatsu A, Serafim RC, Borra RC, Franco M. Canine Paracoccidioidomycosis. *Med Mycol.* 2004; 42: 379-83.
11. Grose E, Tamsitt JR. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. *Sabouraudia.* 1965; 4(2): 124-5.
12. Costa EO, Diniz LSM, Fava Netto C, Arruda C, Dagli MLZ. Delayed hypersensitivity test with paracoccidioidin in captive Latin America wild mammals. *J Med Vet Mycol.* 1995; 33: 39-42.
13. Naiff RD, Ferreira LCL, Barrett TV, Naiff MF, Arias JR. Paracoccidioidomicose enzoótica em tatus (*Dasybus novemcinctus*) no estado do Pará. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1986; 28: 19-27.
14. Franco M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol.* 1986; 25:5-18.

15. Camargo ZP, Franco MF. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev Iberoam Micol.* 2000; 17:41-48.
16. Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Mota NGS. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1987; 20: 129-32.
17. Mendes RP. The gamut of clinical manifestations. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. *Paracoccidioidomycosis.* Boca Raton: CRC Press; 1994. p. 233-58.
18. Manual de Vigilância e Controle da Paracoccidioidomicose. Secretaria de Estado da Saúde - Coordenadoria de Controle de Doenças - Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". São Paulo, 2008.
19. Coutinho Z F, Silva D, Lazéra M, Petri V, Oliveira R M, Sabroza P C, et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saúde Pública.* 2002; 18(5): 1441-54.
20. Rodrigues CC. Avaliação da infecção por *Histoplasma capsulatum* por meio de reações intradérmicas em moradores da zona urbana e rural do Município de Pratânia (SP) [tese]. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais: Faculdade de Medicina de Botucatu / UNESP; 2004.
21. Giraldo R, Restrepo A, Gutiérrez F, Robledo M, Londoño F, Hernández H, et al. Pathogenesis of paracoccidioidomycosis: a model based on the study of 46 patients. *Mycopathologia.* 1976; 58(2): 63-70.
22. Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infec Immun.* 1984; 46(2): 346-53.
23. Moreto TC, Marques MEA, Oliveira MLSC, Moris DV, Carvalho LR, Mendes RP. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 2011; 105: 473– 478.
24. Borges-Walmsley MI, Chen D, Shu X, Walmsley AR. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbiologia* 2002; 10(2): 80-7.
25. Benard G, Hong MA, Del Negro GMB, Batista L, Shikanai-Yasuda MA, Duarte AJS. Antigen-specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg.* 1996; 54(1): 7-12.
26. Benard G, Romano CC, Cacere CR, Juvenale M, Mendes-Giannini MJS, Duarte AJS. Imbalance of IL-2, IFN- and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine.* 2001; 13: 248-52.
27. Bueno JP, Mendes-Giannini MJS, Del Negro GMB, Assis CM, Takiguti CK, Shikanai-Yasuda MA. IgG, IgM and IgA antibody response for the diagnosis and follow-up of

- paracoccidioidomycosis: comparison of counter immune electrophoresis and complement fixation. *J Med Vet Mycol.* 1997; 35: 213-17.
28. Mota NGS, Rezkallah-Iwasso MT, Peraçoli MTS, Audi RC, Mendes RP, Marcondes J, et al. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1985; 79: 765-72.
  29. Biagioni L, Souza MJ, Chamma LG, Mendes RP, Marques SA, Mota NGS, Franco M. Serology of paracoccidioidomycosis. II. Correlation between class-specific antibodies and clinical forms of the disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1984; 78: 617 – 21.
  30. Lopes OSS. Descrição de uma técnica de concentração para pesquisa do *Paracoccidioides brasiliensis* no escarro. *Hospital* 1955; 5:69-79.
  31. Iwama de Mattos MCF, Mendes RP, Marcondes-Machado J, et al. Sputum cytology in the diagnosis of pulmonary paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 1991; 114:187-191.
  32. Restrepo A. La prueba de inmunodiffusion en el diagnostico de la paracoccidioidomycosis. *Sabouraudia* 1966; 4:223-230.
  33. Mendes RP, Cavalcante RS, Marques SA, Marques MEA, Venturini J, Sylvestre TF, Paniago AMM, Pereira AC, da Silva JF, Fabro AT, Bosco SMG, Bagagli E, Hahn RC, Levorato AD. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. *Open Microbiol J.* 2017; 11:224-282.
  34. Cavalcante RS, Sylvestre TF, Levorato AD, de Carvalho LR, Mendes RP. Comparison between Itraconazole and Cotrimoxazole in the Treatment of Paracoccidioidomycosis. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8(4): e2793. doi: 10.1371/journal.pntd.0002793.
  35. Marcondes J, Meira DA, Mendes RP, et al. Avaliação do tratamento da paracoccidioidomycose com o cetoconazole. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1984; 26:113-121.
  36. Levorato AD, Moris DV, Cavalcante RS, Sylvestre TF, Azevedo PZ, Carvalho LR, Mendes RP. Evaluation of the hepatobiliary system in patients with paracoccidioidomycosis treated with cotrimoxazole or itraconazole. *Med Mycol.* 2017; 1-10.
  37. Restrepo A, Stevens DA, Leiderman E et al. Ketoconazole in paracoccidioidomycosis: efficacy of prolonged oral therapy. *Mycopathol* 1980; 72:35-45.
  38. Borgers M and Van de Ven MA. Degenerative changes in fungi after itraconazole treatment. *Rev Infect Dis* 1987; 9 (Suppl 1):33-42.
  39. Naranjo MS, Trujillo M, Munera MI et al. Treatment of paracoccidioidomycosis with itraconazole. *J Med Vet Mycol* 1990; 28:67-76.
  40. Barbosa W, Vasconcelos WNP. Ação da sulfametoxazol associada ao trimetoprim na terapêutica da Blastomicose sul-americana. *Rev Patol Trop* 1973; 2:329-339.

41. Do Valle ACF, Wanke B, Wanke NCF, Lima NS, Perez M. Tratamento da paracoccidiodomicose: estudo retrospectivo de 500 casos. *An Bras Dermatol* 1993; 68(11):66-70.
42. Coelho KIR, Defaveri J, Rezkallah-Iwasso MT, Peraçoli MTS. Experimental paracoccidiodomycosis. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. *Paracoccidiodomycosis*. Boca Raton: CRC Press; 1994. p. 87-107.
43. Splendore A. Blastomycoses Americanas. *Bras Méd* 1910; 24: 153-7.
44. Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia: J Med Vet Mycol* 1985; 23: 323-34.
45. Singer-Vermes LM, Burger E, Russo M, Vaz CAC, Calich VLG. Advances in experimental paracoccidiodomycosis using on isogenic murine model. *Arch Med Res* 1993; 24(3): 239-45.
46. Calich VLG, Singer-Vermes LM, Siqueira AM, Burger E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Br J Exp Pathol* 1985; 66: 585-94.
47. Scavone R, Burger E. Paracoccidiodomycosis: reduction in fungal load and abrogation of delayed-type hypersensitivity anergy in susceptible inbred mice submitted to therapy with trimethoprim-sulfamethoxazole. *Med Microbiol Immunol* 2004; 193(1): 53-9.
48. Lourenço DS, Malta MHB, Afonso AO, Martinez R. Persistência do efeito antifúngico após interrupção do tratamento na paracoccidiodomicose experimental. *XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, I Encontro de Medicina Tropical do Cone Sul; 2005, março, 6 a 10; Florianópolis, Brasil. Florianópolis; 2005: 38 (supl. 1): p.163.*
49. Lourenço DS, Malta MHB, Afonso AO, Martinez R. Avaliação comparativa das drogas antifúngicas no tratamento da paracoccidiodomicose do rato. *XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, I Encontro de Medicina Tropical do Cone Sul; 2005, março, 6 a 10; Florianópolis, Brasil. Florianópolis; 2005: 38 (supl. 1): p.163.*
50. Carvalho FM. Avaliação da associação sulfametoxazol-trimeotprim no tratamento da paracoccidiodomicose experimental murina. [Dissertação]. Pós-Graduação em Doenças Tropicais: Faculdade de Medicina de Botucatu / UNESP; 2006.
51. Queiroz-Telles F, Colombo AL and Nucci M (1998) Comparative efficacy of cotrimoxazole and itraconazole in the treatment of paracoccidiodomycosis. 38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Diego, CA, USA, abstract J-142.

*Capítulo II*  
*Artigo I*

## **Comparação da eficácia de dose diária do cotrimoxazol, administrada uma ou duas vezes, no tratamento da Paracoccidioidomicose murina.**

Lariza Maza<sup>1</sup>, Rinaldo Poncio Mendes<sup>1</sup>, Patricia dos Santos Leão<sup>2</sup>, Sabrina Setembre Batah<sup>2</sup>, Alexandre Todorovic Fabro<sup>2</sup>, Ricardo de Souza Cavalcante<sup>1</sup>

1 – Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem – Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista (UNESP)

2 – Departamento de Patologia e Medicina Legal – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (USP).

### **1. Introdução**

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose endêmica na América Latina, causada por fungos termodimórficos das espécies *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides Lutzii* <sup>(1, 2)</sup>.

A associação sulfametoxazol-trimetoprim, também denominada cotrimoxazol (CMX), é uma das principais opções terapêuticas no tratamento da PCM, principalmente no Brasil, país com o maior número de casos da doença, onde esta droga é distribuída gratuitamente pelo Ministério da Saúde. Habitualmente, o CMX é utilizado na dose de 2400 mg de sulfametoxazol, o que acarreta na ingestão de seis comprimidos ao dia, divididos em duas tomadas. Tem sido observado que o CMX apresenta menor adesão dos pacientes quando comprado com o itraconazol <sup>(a)</sup>. Uma das causas deste fenômeno pode ser o esquema posológico desta droga. Em levantamento sobre os motivos de uso irregular do CMX, 16,2% dos pacientes alegam esquecimento <sup>(b)</sup>. Este contexto aponta para a necessidade de se estudar outras opções posológicas do CMX no tratamento da PCM. <sup>(3, 4)</sup>.

Não existem ensaios clínicos que avaliam o uso do CMX em uma tomada diária para o tratamento da PCM. No entanto, alguns estudos experimentais indicam que o uso desta droga uma vez ao dia pode ser eficaz na terapia desta micose <sup>(5-8)</sup>. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia do tratamento da PCM murina com CMX administrado em uma e duas doses diárias.

### **2. Material e métodos**

#### **2.1 Animais**

Foram utilizados 140 camundongos isogênicos albinos, da linhagem BALB/c, machos, com cinco a sete semanas de idade e peso médio de 25g, provenientes do biotério do Laboratório Experimental da Disciplina de Moléstias Infeciosas e Parasitárias, da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp.

## 2.2 Delineamento do estudo

Este estudo foi constituído de três experimentos.

*Experimento I – Avaliação do efeito dos diferentes esquemas de tratamento com cotrimoxazol*

Os camundongos foram infectados com o isolado 326 de *P. brasiliensis*, pela via intratraqueal, com exceção do grupo controle saudável, que recebeu apenas solução fisiológica pela mesma via. Os animais foram marcados com cores e numerações diferentes e divididos em quatro grupos mediante sorteio: 1) grupo 1 (G1), constituído de 23 camundongos sem infecção e que receberam solução fisiológica 0,9%, por gavagem, do 28º ao 140º dia, constituindo o grupo controle saudável; 2) grupo 2 (G2), constituído de 27 camundongos infectados pelo isolado 326 *P. brasiliensis* e que receberam solução fisiológica 0,9%, por gavagem, do 28º ao 140º dia, constituindo o grupo controle infectado; 3) grupo 3 (G3), constituído de 25 camundongos infectados pelo isolado 326 *P. brasiliensis*, que receberam CMX na dose diária de 200mg/kg/dia do sulfametoxazol, administrados em dose única diária, por gavagem, do 28º ao 140º dia após a infecção; 4) grupo 4 (G4), constituído de 25 camundongos infectados pelo isolado 326 *P. brasiliensis* que receberam CMX na dose de 200mg/kg/dia do sulfametoxazol, administrados em duas doses diárias (100 mg/kg a cada 12 horas), por gavagem, do 28º ao 140º dia após a infecção.

