

AVALIAÇÃO DO CETOCONAZOL EM CAMUNDONGOS INOCULADOS COM *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS* PELA HISTOPATOLOGIA DE FÍGADO E BAÇO E PELA INTRADERMORREAÇÃO DE PARACOCCIDIOIDINA

Maria do Rosário Rodrigues Silva, Landia Fernandes de Paiva e Rosália Santos Amorim Jesuino

Camundongos machos albinos, foram inoculados por via intravenosa com $0,5 \times 10^7$ células leveduriformes viáveis de Paracoccidoides brasiliensis da amostra rotulada como Pb 2052 e tratados diariamente com cetoconazol nas dosagens de 50 e 100mg/kg durante 50 dias e em seguida sacrificados. Observou-se o número de parasitas, formação de granulomas no fígado e baço e reação de hipersensibilidade retardada usando-se antígeno de P. brasiliensis preparado segundo Fava Neto, inoculado na pata direita do animal. Verificou-se que: 1. cetoconazol diminuiu acentuadamente o número de parasitas encontrados no fígado e baço; 2. não havia diferença entre o número de granulomas formados no baço e fígado de animais tratados e não tratados; 3. a intensidade dos testes cutâneos tardios foram similares em todos os animais.

Palavras-chaves: Paracoccidoides brasiliensis, Resposta imune celular. Cetoconazol. Paracoccidiodina.

A paracoccidiodomicose é micose sistêmica, granulomatosa, causada pelo fungo dimórfico, *Paracoccidoides brasiliensis*. A doença é considerada endêmica na América Latina, sendo que o Brasil, a Colômbia, a Venezuela e Argentina são consideradas regiões de alta prevalência^{1 4}.

P. brasiliensis provoca no organismo do animal resposta imunitária muito importante na evolução da doença^{7 10}. Estudos da imunidade humoral demonstram que em pacientes com paracoccidiodomicose a produção de anticorpos processa-se normalmente, ou mostra-se mais ativa, enquanto a imunidade celular apresenta-se diminuída, principalmente nos casos graves, demonstrado *in vivo* pela reação de hipersensibilidade retardada frente ao antígeno específico, pela resposta ao dinitroclorobenzeno (DNCB) e pela sobrevivência aos enxertos de pele^{7 12 13}.

Alguns experimentos em camundongos inoculados com *P. brasiliensis* mostram que nestes animais se produzem lesões crônicas, progressivas e generalizadas semelhantes às observadas no homem^{3 9 10 15}.

O tratamento da paracoccidiodomicose com cetoconazol tem sido considerado uma terapia excelente mesmo em indivíduos com a forma grave da doença, sendo que a droga não tem revelado efeitos colaterais significativos^{11 14}.

Para verificar o quadro histopatológico do fígado e baço e a resposta da imunidade celular, através da formação de granulomas e hipersensibilidade retardada, em camundongos inoculados com *P. brasiliensis* e tratados com cetoconazol, nos propusemos a fazer o presente trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 20 camundongos brancos, *inbred*, machos de 3 a 4 semanas de idade, com 20 a 25g de peso.

Departamento de Microbiologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO.

Endereço para correspondência: Profa. Maria do Rosário Rodrigues Silva. R. Delenda de Rezende s/nº, Setor Universitário, 74065-050 Goiânia, GO.

Recebido para publicação em 19/07/93.

Inóculo

Foi utilizada amostra de *P. brasiliensis*, obtida no laboratório de Micologia da Universidade Federal de Goiás, rotulada como Pb 2052 cultivada por 8 dias a 37°C em agar sabouraud dextrose.

Cada animal recebeu, por via intravenosa, 0,5ml de suspensão fúngica em salina estéril contendo por ml 1×10^7 células leveduriformes viáveis. Os animais controles foram inoculados com o mesmo volume de salina estéril. A viabilidade das células foi verificada através de Janus Green B.

Procedimento experimental

Os animais foram distribuídos em 4 grupos, rotulados de A a D.

Grupo A: inoculados com *P. brasiliensis*.

Grupo B: inoculados com *P. brasiliensis* e 15 dias depois foram tratados com cetoconazol por via oral com 50mg/kg/dia durante 50 dias.

Grupo C: inoculados com *P. brasiliensis* e 15 dias depois foram tratados com cetoconazol por via oral com 100mg/kg/dia durante 50 dias.

Grupo D: animais não infectados e não tratados, usados como controle.

