



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS DE ARAGUAÍNA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE ANIMAL E SAÚDE
PÚBLICA NOS TRÓPICOS

ANTONIO OLIVEIRA DOS SANTOS JÚNIOR

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE NANOPARTÍCULAS COM
ITRACONAZOL POR VIA INALATÓRIA EM CAMUNDONGOS
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Paracoccidioides brasiliensis*

ARAGUAÍNA

2019

ANTONIO OLIVEIRA DOS SANTOS JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE NANOPARTÍCULAS COM
ITRACONAZOL POR VIA INALATÓRIA EM CAMUNDONGOS
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Paracoccidioides brasiliensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos como requisito parcial para obtenção de título de Mestre.

Orientadora: prof. Dra. Ana Patrícia de Carvalho da Silva

Co-orientador: prof. Dr. Diógenes de Souza Neto

ARAGUAÍNA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

- S237a SANTOS JUNIOR, ANTONIO OLIVEIRA DOS.
Avaliação do potencial terapêutico de nanopartículas com itraconazol por via inalatória em camundongos experimentalmente infectados com *Paracoccidioides brasiliensis*. / ANTONIO OLIVEIRA DOS SANTOS JUNIOR. – Araguaína, TO, 2019.
63 f.
Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Araguaína - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, 2019.
Orientador: Ana Patrícia de Carvalho da Silva
Coorientador: Diógenes de Sousa Neto
1. *Paracoccidioides brasiliensis*. 2. Nanopartículas de itraconazol.
3. Tratamento inalatório. 4. Camundongos Swiss. I. Título

CDD 636.089

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

ANTONIO OLIVEIRA DOS SANTOS JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE NANOPARTÍCULAS COM
ITRACONAZOL POR VIA INALATÓRIA EM CAMUNDONGOS
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Paracoccidioides brasiliensis***

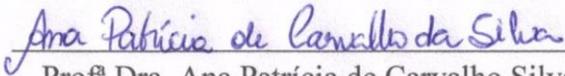
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos como requisito parcial para obtenção de título de Mestre.

Orientadora: prof. Dra. Ana Patrícia de Carvalho da Silva

Co-orientador: prof. Dr. Diógenes de Souza Neto

Aprovada em 12/08/2019

BANCA EXAMINADORA


Prof.^a Dra. Ana Patrícia de Carvalho Silva
(Orientadora, Universidade Federal do Tocantins)


Prof. Dr. Fabiano Mendes, de Cordova
(Universidade Federal do Tocantins)


Prof. Dr. Auricélio Alves de Macedo
(Universidade Estadual do Maranhão)

Dedico este trabalho à minha família;

Isabela, Bernardo e Benício.

Em certos momentos, só o amor clareia a necessidade de definir prioridades e a compreensão de que as dificuldades são sempre passageiras

AGRADECIMENTOS

À prof. Dra. Ana Patrícia de Carvalho da Silva pela consideração e disponibilidade desde o início em me aceitar como o seu orientado em um projeto totalmente novo. Todas as suas sugestões e dicas além de fundamentais foram sempre muito respeitosas. Obrigado!

Ao prof. Dr. Diógenes de Sousa Neto, amigo, colega de trabalho e co-orientador nessa empreitada. Trabalharmos na mesma sala ajudou muito na concretização desse projeto.

À Dra. Alessandra Krackeke, pela incomensurável ajuda na manutenção das culturas fúngicas e preparação dos inóculos. Grande parte da motivação em utilizar o *P. brasiliensis* foi por saber que eu estaria trabalhando com uma profissional experiente.

Ao prof. Dr. Fabiano de Cordova que além de me ceder os camundongos utilizados neste experimento, teve toda a paciência em me ajudar na manutenção e manipulação dos animais.

Aos meus professores no mestrado prof Dra. Helcileia, prof. Dr. Alencariano Falcão, prof. Dra. Silvia Minharro, Prof. Dr. Marco A. Gianocaró, Prof. Dra. Ana Kelen, por todos os ensinamentos aprendidos durante as aulas do mestrado.

Ao prof. Dr. Wagner dos Santos Mariano, amigo, colega de trabalho pelas dicas e pelo incentivo sempre que eu precisei.

Ao prof. Dr. Eduardo Bagagli, que mesmo sem me conhecer abriu as portas do seu laboratório, me ensinou as particularidades no cultivo do *P. brasiliensis* e ainda me cedeu as cepas do fungo que utilizamos no nosso experimento.

À prof. Clarissa Mendes de Cordova por toda a ajuda e disponibilidade sempre que precisei, me oferecendo a chave do laboratório quando coordenadora do curso de medicina.

Ao prof. Dr. Sandro Moron, coordenador do comitê de ética em pesquisa com animais, professor do curso de medicina, pela ajuda cedendo o seu laboratório quando precisei.

Aos meus colegas de mestrado Daiane, Crispim, Eduardo Libânio, Helen, Gustavo e Cícero pela amizade que adquirimos, pela parceria e incentivo.

Às minhas colegas de mestrado Márcia e Denise pela ajuda nos experimentos sempre que precisei.

Aos pós-graduandos da UNESP – Botucatu, Hans Garcia e Jéssica, que sabendo da minha inexperiência na manipulação do fungo, permaneceram comigo nos experimentos iniciais ainda em Botucatu-SP.

À aluna de graduação em Medicina Veterinária Géssica pela ajuda nos experimentos e na manutenção dos animais quando precisei me ausentar.

À tec. Laboratório Ms. Gil, colega de mestrado, pela ajuda com as fotos das lâminas de microscopia optica

As minhas colegas de trabalho da Gerência de Ensino e Pesquisa do HDT-UFT, Raquel, Regiane e Roberta pela compreensão e apoio durante as minhas ausências.

E à técnica Dra. Karina pela ajuda na preparação dos meios de cultura para o cultivo dos fungos,

Sou muito grato a toda ajuda que recebi na elaboração desse projeto durante esses dois anos. Obrigado!

RESUMO

A inalação de agentes antifúngicos tem sido utilizada para a prevenção e tratamento de infecções fúngicas pulmonares de forma experimental há algumas décadas, entretanto ainda não existem formulações disponíveis no mercado desenvolvidas especificamente para este fim. O uso crônico por via oral ou endovenosa de agentes antifúngicos trazem efeitos colaterais principalmente no trato gastrointestinal, além de alterações na função renal. Com isso, o objetivo geral do trabalho foi o de sintetizar uma nova formulação de nanopartículas de itraconazol e avaliar a resposta ao tratamento por via inalatória em camundongos experimentalmente infectados com *Paracoccidioides brasiliensis*, o agente etiológico da micose sistêmica mais frequente na América Latina. Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss, divididos em 4 grupos; Grupo 1 - não infectado/não tratado, Grupo 2 – infectado/não tratado, Grupo 3 – infectado/tratamento oral, Grupo 4 – infectado/tratamento inalatório. Os resultados demonstraram que é possível sintetizar uma solução de itraconazol em pH fisiológico nebulizável, com eficácia “*in vitro*” comparável à droga padrão e que pode ser administrada por via inalatória em um modelo animal de infecção pulmonar por *P. brasiliensis*, além de ser funcional, uma vez que os resultados de macroscopia e microscopia comprovam a redução significativa do número de granulomas nos camundongos tratados com essa solução por via inalatória.

PALAVRAS-CHAVE: Antifúngicos, Micoses, Pulmão, Camundongos, Swiss, Tratamento

ABSTRACT

Inhalation of antifungal agents has been used for the prevention and treatment of pulmonary fungal infections experimentally for some decades, although there are no commercial formulations available for this purpose and chronic use by oral or intravenous route of antifungal agents, cause side effects mainly in the gastrointestinal tract and renal function. Thus, the aim of this work was to synthesize a new nanoparticles itraconazole formulation and to evaluate the response to inhalation treatment of Swiss mice experimentally infected with *Paracoccidioides brasiliensis*, the etiological agent of most frequent systemic mycosis in Latin America. The animals were divided into 4 groups: Group 1 – uninfected/untreated, Group 2 – Infected/untreated, Group 3 – Infected/Oral treatment, Group 4 – Infected/inhalation treatment. Results demonstrated that is possible to synthesize a solution of itraconazole at physiological nebulisable pH, with comparable “*in vitro*” efficacy to the standard drug and that can be administered by inhalation in an animal model of pulmonary infection by *P. brasiliensis*, it is also functional, since macroscopy and microscopy results show a significant reduction in the number of granulomas in mice treated with this solution by inhalation.

KEY WORDS: Antifungals, Mycoses, Lung, Mice, Swiss, Treatment

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Morfologia de <i>P. brasiliensis</i> a 35 ° C.....	15
Figura 2 – Estrutura química do itraconazol.....	18
Figura 3 – Estrutura química da β -ciclodextrina.....	19
Figura 4 – Complexação itraconazol/ β -ciclodextrina.....	21
Figura 5 – Estrutura química do propilenoglicol.....	22
Figura 6 – Câmara de nebulização com exposição das narinas.....	24
Figura 7 – Câmara de nebulização de corpo inteiro.....	24
Figura 8 – Câmara de nebulização para 8 camundongos.....	25
Figura 9 – Esquematização do teste de concentração inibitória mínima.....	31
Figura 10 – Leitura da microplaca com espelho.....	31
Figura 11 – Esquematização do teste de concentração fungicida mínima.....	32
Figura 12 – Aspecto das soluções após síntese.....	36
Figura 13 – Análise de turbidez das diferentes soluções de itraconazol/HPBCD.....	37
Figura 14 – Microscopia optica, formação de agregados.....	38
Figura 15 – Testes de concentração inibitória mínima.....	39
Figura 16 – Testes da concentração fungicida mínima.....	40
Figura 17 – Lâmina histopatológica do pulmão infectado com <i>P. brasiliensis</i>	42
Figura 18 – Nebulização das nanopartículas de IT/HP β CD.....	43
Figura 19 – Macroscopia, Pulmão de camundongo infectado com <i>P. brasiliensis</i>	44
Figura 20 – Macroscopia das vísceras abdominais, animal infectado.....	45
Figura 21 – Avaliação microscópica.....	46
Figura 22 – Escore histopatológico.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultado da concentração inibitória mínima.....	40
Tabela 2 – Resultado da concentração fungicida mínima.....	41

ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
β CD	Beta-ciclodextrina
CD	Ciclodextrina
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CHMP	Committee for Medicinal Products for Human Use
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
DMSO	Dimetil Sulfóxido
EMA	European Medicines Agency
EMVZ	Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
GPY	Glucose Peptone Yeast
HDT-UFT	Hospital de Doenças Tropicais da Universidade Federal do Tocantins
HCl	Ácido clorídrico
HP β CD	Hidroxipropil-beta-ciclodextrina
HPLC	High performance liquid chromatography
LSPA	Laboratório de Saúde Pública de Araguaína
MHz	MegaHertz
MMH	Meio McVeigh and Morton
MOPS	Ácido 3-(N-morpholino) propanosulfônico
NTP	National Toxicity Program
NaOH	Hidróxido de sódio
PBS	Solução Fosfato Salina
PCM	Paracoccidiodomicose
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Cologaritmo da constante de acidez

RM- β CD	Randomicamente metilada-beta-ciclodextrina
RNAse	Ribonuclease
RPM	Rotações por Minuto
RPMI1640	Meio Roswell Park Memorial Institute 1640
TSB	Tryptic Soy Broth
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UV/VIS	Ultraviolet-Visible
%m/v	Percentual massa/volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Paracoccidioidomicose.....	15
2.1.1 Modelo experimental da paracoccidioidomicose.....	16
2.1.2 Caracterização macroscópica e microscópica da lesão causada por <i>Paracoccidioides</i> sp.....	16
2.1.3 Tratamento da paracoccidioidomicose.....	17
2.2 Itraconazol.....	17
2.3 Ciclodextrinas.....	19
2.4 Propilenoglicol.....	21
2.5 Nebulizadores e Câmaras de nebulização.....	23
3 OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivo geral.....	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1 Nanopartículas de itraconazol/HPβCD.....	27
4.1.1 Síntese de nanopartículas.....	27
4.1.2 Estudos de solubilidade.....	27
4.1.3 Formulação da solução de itraconazol/HP β CD para os estudos de concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima.....	27
4.2 Ensaio biológico <i>in vitro</i>.....	28
4.2.1 Cultura e manutenção dos isolados fúngicos.....	28
4.2.2 Preparação e quantificação dos inóculos.....	28
4.2.3 Concentração Inibitória Mínima.....	29
4.2.4 Concentração Fungicida Mínima.....	32
4.3 Ensaio biológico <i>in vivo</i>.....	32
4.3.1 Padronização de Infecção por <i>P. brasiliensis</i> em camundongos SWISS.....	32
4.3.2 Imunossupressão dos animais.....	33
4.3.3 Infecção experimental.....	33

4.3.4 Tratamento experimental inalatório e tratamento via oral.....	34
4.3.5 Eutanásia e histopatologia.....	34
4.3.6 Análise estatística.....	35
5 RESULTADOS.....	36
5.1 Síntese e caracterização da nanopartícula.....	36
5.1.1 Medidas de turbidez.....	36
5.1.2 Microscopia optica.....	37
5.2 Ensaios <i>in vitro</i>.....	38
5.2.1 Concentração Inibitória Mínima.....	38
5.2.2 Concentração Fungicida Mínima.....	40
5.3 Ensaios <i>in vivo</i>.....	41
5.3.1 Manuseio dos animais.....	41
5.3.2 Tratamentos inalatório e via oral.....	42
5.3.3 Avaliação macroscópica.....	43
5.3.4 Avaliação microscópica.....	45
6 DISCUSSÃO.....	48
7 CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

A Paracoccidioidomicose é uma micose sistêmica restrita à América do Sul, a mais frequentemente diagnosticada, sendo que a região norte do Estado do Tocantins é reconhecidamente uma área endêmica. Esta micose acomete principalmente trabalhadores rurais ou aqueles que permaneceram por um tempo prolongado em contato com atividades agrícolas. Entre os anos de 2016 e 2018, foram identificados 37 pacientes diagnosticados e tratados no Hospital de Doenças Tropicais da Universidade Federal do Tocantins – HDT-UFT com paracoccidioidomicose (SANTOS Jr. et al. 2019).

O pulmão é o órgão mais acometido pela doença e apresenta lesões de natureza granulomatosa, podendo disseminar-se por via linfo-hematogênica para tecidos e órgãos adjacentes (MOREIRA, 2008). Em indivíduos com resposta imunológica satisfatória, o desenvolvimento da infecção é contido, havendo resolução do processo. O fungo permanece nesses locais em meio à fibrose em estado latente, porém viável. Após um período prolongado de tempo, a infecção pode progredir e dar origem às formas crônicas (reativação endógena) (WANKE, 2009).

A associação da Paracoccidioidomicose com outras doenças, principalmente respiratórias como tuberculose e neoplasias pulmonares, é bem descrita (DEL NEGRO, 1982). Também chama a atenção o aumento do número de casos relacionados com a síndrome da imunodeficiência humana adquirida, trazendo novos desafios terapêuticos (PEDRO et al, 1989).

O tratamento consiste no uso prolongado de antifúngicos por via oral ou endovenosa (SHIKANAI-YASUDA et al., 2018) com eficácia comprovada, entretanto casos de recidiva ou resistência aos fármacos utilizados não são infrequentes. O uso crônico de agentes antifúngicos por essas vias traz efeitos colaterais principalmente no trato gastrointestinal, além de alterações na função renal. Porém, em pacientes graves em ventilação pulmonar invasiva, a administração inalatória de antibióticos torna-se uma via comprovadamente eficaz para a redução de resistência bacteriana (PALMER et al., 2014).

A utilização dos agentes antifúngicos seguiu-se paralelamente a descoberta e evolução das substâncias antibacterianas. No entanto, para o controle das diversas infecções pulmonares causadas por fungos, existe um reduzido número de drogas utilizáveis na prática

clínica. As sulfonamidas abriram, por volta de 1940, a terapia dos pacientes com micoses sistêmicas (MARTINEZ, 2006).

Os antibióticos inalatórios têm sido usados para tratar infecções crônicas das vias aéreas desde a década de 1940. A primeira experiência com antibióticos inalatórios envolveu antibióticos em aerossol projetados para administração parenteral. Estas formulações causaram irritação brônquica significativa devido a conservantes e a outros componentes não-ativos presentes na formulação. Um grande avanço terapêutico ocorreu em 1997, quando a tobramicina desenhada para inalação foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos da América para uso em pacientes com fibrose cística e infecção crônica por *Pseudomonas aeruginosa* (QUON et al., 2014).

A busca por novas vias de administração pode contribuir com a melhora na farmacocinética das drogas tradicionalmente utilizadas, visando uma maior eficácia terapêutica, com menos efeitos colaterais (YANG et al, 2010). A eficácia na prevenção da aspergilose pulmonar, através da nebulização de nanopartículas de itraconazol em um modelo murino, foi demonstrada por HOEBEN et al. (2006).

