Fabiana Moura de Carvalho

Avaliação da associação sulfametoxazol-trimetoprim no tratamento da paracoccidioidomicose experimental murina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, UNESP, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Titular Dr. Rinaldo Poncio Mendes

Botucatu
2006

A minha mãe Isabel I. Massarico de Moura *''in memorian'', que por meio da sua luta e dedicação, além de me dar a vida, foi a responsável direta por todas as minhas conquistas, sobretudo, meu estudo. Ensinou-me a viver com dignidade e respeito, inclusive, com relação aos meus semelhantes. Não tenho duvida que, através da sua luz, me deu ânimo e coragem para superar todos os obstáculos da vida, principalmente, com relação a esse trabalho. Meu agradecimento e amor serão eternos.*

Aos meus queridos irmãos, Fábio Rodrigo de Moura *e* Mauricio Marcelino de Moura Junior *meus companheiros, meus amigos e confidentes. O amor que nos une é a coisas que mais prezo na vida. Obrigada por toda a alegria que vocês me dão e por estarem sempre ao meu lado.*

Ao meu querido esposo Paulo Roberto Macedo de Carvalho*, companheiro de todos os momentos felizes e difíceis, agradeço pela paciência, dedicação, pelos conselhos, pelas lições de vida, por todo seu carinho e amor. Minha gratidão será eterna.*

Ao meu orientador Professor Dr. **Rinaldo "Tietê" Poncio Mendes**, *por toda ajuda, paciência, conselhos, pelo incentivo e confiança. Sua contribuição foi muito valiosa, enriquecendo-me como pessoa e como profissional. MUITO OBRIGADA POR TUDO.*

Ao meu amigo de todas as horas **Carlos Roberto Gonçalves de Lima** *(Carlinhos), por ter me mostrado a verdadeira amizade, sem cobrança e sem interesse, um dos meus anjos durante todos esses anos. Dizer obrigada é pouco pra demonstrar toda minha gratidão; você foi uma das pessoas fundamentais para que esse trabalho fosse realizado.*

Aos **pacientes** *atendidos no ambulatório de Blastomicose do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual Paulista – Unesp, que fizeram nascer em mim o interesse em tentar fazer algo para melhorar suas vidas.*

A Deus *que me dá todos os dias para que eu possa vivê-los da melhor forma possível, que me deu a oportunidade de realizar este trabalho.*

Ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais, principalmente a professora Dra. Jussara Marcondes Machado*, por ter me dado a oportunidade de desenvolver este trabalho, pela ajuda financeira e por tudo o que me proporcionou.*

A Professora Dra. Lídia Raquel de Carvalho*, do Departamento de Bioestatística do instituto de Biociências – Unesp, pela realização da análise estatística dos resultados encontrados neste trabalho e por toda a atenção.*

A todos os docentes *do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem.*

A todas as bibliotecárias *pela atenção, dedicação e por estarem sempre prontas a ajudar.*

Aos funcionários *da seção de pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, por todas as instruções, pela competência e cordialidade com todos nós.*

Aos queridos pós-graduandos do Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais, Eliana Peresi*,* Mariele Modolo Picka*,* Gabriel Langonni *e* Thaís Batista*, obrigada pela agradável convivência e por sua companhia.*

Aos aprimorandos do Laboratório de pesquisa de Doenças Tropicais, do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem Lidiane Ritsue*,* Priscila Caetano*,* Rodrigo Agustinho Cocato*,* Glaucia Ap. Gomes Cezário *por todos os favores e ajuda nos momentos de maior agonia.*

Aos funcionários do Laboratório de Imunodiagnóstico do departamento de Patologia Claudinei Jurandir Figueira*,* Izaira Maximo de Carvalho Prudente*, por toda a atenção a mim dispensada e por estarem sempre prontos a ajudar, vocês foram meus anjos da guarda.*

A Dra. Kunie Iabuki Rabello Coelho *e a Dra.* Sueli Aparecida Calvi*, por todos os conselhos e sugestões no exame de Qualificação, por ter tornado esse momento difícil muito agradável.*

Ao funcionário do Laboratório de Microscopia Eletrônica, Carlos César Ramos*, pela convivência agradável durante a coleta do material utilizado nesse trabalho.*

Ao funcionário da seção de fotodocumentação científica do Campus da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, Silvio Geraldo dos Santos Junior*, por tirar todas as fotos desse trabalho e por estar sempre pronto a ajudar.*

Às minhas queridas amigas Daniela Vanessa Moris *e* Renata A. Bueno*, por toda a ajuda no desenvolvimento deste trabalho, por toda paciência, conselhos e pela grande amizade. Saibam que a minha gratidão será eterna.*

Aos queridos amigos Cristina Crespo*,* Juliana Seger*,* Keila Siqueira Zaniboni*, por todos os momentos agradáveis que passamos juntas.*

A minha amiga Talísia C. Moreto*, por sempre estar ao meu lado me apoiando, me entendendo e sempre com uma palavra amiga. Obrigado por ser minha amiga, jamais te esquecerei.*

A Professora Dra. Débora Damasceno *por todos os conselhos, atenção e ajuda.*

Ao Sr. Edison Cardoso dos Santos*, a Dra.* Mônica Hamai *e ao Dr.* João Henrique Castro *por me ajudarem na realização deste trabalho respeitando minha escolha, com sua paciência e entendendo minha ausência. Vocês contribuíram muito para meu crescimento. Fica meu muito obrigada e minha gratidão.*

Ao senhor Ademir Natal Svicero *pelo incentivo constante, pela convivência enriquecedora do dia a dia, por toda sua compreensão e ajuda nos momentos que mais necessito.*

Capítulo I – Introdução 1

1. Aspéctos da paracoccidioidomicose e do *Paracoccidioides brasiliensis* 2
2. PCM experimental 5
3. Avaliação de drogas anti-*P. brasiliensis* em modelos experimentais – revisão da literatura 6
4. Objetivos 20

Capítulo II – Material e métodos 21

1. Animais 22
2. Desenho da pesquisa 22
   2.1 Experimento I – Avaliação da mortalidade cumulativa e da porcentagem de óbitos espontâneos 22
   2.2 Experimento II – Avaliação do efeito antifúngico do cotrimoxazol – Grupos experimentais 23
   2.3 Experimento III – Avaliação dos níveis séricos de cotrimoxazol 26
   2.4 Experimento IV – Avaliação da recuperação de fungos, em função do tempo de cultivo 26
3. Infecção pelo *P. brasiliensis* 26
   3.1 Origem e manutenção da cepa infectante 26
   3.2 Obtenção da suspensão fúngica 26
   3.3 Método e via de infecção 27
4. Droga antifúngica 27
5. Sacrifício dos camundongos 28
6. Recuperação de fungos (plaqueamento) 28
   6.1 Preparo do fator de crescimento 28
   6.2 Preparo do meio de cultura 29
   6.3 Determinação do grau de infecção 29
7. Comparação da eficácia do cotrimoxazol em pulmão e baço 30
8. Avaliação da imunidade humoral 30
9. Determinação dos níveis séricos de sulfametoxazol 31
10. Aprovação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp 31

11. Levantamento bibliográfico 31
12. Normas para redação da dissertação 31
13. Análise estatística dos resultados 32

Capítulo III – Resultados 33

1. Experimento I – Avaliação da mortalidade cumulativa e da porcentagem de óbitos espontâneos 34
2. Experimento II – Avaliação do efeito anti-fúngico do cotrimoxazol 36
   2.1 Avaliação de cada grupo experimental 36
   2.2 Comparação dos tratamentos 47
      A. Recuperação de fungos de fragmentos de pulmão 48
      B. Recuperação de fungos de fragmentos de baço 51
      C. Níveis séricos de anticorpos específicos 54
   2.3 Comparação dos efeitos de cotrimoxazol sobre a recuperação de *P. brasiliensis* de fragmentos de pulmão e baço 56
3. Experimento III – Avaliação dos níveis séricos de sulfametoxazol 57
4. Experimento IV – Avaliação da recuperação de fungos, em função do tempo de cultivo 57

Capítulo IV – Discussão 59

Capítulo V – Conclusões 66

Capítulo VI – Referências bibliográficas 68

Capítulo VII – Resumo 75

Capítulo VII – Abstract 77
Capítulo IX – Apêndice 79

AMB	Anfotericina B
BHI	Brain Heart Infusion
CMX	Cotrimoxazol
CTZ	Cetoconazol
FCZ	Fluconazol
GCi	Grupo controle infectado
GCs	Grupo controle saudável
GTc	Grupo que recebeu tratamento precoce, mas por curto período
GTp	Grupo que recebeu tratamento precoce e prolongado
GTt	Grupo que recebeu tratamento tardio, mas por longo período
HE	Hematoxilina-eosina
IDD	Imunodifusão dupla em gel de agar
ITZ	Itraconazol
MCZ	Miconazol
MIC	Concentração inibitória mínima
MIF	Fator de inibição macrofágica
M.O	Microscopia ótica
NOR1 e NOR 2	NDORANE
PBS	Salina fosfatada tamponada
PCM	Paracoccidioidomicose
SMZ	Sulfametoxazol
TMP	Trimetoprim
UFC	Unidades formadoras de colônias

Capítulo I – Introdução

1. Aspéctos da paracoccidioidomicose e do *Paracoccidioides brasiliensis*

A paracoccidioidomicose (PCM), por muito tempo denominada blastomicose sul-americana, é micose sistêmica granulomatosa, em geral crônica, que tem como agente etiológico o fungo termo-dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, que acomete principalmente trabalhadores rurais do sexo masculino[1].

Ela foi descrita pela primeira vez por Adolpho Lutz em 1908[2], que relatou os dois casos de pacientes cujas principais manifestações clínicas incluíam amolecimento dos dentes e comprometimento de mucosa oral, laringe, linfonodos, glândula salivar e traquéia. Lutz também registrou que o exame histopatológico desses pacientes revelava reação tuberculóide com fungos, células gigantes, células epitelióides e fungos com exo-esporulação. Esse pesquisador também isolou o fungo em cultivo, demonstrou a existência das fases micelial em cultivo na temperatura ambiente e leveduriforme em pacientes infectados, e reproduziu a doença em cobaios. Deve-se registrar que poucos pesquisadores foram tão completos ao descreverem uma nova doença e seu agente etiológico.

A PCM se encontra confinada à América Latina, com estimativas das maiores prevalências em Brasil, Venezuela, Colômbia, Equador e Argentina. No Brasil, predomina no Sudeste e no Sul[3].

P. brasilienses foi assim denominado por Almeida, em 1930[1]. Trata-se de fungo termo-dimórfico, que em temperatura ambiente se apresenta sob forma micelial, com filamentos multicelulares, que é a forma infectante. Esses filamentos se transformam na fase leveduriforme à temperatura de 35 a 37°C, que é a forma patogênica[4].

P. brasiliensis vive no solo, mas seu nicho ecológico ainda não foi bem determinado, o que impede o conhecimento do momento da exposição dos indivíduos ao fungo e, como conseqüência, a data provável de infecção e o período de latência que é muito variável e pode ser tão longo quanto 30 anos[5]. O tatu (*Dasypus novemcinctus*) é o único reservatório animal do *P. brasiliensis* que se conhece[6].

A PCM se apresenta sob três formas clínicas principais; forma aguda ou subaguda, também chamada forma juvenil, forma crônica ou do adulto e formas residuais, também denominada seqüelar. A forma aguda ou subaguda é responsável

por 20 a 25% dos casos, caracteriza-se por apresentar instalação mais rápida, de algumas semanas a poucos meses e apresentar envolvimento predominante do sistema reticuloendotelial, 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 aerodigestivas superiores é pouco freqüente. Nos tecidos são encontrados muitos fungos em multiplicação e granulomas em geral frouxos. A forma crônica ocorre em cerca de 75% dos casos, que apresentam história clínica de longa duração, em geral acima de seis meses. As manifestações pulmonares são muito freqüentes e em geral se associa ao comprometimento de outros órgãos, tais como mucosa das vias aerodigestivas superiores, pele e adrenais. As formas residuais são observadas após tratamento e se caracterizam pelas seqüelas, entre as quais se destacam fibrose, enfisema pulmonar e Síndrome de Addison[7].

As alterações anátomo-patológicas são caracterizadas pelo processo inflamatório crônico, tendo como substrato morfológico o granuloma epitelióide, que pode ser compacto ou frouxo, na dependência da intensidade do comprometimento imune celular[8].

O diagnóstico de certeza é feito pela identificação de formas típicas da fase leveduriforme de *P. brasiliensis,* com as células-mãe e múltiplas exoesporulações (roda de leme). As reações sorológicas também contribuem muito para o diagnóstico, em especial os testes de preciptação em agar, como a imunodifusão dupla (IDD) e a contraimunoeletroforese, por sua especificidade[9,10].

Testes moleculares têm sido muito desenvolvidos, aumentando a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico sorológico, apesar de não estarem disponíveis em laboratórios de rotina[9,11].

Antes da descoberta de antimicrobianos que atuassem sobre o *P. brasiliensis,* a PCM era considerada fatal. O primeiro antimicrobiano que se revelou eficaz no tratamento da PCM foi a sulfapiridina, introduzida por Oliveira Ribeiro[12] que, entretanto, era pouco tolerada. A partir dessa experiência, outros derivados sulfamídicos foram utilizados no tratamento da PCM, tais como sulfatiazol, sulfadiazina, sulfametoxipiridazina, sulfadimetoxina e sulfadoxina, derivado de excreção ultra-lenta, que oferecia um tratamento mais confortável para o paciente, por reduzir o número de tomadas[13, 14, 15]. Em seguida, Lacaz & Sampaio[16] introduziram a anfotericina B (AMB), que se revelou eficaz inclusive nos casos de resistência a sulfamídicos. No entanto, os efeitos colaterais, em especial á

nefrotoxicidade e a hospitalização necessária para sua administração restringiam a indicação dessa droga. Lopes & Armond[17] e Barbosa & Vasconcelos[18] foram os pioneiros na utilização da associação sulfametoxazol-trimetoprim no tratamento da PCM e vieram a se constituir em droga de escolha por sua menor toxicidade, eficácia e distribuição gratuita. Borelli et al.[19] e Negroni et al.[20] introduziram o primeiro imidazólico absorvível após injeção oral, no tratamento da PCM. O cetoconazol (CTZ) revelou-se eficaz e bem menos tóxico que a AMB. Stevens et al. [21] foram os pioneiros a avaliarem a ação do fluconazol (FCZ), derivado triazólico, no tratamento da PCM e Naranjo et al.[22] introduziram o itraconazol (ITZ), sugerindo que esta deveria ser a droga de escolha para o tratamento da PCM.

A associação sulfametoxazol-trimetoprim também é denominada cotrimoxazol (CMX). O sulfametoxazol (SMZ) é um derivado sulfamídico de excreção lenta. O trimetoprim (TMP) é um derivado da pirimidina, isto é, o diamino-2,4 (trimetoxibenzil-3', 4', 5')-pirimidina[17,18]. O CMX encontra-se disponível para administração oral sob forma de comprimido, nas doses de 400/80 mg e 800/160 mg, em suspensão, nas doses de 200/40 mg e 400/80 mg em 5mL, e intravenosa, na dose de 400/80 mg em 5 mL, sempre na proporção de 5:1. O CMX é distribuído gratuitamente pelos serviços ligados ao Ministério da Saúde e às Secretarias de Saúde do Estado de São Paulo, para tratamento de doenças bacterianas e da PCM. Assim, os resultados satisfatórios observados no tratamento da PCM, associados á sua distribuição gratuita, fizeram com que o CMX se tornasse a droga de escolha no tratamento da maior parte dos pacientes com essa micose sistêmica.

Após a administração oral, é quase completamente absorvido na porção superior do trato gastrointestinal. As concentrações plasmática de 0,02 mg/ml de TMP e 0,06 mg/ml de SMZ são atingidas em até quatro horas e a meia-vida plasmática é de aproximadamente 10 horas[23]. Apresenta boa difusão para tecidos e fluídos orgânicos. Cerca de 50 a 70% do TMP e 10 a 30% do SMX são excretados pela urina inalterados. O SMX é metabolizado no fígado e eliminado quase que completamente pelo rins, através de filtração glomerular e secreção tubular. Apenas pequena porcentagem é eliminada pelas fezes[24].

Tendo em vista que vários pacientes com PCM apresentavam sulfa-resistência, Lopes & Armond[17] avaliaram a associação de TMP com o derivado sulfamídico Ro-4,4393. Apesar da pequena casuística estudada, esses autores observaram que o TMP não apresentava nenhuma ação anti-*P. brasiliensis,* mas

potencializava a ação anti-fúngica dessa sulfamida, havendo um sinergismo entre essas drogas[17]. Stevens & Vo[25]estudaram a concentração inibitória mínima (MIC) do CMX em amostras clínicas de pacientes com PCM e observaram que cada uma das drogas, por si só, era incapaz de inibir o crescimento fúngico; associadas, causavam 50% de inibição do crescimento.

Em 1973, Barbosa & Vasconcelos[18] avaliaram 33 pacientes com PCM, 25 dos quais eram do sexo masculino e oito do feminino, que receberam tratamento com CMX em duas administrações diárias, com doses decrescentes iguais a 1440 mg durante 20 dias, seguidos de 960 mg por mais 20 dias e, por fim, 480 mg por 20 dias. Os autores concluíram que a resposta ao tratamento foi excelente.

Esses dois estudos observacionais foram muito importantes, embora não tenham sido desenhados de forma a proporcionar maior evidência da efetividade do CMX no tratamento da PCM.

Em 2003, Hahm et al.[26], avaliaram amostra de paciente que apresentou várias recaídas e demonstraram a correlação entre falha terapêutica, caracterizada pela ausência de resposta clínica e resistência *in vitro* ao CTZ e ao CMX, demonstrando a importância de integrar observação clínica e estudos laboratoriais.

2. PCM experimental

Os modelos experimentais da PCM têm trazido grande contribuição para o conhecimento desta importante micose sistêmica. O modelo animal permite avaliar a interação parasita-hospedeiro, a morfologia do fungo nos tecidos, o estudo da resposta imune celular e humoral, a progressão da doença desde o momento da infecção, sua disseminação, o papel da resposta imune no desenvolvimento da doença, o estudo de ação de medicamentos e o dimorfismo do fungo[27].

Após Lutz, Splendore[28] tentou reproduzir a PCM em cobaias, gatos, cachorros e macacos, mas não conseguiu. Pereira & Viana[29], a partir do pus colhido de um paciente que morreu com PCM, conseguiram infectar sagüi, cão, gato, rato branco e coelho e isolar o *P. brasiliensis* em meios de cultura. Montenegro[30] infectou cobaias pela via intratesticular, com fungos obtidos de um paciente. Lacaz[31], conseguiu reproduzir a PCM em camundongos após inoculação do fungo por via intravenosa e intraperitoneal, causando infecção disseminada em pulmões,

fígado, baço, linfonodos, cavidade peritoneal e coração. O autor observou que animais infectados pela via intravenosa apresentavam lesões mais extensas[31].

A partir da década de 80, a utilização de animais de laboratório na pesquisa da PCM se intensificou. Desde então, varias espécies têm sido usadas, embora nenhuma delas mimetize de forma satisfatória a doença humana. Dentre os animais de laboratório mais utilizados, destacam-se cobaios, coelhos, camundongos, hamsters e ratos. No entanto, além da espécie animal, varios outros fatores podem interferir nos resultados das pesquisas, tais como sexo do animal, idade, local onde vive e sua linhagem. Outro fator que também pode interferir é a virulência da cepa utilizada, o tamanho do inóculo e a via de inoculação[27, 32].

Pesquisadores do Campus Universitário de Botucatu, liderados pelo Professor Mário Rubens Guimarães Montenegro, avaliaram a infecção experimental de hamsters, que trouxe grande contribuição ao conhecimento da interação parasita-hospedeiro na PCM, assim como do seu tratamento[33, 34, 35, 36].

A experiência acumulada demonstrou que 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 endovenosa como a intraperitoneal e a intratraqueal são adequadas para obtenção de infecção disseminada. O grupo liderado pela Dra. Vera L. G. Calich[37, 38], do Instituto de Ciências Biomédicas – USP, selecionou camundongos sensíveis e resistentes à infecção pelo *P. brasiliensis,* que têm sido infectados com amostras pouco e muito virulentas desse fungo. As diversas combinações possíveis permitiram a realização de grande número de estudos que trouxeram grande contribuição ao conhecimento da imunopatogenia da PCM.

3. Avaliação de drogas anti-*P. brasiliensis* em modelos experimentais – revisão da literatura

No intuito de se encontrar os melhores antifúngicos e os esquemas terapêuticos mais eficazes e menos tóxicos, vários estudos têm sido realizados em modelos experimentais, com drogas pertencentes a diferentes grupos químicos. A seguir, serão apresentados vários trabalhos, em ordem cronológica, que focalizam o tratamento da PCM experimental.

Silva[39] avaliou a ação da AMB e levamisole (LV) associados ou individualmente, nas doses de 1 mg/mL (AMB) por via endovenosa e 3 mg/dia (LV) por via oral em camundongos albinos machos infectados com a cepa 2052 de *P. brasiliensis*, por via intraperitoneal, injetando 0,5mL de uma suspensão contendo $1x10^6$cels/mL. O tratamento iniciou-se 15 dias pós-infecção e era administrado por ciclos de três dias com e 15 dias sem tratamento, divididos em três etapas; na primeira foi administrada AMB por 33 e LV por 48 dias; na segunda etapa AMB 63 e LV 80 dias e na terceira e última etapa AMB por 78 e LV por 95 dias. Eram sete os grupos, dos quais, três eram infectados e tratados, três tratados sem infecção e um somente infectado. Os sacrifícios ocorreram dois dias após a administração da última dose. A infecção foi avaliada através da histopatologia de baço e fígado, com ênfase nos granulomas.

A autora observou varias mortes, em todas as etapas do experimento, sendo em sua maioria animais pertencentes ao grupo controle e ao grupo que estava infectado e recebendo somente LV. Durante todo o experimento o grupo infectado foi o que apresentou maior número de granulomas em relação aos outros. Observou-se que, o grupo que recebeu ambas as drogas apresentou melhores resultados durante todo o experimento sobre a formação de granulomas e a multiplicação de parasitas, tanto em fígado com em baço. Na primeira etapa a AMB não apresentou resultados sobre os dois órgãos. Na segunda etapa, o LV também mostrou-se muito eficaz sobre o baço. A AMB sozinha não apresentou efeito algum, em comparação ao grupo controle. Na terceria etapa, o número de granulomas do fígado foi inferior no grupo que recebeu AMB, em relação ao número de parasitas não diferenciou entre os grupos estudados, o mesmo não foi observado em baço. Neste experimento, observou-se que os animais tinham 95,9% de lesões no baço e 80,9% no fígado. Há uma relação entre o aumento do número de parasitas e a estimulação da produção de granulomas, é o que aconteceu na etapa II. Nesta etapa o LV sozinho não mostrou ser muito eficaz. A ação desta medicação isolada ou em conjunto com a AMB induz um aumento da resposta imune pelo aumento da ação das células fagocitárias, talvez esta seja a explicação das drogas em conjunto serem mais efetivas do que isoladamente.

Hoyos et al.[40] avaliaram a eficácia do CTZ no tratamento de camundongos machos BALB/c infectados com $68x10^6$ unidades celulares ou $159x10^6$ células leveduriformes da cepa Garcia de *P. brasiliensis*, por instilação

intranasal. Os dois grupos tratados receberam CTZ por gavagem, diluído em agar, na dose de 100 mg/kg de peso corporal administrados duas vezes ao dia; um deles foi tratado por um mês e outro por dois meses, enquanto o grupo controle recebeu apenas agar. Os diferentes tratamentos foram iniciados 19 dias após a infecção intranasal. Os animais foram sacrificados e avaliados 48, 77 e 103 dias após infecção. A recuperação de fungos do baço, avaliada após 10 dias de incubação a $35^{O}C$, revelou que a freqüência de cultivos positivos tendeu a ser menor ($0,05 < p < 0,10$) em animais tratados por dois meses que nos controles, nos três momentos de sacrifício dos animais. No entanto, os camundongos tratados por um mês só revelaram essa tendência no primeiro sacrifício, realizado 48 dias após a infecção, pois nos outros dois a freqüência de cultivos positivos não diferiu daquela do grupo controle. Por outro lado, o grupo tratado por dois meses apresentou tendência de recuperação de menor número de fungos nos sacrifícios realizados 48 e 77 dias pós-infecção e menor número de *P. brasiliensis* no plaqueamento realizado 103 dias pós-infecção.

