

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 01/08/2019.



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

Angela Carolina Finato

**Avaliação de terapias antifibróticas associadas aos
antifúngicos itraconazol e cotrimoxazol em modelo murino
de paracoccidioidomicose pulmonar**

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

Orientador: Prof. Dr. James Venturini

**Botucatu
2017**

Angela Carolina Finato

Avaliação de terapias antifibróticas associadas aos antifúngicos itraconazol e cotrimoxazol em modelo murino de paracoccidioidomicose pulmonar

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

Orientador: Prof. Dr. James Venturini

Botucatu
2017

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

Finato, Angela Carolina.

Avaliação de terapias antifibróticas associadas aos antifúngicos itraconazol e cotrimoxazol em modelo murino de paracoccidioidomicose pulmonar / Angela Carolina Finato. - Botucatu, 2017

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

Orientador: James Venturini

Capes: 21100004

1. Paracoccidioidomicose. 2. Fibrose pulmonar.
3. Pulmões - Doenças. 4. Micoses.

Palavras-chave: Antifibrótico; Azitromicina; Fibrose pulmonar; Pentoxifilina; Talidomida.



Dedicatória

Dedicatória

*Aos pacientes com paracoccidiodomicose,
na esperança deste trabalho
contribuir verdadeiramente em suas vidas.*

*À minha prima Giseli (**in memoriam**),
a qual foi a primeira a me mostrar as belezas e
as tristezas de uma pesquisa científica.*

Agradecimientos

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus pela vida e por sempre atender meus pedidos de força.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Agradeço imensamente ao meu orientador Prof. Dr. James Venturini que sempre esteve presente mesmo quando distante. Agradeço pelas respostas na madrugada, pelo empenho, pela compreensão, pelo carinho, pelos puxões de orelha, pela garra, pelo comprometimento e principalmente pelo companheirismo e ensinamentos.

Aos meus pais, Antonio e Aparecida, que tão pouco conhecem e entendem sobre uma pesquisa científica, mas que sempre me deram todo apoio possível e impossível para que eu pudesse conquistar meus objetivos. Meu eterno e imensurável agradecimento a vocês que muitas vezes se sacrificaram e sempre mantiveram o orgulho e o amor por mim. Obrigada, amo vocês de todo meu coração!

À minha irmã e ao seu esposo, Alessandra e Reginaldo. Agradeço-te, minha irmã, pela compreensão, apoio e amor, mesmo sabendo que às vezes foi muito difícil de entender.

À Vozinha, Magdalena, que sempre achou muito maluco eu trabalhar com “ratinhos”, mas que também sempre me apoiou e viu o quanto é difícil “só estudar”.

Ao meu sobrinho, Bernardo, que com sua inocência e pureza insita sorrisos desde o “banguela” mais novo até o “banguela” mais velho.

A todos meus familiares que sempre demonstraram muito orgulho e amor por mim.

Ao meu amor, Felipe, que foi meu companheiro em TODOS os momentos. Agradeço por você tantas vezes ter abdicado do seu descanso para me ajudar, por ter se disposto a aprender junto comigo, pelo entusiasmo, pela compreensão e principalmente por sempre manter a alegria de um menino.

À Tereza, ao Marcos, à Renata e ao Vitor por demonstrar preocupação, carinho e compreensão durante esta etapa.

Em especial às minhas eternas companheiras de laboratório, Débora e Amanda, que tanto me ajudaram nesse projeto. Foram minhas cúmplices na vida e no trabalho. Meninas, esse trabalho é tão meu quanto de vocês. Obrigada por tudo!

À Babi e Karol por trazerem leveza ao trabalho e por sempre estarem dispostas a ajudar.

À Profa. Dra. Maria Sueli Parreira de Arruda principalmente por ter idealizado o LIPE e assim ter me proporcionado tanta vivência e aprendizado.

Aos eternos companheiros e amigos do LIPE:

À Camila, Thais, Luiza e Nara, que tanto aprendi e cultivo maior admiração.

A Angelinha, Laysla, Rodolfo, Victor, Babizinha, Anne e Gaby por toda ajuda e suporte durante o projeto.

A nova geração Victoria, Silas, Jonatas, Thainá, Adriely, Luiz Gustavo, Beatriz, Karolyne Sousa e Tati, que se dispuseram a trabalhar e aprender neste trabalho.

Lipeanos, obrigada pela companhia, pela ajuda e pelo suporte. Sem vocês o trabalho não seria concluído.

À minha grande amiga Cinthia pelo carinho, ensinamentos e suporte, principalmente na graduação, que foram essenciais para que eu pudesse dar continuidade aos estudos.

Aos meus amigos Mariana, Giovanna, Bruno, Roni e Cesar pela companhia e apoio.

À Vera, ao Junior e à Júlia pelo acolhimento e pelo amor que me deram durante toda a minha vida acadêmica.

Às minhas eternas amigas Letícia, Francis, Taísa, Jéssica e Laudicéia, que mesmo entre turbulências, sempre pude contar com vocês.