Ainda existem diversas questões que precisam ser respondidas sobre a possibilidade de utilização do itraconazol por via inalatória, que vão desde o desenvolvimento da formulação até a forma adequada de administração. Assim, estudos nesta área de pesquisa podem contribuir para responder algumas destas perguntas e avaliar a possibilidade de utilização deste fármaco por via inalatória

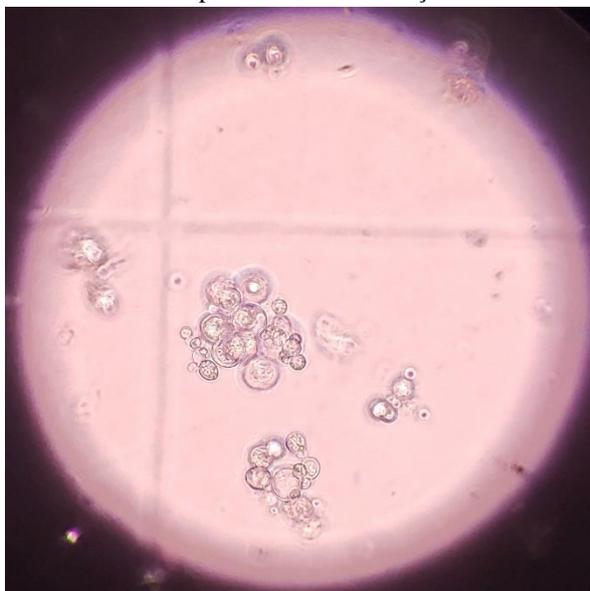
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Paracoccidioidomicose

O *Paracoccidioides brasiliensis* é o principal agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica humana endêmica na América Latina e uma das mais prevalentes do continente. A PCM pode ir de uma doença aguda/subaguda até uma doença crônica progressiva. O Brasil concentra mais de 80% de todos os casos relatados, seguido por Venezuela, Colômbia, Equador, Bolívia e Argentina (VERONESI et al., 2005).

Esse fungo compreende um complexo de pelo menos quatro espécies crípticas, ou seja, um grupo de espécies que satisfazem a definição biológica de espécie, isto é, são isoladas reprodutivamente entre si, mas são morfologicamente idênticas. Os indivíduos das espécies dentro do complexo somente podem ser separados quando se utiliza dados que não provenham da morfologia, como da análise da sequência de DNA, bioacústica ou estudos sobre o seu ciclo de vida: PS1 (presente no Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, bem como na Argentina), PS2 (encontrado no Sudeste do Brasil e Venezuela), PS3 (restrito à Colômbia), e PS4 (apenas encontrado na Venezuela). São termodimórficos, crescendo como leveduras, tanto em culturas a 37 °C quanto em tecidos infectados, e como micélio a temperaturas de 20-25 °C, considerado como sua morfologia ambiental (TEIXEIRA et al., 2014) (Figura 1).

Figura 01: Morfologia do *P. brasiliensis* a 35 ° C após 7 dias de incubação. Lâmina a fresco, arquivo pessoal.



Apesar de ser uma micose sistêmica que sabidamente acomete pacientes imunocompetentes, o perfil geral do paciente acometido é o homem, trabalhador rural,

frequentemente tabagista, etilista e com sinais de baixa qualidade alimentar (VERONESI et al. 2005).

2.1.1 Modelo experimental da paracoccidiomicose

A infecção experimental com *Paracoccidioides brasiliensis* em animais de laboratórios é realizada com maior frequência em camundongos, ratos wistar (LOTH et al, 2014; IOVANNITTI et al, 1999) e também em hamsters (SVIDZINSKI et al, 1999) e no roedor *Calomys callosus* (FORTES et al, 2009). Dentre as linhagens de camundongos utilizadas estão a C57BL/6 (TRISTÃO et al, 2013; DA SILVA et al, 2013), a BALB/C (SILVA MF. et al, 1995; DA COSTA et al, 2016), a Swiss (MANSANO et al, 2014; SARGI et al, 2013), a B10, A/SN e A/J (KASHINO et al, 1990; NISHIKAKU et al, 2009; PINZAN et al, 2010) e as linhagens *Knock-Out* FOXP3^{GFP} e imunodeficiente RAG 1^{-/-} (BAZAN et al 2015).

A PCM é adquirida naturalmente por inalação de conídios (uma forma de esporos) (FRANCO, 1989). Entretanto em experimentos laboratoriais o isolamento das conídias, além de ter um risco maior de infecção acidental para o pesquisador, é um procedimento mais difícil de ser realizado. Por esse motivo utiliza-se mais frequentemente a fase leveduriforme na infecção experimental dos animais de laboratório (SALDANHA et al., 2016; BAZAN et al, 2015; DA SILVA et al., 2013; MARQUES A.F. et al., 2008).

Existem diversas formas de inoculação do fungo nos animais, produzindo desde doenças localizadas nos pulmões, articulações e derme, até doenças sistêmicas, com comprometimento de vários órgãos (IOVANNITTI et al, 1999). Quando a finalidade é testar o tratamento por via inalatória, é preciso inocular o fungo pela via respiratória, minimizando a possibilidade de doença sistêmica e permitindo um tratamento mais eficaz. A infecção por via respiratória pode ser realizada de 3 formas: Via nasal, traqueal translaríngea ou por via traqueal cirúrgica (MARQUES A.F. et al., 2008).

2.1.2 Caracterização macroscópica e microscópica da lesão causada por *Paracoccidioides* spp.

Por ser uma micose sistêmica com capacidade de acometer diferentes órgãos, a paracoccidioidomicose apresenta variações na sua forma de apresentação. Padrões específicos de regulação da imunidade mediada por linfócitos T têm sido associados às diferentes apresentações clínicas do espectro da doença. (BERNARD, 2008). A maioria dos indivíduos

de área endêmica infectados por *Paracoccidioides spp* não desenvolve a doença clínica, exibindo um padrão tipo T-helper [Th] tipo 1 da resposta imune, caracterizado pela síntese de citocinas que ativam macrófagos e linfócitos TCD4 e TCD8, resultando na formação de granulomas compactos e controle da replicação do fungo (BERNARD et al, 2001). Os granulomas geralmente são múltiplos, podem conter o fungo no seu interior, identificado pela membrana birrefringente. Os fungos também podem ser encontrados no interior de células gigantes (LOTH et al., 2015). Os granulomas podem estar circundados por um halo linfomononuclear de extensão variável (IOVANNITTI et al., 1999). Nos pulmões dos indivíduos doentes ou com sequelas provocadas pela doença, as alterações mais frequentes encontradas são distorção arquitetural (90%), espessamento septal e reticulado (88%), enfisema centrolobular ou parasseptal (82%), espessamento brônquico (82%), bandas parenquimatosas (74%), áreas de enfisema cicatricial (66%), nódulos (62%) e cistos pulmonares (10%) (COSTA et al, 2013).

2.1.3 Tratamento da paracoccidioidomicose

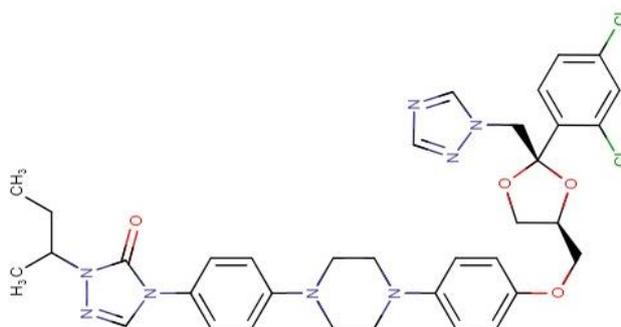
O tratamento da paracoccidioidomicose é farmacológico e os fármacos mais comumente administrados são o itraconazol e o sulfametoxazol+trimetoprima. Pacientes graves devem ser tratados no hospital com anfotericina B 1 mg/kg/dia intravenosa até melhora clínica suficiente para seguir o tratamento com comprimidos. A duração do tratamento depende da gravidade da doença (6 meses na forma leve, 12 na forma moderada e 24 na forma grave) (MARQUES, 2013).

Os efeitos colaterais mais comuns com o uso do itraconazol, apesar de não serem frequentes, são a intolerância gástrica e a hepatopatia associada. O monitoramento da função hepática é recomendado durante o tratamento e a medicação deve ser substituída caso se detecte elevação da atividade sérica das enzimas hepáticas em um valor maior que 3 vezes o basal (SHIKANAI-YASUDA, 2015).

2.2 Itraconazol

O itraconazol (figura 2) é um derivado do imidazol usado principalmente como antifúngico. Sua estrutura química é derivada do triazol, assim como o fluconazol, o cetoconazol e o voriconazol. É indicado no tratamento de infecções fúngicas dos olhos, boca, unhas, pele e órgãos internos como os pulmões (KELLER, 2011).

Figura 02: Estrutura química do itraconazol. Retirado de www.drugbank.ca



Assim como outros derivados do imidazol, o itraconazol altera a permeabilidade da membrana da célula fúngica. Mais especificamente inibe a síntese de ergosterol, interagindo com a 14- α -desmetilase, uma enzima do citocromo P450, que é necessária para a conversão do lanosterol para o ergosterol (KELLER, 2011). É um fármaco largamente utilizado em pesquisa experimental com ratos e camundongos, com sua farmacodinâmica bem descrita para esses animais (SHIN et al., 2004).

Nanopartículas de itraconazol já foram utilizadas por via inalatória de forma experimental para a avaliação da absorção e da farmacocinética logo após a administração, sem o intuito de testar a eficácia do tratamento (KARASHIMA et al., 2017; HASSANPOUR et al., 2016). Artigos científicos utilizando o itraconazol nebulizado para o tratamento de micoses pulmonares são raros na literatura. Um destes trabalhos avaliou, por exemplo o tratamento da aspergilose em falcões (PARDEIKE et al., 2016), dois fizeram esta avaliação para a mesma infecção fúngica em codornas (WLAŻ et al., 2015; RUNDFELDT et al., 2013) e outros dois que utilizaram um modelo murino de aspergilose pulmonar (HOEBEN et al., 2006; RUNDFELDT et al., 2013).

Com um valor de pKa (cologaritmo da constante de acidez) de 3,7 e uma solubilidade aquosa de 1 ng/mL, o itraconazol apresenta propriedades físico-químicas típicas de uma base fraca pouco solúvel. Bases fracas são caracterizadas por uma solubilidade altamente dependente do pH, então uma redução no valor do pH da solução para valores abaixo do pKa leva a um aumento na sua solubilidade. Por outro lado, ao aumentar os valores de pH a solubilidade diminui. Uma vez que esses compostos apresentam fraca solubilidade aquosa, mas uma boa permeabilidade através das membranas fisiológicas, a biodisponibilidade incompleta do itraconazol deve-se em parte à sua baixa dissolução no trato gastrointestinal

humano e também possivelmente à sua precipitação no intestino delgado. Assim, formulações que melhoram a solubilidade e evitem a precipitação do itraconazol no intestino delgado resultam provavelmente em um aumento da biodisponibilidade do composto (BUCHANAN et al., 2007; VAN SPEYBROECK et al., 2010).

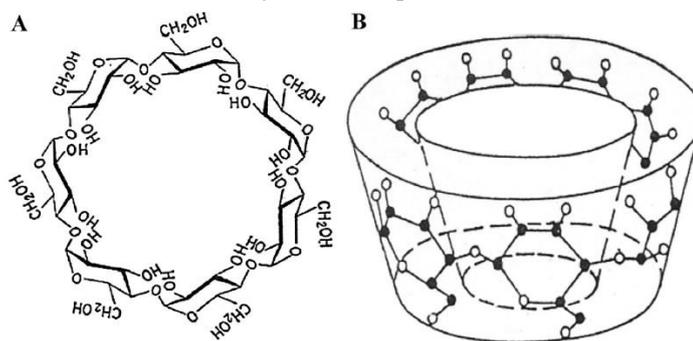
Com o objetivo de aumentar a biodisponibilidade do itraconazol para o tratamento das infecções fúngicas em humanos, a indústria farmacêutica desenvolveu uma solução oral de itraconazol/ciclodextrina que já é comercializada em outros países. Por motivos não esclarecidos, essa medicação ainda não foi aprovada para uso no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (FRANÇOIS et al., 1995).

2.3 Ciclodextrinas

As ciclodextrinas (Figura 3) são oligossacarídeos cíclicos, dotados de uma superfície externa hidrofílica e uma cavidade interna, capaz de formar complexos de inclusão com uma grande variedade de moléculas hospedeiras, afetando positivamente suas propriedades físico-químicas. Em particular, no campo farmacêutico, a complexação de ciclodextrina é utilizada principalmente para aumentar a solubilidade aquosa e a taxa de dissolução de fármacos pouco solúveis, bem como para melhorar sua biodisponibilidade e estabilidade (MURA, 2014).

Figura 03: A – Estrutura química da β -Ciclodextrina. B – Representação da estrutura geométrica em 3D. A superfície exterior do cone é hidrofílica e a cavidade interior é hidrofóbica.

FONTES: Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: a review. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 101, p. 238-250, 2014.



A biodisponibilidade oral das ciclodextrinas é muito baixa em animais e humanos (0,1-3%), exceto para a beta-ciclodextrina randomicamente metilada (RM- β CD), que tem uma biodisponibilidade de 12% em ratos. Por causa de sua natureza volumosa e hidrofílica, apenas quantidades insignificantes de ciclodextrinas são absorvidas pelo trato gastrointestinal por difusão passiva (EMA/CHMP, 2014).

Ciclodextrinas em altas doses podem aumentar a permeabilidade do fármaco por ação direta nas membranas mucosas, contribuindo assim para um aumento da absorção e/ou biodisponibilidade do fármaco. Estes efeitos são possivelmente causados pela solubilização de lipídios das membranas celulares. No entanto, ao contrário dos surfactantes, as ciclodextrinas solubilizam componentes da membrana, mas não se inserem nestas estruturas, daí os efeitos deletérios das ciclodextrinas serem leves e reversíveis. As ciclodextrinas são pouco absorvidas através das membranas mucosas, mas nas concentrações mais altas, necessárias para alcançar uma elevação substancial na permeação de drogas, as ciclodextrinas podem facilitar também a sua própria absorção (EMA/CHMP, 2014).

Como exemplo de um efeito desejável, a administração nasal de complexos de ciclodextrinas/hormônios esteróides altamente solúveis em água provoca um aumento rápido dos níveis da droga na circulação sistêmica, evitando o metabolismo intestinal e hepático de primeira passagem. Os efeitos das ciclodextrinas nas membranas epiteliais nasais parecem ser de menor importância para o aumento da absorção, porque as ciclodextrinas perdem suas habilidades de interagir com as membranas quando seus sítios de ligação estão ocupados com os esteróides (EMA/CHMP, 2014).

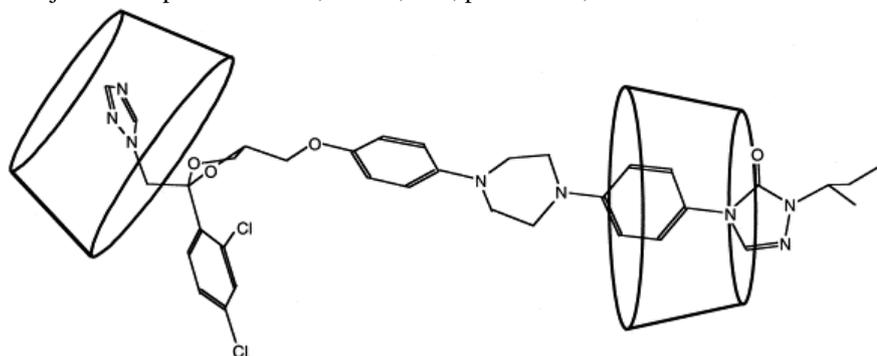
Ciclodextrinas melhoram a liberação pulmonar de drogas, mas também são absorvidas. Quando beta-ciclodextrinas (β CD), RM- β CD ou hidroxipropil-beta-ciclodextrinas (HP- β CD) foram administradas por via intratraqueal em coelhos, a biodisponibilidade das ciclodextrinas foi de 66%, 74% e 80%, respectivamente (EMA/CHMP, 2014).

Com uma exposição de 5 min a soluções de CD na mucosa nasal de ratos, nenhum dano tecidual foi visível para uma solução de 20% de HP β CD. As exposições de 30 ou 60 min a 10% de HP β CD não resultaram em nenhum dano óbvio na mucosa. Estes resultados sugerem que soluções de até 20% de ciclodextrinas não induzem dano tecidual da mucosa nasal (EMA/CHMP, 2014).

Uma excelente tolerância da HP β CD pela mucosa nasal foi demonstrada em estudos de irritação com coelhos, que não apresentaram qualquer efeito tóxico local ou sistêmico pela administração nasal por 3 meses de uma solução com 10% de HP β CD (EMA/CHMP, 2014).

No modelo teórico de complexação com o itraconazol para a formação de nanopartículas, a ciclodextrina se liga as duas extremidades da molécula (figura 4). (MIYAKE et al, 1999).

Figura 04: Complexação itraconazol/beta-ciclodextrina. Fonte: Miyake, K. et al. Characterization of itraconazole/2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex in aqueous propylene glycol solution. International journal of pharmaceutics, v. 179, n. 2, p. 237-245, 1999.



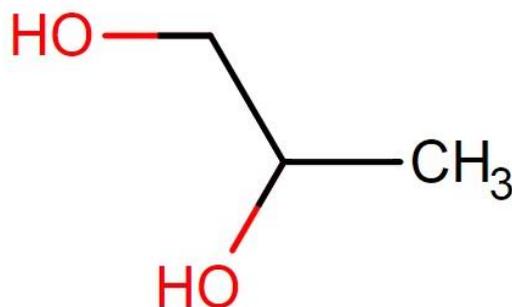
Formulações para nebulização de itraconazol/ciclodextrina já foram utilizadas em outros estudos com camundongos, com avaliação da farmacocinética e demonstração da maior absorção pela mucosa pulmonar em comparação com outras formulações de itraconazol nebulizado (YANG et al., 2010).