Histopatologia

Os animais foram sacrificados 72 horas após a última administração da droga. Fragmentos de fígado e baço foram fixados em formalina a 10%, incluídos em parafina e corados pela hematoxilina-eosina (HE) e ácido periódico de Schiff (PAS) para procedimento histopatológico. O número de granulomas e de fungos nos cortes histológicos foi conseguido através de: contagem total na área do corte; projeção da área examinada com câmara clara sobre papel branco comum; transferência do contorno desenhado para papel milimetrado de gramatura uniforme; recorte da área contornada e pesagem; pesagem da área conhecida e inferência do peso por mm^2 ; correlação entre o peso/ mm^2 e o peso total para conversão em área total expressa em mm^2 ; correlação entre contagem total/superfície conhecida.

Teste do coxim plantar

Para o teste do coxim plantar, cada animal recebeu intradermicamente 0,1ml do antígeno polissacarídico preparado a partir da amostra Pb 2052, na pata posterior direita, 3 dias antes de serem

sacrificados. Leitura foi feita com um paquímetro 48 horas após a inoculação do antígeno. Como controle inoculou-se 0,1ml de salina na pata posterior esquerda.

Teste estatístico

Análise estatística foi feita em relação a reação cutânea, ao número de parasitas e de granulomas em animais infectados, infectados e tratados com 50mg e com 100mg de cetoconazol, utilizando-se o teste "T" de Student $\alpha = 0,05$.

RESULTADOS

Macroscopicamente observou-se aumento do baço e fígado em 13(93%) dos 15 animais infectados e microscopicamente a formação de reação inflamatória inespecífica à custa de histiócitos, linfócitos e neutrófilos e uma reação granulomatosa bem definida constituída por macrófagos, células epitelióides e neutrófilos ao redor de grande número de fungos.

As células de *P. brasiliensis* podiam ser vistas isoladas ou agrupadas, livres no parênquima ou dentro de células gigantes ou apresentando-se desprovidas de citoplasma e de núcleo, destacando-se pela parede de aspecto duplo, principalmente nos animais apenas infectados (Figuras 1 e 2).

Nos animais tratados, o número de células fúngicas apresentou-se bem reduzido ou ausente. Todos os animais infectados apresentaram-se reatores ao teste do coxim plantar.

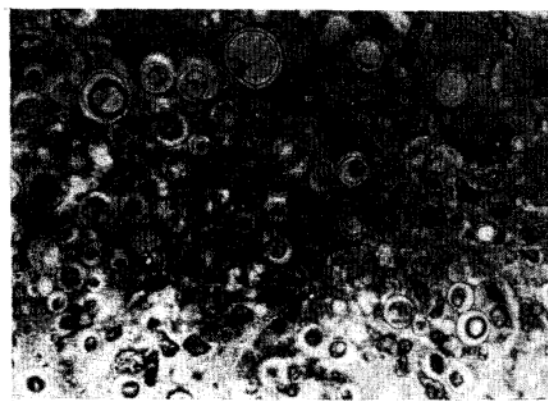


Figura 1 - Numerosas células de *P. brasiliensis* livres e algumas fagocitadas por células gigantes em animais apenas infectados.



Figura 2 - *P. brasiliensis* no interior de células gigantes em animais infectados e tratados com 50mg/kg de cetoconazol.

A Tabela 1 mostra a média do número de parasitas e de granulomas presentes no fígado e baço e os valores médios dos testes cutâneos dos animais estudados.

Com relação ao teste estatístico aplicado verificou-se que: 1. o grupo de animais infectados mostrou-se com um número de parasitos estatisticamente superior em relação aos grupos infectados e tratados nos dois órgãos examinados e não foi verificada diferença significativa entre os grupos infectados e tratados com 50mg e 100mg de cetoconazol; 2. não houve diferença significativa entre os grupos estudados, com relação ao número de granulomas nos dois órgãos; 3. não foi observada diferença significativa entre os grupos infectados e infectados e tratados frente ao teste cutâneo com paracoccidioidina.

Tabela 1 - Média geométrica dos testes cutâneos e do número de parasitas e de granulomas presentes no fígado e baço de animais infectados com *P. brasiliensis*, infectados e tratados com 50mg/kg de cetoconazol e de infectados e tratados com 100mg/kg de cetoconazol.

Grupos	Nº de animais	Parasitas/mm ²		Granulomas/mm ²		Teste cutâneo/mm
		baço	fígado	baço	fígado	
Infectado	5	0,448	0,704	0,070	0,114	0,84
Infectado + 50mg de cetoconazol	5	0,052	0,164	0,022	0,086	0,76
Infectado + 100mg de cetoconazol	5	0,020	0,032	0,016	0,016	0,44

DISCUSSÃO

Os achados histopatológicos no fígado e baço de camundongos inoculados com *P. brasiliensis* são semelhantes aos descritos na literatura para vários animais experimentais como cobaios, ratos brancos, hamsters e camundongos^{2 8 9 15}.

O início do tratamento, depois de 15 dias de inóculo resultou em estudos prévios em que se consegue a infectividade do animal após este período^{6 15}. Obteve-se nos animais estudados uma doença crônica, granulomatosa que envolve principalmente os órgãos do sistema retículo endotelial.