Após a infecção, cinco a sete animais de cada grupo foram selecionados por amostra casual simples e sacrificados na 8ª, 12ª, 16ª e 20ª semana. Em cada momento de sacrifício, foi avaliada a recuperação do fungo em meio de cultura, de fragmentos de pulmões e baço, e foram feitos o exame histopatológico destes órgãos, a avaliação da imunidade humoral pela dosagem sérica de anticorpos específicos anti-*P. brasiliensis* (Tabela1).

**Tabela 1:** Constituição dos grupos de camundongos infectados com o isolado 326 *P. brasiliensis*, submetidos a diferentes tratamentos com CMX e dos grupos controles, definição dos períodos de sacrifício.

Grupos experimentais	Semana do sacrifício				Total de animais
	8ª	12ª	16ª	20ª	
Grupo 1 – controle saudável	5	6	6	6	23
Grupo 2 – controle infectado	6	7	7	7	27
Grupo 3 – tratamento CMX dose única diária	6	6	6	7	25
Grupo 4 – tratamento CMX duas doses diárias	6	6	6	7	25

### *Experimento II – Avaliação da sobrevivência*

Todos os 100 animais utilizados no experimento I foram analisados quanto à sobrevivência no período de 140 dias. Em função dos animais submetidos ao experimento I serem sacrificados para a avaliação do efeito do CMX, foi considerada a mortalidade cumulativa, medida pelo número de mortes e o momento em que elas ocorreram, com censura dos animais sacrificados. Tal procedimento foi utilizado para evitar o uso de grande quantidade de animais neste experimento. Para os demais, apenas foi medido o número total de mortes que ocorreram em 140 dias.

### *Experimento III – Avaliação da dosagem sérica do cotrimoxazol*

Vinte animais foram tratados com CMX 100 mg/kg duas vezes ao dia, ao meio dia e meia noite e outros 20 tratados com CMX 200 mg/kg uma vez às 12:00h. Estes animais, foram submetidos a terapia por um período de 10 dias, e, a seguir, sacrificados às 12:00h, 18:00h, 24:00h e às 6:00h. De cada camundongo coletou-se amostra de sangue por punção cardíaca para a dosagem sérica de sulfametoxazol livre. Também foi realizado o teste de sensibilidade *in vitro* para o isolado 326 de *P. brasiliensis*.

## **2.3 Infecção experimental pelo *P. brasiliensis***

### *Origem e manutenção do isolado*

Neste estudo foi utilizado o isolado 326 de *P. brasiliensis*, obtido de fragmento de tecido de orofaringe de uma paciente com a forma aguda/subaguda, de PCM, atendida no Serviço de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp no ano de 2012. Desde então, vem sendo estocada em ágar Sabouraud, por meio de repiques sucessivos, feitos a cada 15 dias.

### *Obtenção da suspensão fúngica*

O isolado foi cultivado no meio Sabouraud (DIFCO) a 35°C por cinco dias. Após esse período de crescimento, as células leveduriformes foram removidas e transferidas para tubo com solução salina estéril e centrifugadas. A seguir, a suspensão de células da fase leveduriforme foi mantida a 37°C por quinze minutos, para sedimentar possíveis grumos<sup>(9)</sup>. O sobrenadante, contendo células isoladas ou com multi brotamentos, foi coletado e a viabilidade das células fúngicas estabelecida por contagem em câmara hemocitométrica, tipo Neubauer, utilizando o corante azul tripan (Sigma)<sup>(10)</sup>. Para inóculo, foram empregadas culturas de *P. brasiliensis* que apresentavam pelo menos 85% de viabilidade.

### *Método e via de infecção*

Os camundongos foram inicialmente anestesiados com 0,08ul de uma solução com 24ul de ketamina, 32ul de xilasina e 24ul de água destilada, administrada por via intraperitoneal. Após a completa anestesia, o animal foi acomodado em goteira de Claude Bernard e a região de seu pescoço limpa com álcool 70% para antissepsia. Em seguida, a traqueia foi exposta por incisão cutânea cervical anterior e injetados 25ul da suspensão do inóculo de *P. brasiliensis*, contendo  $1 \times 10^6$  células leveduriformes viáveis, constituindo os grupos controle infectado, com tratamento uma e duas vezes ao dia (Figura 1). Os camundongos, sorteados para o grupo controle saudável, também passaram pelo mesmo procedimento, porém foram inoculados por via intratraqueal com solução fisiológica 0,9%. A incisão foi suturada com fio cirúrgico. Os animais ficaram em local aquecido para evitar hipotermia, em razão do uso dos anestésicos, e observados durante o processo de recuperação.



Figura 1. Cirurgia intratraqueal para inoculação do isolado 326 Pb em camundongo da linhagem Balb/c (Acervo Pessoal)

### **2.4 Droga antifúngica**

Os camundongos foram tratados com CMX (Roche)<sup>®</sup>. Utilizou-se a suspensão de CMX, contendo 40mg de TMP e 200mg de SMX em cada 5,0ml. A droga foi administrada, por gavagem, na dose diária de CMX igual a 200mg/kg de peso corporal em dose única diária às 12:00h para o grupo 3 e 200mg/kg de peso corporal, dividida em duas tomadas às 12:00h e às 24:00h para o grupo 4. Os grupos controles saudável e infectado com solução fisiológica por gavagem, às 12:00.

## 2.5 Sacrifício dos camundongos

Os camundongos sacrificados foram inicialmente anestesiados com 0,08ul de uma solução composta de 24ul de ketamina, 32ul de xilasina e 24ul de água destilada, administrada por via intraperitoneal. Após a sedação, foi coletado sangue, através de punção cardíaca e foram retirados mm pulmões e baço.

## 2.6 Recuperação de fungos

O preparo do fator de crescimento foi realizado segundo o método proposto por Restrepo et al <sup>(11)</sup>. O crescimento do isolado Pb 192, foi adicionado em meio GPY na forma líquida, onde foi incubado a 36°C, com agitação constante de 140rpm por 7 dias. Após este processo, as suspensões fúngicas passaram por um filtro contendo uma membrana tipo Millipore.

Para a recuperação de fungos, foi utilizado o meio de cultura BHI, suplementado com 15mL de fator de crescimento, 12ml de soro de cavalo, 50mg/L de gentamicina, 4,5g de ágar e 300mL de água destilada. <sup>(2)</sup>

Para determinar o grau de infecção dos camundongos, os pulmões direitos e baço foram pesados, macerados e homogeneizados, em 1,0mL de solução salina fosfatada tamponada estéril (PBS), com pH 7,2. Alíquotas de 100mL dessa suspensão foram semeadas em toda a superfície das placas de BHI suplementado, em duplicata. A seguir, as placas foram vedadas e incubadas a 35°C, por quatro semanas. Procedeu-se a leitura das placas com o auxílio de um contador de colônias modelo CP600 Plus, da marca Phoenix, repetidas quatro vezes, com uma, duas, três e quatro semanas de cultivo. Por fim, a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi efetuada na quarta semana de cultivo e ajustada para grama de tecido, utilizando-se a fórmula:

$$\text{Contagem (UFC/g de tecido)} = \frac{\text{Média das duas contagens de UFC} \times 10}{\text{Peso do fragmento (g)}}$$

## 2.7 Análise histopatológica

As análises histopatológicas foram realizadas na 8<sup>a</sup>, 12<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup> e 20<sup>a</sup> semana de sacrifício. Foram coletados pulmão direito e baço, fixados em formalina por 48 horas e, a seguir transferidos para o álcool 70º e incorporados em parafina. Foram realizadas as colorações de hematoxilina-eosina e ácido período de Shiff (PAS) para a contagem de células fúngica no tecido.

O estudo morfométrico foi realizado conforme padronizado por Fabro e colaboradores<sup>(12)</sup> e recomendado pela American Thoracic Society/European Respiratory Society<sup>(13)</sup>. Brevemente, 10 fotos de campo de grande aumento foram tiradas em um microscópio Leica. Com um retículo de weibel, a carga fúngica pela coloração de PAS foi avaliada sobre os granulomas, com resultados expressos em números arbitrários. Com o software Image Pro Plus, a área de deposição colagênica pela birrefringência da coloração de picrossirios red foi determinada e subtraída da área bronquiolar total, sendo os resultados expressos em porcentagem de área peribronquiolar.

## **2.8 Avaliação da imunidade humoral**

A imunidade humoral foi avaliada pela dosagem semi-quantitativa de anticorpos séricos, utilizando-se a reação de Imunodifusão dupla em gel de ágar (IDD), de acordo com as especificações de Restrepo<sup>(14)</sup> e coradas por amido de Schuvarz 10B (Merck). O soro foi considerado reagente, quando observada a formação de linhas de precipitação, sendo que a maior diluição em que esta linha era observada, a quantificação de anticorpos anti-*P. brasiliensis*. O filtrado de cultura preparado no Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – Unesp, foi utilizado como antígeno.

## **2.9 Determinação dos níveis séricos de sulfametoxazol**

Os níveis séricos de sulfametoxazol foram determinados pelo método de Bratton & Marshall<sup>(15)</sup>. Devido à quantidade de soro utilizada em cada dosagem, realizou-se apenas a determinação da fração livre. Para o cálculo da quantidade de derivado sulfamídico na amostra usou-se a seguinte fórmula:<sup>(16)</sup>

$$\text{Quantidade de sulfametoxazol (g/mL)} = \frac{(\text{DO desconhecida} \times 100)}{(\text{DO padrão})}$$

(DO padrão), em que DO indica densidade ótica.

## **2.10 Determinação de Unidade Formadora de Colônia (UFC) de *P. brasiliensis***

Foram analisadas as UFC de pulmão direito e baço dos animais infectados com o isolado 326 *P. brasiliensis*, e os animais controles saudáveis. Os órgãos foram macerados previamente em microtubo, contendo 200uL de PBS estéril e, posteriormente foram adicionados 800uL de PBS estéril. Aliquotas de 100uL foram plaqueadas, onde ficaram pelo período de 8 semanas em temperatura de 35°C, e as colônias contadas diariamente até que não se observasse aumento nas contagens.

## **2.11 Teste de sensibilidade in vitro contra fungos dimórficos**

O teste de sensibilidade, foi feito pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM), utilizando - se o método de microdiluição. Ele foi realizado com o Bactrim<sup>®</sup> (Sigma). O teste de microdiluição para fungos do gênero *Paracoccidioides* foi realizado segundo o protocolo proposto por Paula e Silva et al. <sup>(17)</sup>

Foram realizadas diluições seriadas, utilizando-se o meio RPMI-1640 como diluente, mantendo-se um volume constante de 1mL por tubo. O Bactrim foi testado em 8 concentrações que variaram de 1280 a 5µg.mL<sup>-1</sup>. Volumes de 100 uL de cada diluição foram distribuídos nas microplacas. O antifúngico, Anfotericina B (Sigma) foi incluído como controle positivo. As concentrações finais variaram de 1280 a 5µg.mL<sup>-1</sup>. As suspensões de células leveduriformes do isolado 326, foram ajustadas para uma concentração final de 1x10<sup>6</sup> células/mL em meio RPMI-1640 suplementado com 2% de glicose. As placas foram incubadas a 37°C, por um período de 72 horas, com agitação de 150 rpm. Após 48 horas de incubação, foi adicionado o corante Alamar Blue (Invitrogen) e as placas foram mantidas por mais 24 horas. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada visualmente após 72 horas de incubação. Considerou-se ponto de corte pelo menos a menor concentração de Bactrim e 50% de inibição de Anfotericina B que causaram significativa diminuição (≥50% de inibição) do crescimento quando comparado com o crescimento do controle. As leituras das placas foram realizadas da maior para a menor concentração.