A avaliação da freqüência de camundongos com cultivo positivo de pulmões revelou que o grupo controle e os grupos tratados, em seu conjunto, não diferiram no sacrifício realizado aos 48 dias; que o grupo tratado com CTZ por um mês não diferiu do grupo controle, mas que no tratado por dois meses essa freqüência tendeu a ser menor ($0,05 < p < 0,10$) que a do grupo controle no sacrifício feito aos 77 dias; que no plaqueamento realizado aos 103 dias, os três grupos não diferiram entre si. Por outro lado, no sacrifício realizado aos 48 dias pós-infecção o número de UFC obtido no plaqueamento de pulmões foi menor em animais tratados que nos controles ($p < 0,05$); aos 77 dias, os três grupos não diferiram entre si; por fim, aos 103 dias, somente o grupo tratado por um mês revelou menor recuperação de fungos que o grupo controle.

Os anticorpos séricos específicos só foram detectados em camundongos não tratados, aos 77 e 103 dias pós-infecção. A avaliação da reação de hipersensibilidade tardia revelou que apenas os animais infectados e não tratados apresentavam valores superiores aos dos camundongos não infectados.

Com esses resultados, os autores sugeriram que o CTZ pode ser eficaz no tratamento da PCM experimental murina, em esquemas terapêuticos mais prolongados.

Mota et al.[35] avaliaram eficácia e toxicidade do CTZ no tratamento de hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos, infectados com $2x10^5$ células leveduriformes da cepa 18 do *P. brasiliensis*, por via testicular. O grau de infecção foi avaliado através de exame histopatológico de testículos, linfonodos, baço, fígado e rins, corados por HE, Gomori-Grocott e vermelho Congo. A resposta imune dos animais foi avaliada pela dosagem de anticorpos séricos específicos pela reação de imunodifusão dupla em gel de agar (IDD) e a imunidade celular pelo teste da inibição da migração de macrófagos (MIF), com antígeno de *P. brasiliensis*. Foram utilizados 260 hamsters, 220 dos quais, infectados, foram destinados ao estudo da eficácia do CTZ e 40 foram utilizados para avaliação de toxicidade. Os animais infectados foram divididos em grupos que receberam, por gavagem, apenas o diluente do CTZ (grupo controle), tratamento de curta duração, com CTZ do 45º ao 90º dia de infecção, nas doses diárias de 30 e de 80 mg/kg de peso corporal e, finalmente, tratamento prolongado, com CTZ do 7º ao 140º dia de infecção, na dose diária de 80 mg/kg. A avaliação da toxicidade foi feita em animais que receberam CTZ nas doses diárias de 30, 80 e 120 mg/kg de peso corporal, ou apenas água acidificada (grupo controle) e que foram sacrificados nos dias 14, 20, 42 e 56 após o início da administração do imidazólico. Os animais tratados com CTZ, nos esquemas de curta duração, apresentaram menor disseminação para fígado, baço e rins que os do grupo controle, até o 100º dia pós-infecção. A seguir, já sem receber CTZ, apresentaram o mesmo comportamento que os do grupo controle. Ao contrário, a disseminação para linfonodos, fígado e rins foi menos freqüente e menos intensa nos animais submetidos ao tratamento de longa duração. O número de fungos nas lesões foi menor nos animais que receberam tratamento de curta duração com CTZ na dose diária de 30 mg/kg de peso corporal que naqueles que foram tratados com 80 mg/kg, em esquema de curta duração. No entanto, animais que receberam tratamento prolongado com CTZ na dose diária de 80 mg/kg só raras vezes revelavam a presença de fungos nos tecidos.

A avaliação da mortalidade revelou que todos os animais do grupo controle, sem tratamento, evoluíram para óbito até o 140º dia pós-infecção. Os animais tratados em esquema de curta duração começaram a evoluir para óbito entre o 70º e o 105º dia de infecção; a freqüência de óbitos foi igual a 100,0% no grupo que recebeu CTZ na dose diária de 30 mg/kg e a 91,4% no que foi tratado com a dose diária de 80 mg/kg. O grupo de animais que receberam CTZ na dose

diária de 80 mg/kg por período prolongado revelou mortalidade igual a 17,1% enquanto recebia a medicação, que evoluiu para 68,6% no seguimento por 315 dias.

Os níveis séricos de anticorpos específicos não diferiram nos grupos controle e tratados em esquema de curta duração. No entanto, o grupo que recebeu tratamento prolongado apresentou menor nível de anticorpos séricos que os demais.

A avaliação da resposta imune celular revelou-se igual nos grupos controle e tratados com CTZ em esquema de curta duração. Ao contrário, animais tratados com CTZ por tempo prolongado apresentaram recuperação da imunidade celular, porém apenas 140 dias pós-infecção.

A avaliação da toxicidade do CTZ revelou que nenhum dos animais apresentava lesões em coração, pulmões, rins, adrenais, baço, fígado e intestinos. No entanto, necrose de medula óssea foi observada em quatro dos nove animais que receberam a dose diária de 120 mg/kg de CTZ.

Lefler et al.[41] avaliaram a eficácia de dois derivados imidazólicos (CTZ e *I*.9), dois triazólicos (n7 e ICI) e dois poliênicos (AMB e NDORAME) no tratamento da PCM experimental murina. Camundongos BALB/c machos foram infectados com duas doses contendo $48x10^6$ a $68x10^6$ unidades celulares da cepa Garcia de *P. brasiliensis*, por via intranasal. Os derivados azólicos foram administrados por gavagem, sob forma de suspensão em agar, e os poliênicos por via intraperitoneal. Os anti-fúngicos foram administrados durante quatro semanas, a partir do segundo dia de infecção, de acordo com o seguinte esquema: inicialmente sete dias consecutivos de tratamento, seguidos por dois dias sem medicação e cinco dias com tratamento em cada semana, nas três outras semanas. Foram realizados três experimentos, comparando diferentes drogas.

No primeiro experimento foram comparados CTZ, n7 e *I*.9, administrados na dose de 100 mg/kg de peso corporal duas vezes ao dia, e um grupo controle, infectado e não tratado. O estudo da recuperação de fungos em pulmões revelou que a freqüência de culturas positivas foi menor no grupo tratado com o CTZ que no grupo controle e nos grupos tratados com n7 e com *I*.9 ($p < 0,001$) que, por sua vez, não diferiram entre si. Os plaqueamentos de baço e de fígado, por 10 dias a uma temperatura de 35^OC, revelaram que a freqüência de isolamento de fungos foi maior no grupo controle que nos grupos tratados ($p=0,008$) que, por sua vez, não diferiram entre si. O segundo experimento comparou a eficácia da AMB, administrada na dose diária de 6,25 mg/kg de peso corporal (AMB) com o

da NDORAME nas doses diárias de 6,25 mg/kg (NOR.1) e de 12,50 mg/kg (NOR.2). A freqüência de cultivos positivos de baço foi maior no grupo controle que nos tratados com AMB, NOR.1 e NOR2 que, por sua vez, não diferiram entre si (p=0,001). Contagens elevadas, maiores que 4.000 UFC/baço, só foram observadas no grupo controle. Em pulmões, o achado de padrão histopatológico compatível com doença em atividade foi menos freqüente no grupo tratado com AMB que nos demais grupos submetidos a tratamento, que não diferiram entre si. No entanto, os quatro grupos não diferiram quanto à freqüência de culturas positivas, embora um número elevado de UFC ($>10^4$/pulmão) tenha sido mais freqüente nos grupos controle e NOR.2 que nos tratados com AMB ou com NOR.1 (p<0,001).

O terceiro experimento comparou a eficácia do CTZ, na dose de 50 mg/kg de peso corporal, com a do ICI, nas doses de 1 (ICI-1) e 10 mg/kg (ICI-10). Todas as drogas foram administradas por gavagem, uma vez ao dia. O ICI-1 não se revelou eficaz. Ao contrário, os grupos tratados com CTZ e ICI-10 apresentaram menores escores de gravidade de lesão no exame histopatológico de pulmões, que os controles não tratados (p<0,01). Além disso, o ICI-10 foi superior ao CTZ, na avaliação dessa variável. A avaliação quantitativa da recuperação de fungos revelou que somente o ICI-10 reduziu a contagem de UFC de pulmões (p<0,002), mas que tanto CTZ quanto ICI-10 apresentaram esse efeito no baço. (p<0,02). Por fim, ICI-10 e CTZ, na dose de 100 mg/kg duas vezes ao dia (dados do experimento 1), revelaram efeitos equivalentes na análise da gravidade das lesões histopatológicas.

Os autores concluíram que ICI revelou-se a droga mais promissora no tratamento da PCM experimental murina, motivo pelo qual os estudos sobre sua toxicidade deveriam ser implementados, objetivando futuro ensaio clínico.

McEwen et al.[42] estudaram camundongos machos BALB/c By JIMR com três semanas de idade, infectados com $5x10^7$ unidades celulares da cepa Garcia de *P. brasiliensis* por inoculação intranasal. O tratamento com ITZ foi iniciado nas 24 horas que se seguiram à infecção, com a dose diária de 10, 50 e 200 mg/kg de peso corporal, divididos em duas tomadas. Depois de uma semana de tratamento diário seguiram-se três semanas em que o ITZ não era administrado por dois dias e era nos outros cinco. Os camundongos foram observados por 31 dias após a interrupção do tratamento quando, então, foram sacrificados e autopsiados. Pulmões, fígado e baço foram submetidos à avaliação macroscópica de infecção. Os

níveis séricos de ITZ foram determinados em animais tratados com as três doses estudadas.

A sobrevida foi maior nos grupos tratados com as diferentes doses, cujas eficácias não diferiram entre si. A avaliação macroscópica revelou maior porcentagem de infecção pulmonar entre os camundongos tratados com qualquer das doses utilizadas de ITZ que os controles não tratados ou que receberam o diluente polietilenoglicol. A disseminação para fígado e baço foi parcialmente contida. Os níveis séricos de ITZ, observados com as três doses utilizadas, não diferiram entre si e sugerem que, nas condições em que foi administrado, este antifúngico apresenta pequena absorção.

Negroni et al.[43] estudaram ratas Wistar, *Rattus norvegicus*, infectadas com uma suspensão de células leveduriformes de *P. brasiliensis*, com turbidez 5 na escala de McFarland, inoculada por via intra-cardíaca. Esses animais receberam CTZ nas doses diárias de 40 e de 80 mg/kg de peso corporal e ITZ na dose diária de 8 mg/kg, em tomada única por gavagem. A medicação começou a ser administrada três dias antes do desafio e se prolongou até quatro semanas após a infecção (tratamento profilático). Além das ratas, cobaias albinas, machos, foram infectados por via intra-testicular com 0,1 mL da mesma suspensão de fungos. O tratamento das cobaias foi iniciado 10 dias depois da infecção e foi mantido por período variável, de sete a 30 dias (tratamento curativo). As doses dos antifúngicos foram as mesmas, em função do peso corporal. Após o período de observação, os animais foram sacrificados, autopsiados e submetidos à avaliação micológica e histopatológica.

Os três esquemas terapêuticos foram igualmente eficazes quando se avaliaram presença de granulomas pulmonares em ratas e freqüência de cultivos positivos e alterações histopatológicas de testículo, em cobaias. Os autores chamam a atenção para a eficácia do ITZ, comparável à do CTZ, em doses cinco vezes menores.

Ueda et al.[44] avaliaram a eficácia do CTZ no tratamento de camundongos albinos suíços machos, infectados com $1x10^6$ células leveduriformes da cepa 18 de *P. brasiliensis*, através da veia da cauda. Para avaliar o grau da infecção fez-se a histopatologia em pulmão esquerdo, fígado, baço, rins e glândulas adrenais, corados por HE e Gomori-grocott; retirou-se pulmão direito para a recuperação de fungos. A resposta imune foi avaliada através do teste do coxim

plantar e quantificação de anticorpos séricos específicos através da IDD. Para este estudo foram utilizados 174 animais, sendo todos infectados e divididos em três protocolos de tratamento, cuja a dose foi de 120 mg/kg/dia de CTZ, administrado por gavagem, uma vez ao dia, com inicio da terapia três dias pós-infecção. O antígeno sonicado foi utilizado para avaliar a imunidade dos animais. Os animais foram divididos em grupos que receberam, apenas agar (grupo controle), tratamento de longa duração (infectados e tratados do 3º dia a 20ª semana), tratamento por curto período (do 3º ao 56º dia) e tratamento com início tardio, 28º dia a 20ª semana.

Na análise histopatológica dos animais controle, foi observado nos três experimentos apresentaram lesões granulomatosas compactas, com grande quantidade de fungos, principalmente em pulmões; com menor intensidade e freqüência nos outros órgãos avaliados. Os animais tratados no esquema de longa duração, apresentaram alterações pulmonares até a segunda semana, com o decorrer do tempo as lesões foram diminuindo e ficando escassas. Nas duas últimas semanas os pulmões somente exibiam fragmentos de parede fúngica. Em especial neste estudo, os animais controle apresentaram da 16ª a 20ª semanas, granulomas com necrose central e numerosos fungos. Ainda foi avaliado nos sacrifícios das semanas dois, quatro e oito a recuperação de fungos, que foi positiva em todos animais controle; nos animais tratados notou-se o clareamento do pulmão com culturas negativas, a partir da segunda semana. As culturas foram incubadas a 37°C e observadas por seis semanas. Esse esquema de tratamento mostrou-se eficaz, clareando o pulmão e impedindo a disseminação do *P. brasiliensis*.

Nos animais do segundo estudo, que tiveram a terapia interrompida na semana oito, e foram assistidos por 16 semanas, apresentaram lesões pulmonares somente até a semana quatro, ao completar oito semanas as lesões foram desaparecendo e ficando escassas, visto que no final da terapia elas não eram mais observadas, com exceção de três animais que acabaram morrendo. Neste estudo o tratamento também mostrou-se eficaz mesmo com a sua interrupção. No terceiro estudo, os animais quatro semanas após a instituição da terapia, apresentaram lesões granulomatosas pulmonares em menor extensão com número de fungos reduzidos e somente quatro animais apresentavam alguma disseminação. Na semana 16 estas lesões somente eram vistas no pulmão com número bem reduzido de fungos; já no final do experimento, havia somente restos de parede fúngica.

A resposta imune celular, através do teste do coxim plantar, foi altamente positiva nos animais controle durante todos os experimentos, nos animais tratados somente foi positiva naqueles sacrificados na segunda semana do primeiro experimento e a partir da 16ª semana do segundo experimento, ou seja, período em que os animais estavam sem tratamento. No terceiro experimento apresentaram positividade somente até a semana oito. A imunidade humoral, avaliada através do método de IDD, os animais controle do primeiro experimento apresentaram níveis variados de anticorpos, nos outros dois experimentos o teste negativou para quase todos os animais, com exceção, dos sacrifícios ocorridos na oitava semana do segundo experimento e 20ª semana. Todos os animais tratados apresentaram negatividade. Os dois testes mostraram que quando a droga está sendo administrada mantém-se controlada a infecção e a resposta imune.

Conclui-se com este estudo que, quanto mais tempo leva para começar a terapia, mais lenta é a cicatrização das lesões. O tratamento da PCM experimental com CTZ deve ser iniciado o mais cedo possível e seguida durante um tempo suficientemente longo.

Stevens et al.[21] revelaram que o FCZ é cinco vezes mais ativo que o CTZ no tratamento da PCM murina por três semanas, em experimento cujos animais foram observados por dois meses. Na dose diária de 100 mg/kg, CTZ e FCZ se revelaram protetores na vigência de desafio com dose letal de *P. brasiliensis*. No entanto, os autores não registraram detalhes do experimento, tais como via de infecção, inoculo e início do tratamento, entre outros.

Cetoconazol (CTZ), itraconazol ITZ e o derivado triazólico Schering 39304 (Sch) foram avaliados por Rezkallah-Iwasso et al.[36], no tratamento da PCM experimental, em *hamsters* e em camundongos suíços, ambos com seis semanas de idade, infectados com a cepa 18 de *P. brasiliensis.* Os camundongos foram desafiados com $1x10^6$ células leveduriformes pela via I.V. e os *hamsters* com $2x10^5$ células leveduriformes por injeção intra-testicular. Todos os antifúngicos foram administrados por gavagem, em dose diária única baseada no peso corporal. Sch foi administrado nas doses de 2, 5 e 10, o CTZ nas doses de 10, 80 e 100 e o ITZ nas de 10 e 20 mg/kg, que serão referidas com as siglas das drogas, seguidas das doses. O tratamento dos camundongos foi iniciado três dias após a infecção e o dos *hamsters*, sete dias. Os antifúngicos foram mantidos por 42 dias nos camundongos e 72 dias nos *hamsters*. O número de unidades formadoras de colônias de *P.*

brasiliensis foi determinado no pulmão direito de camundongos e em fragmentos de testículo, em *hamsters*. Os camundongos tratados com Sch-2, Sch-10, CTZ-10 e CTZ-100 foram os que apresentaram maiores porcentagens de sobrevida na avaliação da 6ª semana pós-infecção. A avaliação histopatológica revelou que todos os tratamentos inibiram a proliferação fúngica, mas a esterilização do foco infeccioso só foi observada com Sch-10 e CTZ-100. O experimento feito com *hamsters* revelou maior porcentagem de sobrevida, na 10ª semana, nos grupos tratados com ITZ-10, ITZ-20 e Sch-10. Todos os tratamentos reduziram a carga fúngica, mas a esterilização só foi observada com o Sch-10. Os autores chamam a atenção para a divergência de resultados observada com o ITZ, muito eficaz em *hamsters*, mas pouco em camundongos, o que sugere variabilidade de resposta na dependência do animal utilizado.

Restrepo et al.[45] avaliaram camundongos BALB/c de ambos os sexos, com três a quatro semanas de idade, infectados com $3x10^6$ células da cepa Garcia de *P. brasiliensis*, por via intranasal. Esses camundongos foram tratados com ITZ nas doses de 20 e 50 mg/kg de peso corporal e com o triazólico Schering 39304, nas doses de 5 e 20 mg/kg, em uma única administração diária, por gavagem. O tratamento foi iniciado 24 horas após o desafio e mantido por 30 dias. Animais foram sacrificados sete, 14 e 21 dias pós-infecção, autopsiados e avaliados quanto à recuperação de *P. brasiliensis* de pulmões.

A análise de sobrevida demonstrou que todos os tratamentos reduziram a mortalidade dos camundongos, quando comparados aos grupos controles. A comparação dos tratamentos, por outro lado, revelou que a única diferença se encontra entre o Sch-20 e o ITZ-50, tendo o primeiro levado à maior sobrevida. A avaliação da recuperação de fungos demonstrou que as menores cargas fúngicas foram observadas nos grupos tratados com ITZ-50, Sch-5 e Sch-20. O único tratamento que esterilizou os pulmões foi o Schering 39304, na dose de 20 mg/kg/dia. Os autores destacam a observação de efeito apenas fungistático do ITZ, mesmo em doses tão elevadas quanto 50 mg/kg/dia e de efeito fungicida do Sch 39304, na dose de 20 mg/kg/dia.

Clemons & Stevens[46] fizeram rigoroso estudo sobre a eficácia da AMB e da preparação lipossomal de AMB no tratamento de camundongos BALB/c machos, infectados com células leveduriformes da cepa Garcia de *P. brasiliensis*, administrada por via intranasal. No primeiro experimento o inoculo foi igual a $4,1x10^7$

unidades celulares e o tratamento foi feito com AMB na dose de 1,0 mg/kg de peso corporal e AMB lipossomal (AmBisome – AmBi), nas doses de 1,0 e 27,0 mg/kg, sempre por via intravenosa, três vezes por semana, durante duas semanas. O seguimento dos camundongos foi feito por 44 dias após a infecção. No segundo experimento, cada camundongo foi inoculado com $1,6x10^7$ unidades celulares e os tratamentos foram feitos com 0,6 mg/kg de AMB ou com AmBi nas doses de 0,6 , 5, 15 e 30 mg/kg. Com o emagrecimento observado nos quatro primeiros dias de infecção, as doses dos antifúngicos foram reajustadas em função do peso corpóreo. O seguimento dos animais foi feito por 40 dias após a infecção. No último dia de seguimento os animais foram sacrificados, autopsiados e avaliados quanto à recuperação fúngica de pulmões.

O experimento 1, modelo de infecção aguda letal, revelou que nenhum tratamento prolongou a sobrevida em função do dia da morte dos camundongos, mas que a formulação lipossomal, na dose de 27 mg/kg, foi superior aos controles. A determinação de infecção residual revelou que o melhor resultado foi observado com AmBi-27 e, a seguir, com AMB-1; embora a redução da carga fúngica com AmBi-27 tenha sido quase 40 vezes maior que o da AMB-1, os efeitos dessas drogas são estatisticamente iguais. Em doses equivalentes, iguais a 1,0 mg/kg, a carga fúngica pulmonar após tratamento com AMB foi 100 vezes menor que a observada após uso de AmBi. O experimento 2 revelou que todos os tratamentos prolongaram a sobrevida dos animais e que AMB-0,6, AmBi-0,6, AmBi-5 e AmBi-10 foram mais eficazes que AmBi-0,6, únicas comparações que apresentaram diferenças significativas. Além disso, observou-se maior redução da infecção residual com AmBi-5 que AMB-0,6 e que AmBi-0,6 , AmBi-5, AmBi-15 e AmBi-30 são ainda mais eficazes. Avaliando doses equivalentes, AMB-0,6 foi superior a AmBi-0,6. Por fim, a esterilização das infecções pulmonares só foi observada em quatro animais tratados com AmBi-15 e em sete que receberam AmBi-30, enquanto nenhuma infecção pulmonar foi esterilizada por outros esquemas terapêuticos. Os autores registram a importância desta formulação lipossomal porque, embora menos eficaz que a AMB, sua menor toxicidade permite o uso de doses mais elevadas, que podem até esterilizar focos infecciosos de origem paracoccidióidica, em alguns animais.

Silva et al.[47] avaliaram a ação do CTZ no tratamento de camundongos brancos inbred inoculados com $1x10^7$ células leveduriformes viáveis da cepa Pb 2052 de *P. brasiliensis*, pela veia da cauda. O grau da infecção foi avaliado através

da histopatologia de fígado e baço, com contagem do número de granulomas e de parasitas. A imunidade celular foi avaliada pelo teste coxim plantar.

O experimento foi dividido em quatro grupos, sendo dois controles, um deles constituído por animais não infectados e outro, de camundongos infectados e não tratados. Os grupos tratados receberam CTZ 15 dias após a infecção, por via oral, uma vez ao dia durante 50 dias, nas doses de 50mg/kg e 100mg/kg. Os sacrifícios ocorreram 72h após a administração da última dose da droga. O teste do coxim plantar foi realizado com antígeno polissacarídico extraído do Pb2052, na pata posterior direita, três dias antes do sacrifício e a leitura realizada 48h após a aplicação.

A avaliação macroscópica revelou que todos os animais infectados, com ou sem tratamento, apresentavam fígado e baço aumentados. O número de fungos foi inferior em fígado e baço dos animais tratados com CTZ; no entanto, não observou-se diferenças na eficácia das doses estudadas. Por outro lado, os autores não observaram diferenças no número de granulomas e no teste do coxim plantar entre os grupos de animais infectados, tratados ou não. O CTZ diminuiu o número de células fúngicas, mas não impediu a formação de granulomas, mostrando que frações do próprio fungo estimulou esta resposta.