A grande quantidade de células fúngicas presentes nos animais infectados em contraste com aqueles infectados e tratados mostra mais uma vez que o cetoconazol é uma droga eficaz no tratamento

da paracoccidioidomicose.

A resposta da imunidade mediada por células através de teste cutâneo feito na pata do animal mostrou-se positiva em 96,7% dos animais infectados. Defaveri e cols⁵ encontraram 78,6% de positividade frente ao antígeno específico em camundongos infectados com *P. brasiliensis*. Sabe-se que esta resposta depende da quantidade e via de administração do inóculo, da virulência e antigenicidade do parasita.

A formação da resposta inflamatória granulomatosa foi praticamente igual em todos os animais, mostrando que a própria célula fúngica estimulou o aparecimento desta resposta, não se verificando ação do cetoconazol nas dosagens de 50 e 100mg/kg com relação a produção de granulomas nos animais estudados.

SUMMARY

Male albino mice were inoculated intravenously with $0,5 \times 10^7$ viable yeast forms of *P. brasiliensis* (strain 2052). These animals were treated with two doses of ketoconazole (50 and 100mg/kg) during fifty days and the sacrificed. We studied the presence of *P. brasiliensis*, the inflammatory granulomatous response of liver and spleen and the anti *P. brasiliensis* delayed hypersensitivity response measured by the footpad test after 48 hours. It was observed that: 1. animals infected and treated with ketoconazole showed reduction in the number of fungi in the organs studied; 2. there was no difference in the number of granulomas among animals treated and non-treated; 3. the cutaneous delayed tests intensity was similar in all animals.

Key-words: *Paracoccidioides brasiliensis*. Cellular immune response. Ketoconazole. Paracoccidioidine.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alves LM, Figueiredo F, Brandão Filho SL, Tincani I, Silva CL. The role of fractions from *P. brasiliensis* in the genesis of inflammatory response. *Mycopathology* 97:3-7, 1987.
2. Brito T, Fava Neto C. Disseminated experimental south American Blastomycosis of the guinea pig: a pathologic and immunologic study. *Pathology and Microbiology* 26:29-43, 1963.
3. Calich VLG, Singer-Vermes LM, Siqueira AM, Burger E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *P. brasiliensis*. *British Journal of Experimental Pathology* 66:585-594, 1985.
4. Casotta M. Characterization of the cellular antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form. *Journal of Clinical Microbiology* 28:1188-1193, 1990.
5. Defaveri J, Reskallah-Iwassa MT, Franco MF. Experimental pulmonary paracoccidioidomycosis in mice. Morphology and correlation of lesions with humoral and cellular immune response. *Mycopathologia* 77:3-11, 1982.
6. Fialho F, Gonçalves AP. Contribuição ao estudo da blastomicose brasileira. Estudo experimental desta micose no cobaijo. *O Hospital* 30:397-407, 1946.
7. Franco M, Montenegro MRG. Relação parasita-hospedeiro na paracoccidioidomycose. Revisão da literatura. *Revista de Ciências Biomédicas* 7/8:47-60, 1987.
8. Guimarães N. Infecção do hamster (*Cricetus auratus*, Water-house) pelo agente da micose de Lutz (Blastomicose Sul Americana). *O Hospital* 15:515-520, 1951.
9. Kerr IB, Araripe JR, Oliveira PC, Lenzi HL. Paracoccidioidomycosis: a sequencial histopathologic study of lesions in experimentally infected rats. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 30:336-350, 1988.
10. Kerr IB, Silva AMM, Drouhet E, Oliveira P, Costa SCG. Paracoccidioidomycosis in nude mice. Presence of filamentous forms of the fungus. *Mycopathologia* 101:3-11, 1988.
11. Lima NS, Valle ACF. Ketoconazol na paracoccidioidomycose com longo seguimento pós terapêutico. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 62:205-207, 1987.
12. Mendes E. Delayed hypersensitivity reactions in patients with paracoccidioidomycosis. *Proceeding of the Third International Conference on the Mycoses. Scientific Public* 305:17-22, 1975.
13. Musatti CC. Cell mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. *Proceeding of the Third International Conference on the Mycoses* 305:23-29, 1975.
14. Negroni R. Ketoconazol in the treatment of paracoccidioidomycosis and histoplasmosis. *Fifth International Conference on the mycoses superficial, cutaneous and subcutaneous infections. PAHO. Scientific Public* 396:361-365, 1980.
15. Silva MRR. Ação da anfotericina B e levamisole em camundongos albinos inoculados com *Paracoccidioides brasiliensis*. *Revista do Instituto de Patologia Tropical* 11:173-217, 1982.