Após a determinação da CIM, foram realizados subcultivos de todos os poços da microplaca que não apresentaram crescimento fúngico. Aliquotas de 100 uL de cada poço foram retiradas e plaqueadas em meio *brain heart infusion*-BHI<sup>®</sup>(Difco) contendo gentamicina a 0,5%, 4,0% de soro de cavalo e filtrado de cultura da cepa *P. brasiliensis* 192. A CFM foi definida como a menor concentração do Bactrim com ≤1 colônia visível no meio de cultivo após o período de incubação. <sup>(17, 18)</sup>

## 2.12 Aprovação pelo Comitê de Ética

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB/ Unesp) protocolo, 1146- 2015, no dia 27 de agosto de 2015.

## 2.13 Análise estatística dos resultados

A comparação de duas amostras independentes foi feita pelo teste U de Mann-Whitney. Três ou mais amostras independentes foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis seguido Dumm. Usou-se o método da regressão linear para comparar as semanas

quanto a recuperação fúngica e dosagem sérica de anticorpos. Fez-se a avaliação de sobrevida pelo estimador de Kaplan-Meyer com cálculo do Log Rank. Foi considerado o erro tipo  $\alpha$  igual ou inferior a 0,05 como significativo, isto é, para rejeição da hipótese de nulidade. Todos os testes foram realizados segundo as especificações de Zar. <sup>(19)</sup>

### 3. Resultados

Cento e noventa animais foram utilizados para os experimentos I, II, III do estudo. A figura 2 apresenta o fluxograma de distribuição dos animais e experimentos realizados durante o período de 140 dias.

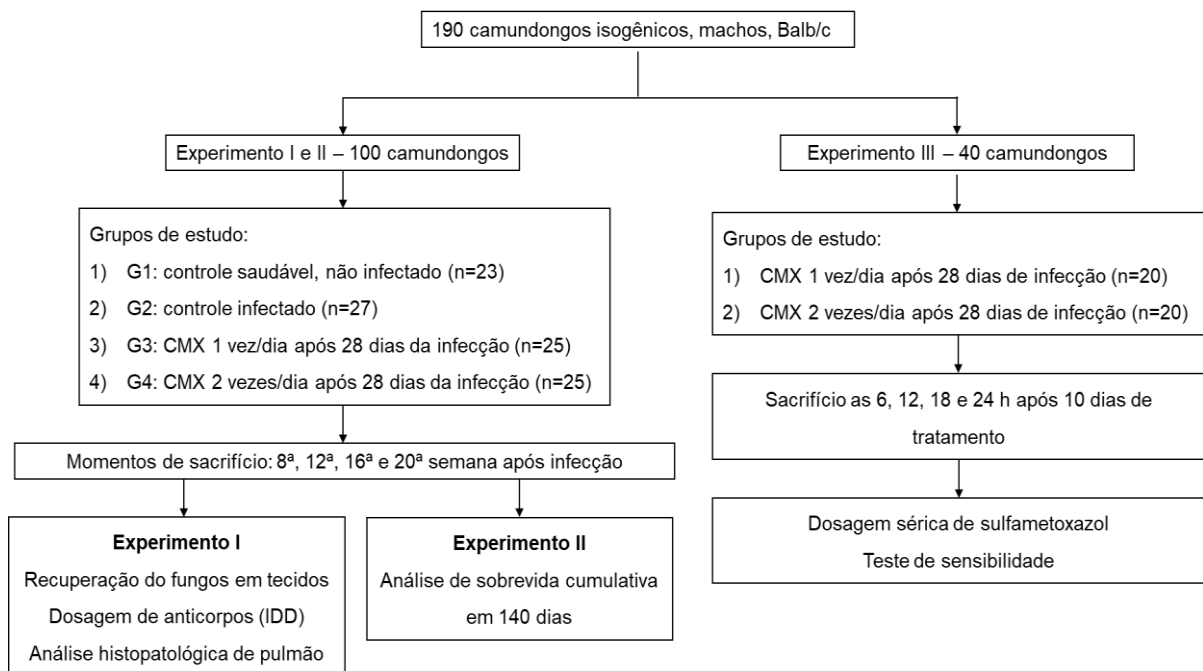


Figura 2. Fluxograma de distribuição dos animais e experimentos realizados para a comparação do tratamento com cotrimoxazol administrado uma ou duas vezes ao dia, no tratamento da paracoccidiodomicose murina. CMX = cotrimoxazol; IDD = imunodifusão dupla em gel de ágar.

#### 3.1 Experimento I – Avaliação do efeito de diferentes esquemas de tratamento com cotrimoxazol

##### 3.1.1 Avaliação de grupos

*Grupo Controle Saudável (G1)*

Este grupo foi composto de 23 camundongos da linhagem Balb/c, não submetidos à infecção, que receberam somente solução fisiológica 0,9%, por gavagem, uma vez ao dia em um período de 140 dias.

Esses animais permaneceram tranquilos, com pelos brilhantes durante todo o experimento. Os animais apresentavam um peso médio de 24g, com aumento de 4g, ao decorrer do experimento.

A recuperação de fungos sempre se manteve negativa, em pulmões e baço, em todos os animais. Nenhum deles apresentou resultados positivos na pesquisa de anticorpos séricos específicos.

#### *Grupo Controle Infectado (G2)*

Este grupo foi formado por 27 camundongos da linhagem Balb/c, infectados com o isolado 326 *P. brasiliensis* pela via intratraqueal. O tratamento foi iniciado após 28 dias de observação, com administração de solução fisiológica 0,9%, por gavagem, uma vez ao dia por um período de 140 dias.

No início, os animais não apresentavam sinais da doença e pesavam em média 24g. Começaram a perder peso partir da 12ª semana, começaram a perder peso, chegando a média de 21g. A aparência também piorou, com pelos arrepiados e sem brilho. Houve redução da movimentação dentro das caixas e os animais ficaram mais irritados.

Isolou-se *P. brasiliensis* de fragmentos de pulmões e baço, em todos os momentos em que foram sacrificados, sem diferença entre as semanas tanto para pulmão quanto para baço (Tabelas 2 e 3 e Figura 3). Os níveis séricos de anticorpos específicos foram detectáveis em todas as semanas com elevação progressiva (Tabela 4 e Figura 3).

#### *Grupo tratado com CMX uma vez ao dia (G3)*

Este grupo foi composto de 25 camundongos da linhagem Balb/c infectados com o isolado 326 *P. brasiliensis*, pela via intratraqueal, e receberam, por gavagem, uma vez ao dia, sempre no mesmo horário (12h00), 10,4ul da suspensão de CMX, no período do 28º ao 140º dia após a infecção.

No início do tratamento, os animais estavam muito agitados, com pelos menos brilhantes. Após a instituição da terapia, os camundongos ficaram mais calmos e com pelos brilhantes. O peso dos animais se manteve constante durante todo o tratamento, com média de 32g.

Foi observado crescimento de *P. brasiliensis* nos pulmões e baço em todas as semanas de sacrifícios, porém, não em todos os animais. Não houve diferenças de

crescimento entre as semanas tanto para pulmão quanto para baço (Tabelas 2 e 3 e Figura 3). Os níveis séricos de anticorpos específicos foram positivos desde a 8ª semana, com mediana de titulação de 1:16, com redução dos títulos nas semanas subsequentes (Tabela 4 e Figura 3).

#### *Grupo tratado com CMX duas vezes ao dia (G4)*

Este grupo foi constituído de 25 camundongos da linhagem Balb/c, infectados com o isolado 326 *P. brasiliensis* pela via intratraqueal, e receberam por gavagem duas vezes ao dia, sempre no mesmo horário (00h00 e 12h00), 5,2uL da suspensão de CMX, do 28º ao 140º dia após a infecção.

No início do tratamento, os animais estavam muito agitados, irritados e com pelos menos brilhantes. Com o tratamento, tornaram-se mais dóceis, com pelos brilhantes, calmos e apresentaram ganho de peso, chegando a 33g em média. Após a administração do CMX os animais ficavam agitados e ingeriam grande quantidade de água e, após alguns minutos, tornavam-se mais calmos.

Observou-se crescimento de *P. brasiliensis* em todos os sacrifícios, sem diferença entre as semanas tanto para pulmão quanto para baço (Tabelas 2 e 3 e Figura 3). Os níveis séricos de anticorpos específicos foram detectáveis no primeiro sacrifício, na 8ª semana, com titulação mediana de 1:4 e redução nas semanas seguintes (Tabela 4 e Figura 3).

### **3.1.2 Comparação de resposta ao tratamento entre grupos**

Houve maior recuperação de fungos de pulmões no grupo controle infectado em comparação ao grupo tratado com CMX duas vezes ao dia na 8ª e 12ª semanas. Na 20ª semana, o grupo controle infectado teve maior recuperação de fungos que os dois grupos tratados com CMX. Não houve diferença de crescimento fúngico entre os dois esquemas de tratamento com CMX (Tabela 3).

**Tabela 2.** Recuperação de fungos de pulmões de camundongos isogênicos BALB/c infectados com o isolado 326 de *Paracoccidioides brasiliensis*, conforme esquema terapêutico e tempo de tratamento. Quantificação de fungos em unidades formadoras de colônias por grama de tecido. Dados apresentados em mediana e intervalo interquartis.

Semana	CI (G2)	CMX1 (G3)	CMX2 (G4)
8 <sup>a</sup>	12.223,0 [10.400,0 – 20.000,0] <sup>A, a</sup>	4.861,0 [0,0 – 15.000,0] <sup>A, ab</sup>	1.875,0 [0,0 – 5.000,0] <sup>A, b</sup>
12 <sup>a</sup>	10.416,5 [6.000,0 – 12.400,0] <sup>A, a</sup>	2.933,5 [0,0 – 11.500,0] <sup>A, ab</sup>	124,0 [0,0 – 3.703,0] <sup>A, b</sup>
16 <sup>a</sup>	20.000,0 [5.557,0 – 24.443,0] <sup>A, a</sup>	3.000,0 [0,0 – 11.250,0] <sup>A, a</sup>	6075,0 [0,0 – 15.242,0] <sup>A, a</sup>
20 <sup>a</sup>	23.750,0 [5.557,0 – 40.000,0] <sup>A, a</sup>	0,0 [0,0 – 6.750,0] <sup>A, b</sup>	1.605,0 [0,0 – 12.785,0] <sup>A, b</sup>

CI (G2) = grupo controle infectado: animais que receberam solução fisiológica 0,9% por gavagem uma vez ao dia, do 28<sup>o</sup> ao 140<sup>o</sup> dia após infecção; CMX1 (G3) = animais que receberam cotrimoxazol 200 mg/kg/dia do sulfametoxazol administrado em dose única diária, por gavagem, do 28<sup>o</sup> ao 140<sup>o</sup> dia após a infecção; CMX2 (G4) = animais que receberam cotrimoxazol 200 mg/kg/dia do sulfametoxazol administrado em duas doses diárias (100 mg/kg a cada 12 horas), por gavagem, do 28<sup>o</sup> ao 140<sup>o</sup> dia após a infecção. Comparação entre medianas: Teste de Kruskal-Wallis e Dumm e Mann-Whitney. Letras maiúsculas comparam diferentes semanas dentro de um grupo enquanto que as letras minúsculas comparam a mesma semana entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ), sendo que a ou A > b ou B e ab ou AB não difere de a ou A nem de b ou B.