Em um estudo, realizado por Martinez et al.[48] no qual a droga empregada foi o FCZ, avaliou-se sua eficácia e da AMB no tratamento de ratas Wistar (*Rattus norvegicus*), infectadas por $2,8x10^6$ (experimento I) ou $2,2x10^6$ (experimento II) células leveduriformes de *P. brasiliensis da* pela cepa Boas, inoculada por via endovenosa. A AMB, foi utilizada na dose de 2,0 mg/kg de peso corporal por via intra-peritoneal e na de 0,8 mg/kg por via intravenosa. O FCZ foi utilizado nas doses de 14,0 mg/kg por via intra-peritoneal e 3,0 mg/kg por via venosa. Os tratamentos antifúngicos foram iniciados sete dias após a infecção, administrados em dias alternados, três vezes por semana, durante quatro semanas, totalizando 12 doses. O grau da infecção foi avaliado pela recuperação de fungos em pulmões e baço, após 14 dias de incubação a uma temperatura de 35°C.

Os resultados do experimento I, em que a via intra-peritoneal foi utilizada, demonstraram que a AMB não reduziu a carga fúngica de pulmão ou de baço, ao contrário do FCZ, que reduziu a carga parasitária desses dois órgãos. Quando a via intravenosa foi utilizada, no experimento II, AMB e FCZ reduziram a

carga parasitária de pulmão e de baço. No entanto, enquanto AMB e FCZ revelaram o mesmo efeito sobre pulmões, o da AMB foi maior que o do FCZ sobre o baço.

Apenas um trabalho e duas comunicações prévias avaliaram o CMX no tratamento da PCM experimental. Scavone & Burger[49] foram as primeiras a avaliar o CMX na PCM murina, ao estudar o efeito da dose diária de 30 e de 150 mg/kg de peso corporal no tratamento de fêmeas de camundongos isogênicos B10.A, sensíveis à infecção paracoccidióidica, inoculadas com $5x10^6$ células leveduriformes da cepa 18 de *P. brasiliensis*, por via intraperitoneal. O CMX foi diluído na água oferecida aos animais e as doses administradas foram calculadas admitindo-se que cada animal pesava 25g e bebia 5,0 mL de água por dia. Foram utilizados dois tipos de protocolo de administração do CMX. No primeiro a instituição do tratamento foi precoce, isto é, 24 horas após a infecção e foi mantido até o 180º dia de infecção. No segundo o início dos tratamentos foi mais tardio, isto é, sete, 15, 30, 60 e 90 dias após a infecção, e foram mantidos até o 180º dia de infecção. Os resultados foram avaliados pela recuperação de fungos de diferentes órgãos, pela restauração da imunidade celular, analisada pelo teste do coxim plantar e pelo estudo dos exames histopatológicos de órgãos comprometidos. As autoras observaram que não ocorreram mortes durante o período de estudo. Os camundongos tratados com CMX, na dose diária de 30mg/kg de peso corporal, revelaram maior resposta ao teste intra-dérmico que os controles não tratados, aos sete, 60, 90, 120, 150 e 180 dias pós-infecção enquanto os que receberam 150 mg/kg de peso corporal revelaram resposta aumentada aos sete, 60, 90 e 150 dias pós-infecção, em relação aos controles. Na avaliação feita aos 150 dias de infecção observou-se redução da carga fúngica em baço e pulmões de camundongos tratados com 150 mg/kg/dia de CMX, enquanto os que receberam 30mg/kg/dia só revelaram essa diminuição em pulmões. Por outro lado, não se observou eliminação da carga fúngica de epíploon e fígado, independentemente da dose diária de CMX utilizada. Esses resultados sugerem que a dose diária de 150mg/kg de peso corporal é mais eficaz que a de 30mg/kg. A esterilização total dos órgãos avaliados só foi observada em camundongos cujo tratamento se iniciou sete ou 15 dias após a infecção fúngica. Quando o tratamento foi instituído 30, 60 e 90 dias após a infecção observou-se redução da carga fúngica, mas não sua esterilização. Por fim, a avaliação histopatológica, realizada 180 dias após a infecção, revelou que as maiores diferenças entre os grupos controle-infectado e tratado foram observadas no baço,

que não revelou fungos viáveis quando as doses diárias de 30mg/kg ou de 150 mg/kg de peso corporal foram utilizadas.

Lourenço et al.[50] compararam o efeito de CTZ (8 mg/kg/dia), FCZ (6 mg/kg/dia), ITZ (4mg/kg/dia) e CMX (60 mg/kg/dia) sobre a infecção residual de ratos fêmeas infectados com $0,64x10^7$ células leveduriformes de *P. brasiliensis*, por via venosa. A infecção residual foi avaliada pela recuperação de fungos de macerado de pulmão, contando-se o número de UFC e de baço, pela determinação de unidades fúngicas, em leitura de hemocitômetro,. O tratamento com derivados azólicos foi feito em dose única diária, por gavagem, enquanto o CMX foi diluído na água de bebedouro; todos foram iniciados sete dias após a infecção e mantidos por 13 dias. Os animais foram avaliados logo após o término do tratamento e três semanas depois de sua interrupção. Todos os tratamentos revelaram redução da carga fúngica de pulmão e baço, logo após o término do tratamento. A avaliação realizada três semanas após interrupção do tratamento demonstrou menor carga fúngica em pulmão que a observada nos controles não tratados, mas sua elevação em relação à avaliação anterior, nos grupos tratados com CTZ e FCZ. No baço, a segunda avaliação demonstrou redução da carga fúngica em relação ao grupo controle. A redução mais persistente foi observada com ITZ no pulmão e FCZ no baço.

Lourenço et al.[51] compararam a eficácia de CTZ (4 e 16 mg/kg/dia), FCZ (4 e 16 mg/kg/dia), ITZ (2 e 8 mg/kg/dia) e CMX (10 e 40 mg/kg/dia) para reduzir a carga fúngica de pulmões e baço de ratos fêmeas infectados com $1x10^6$ células leveduriformes de *P. brasiliensis*, por via venosa. O tratamento foi feito por gavagem, em dose única diária, iniciado sete dias após a infecção e mantido por quatro semanas. Todos os tratamentos reduziram a carga fúngica de pulmões, exceto os realizados com CMX e com a dose de 4,0 mg/kg de CTZ. No baço, com exceção do tratamento com 40 mg/kg/dia de CMX, observou-se redução da carga fúngica em todos os demais grupos tratados. Os autores observaram superioridade de FCZ e ITZ sobre o CMX, nas doses estudadas.

4. Objetivos

Considerando-se o pequeno número de estudos experimentais com medicação tão utilizada no tratamento de pacientes com PCM, decidiu-se propor o presente estudo, que tem como objetivo geral avaliar a eficácia do CMX na terapêutica da PCM murina, em animais inoculados com a cepa 18 de *P. brasiliensis*.

Além disso, a presente pesquisa tem como objetivos específicos:

a) avaliar a mortalidade cumulativa e porcentagem de óbitos, nos diferentes grupos experimentais;
b) avaliar o efeito de três esquemas terapêuticos utilizando cotrimoxazol;
c) comparar a eficácia de cada esquema terapêutico no clareamento das lesões de pulmões com as de baço;
d) avaliar a influência do tratamento com CMX na evolução sorológica dos camundongos de diferentes grupos de estudo;
e) avaliar o tempo de cultivo para recuperação de fungos em fragmentos de órgãos.

Capítulo II – Material e Métodos

1. Animais

Foram utilizados 168 camundongos isogênicos albinos, da linhagem BALB/c, machos, com cinco a sete semanas de idade e pesando em média 26g, provenientes do biotério da Disciplina de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

Os camundongos foram divididos aleatoriamente em seis grupos distintos. Esses animais foram mantidos em caixas coletivas contendo em média 20 animais, com cama de maravalha autoclavada, em ambiente a uma temperatura variando de 23 a 25°C, com luminosidade controlada por interruptor horário eletromecânico, isto é, 12h no claro e 12h no escuro, recebendo, "*ad libitum*", água filtrada e ração comercial balanceada para camundongos, autoclavada.

2. Desenho da pesquisa

Esta pesquisa foi constituída de quatro experimentos, isto é, avaliação de sobrevida dos animais, eficácia do tratamento com CMX, avaliação do perfil sérico do CMX e avaliação da recuperação de fungos, em função do tempo de cultivo.

2.1 Experimento I – Avaliação da mortalidade cumulativa e da porcentagem de óbitos espontâneos

Cinco grupos de camundongos foram constituídos para avaliação da mortalidade cumulativa, que levou em conta o número de mortes espontâneas em cada grupo e o momento em que elas ocorreram. A tabela 1 apresenta os grupos experimentais estudados e a distribuição dos 148 animais utilizados neste experimento.

Tabela 1: Constituição dos grupos de camundongos infectados com a cepa 18 de *Paracoccidioides brasiliensis,* submetidos a diferentes tratamentos com cotrimoxazol e dos grupos controles.

Grupos	Número de animais
G1 (GCs)	30
G2 (GCi)	38
G3 (GTp)	28
G4 (GTc)	35
G5 (GTt)	17
TOTAL	148

G1 (GCs) – grupo controle saudável; G2 (GCi) – grupo controle infectado; G3 (GTp) – grupo que recebeu tratamento precoce e prolongado; G4 (GTc) – grupo que recebeu tratamento precoce, mas por curto período; G5 (GTt) – grupo que recebeu tratamento tardio, mas por período prolongado

2.2 Experimento II - Avaliação do efeito antifúngico do cotrimoxazol - Grupos experimentais

A avaliação da eficácia do CMX foi realizada segundo desenho proposto por Ueda et al.[44]. Foram constituídos cinco grupos experimentais, um dos quais era o controle saudável, outro o controle infectado e os outros três receberam cotrimoxazol em diferentes esquemas, como revela a tabela 2. Em cada momento de estudo foram sacrificados cinco camundongos, que constituía o número de repetições. Nesse experimento foram utilizados 125 dos 148 camundongos que participaram do experimento I, selecionados, por sorteio, para o sacrifício. A constituição dos grupos experimentais se encontra especificada, a seguir.

Tabela 2: Constituição dos grupos de camundongos infectados com a cepa 18 de *Paracoccidioides brasiliensis,* submetidos a diferentes tratamentos com cotrimoxazol e dos grupos controles. Definição dos períodos de sacrifício, para recuperação do fungo e determinação dos níveis de anticorpos séricos específicos.

Grupos experimentais e tratamentos	Animais	Sacrifício dos animais*					
	(nº)	2ª	4ª	8ª	12ª	16ª	20ª
Grupo 1 – SF [GCs]	30	X	X	X	X	X	X
Grupo 2 – Pb, SF [GCi]	30	X	X	X	X	X	X
Grupo 3 – Pb – CMX (D_3-D_{140}) [GTp]	25	X	X	X		X	X
Grupo 4 – Pb – CMX (D_3-D_{56}) [GTc]	25		X	X	X	X	X
Grupo 5 – Pb – CMX (D_{28}-D_{140}) [GTt]	15			X		X	X

* Semanas contadas a partir do primeiro dia em que os camundongos foram infectados

SF – Solução fisiológica Pb- infecção com a cepa 18 de *Paracoccidioides brasiliensis*

D_3, D_{28}, D_{56} e D_{140} – 3º, 28º, 56º e 140º dias após infecção, respectivamente.

( ) – período de tratamento com CMX

GRUPO 1 – Grupo controle saudável [GCs]

Foi composto por 30 camundongos sem infecção, que receberam somente solução fisiológica a 0,9%, por gavagem e constituíram o grupo controle saudável.

Conjuntos de cinco camundongos foram sacrificados na segunda, quarta, oitava, 12ª, 16ª e 20ª semanas, contadas a partir do primeiro dia de infecção (tabela 2).

GRUPO 2 – Grupo controle infectado [GCi]

Foi composto por 30 camundongos com infecção pelo *P. brasiliensis*, que também receberam somente solução fisiológica a 0,9%, por gavagem. Estes camundongos constituíram o grupo controle infectado. Conjuntos de cinco animais

foram sacrificados na segunda, quarta, oitava, 12ª, 16ª e 20ª semanas, contadas a partir do primeiro dia de infecção (tabela 2).

GRUPO 3 – Grupo que recebeu tratamento precoce e prolongado [GTp]

Foi composto por 25 camundongos infectados pelo *P. brasiliensis*, que receberam tratamento precoce, por gavagem, isto é, que se iniciou no terceiro dia após a infecção (dia 3), e que se estendeu por 20 semanas (dia 140). Conjuntos de cinco camundongos foram sacrificados na segunda, quarta, oitava, 16ª e 20ª semanas, contadas a partir do primeiro dia de infecção (tabela 2).

GRUPO 4 – Grupo que recebeu tratamento precoce, mas por curto período [GTc]

Foi composto por 25 camundongos infectados pelo *P. brasiliensis*, que receberam tratamento precoce, por gavagem, mas por curto período de tempo. Assim, o tratamento se iniciou no terceiro dia após a infecção e foi mantida por oito semanas (dia 56). Esses camundongos foram seguidos por 12 semanas após a suspensão do tratamento. Conjunto de cinco camundongos foram sacrificados na quarta, oitava, 12ª, 16ª e 20ª semanas, contadas a partir do primeiro dia de infecção (tabela 2).

GRUPO 5 – Grupo que recebeu tratamento tardio, mas por período prolongado [GTt]

Foi composto por 15 camundongos infectados pelo *P. brasiliensis*, que receberam tratamento tardio, por gavagem, ou seja, que se iniciou após quatro semanas de infecção (dia 28), e que foi mantido por 16 semamas (dia 140). Conjunto de cinco camundongos foram sacrificados na oitava, 16ª e 20ª semanas, contadas a partir do primeiro dia de infecção (tabela 2).

2.3 Experimento III - Avaliação dos níveis séricos de sulfametoxazol

Vinte camundongos, sem infecção, receberam cotrimoxazol na dose de 200 mg/kg de peso corporal, uma vez ao dia, às 13:30h, por gavagem, durante 10 dias. A seguir, grupos de cinco camundongos foram sacrificados às 12:00, 18:00, 24:00 e às 6:00h. De cada camundongo colheu-se amostra de sangue por punção cardíaca, para determinação do nível sérico de derivado sulfamídico livre.

2.4 Experimento IV – Avaliação da recuperação de fungos, em função do tempo de cultivo

Esse experimento foi realizado com o cultivo de fragmentos de pulmão e baço de 95 animais que foram infectados e, a seguir, sacrificados, pertencentes aos grupos 2 (GCi), 3 (GTp), 4 (GTc) e 5 (GTt), utilizados na avaliação da eficácia do CMX.

3. Infecção pelo *P. brasiliensis*

3.1 Origem e manutenção da cepa infectante

Os camundongos foram infectados com a cepa 18 de *P. brasiliensis,* inicialmente isolada em 1929 pelo pesquisador Prof. Carlos da Silva Lacaz, em secreção dos linfonodos de uma criança com PCM, em São Paulo. Desde então, vem sendo estocada em agar Sabouraud, por meio de repiques sucessivos, feitos a cada 15 dias. Essa amostra foi gentilmente cedida pelo Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Três meses antes da inoculação, a cepa 18 de *P. brasiliensis* foi inoculada em testículo de hamsters, confirmando sua virulência.

3.2 Obtenção da suspensão fúngica

A cepa foi cultivada em tubos de 20X200mm no meio Sabouraud (DIFCO) a 35°C por cinco dias. Após esse período de crescimento, as células leveduriformes foram removidas da superfície de cultivo com o auxílio de uma alça

de platina e transferidas para um outro tubo com solução salina estéril. Este tubo foi centrifugado por três minutos. A seguir, a suspensão de células da fase leveduriforme foi mantida a 37°C por quinze minutos, para sedimentar possíveis grumos[52]. O sobrenadante, contendo células isoladas ou com multibrotamentos, foi coletado e a viabilidade das células fúngicas foi estabelecida por contagem em câmara hemocitométrica, tipo Newbauer, pelo método de Imunofluorescência, com diacetato de fluoresceína e brometo de etídeo em microscópio de imunofluorescência[53]. Foram consideradas como células viáveis aquelas que apresentavam aspecto brilhante e refringente, uma vez que as células mortas se mostram opacas e de coloração avermelhadas.

Após a contagem, a concentração das células fúngicas foi padronizada em $4x10^6$ células viáveis/mL. Para inóculo, foram empregadas culturas de *P. brasiliensis* que apresentavam pelo menos 85% de viabilidade.

3.3 Método e via de infecção

Os camundongos foram infectados por via intravenosa com 0,25mL da suspensão de *P. brasiliensis* contendo $1x10^6$ células leveduriformes viáveis, utilizando-se a veia da cauda, com auxílio de uma seringa descartável com volume calibrado até 1,0 mL.

4. Droga antifúngica

Os camundongos foram tratados com a associação sulfametoxazol-trimetoprim (Bactrim®), também chamado CMX. A forma farmacêutica utilizada do CMX foi a suspensão contendo 40 mg de TMP e 200 mg de SMZ em cada 5,0 mL, provenientes de frasco contendo 100 mL. A administração foi feita por gavagem, na dose diária de CMX igual a 200 mg/kg de peso corporal. Assim, cada camundongo recebeu CMX na dose de 6,0 mg/dia, em um volume de 0,15 mL da suspensão, em uma única tomada diária, por gavagem, sempre no mesmo horário. Como a associação de SMZ com TMP se encontra na proporção de 5:1, a dose diária de TMP foi de 1,2 mg.

5. Sacrifício dos camundongos

Os camundongos sacrificados, foram inicialmente anestesiados com 0,05mL de pentobarbital sódico a 3% (Hipnol®) administrado por via intraperitoneal, com a auxílio de uma seringa descartável milimetrada até 1,0 mL. Após a sedação, coletou-se sangue, por meio de punção cardíaca, com o auxílio de uma seringa de 1,0 mL e de uma agulha calibre 25X7. O sangue foi, então, transferido para um tubo de ensaio estéril, sem anticoagulante e identificado com o número daquele camundongo. Esse tubo permaneceu em temperatura ambiente por algumas horas e, a seguir, foi centrifugado a 3.500 rpm, em centrífuga Revan Ciclo C I. O soro obtido foi transferido para tubos com tampa rosqueada e capacidade de 2,0 mL e, em seguida, estocado em freezer com temperatura de 70°C negativos. As amostras de soro, após descongelamento, foram destinadas à dosagem de anticorpos séricos específicos circulantes, utilizando-se o teste de IDD.

A seguir, foram coletados fragmentos de pulmão direito e baço, que foram destinadas ao cultivo, para recuperação de colônias de *P. brasiliensis.*

6. Recuperação de fungos (plaqueamento)

6.1 Preparo do fator de crescimento

O seu preparo baseou-se no método proposto por Restrepo et al[54]. O fator de crescimento utilizado era composto por um filtrado de diferentes amostras (Pb18, Pb113, Pb265, Pb339, BT02 e BT03) de *P. brasiliensis.* Todas as cepas utilizadas foram repicadas em agar Sabouraud, sete dias antes de todo o processo de fabricação e incubadas à temperatura de 37°C. Após o crescimento das culturas, preparou-se o meio *brain heart infusion agar* - BHI (OXOID®) na forma líqüida, esterilizado e acrescentaram-se 3,0 mL/Lt de um complexo vitamínico composto por 1,0 mg de cloridrato de tiamina, 1,0 mg de niacina, 1,0 mg de pantotenato de cálcio, 0,5 mg de riboflavina, 0,5 mg de inositol e 100 mL de água destilada.

As culturas foram inoculadas em BHI líquido, separadamente, em elenmeyers de vidro, num volume total de 50 mL de meio. A seguir, os elenmeyrs foram lacrados e incubados em um agitador automático constante por 14 dias, a uma temperatura média de 27°C. Após este processo, as suspensões fúngicas

foram filtradas com auxílio de um filtro contendo uma membrana tipo Millipore. Nesse momento todas as cepas foram misturadas. A seguir, o filtrado foi agitado e fracionado em alíquotas de 40 mL e depois congeladas[54].

6.2 Preparo do meio de cultura

Para a recuperação de fungos foi utilizado o meio de cultura BHI (OXOID®), suplementado com 5% de fator de crescimento, 4% de soro de cavalo (Laborclin) e 50 mg/Lt de gentamicina (Gentaron®)[55]. Foram colocados 20 mL de meio em cada placa de Petri de poliestireno cristal descartável, com diâmetro de 90X15, lisa. As placas com esse meio de cultura eram preparadas dois dias antes do sacrifício, armazenadas em geladeira a 4°C.

6.3 Determinação do grau de infecção

Para determinar o grau de infecção dos camundongos, fragmentos de pulmão direito e baço foram pesados em uma balança digital (marca Schimadzu, com capacidade de pesagem de 0,01 a 220g) com o auxílio de um tubo plástico tipo *falcon* e transferidos, um a um, para um cadinho de porcelana estéril, onde foram macerados e homogeneizados, com o auxílio de pistilo, em 1,0 mL de solução salina fosfatada tamponada estéril (PBS), com pH 7,2. Alíquotas de 100µL dessa suspensão foram semeadas em toda a superfície das placas de BHI, em duplicata, com o auxílio de bastões de vidro em L. A seguir, as placas foram vedadas e incubadas a 35°C, por quatro semanas.

A leitura das placas foi realizada com o auxílio de um contador de colônias modelo CP600 Plus, da marca Phoenix, e 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 feita com a avaliação da quarta semana e foi ajustada para grama de tecido, utilizando-se a fórmula:

$$\text{Contagem (UFC/g de tecido)} = \frac{\text{média das duas contagens de UFC x 10}}{\text{peso do fragmento (g)}}$$

7. Comparação da eficácia do cotrimoxazol em pulmão e baço

A comparação da eficácia do CMX no tratamento da infecção de pulmões e de baço foi feita pela comparação dos índices de recuperação relativa, obtidos utilizando-se a fórmula:

$$i = \frac{RFi - RF_1}{RF_1}$$

em que RFi representa a recuperação de fungos em cada momento de sacrifício, isto é, na quarta, oitava, 12ª, 16ª ou 20ª semanas e RF_1 representa a recuperação realizada no primeiro sacrifício de cada grupo.

A comparação entre os índices obtidos na recuperação de *P. brasiliensis* de fragmentos de pulmão e baço, do mesmo animal, foi utilizada para confrontar a eficácia do CMX nestes dois órgãos.

8. Avaliação da imunidade humoral

A imunidade humoral foi avaliada pela dosagem semi-quantitativa de anticorpos séricos, feita pela reação de Imunodifusão dupla em gel de ágar (IDD), de acordo com as especificações de Restrepo[10] e coradas por amido de Schuvarz 10B (Merck). O soro era considerado reagente quando se observava a formação de linhas de preciptação. A maior diluição em que se observava linha de preciptação definia a quantificação de anticorpos anti-*P. brasiliensis*. Como antígeno utilizou-se o filtrado de cultura preparado no Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP. Em resumo, *P. brasiliensis* cultivado em meio de Fava Netto a 35°C por cinco dias foi inoculado em meio de Negroni modificado segundo Siqueira[56] e incubado em estufa agitadora a 35°C por 15 dias. A seguir, acrescentou-se timerosal na concentração final de 0,2 g/mL e incubou-se nas mesmas condições por mais quatro dias. O antígeno foi, então, filtrado, concentrado 10 vezes com polietilenoglicol (Sigma P-2263) e dialisado contra PBS em membrana de diálise (Sigma D-9377). O extrato concentrado foi avaliado quanto ao teor protéico, analisado por SDS-PAGE, separado em pequenas alíquotas e congelado a 70°C negativos.

A solução de amido Schuvarz, utilizada como corante, era constituída de 4,0 g de amido Schuvarz 10B (Merck), 100 mL de ácido acético glacial e água destilada na quantidade suficiente para completar 1000 mL e era conservada em frasco âmbar ao abrigo da luz solar.

9. Determinação dos níveis séricos de sulfametoxazol

Os níveis séricos de sulfametoxazol foram determinados pelo método de Bratton & Marshall[57]. Devido à quantidade de soro utilizada em cada dosagem, procedeu-se apenas à determinação da fração livre.