A viscosidade da solução contendo ciclodextrina é uma barreira para administração pelos nebulizadores de membrana. Para nebulizar completamente a formulação dentro de uma duração razoável, é necessário encontrar uma concentração ideal de ciclodextrina. A viscosidade das soluções de HP β CD é uma função não linear da concentração de ciclodextrina. Em um estudo, por exemplo, foram necessários 30 min para nebulizar 5 mL a 20% e 17 minutos para 15% (concentração massa/volume). As viscosidades medidas dessas soluções foram de 1,40 e 1,19 cP, respectivamente (MIYAKE et al, 1999; YANG et al., 2010).

2.4 Propilenoglicol

O propilenoglicol é um dos solventes e transportadores mais comumente utilizados na indústria e no comércio de substâncias químicas para humanos. Uma longa história de uso em humanos e um extenso banco de dados sobre a suas características toxicológicas e epidemiológicas apoiaram sua aceitação regulamentar para uma ampla gama de usos (FOWLES et al., 2013) (Figura 5).

Figura 05: Estrutura química do propilenoglicol. Fonte: www.drugbank.ca



O propilenoglicol é um líquido incolor e inodoro que tem uma enorme gama de utilizações. Destaca-se entre os seus diversos usos a sua aplicação como um aditivo alimentar. Usado como um solvente para corantes, emulsionantes e antioxidantes até um máximo de 1 grama por quilograma de alimento final. Também é aprovado para uso como veículo em formulações de uso tópico, oral e algumas preparações farmacêuticas intravenosas (FOWLES et al., 2013).

Como resultado das diversas aplicações, a exposição humana ao propilenoglicol ocorre através de múltiplas vias e, portanto, espera-se que seja significativa. A média diária de ingestão do propilenoglicol nos EUA, com base na ocorrência em alimentos, é estimada em 34 mg/kg de massa corpórea para uma pessoa de 70 kg. Não há estimativas para a exposição ao propilenoglicol pelas vias dérmica ou inalatória. Entretanto, com o advento dos cigarros eletrônicos, que usam predominantemente o propilenoglicol como molécula carreadora da nicotina, a exposição inalada pode tornar-se mais importante nos consumidores que fumam cigarros eletrônicos (FOWLES et al., 2013).

Os dados sobre a farmacocinética do propilenoglicol em humanos são limitados, e aqueles que existem geralmente se alinham com observações de dados de animais. Um estudo em humanos neonatos relatou uma meia-vida de eliminação de 6-12 horas (Kulo et al., 2012).

Estudos de farmacocinética em ratos mostraram que a absorção de propilenoglicol após exposição à inalação pulmonar ocorre rapidamente e o equilíbrio entre o tecido pulmonar e o plasma é alcançado rapidamente. A inalação diária de aerossóis contendo propilenoglicol permitiu atingir concentrações na circulação sistêmica semelhantes às obtidas por meio da administração por via oral (FOWLES et al., 2013).

Uma série de estudos laboratoriais foi realizada durante os últimos 75 anos para examinar a toxicidade aguda do propilenoglicol, predominantemente através da via oral.

Estudos por inalação são em menor número, mas também indicam uma toxicidade aguda muito baixa (MONTHARU et al., 2010).

2.5 Nebulizadores e câmaras de nebulização

O desenvolvimento de uma terapia inalatória que seja eficaz e segura depende não somente de uma molécula farmacologicamente ativa, mas também de um sistema de entrega bem projetado para a formulação. Todo o sistema (droga, formulação e dispositivo) precisa estar integrado para que a terapia inalatória seja bem-sucedida. Combinações droga-dispositivo devem aerosolizar a droga com o tamanho apropriado da partícula para garantir a deposição ideal nos pulmões (LABIRIS et al, 2003).

O pulmão vem servindo como rota de administração de drogas por milhares de anos. A origem das terapias inalatórias remonta a 4 mil anos atrás na Índia, onde as pessoas fumavam as folhas da planta *Atropa belladonna* como antitussígeno. Já os dispositivos modernos de inalação podem ser divididos em três categorias: os nebulizadores, o inalador dosimetrado e o inalador de pó seco (LABIRIS et al, 2003).

Os nebulizadores são usados há muitos anos para tratar a asma e outras doenças respiratórias. Existem três tipos básicos de nebulizadores: A jato, ultra-sônicos e nebulizadores de membrana vibratória. O tipo mais comum é o nebulizador a jato, que gera aerossóis do meio líquido usando uma fonte de gás comprimido. Embora relativamente barato, tem um maior tempo de nebulização, os compressores de ar são volumosos e ruidosos, e medicamentos caros são desperdiçados em consideráveis volumes residuais. O nebulizador ultrasônico usa um cristal piezoelétrico vibrando em alta frequência (normalmente 1–3 MHz) para nebulizar o líquido e os nebulizadores de membrana vibratória são mais recentes, menores e mais silenciosos. Possuem um volume residual de medicação desprezível e produzem uma névoa uniforme e de baixa velocidade, aumentando a deposição pulmonar (ZHOU et al, 2014)

As propriedades físicas das formulações podem ter um efeito nas taxas de nebulização e tamanho das partículas nebulizadas. A viscosidade, força iônica, osmolaridade, pH e tensão superficial pode impedir a nebulização de algumas formulações. Se o pH é muito baixo, ou se a solução é hiper ou hiposmolar, o aerossol pode induzir broncoconstrição, tosse e irritação da mucosa pulmonar (LABIRIS et al, 2003).

Com relação as câmaras de nebulização para animais de laboratório, existem diversos modelos que podem ser divididos em dois grupos. As câmaras de nebulização com exposição exclusiva das narinas (figuras 6 e 8) e as câmaras de corpo inteiro (figura 7). Existem vantagens e desvantagens para o uso de cada uma delas. Nas câmaras de corpo inteiro os animais não precisam sofrer o estresse da restrição, são de forma geral de menor custo e de fácil manipulação, entretanto expõe todo o animal à medicação (DENKERS et al., 2010; MCCONVILLE et al., 2005).

Figura 06: Câmara de nebulização com exposição das narinas.

Fonte: Denkers et al. , 2010.

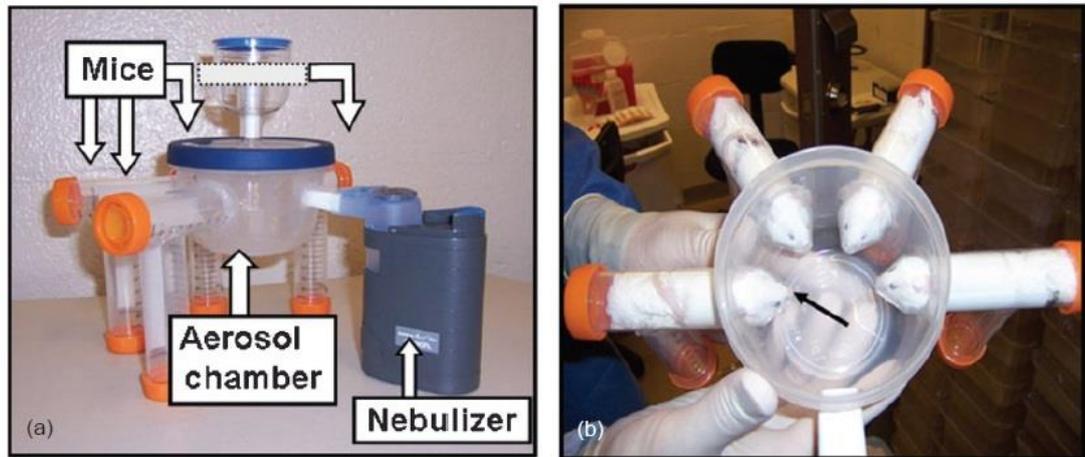


Figura 07: Câmara de nebulização de corpo inteiro.

Fonte: RIVKIN et al., 2017.

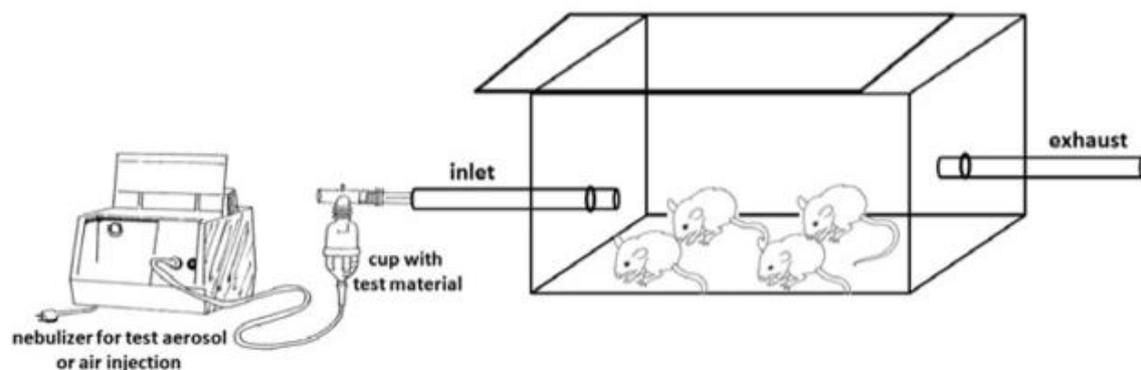


Figura 08: Câmara de nebulização para 8 camundongos. Arquivo pessoal



3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Formular e testar a eficácia do tratamento por nanopartículas com itraconazol em um modelo murino de *Paracoccidioides brasiliensis*.

3.2 Objetivos específicos:

- 1) Formular diferentes soluções com nanopartículas de itraconazol e 2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina para avaliar a solubilidade em água.
- 2) Definir a concentração inibitória mínima *in vitro* das formulações de itraconazol utilizando os fungos *Paracoccidioides brasiliensis* e uma cepa padrão de *Candida albicans* (controle).
- 3) Padronizar a forma de infecção por via inalatória dos camundongos utilizados no experimento com relação ao tempo de exposição ao fungo, concentração e meio do inóculo.
- 4) Padronizar a dose e o tempo de tratamento por via inalatória dos camundongos infectados.
- 5) Avaliar a eficácia do tratamento nos diferentes grupos através da histopatologia.

4 MATERIAIS E MÉTODOS:

4.1 Nanopartículas de itraconazol/2-hidroxi-propil-beta-ciclodextrina

4.1.1 Síntese de nanopartículas

Para a solubilização do itraconazol em água na forma de nanopartícula, inicialmente foram utilizados diferentes surfactantes não-iônicos tais como o poloxâmero 407, cremophor 40, polisorbato 80 e o ácido oleico em diferentes concentrações e combinações. Além disso, nanopartículas de itraconazol também foram produzidas na presença de β -CD e HP- β -CD em meio aquoso.

Soluções contendo diferentes concentrações de HP- β -CD (Sigma-Aldrich) (Solução 1: sem ciclodextrina, Solução 2: 6% m/v, Solução 3: 12% m/v e Solução 4: 24% m/v), foram preparadas com água destilada com um volume final de 10 mL. Dez miligramas de itraconazol foram dissolvidos em 100 μ l (1% do volume da solução final) de propilenoglicol (Sigma-Aldrich) e 36 μ l de ácido clorídrico (HCl) (Sigma-Aldrich) a 36,5% (3,6 μ l/ml da solução final). A seguir foi adicionado o itraconazol dissolvido em propilenoglicol (Sigma-Aldrich) acidificado por microgotejamento à solução de ciclodextrina aquosa e mantido sob agitação magnética (Velp científica ARE Heating Magnetic Stirrer) por 1 hora a temperatura ambiente (25 °C). Após esse período, adicionou-se NaOH (Cromoline) à solução sob agitação e, com o auxílio de um medidor de pH (Thermo Scientific Orion Star A211), corrigiu-se o pH para $7,0 \pm 0,1$. Após a correção do pH, as soluções foram mantidas sob refrigeração a 8 °C. (MIYAKE et al., 1999; PEETERS et al., 2002; HOLVOET et al., 2007; HOSTETLER et al., 1992).

4.1.2 Estudos de Solubilidade:

Com o auxílio de um turbidímetro (Instrutherm), foram realizadas medidas de turbidez das diferentes formulações (soluções formadas pelo complexo de ciclodextrina-itraconazol) em dois momentos: Antes e após centrifugação por 5 min a 3000 rpm, para efeito de comparação. Além disso, aliquotas de cada solução foram adicionadas a uma lâmina de vidro, coberta com lamínula e avaliadas em microscópio óptico para a observação da formação de agregados (PARDEIKE et al., 2011).

4.1.3 Formulação das nanopartículas de itraconazol/HP- β -CD para os estudos de concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima

Para os estudos de concentração inibitória mínima (CIM), foi sintetizado uma formulação específica com a concentração final de 3,2 mg/ml de itraconazol e na proporção de HP β CD de 24% m/v (80 vezes a quantidade de itraconazol – 2,56 g) seguindo-se as etapas descritas no item 4.1.1. (MIYAKE et al., 1999). Para a esterilização, a solução foi filtrada com o auxílio de uma seringa de 5 ml conectada ao filtro de membrana de polietersulfona hidrofílica 0.22 μ m (Pall Corporation), coletada em tubo de ensaio estéril com tampa e mantida sob refrigeração a 8 °C até a realização da análise microbiológica.

4.2 Ensaios Biológicos *in vitro*

4.2.1 Cultura e manutenção dos isolados fúngicos

Para a realização dos ensaios biológicos, haviam 7 diferentes isolados de *Paracoccidioides spp* à disposição dos pesquisadores, no Laboratório de Saúde Pública de Araguaína-TO. Desses, 3 isolados foram provenientes do Laboratório de Micologia da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP) campus Botucatu, gentilmente cedidos pelo prof. Eduardo Bagagli. Dentre esses 3 isolados, geneticamente identificados, um isolado clínico e um isolado de tatu de *Paracoccidioides brasiliensis* e um isolado clínico de *Paracoccidioides lutzi*. De acervo próprio do Laboratório de Saúde Pública de Araguaína-TO, 4 isolados clínicos locais de *Paracoccidioides spp*. também estavam à disposição dos pesquisadores. Para os testes de concentração inibitória mínima, também foi adquirida e utilizada a cepa padrão de *Candida albicans* sob a forma de discos liofilizados ATCC 10231 (Newprov).

Todos os isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzi* foram mantidos em meio Agar Sabourand acrescido de estrato de levedura (GPY – Kasvi), em incubadora bacteriológica tipo B.O.D. (Hydrosan) a 35°C sob a forma de levedura e repicados a cada 7 dias (PINTO et al., 2017; FERNANDES et al., 2017).

O inóculo de *C. Albicans* foram armazenados em caldo trípico de soja (TSB) (Kasvi) acrescido de glicerol (Sigma-Aldrich) como crioprotetor e mantidos em freezer -80°C (Ultra freezer -86°C Indrel IVLT 335D special) até sua utilização. Ambos no complexo de laboratórios do Centro de Ciências da Saúde da UFT.

4.2.2 Preparação e quantificação dos inóculos

Para a preparação do inoculo fúngico, selecionou-se uma cultura de *P. brasiliensis* que apresentava o maior crescimento *in vitro*, repicada semanalmente em meio GPY (Kasvi) e uma alíquota do meio contendo *C. Albicans* do freezer -80°C. Os fungos foram inoculados em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) e mantidos por 7 dias à 35°C, umidade de 45%, sob agitação à 60 rpm em uma incubadora shaker (Hydrosan Biosan) para a cultura de *P. brasiliensis* e 24 h sob as mesmas condições para a cultura de *Candida albicans*. Este último microrganismo foi incluído no teste de CIM por ser um fungo padrão, de fácil manuseio, permitindo uma outra forma de comparação entre o itraconazol padrão e o itraconazol/HP-β-CD.

A cultura mantida em RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) foi centrifugada por 5 minutos a 4000 rpm (Centribio). O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuscitado em PBS estéril (PBS-Mallincrodt e Carlo Erba). O procedimento foi repetido por 3 vezes. A suspensão resultante foi colocada em agitador vórtex durante 15 segundos e a densidade celular, ajustada com espectrofotômetro (PG Instruments T80+ UV/VIS), acrescentando-se PBS estéril suficiente para obter uma absorbância equivalente de uma solução-padrão no valor de 0,5 da escala de McFarland, em comprimento de onda de 625 nm. Esse procedimento fornece uma suspensão-padrão de levedura contendo de 1×10^6 a 5×10^6 células/mL.

Para avaliar a viabilidade do inóculo, 0,5 ml da solução padronizada foi adicionada de 0,5 ml de PBS estéril acrescida de verde janus 0,02%. Após 20 minutos a solução foi agitada e uma alíquota foi levada ao microscópio óptico utilizando-se um hemocitômetro (câmara de Neubauer). As células que permaneceram sem coloração foram consideradas viáveis. A viabilidade foi considerada satisfatória quando maior ou igual 80%.

A suspensão de trabalho para a *C. albicans* foi produzida utilizando-se uma diluição 1:50 seguida de uma diluição de 1:20 da suspensão-padrão com meio líquido RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), resultando em concentração de $5,0 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$ células/mL (NCCLS, 2002). A suspensão de trabalho para o *P. brasiliensis* foi produzida centrifugando-se o inóculo padrão e ressuscitando em meio líquido RPMI 1640 (TAKAHAGI-NAKAIRA et al., 2009).