Comparação entre as semanas para cada grupo: G2 ( $p=0,85$ ), G3 ( $p=0,90$ ), G4 ( $p=0,89$ ).

Compração entre grupos. 8<sup>a</sup> semana: G2 vs G3 vs G4,  $p=0,09$ ; G2 > G4 ( $p=0,02$ ) e G3 não difere de G2 e G4. 12<sup>a</sup> semana: G2 vs G3 vs G4,  $p=0,02$ ; G2 > G4 ( $p=0,006$ ) e G3 não difere de G2 e G4. 16<sup>a</sup> semana: G2 vs G3 vs G4,  $p=0,48$ . 20<sup>a</sup> semana: G2 vs G3 vs G4,  $p=0,05$ ; G2 > G3 ( $p=0,03$ ) e G2 > G4 ( $p=0,05$ ).

A recuperação de fungos de baço foi maior no grupo controle infectado na 8<sup>a</sup> semana em comparação com grupo tratado com CMX uma vez ao dia. Na 16<sup>a</sup> e 20<sup>a</sup> semanas de tratamento o grupo controle infectado teve maior recuperação fúngica que o grupo tratado com CMX duas vezes ao dia. Não houve diferença de recuperação fúngica entre os grupos tratados com CMX (tabela 4).

**Tabela 3.** Recuperação de fungos de fragmentos de baço de camundongos isogênicos BALB/c infectados com o isolado 326 de *Paracoccidioides brasiliensis*, conforme esquema terapêutico e tempo de tratamento. Quantificação de fungos em unidades formadoras de colônias por grama de tecido. Dados apresentados em mediana e intervalo interquartis.

Semana	CI (G2)	CMX1 (G3)	CMX2 (G4)
8 <sup>a</sup>	13.333,0 [9.000,0 – 15.000,0] <sup>A, a</sup>	1.875,0 [0,0 – 45.000,0] <sup>A, b</sup>	3.888,5 [0,0 – 10.000,0] <sup>A, ab</sup>
12 <sup>a</sup>	35.000,0 [6.250,0 – 35.000,0] <sup>A, a</sup>	45.000,0 [0,0 – 105.000,0] <sup>A, a</sup>	7.322,0 [0,0 – 31.000,0] <sup>A, a</sup>
16 <sup>a</sup>	62.500,0 [5.200,0 – 80.000,0] <sup>A, a</sup>	14.375,0 [0,0 – 43.335,0] <sup>A, ab</sup>	450,0 [0,0 – 5.000,0] <sup>A, b</sup>
20 <sup>a</sup>	19.250,0 [11.000,0 – 20.000,0] <sup>A, a</sup>	4.100,0 [0,0 – 40.000,0] <sup>A, ab</sup>	0,0 [0,0 – 4.533,0] <sup>A, b</sup>

CI (G2) = grupo controle infectado: animais que receberam solução fisiológica 0,9% por gavagem uma vez ao dia, do 28<sup>o</sup> ao 140<sup>o</sup> dia após infecção; CMX1 (G3) = animais que receberam cotrimoxazol 200 mg/kg/dia do sulfametoxazol administrado em dose única diária, por gavagem, do 28<sup>o</sup> ao 140<sup>o</sup> dia após a infecção; CMX2 (G4) = animais que receberam cotrimoxazol 200 mg/kg/dia do sulfametoxazol administrado em duas doses diárias (100 mg/kg a cada 12 horas), por gavagem, do 28<sup>o</sup> ao 140<sup>o</sup> dia após a infecção. Comparação entre medianas: Teste de Kruskal-Wallis e Dumm e Mann-Whitney. Letras maiúsculas comparam diferentes semanas dentro de um grupo enquanto que as letras minúsculas comparam a mesma semana entre

os grupos. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ), sendo que a ou A > b ou B e ab ou AB não difere de a ou A nem de b ou B.

Comparação entre as semanas para cada grupo: G2 ( $p=0,97$ ), G3 ( $p=0,40$ ), G4 ( $p=0,52$ ).

Comparaçãõ entre grupos. 8ª semana: G2 vs G3 vs G4,  $p=0,09$ ; G2 > G3 ( $p=0,04$ ) e G4 não difere de G2 e G3. 12ª semana: G2 vs G3 vs G4,  $p=0,46$ . 16ª semana: G2 vs G3 vs G4,  $p=0,07$ ; G2 > G4 ( $p=0,02$ ) e G3 não difere de G2 e G4. 20ª semana: G2 vs G3 vs G4,  $p=0,04$ ; G2 > G4 ( $p=0,005$ ) e G3 não difere de G2 e G4.

O grupo tratado com CMX uma vez ao dia tiveram maiores níveis de anticorpos séricos, determinados pela reação de imunodifusão dupla em gel de agar, na 8ª semana comparados ao grupo controle infectado. Na 20ª semana, ambos os grupos tratados com CMX tiveram títulos de anticorpos menores que o grupo controle infectado. Na 8ª semana de tratamento, houve uma tendência de menores títulos de anticorpos no grupo tratado com CMX duas vezes ao dia (1:4) comparado ao grupo tratado uma vez ao dia (1:16;  $p=0,08$ ) [tabela 5].

**Tabela 4.** Níveis séricos de anticorpos específicos determinados pela reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, em camundongos isogênicos BALB/c infectados com o isolado 326 de *Paracoccidioides brasiliensis*, conforme esquema terapêutico e tempo de tratamento. Dados apresentados em mediana e intervalo interquartis.

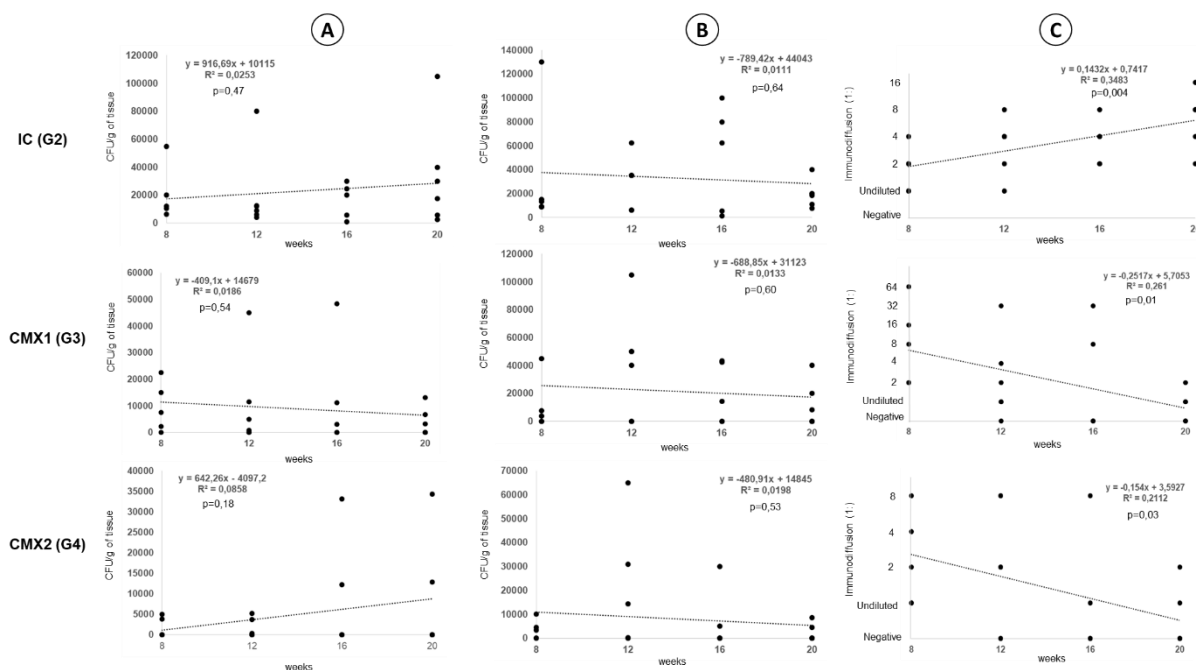
Semana	CI (G2)	CMX1 (G3)	CMX2 (G4)
8ª	1:2 [ND – 1:2] <sup>B, b</sup>	1:16 [1:2 – 1:16] <sup>A, a</sup>	1:4 [ND – 1:4] <sup>A, ab</sup>
12ª	1:4 [1:2 – 1:4] <sup>AB, a</sup>	1:2 [ND – 1:4] <sup>AB, a</sup>	1:2 [NR – 1:8] <sup>AB, a</sup>
16ª	1:4 [1:2 – 1:4] <sup>AB, a</sup>	NR [NR – 1:8] <sup>AB, a</sup>	ND [NR – ND] <sup>AB, a</sup>
20ª	1:8 [1:4 – 1:8] <sup>A, a</sup>	ND [NR – ND] <sup>B, b</sup>	NR [NR – ND] <sup>B, b</sup>

CI (G2)= grupo controle infectado: animais que receberam solução fisiológica 0,9% por gavagem uma vez ao dia, do 28º ao 140º dia após infecção; CMX1 (G4) = animais que receberam cotrimoxazol 200 mg/kg/dia (baseado no sulfametoxazol) administrado em dose única diária, por gavagem, do 28º ao 140º dia após a infecção; CMX2 (G3) = animais que receberam cotrimoxazol 200 mg/kg/dia (baseado no sulfametoxazol) administrado em duas doses diárias (100 mg/kg a cada 12 horas), por gavagem, do 28º ao 140º dia após a infecção. ND = soro não diluído; NR = não reagente.

Comparação entre medianas: Teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Letras maiúsculas comparam diferentes semanas dentro de um grupo enquanto que as letras minúsculas comparam a mesma semana entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ), sendo que a > b, A > B, ab não difere de a ou de b.

Comparação entre as semanas para cada grupo: G2: 8ª vs 20ª semana  $p=0,02$ ; G3: 8ª vs 20ª semana  $p=0,005$ ; G4: 8ª vs 16ª semana  $p=0,08$  e 8ª vs 20ª semana  $p=0,01$ .

Comparação entre grupos: G3 vs G4 na 8ª semana  $p=0,08$ ; G2 vs G4 na 16ª semana  $p=0,05$ .