10. Aprovação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp

Este projeto de pesquisa, cujo protocolo é o de número 444, foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal no dia 20 de julho de 2005.

11. Levantamento bibliográfico

O levantamento bibliográfico foi realizado por meio de MEDLINE, produzido pela *National Library of Medicine,* de Washington e da *Literatura Latino-Americana em Ciências da Saúde* (LILACS), produzida pelo *Centro Latino-Americano e do Caribe de Informações em Ciências da Saúde* (B.I.R.E.M.E) de São Paulo. Também foram levantados os trabalhos referidos em cada publicação que foi selecionada. Esse levantamento foi feito no período correspondente aos últimos 15 anos.

12. Normas para redação da dissertação

Na redação desta dissertação foram seguidas as normas propostas por Meira, aprovadas pelo Conselho do Programa de Pós - Graduação em Doenças Tropicais[58]. Os títulos dos periódicos foram apresentados de acordo com o *National*

Library of Medicine (2003). Os títulos de periódicos não indexados foram apresentados obedecendo-se às normas utilizadas pelo *National Library of Medicine* (2003), de acordo com a proposta feita por especialista da Biblioteca do Campus de Botucatu - Unesp. As referências bibliográficas e suas citações no texto foram feitas de acordo com as normas de Vancouver[59].

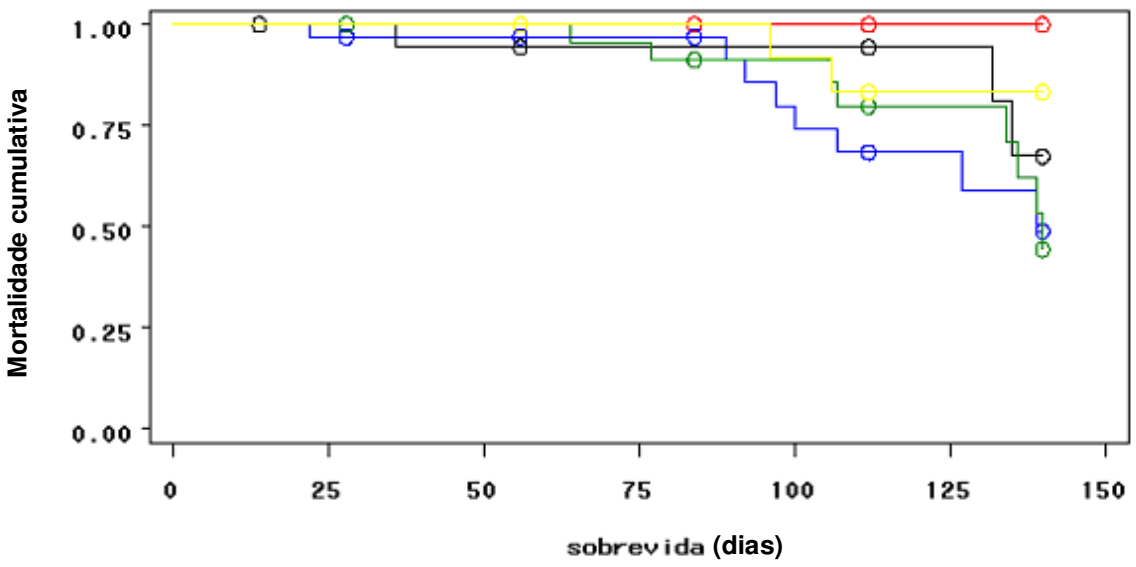
13. Análise estatística dos resultados

A comparação de duas amostras independentes foi feita pelo teste U de Mann-Whitney, enquanto a de mais de duas amostras independentes foi feita pelo teste de Kruskal-Wallis. O método da regressão segmentada foi utilizado para comparar as semanas de contagem das unidades formadoras de colônias. A comparação de duas amostras dependentes foi feita pelo teste de Wilcoxon. A avaliação de mortalidade cumulativa foi feita pelo estimador de Kaplan-Meyer e a comparação das freqüências de óbitos espontâneos foi realizada pelos testes do χ^2 e exato de Fisher. Definiu-se um erro tipo α igual ou inferior a 0,05 como significativo, isto é, para rejeição da hipótese de nulidade. Todos os testes foram feitos segundo as especificações de Zar[60].

Capítulo III – Resultados

1. Experimento I – Avaliação da mortalidade cumulativa e da porcentagem de óbitos espontâneos

A avaliação de sobrevida, realizada pelo estimador de Kaplan-Meyer, revelou que os grupos apresentaram tendência a serem diferentes entre si (p= 0,09), como revela a figura 1. A tabela 3 revela que a sobrevida foi maior no G1(GCs), não infectado, que nos grupos 2 (GCi) e 4 (GTc) que, por sua vez não diferiram entre si. Por fim os grupos 3 (GTp) e 5 (GTt), que não diferiram entre si, apresentaram maior taxa de sobrevida que os grupos 2 (GCi) e 4 (GTc), como revela a tabela 3.



- G1 (GCs) – Grupo Controle saudável, que recebeu somente solução fisiológica;
- G2 (GCi) – Grupo Controle infectado, que recebeu somente solução fisiológica;
- G3 (GTp) – Grupo que recebeu tratamento precoce, do 3º ao 140º dia após infecção;
- G4 (GTc) – Grupo que recebeu tratamento precoce, mas por curto período, do 3º ao 56º dia após infecção;
- G5 (GTt) – Grupo que recebeu tratamento tardio, mas por período prolongado, do 28º ao 140º dia após infecção

Figura 1: Mortalidade cumulativa de camundongos BALB/c saudáveis e de infectados com a cepa 18 de *Paracoccidioides brasiliensis* e submetidos a diferentes tratamentos com cotrimoxazol.

Tabela 3: Óbitos observados em 148 camundongos isogênicos, da linhagem BALB/c, infectados com a cepa 18 de *Paracoccidioides brasiliensis*, 118 dos quais foram submetidos a diferentes tratamentos. Cotrimoxazol administrado por gavagem, na dose diária de 200 mg/kg de peso corporal; em tomada única.

Grupos	Animais	Óbitos	
Experimentais	(número)	número	(%)
G1 (GCs)	30	0	$0,00^{C}$
G2 (GCi)	38	8	$21,10^{A}$
G3 (GTp)	28	3	$10,70^{B}$
G4 (GTc)	35	10	$28,60^{A}$
G5 (GTt)	17	2	$11,80^{B}$
Total	**148**	**23**	**15,50**

Letras maiúsculas comparam medianas em cada coluna; medianas seguidas de letras iguais não diferem entre si, enquanto as seguidas de letras diferentes diferem entre si.

G1 (GCs) – Grupo Controle saudável, que recebeu somente solução fisiológica;

G2 (GCi) – Grupo Controle infectado, que recebeu somente solução fisiológica;

G3 (GTp) – Grupo que recebeu tratamento precoce, do 3º ao 140º dia após infecção;

G4 (GTc) – Grupo que recebeu tratamento precoce, mas por curto período, do 3º ao 56º dia após infecção;

G5 (GTt) – Grupo que recebeu tratamento tardio, mas por período prolongado, do 28º ao 140º dia após infecção.

Contrastes:

G2 vs G4 $\chi^2 = 0,22$ $p>0,05$ G2 = G4

G3 vs G5 teste exato de Fisher $p = 0,37$ G3 = G5

G1 vs (G2+G4) vs (G3+G5) $\chi^2 = 10,95$ $p<0,01$

Comentário: a porcentagem de óbitos foi maior nos animais infectados e não tratados (G2) e nos tratados por curto período (G4) que nos tratados por período prolongado (G3 eG5).

2. Experimento II - Avaliação do efeito antifúngico do CMX

2.1 Avaliação de cada grupo experimental

GRUPO 1 – Grupo Controle saudável (GCs)

Esse grupo era constituído de camundongos sem infecção, que receberam, por gavagem, somente solução fisiológica.

Os camundongos desse grupo, permaneceram tranqüilos e com pêlos brilhantes do início ao fim do experimento. O peso desses animais aumentou em média de 25 para 31g.

O cultivo para recuperação de fungos foi sempre negativo, tanto de pulmão como de baço, em todos os animais. Nenhum dos camundongos revelam produção de anticorpos, durante todo o experimento.

GRUPO 2 – Grupo controle infectado (GCi)

Esse grupo era constituído de camundongos infectados que receberam, por gavagem, apenas solução fisiológica. Nas duas primeiras semanas não apresentaram sinais de doença e pesavam em média 25g; a seguir, começaram a perder peso, chegando a pesar em média 20g. A aparência desses animais também piorou com o decorrer do experimento, cujos pêlos se tornaram arrepiados e sem brilho. Além disso, apresentavam grande irritabilidade.

P. brasiliensis foi isolado de fragmentos de pulmão de todos os animais nos seis momentos em que foram sacrificados, como revelam a tabela 4 e a figura 2A. O número de unidades formadoras de colônias (UFC) elevou-se da segunda para a quarta semana, a partir da qual permaneceu estável.

Tabela 4: Recuperação de fungos de fragmentos de pulmão de camundongos isogênicos BALB/c infectados com a cepa 18 de *Paracoccidioides brasiliensis,* que receberam apenas solução fisiológica (GCi). Avaliação feita em função do tempo de infecção. Quantificação de fungos em unidades formadoras de colônias por grama de tecido.

Animal	Semanas de sacrifício*					
Número	2ª	4ª	8ª	12ª	16ª	20ª
1	8.937	39.900	102.818	69.750	466.500	25.833
2	5.333	11.437	65.500	32.643	75.417	196.125
3	12.200	10.750	82.100	77.312	118.000	39.682
4	4.200	16.000	18.333	70.136	113.318	99.125
5	16.167	296.600	56.227	124.250	88.875	466.625
Mediana	**8.937^{b}**	**16.000^{a}**	**65.500^{a}**	**70.136^{a}**	**113.318^{a}**	**99.125^{a}**

Letras minúsculas comparam medianas em cada linha; medianas seguidas de letras iguais não diferem entre si, enquanto as seguidas de letras diferentes diferem entre si.

* a contar do dia da infecção

Teste de Kruskal-Wallis $p<0,05$

O estudo realizado em fragmentos de baço revelou isolamento de *P. brasiliensis* de todos os camundongos, exceto um como demonstra a tabela 5.

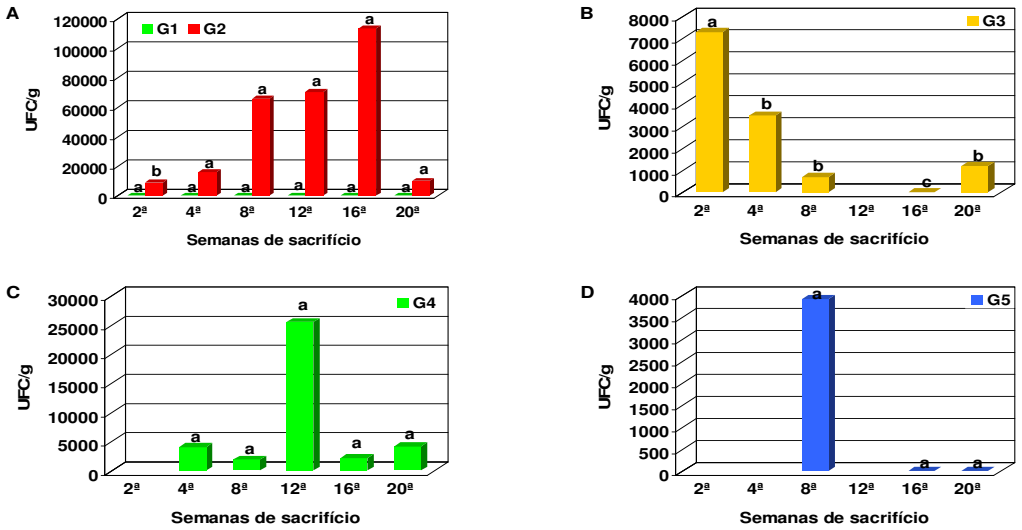


Figura 2 - Recuperação de *Paracoccidioides brasiliensis* de fragmentos de pulmão, em unidades formadoras de colônia por grama de tecido (UFC/g), em diferentes momentos. A - G1: grupo controle saudável que recebeu somente solução fisiológica; G2: grupo controle infectado que recebeu somente solução fiisológica; B - G3: grupo que recebeu tratamento precoce do 3º ao 140º dia após infecção; C - G4: grupo que recebeu tratamento precoce mas por curto período, do 3º ao 56º dia após infecção; D - G5: grupo que recebeu tratamento tardio, mas por período prolongado, do 28º ao 140º dia após infecção. Mediana de cinco camundongos em cada sacrifício. Tratamento com 200 mg/kg de cotrimoxazol, por gavagem, uma vez ao dia. Letras minúsculas comparam medianas que, seguidas de letras iguais não diferem entre si, enquanto as seguidas de letras diferentes diferem entre si.

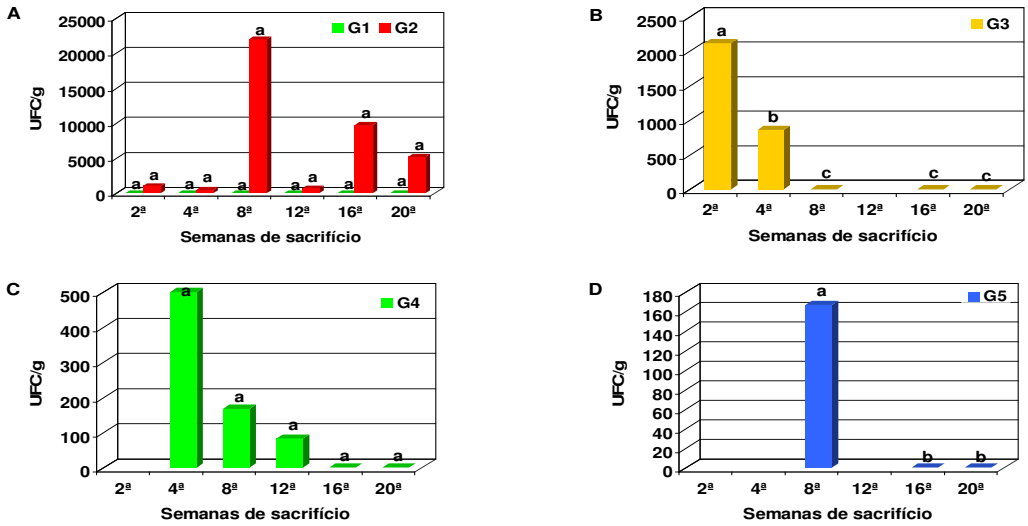


Figura 3 - Recuperação de *Paracoccidioides brasiliensis* de fragmentos de baço, em unidades formadoras de colônia por grama de tecido (UFC/g), em diferentes momentos. A - G1: grupo controle saudável que recebeu somente solução fisiológica; G2: grupo controle infectado que recebeu somente solução fiisológica; B - G3: grupo que recebeu tratamento precoce do 3º ao 140º dia após infecção; C - G4: grupo que recebeu tratamento precoce mas por curto período, do 3º ao 56º dia após infecção; D - G5: grupo que recebeu tratamento tardio, mas por período prolongado, do 28º ao 140º dia após infecção. Mediana de cinco camundongos em cada sacrifício. Tratamento com 200 mg/kg de cotrimoxazol, por gavagem, uma vez ao dia. Letras minúsculas comparam medianas que, seguidas de letras iguais não diferem entre si, enquanto as seguidas de letras diferentes diferem entre si.

Tabela 5. Recuperação de fungos de fragmentos de baço de camundongos isogênicos BALB/c infectados com a cepa 18 de *Paracoccidioides brasiliensis,* que receberam apenas solução fisiológica (GCi). Avaliação feita em função do tempo de infecção. Quantificação de fungos em unidades formadoras de colônias por grama de tecido.

Animal	Semanas de sacrifício*					
Número	2ª	4ª	8ª	12ª	16ª	20ª
1	1.056	350	51.954	500	67.750	375
2	556	273	21.954	0	9.750	104.833
3	950	10.954	8.812	72.176	9.000	5.214
4	11.533	500	654	38.314	31.964	80.250
5	2.700	52.714	114.400	700	5.375	667
Mediana	**1.056[a]**	**500[a]**	**21.954[a]**	**700[a]**	**9.750[a]**	**5.214[a]**

Letras minúsculas comparam medianas em cada linha; medianas seguidas de letras iguais não diferem entre si.

* a contar do dia de infecção

Teste de Kruskal-Wallis p>0,05

Ao contrário, do que se observou com pulmões, o número de UFC permaneceu estável no baço durante todo o experimento (tabela 5 e figura 3A).

Os níveis séricos de anticorpos passaram a ser detectáveis apenas a partir da quarta semana. Eles apresentaram novo aumento da quarta para a oitava semana, um decréscimo para a 12ª semana e permanecendo estáveis até o final do experimento, como demonstra a tabela 6.

Tabela 6: Níveis séricos de anticorpos específicos determinados pela reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, em camundongos isogênicos BALB/c infectados com a cepa 18 de *Paracoccidioides brasiliensis,* que receberam apenas solução fisiológica (GCi). Avaliação feita em função do tempo de infecção. Determinação semi-quantitativa, apresentada como inverso da diluição (1:).

Animal	Semanas de sacrifício*					
Número	2ª	4ª	8ª	12ª	16ª	20ª
1	NR	2	32	8	8	16
2	NR	ND	64	16	4	8
3	NR	NR	64	32	16	32
4	NR	8	32	16	4	16
5	NR	8	32	32	16	16
Mediana	**NR^{d}**	**2^{c}**	**32^{a}**	**16^{b}**	**8^{b}**	**16^{b}**

Letras minúsculas comparam medianas em cada linha; medianas seguidas de letras iguais não diferem entre si, enquanto as seguidas de letras diferentes diferem entre si.

NR = não reagente; ND = reagente em soro não diluído

* a contar do dia da infecção

Teste de Kruskal-Wallis p< 0,05

GRUPO 3 – Grupo submetido a tratamento precoce e prolongado, do 3º ao 140º dia pós-infecção (GTp)

Esse grupo era constituído por camundongos infectados que receberam, por gavagem, CMX, em suspensão, uma vez ao dia e sempre no mesmo horário, durante todo o experimento.

Os animais se mantiveram, do início ao fim do experimento, sem sinais de doença, apresentando pêlos brilhantes e permanecendo dóceis. Ao contrário do G2 (GCi), os camundongos deste grupo apresentaram ganho de peso, passando de 25g, em média, para 33g em média, no final do experimento. Pode-se notar que, após a administração do CMX os camundongos se tornavam agitados por alguns minutos e bebiam muita água.

P. brasiliensis foi isolado de fragmentos de pulmão de todos os camundongos da segunda à oitava semana de infecção. Na 16ª semana somente

um dos cinco animais apresentou crescimento e na 20ª semana um dos cinco animais apresentou cultura negativa, como revela a tabela 7.

Tabela 7: Recuperação de fungos de fragmentos de pulmão de camundongos isogênicos BALB/c infectados com a cepa 18 de *Paracoccidioides brasiliensis,* que receberam cotrimoxazol do 3º ao 140º dia de infecção (GTp). Avaliação feita em função do tempo de infecção. Quantificação de fungos em unidades formadoras de colônias por grama de tecido.

Animal	Semanas de sacrifício*				
Número	2ª	4ª	8ª	16ª	20ª
1	8.000	731	778	0	3.500
2	6.300	4.500	562	0	1.250
3	7.312	3.500	300	167	0
4	6.000	3.250	3.062	0	1.200
5	9.667	3.875	700	0	300
Mediana	**7.312^{a}**	**3.500^{b}**	**700^{b}**	**0^{c}**	**1.200^{b}**

Letras minúsculas comparam medianas em cada linha; medianas seguidas de letras iguais não diferem entre si, enquanto as seguidas de letras diferentes diferem entre si.

* a contar a partir do dia de infecção

Teste de Kruskal–Wallis $p < 0,05$

O número de UFC foi elevado na segunda semana e diminuiu a partir da quarta, atingindo seu menor valor na 16ª semana, como demonstra a tabela 7. Deve-se registrar que houve elevação do número de fungos recuperados, da 16ª para a 20ª semana, apesar da manutenção do CMX.

O número de fungos recuperados de fragmentos de baço apresentou uma curva decrescente da segunda à oitava semana quando, então, se estabilizou, como revelam a tabela 8 e a figura 3B. Deve-se registrar que o comportamento do baço, da 16ª para a 20ª semana, foi diferente do apresentado pelos pulmões, eliminando a infecção do baço de 46% dos animais.

Tabela 8: Recuperação de fungos de fragmentos de baço de camundongos isogênicos BALB/c infectados com a cepa 18 de *Paracoccidioides brasiliensis,* que receberam cotrimoxazol do 3º ao 140º dia de infecção (GTp). Avaliação feita em função do tempo de infecção. Quantificação de fungos em unidades formadoras de colônias por grama de tecido.

Animal	Semanas de sacrifício*				
Número	2ª	4ª	8ª	16ª	20ª
1	3.562	900	500	0	0
2	2.111	1.000	0	0	0
3	2.778	500	0	0	0
4	2.000	500	357	0	0
5	1.818	857	0	0	0
Mediana	**2.111[a]**	**857[b]**	**0[c]**	**0[c]**	**0[c]**

Letras minúsculas comparam medianas em cada linha; medianas seguidas de letras iguais não diferem entre si, enquanto as seguidas de letras diferentes diferem entre si.

* a contar do dia da infecção

Teste de Kruskal-Wallis p< 0,05

A detecção de anticorpos séricos específicos se iniciou na quarta semana de infecção. Assim, observou-se uma curva ascendente da segunda à 20ª semana, exceto por um decréscimo transitório, observado na 16ª semana (tabela 9).

Tabela 9. Níveis séricos de anticorpos específicos determinados pela reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, em camundongos isogênicos BALB/c infectados com a cepa 18 de *Paracoccidioides brasiliensis,* que receberam cotrimoxazol do 3º ao 140º dia de infecção (GTp). Avaliação feita em função do tempo de infecção. Determinação semi-quantitativa, apresentada como inverso da diluição (1:).

Animal	Semanas de sacrifício*				
Número	2ª	4ª	8ª	16ª	20ª
1	NR	ND	8	4	16
2	NR	2	NR	4	8
3	NR	NR	8	2	8
4	NR	2	8	4	16
5	NR	4	8	NR	16
Mediana	**NR[d]**	**2[c]**	**8[b]**	**4[c]**	**16[a]**

Letras minúsculas comparam medianas em cada linha; medianas seguidas de letras iguais não diferem entre si, enquanto as seguidas de letras diferentes diferem entre si.

NR = não reagente; ND = reagente em soro não diluído

* a contar do dia de infecção

Teste de Kruskal-Wallis p< 0,05

GRUPO 4 – Grupo submetido a tratamento precoce, mas de curta duração (GTc)

Este grupo foi constituído por camundongos infectados, que receberam CMX, por gavagem, do 3º ao 56º dia após infecção.

Até a oitava semana os animais deste grupo apresentavam-se bem, sem manifestações de doença, com pêlos brilhantes e comportamento dócil. Da mesma forma, como os animais do G3 (GTp), ficavam agitados após a administração de CMX, a que se seguia a ingestão de água em abundância. Até essa época, pesavam em média 30g. A interrupção do tratamento, no entanto, se acompanhou de piora do estado dos animais, que passaram a apresentar pêlos arrepiados, irritação e emagrecimento, chegando a média de 23g, no final do experimento.

P. brasiliensis foi isolado de fragmentos de pulmão de 88% dos camundongos como revela a tabela 10.

Tabela 10: Recuperação de fungos de fragmentos de pulmão de camundongos isogênicos BALB/c infectados com a cepa 18 de *Paracoccidioides brasiliensis,* que receberam cotrimoxazol do 3º ao 56º dia de infecção (GTc). Avaliação feita em função do tempo de infecção. Quantificação de fungos em unidades formadoras de colônias por grama de tecido.