4.2.3 Concentração inibitória mínima (CIM)

O meio utilizado para os testes de concentração inibitória mínima foi o RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) com glutamina e sem bicarbonato. Para a preparação desse meio utilizou-se 1 litro de água destilada e 10.4 g do meio em pó (Diluição padrão). Adicionou-se ao meio a

quantidade de 0,165 mol/L de ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico (MOPS) (JT Baker) para tamponamento da solução e correção do pH da solução para 7, com solução de NaOH (Cromoline) e o auxílio do medidor de pH. Para os testes com *Candida albicans*, adicionou-se resazurina 0,01% ao meio para revelação. A solução de RPMI tamponado com MOPS em pH 7 foi submetida à filtração por membrana de polietersulfona hidrofílica 0.22 μm (Pall Corporation) e armazenada sob refrigeração a 8 °C.

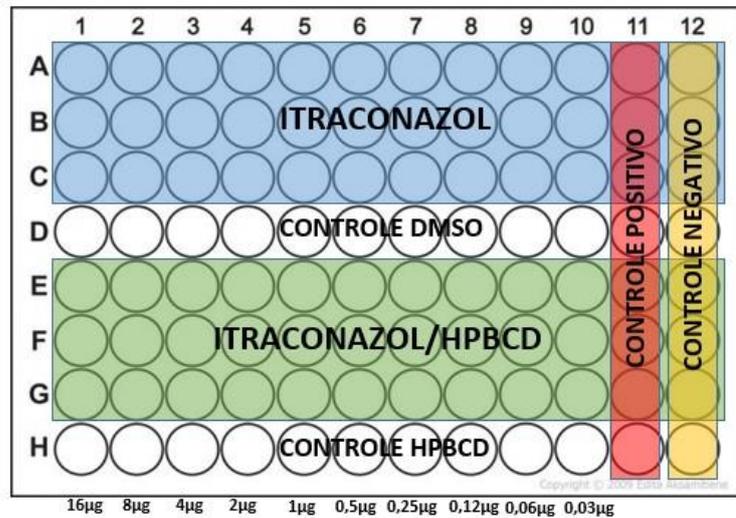
Para a preparação da solução de itraconazol a ser utilizada nas placas de microdiluição, foram utilizados itraconazol (Sigma-Aldrich) 98% diluído em dimetilsulfóxido 100% (DMSO) (Sigma-Aldrich) na proporção de 1,6 mg/ml (solução estoque). A solução de trabalho foi realizada utilizando uma alíquota da solução estoque e diluindo em meio RPMI 1640 até a concentração final de 32 $\mu\text{g/ml}$ (50x) para o itraconazol e 2% (50x) para o controle DMSO (NCCLS, 2002).

Para a diluição do itraconazol/HP β CD 3,2 mg/ml (solução estoque aquosa), foi realizada a diluição em meio RPMI 1640 até a concentração final de 32 $\mu\text{g/ml}$ (100x). A solução estoque do controle HP β CD contendo todos os outros componentes da formulação, com exceção do itraconazol, também foi submetida à diluição em meio RPMI 1640 na mesma proporção (100x).

Utilizou-se uma placa de 96 poços com fundo em U estéril manipulada na cabine de segurança biológica e com o bico de bunsen aceso. Pipetou-se 100 μl do meio RPMI 1640 nos poços da 2^a a 10^a coluna e 200 μl nos poços da 12^a coluna. Em seguida, nas fileiras de 1 a 3 pipetou-se 100 μl de solução padrão de itraconazol 32 $\mu\text{g/ml}$ nos poços da primeira coluna e segunda coluna. Na 4^a fileira pipetou-se 100 μl da solução controle de DMSO nos poços da 1^a e 2^a coluna. Nas fileiras de 5 a 7, pipetou-se 100 μl na primeira e segunda colunas da solução de nanopartículas Itraconazol/HP β CD. Na fileira 8 pipetou-se 100 μl da solução controle HP β CD nos 1^o e 2^o poços.

Em seguida, procedeu-se com a diluição sucessiva do 2^o ao 10^o poço com o uso de uma pipeta multicanais, aspirando 100 μl dos poços da coluna anterior e diluindo-se nos poços da coluna seguinte. O volume residual de 100 μl que conforme esperado, sobrou na pipeta ao final da diluição do 10^o poço, foi devidamente desprezado. Por último, adicionou-se 100 μl do inóculo padronizado e diluído no meio RPMI 1640 em todas as fileiras da 1^a a 11^a coluna da placa. Todo o procedimento foi realizado em duplicata (Figura 9).

Figura 9: Esquemática da diluição das formulações em placa de 96 poços. Itraconazol e Itraconazol/HP β CD em concentrações variando de 16 μ g (coluna 1) a 0,03 μ g (coluna 10). Inóculo de *C. albicans* na concentração de $5,0 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$ células por ml e inóculo de *P. brasiliensis* na concentração de 1×10^6 a 5×10^6 células por ml em diferentes placas.



Após a inoculação, a microplaca foi colocada na incubadora shaker (Hydrosan Biosan) e mantida a 35 °C, a 60 rpm por 48 h (para *Candida albicans*) e 10 dias (para *Paracoccidioides brasiliensis*). Após esse período foi realizada a leitura visual da placa. Para o *Paracoccidioides brasiliensis*, utilizou-se uma câmara de leitura adaptada conforme figura 10.

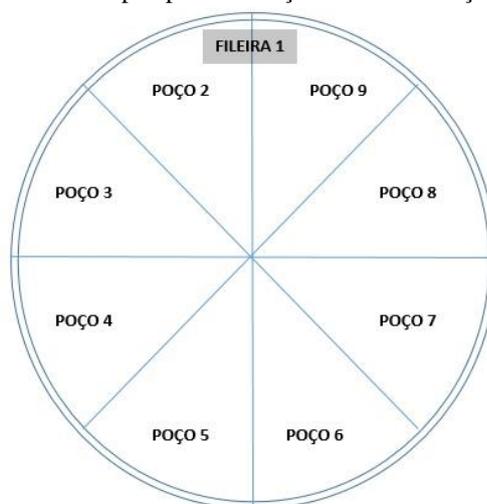
Figura 10: Leitura adaptada da placa de 96 poços com espelho em capela de biossegurança. Arquivo pessoal



4.2.4 Concentração fungicida mínima (CFM)

Após 48 h ou 10 dias (a depender a espécie do fungo), no momento da leitura, 1 alíquota de 10 microlitros de cada poço acima da concentração inibitória mínima foi inoculada em uma placa de petri com ágar sabourand (para a *Candida albicans*) e tubos de ensaio com o meio GPY (para o *Paracoccidioides brasiliensis*), para verificação da viabilidade ou não da colônia nas diferentes concentrações antifúngicas conforme esquema abaixo (Figura 11).

Figura 11: Placa de Petri dividida em 8 campos para avaliação de concentração fungicida mínima de *C. albicans*



Após 7 dias de inoculação na placa de petri, foi realizada a leitura da concentração fungicida mínima. Considerou-se concentração fungicida quando não houve nenhum crescimento de fungos (HAZEN, 1998; LI et al., 2000).

4.3 Ensaios biológicos *in vivo*

4.3.1 Manuseio dos animais

Todo o manuseio e procedimentos com os animais foram realizados de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, publicado pelo Instituto Nacional de Saúde, EUA, e foram submetidos à aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Tocantins. (CEUA – 23101.002945/2018-61)

Inicialmente foram realizados 4 estudos pilotos até a definição do modelo a ser utilizado. No primeiro piloto foram 9 camundongos divididos em 3 grupos. Cada grupo inoculado com uma das 3 cepas diferentes provenientes de Botucatu-SP. O inóculo foi

preparado em solução salina 0.9% e padronizado em 0,5 na escala de McFarland (1×10^6 a 5×10^6 células/mL). O segundo piloto foi realizado com 3 camundongos, utilizando a cepa clínica do *Paracoccidioides brasiliensis* em solução fosfato salina com uma concentração 10x maior (1×10^7 a 5×10^7 células/mL). Todas as inoculações foram realizadas por via traqueal.

Para o experimento definitivo foram utilizados 28 camundongos Swiss, de 8 - 12 semanas de vida, fêmeas, não castradas, provenientes do Laboratório de Patologia Experimental da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia (EMVZ-UFT) e peso aproximado de 35 g. Os animais foram acondicionados em 4 caixas grandes com 7 animais cada, com água e ração *ad libitum*, em temperatura controlada e mantidos no laboratório por 2 semanas para aclimação antes do início do experimento.

4.3.2 Imunossupressão dos animais

Com o objetivo de mimetizar as condições vividas por pacientes com paracoccidioidomicose atendidos no HDT de Araguaína-TO, os camundongos utilizados nesse experimento foram imunossuprimidos. Para a indução de imunossupressão nos animais foi utilizado dexametasona diluído na água do bebedouro na concentração de 8 mg/L acrescido de amoxicilina 1 g/L ofertado *ad libitum*, 1 semana antes da inoculação experimental e mantido até o final do experimento para todos os animais (ALEIXO et al., 2012; HU et al., 2017; MACHADO et al., 1985). Assumindo uma ingestão média de água de 5 ml por dia, a dose diária de fosfato de dexametasona calculada foi de 0,15 mg/kg (MARQUES et al., 2008; SILVA DE. et al., 2016).

4.3.3 Infecção experimental

Para a preparação do inóculo foi utilizado o fungo *P. brasiliensis*, isolado clínico de Botucatu-SP. O mesmo utilizado nos testes de CIM e concentração fungicida mínima (CFM) *in vitro*.

Após a padronização do inóculo para 0,5 na escala de McFarland, absorvância de 0,1 em 625 nm no espectrofotômetro, uma alíquota foi utilizada para o teste de viabilidade com verde janus a 0,01%. Considerou-se o inóculo como viável quando pelo menos 80% das células/agregados mantiveram-se sem coloração após 20 min da adição do corante. Procedeu-se a anestesia dos animais com Cetamina 120 mg/kg + Xilasina 8 mg/kg (SEABRA et al,

2018), laringoscopia direta e inoculação intratraqueal com 50 µl do inóculo (concentração de 1×10^6 a 5×10^6 células/ml) (DA SILVA et al., 2013). Os animais foram mantidos sob observação até a recuperação completa da anestesia. Após a inoculação, os animais foram randomicamente distribuídos em 3 grupos iguais (além do grupo controle não inoculado). O tratamento foi iniciado 48 h após a inoculação (PINA et al., 2004; ARISTIZABAL et al., 1998; GONZÁLEZ et al., 2008).

4.3.4 Tratamento experimental inalatório e tratamento por via oral

Os animais foram divididos em 4 grupos com 7 animais em cada grupo. Todos os animais foram mantidos sob as mesmas condições e imunossuprimidos conforme descrito.

No **grupo 1** os animais não foram inoculados nem tratados (controle negativo - CN). No **grupo 2** os animais foram inoculados com *P. brasiliensis* e tratados com a dose 1 mg/dia/animal por via oral no volume de 0.33 ml (3 mg/ml) através de gavagem (VO). No **grupo 3** os animais foram inoculados com *P. brasiliensis* e tratados com a dose 1 mg/dia/animal por via inalatória na câmara de nebulização de corpo inteiro, com solução 3 mg/ml (IN). No **grupo 4**, controle infectado, os animais foram inoculados com *P. brasiliensis*, porém não foram tratados (controle positivo - CP) (YANG et al., 2010; EVRARD et al., 2004).

4.3.5 Eutanasia e histopatologia

Após 7 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados com sobredose de cetamina e xilasina via intraperitoneal seguido de deslocamento cervical. Logo em seguida foi realizada a necropsia, retirando-se fragmentos de pulmões, fígado e baço. Os fragmentos foram acondicionados em formaldeído à 10% tamponado e processados seguindo as etapas de rotina como desidratação, diafanização, embebição por parafina e emblocamento. Em seguida foram cortados em micrótomo na espessura de 4 µm e corado pelo método de Hematoxilina e Eosina (H&E). Para evidenciar melhor o fungo, fez-se coloração especial com prata metenamina Grocott-Gomori (GMS). Foi atribuído escore para as lesões inflamatórias no pulmão dos camundongos, atribuindo-se valores de acordo com a intensidade das lesões: 0 para ausência de lesões, 1 para discreta, 2 para moderada e 3 para intensa.

4.3.6 Análise Estatística

Para análise dos dados de turbidez utilizou-se o teste paramétrico de Student - Newman-Keuls (SNK), com auxílio do software GraphPad Prisma 5.0 (GraphPad Prisma software, Inc 5.0, EUA). Para comparação dos dados de escore das lesões inflamatórias, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis com auxílio do software GraphPad Prisma 5.0 (GraphPad Prisma software, Inc 5.0, EUA).

5 RESULTADOS

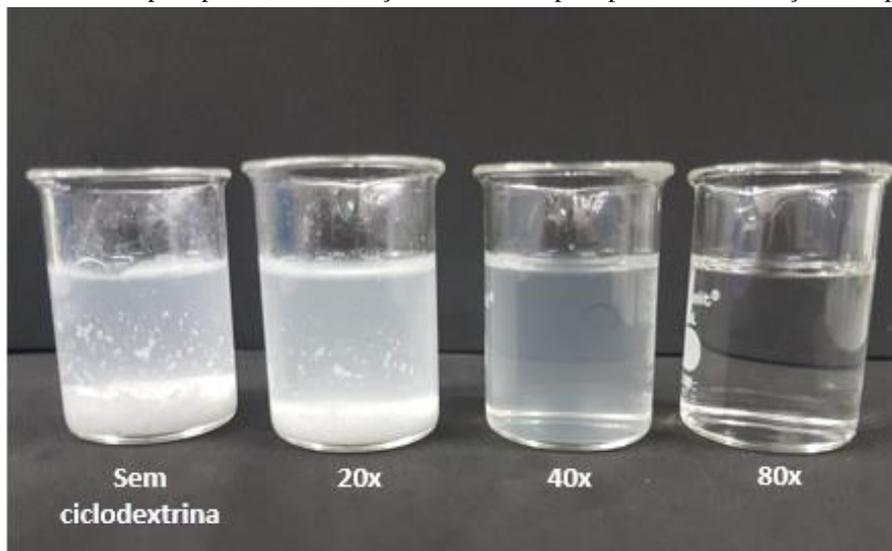
5.1 Síntese das nanopartículas

5.1.1 Medida de Turbidez

As tentativas iniciais de utilização de poloxâmero 407, cremophor 40, polisorbato 80 e ácido oleico em diferentes concentrações e combinações como surfactante não resultaram em soluções estáveis e foram descartadas. Em seguida foram utilizadas a β -CD e a HP β CD, sendo optado pela última por apresentar maior solubilidade em água (EMA/CHMP, 2014).

A síntese da formulação com nanopartículas de Itraconazol/HP β CD na proporção de 3 mg/ml e 24% m/v resultou em uma solução final transparente e homogênea, estável em temperatura ambiente (Figura 12). A pipetagem da solução de itraconazol sobre a ciclodextrina foi realizada lentamente e sob agitação. Da mesma forma para a correção do pH. A solução de NaOH foi acrescentada lentamente e sob agitação.

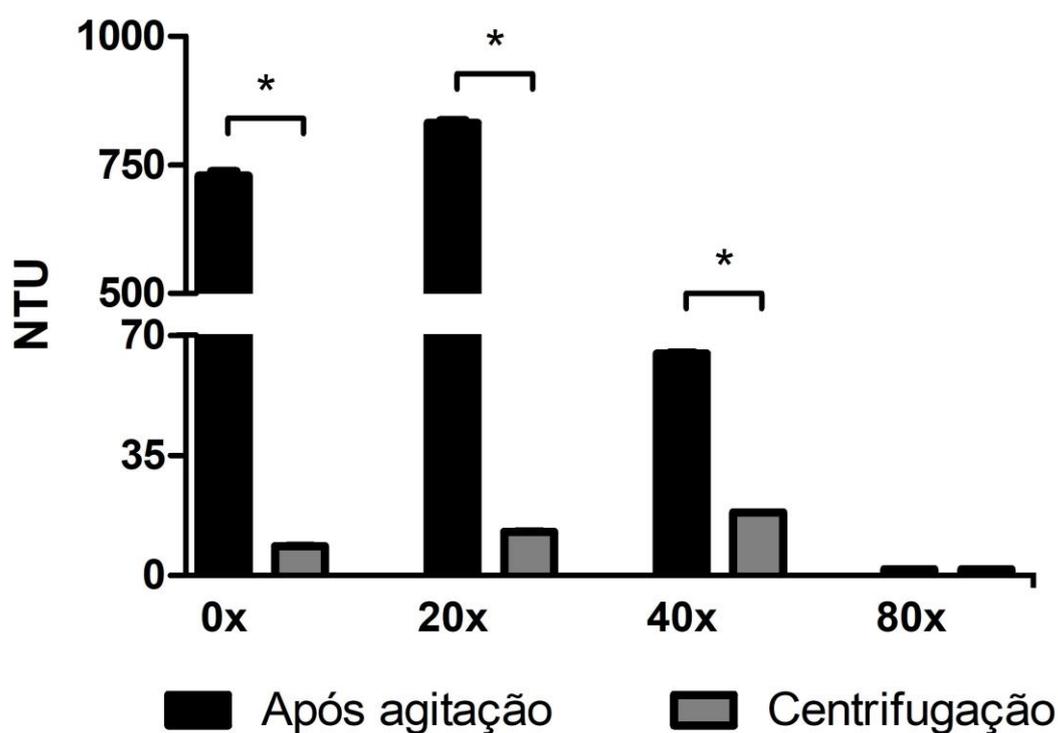
Figura 12: Aspecto das soluções após a síntese. Sem ciclodextrina: solução turva e com muito precipitado, 20x: solução turva e com menos precipitado, 40x: solução turva e sem precipitado, 80x: solução transparente.