As minhas amigas Iara e Mayara e os agregados Lipeanos Caio, Raul, Bruno e Pedro, pelos momentos de alegria.

Ao André e toda sua família por ter acreditado em mim. Em especial ao André por ter “apostado” no meu sucesso.

Aos professores que tive a oportunidade de conhecer durante o mestrado e por terem compartilhado uma ínfima parte do seu conhecimento.

Ao grupo de micoses sistêmicas da Faculdade de Medicina de Botucatu por disponibilizar o fungo.

Ao Prof. Dr. Olavo Spenranza Arruda pela disposição em sempre ajudar.

A todos os amigos e colaboradores do Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL).

Ao Dr. Ricardo Cavalcante, Prof. Dr. Rinaldo Poncio Mendes, Dr. Cléverson Soares, Profa. Dra. Anamaria Paniago e Prof. Dr. Dejair Nascimento pela colaboração no trabalho.

À Profa. Dra. Vanessa Soares Lara e Karen Pinke pela ajuda com as fotos de histologia.

Ao programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais e aos funcionários da Faculdade de Medicina de Botucatu por toda atenção e ajuda quando necessário.

A todos os amigos e colegas que de alguma forma ajudaram na concepção deste trabalho, mas que a memória insiste em falhar.

*Trabalho, aquilo que dignifica o homem!
Em qualquer campo de ação, a luta deve ser sempre justa e
em prol do bem comum.”
(Dirsomar Chaves)*

Resumo

Resumo

FINATO, A. C. **Avaliação de terapias antifibróticas associadas aos antifúngicos itraconazol e cotrimoxazol em modelo murino de paracoccidioidomicose pulmonar.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2017.

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada por fungos do gênero *Paracoccidioides*; suas principais formas clínicas são aguda/subaguda, crônica e residual. A PCM é uma doença restrita a países da América Latina com maior incidência no Brasil, especialmente entre os trabalhadores rurais. A maioria dos pacientes com a forma crônica da doença, mesmo após tratamento eficaz, apresentam sequelas, incluindo fibrose pulmonar e adrenal. Os problemas sociais, econômicos e psicológicos desencadeados pela fibrose pulmonar são subestimados; além disso, a fibrose na PCM permanece negligenciada, uma vez que não há tratamento. Dessa forma, o estudo teve por objetivo investigar a influência de drogas com potencial antifibrótico (pentoxifilina - PTX, azitromicina - AZT e talidomida - Thal) associadas aos tratamentos antifúngicos com itraconazol - ITC e cotrimoxazol - CMX em modelo murino de PCM pulmonar. Para tanto, camundongos BALB/c machos foram inoculados com leveduras do isolado 326 de *P. brasiliensis* e após 8 semanas de infecção foi dado início aos esquemas terapêuticos: PTX/ITC, PTX/CMX, AZT/ITC, AZT/CMX, Thal/ITC e Thal/CMX. Após 8 semanas de tratamento, os animais foram eutanasiados a fim de se avaliar a deposição de fibras colágenas, produção de hidroxiprolina, recuperação de fungos viáveis e a porcentagem das áreas com lesão nos pulmões e peso corporal. Visando identificar os mecanismos envolvidos foi avaliada a produção de TGF- β 1, CCL3, IFN- γ , TNF- α , IL-10, VEGF, IL-6, IL-1 β , IL-17 e IL-2 no homogenato dos pulmões. Nossos achados revelaram que os camundongos infectados tratados com PTX/ITC mostraram redução nos níveis de hidroxiprolina associada a menor produção de IL-6, IL-17 e TGF- β 1 e níveis mais elevados de IL-10 em comparação ao tratamento apenas com ITC. De forma semelhante, os camundongos infectados tratados com AZT/CMX apresentaram menos fibrose pulmonar associada a níveis reduzidos de TGF- β 1 e aumento de TNF- α e IL-10 do que os camundongos infectados tratados com CMX. Ambos os grupos em que os camundongos foram tratados com ITC/Thal e

CMX/Thal mostraram perda de peso intensa, aumento da deposição de fibras reticulares, altos níveis de CCL3, IFN- γ e VEGF e níveis diminuídos de IL-6, IL-1 β , IL-17 e TGF- β 1 em relação aos camundongos infectados tratados com ITC ou CMX. Dessa forma, nossos achados reforçam o papel antifibrótico da PTX na PCM pulmonar quando associado ao ITC. Além disso, nossos resultados apontaram a AZT como candidata a droga antifibrótica em associação com CMX e a ineficácia da Thal, no tratamento da PCM pulmonar.

Palavras-chave: Antifibróticos; Azitromicina; Fibrose pulmonar; Pentoxifilina; Talidomida.

Abstract

Abstract

FINATO, A. C. **Evaluation of antifibrotic therapies associated with itraconazole and cotrimoxazole in a murine model of pulmonary paracoccidioidomycosis.** Thesis (Master) – Faculty of Medicine of Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2017.