Animal	Semanas de sacrifício*				
Número	4ª	8ª	12ª	16ª	20ª
1	1.500	4.250	25.500	0	0
2	4.000	1.875	9.900	750	5.500
3	4.600	357	145.300	2.167	4.167
4	7.300	700	27.500	177.875	67.750
5	300	3.300	111	10.125	0
Mediana	**4.000[a]**	**1.875[a]**	**25.500[a]**	**2.167[a]**	**4.167[a]**

Letras minúsculas comparam medianas em cada linha; medianas seguidas de letras iguais não diferem entre si.

* a contar do dia de infecção

Teste de Kruskal-Wallis p>0,05

Por outro lado, a carga fúngica se manteve estável em fragmentos de pulmão durante todo o experimento, como revelam a tabela 10 e a figura 2C.

O isolamento do *P. brasiliensis* em fragmentos de baço ocorreu em 48% dos camundongos, como revelam a tabela 11 e figura 3C.

Tabela 11: Recuperação de fungos de fragmentos de baço de camundongos isogênicos BALB/c infectados com a cepa 18 de *Paracoccidioides brasiliensis,* receberam cotrimoxazol do 3º ao 56º dia de infecção (GTc). Avaliação feita em função do tempo de infecção. Quantificação de fungos em unidades formadoras de colônias por grama de tecido.

Animal	Semanas de sacrifício*				
Número	4ª	8ª	12ª	16ª	20ª
1	850	583	2.375	0	0
2	500	188	0	0	0
3	2.000	0	1.500	0	0
4	250	71	83	0	1.813
5	0	167	0	0	0
Mediana	**500ª**	**167ª**	**83ª**	**0ª**	**0ª**

Letras minúsculas comparam medianas em cada linha; medianas seguidas de letras iguais não diferem entre si.

* a contar do dia da infecção

Teste de Kruskal-Wallis p>0,05

A carga fúngica de fragmentos de baço permaneceu estável durante todo o experimento (tabela 11 e figura 3C). A freqüência de animais com culturas positivas foi menor na 16ª e na 20ª semana que nos três sacrifícios anteriores ($p<0,01$).

Os anticorpos séricos foram detectados em 88% dos camundongos, como revela a tabela 12. Os níveis séricos se mantiveram estáveis durante todo o experimento (tabela 12).

Tabela 12. Níveis séricos de anticorpos específicos determinados pela reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, em camundongos isogênicos BALB/c infectados com a cepa 18 de *Paracoccidioides brasiliensis,* que receberam cotrimoxazol 3º ao 56º dia de infecção (GTc). Avaliação feita em função do tempo de infecção. Determinação semi-quantitativa e apresentada como inverso da diluição (1:).

Animal	Semanas de sacrifício*				
Número	4ª	8ª	12ª	16ª	20ª
1	4	16	16	16	NR
2	8	8	16	16	16
3	8	ND	16	8	16
4	4	8	8	32	16
5	NR	16	8	16	NR
Mediana	**4ª**	**8ª**	**16ª**	**16ª**	**16ª**

Letras minúsculas comparam medianas em cada linha; medianas seguidas de letras iguais não diferem entre si.

NR = não reagente; ND = reagente em soro não diluído

* a contar a partir do dia da infecção

Teste de Kruskal-Wallis p>0,05

GRUPO 5 – Grupo submetido a tratamento tardio, mas de longa duração (GTt)

Esse grupo foi constituído por camundongos infectados que receberam CMX, por gavagem, a partir do 28º dia de infecção e que se prolongou até o final do experimento, isto é, até o 140º dia.

Durante o período em que não foram tratados, esses camundongos mantiveram seu peso estável, em torno de 25g, mas se revelaram muito irritados e com pêlos menos brilhantes. Com a instituição da terapia passaram a ganhar peso, chegando a 33g, os pêlos recuperaram o brilho e eles se tornaram dóceis. Da mesma maneira que os animais de outros grupos a administração de CMX os tornava agitados e os levava a grande ingestão de água.

O isolamento de *P. brasiliensis* de fragmentos de pulmão, foi verificado em 53% dos camundongos, como se observa na tabela 13.

Tabela 13. Recuperação de fungos de fragmentos de pulmão de camundongos isogênicos BALB/c infectados com a cepa 18 de *Paracoccidioides brasiliensis,* que receberam cotrimoxazol do 28º ao 140º dia de infecção (GTt). Avaliação feita em função do tempo de infecção. Quantificação de fungos em unidades formadoras de colônias por grama de tecido.

Animal	Semanas de sacrifício*		
Número	8ª	16ª	20ª
1	26.417	0	250
2	2.875	1.250	0
3	7.600	0	0
4	0	500	0
5	3.917	0	375
Mediana	**3.917[a]**	**0[a]**	**0[a]**

Letras minúsculas comparam medianas em cada linha; medianas Seguidas de letras iguais não diferem entre si.

* a contar do dia da infecção

Teste de Kruskal-Wallis p>0,05

O número de UFC de fragmentos de pulmão permaneceu estável durante todo o experimento (tabela 13 e figura 2D).

O fungo *P. brasiliensis* só foi isolado de fragmentos de baço na oitava semana, como se pode observar na tabela 14.

Tabela 14: Recuperação de fungos de fragmentos de baço de camundongos isogênicos BALB/c infectados com a cepa 18 de *Paracoccidioides brasiliensis,* que receberam cotrimoxazol do 28º ao 140º dia de infecção (GTt). Avaliação feita em função do tempo de infecção. Quantificação de fungos em unidades formadoras de colônias por grama de tecido.

Animal	Semanas de sacrifício*		
Número	8ª	16ª	20ª
1	1.000	0	0
2	167	0	0
3	125	0	0
4	0	0	0
5	250	0	0
Mediana	**167[a]**	**0[b]**	**0[b]**

Letras minúsculas comparam medianas em cada linha; medianas seguidas de letras iguais não diferem entre si, enquanto as seguidas de letras diferentes diferem entre si.

* a contar do dia da infecção

Teste de Kruskal-Wallis p< 0,05

Observou-se redução evidente da carga fúngica de baço, da oitava para a 16ª semana (tabela 14 e figura 3D), que se mostrou estéril e que assim se manteve na 20ª semana (tabela 14).

Os anticorpos séricos específicos foram detectados em 80% dos camundongos. Os níveis séricos não diferiram durante todo o experimento, mantendo-se estáveis.

Tabela 15: Níveis séricos de anticorpos específicos determinados pela reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, em camundongos isogênicos BALB/c infectados com a cepa 18 de *Paracoccidioides brasiliensis,* que receberam cotrimoxazol do 28º ao 140º dia de infecção (GTt). Avaliação feita em função do tempo de infecção. Determinação semi-quantitativa, apresentada como inverso da diluição (1:).

Animal	Semanas de sacrifício*		
Número	8ª	16ª	20ª
1	4	8	NR
2	16	16	NR
3	4	16	16
4	NR	16	8
5	32	16	8
Mediana	**4ª**	**16ª**	**8ª**

Letras minúsculas comparam medianas em cada linha; medianas seguidas de letras iguais não diferem entre si.

NR = não reagente

* a contar do dia da infecção

Teste de Kruskal-Wallis p>0,05

2.2 Comparação dos tratamentos

Os tratamentos foram comparados em seis momentos, da segunda à 20ª semana, em função da recuperação de fungos de fragmentos de pulmão e de baço e da produção de anticorpos séricos específicos, determinada pela reação de imunodifusão dupla em gel de agar.

A. Recuperação de fungos de fragmentos de pulmão

Os resultados dessa avaliação se encontram na tabela 16 e figura 4.

A avaliação, realizada na segunda semana, revela que não houve diferença entre o G2 (GCi), não tratado e o G3 (GTp), sob tratamento com CMX. Nenhum fungo foi recuperado no G1 (GCs), que é o grupo controle não tratado.

Na quarta semana já pode ser observado o efeito dos tratamentos, pois a recuperação de fungos foi menor nos grupos tratados, G3 (GTp) e G4 (GTc), que no grupo não tratado (G2-GCi). Deve-se registrar que os grupos tratados não diferiram entre si, o que era esperado, pois nesse momento os tratamentos eram idênticos. Uma vez mais, nenhum fungo foi isolado de camundongos do G1(GCs).

Os três grupos tratados, G3 (GTp), G4 (GTc)e G5 (GTt), apresentaram recuperação de fungos que não diferiam entre si, na oitava semana, mas que foram menores que a carga fúngica isolada no G2 (GCi), não tratado. Deve-se registrar que os G3 (GTp) e G4 (GTc) apresentavam, nesse momento, o mesmo esquema terapêutico e que o G5 (GTt) estava sendo tratado há apenas quatro semanas.

Na 12ª semana pode-se observar o efeito da descontinuação do tratamento no G4 (GTc), pois a recuperação de *P. brasiliensis* não diferiu da observada no G2 (GCi), constituído de camundongos infectados, mas não tratados. Como seria esperado, desses dois grupos foi recuperado maior número de fungos que no G1 (GCs), constituído de animais não infectados.

Os cinco tratamentos foram comparados na 16ª semana. Pode-se observar a eficácia dos tratamentos dos grupos 3 (GTp) e 5 (GTt), que diferem apenas em relação ao início da administração do CMX. A recuperação de fungos desses grupos não diferiu entre si, nem do G1 (GCs), constituído de animais não infectados, o que caracteriza a quase total esterilização dos fragmentos de pulmão, pelo CMX. A recuperação de fungos foi muito maior no grupo não tratado (G2-GCi) e intermediária no grupo cujo tratamento tinha sido descontinuado (G4-GTc).

Por fim, na 20ª semana, a recuperação de fungos dos grupos tratados, G3 (GTp), G4 (GTc) e G5 (GTt), não diferiu entre si, nem do grupo não infectado (G1-GCs), mas foi menor que a observada no grupo infectado e não tratado (G2-GCi). Deve-se registrar que os animais dos grupos 3 (GTp) e 5 (GTt) ainda se encontravam em tratamento quando foram sacrificados, o que não ocorria com o G4 (GTc), cujo tratamento tinha sido descontinuado oito semanas antes.

Tabela 16: Avaliação do efeito dos tratamentos na recuperação de fungos de fragmentos de pulmão de camundongos isogênicos BALB/c infectados com a cepa 18 de *Paracoccidioides brasiliensis.* Quantificação de fungos em unidades formadoras de colônias por grama de tecido. Análise comparativa entre grupos, em cada momento.

Pulmões	Semanas de sacrifício*					
	2ª	4ª	8ª	12ª	16ª	20ª
G1 (GCs)	0^{B}	0^{C}	0^{C}	0^{B}	0^{C}	0^{B}
G2 (GCi)	8.937^{A} 4.200 – 16.167	16.000^{A} 10.750 – 296.600	65.500^{A} 18.333 – 102.818	70.136^{A} 32.643 – 124.250	113.318^{A} 75.417 - 466.500	99.125^{A} 25.833 – 466.625
G3 (GTp)	7.312^{A} 6.000 - 9.667	3.500^{B} 731 - 4.500	700^{B} 300 – 3.062	—	0^{C} 0 - 167	1.200^{B} 0 - 3.500
G4 (GTc)	—	4.000^{B} 300 - 7.300	1.875^{B} 357 – 4.250	25.500^{A} 111 - 145.300	2.167^{B} 0 – 177.875	4.167^{B} 0 – 67.750
G5 (GTt)	—	—	3.917^{B} 0 – 26.417	—	0^{C} 0 - 1.250	0^{B} 0 – 375

Letras maiúsculas comparam medianas em cada coluna; medianas seguidas de letras iguais não diferem entre si, enquanto as seguidas de letras diferentes diferem entre si.

* a contar do dia da infecção

G1 (GCs) – Grupo Controle saudável, que receberam somente solução fisiológica; G2 (GCi) – Grupo Controle infectado, que receberam somente solução fisiológica

G3 (GTp) – Grupo que recebeu tratamento precoce, do 3º ao 140º dia após infecção; G4 (GTc) – Grupo que recebeu tratamento precoce, mas por curto período, do 3º ao 56º dia após infecção; G5 (GTt) – Grupo que recebeu tratamento tardio, mas por período prolongado, do 28º ao 140º dia após infecção

Teste de Kruskal-Wallis $p < 0,05$

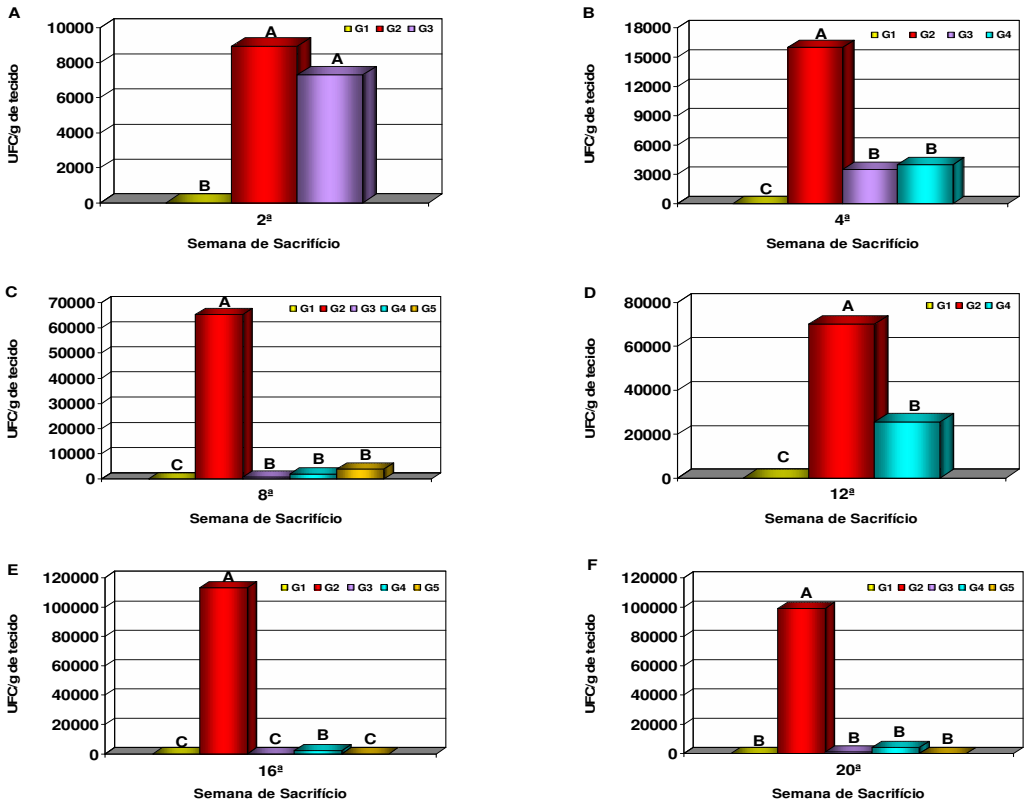


Figura 4 - Avaliação do efeito dos tratamentos na recuperação de fungos de fragmentos de pulmão de camundongos isogênicos BALB/c infectados com a cepa 18 de *Paracoccidioides brasiliensis.* Quantificação de fungos em unidades formadoras de colônias por grama de tecido (UFC/g). Análise comparativa entre grupos, em cada momento. Letras maiúsculas comparam medianas que, seguidas de letras iguais não diferem entre si, enquanto as seguidas de letras diferentes diferem entre si. G1 (GCs) – Grupo Controle saudável, que receberam somente solução fisiológica; G2 (GCi) – Grupo Controle infectado, que receberam somente solução fisiológica; G3 (GTp) – Grupo que recebeu tratamento precoce, do 3º ao 140º dia após infecção; G4 (GTc) – Grupo que recebeu tratamento precoce, mas por curto período, do 3º ao 56º dia após infecção; G5 (GTt) – Grupo que recebeu tratamento tardio, mas por período prolongado, do 28º ao 140º dia após infecção.

B. Recuperação de fungos de fragmentos de baço

Os resultados dessa avaliação constam da tabela 17 e na figura 5.

A avaliação realizada na segunda semana revela que não houve diferença entre o G2 (GCi), não tratado e o G3 (GTp), sob tratamento com CMX. Nenhum fungo foi recuperado no G1, que é o grupo controle não tratado, como seria esperado.

Na quarta semana, os dois grupos tratados, G3 (GTp) e G4 (GTc), não diferiram entre si, nem do G2 (GCi), infectado e não tratado, demonstrando que o efeito do tratamento ainda não tinha se manifestado. Do G1 (GCs), constituído de camundongos não infectados, nenhum fungo foi isolado, como era esperado.

O efeito dos tratamentos só foi observado na oitava semana, pois a recuperação de fungos foi menor nos grupos 3 (GTp), 4 (GTc) e 5 (GTt), tratados, que no G2 (GCi), infectado e não tratado. Os grupos sob tratamento, por sua vez, não diferiram entre si, enquanto do G1 não se isolou nenhum fungo.

Na 12ª semana pós-infecção, do G4 (GTc), cujo tratamento foi interrompido quatro semanas antes, isolou-se uma carga fúngica que não diferia da apresentada pelo G1 (GCs), constituída de animais não infectados, mas que era menor que a revelada pelo G2 (GCi), cujos animais tinham sido infectados, mas não tratados, revelando a existência de um efeito residual do tratamento.

Os cinco grupos foram comparados na 16ª semana e revelavam que nenhum fungo tinha sido isolado dos grupos submetidos a tratamento, assim como do G1 (GCs), não infectado. Deve-se assinalar a ausência de isolamento de fungos na 16ª semana, no G4 (GTc), uma vez que nesses animais o tratamento tinha sido interrompido oito semanas antes.

Por fim, na 20ª semana se repetiram os mesmos achados da 16ª semana.

Tabela 17: Avaliação do efeito dos tratamentos na recuperação de fungos de fragmentos de baço de camundongos isogênicos BALB/c infectados com a cepa 18 de *Paracoccidioides brasiliensis.* Quantificação de fungos em unidades formadoras de colônias por grama de tecido. Análise comparativa entre grupos em cada momento.

Baço	Semanas de sacrifício*					
	2ª	4ª	8ª	12ª	16ª	20ª
G1 (GCs)	0^{B}	0^{B}	0^{B}	0^{B}	0^{B}	0^{B}
G2 (GCi)	1.056^{A}	500^{A}	21.954^{A}	700^{A}	9.750^{A}	5.214^{A}
	556 – 11.533	273 – 52.714	654 – 114.400	0 - 72.176	5.375 - 67.750	375 - 104.833
G3 (GTp)	2.111^{A}	857^{A}	0^{B}	—	0^{B}	0^{B}
	1.818 - 3.562	500 - 1.000	0 – 500		0 – 0	0 - 0
G4 (GTc)	—	500^{A}	167^{B}	83^{B}	0^{B}	0^{B}
		0 – 2.000	0 – 583	0 - 2.375	0 – 0	0 - 1.813
G5 (GTt)	—	—	167^{B}	—	0^{B}	0^{B}
			0 – 1.000		0 – 0	0 - 0

Letras maiúsculas comparam medianas em cada coluna; medianas seguidas de letras iguais não diferem entre si, enquanto as seguidas de letras diferentes diferem entre si.

* a contar do dia da infecção

G1 (GCs) – Grupo Controle saudável, que receberam somente solução fisiológica; G2 (GCi) – Grupo Controle infectado, que receberam somente solução fisiológica

G3 (GTp) – Grupo que recebeu tratamento precoce, do 3º ao 140º dia após infecção; G4 (GTc) – Grupo que recebeu tratamento precoce, mas por curto período, do 3º ao 56º dia após infecção; G5 (GTt) – Grupo que recebeu tratamento tardio, mas por período prolongado, do 28º ao 140º dia após infecção

Teste de Kruskal-Wallis $p < 0,05$

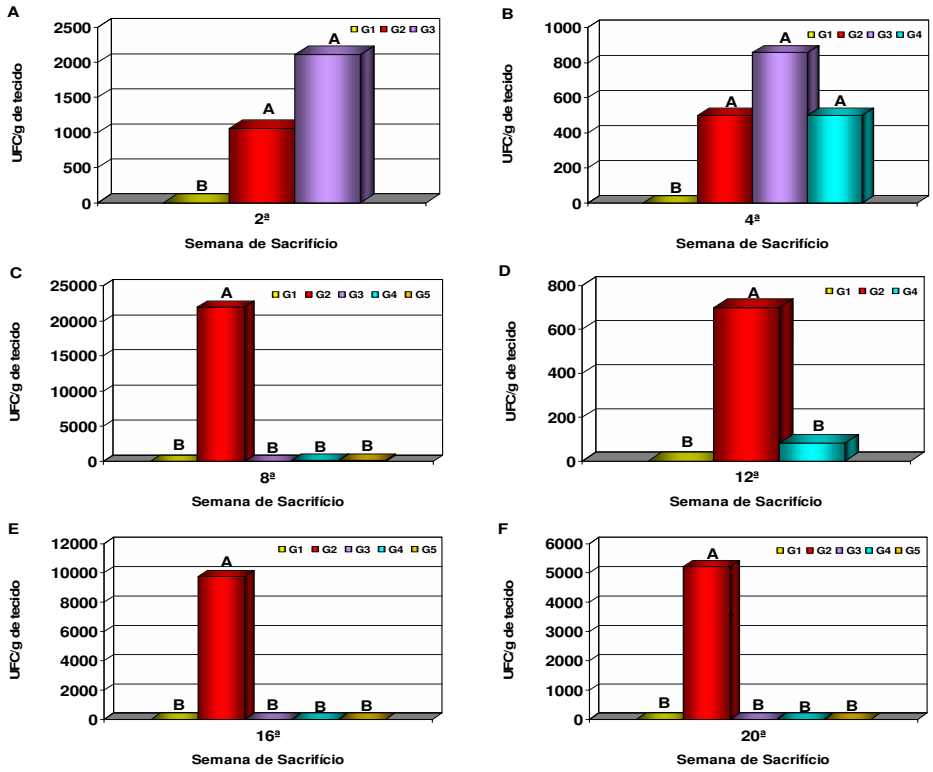


Figura 5 - Avaliação do efeito dos tratamentos na recuperação de fungos de fragmentos de baço de camundongos isogênicos BALB/c infectados com a cepa 18 de *Paracoccidioides brasiliensis.* Quantificação de fungos em unidades formadoras de colônias por grama de tecido (UFC/g). Análise comparativa entre grupos, em cada momento. Letras maiúsculas comparam medianas que, seguidas de letras iguais não diferem entre si, enquanto as seguidas de letras diferentes diferem entre si. G1 (GCs) – Grupo Controle saudável, que receberam somente solução fisiológica; G2 (GCi) – Grupo Controle infectado, que receberam somente solução fisiológica; G3 (GTp) – Grupo que recebeu tratamento precoce, do 3º ao 140º dia após infecção; G4 (GTc) – Grupo que recebeu tratamento precoce, mas por curto período, do 3º ao 56º dia após infecção; G5 (GTt) – Grupo que recebeu tratamento tardio, mas por período prolongado, do 28º ao 140º dia após infecção.

C. Níveis séricos de anticorpos específicos

Os resultados da determinação dos níveis séricos de anticorpos específicos se encontram na tabela 18, que revela que eles passaram a ser detectados, nos grupos infectados, a partir da quarta semana.

Na segunda e na quarta semanas, os níveis séricos de anticorpos específicos não diferiram entre os grupos avaliados.

Os resultados dos cinco grupos, comparados na oitava semana, revelam que os níveis de anticorpos séricos foram maiores no G2 (GCi), infectado e não tratado, que nos demais grupos que, por sua vez, não diferiram entre si. Esses resultados sugerem que os menores níveis séricos poderiam estar vinculados a um efeito do tratamento instituído.

Na 12ª semana, os níveis séricos de anticorpos dos grupos 2 (GCi) e 4 (GTc) não diferiram entre si, mas eram superiores aos do G1 (GCs), constituído de animais não infectados. Como o G2 (GCi) era formado por animais infectados e não tratados e o G4 (GTc) por animais que haviam sido tratados até quatro semanas antes, esses resultados sugerem a inexistência de efeito residual do tratamento, quando avaliado por este parâmetro.

Os cinco grupos foram comparados na 16ª semana e revelavam que os níveis séricos anticorpos dos grupos 2 (GCi), 4 (GTp) e 5 (GTt) não diferiram entre si, sendo superiores ao do G1 (GCs) constituído de animais não tratados e G3 (GTp) que era formado por animais tratados.