Observou-se uma diferença significativa no aspecto visual das soluções em decorrência da adição da HP β CD. Como se pode observar na figura 13, a solução sem ciclodextrina apresentou uma coloração turva e com precipitado e a solução com ciclodextrina 80x permaneceu visualmente transparente, sugerindo alta solubilidade do itraconazol na solução.

As medidas de turbidez foram realizadas em duas condições diferentes para cada solução: antes e após centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos. Evidenciou-se que após a centrifugação, quanto maior a concentração de ciclodextrina, maior a turbidez da solução (até a solução 40x). Quando a ciclodextrina está concentrada 80x, não há diferença significativa de turbidez antes ou após centrifugação, permanecendo homogênea. (Figura 13)

Figura 13: Análise de turbidez das diferentes soluções após agitação e após centrifugação. Concentração de ciclodextrina variando de zero (Solução 1 - sem ciclodextrina) a 80 vezes (Solução 4 - 24% m/v) a concentração de itraconazol. Os dados são mensurados em unidades nefelométricas de turbidez (NTU). Os dados foram analisados pelo teste paramétrico de Student-Newman-Keuls (SNK). Diferenças estatísticas entre solução após agitação e após centrifugação são indicadas por asteriscos (* $p < 0,05$).



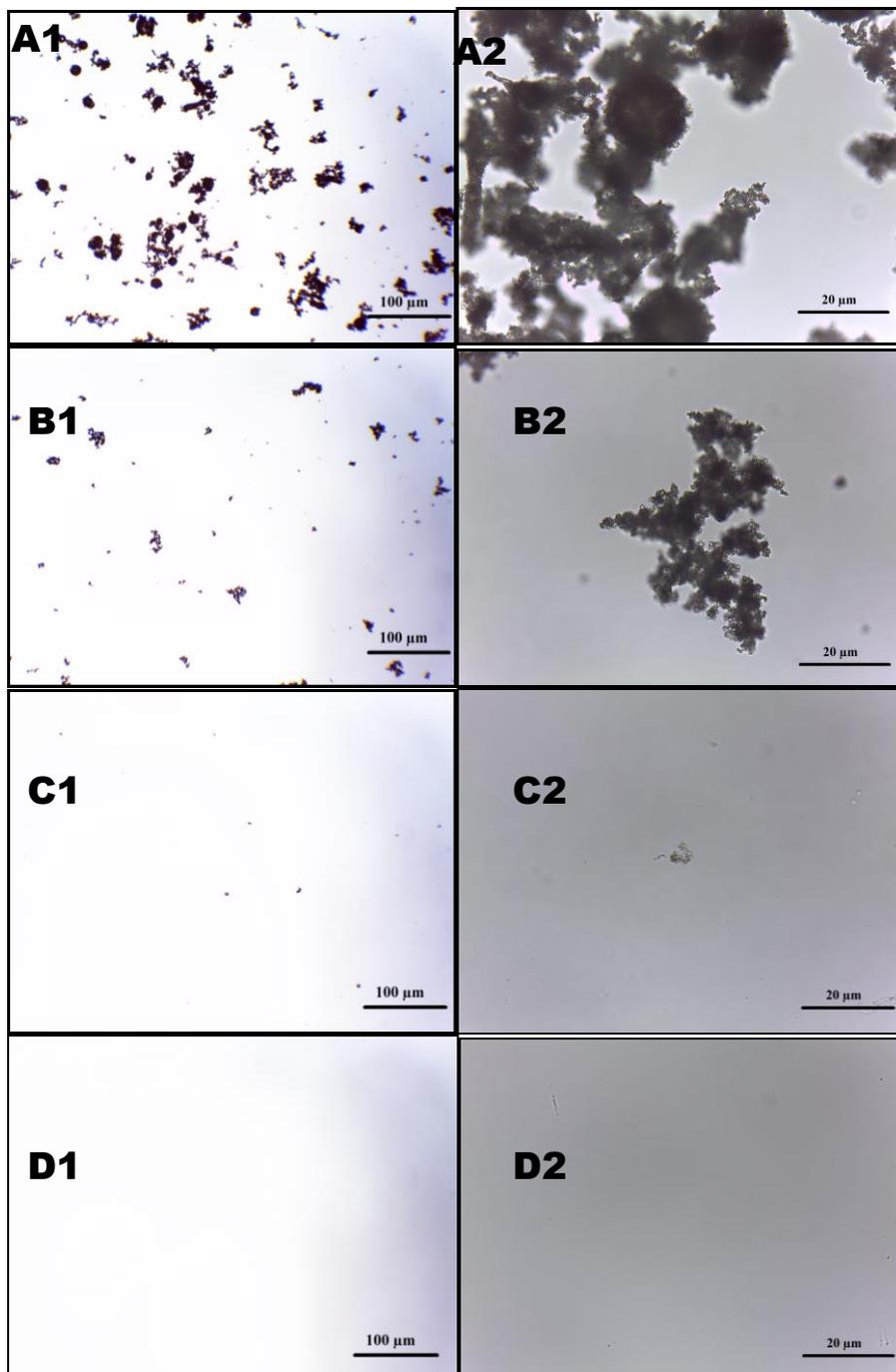
Percebe-se que, antes da centrifugação, a turbidez das soluções sem ciclodextrina e com ciclodextrina 20x são muito superiores à turbidez das soluções com ciclodextrina 40x e 80x.

5.1.2 Microscopia óptica

Na análise das lâminas com alíquotas de cada uma das 4 soluções através da microscopia óptica, percebe-se a formação intensa de agregados na solução sem ciclodextrina, que foram gradativamente diminuindo em quantidade até não serem mais percebidos na

solução ciclodextrina 80x. Em maior aumento, observa-se o aspecto dos agregados formados. (Figura 14)

Figura 14: Formação de agregados, microscopia óptica, solução sem coloração. Aumento de 4x. A1: sem ciclodextrina, B1: 20x, C1: 40x, D1: 80X. Aumento de 40x. A2: sem ciclodextrina, B2: 20x, C2: 40x, D2: 80X



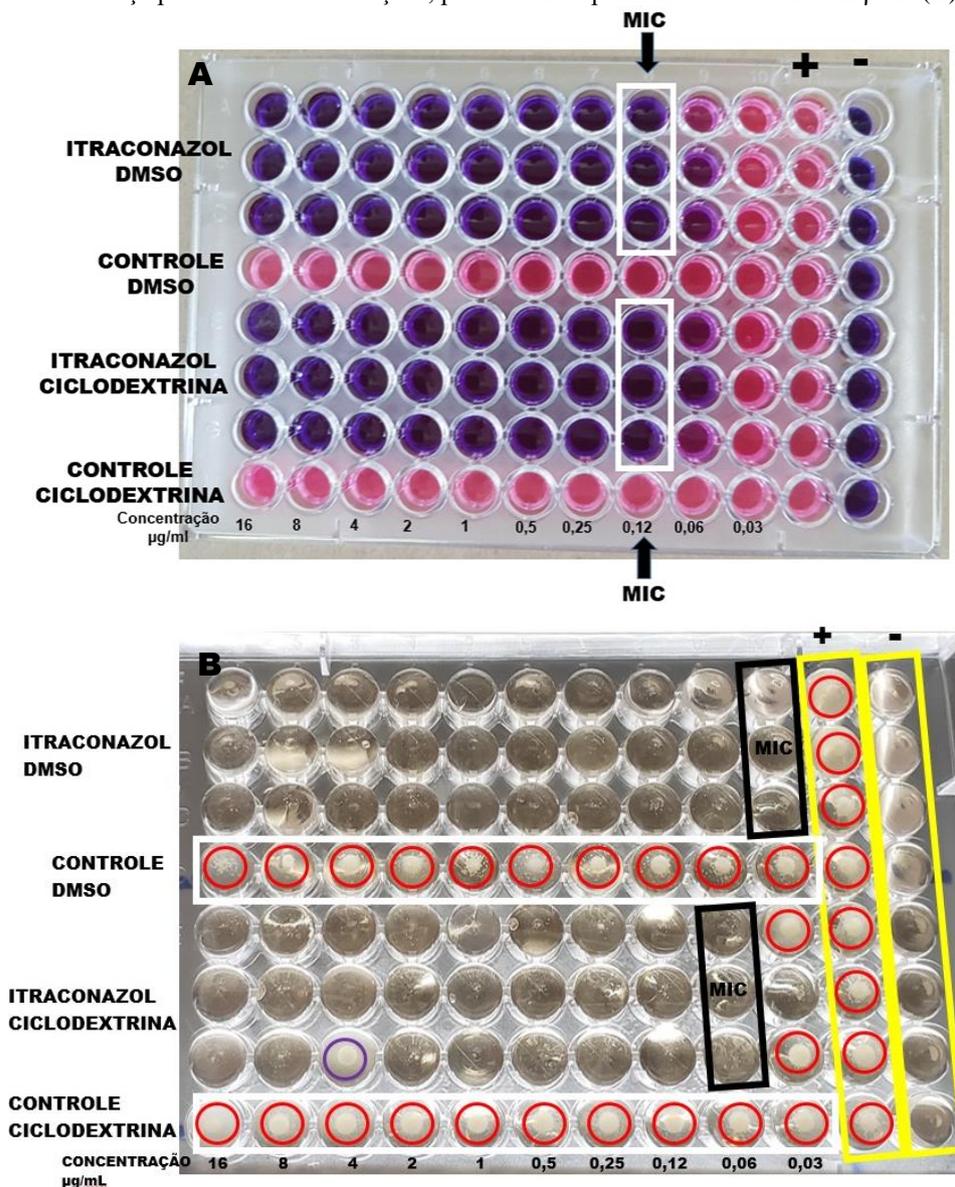
5.2 Ensaio *in vitro*

5.2.1 Concentração Inibitória Mínima

Para avaliar a concentração mínima de itraconazol capaz de inibir o crescimento de *C. albicans* e *P. brasiliensis*, realizou-se o teste de concentração inibitória mínima,

evidenciando-se que a CIM da solução itraconazol diluído em DMSO foi a mesma da solução itraconazol/HP β CD quando o fungo testado foi a *Candida albicans*. O valor encontrado foi de 0,125 μ g/ml (Tabela 1 e Figura 15A).

Figura 15: Resultado do teste de concentração inibitória mínima com *C. albicans* revelado com resazurina. Observa-se o mesmo valor para as duas formulações, padrão e nanopartículas itraconazol/HP β CD (A). Concentração inibitória mínima com *P. brasiliensis* evidenciando a precipitação do fungo no fundo do poço, com diferença para as duas formulações, padrão e nanopartículas itraconazol/HP β CD (B).



Na leitura realizada com a placa inoculada com o *Paracoccidioides brasiliensis* os resultados diferiram. A concentração inibitória mínima para o itraconazol/DMSO foi menor que 0,03 μ g/ml. Já para a solução itraconazol/HP β CD a concentração inibitória mínima foi de 0,06 μ g/ml (Tabela 1). Outra alteração nítida encontrada foi com relação aos controles dos

diluentes (Figura 16b15B), pois o fungo cresceu em maior intensidade no controle HP β CD em relação ao controle DMSO.

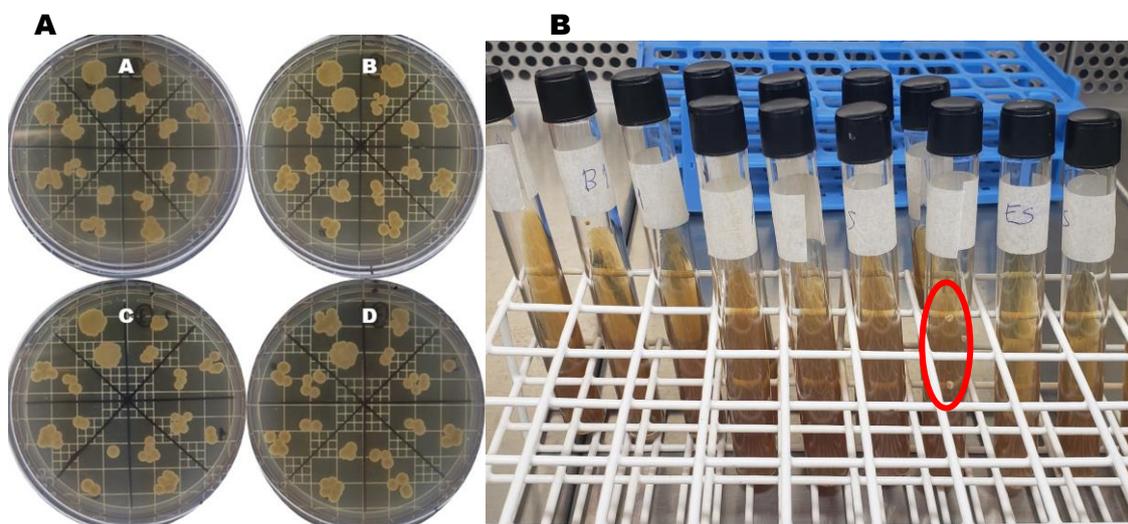
Tabela 1: Resultados do teste de Concentração Inibitória Mínima

Fungos	Antifúngicos testados	
	Nanopartícula de itraconazol	Itraconazol padrão
<i>Candida albicans</i>	0,125 μ g/ml	0,125 μ g/ml
<i>P. brasiliensis</i>	0,06 μ g/ml	0,03 μ g/ml

5.2.2 Concentração Fungicida Mínima

Após a incubação por 7 dias, procedeu-se a leitura das placas de petri na cabine de segurança biológica. Observou-se que as aliquotas de todos os poços inoculados na placa apresentaram crescimento de colônias de *Candida albicans*. Ou seja, a concentração fungicida mínima é maior que 16 μ g/ml para as duas soluções (figura 16A).

Figura 16: (A) Teste de concentração fungicida mínima: placas A e B, inoculação dos poços da primeira e segunda fileiras da microplaca (Solução padrão de itraconazol); placas C e D, inoculação dos poços da quinta e sexta fileiras da microplaca (Solução itraconazol/HP β CD) para *C. albicans*. (B) Concentração fungicida mínima utilizando tubos de ensaio com o meio GPY para o *P. brasiliensis*, não evidenciando nenhum crescimento em 8 μ g/ml e 16 μ g/ml.



Os tubos de ensaio inoculados com os poços de RPMI 1640 da placa contendo o fungo *P. brasiliensis* de forma geral não apresentaram crescimento, tanto na formulação padrão de itraconazol/DMSO como na solução de itraconazol/HP β CD. Houve dois pequenos pontos de crescimento em um tubo inoculado com a solução de um poço de 8 μ g/ml de

itraconazol/HP β CD. Entretanto a ausência de crescimento do fungo pode ser em decorrência da dificuldade de readaptação do fungo ao meio ágar GPY, visto que estava sendo cultivado em meio RPMI 1640 por 3 passagens sucessivas. Este experimento foi realizado em triplicata (Figura 16B) (Tabela 2).

Tabela 2: Resultados do teste de Concentração Fungicida Mínima

Fungos	Antifúngicos testados	
	Nanopartícula de itraconazol	Itraconazol padrão
<i>Candida albicans</i>	>16 μ g/ml	>16 μ g/ml
<i>P. brasiliensis</i>	<0,03 μ g/ml	<0,03 μ g/ml

5.3 Ensaios *in vivo*

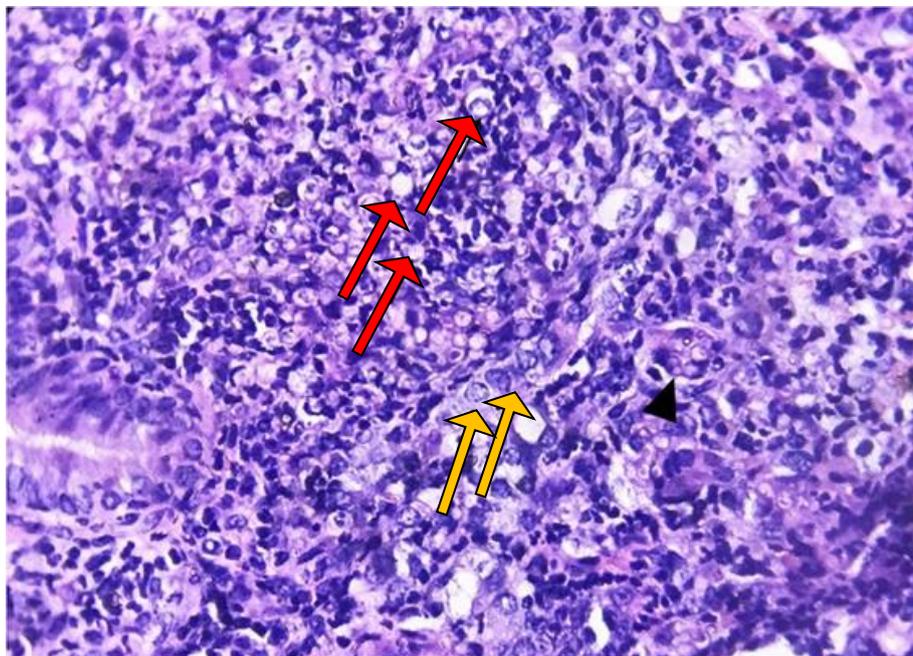
5.3.1 Padronização de infecção por *P. brasiliensis* em camundongos Swiss

Para que as condições experimentais se aproximassem da realidade vivida pelos pacientes atendidos no HDT em Araguaína, ou seja, a maioria dos pacientes atendidos com paracoccidiodomicose são pacientes imunocomprometidos, os camundongos utilizados foram imunossuprimidos com dexametasona 8mg/L através da água do bebedouro, porém todos os animais morreram. Na segunda tentativa, acrescentou-se amoxicilina 1 g/L à água do bebedouro contendo 8mg/L de dexametasona e todos os animais permaneceram vivos.