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by fungi of *Paracoccidioides* genus; the main clinical forms are acute/subacute, chronic and residual. PCM is a disease restricted to Latin American countries with a higher incidence in Brazil, especially among rural workers. Most patients with the chronic form, even after effective treatment, present sequelae, including pulmonary and adrenal fibrosis. The social, economic and psychological problems triggered by pulmonary sequels are underestimated. In addition, fibrosis in PCM remains neglected, since there is no treatment. The aim of this study was to investigate the influence of antifibrotic drugs (pentoxifylline - PTX, azithromycin - AZT and thalidomide - Thal) associated with antifungal treatments with itraconazole - ITC and cotrimoxazole - CMX in a murine model of pulmonary PCM. Male BALB/c mice were inoculated with *P. brasiliensis* "isolated 326" and after 8 weeks of infection the treatment were started: PTX/ITC, PTX/CMX, AZT/ITC, AZT/CMX, Thal/ITC and Thal/CMX. After 8 weeks of treatment, the mice were euthanized in order to evaluate the deposition of collagen fibers, hydroxyproline production, recovery of viable fungi and the percentage of areas with injury in lung and body weight. In order to identify the mechanisms involved, the production of TGF- β 1, CCL3, IFN- γ , TNF- α , IL-10, VEGF, IL-6, IL-1 β , IL-17 and IL-2 in the lung homogenate was evaluated. Our findings revealed that infected mice treated with PTX/ITC showed a reduction in hydroxyproline levels associated with lower production of IL-6, IL-17 and TGF- β 1 and higher levels of IL-10 compared to treatment with ITC. Similarly, infected mice treated with AZT/CMX had less lung fibrosis associated with reduced levels of TGF- β 1 and increased TNF- α and IL-10 than infected mice treated with CMX. Both groups in which the mice were treated with Thal/ITC and Tha/CMX showed intense weight loss, increased deposition of reticulin fiber, high levels of CCL3, IFN- γ and VEGF and decreased levels of IL-6, IL-1 β , IL-17 and TGF- β 1 than to the infected mice treated with ITC or CMX. Thus, our findings reinforce the antifibrotic role of PTX in pulmonary PCM when associated with ITC. Besides, our results point out the AZT as a candidate for antifibrotic drug in association with CMX and the inefficacy of Thal in

the treatment of pulmonary PCM.

Keywords: Antifibrotic; Azithromycin; Pentoxifylline; Pulmonary fibrosis; Thalidomide.



Sumário

Sumário

1. Introdução	21
2. Objetivo geral	26
2.1. Objetivos específicos	26
3. Referências bibliográficas	27
4. Manuscrito	33
5. Conclusões	63



Introdução

1. Introdução

1.1. Aspectos da paracoccidiodomicose e de seu agente etiológico.

Descrita em 1908 por Adolfo Lutz, a paracoccidiodomicose (PCM) é uma micose sistêmica, granulomatosa causada por fungos termodimórficos do gênero *Paracoccidioides*(1,2).

O gênero *Paracoccidioides* é composto por duas espécies, o *P. brasiliensis* (Pb) e o *P. lutzii*. O *P. lutzii* é um grupo monofilético e recombinante encontrado no centro, sudoeste e norte do Brasil e do Equador(1), já o Pb é um grupo monofilético composto por espécies crípticas classificadas recentemente em S1a, S1b, PS2, PS3 e PS4(3). As espécies crípticas S1a e S1b estão associadas à maioria dos casos de PCM e está amplamente distribuída na América do Sul(1,3–5). A espécie críptica PS2 foi identificada até o momento no Brasil e na Venezuela, a PS3 é encontrada principalmente em regiões endêmicas da Colômbia(1,4) e a PS4 foi descrita na Venezuela(5).

Apesar de ter sido isolado algumas vezes do solo, o nicho ecológico dos fungos *Paracoccidioides* spp. ainda é pouco conhecido. Os tatus da espécie *Dasypus novemcinctus* (popularmente conhecidos como tatu de nove bandas ou tatu galinha) são reservatórios naturais desse fungo(6–8).

A PCM é uma doença endêmica no Brasil, geograficamente restrita à América Latina, do México à Argentina, apresenta incidência de 1-3 casos por 100.000 habitantes e a maioria dos indivíduos afetados são trabalhadores rurais do sexo masculino(9). A doença pode comprometer qualquer órgão, com predomínio de pulmões, órgãos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear, mucosa das vias aerodigestivas superiores, pele e adrenais(10).

As principais formas clínicas da doença são: a) a forma aguda/sub-aguda, também chamada juvenil que em geral compromete crianças, adolescentes e adultos jovens, apresenta história clínica de curta duração (mediana de dois meses) e exibe manifestações clínicas compatíveis com o comprometimento de órgãos do sistema fagocítico mononuclear; b) a forma crônica, em geral compromete adultos com mais de 30 anos de idade, que apresentam história clínica de longa duração (em geral acima de seis meses), acometendo pulmões e mucosa das vias aerodigestivas superiores com grande frequência; c) forma residual, caracterizada

pelas sequelas observadas após tratamento, em especial nos pulmões, laringe e adrenais(11).