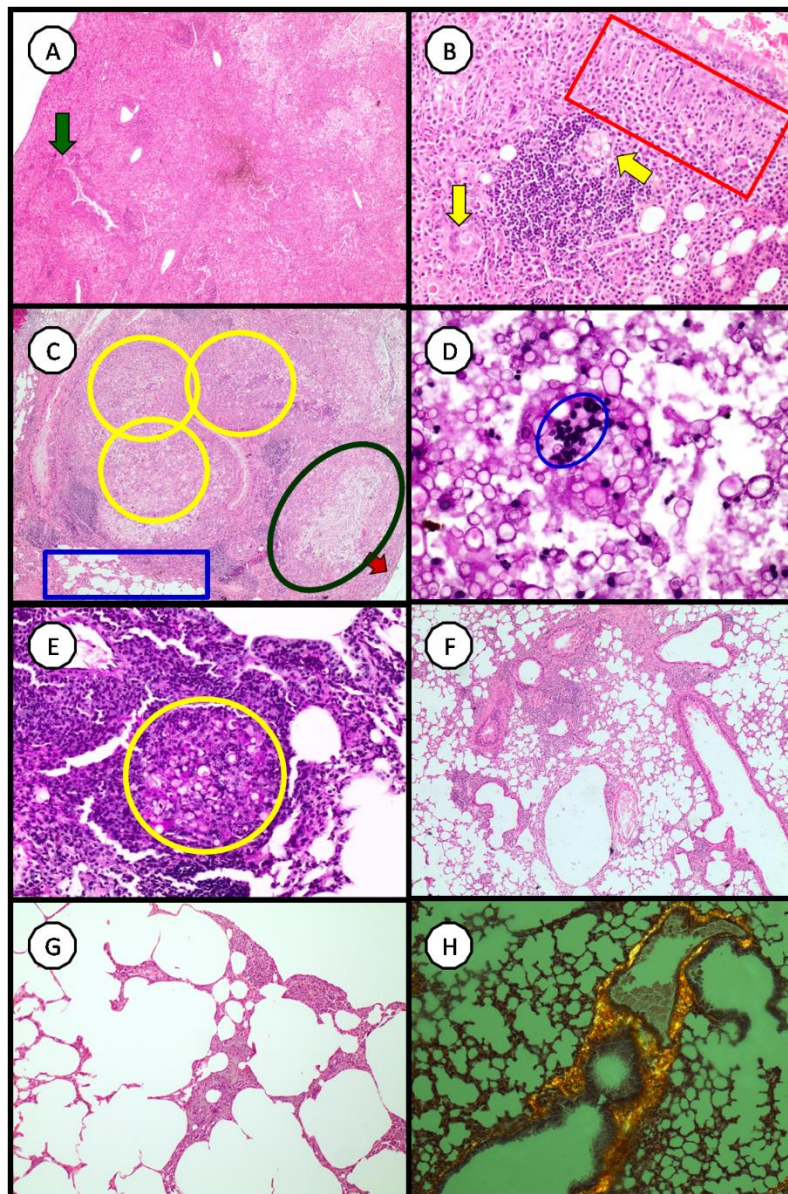


**Figura 3.** Recuperação fúngica em pulmão (A), baço (B) e determinação dos níveis séricos de anticorpos específicos, determinados pela reação de imunodifusão dupla em gel de ágar (C), em camundongos isogênicos BALB/c infectados com o isolado 326 de *Paracoccidioides brasiliensis*, conforme esquema terapêutico e tempo de tratamento, analisados por regressão linear. CI (G2) = grupo controle infectado: animais que receberam solução fisiológica 0,9% por gavagem uma vez ao dia, do 28<sup>o</sup> ao 140<sup>o</sup> dia após infecção; CMX1(G3) = animais que receberam cotrimoxazol 200 mg/kg/dia (baseado no sulfametoxazol) administrado em dose única diária, por gavagem, do 28<sup>o</sup> ao 140<sup>o</sup> dia após a infecção; CMX2 (G4)= animais que receberam cotrimoxazol 200 mg/kg/dia (baseado no sulfametoxazol) administrado em duas doses diárias (100 mg/kg a cada 12 horas), por gavagem, do 28<sup>o</sup> ao 140<sup>o</sup> dia após a infecção.

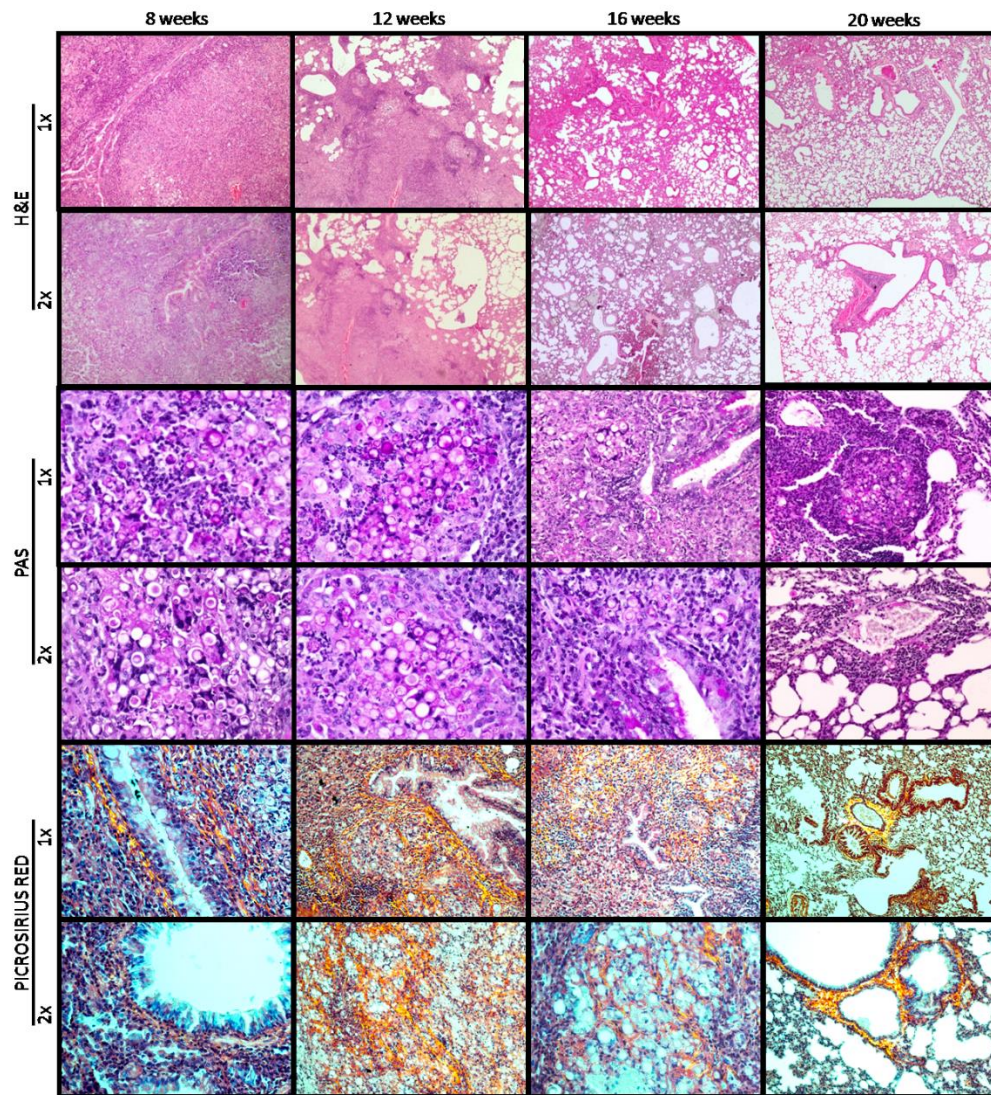
### 3.1.3 Avaliação histopatológica

A minuciosa avaliação histomorfológica revela, ao menor aumento, nos grupos controle, de 8 e de 12 semanas, intensa e extensa reação granulomatosa acometendo todo o eixo broncovascular (Figura 4A – seta verde) com ampla extensão parenquimatosa ora por granulomas epitelióides compactos confluentes ora por uma pneumonia descamativa símile, mas todos com uma alta carga paracoccidioidomicótica. Ao maior aumento, percebe-se células gigantes com fungos (Figura 4B - setas amarelas) bordeando a interface entre granulomas com agregados linfóides e a reação pneumônica descamativa-símile (Figura 4B – retângulo vermelho), a qual é composta por macrófagos preenchendo completamente os alvéolos e sacos alveolares, muitos dos quais com fungos intracitoplasmáticos. Com o passar das semanas, entre 12 e 16 semanas, essas extensas áreas de acometimento tornam-se mais delimitadas, formando grandes nodulações broncoparenquimatosas contituídas por granulomas confluentes (Figura 4C – círculos amarelos), ora com necrose de coagulação central (Figura 4C – círculo verde), circundadas por áreas parenquimatosas de aspecto habitual (Figura 4C – retângulo azul). Nota-se ainda dentro dos granulomas intensa atividade fúngica, especialmente na necrose intragranulomatosa, com proliferações intracitoplasmáticas nas células gigantes com rompimento de sua membrana plasmática celular e núcleos picnóticos (Figura 4D – círculo azul). Com o evoluir da lesão nas semanas finais, entre 16 e 20 semanas, observa-se pequenos granulomas bem formados no eixo broncovascular (Figura 4E – círculo amarelo), por vezes com alguma confluência interbronquiolar (Figura 4F). No estágio tardio, na semana 20, destaca-se o remodelamento peribronquiolar com bronquioloectasia de tração e extensão subpleural (Figura 4G) com evidente deposição de matriz extracelular peribronquiolar (Figura 4H, coloração de picrossirius). Ressalta-se aqui a ausência de fibras birrefringentes verdes nesta última coloração (Figura 4H), correspondente as fibras reticulares, sugerindo uma distorção tridimensional do arranjo arquitetural matricial fibrilar.

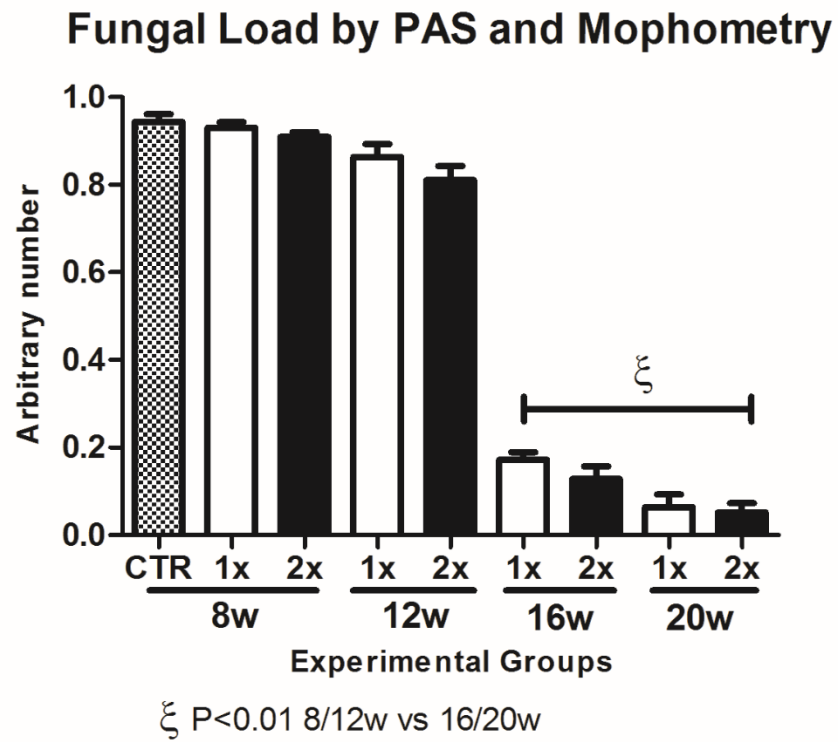
A análise histopatológica comparando os dois esquemas terapêuticos com CMX encontra-se na figura 5. A medida de carga fúngica realizada no exame histopatológico, utilizando-se a coloração de PAS, revelou redução nas semanas 16 e 20 para ambos os tratamentos quando comparados com a semana 8 e 12 e com o grupo controle infectado ( $p < 0,01$ ). Não houve diferença entre os dois esquemas terapêuticos com CMX (Figura 6). Na determinação da porcentagem de fibras colágenas por área peribronquiolar, utilizando-se a coloração de Picosirius, foi possível observar um aumento do depósito de colágeno na semana 12 para ambos os tratamentos. Na semana 20, observou-se menos fibras colágenas que na semana 12 e mais que o grupo controle para ambos os tratamentos ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença entre os esquemas terapêuticos utilizados (Figura 7).