Os camundongos utilizados na primeira tentativa de infecção (9 camundongos, divididos em 3 grupos, inoculados com 1×10^6 a 5×10^6 células/ml de 3 cepas diferentes provenientes de botucatu) não desenvolveram a doença. Na segunda tentativa de infecção (3 camundongos inoculados com uma cepa clínica de *Paracoccidioides brasiliensis*, com uma concentração 10x maior de inóculo - 1×10^7 a 5×10^7 células/ml) os animais também não desenvolveram a doença. Na terceira tentativa de infecção, após 7 dias do início da imunossupressão, foi realizada a inoculação dos camundongos com a cepa clínica de *P. brasiliensis* proveniente de Botucatu-SP (concentração de 1×10^6 a 5×10^6 células/ml) e finalmente houve confirmação do desenvolvimento da doença por histopatologia do pulmão, com a eutanásia dos animais após 15 dias da inoculação.

Nos fragmentos de pulmão dos camundongos foi possível observar múltiplas lesões caracterizando uma pneumonia piogranulomatosa multifocal e moderada, associada ao *Paracoccidioides brasiliensis* (Figura 17), confirmando a infecção.

Figura 17 - Pulmão de camundongo experimentalmente infectado com *P. brasiliensis*. Setas grossas indicam macrófagos epitelióides, setas finas indicam imagem negativa de aspecto leveduriforme e a cabeça de seta indica brotamento múltiplo, caracterizando *P. brasiliensis*.



Não foram observados efeitos colaterais no comportamento dos animais após o início da imunossupressão, porém, durante a inoculação, houve a morte de alguns animais em decorrência do procedimento. Após o período de recuperação da sedação, os animais não apresentaram mudança de comportamento.

5.3.2 Tratamentos inalatório e via oral

Primeiramente havíamos desenvolvido uma câmara de nebulização com 8 portas, para restrição do animal e exposição somente das narinas, porém não foi possível utilizá-la devido incompatibilidade entre o tamanho dos animais e o tamanho dos tubos de restrição da câmara. Então, optou-se por uma câmara de nebulização de corpo inteiro que permitisse o tratamento simultâneo dos animais (Figura 18). Foi possível perceber que o ar contido no interior da câmara rapidamente tornava-se saturado e começava a sair pelo orifício de respiro, importante para diminuir a pressão no interior da câmara e permitir o funcionamento adequado do nebulizador.

O tratamento inalatório foi realizado em subgrupos de até 5 animais, devido ao tempo prolongado de nebulização da solução, em decorrência do aumento da viscosidade provocado pela ciclodextrina. O tempo médio de nebulização foi de 50 min para cada ml da solução. A

velocidade de nebulização da água/soro fisiológico no aparelho utilizado é de 0,25 ml/min, o que demonstra a grande diferença na solução utilizada.

A gavagem foi realizada sem nenhuma intercorrência, com fácil introdução do cateter e administração da solução.

Figura 18: Câmara de nebulização de corpo inteiro



5.3.3. Avaliação macroscópica

Após a confirmação da infecção no terceiro experimento, 21 camundongos foram inoculados com 50 μ l da cepa clínica Botucatu-SP de *P. brasiliensis* e em seguida 7 animais foram tratados com nanopartículas de itraconazol por via inalatória e 7 tratados com itraconazol por via oral (1mg/dia/animal, solução de 3mg/ml).

A diferença de intensidade das lesões foi possível de ser observada nitidamente na avaliação macroscópica do pulmão. Os camundongos não tratados apresentaram áreas esbranquiçadas, circulares, bem delimitadas, multifocais e que aprofundam ao corte, caracterizando granulomas nos pulmões (Figura 19B). Os camundongos tratados com itraconazol por via oral e com nanopartículas de itraconazol por via inalatória também apresentaram granulomas, porém em menor quantidade (Figura 19C) e, surpreendentemente, o grupo de camundongos tratado com nanopartículas de itraconazol por via inalatória apresentou granulomas em discreta quantidade comparado aos demais grupos (Figura 19D),

Apenas 1 camundongo, do grupo não tratado, apresentou granulomas no fígado (Fig. 20). Não foram observadas lesões macroscópicas no fígado e no baço dos camundongos dos demais grupos.

Figura 19 - Avaliação macroscópica dos pulmões de camundongo experimentalmente infectado com *P. brasiliensis* e tratados ou não com itraconazol por via oral ou com nanoparículas por via inalatória. Pulmão de camundongo não infectado macroscopicamente normal (A), pulmão de camundongo infectado e não tratado (B), pulmão de camundongo infectado e tratado com itraconazol por via oral (C) e pulmão de camundongo infectado e tratado com nanoparículas de itraconazol por via inalatória (D). As setas apontam lesões granulomatosas em diferente intensidade entre os grupos.

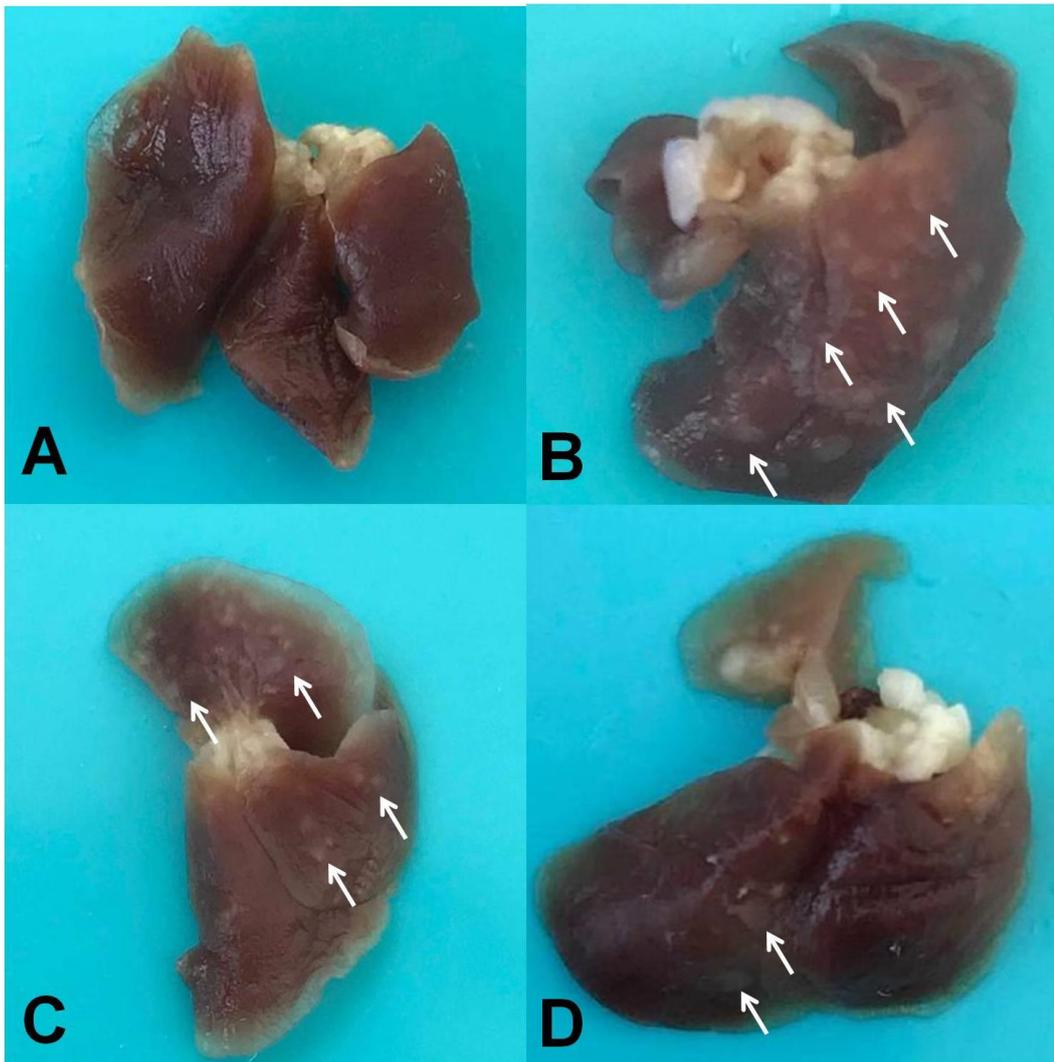


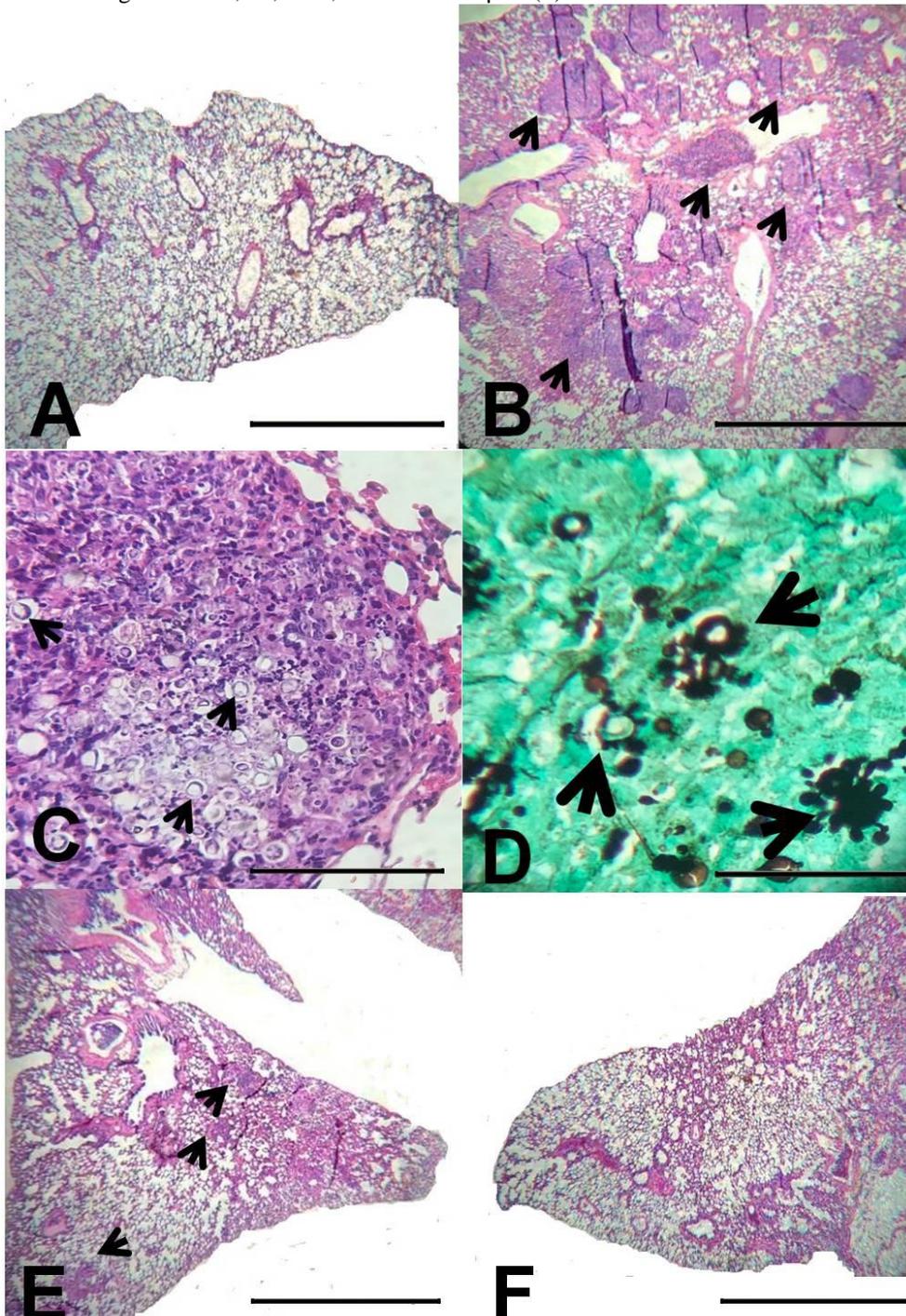
Figura 20 - Avaliação macroscópica de vísceras abdominais de camundongo experimentalmente infectado com *P. brasiliensis* (Grupo não tratado). As setas apontam áreas circulares, esbranquiçadas, bem delimitadas de diferentes tamanhos no fígado (granulomas).



5.3.4 Avaliação microscópica

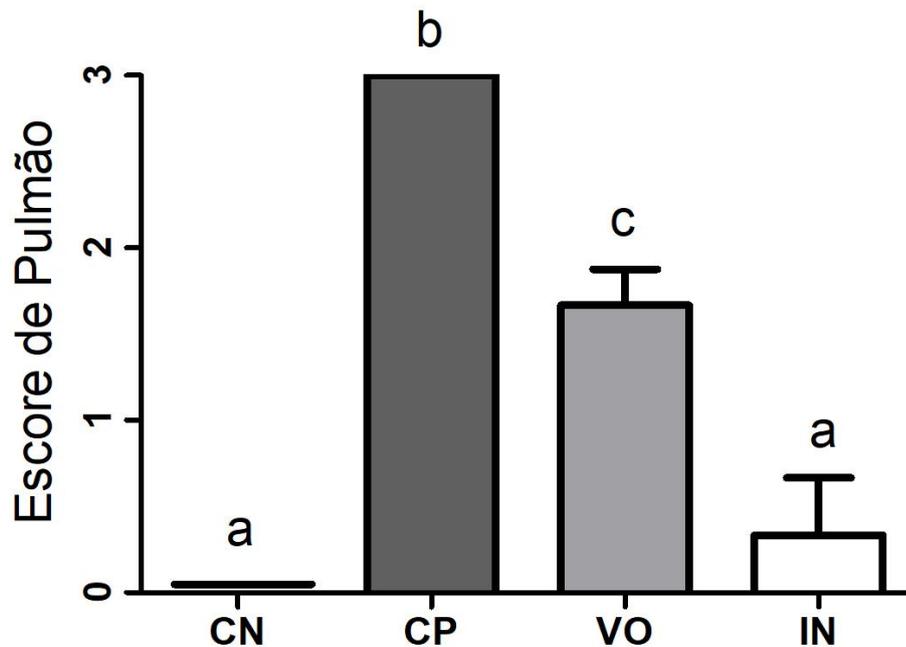
A histopatologia mostrou que, no pulmão dos camundongos infectados e não tratados havia numerosos granulomas (Fig. 21B) caracterizados por infiltrado inflamatório linfocitário e neutrofílico, multifocal intenso, com macrófagos epitelióides associados a miríade de estruturas de imagem negativa, leveduriformes, de aproximadamente 40 μm (setas) (Fig. 21C), evidenciando-se brotamento múltiplo (setas) em coloração especial de impregnação pela prata (Grocott) (Fig 21D), compatível com a morfologia do *Paracoccidioides brasiliensis*. No pulmão dos camundongos infectados e tratados por via oral com itraconazol, observou-se redução significativa do número de granulomas (Fig 21E), e interessante, no pulmão dos camundongos tratados com as nanopartículas de itraconazol por via inalatória foi observada maior redução no número de granulomas (Fig. 21F) em comparação aos demais grupos.

Figura 21 - Avaliação microscópica dos pulmões de camundongo experimentalmente infectado com *P. brasiliensis* e tratados ou não com itraconazol por via oral ou com nanoparículas por via inalatória. Pulmão de camundongo não infectado sem alteração histológica normal, 4x, H.E., barra com 500 μ m (A); pulmão de camundongo infectado e não tratado apresentando numerosos granulomas (setas), 4x, H.E., barra com 500 μ m (B); maior aumento de granuloma apresentando miríade de estruturas leveduriformes contendo cápsula fina (setas), 40x, H.E. barra com 50 μ m (C); estruturas leveduriformes apresentando brotamentos múltiplos compatíveis com *Paracoccidioides brasiliensis* (setas grossas), 40x, Grocott, barra com 50 μ m (D); pulmão de camundongo infectado e tratado com itraconazol por via oral apresentando alguns granulomas (setas), 4x, H.E., barra com 500 μ m (E); e pulmão de camundongo infectado e tratado com nanoparículas de itraconazol por via inalatória sem granulomas, 4x, H.E., barra com 500 μ m (F).



Foi atribuído escore à lesão inflamatória granulomatosa observada no pulmão dos diferentes grupos de camundongos (CN, CP, VO, IN). A média do escore da lesão observada no pulmão de camundongos tratados por via inalatória com nanopartículas de itraconazol foi significativamente menor ($P < 0,005$) quando comparada à lesões nos camundongos não tratados e em relação aos tratados com itraconazol por via oral ($P < 0,01$). E, mais surpreendente, não houve diferença estatística significativa entre o grupo de camundongos tratados por via inalatória em relação aos camundongos não infectados (Fig 22).