Até a década de 1940 não havia uma droga padrão utilizada no tratamento da PCM, assim, apresentando evolução fatal. Em 1958, a anfotericina B, um potente antifúngico de amplo espectro, foi introduzido no tratamento demonstrando ser eficaz, entretanto a administração do medicamento requer via intravenosa e hospitalização do paciente, além de demonstrar efeitos adversos(12). Assim, no início da década de 1970, demonstrando menores efeitos adversos e de fácil administração, a associação sulfametoxazol-trimetoprima (cotrimoxazol – CMX) se torna amplamente utilizada no tratamento da doença(13). Ainda em busca de fármacos, no final da década 1980 surgiram os azólicos. O itraconazol (ITC) mostrou-se muito eficaz e seguro no tratamento(14–16) e foi considerado a droga de primeira escolha para o tratamento da PCM(17).

No Brasil, o CMX possui distribuição gratuita pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e, por isso, continua sendo amplamente empregado no tratamento da PCM.

1.2. PCM forma crônica (FC) e fibrose pulmonar

Mesmo após tratamento antifúngico eficaz, a avaliação clínica e radiológica de pacientes com a FC revela a presença de fibrose nos diferentes órgãos comprometidos. Os pulmões, além da fibrose, também exibem enfisema - possivelmente pela elevada incidência de tabagismo nesses pacientes(18–21). Santos e colaboradores (2003)(21) consideraram o tabagismo como fator de risco para a PCM. Nesse estudo foi observado que fumantes possuem cerca de 14 vezes mais chances de desenvolver a doença e, adicionalmente, cerca de 3 vezes mais chances em indivíduos etilistas.

Os achados necroscópicos de pacientes com PCM revelam que a fibrose pulmonar é caracterizada por extensas áreas de depósito de colágeno próximas à região hilar, envolvendo outras estruturas como linfonodos, brônquios e artérias. As fibras colágenas se encontram na periferia dos granulomas e se estendem a brônquios e vasos sanguíneos próximos. A proliferação de fibras reticulares (colágeno III) também ocorre no septo alveolar, inclusive em áreas distantes do processo granulomatoso, sugerindo que o próprio fungo e/ou seus antígenos possam atuar diretamente sobre a proliferação de fibras reticulares nos alvéolos

pulmonares(22).

Essas sequelas levam ao comprometimento do órgão e conseqüentemente a incapacitação do paciente, levando a problemas econômicos e sociais, tendo em vista, que os pacientes se encontram na fase mais produtiva profissionalmente de suas vidas (adultos a partir de 30 anos). A incapacitação nesses pacientes, visto que comumente são tabagistas e etilistas, pode contribuir para o agravamento dessas condições e conseqüentemente levar a sintomas depressivos(23).

Apesar da sua importância, poucos estudos têm focado especificamente na fibrogênese pulmonar que ocorre na PCM. Cock e colaboradores (2000)(24) demonstraram em modelo experimental murino que esse processo é precoce, onde os animais após 1 semana de infecção apresentaram início do processo granulomatoso e a partir da 4ª de infecção apresentaram granulomas com aumento da deposição de fibras de colágeno tipo III. Araújo (2011)(25), observou em estudos necroscópicos presença da fibrose em pacientes que não receberam tratamento antifúngico, demonstrando assim, que os pacientes com PCM quando admitidos no serviço de saúde já apresentam alterações relacionadas ao processo fibrótico. Venturini e colaboradores (2014) demonstraram que monócitos de pacientes com PCM-FC no momento do diagnóstico exibem alta produção de TGF- β 1 e FGF. Adicionalmente, Tobón e colaboradores (2003), observaram que após a introdução do tratamento antifúngico o processo fibrótico é intensificado.

A forma crônica da PCM é mediada por uma resposta imunológica mista com predomínio dos perfis Th₁₇ e Th₂₂, além da contribuição substancial do perfil Th₁. Essa resposta contribui parcialmente para a resistência a infecção, entretanto, está envolvida na exacerbação da resposta imunológica mediada por Th₁₇ com conseqüente ativação de neutrófilos, lesão tecidual e desenvolvimento da fibrose(26–30).

Apesar dos mecanismos envolvidos no processo da fibrose serem pouco conhecidos, sugere-se que, a semelhança de outras doenças, a instalação da fibrose pulmonar na PCM é decorrente, também, da estimulação antigênica persistente e da constante ativação da resposta imune, além de distúrbios no processo de reparo tecidual(31). O processo crônico induz dano e morte tecidual e, assim, leva a produção de mediadores que ativam células vizinhas a produzir citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento pró-fibróticos. Esses mediadores estimulam o recrutamento de leucócitos e a diferenciação de fibroblastos em

miofibroblastos, assim, aumentando a produção e deposição de colágeno. Além disso, a fibrogênese é caracterizada pela inibição das metaloproteinases de matriz extracelular (MMP)(32–35).