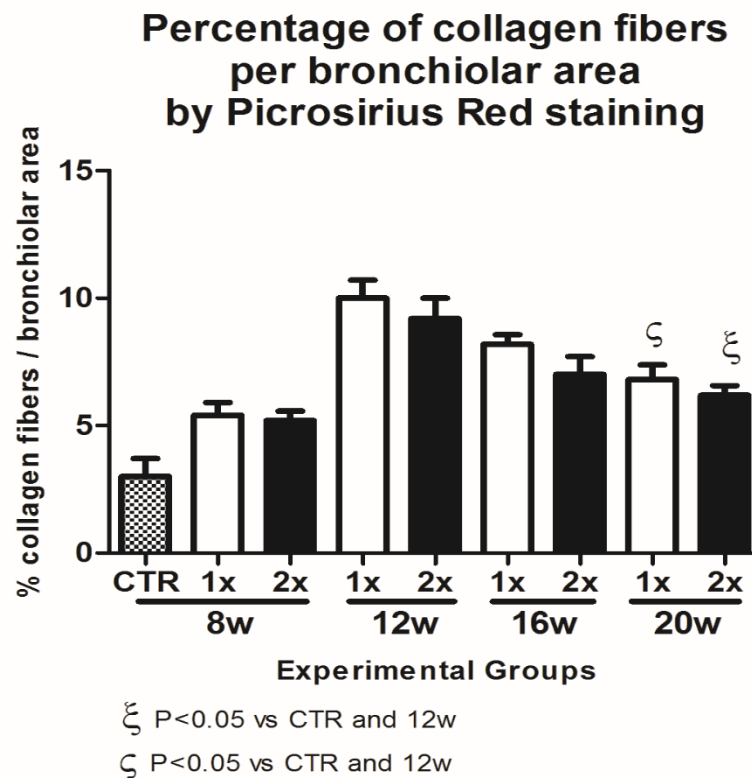
**Figura 4.** Painel Histomorfológico das lesões induzidas por *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb). A - Reação granulomatosa parênquimatosa e peribronquiolar (seta verde). B - Pneumonia descamativa símile Pb-induzida (retângulo vermelho), células gigantes com fungos (setas amarelas) com agregados linfóides. C - Nodulações granulomas broncoparenquimatosas confluentes (círculos amarelos), ora com necrose de coagulação central (círculo verde), circundadas por áreas parenquimatosas de aspecto habitual (retângulo azul). D - Proliferações intracitoplasmáticas nas células gigantes com rompimento de sua membrana plasmática celular e núcleos picnóticos (círculo azul). E - Pequenos granulomas bem formados peribronquiolar (círculo amarelo). F - Confluência interbronquiolar. G - Remodelamento peribronquiolar com bronquioloectasia de tração e extensão subpleural. H - Deposição de matriz extracelular peribronquiolar (coloração de picrossirius).



**Figura 5.** Painel Histomorfológico com evolução temporal da lesão relacionado a carga fungica e deposição de matriz, conforme o esquema terapêutico de cotrimoxazol. Note que a intensa e extensa reação granulomatosa e pneumonia descamativa-símile das primeiras semanas evolui para remodelamento peribronquiolar na última semana (H&E). Também se observa redução da carga fúngica (PAS), assim como aumento seguido por redução progressiva, mas maior nível do que o controle (coloração de picrossirius). 1x - animais que receberam cotrimoxazol 200 mg/kg/dia do sulfametoxazol administrado em dose única diária, por gavagem, do 28° ao 140° dia após a infecção; 2x - animais que receberam cotrimoxazol 200 mg/kg/dia do sulfametoxazol administrado em duas doses diárias (100 mg/kg a cada 12 horas), por gavagem, do 28° ao 140° dia após a infecção.



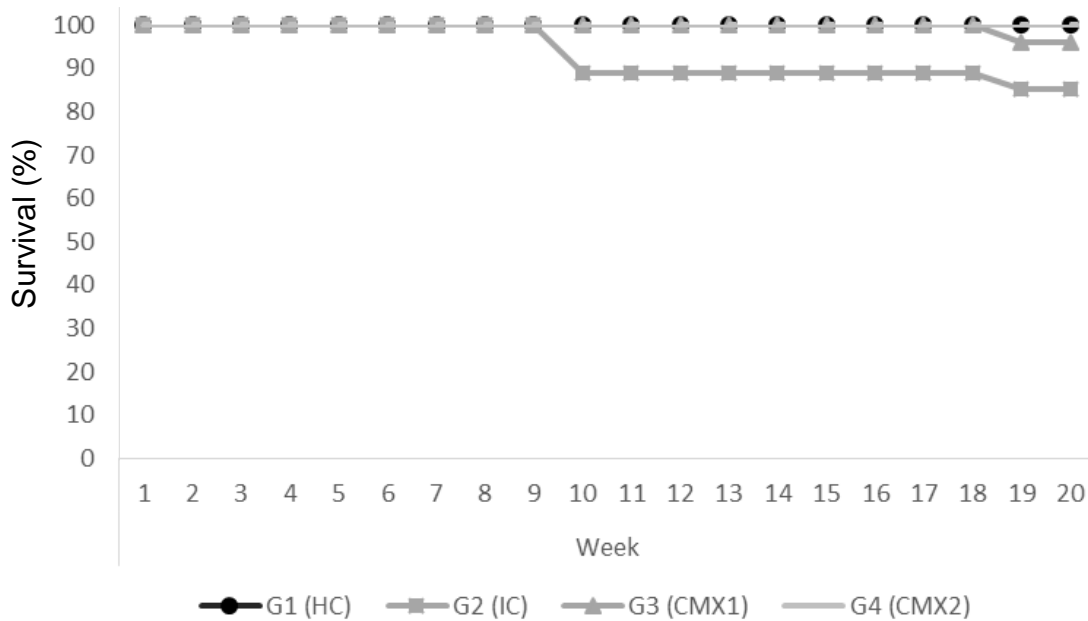
**Figura 6.** Determinação da carga fúngica pelo exame histopatológico de pulmão pela coloração de ácido periódico de Schiff (PAS) em camundongos machos, isogênicos, Balb/c, infectados pelo isolado 326 de *Paracoccidioides brasiliensis*, conforme o esquema terapêutico utilizado.



**Figura 7.** Porcentagem de fibras colágenas por área peribronquiolar, medidas pela coloração de Picrosirius, de pulmão de camundongos machos, isogênicos, Balb/c, infectados pelo isolado 326 de *Paracoccidioides brasiliensis*, conforme o esquema terapêutico utilizado. CTR – controle infectado; 1x - animais que receberam cotrimoxazol 200 mg/kg/dia do sulfametoxazol administrado em dose única diária, por gavagem, do 28° ao 140° dia após a infecção; 2x - animais que receberam cotrimoxazol 200 mg/kg/dia do sulfametoxazol administrado em duas doses diárias (100 mg/kg a cada 12 horas), por gavagem, do 28° ao 140° dia após a infecção. Comparação entre momentos e grupos: teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

### 3.2 Experimento II – Avaliação da sobrevida

Na avaliação de sobrevida cumulativa observou-se que não houve óbito no grupo controle saudável e nem no grupo tratado com CMX duas vezes ao dia. No grupo controle infectado a mortalidade foi de 14,8% enquanto não se observou diferença na sobrevida entre os grupos tratados (Figura 7).



**Figura 8:** Curva de sobrevivência cumulativa de camundongos isogênicos BALB/c infectados com a cepa 326 de *Paracoccidioides brasiliensis*, conforme esquema terapêutico e tempo de tratamento. G1 (HC) = grupo controle saudável constituído de animais sem infecção e que receberam solução fisiológica 0,9%, por gavagem (mortalidade = 0,0%); G2 (IC) = grupo controle infectado: animais que receberam solução fisiológica 0,9% por gavagem uma vez ao dia, do 28º ao 140º dia após infecção (mortalidade = 14,8%); G3 (CMX1) = animais que receberam cotrimoxazol 200 mg/kg/dia (baseado no sulfametoxazol) administrado em dose única diária, por gavagem, do 28º ao 140º dia após a infecção (mortalidade = 4,0%); G4 (CMX2) = animais que receberam cotrimoxazol 200 mg/kg/dia (baseado no sulfametoxazol) administrado em duas doses diárias (100 mg/kg a cada 12 horas), por gavagem, do 28º ao 140º dia após a infecção (mortalidade = 0,0%). Análise da curva de sobrevivência realizada pelo teste de Kaplan-Meier.

### 3.3 Experimento III – Determinação dos níveis séricos de cotrimoxazol e concentração inibitória mínima de *Paracoccidioides brasiliensis*.

Os níveis séricos da fração livre do sulfametoxazol, após 10 dias de administração de cotrimoxazol, por gavagem, na dose diária de 200 mg/kg de peso corporal, divididos em duas doses diárias e em uma única tomada são apresentados na tabela 5. Os resultados revelam que os valores máximos foram observados seis horas após a última administração do CMX. O isolado 326 de *P. brasiliensis* apresentou sensibilidade ao CMX com uma concentração inibitória mínima de 40 µg. mL<sup>-1</sup>.

**Tabela 5.** Dosagem sérica da sulfametoxazol em 40 animais tratados com cotrimoxazol (CMX), dos quais 20 receberam 200 mg/kg uma vez ao dia, às 24:00h (CMX1) e outros 20, 100 mg/kg duas vezes ao dia, às 12:00h e às 24:00h (CMX2), por um período de 10 dias de tratamento. A primeira dosagem (6h00) foi realizada seis horas após a última dose do CMX. Resultados apresentados em mediana e intervalo interquartis.

Hora da dosagem	CMX1	CMX2
6h00	58,21 [33,95 – 64,02]	29,30 [26,86 – 35,62]
12h00	5,51 [4,48 – 5,78]	3,55 [2,98 – 4,85]
18h00	2,43 [2,24 – 5,41]	3,36 [2,05 – 4,58]
24h00	2,42 [1,68 – 2,43]	3,36 [2,61 – 4,48]

#### 4. Discussão

Na atualidade, o desenvolvimento de um medicamento anti-infeccioso passa por diversas etapas até estar disponível para uso clínico. Inicialmente, trabalha-se com a molécula da droga. Depois são realizados estudos *in vitro* para se verificar a sensibilidade aos microrganismos aos quais se pretende combater. Segue-se os estudos com experimentação animal para se avaliar a farmacocinética e farmacodinâmica (Pk/Pd) da droga, bem como sua segurança e eficácia. Por fim, são conduzidos os ensaios clínicos em diversas fases para se conhecer a segurança, tolerabilidade, eficácia e efetividade nos seres humanos.

O CMX tem sido utilizado para tratamento de pacientes com PCM desde 1973, quando Barbosa e Vasconcelos demonstraram a eficácia desta droga em 35 indivíduos com esta micose <sup>(20)</sup>. Na época, não se dispunha dos mesmos conhecimentos da medicina baseada em evidência que se tem na atualidade, de forma que a etapa dos estudos em animal de experimentação para se conhecer o comportamento do CMX diante da PCM ocorreram posteriormente. Mesmo assim, ainda existem poucas pesquisas na área, de tal modo que ainda não é conhecido o mecanismo de ação desta droga sobre o *P. brasiliensis*.

O tratamento da PCM continua sendo alvo de estudos na pesquisa clínica e experimental. Os trabalhos revelam que não existe uma padronização dos modelos animais, utilizados na avaliação da eficácia de antifúngicos. Existem diferenças quanto à espécie, sexo, idade do animal, cepa infectante utilizada, o tamanho do inóculo, a via de administração, doses utilizadas e a duração do tratamento. Desta forma, é difícil realizar uma análise comparativa dos resultados observados neste estudo com os da literatura.

Apesar disso, os modelos experimentais são importantes para avaliação da eficácia

dos antifúngicos antes que os testes sejam realizados em humanos, pois conseguem mimetizar o cenário observado nos pacientes com PCM.