Por fim, os resultados da 20ª semana revelam que os níveis séricos de anticorpos específicos não diferiram entre os quatro grupos infectados, mas foram superiores aos do grupo não infectado. Esses achados descartam a existência de um efeito dos tratamentos sobre os níveis séricos de anticorpos específicos.

A análise do conjunto de dados demonstra que somente na oitava semana os grupos tratados apresentaram níveis séricos de anticorpos específicos menores que os do grupo não tratado.

Tabela 18: Avaliação dos níveis séricos de anticorpos específicos determinados pela reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, em camundongos isogênicos BALB/c infectados com a cepa 18 de *Paracoccidioides brasiliensis* em relação ao efeito dos tratamentos. Determinação semi-quantitativa, apresentada como inverso da diluição (1:). Análise comparativa entre grupos em cada momento.

Imunodifusão	Semanas de sacrifício*					
	2ª	4ª	8ª	12ª	16ª	20ª
G1 (GCs)	NR^{A}	NR^{A}	NR^{B}	NR^{B}	NR^{C}	NR^{B}
G2 (Gci)	NR^{A} NR – NR	2^{A} NR - 8	32^{A} 32 – 64	16^{A} 8 32	8^{A} 4 16	16^{A} 8 32
G3 (GTp)	NR^{A} NR – NR	2^{A} NR - 4	8^{B} NR – 8	—	4^{B} NR - 4	16^{A} 8 16
G4 (GTc)	—	4^{A} NR - 8	8^{B} ND – 16	16^{A} 8 16	16^{A} 8 32	16^{A} NR - 16
G5 (GTt)	—	—	4^{B} NR – 32	—	16^{A} 8 16	8^{A} NR - 16

Letras maiúsculas comparam medianas em cada coluna; medianas seguidas de letras iguais não diferem entre si, enquanto as seguidas de letras diferentes diferem entre si.

NR = não reagente; ND = reagente em soro não diluído

* a contar do dia da infecção

G1 (GCs) – Grupo Controle saudável, que receberam somente solução fisiológica; G2 (GCi) – Grupo Controle infectado, que receberam somente solução fisiológica

G3 (GTp) – Grupo que recebeu tratamento precoce, do 3º ao 140º dia após infecção; G4 (GTc) – Grupo que recebeu tratamento precoce, mas por curto período, do 3º ao 56º dia após infecção; G5 (GTt) – Grupo que recebeu tratamento tardio, mas por período prolongado, do 28º ao 140º dia após infecção

Teste de Kruskal-Wallis $p < 0,05$

2.3 Comparação dos efeitos do cotrimoxazol sobre a recuperação de *P. brasiliensis* de fragmentos de pulmão e baço

Os índices de recuperação relativa de *P. brasiliensis* de fragmentos de pulmão e de baço foram avaliados nos quatro grupos infectados, nos diferentes momentos, como revela a tabela 19. Como se pode observar, em nenhum momento os índices de recuperação relativa de fungos de fragmentos de pulmão e baço revelaram diferenças entre si, sugerindo que a ação do CMX se manifesta igualmente nos dois órgãos.

Tabela 19: Medianas dos índices de recuperação relativa de fungos* de fragmentos de pulmão e de baço, de camundongos isogênicos BALB/c infectados com a cepa 18 de P*aracoccidioides brasiliensis*, nos diferentes momentos de sacrifício.

Grupo	Momento (semana)	Pulmão	Baço	Valor de **p**
G2 (GCi)	4	2,81	- 0,51	p>0,05
	8	5,73	38,52	
	12	6,69	- 0,53	
	16	13,14	8,47	
	20	22,60	4,49	
G3 (GTp)	4	- 0,52	- 0,75	p>0,05
	8	- 0,91	- 1,00	
	16	- 1,00	- 1,00	
	20	- 0,80	- 1,00	
G4 (GTc)	8	0,65	- 0,62	p>0,05
	12	7,38	- 0,25	
	16	7,74	- 1,00	
	20	0,14	- 1,00	
G5 (GTt)	16	- 1,00	- 1,00	p>0,05
	20	- 1,00	- 1,00	

* Recuperação de fungos em determinado momento menos a recuperação na Segunda semana, dividida pela recuperação observada na segunda semana.

G2 (GCi)– Grupo Controle infectado, que receberam somente solução fisiológica; G3 (GTp)– Grupo que recebeu tratamento precoce, do 3º ao 140º dia após infecção; G4 (GTc)– Grupo que recebeu tratamento precoce, mas por curto período, do 3º ao 56º dia após infecção; G5 (GTt) – Grupo que recebeu tratamento tardio, mas por período prolongado, do 28º ao 140º dia após infecção

Teste U de Wilcoxon p>0,05

3. Experimento III - Avaliação dos níveis séricos de sulfametoxazol

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, em uma única tomada podem ser avaliados na tabela 20. Os resultados revelam que os valores máximos foram observados às 18:00 h; os valores intermediários apareceram nas determinações realizadas às 24:00 h e às 6:00 h, que não diferiram entre si. Por fim, os menores valores foram observados às 12:00 h, pouco antes do horário da nova administração.

Tabela 20: Perfil sérico da fração livre do sulfametoxazol (µg/mL), observado em 20 camundongos isogênicos BALB/c, sem infecção, sacrificados após 10 dias de administração de cotrimoxazol, na dose diária de 200 mg/kg de peso corporal, ao dia, por gavagem, em uma única tomada diária, às 13:30 horas.

Animal	Horários de dosagem			
Número	12:00	18:00	24:00	06:00
1	3,51	118,45	24,60	5,45
2	1,05	88,40	9,14	20,21
3	1,76	103,16	55,71	33,39
4	1,93	97,19	25,13	5,98
5	2,46	61,34	30,76	5,27
Mediana	**1,93^{c}**	**97,19^{a}**	**25,13^{b}**	**5,98^{b}**
1º e 3º quartil	**[1,6 ; 2,7]**	**[81,6 ; 106,9]**	**[20,7 ; 36,9]**	**[5,4 ; 23,5]**

Letras minúsculas comparam medianas em cada linha; medianas seguidas de letras iguais não diferem entre si, enquanto as medianas seguidas de letras diferentes diferem entre si.

Teste de Kruskal-Wallis $p<0,05$

4. Experimento IV - Avaliação da recuperação de fungos, em função do tempo de cultivo

O número de unidades formadoras de colônias de *P. brasiliensis*, obtido na recuperação de fungos de fragmentos de pulmão e baço, aumenta da primeira para a segunda semana de cultivo, mantendo-se estável até a quarta semana, como se pode observar na figura 6.

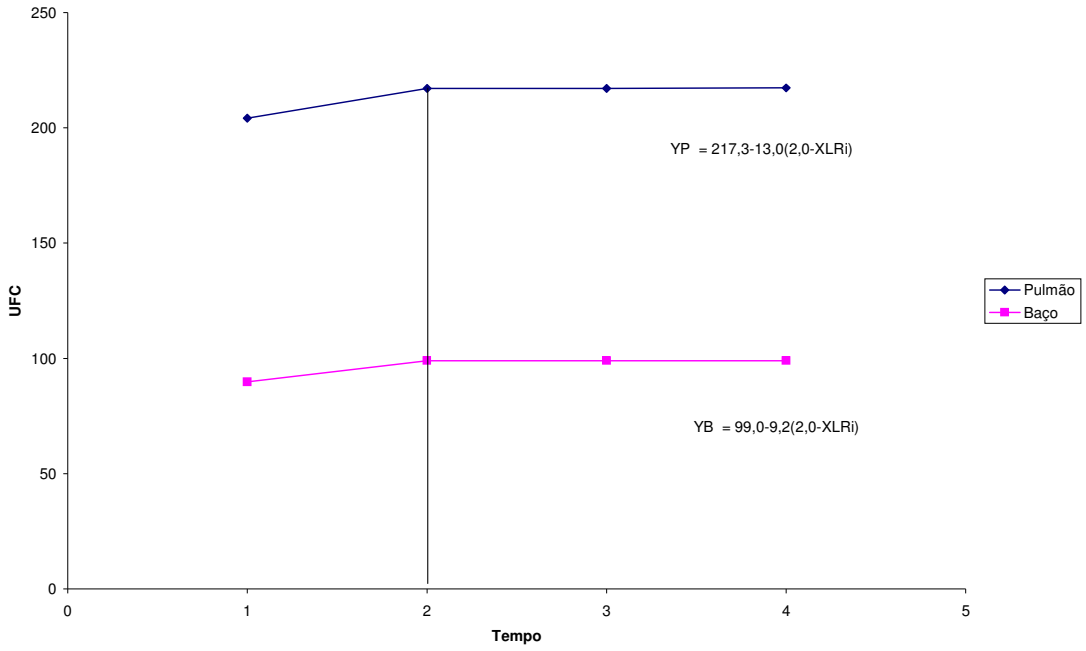


Figura 6: Recuperação de *Paracoccidioides brasiliensis* de fragmentos de pulmão e de baço de 95 animais que foram infectados e, a seguir, sacrificados, em função do tempo de cultivo.

Capítulo IV – Discussão

É amplamente aceito que a atividade antimicrobiana observada *in vitro* se correlaciona e prediz o comportamento dessa droga no uso clínico. Para muitos compostos antibacterianos essa correlação é verdadeira. No entanto, para antifúngicos essa correlação é pobre. Para os derivados azólicos, a correlação entre os efeitos *in vivo* e *in vitro* era tão ruim que os testes de *screening* chegaram a ser abandonados.

Por outro lado, os testes *in vitro* com amostras de *Candida* spp e *Cryptococcus* spp se encontram entre os que revelam melhores correlações com a resposta clínica. Ao contrário, ainda não se dispõe de testes *in vitro* que se correlacionem bem com a resposta clínica para fungos dimórficos e, menos ainda, para os filamentosos.

Essa falta de padronização dos testes de sensibilidade *in vitro* podia estar relacionada ao pequeno valor que se dava, em passado recente, às infecções fúngicas e, como conseqüência, aos antifúngicos. No entanto, um simpósio realizado no *9th International Congress of the International Society for Human and Animal Mycology* (Atlanta, Estados Unidos), sobre determinação e significado clínico de testes para avaliação da sensibilidade de fungos a antimicóticos, o crescimento da incidência de infecções fúngicas oportunísticas e o advento de novas drogas antifúngicas têm modificado bastante este panorama. Assim, muitos estudos foram e continuam sendo conduzidos no sentido de padronizar tamanho do inoculo, constituição do meio de cultura, período de incubação e determinação do efeito esperado para cada teste *in vitro* de sensibilidade a agentes antifúngicos[61].

Apesar de todos esses avanços, os testes *in vitro* não são adequados para avaliar substâncias que agem como pró-droga, pois dependem do metabolismo do hospedeiro para transformá-las em drogas que apresentam atividade antifúngica.

Devido a essas dificuldades, desenvolveram-se os modelos de infecção experimental, que em geral determinam doença rapidamente fatal, nos quais são aplicadas poucas doses de antifúngicos e cujo desfecho esperado é o retardo da morte, isto é, o aumento da sobrevida[62].

Esse modelo proporciona um rápido *screening* de muitas drogas a baixo custo, o que é uma necessidade da indústria farmacêutica, que precisa selecionar, entre muitas, as drogas mais promissoras, para desenvolvimento posterior. No entanto, este modelo tende a selecionar compostos que apresentam rápida atividade antifúngica, com a menor interação com as defesas do hospedeiro.

Assim, os modelos de infecção experimental que induzem doença rapidamente fatal parecem mais adequados à avaliação da eficácia de drogas que agem em fungos oportunistas, no hospedeiro imunossuprimido. Esses modelos, portanto, não mimetizam as micoses endêmicas, inclusive as sistêmicas, que comprometem hospedeiros imunocompetentes e que apresentam um caráter crônico, tais como PCM, histoplasmose, coccidioidomicose e cromoblastomicose, entre outras. Nesses casos, a rapidez da atividade antifúngica pode não ser essencial, embora desejável, enquanto a atividade fungicida ao longo do tempo é muito importante, pois essas doenças se caracterizam por sua cronicidade e pelas recaídas. A interação dessas drogas com a resposta imune do hospedeiro se torna muito importante, pois esta última constitui importante determinante do desfecho.

Os modelos experimentais para avaliação da eficácia de antifúngicos em micoses sistêmicas devem mimetizar os problemas relacionados com a penetração de drogas em tecidos cronicamente infectados, nos quais granulomas e fibrose atuam impedindo esta difusão. Por outro lado, a penetração de drogas em macrófagos e células gigantes pode ser importante, no estudo dessas infecções[63].

Os estudos realizados na PCM experimental murina têm revelado boa concordância com os ensaios clínicos, como ocorreu com a avaliação do CTZ, por Lefler et al.[41] e por Negroni et al.[43], respectivamente.

É interessante notar que o CMX foi indicado no tratamento da PCM graças a dois estudos observacionais[17, 18]. Sua toxicidade, muito menor que a da AMB e sua distribuição gratuita aos pacientes, aliados à eficácia, foram responsáveis pela difusão de sua indicação no tratamento da PCM, nos diferentes Serviços especializados do país. Somente em 2004 o CMX foi estudado em modelo experimental bem conduzido[49], a que se seguiram estudos que geraram duas comunicações prévias[50, 51].

Os trabalhos consultados revelam que não foi seguida uma padronização dos modelos utilizados na avaliação da eficácia de antifúngicos no tratamento da PCM experimental. Eles diferiram quanto à espécie e ao sexo do animal utilizado, à cepa infectante e ao tamanho do inoculo, ao início e à duração do tratamento, às doses utilizadas na avaliação de um mesmo antifúngico e, por fim, quanto ao desfecho a ser alcançado.

Assim, foram utilizados hamsters, camundongos Balb/c e B10A, ratos Wistar e cobaios. Quase todos os trabalhos utilizaram hospedeiros machos, mas em

cinco as fêmeas é que foram avaliadas. As cepas de *P. brasiliensis* utilizadas foram a 18, a Garcia, a 2052 e a Boas. Nos trabalhos consultados 17 inóculos diferentes foram utilizados. As vias de inoculação foram a intravenosa, intranasal, intraperitoneal, intratesticular e intracardíaca. Os antifúngicos avaliados foram a AMB em nove doses diferentes, o CTZ em 12 doses diferentes, o ITZ em sete doses diferentes, o FCZ em cinco doses diferentes, o CMX em cinco doses diferentes, o Sch 39304 em quatro doses diferentes, o Bay 7133 (n7), o Bay *l* 9139 (*l*9), em uma única dose, o NDORAME em duas doses diferentes e o ICI 153,066 em quatro doses diferentes. Os tratamentos foram iniciados, em função do dia da infecção, dois dias antes da infecção, dentro da primeira semana, entre a primeira e a quarta semana incompleta, com quatro semanas ou mais. A duração do tratamento variou de sete a 180 dias[35, 36, 39-51].

Esses dados demonstram a enorme dificuldade, ou até mesmo a impossibilidade de se fazer uma análise comparativa dos resultados observados, apesar de não serem muito numerosos os trabalhos que focalizam o tratamento da PCM experimental.

Por esses motivos, será feita uma análise baseada em dois desfechos, isto é, redução ou esterilização de pulmões e baço e reativação da doença após a interrupção do tratamento. Além disso, será feita uma comparação dos resultados do presente estudo com os de Ueda et al.[44], uma vez que o desenho do presente estudo foi baseado no destes autores. Por fim, serão comparados os resultados deste trabalho com os observados em estudos que também avaliaram a eficácia do CMX.

A comparação da eficácia do CMX, na dose diária de 200 mg/kg com a do CTZ, na dose diária de 120 mg/kg administrados por gavagem, em uma única tomada, revela resultados muito semelhantes, pois nos dois estudos os grupos tratados por período mais curto revelaram-se ineficazes, com piora evidente após a interrupção da terapêutica, enquanto os grupos que receberam antifúngicos por mais tempo, com início precoce e duração prolongada, apresentaram resultados igualmente eficazes. A diferença entre as duas drogas reside na eficácia dos grupos cujos tratamentos se iniciaram tardiamente, embora mantidos por tempo prolongado, quando comparada à dos grupos tratados por mais tempo; com o CMX, a eficácia destes dois esquemas foi a mesma, enquanto com o CTZ o regime de início tardio foi menos eficaz. É importante assinalar que essa vantagem do CMX sobre o CTZ foi

verificada a despeito da variação dos níveis séricos do CMX que, no presente estudo, se revelaram baixos em grande parte do dia. Os níveis séricos do CTZ não foram determinados por Ueda et al.[44], mas devem ter sido adequados, tendo em vista sua farmacocinética[64].

Os trabalhos em que a AMB foi avaliada sugerem uma alta toxicidade devido ao número de mortes entre os animais e pouco efeito sobre a diminuição da carga fúngica e sobre a infecção residual. Os derivados azólicos mostraram-se muito eficazes, principalmente o CTZ na dose de 100 mg/kg/dia, que conseguiu esterilizar todos os órgãos estudados, impediu a disseminação da doença e não permitiu reativação após interrupção do tratamento, no período avaliado. O ITZ não foi muito eficaz. Negroni[43] concluiu que o ITZ tem uma ação mais profilática do que curativa, protegendo 95% dos animais, embora tenha sido utilizado em doses inferiores à dos outros antifúngicos. Nos animais que o tratamento com ITZ foi interrompido observou-se doença residual e nenhuma toxicidade. O triazólico Sch 39304 apresentou ótimos resultados tanto na avaliação de sobrevida como no tratamento da infecção na sobre a doença residual.

Os resultados do presente estudo não podem ser totalmente comparados aos observados por Lourenço et al.[50, 51] em relação ao CMX, pois as doses utilizadas foram muito menores, isto é, 10 e 40 mg/kg de peso corporal, durante apenas quatro semanas, o que poderia explicar a ineficácia observada em relação aos pulmões. Por outro lado, foi surpreendente a observação de que 10 mg/kg diminuíram a carga fúngica do baço, o que não foi observado com a dose de 40 mg/kg. O tempo de tratamento, curto, também poderia explicar esses achados pois, no presente estudo, bons resultados só foram observados com o uso de dose maior e por tempo mais prolongado.

A avaliação de um possível efeito residual do CMX, após administração de apenas 12 doses de 60 mg/kg de peso corporal diluídos em água de bebedouro, não foram bem caracterizados nos animais que receberam CMX, embora os autores tenham concluído que ITZ e FCZ se revelaram mais eficazes. No presente estudo, o efeito do tratamento sobre a infecção de baço e de pulmões foi o mesmo, diferentemente do que observaram esses autores.

Scavone & Burger[49] utilizaram CMX nas doses diárias de 30 e de 150 mg/kg de peso corporal, iniciadas 24 horas após infecção. O esquema terapêutico de 150 mg/kg, que foi mais eficaz que o de 30 mg/kg, reduziu a carga fúngica de

pulmões e baço, mas não a de epiploon e fígado. Além disso, a eficácia foi maior quando o tratamento foi iniciado sete ou 15 dias após a infecção. Os resultados do presente estudo, em que 200 mg/kg de peso corporal por dia foram utilizados, são muito parecidos com os de Scavone & Burger, em relação à redução da carga parasitária em pulmões e baço. A única diferença aparente se encontra no tratamento iniciado, no presente estudo, após quatro semanas de infecção, em relação ao que se iniciou 30 dias pós-infecção, no estudo de Scavone & Burger[49]. No presente estudo, os resultados dos esquemas terapêuticos de início precoce e tardio não diferiram entre si, ao contrário do que relataram Scavone & Burger[49]. Essa diferença talvez possa ser explicada pela dose, um pouco mais elevada, utilizada no presente estudo, apesar de ter sido administrada uma única vez ao dia, por gavagem.

Também deve ser registrado que o nível sérico de CMX alcançado nos camundongos, com a dose diária de 200 mg/kg de peso corporal, se encontra na faixa observada em pacientes com PCM em tratamento, achado que valida a escolha dessa dose para o experimento[63].

Em relação a dose e espaçamento entre as administrações, em futuro experimento deve-se comparar eficácia e toxicidade do CMX na dose de 200 mg/kg de peso corporal, administrada uma e duas vezes ao dia. Nessa avaliação deve ter papel relevante a velocidade de multiplicação de *P. brasiliensis* que, é desconhecida.

O isolamento de *P. brasiliensis* após longo tempo de tratamento explica as reativações observadas na prática clínica, pois a erradicação de *P. brasiliensis* do organismo é muito difícil, provavelmente impossível. Esse achado também justifica a necessidade de se manter o tratamento de pacientes com PCM por tempo prolongado o suficiente para recuperação da resposta imune celular, que deverá ser responsável pela manutenção do estado de latência dos fungos que continuarem viáveis, apesar da ação do antifúngico.

A persistência dos níveis séricos de anticorpos, observada no presente trabalho, revelou-se conflitante com os resultados de Hoyos et al.[40], que observaram menores concentrações nos grupos tratados, que foram seguidos, inclusive, por períodos um pouco menores que os do presente estudo. A maior diferença entre os dois trabalhos se encontra na droga estudada - CMX no presente estudo e CTZ no de Hoyos et al.[40].

O tempo de cultivo para recuperação de *P. brasiliensis* de fragmentos de tecido pode ser determinado em duas semanas pois, no presente estudo, o número de UFC não aumentou no plaqueamento realizado com três e com quatro semanas, o que está de acordo com metodologia e observação de outros autores [48, 49].

Com base nessas considerações, modelos experimentais envolvendo avaliação micológica do tratamento antifúngico e correlação com a análise evolutiva da resposta imune celular devem ser mais estudados, como foi feito por Scavone & Burger[49]. A dosagem de citocinas séricas, importantes marcadores de avaliação da resposta imune celular, deverá trazer grande contribuição a esse modelo experimental.

Esse conjunto de dados experimentais poderá contribuir para a determinação do tempo pelo qual o paciente deverá ser tratado ou o critério de interrupção do tratamento, que provavelmente constitui a maior dúvida que se tem ao acompanhar um caso de PCM.

Capítulo V – Conclusões

O presente estudo, nas condições experimentais em que foi realizado, permitiu concluir que:

1. A mortalidade cumulativa apresentou tendência a ser menor nos grupos tratados, enquanto a porcentagem de mortes espontâneas foi menor nos camundongos que receberam tratamento por tempo prolongado, com início precoce ou tardio;
2. A recuperação de fungos de fragmentos de pulmão e de baço foi menor nos grupos tratados que no grupo controle infectado, a partir da quarta e da oitava semana, respectivamente;
3. As análises da recuperação de fungos em função do tempo de tratamento e da porcentagem de culturas negativas revelam que os tratamentos prolongados foram mais eficazes e que, entre eles, foi ainda melhor o de início precoce;
4. Os tratamentos eficazes não erradicaram a infecção;
5. Os níveis de anticorpos séricos, determinados pela reação de imunodifusão dupla em gel de agar, não apresentaram variações com os tratamentos, ao longo dos 140 dias de seguimento;
6. O efeito do cotrimoxazol foi o mesmo em pulmões e baço;
7. O cotrimoxazol, administrado por gavagem na dose de 200 mg/kg de peso corporal, alcança os níveis séricos necessários para o tratamento de pacientes, mas, em dose diária única, não os mantém ao longo das 24 horas;
8. O tempo de cultivo para avaliação quantitativa da recuperação de *P. brasiliensis* de fragmentos de tecido pode ser de duas semanas.

Capítulo VI – Referências Bibliográficas*

* National Library of Medicine. List of journals indexed in index Medicus. Washington, 2003;240p.