1.3. Drogas com potencial antifibrótico

1.3.1. Pentoxifilina. A pentoxifilina (PTX) é uma droga hemorreológica padrão, utilizada no tratamento de doenças vasculares crônicas(36). Estudos *in vitro* demonstraram que a atividade supressiva da droga sobre o TNF- α é similar aos efeitos do tratamento com anticorpo anti-TNF- α (37), podendo atuar também, na inibição da produção de IL-10(38,39). A droga possui potencial antifibrótico por exibir redução na proliferação de fibroblastos, supressão da produção, secreção e deposição de colágenos tipo I e III, proteoglicanas e fibronectina(40).

Apesar desses achados, os mecanismos envolvidos ainda não são totalmente conhecidos.

Experimentalmente foi testada em camundongos isogênicos da linhagem AKR/J infectados com *Schistosoma mansoni*. O tratamento diário com 200 mg/Kg de pentoxifilina, via injeção subcutânea na região dorsal, demonstrou que o perfil granulomatoso hepático dos animais tratados com a droga foi irregular e menos concêntrico, com redução significativa no tamanho das lesões nas fases aguda e crônica. O depósito de colágeno tipo I e III nas lesões foi menor nas duas fases da infecção e conseqüentemente houve redução da fibrose(41).

Desse modo, por exibir potencial antifibrótico, foi a primeira droga com essa característica a ser avaliada na PCM experimental murina. Neste estudo, a terapia combinada de ITC (1 mg/dia/animal) e PTX (20 mg/Kg) foi administrada diariamente via gavagem, em camundongos BALB/c machos que foram divididos em dois grupos: a) início do tratamento após 4 semanas de infecção; b) início do tratamento após 8 semanas de infecção. Após períodos de 4, 8, 12 e 16 semanas de tratamento, ambos os grupos resultaram em redução significativa da inflamação granulomatosa e da deposição de fibras colágenas nos pulmões, quando comparado a monoterapia com ITC(42).

Recentemente, o mesmo grupo demonstrou que 8 semanas de monoterapia com PTX (20mg/Kg/dia), dando início após 4 semanas de infecção (processo fibrótico precoce), foi capaz de reduzir a área de lesão dos pulmões associado a

redução da carga fúngica, além de restaurar os níveis de IFN- γ , CCL3 e IL-3(43).

Em um estudo realizado com dezoito pacientes com progressão da sarcoidose, tratados com 25 mg/Kg/dia da droga por seis meses, foi observado melhora clínica em onze pacientes. Sete permaneceram estáveis, não apresentaram piora clínica e apresentaram melhora na função pulmonar(44).

Em *clinical trial* realizado para o uso da PTX na cirrose avançada (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00162552), observou-se que a droga não reduziu o índice de mortalidade de pacientes com cirrose e insuficiência hepática, talvez por conta do curto período de tratamento de 6 meses. No entanto, esse tratamento oral com 400 mg da droga três vezes ao dia, limitou o risco de complicações relacionadas ao fígado, além de limitar o desenvolvimento de infecção bacteriana, insuficiência renal e encefalopatia hepática(45).

1.3.2. Talidomina. A talidomida (Thal) é uma droga com efeito anti-inflamatório e antineoplásico, que atua por inibir a produção de IL-6 e TNF- α (46). Por apresentar, portanto, características similares a PTX, ela tem sido avaliada no tratamento da fibrose hepática em modelos experimentais(47–49). No modelo experimental de fibrose pulmonar induzida por bleomicina, o tratamento com Thal resultou em melhora da fibrose pulmonar com a diminuição na expressão de RNAm de IL-6, TGF- β 1, VEGF, diminuição do depósito de colágeno tipo I e inibição da angiogênese(49). O efeito direto da Thal sobre fibroblastos e/ou degradação do colágeno, é desconhecido.

Até o momento foram realizados dois *clinical trials* para o tratamento de pacientes com fibrose pulmonar idiopática (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00600028 e NCT00162760). Embora tenham sido completados, apenas um deles teve seu resultado publicado. Nesse estudo, demonstrou-se que o tratamento oral com 400 mg/dia de Thal melhorou significativamente a pontuação do questionário sobre qualidade de vida (*Cough Quality of Life Questionnaire*) aplicado aos pacientes, em comparação aos indivíduos tratados com placebo, e, ainda, apresentou melhora significativa dos scores da tosse(50).

1.3.3. Azitromicina. A azitromicina (AZT), um importante antibiótico macrolídeo(51), tem demonstrado efeito antifibrótico promissor(52).