Embora existam evidências de que o itraconazol seja superior ao CMX no tratamento da PCM <sup>(21,22)</sup>, principalmente para tratamento de casos leves e moderados <sup>(23)</sup>, o CMX continua sendo amplamente utilizado no Brasil, principalmente pela facilidade de acesso pelos pacientes, pois sua distribuição é gratuita na rede pública de saúde. Os esquemas terapêuticos com CMX no tratamento da PCM são variáveis nos diversos Serviços que atendem pacientes com esta enfermidade e não existem trabalhos publicados que comparem esquemas terapêuticos com CMX na terapia da PCM.

No presente estudo foi utilizado a dose diária total de 200 mg/kg de sulfametoxazol que revelou eficácia terapêutica na PCM experimental, seja administrada em tomada única ou duas vezes ao dia. Em ambos os esquemas observou-se queda dos níveis séricos de anticorpos entre a 8ª e a 20ª semanas de tratamento. Também foi revelado redução da carga fúngica pulmonar, no exame histopatológico, nas semanas 16 e 20. Devido a dificuldades técnicas, não foi possível realizar o exame histopatológico de baço.

A dose única diária de 200 mg/kg de sulfametoxazol já foi estudada por Carvalho <sup>(8)</sup>, que observou redução da carga fúngica no baço em camundongos Balb/c, mas não em pulmões e nem no nível sérico de anticorpos. Esta foi a única pesquisa encontrada na literatura que utilizou o mesmo modelo animal e mesmo esquema terapêutico que presente estudo, porém não foi realizada a contagem da carga fúngica na análise histopatológica.

Outros autores também demonstraram eficácia do CMX no tratamento da PCM experimental, utilizando modelos animais e esquemas de tratamento diferentes. Scavone & Burger observaram eficácia nos animais tratados com CMX na dose de 150 mg/kg ao dia pela redução da recuperação fúngica em pulmões e baço após 150 dias da infecção <sup>(5)</sup>. O mesmo fenômeno também foi observado por Lourenço e colaboradores após 13 dias de tratamento com 60 mg/kg de CMX <sup>(6)</sup>. Granzoto e colaboradores, em ratos tratados com CMX 120 a 150 mg/kg/dia, também observaram redução da carga fúngica pulmonar e esplênica com três semanas de terapia <sup>(24)</sup>. Nos três estudos, a eficácia foi encontrada quando a terapia com CMX era iniciada mais precocemente (24 h a 7 dias após infecção). Esta pode ser uma justificativa para não se ter observado o mesmo efeito no presente estudo.

Além da variação do modelo animal e da terapia, outro fator que torna difícil a comparação entre estes tratamentos é que o isolado de *P. brasiliensis* utilizado nestas pesquisas experimentais também foram diferentes. Neste estudo, utilizou-se o isolado Pb 326, obtido de uma paciente acompanhada pelo Serviço de Infectologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, que apresentava forma aguda/subaguda grave, o que pode sugerir ser um isolado mais virulento e, portanto, mais difícil de se alcançar o controle da doença. O isolamento de *P. brasiliensis*, após longo período de tratamento, em

ambos os esquemas terapêuticos indica a dificuldade e talvez mesmo de se alcançar a impossibilidade a uma cura radical, isto é a erradicação. Este fenômeno explicaria as reativações observadas na prática clínica, sob forma de recrudescência e de recaída, tornando necessária a realização de tratamento prolongado nos pacientes com PCM para permitir uma recuperação da resposta imune celular, responsável pela manutenção dos fungos viáveis em estado de latência, apesar da ação do antifúngico. Além disso, deve-se registrar que entre os antifúngicos disponíveis, apenas a anfotericina B é fungicida.

A mortalidade cumulativa dos animais dos grupos que receberam CMX foi muito baixa. No grupo tratado em dose única diária apenas um camundongo morreu, o que trouxe uma taxa de mortalidade cumulativa de 4,0%. Já no grupo tratado em duas doses diárias não houve óbito de animais. A comparação entre estes grupos não demonstrou diferença. Provavelmente, esta baixa taxa de mortalidade deveu-se ao tratamento prolongado de 140 dias. No estudo de Carvalho, dois grupos de animais tratados por 140 dias, um com início precoce e outro tardio do CMX, revelaram 10,7 e 11,8% de óbito, enquanto que o grupo tratado por apenas 56 dias esta taxa foi de 28,6%<sup>(8)</sup>. O mesmo fato pode ser corroborado no estudo de Granzoto e colaboradores em que o tratamento com CMX foi realizado por apenas 12 dias em ratos infectados e observou-se uma mortalidade de aproximadamente 50%<sup>(24)</sup>. Como comentado anteriormente, este achado também reforça a necessidade do tratamento prolongado na PCM, para permitir a recuperação da resposta imune celular.

Um interessante achado deste estudo foi o depósito de fibras colágenas bronquiolares. Foi observado um pico de produção de colágeno na semana 12, com redução na semana 20, para ambos os esquemas terapêuticos. Este é o comportamento esperado, segundo os modelos de fibrose pulmonar, por exemplo bleomicina, que mostram um pico de produção colagênica entre 14 e 21 dias após a injúria aguda, com posterior remodelamento parenquimatoso que evolue com organização e resolução da fibrose após cerca de 2 meses. Embora tenha havido redução do depósito de colágeno na 20ª semana ela ainda permanece maior que o controle, indicando que o tratamento antifúngico possa exercer algum papel no processo de reparo tecidual.

O modelo de Pk/Pd do CMX ainda é pouco conhecido<sup>(25)</sup>. Neste estudo, foi realizada a dosagem sérica do sulfametoxazol e também determinada a CIM do isolado 326 de *P. brasiliensis* frente ao CMX (experimento III). Embora esta avaliação não tenha um desenho específico para um estudo de Pk/Pd, algumas observações podem ser feitas. Observa-se que na maior parte do dia os níveis séricos estão abaixo da CIM e, mesmo assim, os animais responderam ao tratamento. Apenas a dosagem de 6h00 na dose única diária mostrou-se com mediana acima de 40 µg. mL<sup>-1</sup>. Sabe-se que o pico sérico do CMX é alcançado com 1 a 2 horas após a administração via oral, o que, devido ao momento da dosagem, não pode ser observado neste estudo. Para que tenha ocorrido resposta terapêutica em ambos os

esquemas é provável que o CMX tenha um comportamento concentração-dependente, no qual o nível sérico máximo atingido deva ser determinante no efeito antifúngico.

O principal objetivo deste estudo foi comparar os dois esquemas de tratamento da PCM experimental com CMX, uma e duas tomadas diárias. Em todos os parâmetros avaliados, não foram observadas diferenças com significância estatística. No entanto, alguns pontos chamam a atenção e devem ser ressaltados. Na oitava semana, houve uma tendência ( $p=0,08$ ) de maior queda do nível sérico de anticorpos no grupo tratado duas vezes ao dia, o que sugere que este esquema poderia oferecer uma terapêutica mais rápida. Também corrobora com este achado o fato de o grupo tratado duas vezes ao dia apresentar menor recuperação fúngica dos pulmões na 8ª e 12ª semanas quando comparado ao controle infectado, o que não aconteceu com o grupo da terapia única diária. O mesmo fenômeno se repetiu na recuperação fúngica do baço nas semanas 16 e 20. Estas observações devem ser consideradas, antes que se afirme que realmente a eficácia entre dose única e duas tomadas diárias sejam semelhantes. O pequeno número de animais em cada grupo e momento de avaliação e o fato de os granulomas, observados na análise histopatológica, serem realmente massas granulomatosas, até com necrose central, dificultando a penetração do CMX nestes tecidos, podem explicar a ausência de diferenças entre os esquemas terapêuticos estudados.

Este foi um estudo inédito por comparar o tratamento da PCM com dose única e duas tomadas diárias do CMX. Ambos os esquemas demonstraram ação terapêutica sobre camundongos infectados por *P. brasiliensis*, sem diferenças entre os grupos, embora observam-se sinais de que o uso a cada 12 horas possa oferecer um tratamento mais precoce.

*Conclusões*

Este estudo permitiu concluir:

- 1) O tratamento da PCM experimental com CMX da dose de 200 mg/kg de sulfametoxazol foi eficaz sendo dada uma ou duas vezes ao dia;
- 2) Os grupos tratados com CMX um ou duas vezes ao dia apresentaram resultados semelhantes quanto aos parâmetros avaliados;
- 3) O grupo tratado duas vezes ao dia com CMX foi claramente superior ao grupo controle infectado;
- 4) A recuperação de fungos na 20ª semana de infecção corrobora a necessidade de tratamentos prolongados na PCM, pela dificuldade de se eliminar o fungo dos tecidos;
- 5) A baixa mortalidade encontrada neste estudo também reforça a necessidade de tratamentos prolongados;
- 6) Embora este estudo não tenha um desenho próprio para estudos de Pk/Pd, seus achados sugerem que o CMX se comporta como droga concentração-dependente no tratamento da PCM.

*Referências bibliográficas*

1. Mendes RP, Cavalcante RS, Marques AS, Marques MEA, Venturini J, Sylvestre TF et al. Paracoccidioidomycosis: current perspectives from Brazil. *The Open Microbiol J*. In press 2017.
2. Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJA, Fernandes L, Paes HC, Hahn, RC et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2009; 52: 273–283.
3. Queiroz-Telles F, Colombo AL and Nucci M (1998) Comparative efficacy of cotrimoxazole and itraconazole in the treatment of paracoccidioidomycosis. 38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Diego, CA, USA, abstract J-142
4. Mendes RP, Moris DV, Cavalcante RS. Treatment compliance in paracoccidioidomycosis. In: X International Congress on Paracoccidioidomycosis, 2008, Medellin. *Biomédica - Proceedings of the X International Congress on Paracoccidioidomycosis*. Bogotá: Instituto Nacional de Salud, 2008. v.28. p.103 – 105.
5. Scavone R, Burger E. Paracoccidioidomycosis: reduction in fungal load and abrogation of delayed-type hypersensitivity anergy in susceptible inbred mice submitted to therapy with trimethoprim-sulfamethoxazole. *Med Microbiol Immunol* 2004; 193(1): 53-9.
6. Lourenço DS, Malta MHB, Afonso AO, Martinez R. Persistência do efeito antifúngico após interrupção do tratamento na paracoccidioidomicose experimental. XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, I Encontro de Medicina Tropical do Cone Sul; 2005, março, 6 a 10; Florianópolis, Brasil. *Florianópolis; 2005: 38 (supl. 1): p.163*
7. Lourenço DS, Malta MHB, Afonso AO, Martinez R. Avaliação comparativa das drogas antifúngicas no tratamento da paracoccidioidomicose do rato. XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, I Encontro de Medicina Tropical do Cone Sul; 2005, março, 6 a 10; Florianópolis, Brasil. *Florianópolis; 2005: 38 (supl. 1): p.163*.
8. Carvalho FM. Avaliação da associação sulfametoxazol-trimeotprim no tratamento da paracoccidioidomicose experimental murina. [Dissertação]. Pós-Graduação em Doenças Tropicais: Faculdade de Medicina de Botucatu / UNESP; 2006.
9. Fava Netto C. Contribuição para o estudo imunológico da Blastomicose de Lutz. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1961; 21: 99-194.
10. Calich VLG, Purchio A, Paula CR. A new fluorescent viability test for fungi cells. *Mycopathologia* 1978; 66: 175-77.
11. Restrepo A, Jimenez BE. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined medium. *J Clin Microbiol* 1980; 12: 279-81.
12. Fabro AT, da Silva PH, Zocolaro WS, de Almeida MS, Rangel MP, de Oliveira CC, Minatel IO, Prando ED, Rainho CA, Teodoro WR, Velosa AP, Saber AM, Parra-Cuentas ER, Popper HH, Capelozzi VL. The Th17 pathway in the peripheral lung microenvironment interacts with expression of collagen V in the late state of experimental pulmonary fibrosis. *Immunobiology*. 2015; 220(1):124-35.