1. Almeida FP. Estudos comparativos do granuloma coccidióico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasito brasileiro. An Fac Med Univ S Paulo 1930; 5:125-41.
2. Lutz A. Uma micose pseudococcídica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas. Braz Méd 1908; 22: 121-24, 141-44.
3. Coutinho ZF, Silva D, Lazéra M, Petri V, Oliveira RM, Sabroza PC, Wanke B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil. Cad Saúde Pública 2002; 18: 1441-54.
4. Brummer E, Castañeda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an Update. Clin Microbiol Rev 1993; 6(2): 89-117.
5. Balabanov K, Balabanoff VA, Angelov N. Blastomycose sud-americaine chez un laboureur bulgare renevu depuis 30 ans de Brasil. Mycopathologia (Den Haag) 1964; 24: 265-70.
6. Naiff RD, Ferreira LCL, Barrett TV, Naiff MF, Arias JR. Paracoccidioidomicose enzoótica em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no estado do Pará. Rev Inst Med Trop S Paulo 1986; 28(1): 19-27.
7. 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.
8. Franco M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. J Med Vet Mycol 1987; 25: 5-18.
9. Mendes-Giannini MJS, Del Negro GB, Siqueira AM . Serodiagnosis. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton: C R C Press;1994. p. 345-63.
10. Restrepo A. La prueba de inmunodifusion em el diagnostico de la paracoccidioidomicosis. Sabouraundia 1966; 4: 223-30.
11. San-Blas G, Niño-Veja G, Barreto L, Hebeler-Barbosa F, Bagagli E, Bricenõ RO, Mendes RP. Primers for clinical detection of *Paracoccidioides brasiliensis*. J Clin Microbiol 2005; 43: 4255-7.
12. Ribeiro DO. Nova terapêutica para a blastomicose. Publ Méd 1940; 12: 36-54.
13. Lacaz CS, Minami PS. Ação in vitro da sulfamida Ro 4-4393 sobre o *Paracoccidioides brasiliensis*. Resultados preliminares. O Hospital 1963; 64(3): 603-7.

14. Lacaz CS, Minami PS, Fernandes W. Ação in vitro da sulfametoxipiridazina sobre fungos patogênicos. O Hospital 1968; 73: 1.715.
15. Padilha-Gonçalves A. Tratamento da micose de Lutz (Blastomicose sul-americana). Bol Acad Nac Med 1962; 1: 81-9.
16. Lacaz CS, Sampaio SAP. Tratamento da blastomicose sul-americana com anfotericina B. Resultados preliminares. Rev Paul Med 1958; 52: 443-50.
17. Lopes CF, Armond S. Ensaio terapêutico em casos sulfa-resistentes de blastomicose sul-americana. O Hospital 1968; 73(4): 253-63.
18. Barbosa W, Vasconcellos WMP. Ação da sulfametozaxol associada ao trimetoprim na terapêutica da blastomicose sul-americana. Rev Patol Trop 1973; 3(2): 329-39.
19. Borelli D, Bran JL, Fuentes J, Legendre R, Leiderman E, Levine HB, Restrepo A, Stevens DA. Ketoconazole, na oral antifungal: laboratory and clinical assessment of imidazole drugs. J Med Postgrad 1979; 55(647): 657-61
20. Negrone R, Gonzalez-Montaner LJ, Beltran OP, Tuculet MA, Rey D. Resultados del Ketoconazole (R-41400) em el tratamiento de la paracoccidioidomycosis y la histoplasmosis. Rev Argent Micol 1979; 2: 12-8.
21. Stevens DA, Brummer E, McEwen JG, Perlman A. Efficacy of fluconazole, a new oral triazole, in blastomycosis and paracoccidioidomycosis and in comparison with ketoconazole. Rev Iber Micol 1988; 5(suppl 1): 26 (Abstract)
22. Naranjo MS, Trujillo M, Munera MI, Restrepo P, Gomez I, Restrepo A. Treatment of paracoccidioidomycosis with itraconazole. J Med Vet Mycol 1990; 28: 67-76.
23. Budel AR, Fernandes GP, Lameira RF, Telles Filho FQ. Sensibilidade “in vitro” do *Paracoccidioides brasiliensis* à associação trimetoprim-sulfametoxazol. Rev Soc Bras Med Trop 1987; 20 (supl 1): 76.
24. Gleckman R, Gantz NM, Joubert DW. Intravenous sulfamethoxazole-trimethoprim: pharmacokinetics, therapeutic indications, and adverse reactions. Pharmacotherapy 1981; 1: 206-11.
25. Stevens DA, VO PT. Synergistic interaction of trimethoprim and sulfamethoxazole on *Paracoccidioides brasiliensis*. Antimicrobial Agent Chemother 1982; 21(5): 852-54.
26. Hahn RC, Conceição YTM, Santos NL, Ferreira JF, Hamdam JS. Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and in vitro resistence to Ketoconazol and trimethoprim-sulphamethoxazole. Mycoses 2003; 46: 324-9.

27. Coelho KIR, Defaveri J, Rezkallah-Iwasso MT, Peraçoli MTS. Experimental paracoccidioidomycosis. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton: CRC Press; 1994. p. 87-107.
28. Splendore A. Blastomycoses Americanas. Bras Méd 1910; 24: 153-7.
29. Pereira M, Vianna G. A propósito de um caso de blastomycose (Phyohemia blastomicótica). Arq Brás Med 1911; 1: 63-83.
30. Montenegro J. Acerca da inoculabilidade da blastomicose no Brasil. Brasil-Méd 1927; 41: 808-12.
31. Lacaz CS, Jaria ST, Ferreira M, Martins AA, Veja VS. Blastomicose experimental. O Hospital 1949; 35(3): 341-9.
32. Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. Sabouraudia: J Med Vet Mycol 1985; 23: 323-34.
33. Iabuki K, Montenegro MR. Experimental paracoccidioidomycosis in the *Syrian* hamster: morphology, ultrastructure and correlation of lesions with the presence of specific antigens and serum levels of antibodies. Mycopathologia 1979; 67: 131-41.
34. Peraçoli MTS, Mota NGS, Montenegro MR. Experimental paracoccidioidomycosis in the *Syrian* hamster: morphology and correlation of lesions with humoral and cell-mediated immunity. Mycopathologia 1982; 79: 7-17.
35. Mota NGS, Viero RM, Rezkallah-Iwasso MT, Peraçoli MTS, Soares AMVC, Montenegro MR. The effect of Ketoconazole on experimental paracoccidioidomycosis in the *Syrian* hamster: immunological and histopathological study. Mycopathologia 1984; 88(2/3): 141-8.
36. Rezkallah-Iwasso MT, Villas Boas MLF, Soares A, Franco M, Sugizaki MF, Fecchio D, et al. Experimental paracoccidioidomycosis of hamsters and mice: treatment with a new triazole Sch 39304. Rev Iberoam Micol 1992; 9: 72-5.
37. Singer-Vermes LM, Burger E, Russo M, Vaz CAC, Calich VLG. Advances in experimental paracoccidioidomycosis using on isogenic murine model. Arch Med Res 1993; 24(3): 239-45.
38. 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.

39. Silva MRR. Ação da anfotericina B e levamisole em camundongos albinos inoculados com *Paracoccidioides brasiliensis*. Rev Patol Trop 1982; 11(3): 173-217.
40. Hoyos GL, McEwen JG, Brummer E, Castañeda E, Restrepo A, Stevens DA. Chronic murine paracoccidioidomycosis: effect of ketoconazole on clearance of *Paracoccidioides brasiliensis* and immune response. Sabouraudia: J Med Vet Mycol 1984; 22: 419-26.
41. Lefler E, Brummer E, McEven JG, Hoyos GL, Restrepo A, Stevens DA. Study of current and new drugs in a murine model of acute paracoccidioidomycosis. Am J Trop Med Hyg 1985; 34(1): 134-40.
42. McEwen JG, Peters GR, Blaschke TF, Brummer E, Perlman AM, Restrepo A, et al. Treatment of paracoccidioidomycosis with itraconazole in a murine model. J Trop Med Hyg 1985; 88: 295-9.
43. Negrone R, Finquelievich JL, Gosis AS. Estudio comparativo de la eficacia del itraconazol y el ketoconazol en el tratamiento de la paracoccidioidomicosis experimental. Med Cutan Ibero Lat Am 1987; 15: 455-60.
44. Ueda AK, Franco M, Fabio AS, Prestes FR. Ketoconazole in the treatment of experimental murine paracoccidioidomycosis. Mycophatologia 1987; 98(1): 27-34.
45. Restrepo S, Tabares AM, Restrepo A. Activity of two different triazoles in a murine model of paracoccidioidomycosis. Rev Inst Med Trop S Paulo 1992; 34(2): 171-6.
46. Clemons KV, Stevens DA. Comparison of a lipossomal amphotericin B formulation (Ambisome) and deoxycholate amphotericin B (Fungizone) for the treatment of murine paracoccidioidomycosis. J Med Vet Mycol 1993; 31: 387-94.
47. Silva MRR, Paiva LF, Jesuino RSA. Avaliação do cetoconazol em camundongos inoculados com *Paracoccidioides brasiliensis* pela histopatologia de fígado e baço e pela intradermorreação de paracoccidioidina. Rev Soc Bras Med Trop 1994; 27(1): 11-4.
48. Martinez R, Malta MHB, Verceze AV, Arantes MR. Comparative efficacy of fluconazole and amphotericin B in the parenteral treatment of experimental paracoccidioidomycosis in the rat. Mycopathologia 1999; 146(3): 131-4.

49. 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.
50. 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.
51. 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.
52. Fava Netto C. Contribuição para o estudo imunológico da blastomicose de Lutz. Rev Inst Adolfo Lutz 1961; 21: 99-194.
53. Calich VLG, Purchio A, Paula CR. A new fluorescent viability test for fungi cells. Mycophatologia 1978; 66: 175-77
54. Restrepo A, Jimenez BE. Growth of *Paracoccidoides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined medium. J Clin Microbiol 1980; 12: 279-81
55. Singer-Vermes LM, Ciavaglia MC, Kashino SS, Burger E, Calich VLG. The source of the growth promoting factor affects the platting efficiency of *Paracoccidioides brasiliensis*. J Med Vet Mycol 1992; 30: 261-4.
56. Siqueira AM. Avaliação da sensibilidade e especificidade de algumas provas sorológicas no diagnóstico, prognóstico e controle de cura da paracoccidioidomicose. Caracterização imunoquímica do antígeno E_2 do *Paracoccidioides brasiliensis* [tese]. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 1982.
57. Bratton AC, Marshall EK, Jr. A new coupling component for sulfanilamide determination. J. Biol Chem 1939; 128: 537-550.
58. Meira DA. Normas para elaboração de dissertações e teses. Curso de Pós-Graduação de Doenças Tropicais Botucatu: Faculdade de Medicina – Unesp; 2003.

59. International Committee of Medicine Journal Editors. Uniform Requeriments for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal: sample references. [homepage on the internet]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine; 2003 [last update 2003 July 09; cited 2005 Jun 01]. Available from://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requeriments.html.
60. Zar JH. Biostatistical Analysis. Prentice Hall, 4 ed. New Jersey, 1999, 663p
61. Arai T, Kaji H, Mikami Y. Standardization of *in vitro* evaluation of antifungal agents.*In*: Iwata K & Vanden Bossche H. *In vitro* and *in vivo* evaluation of antifungal agents. 1 Ed Amsterdan, Elsevier, 1985: 21 – 30.
62. Stevens DA. Animals models to evaluate antifungal activity: utility of models of chronic deep mycoses. *In*: Iwata K & Vanden Bossche H. *In vitro* and *in vivo* evaluation of antifungal agents. 1 Ed Amsterdan, Elsevier, 1985: 153 – 7.
63. Mendes RP, Negroni R, Arechavala A. Treatment and control of de cure. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. Paracoccidioidomycosis. Boca Ratón: C R C Press; 1994. p. 373-92.
64. Levine HB, Cobb JM. Oral therapy for experimental coccidioidomycosis with R-41400 (Ketoconazole), a new imidazole. Am Rev Resp Dis 1978; 118: 715-21.

Capítulo VII – Resumo

O tratamento da PCM, micose sistêmica causada *Paracoccidioides brasiliensis,* continua sendo objeto de pesquisa clínica e experimental. Este trabalho avaliou a eficácia de diferentes esquemas terapêuticos com cotrimoxazol (CMX), na dose diária de 200 mg/kg de peso corporal, em dose diária única, no tratamento da PCM murina. Utilizaram-se 168 camundongos BALB/c machos, infectados com a cepa 18 de *P. brasiliensis*, divididos em seis grupos: G1– controle saudável; G2– controle infectado; G3– tratamento precoce e prolongado (140 dias); G4– tratamento precoce, por curto período (56 dias); G5–tratamento tardio (início no 28º dia) e prolongado (112 dias); G6 – usado na determinação dos níveis séricos de sulfametoxazol. A eficácia do tratamento foi avaliada pela recuperação de fungos em fragmentos de pulmão e de baço nas 2ª, 4ª, 8ª, 12ª, 16ª e 20ª semanas pós-infecção, através da mortalidade cumulativa e também foram avaliados os níveis séricos de anticorpos específicos. O tratamento foi considerado eficaz quando levou à redução do número de fungos recuperados e diminuição da mortalidade cumulativa. A avaliação estatística dos resultados foi feita pelos testes de Kruskal-Wallis, U de Mann-Whitney, χ^2, exato de Fisher, estimador de Kaplan-Meyer e de Wilcoxon, com ***p*** menor que 0,05 para caracterização de diferença significante. Os resultados revelaram que o tratamento com CMX por tempo prolongado foi eficaz quando iniciado precoce ou tardiamente. O tratamento com curta duração foi ineficaz, pois não determinou diminuição da carga fúngica, durante as 20 semanas de seguimento. O efeito do CMX foi o mesmo em pulmões e baço, nos diferentes esquemas terapêuticos utilizados, eficazes ou não. A mortalidade cumulativa entre os grupos 1, 2 e 4 não diferiram entre si, os grupos 3 e 5 apresentaram a melhor taxa de sobrevida. Os níveis séricos de anticorpos específicos foram detectados a partir da segunda semana, apresentando maiores índices nos animais do G2, sendo que nesses os níveis aumentaram até a oitava semana e permanecendo estáveis por todo o experimento. No G3 houve uma flutuação durante todo o experimento apresentando níveis altos na 20ª semana. Os grupos 4 e 5 permaneceram estáveis durante todo o experimento. Os efeitos benéficos do tratamento foram observados com a administração de CMX em dose única diária, cujos níveis séricos se mantiveram adequados por menos de 12 horas. Esses resultados, bastante satisfatórios, demonstram que o modelo experimental murino é bom método de avaliação da eficácia do CMX no tratamento da PCM e sugerem a avaliação de outros esquemas terapêuticos, como a administração a cada 12 horas.

Capítulo VIII – Abstract

Paracoccidioidomicosis (PCM) treatment, a systemic mycosis caused by *Paracoccidioides brasiliensis*, has been a clinical and experimental research issue. This work evaluated the efficacy of different therapeutic protocols with cotrimoxazole (CMX) on a daily dosage of 200mg/kg body weight, in a single daily dosage on murine PCM treatment. One hundred and sixty eight (168) BALB/c male mice were used and infected with *P. brasiliensis* 18 strain divided into 6 groups: G1 healthy control; G2 infected control; G3 early and prolonged treatment (140 days); G4 early treatment for a short period (56 days); G5 late treatment (started on 28th day) and prolonged (112 days); G6 used to determine blood levels of sulfamethoxazole. Treatment effectiveness was evaluated by fungus recovery from lung and spleen fragments in 2nd, 4th, 8th, 12th, 16th and 20th weeks post-infection by cumulative death and frequency of deaths. Specific antibodies blood levels were also evaluated. The treatment was considered effective when it led to a reduction of recovery fungus number. Statistical result analysis was performed by the following tests: Kurskal-Wallis, Mann-Whitney U, Wilcoxon, x2, Fisher exact, Kaplan-Meyer and Wilcoxon, with **p** smaller than 0,05 for significant difference characterization. The results showed that CMX treatment for a prolonged period was efficient when started early or late. The short duration treatment was inefficient once it did not determine fungus load decrease during 20 weeks of following. CMX effect was the same in lungs and spleen under different therapeutic protocols used, whether efficient or not. Cumulative death tends to be different among studied groups. Death frequency was smaller in prolonged treated groups with an early or late protocol starting. Specific antibodies blood levels were detected from the second week and did not differ among experimental groups. Beneficial effects of treatment were observed with CMX administration on a daily single dosage and blood levels remained satisfactory for less than 12 hours. These results, quite satisfactory, show that murine experimental protocol is a good evaluation method of MCX effectiveness on PCM treatment and it suggests the evaluation of other therapeutic protocols, as an administration at every 12 hours.

Capítulo IX – Apêndice

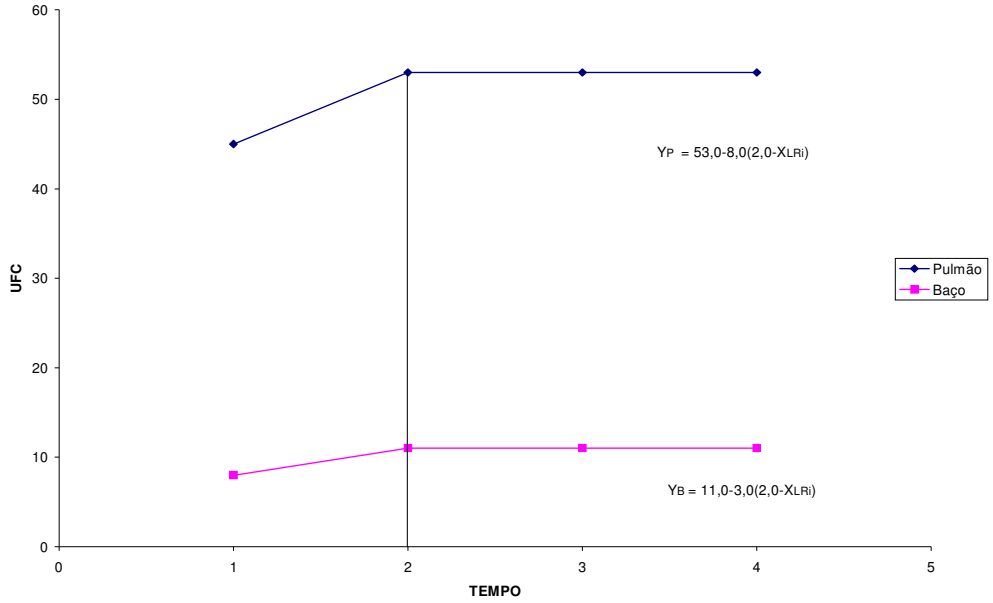


Figura 1: Recuperação de *Paracoccidioides brasiliensis* de fragmentos de pulmão e de baço. Camundongos infectados, não tratados e sacrifícados duas semanas pós-infecção (G2 - GCi).

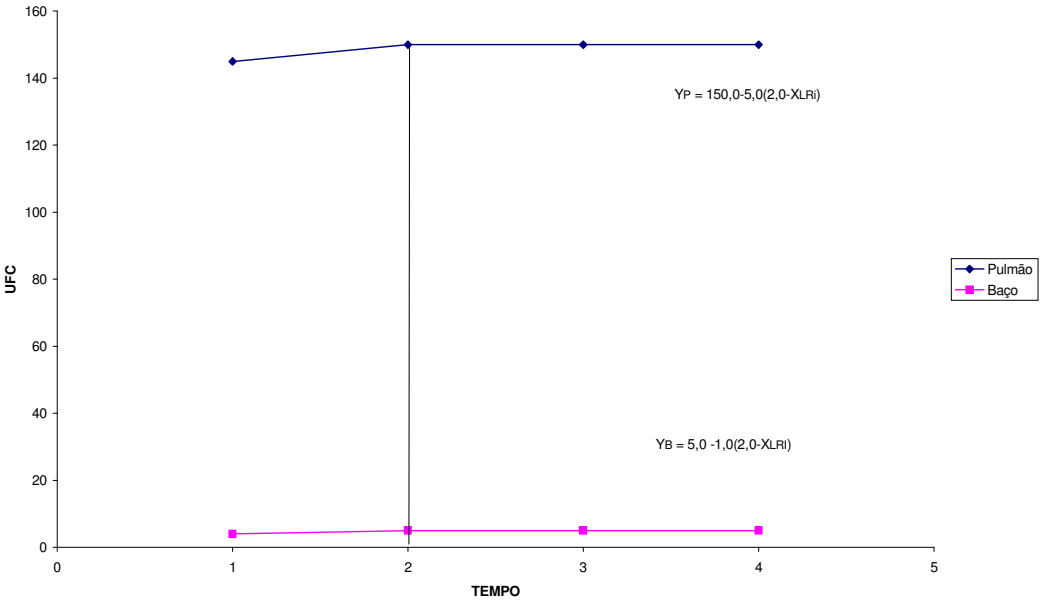


Figura 2: Recuperação de *Paracoccidioides brasiliensis* de fragmentos de pulmão e de baço. Camundongos infectados, não tratados e sacrificados quatro semanas pós-infecção (G2 - GCi).

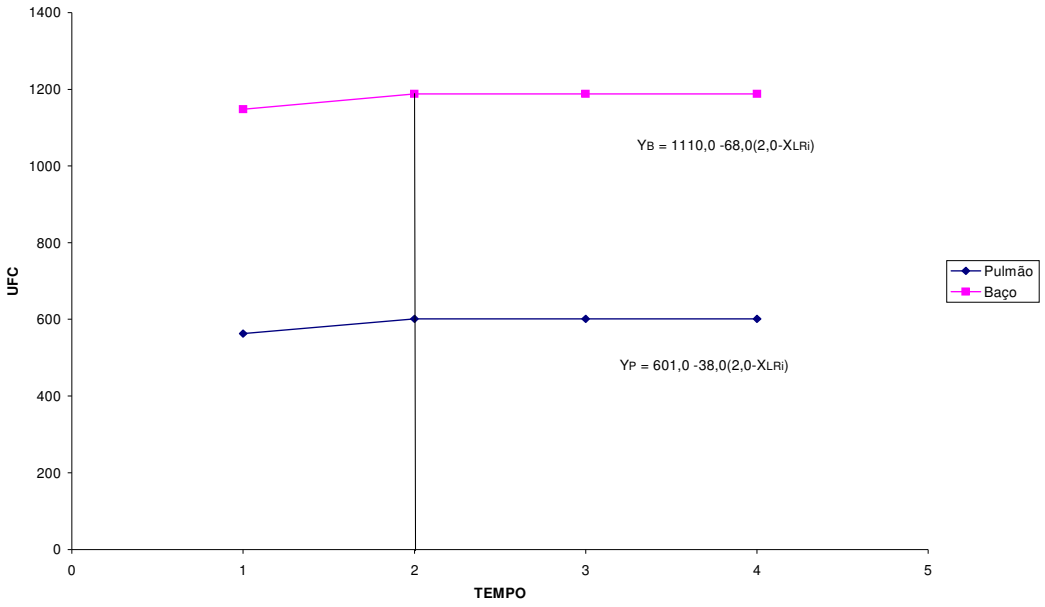


Figura 3: Recuperação de *Paracoccidioides brasiliensis* de fragmentos de pulmão e de baço. Camundongos infectados, não tratados e sacrificados oito semanas pós-infecção (G2 - GCi).