Em estudo experimental com cobaias que apresentavam inflamação

respiratória eosinofílica e foram tratadas com AZT, foi observado significativa redução dos reflexos da tosse, assim, os autores do estudo sugerem mesmo efeito em pacientes com fibrose pulmonar idiopática(53). Em modelo experimental murino de fibrose pulmonar induzida por bleomicina, o tratamento com AZT (3,5 mg/Kg/dia) resultou em redução do declínio da função pulmonar e redução da fibrose nos animais tratados. O estudo também demonstrou redução no recrutamento de linfócitos e neutrófilos, além de efeito imunomodulador diminuindo os níveis de IL-1 β , IL-6, IL-17, MCP-1 e KC do fluido broncoalveolar(52).

Em estudo *in vitro*, os monócitos humanos desafiados com LPS e tratados com AZT apresentaram diminuição nos níveis de TNF- α e IL-12, em comparação aos monócitos apenas desafiados com LPS(54).

Em *clinical trial* (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00431964), realizado com pacientes pediátricos de fibrose cística sem coinfeção por *Pseudomonas aeruginosa*, foi observado que o tratamento com a droga em um período de 24 semanas, não afetou significativamente na melhora da função pulmonar(55).

Até o momento existe um *clinical trial* (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02173145) aberto para o recrutamento de pacientes com fibrose pulmonar idiopática.

3. Referências bibliográficas

1. Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJA, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol.* agosto de 2009;52(2):273–83.
2. Lutz, A. Uma mycose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas. *Bras Med.*1908;(22):121-4;142-4
3. Muñoz JF, Farrer RA, Desjardins CA, Gallo JE, Sykes S, Sakthikumar S, et al. Genome Diversity, Recombination, and Virulence across the Major Lineages of *Paracoccidioides*. *mSphere.* outubro de 2016;1(5).
4. Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol.* janeiro de 2006;23(1):65–73.
5. Teixeira MM, Theodoro RC, Nino-Vega G, Bagagli E, Felipe MSS. *Paracoccidioides* species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. *PLoS Pathog.* outubro de 2014;10(10):e1004397.
6. Bagagli E, Franco M, Bosco SDMG, Hebelbarbosa F, Trinca LA, Montenegro MR. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. *Med Mycol.* junho de 2003;41(3):217–23.
7. Naiff RD, Ferreira LC, Barrett TV, Naiff MF, Arias JR. [Enzootic paracoccidioidomycosis in armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in the State of Pará]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* fevereiro de 1986;28(1):19–27.
8. Peraçoli MT, Sugizaki MF, Mendes RP, Naiff R, Montenegro MR. *Paracoccidioides brasiliensis* isolated from armadillos is virulent to Syrian hamsters. *Mycopathologia.* dezembro de 1999;148(3):123–30.
9. Bocca AL, Amaral AC, Teixeira MM, Sato PK, Sato P, Shikanai-Yasuda MA, et al. *Paracoccidioidomycosis*: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. *Future Microbiol.* setembro de 2013;8(9):1177–91.
10. Moreto TC, Marques MEA, de Oliveira MLSC, Moris DV, de Carvalho LR, Mendes RP. Accuracy of routine diagnostic tests used in paracoccidioidomycosis patients at a university hospital. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* agosto de 2011;105(8):473–8.
11. Mendes RP. The gamut of clinical manifestations. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, editors. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton: CRC Press; 1994. p. 233-58
12. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* - Google Livros [Internet]. [citado 11 de julho de 2017]. Disponível em: https://books.google.com.br/books?id=clDih5b_icC&pg=PA170&lpg=PA170&dq=Tratamento+da+blastomicose+sul-americana+com+anfotericina+B+1958&source=bl&ots=psOVMdEb2k&sig=WiVhy1RQulxCMIRbnAwe3Zt3aA4&hl=pt-BR&sa=X&ved=0ahUKEwju1unG3IHVAhWEjpAKHfJTDdUQ6AEIPjAD#v=onepage&q=Tratamento%20da%20blastomicose%20sul-americana%20com%20anfotericina%20B%201958&f=false