Figura 22. Escore histopatológico de lesão inflamatória granulomatosa no pulmão de camundongos não experimentalmente infectados com *P. brasiliensis* e tratados ou não com itraconazol por via oral ou com nanopartículas por via inalatória. Cada barra representa a média aritmética de 6 (CN - controle negativo), 5 (CP- controle positivo), 6 (VO - camundongos tratados com itraconazol por via oral) e 6 (IN- camundongos tratados com nanopartículas de itraconazol por via inalatória) camundongos com erro padrão. As médias foram comparadas pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis. Letras diferentes apontam diferença estatística significativa ($P < 0,01$ e $P < 0,005$).



6 DISCUSSÃO

O tratamento inalatório com nanopartículas de itraconazol em camundongos Swiss experimentalmente infectados com *P. brasiliensis* mostrou ser funcional, uma vez que houve redução do número de granulomas macro e microscopicamente. Essa forma de tratamento experimental da Paracoccidioidomicose pulmonar em camundongos experimentalmente infectados ainda não possui referencial teórico suficiente na literatura. Sendo esse trabalho, de acordo com o nosso conhecimento, o primeiro que comprova a eficácia do tratamento inalatório com nanopartículas de itraconazol por contra infecção pulmonar por *P. brasiliensis*.

Existem poucos artigos voltados para o uso do itraconazol e outros antifúngicos por via inalatória e em sua grande maioria, esses trabalhos são voltados para a análise farmacocinética da formulação (YANG et al, 2010). A diferença observada entre os grupos experimentais, na análise histopatológica, é um grande indicativo do potencial terapêutico da formulação de nanopartículas administradas por via inalatória. O potencial terapêutico é de fundamental importância para a análise da formulação pois reúne os efeitos da administração, da farmacocinética e da farmacodinâmica em um único dado, difícil de ser inferido pela somatória de estudos isolados (FELTON, 2014). Como é descrito a seguir, é sabido que existem diversos fatores que influenciam neste potencial, a começar pela escolha do melhor surfactante para a síntese das nanopartículas.

Inicialmente utilizamos o poloxâmero 407, o cremophor 40, o polisorbato 80 e o ácido oleico em diferentes concentrações e combinações na tentativa de formular uma solução aquosa de itraconazol. Todas as tentativas resultaram em suspensões de itraconazol ou em soluções instáveis, que precipitavam após algum tempo depois da preparação. Existem diversos surfactantes diferentes que atuam como agentes solubilizantes formando um complexo de inclusão com o itraconazol. Entretanto a maioria desses agentes solubilizantes são utilizados através da técnica de spray a seco, formando um pó seco de itraconazol que pode ser administrado pelas vias aéreas (AGHDAM et al., 2016; DURET et al., 2014; KARASHIMA et al., 2017; DURET et al., 2012).

Como mencionado anteriormente, esses primeiros surfactantes testados neste estudo foram utilizados por outros autores na formulação de nanopartículas de itraconazol em pó, pela técnica de spray a seco (*spray drying*) e não na forma de solução aquosa, como a pretendida neste trabalho.

Posteriormente decidiu-se utilizar as ciclodextrinas na tentativa de solubilizar o itraconazol em água. Existem diversos tipos de ciclodextrina com diferentes taxas de solubilidade (EMA/CHMP, 2014). A primeira ciclodextrina utilizada foi a β -CD, que apresentou baixa solubilidade em água e conseqüentemente não foi capaz de solubilizar o itraconazol na concentração final desejada. Posteriormente utilizou-se a HP- β -CD, que apresenta uma solubilidade em água de 450 mg/ml em temperatura ambiente segundo o fabricante (SIGMA-ALDRICH, Cat. No. H-107). A forma de preparação da solução itraconazol/HP- β -CD foi a mesma descrita no trabalho desenvolvido por François et al (1995), com exceção do pH final, visto que neste estudo o pH da formulação foi corrigido para 7, mais próximo do pH fisiológico das vias aéreas dos camundongos e mamíferos de uma forma geral (EFFROS,1969) e mais adequado para a administração por via inalatória. Outra exceção foi a proporção em dobro de HP- β -CD, necessária para solubilizar a concentração desejada de itraconazol.

Um efeito interessante observado e não descrito no trabalho de François et al. (1995) foi a maior solubilidade do itraconazol em concentrações acima de 3 mg/ml utilizando-se a concentração de ciclodextrina 80x a de itraconazol. Ou seja, mesmo utilizando uma proporção em dobro de ciclodextrina % m/v, a solubilidade do itraconazol não se mostrou adequada em concentrações inferiores a essa. Uma possível explicação para este fato é que a solubilidade do itraconazol diminui quando diminui a quantidade de ciclodextrina na água, independente da proporção relativa itraconazol/ciclodextrina. No entanto, estudos adicionais de calorimetria diferencial de varredura (MURA et al., 2003; MIRZA et al., 2012), por exemplo, necessitariam ser realizados para comprovar esta explicação.

Existe, inclusive, um aumento de turbidez da solução sem ciclodextrina para a solução ciclodextrina 20x que poderia ser explicada devido ao fato que na solução sem ciclodextrina, o itraconazol precipita-se em maior quantidade ao invés de estar suspenso na solução. O mesmo efeito é percebido nas medidas de turbidez após a centrifugação, que apesar de serem bem inferiores quando comparadas com a medida após a agitação da solução, diferem significativamente da solução ciclodextrina 80x.

Nos testes de CIM utilizando o *P. brasiliensis*, como demonstrado nos resultados, houve diferença na intensidade e velocidade de crescimento do fungo nos controles DMSO e HP β CD. Existem evidências que mesmo em concentrações baixas o DMSO pode ser tóxico (GALVAO et al., 2014). Mesmo em concentrações abaixo de 1%, a depender da

suscetibilidade do organismo ou célula que está sendo exposto ao DMSO, pode haver interferências no metabolismo e consequentemente no crescimento das colônias.

Os estudos com modelos experimentais de infecção *in vivo* do *Paracoccidioides brasiliensis* utilizam em sua maioria os camundongos da linhagem BALB/c. Por indisponibilidade dessa linhagem, utilizamos os camundongos da linhagem SWISS, que são utilizados nos estudos de infecção experimental com o *Paracoccidioides spp.* em um número significativamente menor.

A patogenia do *Paracoccidioides brasiliensis* nos pulmões dos camundongos e outros animais de laboratório tem algumas características peculiares. Utilizando camundongos da linhagem C57BL/6 inoculados por via endovenosa, um grupo demonstrou a “preferência” da infecção pelo pulmão esquerdo, que é menor e possui menos lobos (TRISTÃO et al., 2013). Esse conhecimento enfatiza a necessidade de um protocolo preciso e padronizado para a coleta de tecidos durante os estudos de infecção experimental por *P. brasiliensis*. Outro grupo estudou o papel da parede do fungo na resposta imunológica mediada por anticorpos e encontraram que ela possui um efeito potente na ativação dos linfócitos tipo B (SILVA. et al., 1995). O papel dos linfócitos tipo T na resposta imunológica contra a infecção já é bem conhecido (BAZAN et al., 2015). Outros estudos com camundongos demonstraram a importância de proteínas específicas na interação do fungo com o tecido infectado (DA SILVA et al., 2013).

As alterações macroscópicas e microscópicas encontradas no grupo controle positivo são muito semelhantes às descritas na literatura, quando se analisa a evolução histopatológica natural em animais de laboratório (OVANNITTI et al. 1999). O achado predominante são numerosos granulomas distribuídos de forma esparsa por ambos pulmões. Pode-se visualizar ainda, a depender da resposta imunológica do animal, a presença de infiltrado linfocitário e do próprio fungo, geralmente no interior dos granulomas.

Outro estudo interessante demonstrou que a patogenicidade dos isolados de *P. brasiliensis*, avaliada através da mortalidade dos camundongos infectados, não tem relação com o crescimento *in vitro* do fungo. O subcultivo sucessivo está relacionado à diminuição da virulência e o fungo reisolado dos animais infectados tem uma virulência nitidamente maior (KASHINO et al., 1990). Em nossos primeiros estudos-piloto para induzir a infecção, um volume maior do inóculo foi injetado na cavidade peritoneal com o intuito de permitir o

desenvolvimento do fungo e aumentar a virulência com o reisolamento. Mas o fungo também não se desenvolveu na cavidade peritoneal sem a imunossupressão.

A diferença entre gêneros da doença em humanos varia de 10 a 15 homens para cada mulher diagnosticada com a doença (SHIKANAI-YASUDA et al., 2018). Um interessante estudo com camundongos demonstrou que essa característica parece estar pelo menos parcialmente relacionada às diferenças hormonais entre os sexos. As fêmeas são naturalmente mais resistentes à infecção pelo *P. brasiliensis* (PINZAN et al., 2010). Por uma questão de disponibilidade de animais, nosso estudo foi realizado utilizando somente fêmeas. Isto pode explicar parcialmente as dificuldades encontradas no desenvolvimento experimental da doença.

Tendo em vista que uma parcela significativa dos pacientes acometidos com micoses sistêmicas apresenta algum grau de imunodeficiência, seja ela demonstrada ou não, foi optado pela imunossupressão dos animais com dexametasona, simulando o quadro clínico mais frequente no atendimento aos pacientes humanos. Dentro dessa associação destaca-se a infecção concomitante pelo vírus da imunodeficiência humana. Ambas patologias têm como referência para atendimento o Hospital de Doenças Tropicais da Universidade Federal do Tocantins. Outra característica importante já demonstrada é que tanto os camundongos resistentes quanto os sensíveis demonstraram uma redução significativa na quantidade de fungo inoculado durante a primeira semana, em comparação com as primeiras 24 h após a inoculação. Após a primeira semana, os camundongos sensíveis começam a apresentar uma quantidade cada vez maior do fungo nos pulmões (CANO et al., 1995). A definição do tempo de início do tratamento neste estudo levou em consideração que até as primeiras 48 h (tempo escolhido) não é possível identificar lesões pulmonares, somente infiltrado inflamatório e a presença do fungo (PINA et al., 2004; ARISTIZABAL et al., 1998; GONZÁLEZ et al., 2008; THOMAZ et al., 2008).

O tempo, a dose e a forma de administração do tratamento é bem variado na literatura. O uso de itraconazol inalatório com a finalidade de avaliar a eficácia do tratamento restringe-se a poucos artigos para o tratamento da aspergilose em aves (PARDEIKE et al, 2016, WLAŹ et al, 2015, RUNDDELDT et al, 2013). Outros artigos encontrados administram o itraconazol por via inalatória para avaliar as características farmacocinéticas, seja em forma de pó seco (KARASHIMA et al, 2017) (DURET et al. 2014) ou por nebulização (YANG et al, 2010). O que se sabe de importante é que a concentração do itraconazol no tecido pulmonar deve se

manter acima de 0.5 µg/grama de pulmão para que se tenha um efeito antifúngico (SOBEL et al, 2000). Os pulmões dos camundongos juntos pesam em média 150 miligramas. Em AMY et al, (1977) e YANG et al., (2010) foi demonstrado que após a nebulização de uma solução de itraconazol/HPβCD a concentração de itraconazol no tecido pulmonar aferida por HPLC foi de 3.38 ± 1.16 µg/g, ou seja, quase 7 vezes maior que a concentração mínima necessária. Todos esses dados foram levados em consideração na padronização da forma de tratamento, visto que não existiam artigos semelhantes que pudessem ser utilizados como modelo metodológico.

O efeito da câmara de nebulização sobre o tratamento pode se dar de diversas formas e é importante que seja conhecido. A estimativa da quantidade total da droga inalada (D) que é depositada nos pulmões é calculada pela seguinte fórmula:

$$D = C \times V \times DI \times T$$

Onde; C = concentração de itraconazol no volume de aerossol (xx µg / ml), V = volume de ar inspirado pelo animal durante 1 min (para camundongos, V = 1,0 L-min / kg), DI = estimativa do índice de deposição [fração da dose inalada depositada em todo o trato respiratório (para camundongos DI = 0,3)], T = duração do tratamento em minutos (PATLOLLA et al, 2010, KOSHKINA et al, 2004, FAIRCHILD, 1972). Como se pode perceber, a variável que precisa ser conhecida é a concentração da droga no volume de aerossol. Em câmaras de nebulização com exposição das narinas, essa medida pode ser calculada da seguinte forma: C = quantidade total de itraconazol coletado em cada porta da câmara de inalação (mg) /volume total de ar retirado por porta durante o tempo de exposição (FULZELE et al, 2006). Nas câmaras de nebulização de corpo inteiro, a estimativa da concentração é feita coletando-se alíquotas do ar em diferentes pontos (MCCONVILLE et al, 2005). McConville e colaboradores (2005) também demonstraram que o centro da câmara de nebulização apresenta uma maior concentração do fármaco. A opção por utilizar uma câmara de corpo inteiro se deu pela necessidade de simplificar o procedimento, permitindo facilmente a administração da medicação.

Um estudo interessante avaliou a influência do tempo de nebulização, da umidade do ar e do espectro de tamanho das partículas nebulizadas entre outros parâmetros menos importantes e demonstrou que as diferentes combinações entre esses fatores produzem variações na eficiência da nebulização (ROBICHAUD et al, 2015). Partículas de aerossol maiores do que 5µm tendem a precipitar na cavidade oral/nasal e a não atingir os pulmões,

sendo geralmente deglutidas. Já partículas menores do que 0,5 μm entram e saem dos pulmões sem depositar-se nos alvéolos. Mesmo na faixa ideal de tamanho de 1 a 5 μm , apenas 4% das partículas inaladas depositam-se no pulmão a cada respiração (PHILLIPS, 2017). O nebulizador utilizado neste estudo, que funciona pela tecnologia de rede vibratória, garante a entrega de partículas com tamanho médio de 5 μm , ou seja, o tamanho ideal para que a deposição da droga nos alvéolos seja a maior possível.

As principais funções dos pulmões são permitir a troca gasosa entre o sangue e o ambiente e manter o pH sistêmico homeostático. A luz das vias aéreas é revestida por epitélio pseudoestratificado sobre a qual flutua uma camada de muco, que ajuda a capturar partículas aerossolizadas. O batimento dos cílios constantemente move essa camada mucosa em direção às vias aéreas proximais, onde é ingerido ou expectorado. As partículas que se depositam no pulmão têm um tempo de permanência de aproximadamente 24 horas em um humano adulto saudável. Uma vez depositadas, as drogas encontram uma variedade de barreiras físico-químicas e biológicas. Estas incluem barreiras mucosas e enzimas catabólicas na região traqueobrônquica e macrófagos na região alveolar. Nos alvéolos as partículas se dissolvem e a droga se difunde para a corrente sanguínea através da barreira alvéolo-capilar.

As nanopartículas oferecem diversas vantagens. A medida que o tamanho de uma partícula diminui, um número maior de moléculas é encontrado na sua superfície e não no interior da partícula, dando às nanopartículas uma grande área superficial. Este aumento na área de superfície leva a um aumento na velocidade de dissolução. Além disso, as formulações de nanopartículas têm sido usadas para melhorar a biodisponibilidade de drogas hidrofóbicas insolúveis (BAILEY et al., 2009), como é o caso do itraconazol.

7 CONCLUSÃO

Os dados de turbidimetria das formulações de itraconazol com diferentes concentrações de HP β CD demonstraram que houve de fato uma solubilização completa do itraconazol na solução HP β CD 24% m/v em pH 7. Formulações com essas características ainda não foram utilizadas para tratamento inalatório experimental e tampouco clínico, abrindo um potencial enorme para a realização de novos estudos.

A equivalência nos testes de concentração inibitória mínima entre a formulação de nanopartículas e a droga padrão demonstrou que a solução de itraconazol/ HP β CD não teve sua eficácia antifúngica reduzida *in vitro*, quando o fungo utilizado foi a *Candida albicans*. Com o *P. brasiliensis*, houve diferenças na CIM, que não podem ser atribuídas a uma menor eficiência da formulação de nanopartículas.

O modelo experimental de infecção com *Paracoccidioides brasiliensis* é funcional em camundongos Swiss, utilizando-se imunossupressão com dexametasona 8mg/L acrescida de amoxicilina 1g/L no fornecimento hídrico diário.

A utilização de nanopartículas de itraconazol por via inalatória em camundongos experimentalmente infectados com *Paracoccidioides brasiliensis* é funcional, por reduzir significativamente o número de granulomas nos pulmões e por impedir o desenvolvimento de lesões em outros órgãos.