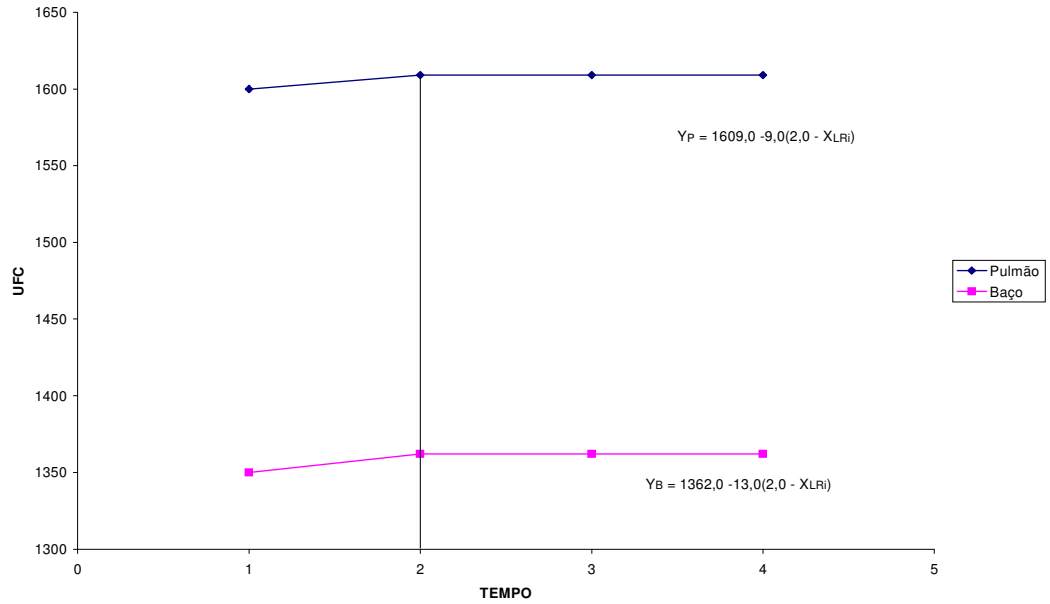


Figura 4: Recuperação de *Paracoccidioides brasiliensis* de fragmentos de pulmão e de baço. Camundongos infectados, não tratados e sacrificados doze semanas pós-infecção (G2 - GCi).

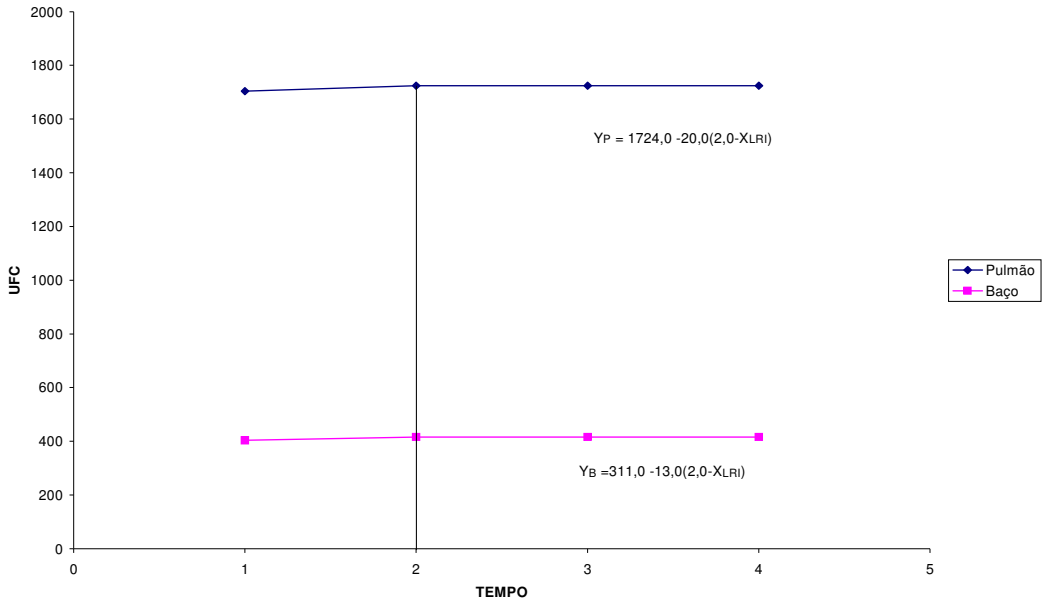


Figura 5: Recuperação de *Paracoccidioides brasiliensis* de fragmentos de pulmão e baço. Camundongos infectados, não tratados e sacrificados dezesseis semanas pós-infecção (G2 - GCi).

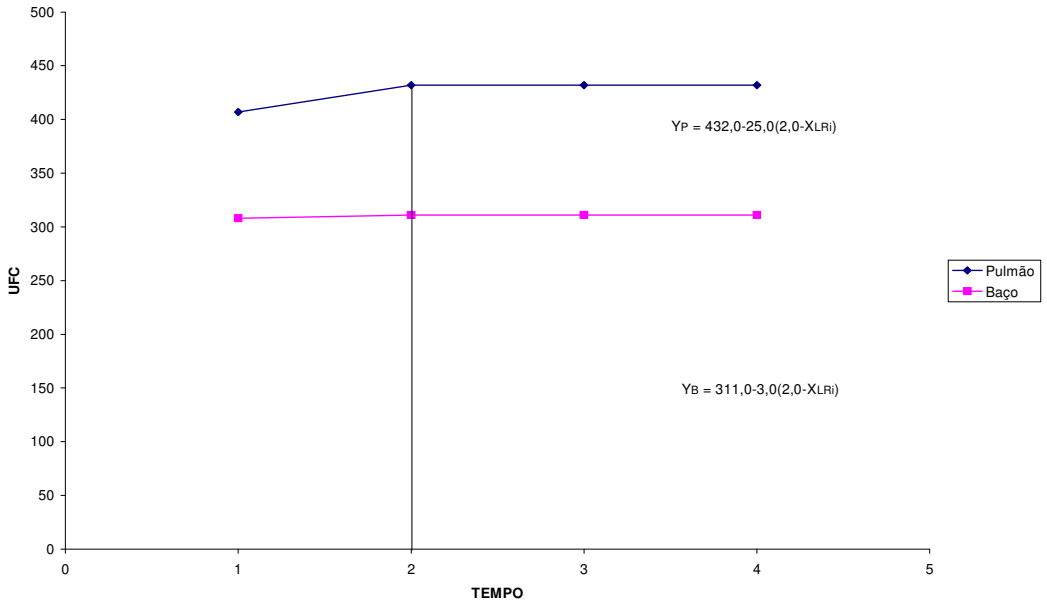


Figura 6: Recuperação de *Paracoccidioides brasiliensis* de fragmentos de pulmão e baço. Camundongos infectados, não tratados e sacrificados vinte semanas pós-infecção (G2 - GCi)

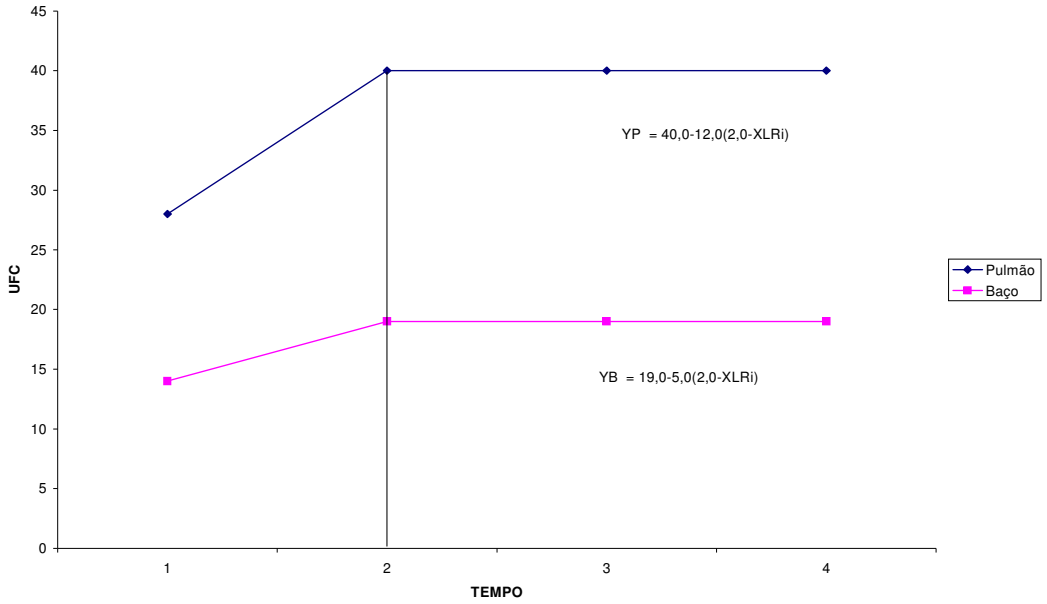


Figura 7: Recuperação de *Paracoccidioides brasiliensis* de fragmentos de pulmão e baço. Camundongos Infectados e tratados com CMX do 3º ao 140º dia de infecção. Animais sacrificados duas semanas pós-infecção (G3 - GTp).

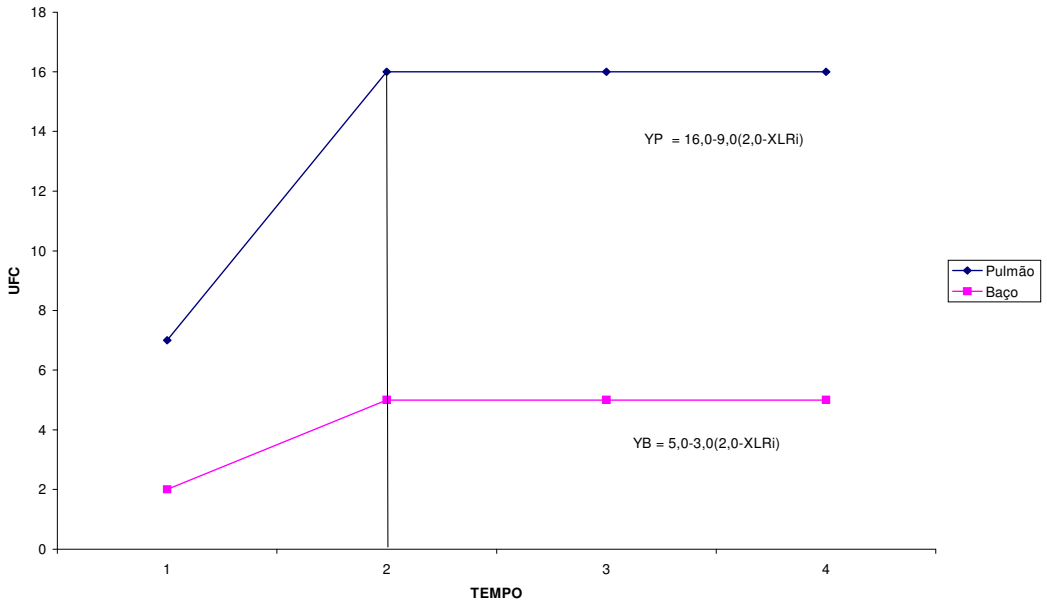


Figura 8: Recuperação de *Paracoccidioides brasiliensis* de fragmentos de pulmão e baço. Camundongos Infectados e tratados com CMX do 3º ao 140º dia de infecção. Animais sacrificados quatro semanas pós-infecção (G3 - GTp).

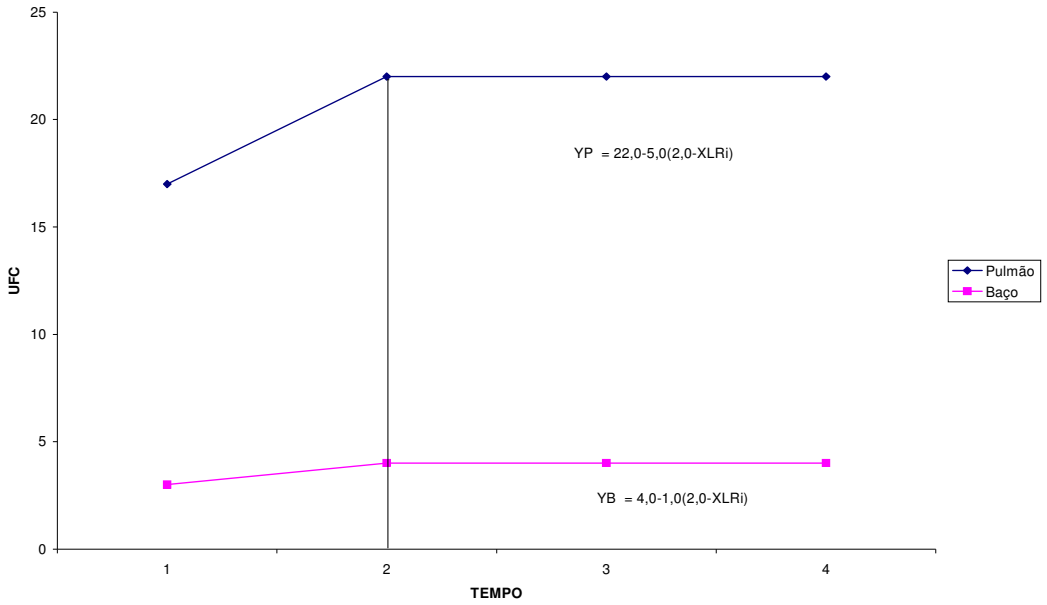


Figura 9: Recuperação de *Paracoccidioides brasiliensis* de fragmentos de pulmão e baço. Camundongos Infectados e tratados com CMX do 3º ao 140º dia de infecção. Animais sacrificados oito semanas pós-infecção (G3 - GTp).

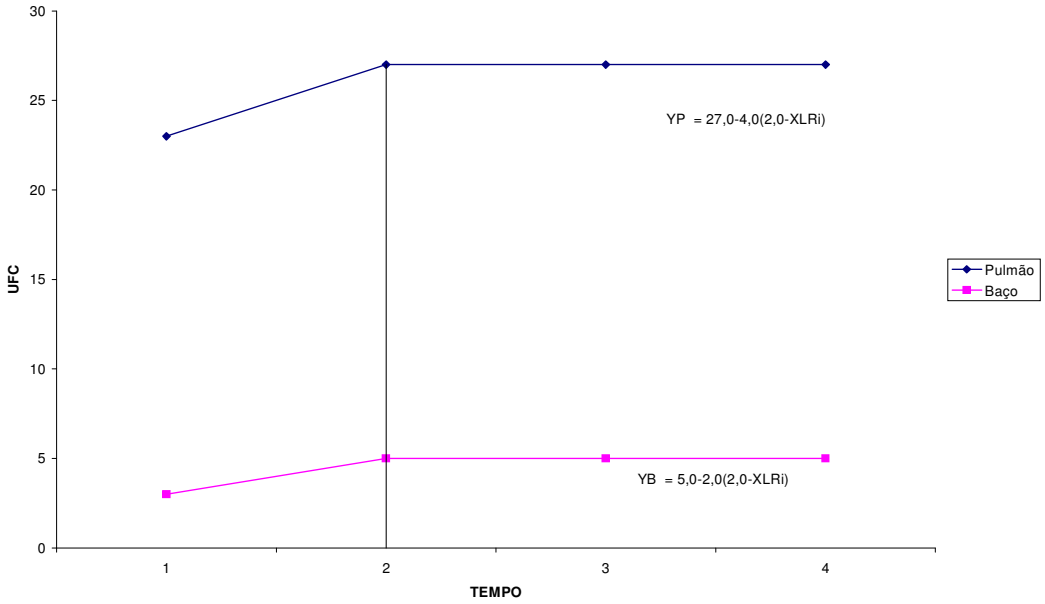


Figura 10: Recuperação de *Paracoccidioides brasiliensis* de fragmentos de pulmão e baço. Camundongos Infectados e tratados com CMX do 3º ao 56º dia de infecção. Animais sacrificados quatro semanas pós-infecção (G4 - GTc).

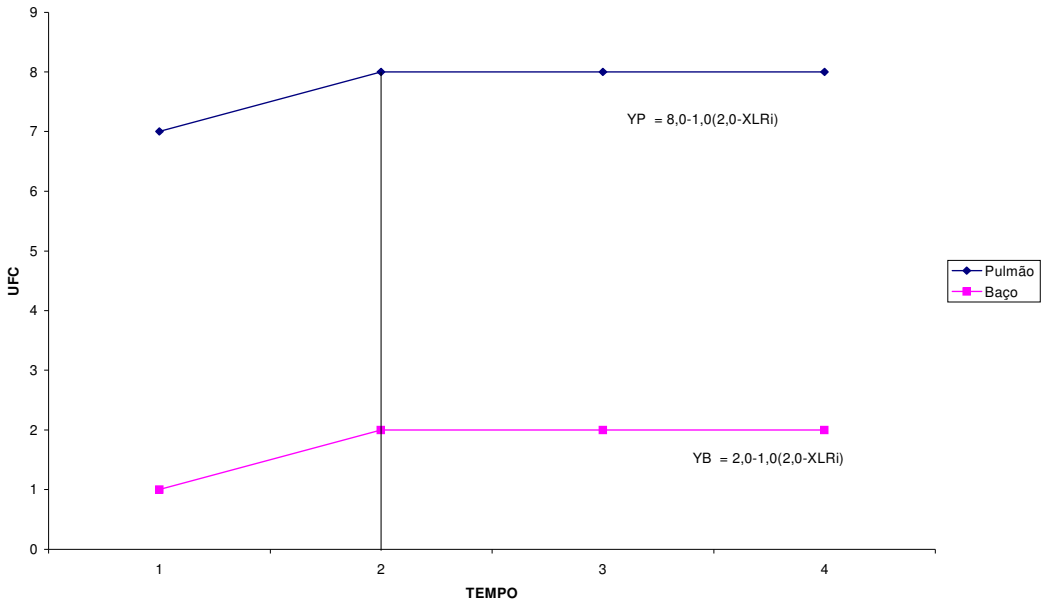


Figura 11: Recuperação de *Paracoccidioides brasiliensis* de fragmentos de pulmão e baço. Camundongos Infectados e tratados com CMX do 3º ao 56º dia de infecção. Animais sacrificados oito semanas pós-infecção (G4 - GTc).

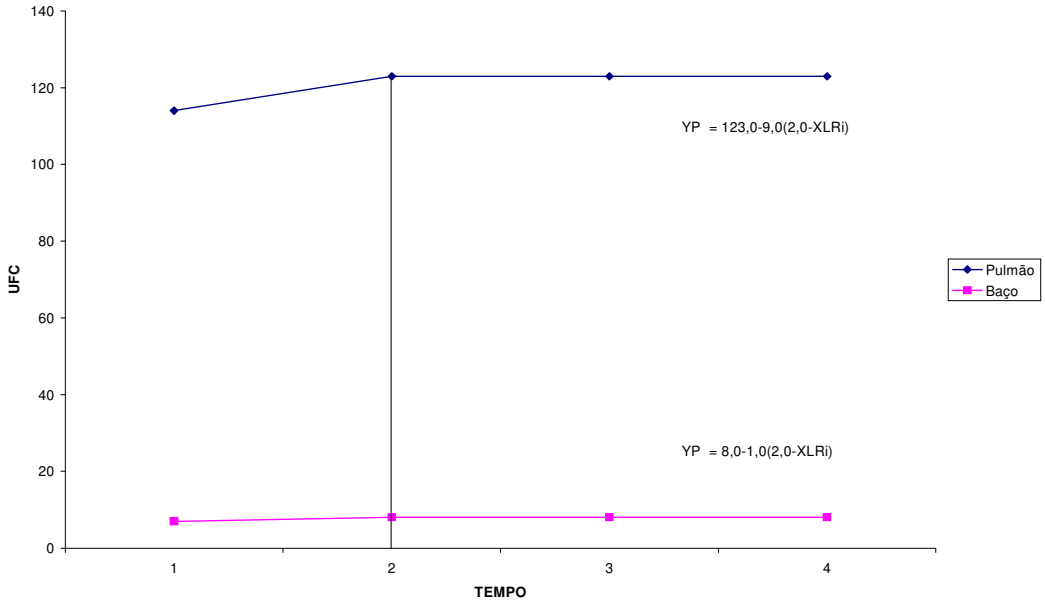


Figura 12: Recuperação de *Paracoccidioides brasiliensis* de fragmentos de pulmão e baço. Camundongos Infectados e tratados com CMX do 3º ao 56º dia de infecção. Animais sacrificados doze semanas pós-infecção (G4 - GTc).

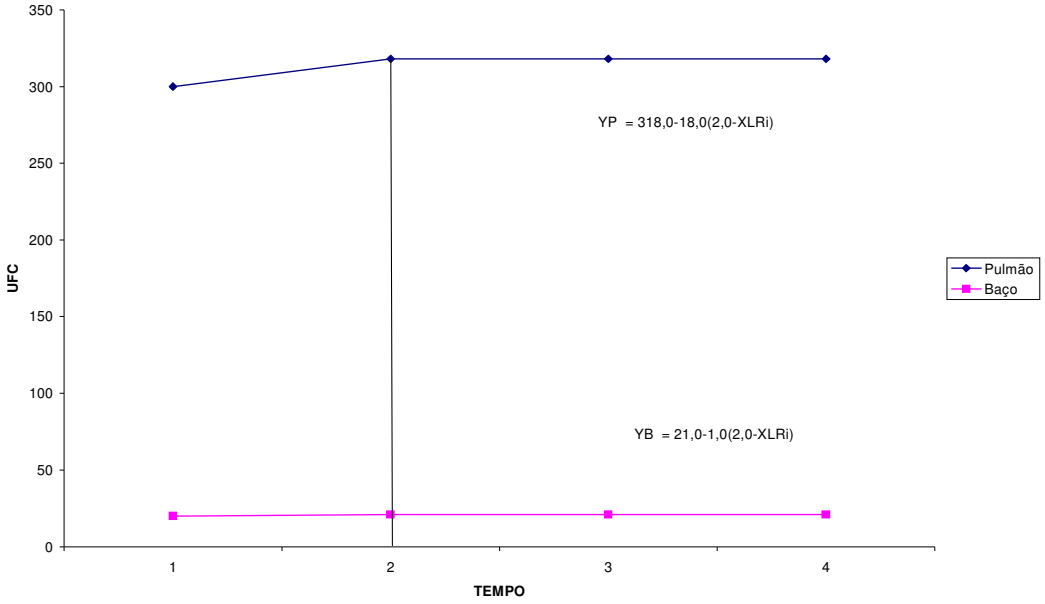


Figura 13: Recuperação de *Paracoccidioides brasiliensis* de fragmentos de pulmão e baço. Camundongos infectados e tratados com CMX do 3º ao 56º dia de infecção. Animais sacrificados vinte semanas pós-infecção (G4 - GTc).

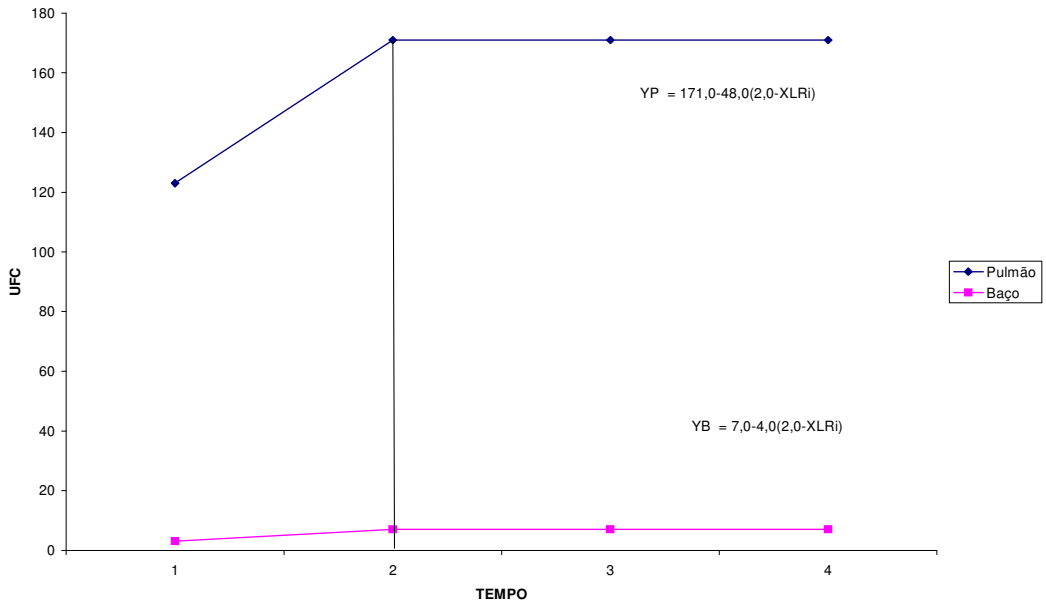


Figura 14: Recuperação de *Paracoccidioides brasiliensis* de fragmentos de pulmão e baço. Camundongos Infectados e tratados com CMX do 28º ao 140º dia de infecção. Animais sacrificados oito semanas pós-infecção (G5 - GTt).