13. Barbosa W, Vasconcelos WM de P. AÇÃO DA SULFAMETOXAZOL ASSOCIADA AO TRIMETOPRIM NA TERAPÊUTICA DA BLASTOMICOSE SUL-AMERICANA. *Rev Patol Trop.* 1973;2(3).
14. Negroni R, Palmieri O, Koren F, Tiraboschi IN, Galimberti RL. Oral treatment of paracoccidioidomycosis and histoplasmosis with itraconazole in humans. *Rev Infect Dis.* fevereiro de 1987;9 Suppl 1:S47-50.
15. Restrepo A, Gomez I, Robledo J, Patiño MM, Cano LE. Itraconazole in the treatment of paracoccidioidomycosis: a preliminary report. *Rev Infect Dis.* fevereiro de 1987;9 Suppl 1:S51-56.
16. Naranjo MS, Trujillo M, Munera MI, Restrepo P, Gomez I, Restrepo A. Treatment of paracoccidioidomycosis with itraconazole. *J Med Vet Mycol Bi-Mon Publ Int Soc Hum Anim Mycol.* 1990;28(1):67–76.
17. Cavalcante R de S, Sylvestre TF, Levorato AD, de Carvalho LR, Mendes RP. Comparison between itraconazole and cotrimoxazole in the treatment of paracoccidioidomycosis. *PLoS Negl Trop Dis.* abril de 2014;8(4):e2793.
18. Campos EP, Cataneo AJ. [Pulmonary function in 35 patients with paracoccidioidomycosis]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* outubro de 1986;28(5):330–6.
19. Campos EP, Padovani CR, Cataneo AM. [Paracoccidioidomycosis: radiologic and pulmonary study in 58 cases]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* agosto de 1991;33(4):267–76.
20. Lemle A, Wanke B, Miranda JL, Kropf GL, Mandel MB, Mandel S. Pulmonary function in paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis). An analysis of the obstructive defect. *Chest.* maio de 1983;83(5):827–8.
21. Santos WA dos, Silva BM da, Passos ED, Zandonade E, Falqueto A. Association between smoking and paracoccidioidomycosis: a case-control study in the State of Espírito Santo, Brazil. *Cad Saúde Pública.* fevereiro de 2003;19(1):245–53.
22. Tuder RM, el Ibrahim R, Godoy CE, De Brito T. Pathology of the human pulmonary paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* dezembro de 1985;92(3):179–88.
23. Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho F de Q, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. [Guidelines in paracoccidioidomycosis]. *Rev Soc Bras Med Trop.* junho de 2006;39(3):297–310.
24. Cock AM, Cano LE, Vélez D, Aristizábal BH, Trujillo J, Restrepo A. Fibrotic sequelae in pulmonary paracoccidioidomycosis: histopathological aspects in BALB/c mice infected with viable and non-viable paracoccidioides brasiliensis propagules. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* abril de 2000;42(2):59–66.
25. Araujo S de A. Contribuição ao estudo anátomo-clínico da Paracoccidioidomycose em Minas Gerais. meio século de experiência - avaliação das necrópsias realizadas no período compreendido entre 1944 até 1999, no departamento de anatomia patológica e medicina legal, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. [Internet]. 2011 [citado 21 de junho de 2017]. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/BUOS-8KVLVK>

26. de Castro LF, Ferreira MC, da Silva RM, Blotta MH de SL, Longhi LNA, Mamoni RL. Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. *J Infect.* novembro de 2013;67(5):470–85.
27. Benard G, Romano CC, Cacere CR, Juvenale M, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine.* 21 de fevereiro de 2001;13(4):248–52.
28. Mamoni RL, Nouér SA, Oliveira SJ, Musatti CC, Rossi CL, Camargo ZP, et al. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF- β in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. *Med Mycol.* 1º de janeiro de 2002;40(2):153–9.
29. Oliveira SJ, Mamoni RL, Musatti CC, Papaiordanou PMO, Blotta MHSL. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes Infect.* 1º de fevereiro de 2002;4(2):139–44.
30. Mamoni RL, Blotta MHSL. Flow-cytometric analysis of cytokine production in human paracoccidioidomycosis. *Cytokine.* 1º de agosto de 2006;35(3):207–16.
31. Kisseleva T, Brenner DA. Fibrogenesis of parenchymal organs. *Proc Am Thorac Soc.* 15 de abril de 2008;5(3):338–42.
32. Phan SH. Biology of fibroblasts and myofibroblasts. *Proc Am Thorac Soc.* 15 de abril de 2008;5(3):334–7.
33. Klingberg F, Hinz B, White ES. The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. *J Pathol.* janeiro de 2013;229(2):298–309.
34. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmoulière A, Varga J, et al. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol.* abril de 2012;180(4):1340–55.
35. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol.* janeiro de 2008;214(2):199–210.
36. Jull A, Arroll B, Parag V, Waters J. Pentoxifylline for treating venous leg ulcers. *Cochrane Database Syst Rev.* 18 de julho de 2007;(3):CD001733.
37. Tilg H, Eibl B, Pichl M, Gächter A, Herold M, Brankova J, et al. Immune response modulation by pentoxifylline in vitro. *Transplantation.* julho de 1993;56(1):196–201.
38. Marcinkiewicz J, Grabowska A, Lauterbach R, Bobek M. Differential effects of pentoxifylline, a non-specific phosphodiesterase inhibitor, on the production of IL-10, IL-12 p40 and p35 subunits by murine peritoneal macrophages. *Immunopharmacology.* setembro de 2000;49(3):335–43.
39. Bienvenu J, Doche C, Gutowski MC, Lenoble M, Lepape A, Perdrix JP. Production of proinflammatory cytokines and cytokines involved in the TH1/TH2 balance is modulated by pentoxifylline. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1995;25 Suppl 2:S80-84.
40. Samlaska CP, Winfield EA. Pentoxifylline. *J Am Acad Dermatol.* abril de 1994;30(4):603–21.