13. Hsia CC, Hyde DM, Ochs M, Weibel ER; ATS/ERS Joint Task Force on Quantitative Assessment of Lung Structure. An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: standards for quantitative assessment of lung structure. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010; 181(4):394-418.
14. Restrepo A. La prueba de inmunodifusion en el diagnostico de la paracoccidioidomicosis. *Sabouraudia* 1966; 4:223-230.
15. Bratton AC, Marshall EK, Jr. A new coupling component for sulfanilamide determination. *J. Biol Chem* 1939; 128: 537-550.
16. Joos B, Blaser J, Opravil M, Chave JP, Lüthy R. Monitoring of co-trimoxazole concentrations in serum during treatment of pneumocystis carinii pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39(12):2661-
17. Paula e Silva ACA, Oliveira HC, Silva JF, Sangalli-Leite F, Scorzoni L et al. Microplate alamarBlue Assay for *Paracoccidioides* Susceptibility Testing. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013; 51(4): 1250–1252.
18. Cruz RC, Werneck MC, Oliveira CS et al. Influence of Different Media, Incubation Times, and Temperatures for Determining the MICs of Seven Antifungal Agents against *Paracoccidioides brasiliensis* by Microdilution. *Journal of Clinical Microbiology* 2013; 51(2): 436–443.
19. Zar JH. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, 4 ed. New Jersey, 1999, 663p.
20. Barbosa W & Vasconcelos WM. Ação da sulfamatoxazol associada a trimetoprim na terapêutica da blastomicose sul-americana. *Rev Pat Trop* 1973; 2: 329-339.
21. Cavalcante RS, Sylvestre TF, Levorato AD, de Carvalho LR, Mendes RP. Comparison between Itraconazole and Cotrimoxazole in the Treatment of Paracoccidioidomycosis. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8(4): e2793. doi: 10.1371/journal.pntd.0002793.
22. Borges SR, Silva GM, Chambela Mda C, Oliveira Rde V, Costa RL, Wanke B, Valle AC. Itraconazole vs. trimethoprim-sulfamethoxazole: A comparative cohort study of 200 patients with paracoccidioidomycosis. *Med Mycol* 2014; 52(3):303-10.
23. Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Colombo AL et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2017; 50(5):715-740.
24. Granzoto DS, Vitali LH, Martinez R. Efficacy of voriconazole in experimental rat paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013; 46(1):79-83.
25. Vouloumanou EK, Karageorgopoulos DE, Rafailidis PI, Michalopoulos A, Falagas ME. Trimethoprim/sulfamethoxazole: evaluation of the available clinical and pharmacokinetic/pharmacodynamic evidence. *Int J Antimicrob Agents*. 2011; 38(3):197-216.

*Apêndices*

**Tabela 1:** Recuperação de fungos de fragmentos de pulmões de camundongos isogênicos BALB/c infectados com o isolado 326 *P. brasiliensis*, que receberam solução fisiológica 0,9%(GCI) por gavagem uma vez ao dia, por um período de 140 dias. Quantificação de fungos em unidades formadoras de colônias por grama de tecido.

Nº de Animais	Semanas de Sacrifício*			
	8 <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>
1	6250	4066,6	20000	2500
2	12223,3	12400	816,28	5556,7
3	20000	6000	5556,7	40000
4	55000	80000	30000	30000
5	10400	12000	24443,3	17500
6	...	8833,3	...	105000
<b>Mediana</b>	<b>1223,3</b>	<b>10416,65</b>	<b>20000</b>	<b>23750</b>

\*a contar do dia após a infecção

... Não foi realizado IDD - três animais morreram antes do primeiro sacrifício e um na 16<sup>o</sup> semana.

**Tabela 2:** Recuperação de fungos de fragmentos de baço de camundongos isogênicos BALB/c infectados com o isolado 326 *P. brasiliensis*, que receberam solução fisiológica 0,9%(GCI) por gavagem uma vez ao dia, por um período de 140 dias. Quantificação de fungos em unidades formadoras de colônias por grama de tecido.

Nº de Animais	Semanas de Sacrifício*			
	8 <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>
1	15000	35000	1450	40000
2	130000	35000	100000	18500
3	9000	6250	80000	110000
5	8890	35000	62500	20000
5	13333,3	62500	5200	7776,6
6	...	6250	...	20000
<b>Mediana</b>	<b>1333,3</b>	<b>35000</b>	<b>20000</b>	<b>20000</b>

\*a contar do dia após a infecção.

... Não foi realizado IDD - três animais morreram antes do primeiro sacrifício e um na 16<sup>o</sup> semana.

**Tabela 3:** Níveis séricos de anticorpos específicos determinados pela reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, em camundongos da linhagem BALB/c infectados com o isolado 326 *P. brasiliensis*, que receberam solução fisiológica 0,9%(GCi) por gavagem uma vez ao dia, do 28° ao 140° dia após infecção.

Nº de Animais	Semanas de Sacrifício*			
	8 <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>
1	4	4	2	2
2	2	2	2	4
3	ND	4	8	8
5	ND	ND	4	16
5	2	8	4	8
6	...	4	...	8
<b>Mediana</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>8</b>

\*a contar do dia após a infecção.

... Não foi realizado IDD - três animais morreram antes do primeiro sacrifício e um na 16° semana.

ND = reagente em soro não diluído.

**Tabela 4:** Recuperação de fungos de fragmentos de pulmões de camundongos isogênicos BALB/c infectados com o isolado 326 *P. brasiliensis*, que receberam solução de CMX por gavagem duas vezes ao dia, 28° ao 140° dia pós infecção. Quantificação de fungos em unidades formadoras de colônias por grama de tecido.

Nº de Animais	Semanas de Sacrifício*			
	8 <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>
1	5000	248	0	0
2	0	3703,7	33125	0
3	0	5200	0	0
5	3750	0	0	12785,7
5	0	0	12150	34286,6
6	15000	0	15242,86	0
<b>Mediana</b>	<b>1875</b>	<b>35000</b>	<b>6075</b>	<b>20000</b>

\*a contar do dia após a infecção.

**Tabela 5:** Recuperação de fungos de fragmentos de baço de camundongos isogênicos BALB/c infectados com o isolado 326 *P. brasiliensis*, que receberam solução de CMX por gavagem duas vezes ao dia, 28° ao 140° dia pós infecção. Quantificação de fungos em unidades formadoras de colônias por grama de tecido.

Nº de Animais	Semanas de Sacrifício*			
	8 <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>
1	0	14444	0	0
2	3333,5	65000	0	0
3	10000	0	0	8600
5	4444,3	200	30000	4533,3
5	0	0	5000	0
6	23333	31000	900	0
<b>Mediana</b>	<b>3888,9</b>	<b>7322,2</b>	<b>20000</b>	<b>0</b>

\*a contar do dia após a infecção.

**Tabela 6:** Níveis Séricos de Dosagem de sulfa livre em camundongos isogênicos BALB/c infectados com o isolado 326 *P. brasiliensis*, que receberam solução de CMX por gavagem duas vezes ao dia, 28° ao 140° dia pós infecção.

Nº de Animais	Semanas de Sacrifício*			
	8 <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>
1	4,22	101,9	2,74	4,22
2	1,48	68,78	8,44	4,43
3	3,16	69,62	3,16	2,02
5	2,74	62,24	5,7	2,91
5	1,26	14,35	6,54	2,24
6	4,68	49,68	7,42	3,58
<b>Mediana</b>	<b>2,95</b>	<b>65,51</b>	<b>6,12</b>	<b>3,245</b>

\*a contar do dia após a infecção.

**Tabela 7:** Níveis séricos de anticorpos específicos determinados pela reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, em camundongos da linhagem BALB/c infectados com o isolado 326 *P. brasiliensis*, que receberam que receberam solução de CMX por gavagem duas vezes ao dia, 28° ao 140° dia pós infecção.

Nº de Animais	Semanas de Sacrifício*			
	8 <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>
1	2	2	NR	NR
2	4	8	8	NR
3	ND	8	NR	NR
5	8	NR	NR	2
5	ND	NR	ND	ND
6	4	2	ND	NR
<b>Mediana</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>NR</b>	<b>NR</b>

\*a contar do dia após a infecção.

ND = reagente em soro não diluído.

NR = resultado negativo.

**Tabela 8:** Recuperação de fungos de fragmentos de pulmões de camundongos isogênicos BALB/c infectados com o isolado 326 *P. brasiliensis*, que receberam solução de CMX por gavagem uma vez ao dia, 28° ao 140° dia pós infecção. Quantificação de fungos em unidades formadoras de colônias por grama de tecido.

Nº de Animais	Semanas de Sacrifício*			
	8 <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>
1	7500	5000	11250	13157,89
2	2222,33	45000	0	6750
3	22500	866,7	0	0
5	15000	0	48333,33	0
5	0	11500	3000	0
6	0	0	...	3210
<b>Mediana</b>	<b>4861,165</b>	<b>2933,35</b>	<b>3000</b>	<b>1605</b>

\*a contar do dia após a infecção

... Não foi realizado IDD - um animal morreu antes do primeiro sacrifício e um na 16° semana.

**Tabela 9:** Recuperação de fungos de fragmentos de baço de camundongos isogênicos BALB/c infectados com o isoaldo 326 *P. brasiliensis*, que receberam solução de CMX por gavagem uma vez ao dia, 28° ao 140° dia pós infecção. Quantificação de fungos em unidades formadoras de colônias por grama de tecido.

Nº de Animais	Semanas de Sacrifício*			
	8 <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>
1	3750	0	14375	40000
2	0	50000	0	20117,65
3	0	50000	0	0
5	45000	105000	43335	0
5	7500	0	42500	0
6	0	40000	...	8200
<b>Mediana</b>	<b>1875</b>	<b>45000</b>	<b>14375</b>	<b>4100</b>

\*a contar do dia após a infecção

... Não foi realizado IDD - um animal morreu antes do primeiro sacrifício e um na 16° semana.

**Tabela 10:** Níveis Séricos de Dosagem de sulfa livre em camundongos isogênicos BALB/c infectados com o isolado 326 *P. brasiliensis*, que receberam solução de CMX por gavagem uma vez ao dia, 28° ao 140° dia pós infecção.

Nº de Animais	Semanas de Sacrifício*			
	8 <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>
1	2,32	48,52	22,6	16,88
2	1,48	133,54	3,16	4,22
3	6,54	109,71	3,16	3,59
5	2,81	61,2	3,16	5,14
5	2,81	75,95	3,16	8,28
6	4,68	78,65	...	7,43
<b>Mediana</b>	<b>2,81</b>	<b>75,95</b>	<b>3,16</b>	<b>5,14</b>

\*a contar do dia após a infecção

... Não foi realizado IDD - um animal morreu antes do primeiro sacrifício e um na 16° semana.

**Tabela 11:** Níveis séricos de anticorpos específicos determinados pela reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, em camundongos da linhagem BALB/c infectados com a cepa 326 *P. brasiliensis*, que receberam que receberam solução de CMX por gavagem uma vez ao dia, 28<sup>o</sup> ao 140<sup>o</sup> dia pós infecção

Nº de Animais	Semanas de Sacrifício*			
	8 <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>
1	64	2	8	2
2	16	32	NR	ND
3	2	ND	ND	NR
5	2	ND	32	NR
5	8	NR	ND	NR
6	16	4	...	ND
<b>Mediana</b>	<b>8</b>	<b>Puro</b>	<b>Puro</b>	<b>ND</b>

\*a contar do dia após a infecção.

... Não foi realizado IDD - um animal morreu antes do primeiro sacrifício e um na 16<sup>o</sup> semana.

ND = reagente em soro não diluído.

NR = resultado negativo.