41. Mati VLT, Freitas RMC, Melo AL. Effects of pentoxifylline during *Schistosoma mansoni* infection in Swiss mice: an analysis of worm burden, fecundity and liver histopathology. *J Helminthol*. dezembro de 2010;84(4):348–54.
42. Naranjo TW, Lopera DE, Diaz-Granados LR, Duque JJ, Restrepo AM, Cano LE. Combined itraconazole-pentoxifylline treatment promptly reduces lung fibrosis induced by chronic pulmonary paracoccidiodomycosis in mice. *Pulm Pharmacol Ther*. fevereiro de 2011;24(1):81–91.
43. Lopera DE, Naranjo TW, Hidalgo JM, Echeverri L, Patiño JH, Moreno ÁR, et al. Pentoxifylline immunomodulation in the treatment of experimental chronic pulmonary paracoccidiodomycosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 1º de junho de 2015;8:10.
44. Zabel P, Entzian P, Dalhoff K, Schlaak M. Pentoxifylline in treatment of sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med*. maio de 1997;155(5):1665–9.
45. Lebrech D, Thabut D, Oberti F, Perarnau J-M, Condat B, Barraud H, et al. Pentoxifylline does not decrease short-term mortality but does reduce complications in patients with advanced cirrhosis. *Gastroenterology*. maio de 2010;138(5):1755–62.
46. Zhou S, Wang F, Hsieh T-C, Wu JM, Wu E. Thalidomide—a notorious sedative to a wonder anticancer drug. *Curr Med Chem*. 2013;20(33):4102–8.
47. Arai H, Furusu A, Nishino T, Obata Y, Nakazawa Y, Nakazawa M, et al. Thalidomide prevents the progression of peritoneal fibrosis in mice. *Acta Histochem Cytochem*. 28 de abril de 2011;44(2):51–60.
48. Choe J-Y, Jung H-J, Park K-Y, Kum Y-S, Song GG, Hyun D-S, et al. Anti-fibrotic effect of thalidomide through inhibiting TGF-beta-induced ERK1/2 pathways in bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al*. março de 2010;59(3):177–88.
49. Tabata C, Tabata R, Kadokawa Y, Hisamori S, Takahashi M, Mishima M, et al. Thalidomide prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1º de julho de 2007;179(1):708–14.
50. Horton MR, Santopietro V, Mathew L, Horton KM, Polito AJ, Liu MC, et al. Thalidomide for the treatment of cough in idiopathic pulmonary fibrosis: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 18 de setembro de 2012;157(6):398–406.
51. Retsema J, Girard A, Schelkly W, Manousos M, Anderson M, Bright G, et al. Spectrum and mode of action of azithromycin (CP-62,993), a new 15-membered-ring macrolide with improved potency against gram-negative organisms. *Antimicrob Agents Chemother*. dezembro de 1987;31(12):1939–47.
52. Wuyts WA, Willems S, Vos R, Vanaudenaerde BM, De Vleeschauwer SI, Rinaldi M, et al. Azithromycin reduces pulmonary fibrosis in a bleomycin mouse model. *Exp Lung Res*. dezembro de 2010;36(10):602–14.
53. Tokuda A, Ohkura N, Fujimura M, Furusho S, Abo M, Katayama N. Effects of macrolides on antigen-induced increases in cough reflex sensitivity in guinea pigs. *Pulm Pharmacol Ther*. fevereiro de 2010;23(1):55–61.

54. Khan AA, Slifer TR, Araujo FG, Remington JS. Effect of clarithromycin and azithromycin on production of cytokines by human monocytes. *Int J Antimicrob Agents*. fevereiro de 1999;11(2):121–32.
55. Saiman L, Anstead M, Mayer-Hamblett N, Lands LC, Kloster M, Hocevar-Trnka J, et al. Effect of azithromycin on pulmonary function in patients with cystic fibrosis uninfected with *Pseudomonas aeruginosa*: a randomized controlled trial. *JAMA*. 5 de maio de 2010;303(17):1707–15.

Conclusões

5. Conclusões

A pentoxifilina quando associada ao itraconazol apresentou efeito antifibrótico, entretanto quando utilizada com o cotrimoxazol não se mostrou eficiente. A azitromicina mostrou-se mais eficaz na combinação com o cotrimoxazol. Os mecanismos envolvidos estavam relacionados a diminuição da produção de TGF- β e aumento de IL-10. O tratamento com talidomida não foi satisfatório nas associações com itraconazol e cotrimoxazol, pois não apresentou efeito antifibrótico, além de ter agravado a doença nos animais tratados com cotrimoxazol.

A intensificação dos quadros de fibrose em indivíduos tratados com os diferentes esquemas terapêuticos não eficazes, estiveram associados a níveis elevados de CCL3 e VEGF nos pulmões desses animais.

Assim, os resultados obtidos abrem novas perspectivas para aplicação terapêutica das drogas avaliadas na paracoccidiodomicose pulmonar.