REFERÊNCIAS

- AGHDAM, Mehdi Hassanpour et al. Aggregated nanotransfersomal dry powder inhalation of itraconazole for pulmonary drug delivery. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 6, n. 1, p. 57, 2016.
- ALEIXO, F.S. et al. Avaliação do efeito de medicamentos imunossuppressores na reativação da toxoplasmose crônica murina. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 41, n. 2, p.69-178, jun.2012.
- AMY, R. W. et al. Postnatal growth of the mouse lung. **Journal of Anatomy**, v. 124, n. Pt 1, p. 131, 1977.
- ARISTIZABAL, Beatriz H. et al. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 11, p. 5587-5591, 1998.
- BAILEY, Mark M.; BERKLAND, Cory J. Nanoparticle formulations in pulmonary drug delivery. **Medicinal Research Reviews**, v. 29, n. 1, p. 196-212, 2009.
- BAZAN, Silvia B. et al. Loss-and gain-of-function approaches indicate a dual role exerted by regulatory T cells in pulmonary paracoccidioidomycosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 10, p. e0004189, 2015.
- BENARD, Gil. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 209-221, 2008.
- BENARD, Gil et al. Imbalance of IL-2, IFN- γ and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, v. 13, n. 4, p. 248-252, 2001.
- BUCHANAN, Charles M. et al. Pharmacokinetics of itraconazole after intravenous and oral dosing of itraconazole-cyclodextrin formulations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 11, p. 3100-3116, 2007.
- CANO, Luz E. et al. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 5, p. 1777-1783, 1995.
- COSTA, Andre Nathan et al. The lung in paracoccidioidomycosis: new insights into old problems. **Clinics**, v. 68, n. 4, p. 441-448, 2013.
- CRUZ, R. C. et al. Influence of different media, incubation times, and temperatures for determining the MICs of seven antifungal agents against *Paracoccidioides brasiliensis* by microdilution. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 436-443, 2013.
- DA COSTA, Thiago Alves et al. Severe Changes in Thymic Microenvironment in a Chronic Experimental Model of Paracoccidioidomycosis. **PloS One**, v. 11, n. 10, p. e0164745, 2016.

DA SILVA, Julhiany de Fatima et al. Paracoccidioides brasiliensis 30 kDa adhesin: identification as a 14-3-3 protein, cloning and subcellular localization in infection models. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e62533, 2013.

DEL NEGRO, G. Outras lesões. Formas de ocorrência rara e associações com outros processos. In: Del Negro G, Lacaz CS, Fiorillo AM (eds.) **Paracoccidioidomicose (blastomicose sul-americana)**. São Paulo: Sarvier-Edusp, 229-243, 1982.

DENKERS, Nathaniel D. et al. Aerosol and nasal transmission of chronic wasting disease in cervidized mice. **The Journal of General Virology**, v. 91, n. Pt 6, p. 1651, 2010.

DIOT, P. et al. Deposition of amphotericin B aerosols in pulmonary aspergilloma. **European Respiratory Journal**, v. 8, n. 8, p. 1263-1268, 1995.

DURET, Christophe et al. New respirable and fast dissolving itraconazole dry powder composition for the treatment of invasive pulmonary aspergillosis. **Pharmaceutical Research**, v. 29, n. 10, p. 2845-2859, 2012.

DURET, Christophe et al. Pharmacokinetic evaluation in mice of amorphous itraconazole-based dry powder formulations for inhalation with high bioavailability and extended lung retention. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, n. 1, p. 46-54, 2014.

EFFROS, Richard M.; CHINARD, Francis P. The in vivo pH of the extravascular space of the lung. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 48, n. 11, p. 1983-1996, 1969.

EMA/CHMP/333892/2013, Committee for Human Medicinal Products (CHMP). Background review for cyclodextrins used as excipients In the context of the revision of the guideline on 'Excipients in the label and package leaflet of medicinal products for human use' (CPMP/463/00 Rev 1); 20 November 2014.

EVRARD, Brigitte et al. Cyclodextrins as a potential carrier in drug nebulization. **Journal of Controlled Release**, v. 96, n. 3, p. 403-410, 2004.

FAIRCHILD, Glen A. Measurement of respiratory volume for virus retention studies in mice. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 24, n. 5, p. 812-818, 1972.

FELTON, Timothy; TROKE, Peter F.; HOPE, William W. Tissue penetration of antifungal agents. **Clinical microbiology reviews**, v. 27, n. 1, p. 68-88, 2014.

FERNANDES, Fabrício F. et al. Impact of Paracoccin Gene Silencing on Paracoccidioides brasiliensis Virulence. **Mbio**, v. 8, n. 4, p. e00537-17, 2017.

FORTES, Rogério M.; KIPNIS, André; JUNQUEIRA-KIPNIS, Ana Paula. Paracoccidioides brasiliensis pancreatic destruction in Calomys callosus experimentally infected. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 84, 2009.

FOWLES, Jeff R.; BANTON, Marcy I.; POTTENGER, Lynn H. A toxicological review of the propylene glycols. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 43, n. 4, p. 363-390, 2013.

FRANCO, Marcello et al. Chlamydospore formation by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 31, n. 3, p. 151-157, 1989.

FRANÇOIS et al. Oral formulations on an Antifungal. Int Cl⁶ A61K9/27. U.S.Cl 514/58; 514/252. Sep. 22, 1994, Apr. 6, 1995.

FULZELE, Suniket V. et al. Inhalation delivery and anti-tumor activity of celecoxib in human orthotopic non-small cell lung cancer xenograft model. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 9, p. 2094-2106, 2006.

GALVAO, Joana et al. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. **The FASEB Journal**, v. 28, n. 3, p. 1317-1330, 2014.

GONZÁLEZ, Angel; RESTREPO, Angela; CANO, Luz Elena. Pulmonary immune responses induced in BALB/c mice by *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 313, 2008.

HASSANPOUR, Aghdam M, Ghanbarzadeh S, Javadzadeh Y, Hamishehkar H. Aggregated Nanotransfersomal Dry Powder Inhalation of Itraconazole for Pulmonary Drug Delivery. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**. 6(1):57-64; 2016.

HAZEN, Kevin C. Fungicidal versus fungistatic activity of terbinafine and itraconazole: an in vitro comparison. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 38, n. 5, p. S37-S41, 1998.

HOEBEN, Barbara J. et al. In vivo efficacy of aerosolized nanostructured itraconazole formulations for prevention of invasive pulmonary aspergillosis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1552-1554, 2006.

HOLVOET, C.; VANDER HEYDEN, Y.; PLAIZIER-VERCAMMEN, J. Influence of preparation method on itraconazole oral solutions using cyclodextrins as complexing agents. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 62, n. 7, p. 510-514, 2007

HOSTETLER, JOHN S.; HANSON, L. H.; STEVENS, D. A. Effect of cyclodextrin on the pharmacology of antifungal oral azoles. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n. 2, p. 477-480, 1992.

HU, Yang et al. Transcriptomic analysis reveals significant B lymphocyte suppression in corticosteroid-treated hosts with *Pneumocystis pneumonia*. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 56, n. 3, p. 322-331, 2017.

OVANNITTI, C. A. et al. Histopathological evolution of experimental paracoccidioidomycosis in Wistar rats. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v. 289, n. 2, p. 211-216, 1999.

KARASHIMA, Masatoshi et al. Enhanced pulmonary absorption of poorly soluble itraconazole by micronized cocrystal dry powder formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 115, p. 65-72, 2017.

KASHINO, Suely Sanae et al. Alterations in the pathogenicity of one *Paracoccidioides brasiliensis* isolate do not correlate with its in vitro growth. **Mycopathologia**, v. 111, n. 3, p. 173-180, 1990.

KELLER, Krista A. Therapeutic review. **Journal of Exotic Pet Medicin**, v. 20, n. 2, p. 156-60, 2011.

KOSHKINA, Nadezhda V. et al. Cyclosporin A aerosol improves the anticancer effect of paclitaxel aerosol in mice. **Journal of aerosol medicine**, v. 17, n. 1, p. 7-14, 2004.

KULO, Aida; DE HOON, Jan N.; ALLEGAERT, Karel. The propylene glycol research project to illustrate the feasibility and difficulties to study toxicokinetics in neonates. **International journal of pharmaceutics**, v. 435, n. 2, p. 112-114, 2012.

LABIRIS, N. Renee; DOLOVICH, Myrna B. Pulmonary drug delivery. Part II: the role of inhalant delivery devices and drug formulations in therapeutic effectiveness of aerosolized medications. **British journal of clinical pharmacology**, v. 56, n. 6, p. 600-612, 2003.

LE, Jennifer; SCHILLER, Daryl S. Aerosolized delivery of antifungal agents. **Current fungal infection reports**, v. 4, n. 2, p. 96-102, 2010.

LI, Ren-Kai et al. In vitro activities of voriconazole, itraconazole, and amphotericin B against *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, and *Histoplasma capsulatum*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 6, p. 1734-1736, 2000.

LOTH, Eduardo Alexandre et al. Dose Response Effect Of *Paracoccidioides Brasiliensis* In An Experimental Model Of Arthritis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 3, p. 259-264, 2014.

LOTH, Eduardo Alexandre et al. Experimental paracoccidioidomycosis in pregnant rats. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 6, p. 515-518, 2015.

MACHADO, Luís R. et al. Neurocryptococcosis and immunosuppression: an experimental model in mice. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 43, n. 1, p. 29-38, 1985.

MANSANO, Elaine Sciuniti Benites et al. Correlation between histopathological and FT-Raman spectroscopy analysis of the liver of Swiss mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **PloS One**, v. 9, n. 9, p. e106256, 2014.

MARQUES, Alexandre F. et al. Additive effect of P10 immunization and chemotherapy in anergic mice challenged intratracheally with virulent yeasts of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes and infection**, v. 10, n. 12-13, p. 1251-1258, 2008.

MARQUES, Silvio Alencar. Paracoccidioidomycosis: epidemiological, clinical, diagnostic and treatment up-dating. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 88, n. 5, p. 700-711, 2013.

MARTINEZ, Roberto. Atualização no uso de agentes antifúngicos*, **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. 32(5):449-60: 2006.

MCCONVILLE, Jason T. et al. Design and evaluation of a restraint-free small animal inhalation dosing chamber. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 31, n. 1, p. 35-42, 2005.

MIRZA, Mohammad Aamir et al. In vitro/in vivo performance of different complexes of itraconazole used in the treatment of vaginal candidiasis. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 4, p. 759-772, 2012.

MIYAKE, K. et al. Characterization of itraconazole/2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex in aqueous propylene glycol solution. **International journal of pharmaceutics**, v. 179, n. 2, p. 237-245, 1999.

MONFORTE, Victor et al. Nebulized amphotericin B prophylaxis for *Aspergillus* infection in lung transplantation: study of risk factors. **The Journal of heart and lung transplantation**, v. 20, n. 12, p. 1274-1281, 2001.

MONTHARU, Jérôme et al. Evaluation of lung tolerance of ethanol, propylene glycol, and sorbitan monooleate as solvents in medical aerosols. **Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery**, v. 23, n. 1, p. 41-46, 2010.

MOREIRA, A. P. V. Paracoccidioidomicose: histórico, etiologia, epidemiologia, patogênese, formas clínicas, diagnóstico laboratorial e antígenos. **Boletim Epidemiológico Paulista**. Coordenadoria de Controle de Doenças. São Paulo. Março, 2008.

MURA, P. et al. Differential scanning calorimetry as an analytical tool in the study of drug-cyclodextrin interactions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 73, n. 2, p. 635-646, 2003.

MURA, Paola. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: a review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 101, p. 238-250, 2014.

NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada—Segunda Edição. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002

NISHIKAKU, Angela Satie et al. Matrix metalloproteinases with gelatinolytic activity induced by *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **International journal of experimental pathology**, v. 90, n. 5, p. 527-537, 2009.

PALMER, Lucy B.; SMALDONE, Gerald C. Reduction of bacterial resistance with inhaled antibiotics in the intensive care unit. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 189, n. 10, p. 1225-1233, 2014.

PARDEIKE, Jana et al. Development of an itraconazole-loaded nanostructured lipid carrier (NLC) formulation for pulmonary application. **International journal of pharmaceutics**, v. 419, n. 1-2, p. 329-338, 2011.

PARDEIKE, J., Weber S, Zarfl HP, Pagitz M, Zimmer A. Itraconazole-loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for pulmonary treatment of aspergillosis in falcons. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. 108:269-276. Nov; 2016.

PATLOLLA, Ram R. et al. Formulation, characterization and pulmonary deposition of nebulized celecoxib encapsulated nanostructured lipid carriers. **Journal of Controlled Release**, v. 144, n. 2, p. 233-241, 2010.

PEDRO, RJ. et al. Paracoccidioidomicose e infecção pelo vírus da imunodeficiência humana. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 31:119-125, 1989.

PEETERS, Jef et al. Characterization of the interaction of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin with itraconazole at pH 2, 4, and 7. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 91, n. 6, p. 1414-1422, 2002.

PHILLIPS, Jonathan E.; ZHANG, Xuxia; JOHNSTON, James A. Dry powder and nebulized aerosol inhalation of pharmaceuticals delivered to mice using a nose-only exposure system. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 122, p. e55454, 2017.

PINA, Adriana et al. Absence of interleukin-4 determines less severe pulmonary paracoccidioidomycosis associated with impaired Th2 response. **Infection and immunity**, v. 72, n. 4, p. 2369-2378, 2004.

PINTO, Maria EA et al. Antifungal and antioxidant activity of fatty acid methyl esters from vegetable oils. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 3, p. 1671-1681, 2017

PINZAN, Camila Figueiredo et al. Immunological basis for the gender differences in murine *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **PloS One**, v. 5, n. 5, p. e10757, 2010.

QUON, Bradley S.; GOSS, Christopher H.; RAMSEY, Bonnie W. Inhaled antibiotics for lower airway infections. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 11, n. 3, p. 425-434, 2014.

RIVKIN, Iliia et al. Treatment of respiratory damage in mice by aerosols of drug-encapsulating targeted lipid-based particles. **Journal of Controlled Release**, v. 257, p. 163-169, 2017.

ROBICHAUD, Annette; FERREYDOONZAD, Liah; SCHUESSLER, Thomas F. Delivered dose estimate to standardize airway hyperresponsiveness assessment in mice. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 308, n. 8, p. L837-L846, 2015.

RUNDFELDT, Chris et al. A model for treating avian aspergillosis: serum and lung tissue kinetics for Japanese quail (*Coturnix japonica*) following single and multiple aerosol exposures of a nanoparticulate itraconazole suspension. **Medical Mycology**, v. 51, n. 8, p. 800-810, 2013.

RUNDFELDT, Chris et al. Inhalable highly concentrated itraconazole nanosuspension for the treatment of bronchopulmonary aspergillosis. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 83, n. 1, p. 44-53, 2013.

SALDANHA, Camila Arruda et al. Antifungal activity of amphotericin B conjugated to nanosized magnetite in the treatment of paracoccidioidomycosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 6, p. e0004754, 2016.

SANTOS Jr, A. et al. Paracoccidioidomicose: caracterização clínico-epidemiológica dos casos notificados no Hospital de Doenças Tropicais da Universidade Federal do Tocantins (HDT-UFT), Brasil, no período de 2016 a 2018. **XL International Sodebras Congress, 10 a 12 de dezembro de 2018 – Vitória – ES. Sodebras**, Volume 14 – Nº 159 – Março/2019.

SARGI, S. C. et al. Role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in the production of prostaglandin E2 and nitric oxide during experimental murine paracoccidioidomycosis. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

SEABRA, D. I.; POMPEU, E.; VALENTI, M. L. G. Anestesia e analgesia de animais utilizados em protocolos experimentais. Central Vivarium of the University of São Paulo Medical School. http://www.bioterio.fm.usp.br/pdf/Anestesia_e_Analgesia.pdf. Accessed, v. 8, 2018

SERRA, Henrique A. A História dos antibióticos. Pediatra preceptor da Enfermaria de Especialidades do Instituto da criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. Disponível em: http://profiva.dominiotemporario.com/doc/Micro_AHistoriadosantibioticos, 2002.

SHIKANAI-YASUDA, Maria Aparecida. Paracoccidioidomycosis treatment. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, p. 31-37, 2015.

SHIKANAI-YASUDA, Maria Aparecida et al. II Consenso Brasileiro em Paracoccidioidomicose-2017. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 27, p. e0500001, 2018.

SHIN, Jee H. et al. Dose-dependent pharmacokinetics of itraconazole after intravenous or oral administration to rats: intestinal first-pass effect. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 5, p. 1756-1762, 2004.

SIGMA-ALDRICH, Cat. No. H-107, 2-HYDROXYPROPYL- β -CYCLODEXTRIN HBC

SILVA, DE. et al. Avaliação do consumo de água e ração de camundongos expostos a baixas doses de Mancozebe, **II Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão da UEG**, Pirenópolis-GO, 2016.

SILVA, M. F.; SILVA, C. L. The role of somatic structure of the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* upon B cell activation in experimental paracoccidioidomycosis. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 101, n. 2, p. 321-327, 1995.

SILVA, M. R. R.; PAIVA, L. F.; JESUINO, R. S. A. Avaliação do cetoconazol em camundongos inoculados com *Paracoccidioides brasiliensis* pela histopatologia de fígado e baço e pela intradermoreação de paracoccidioidina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.27, n.1. p.11-14. jan-mar, 1994.

SOBEL, Jack D.; MYCOSES STUDY GROUP. Practice guidelines for the treatment of fungal infections. **Clinical infectious diseases**, v. 30, n. 4, p. 652-652, 2000.

SVIDZINSKI, Terezinha Inez Estivalet et al. *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from patients with acute and chronic disease exhibit morphological differences after animal passage. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41, n. 5, p. 279-283, 1999.

TAKAHAGI-NAKAIRA, E.; SUGIZAKI, M. F.; PERAÇOLI, M. T. S. Microdilution procedure for antifungal susceptibility testing of *Paracoccidioides brasiliensis* to amphotericin b and itraconazole. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 15, n. 4, p. 718-731, 2009.

TEIXEIRA, Marcus M. et al. *Paracoccidioides* species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 10, p. e1004397, 2014.

THOMAZ, L. et al. Experimental paracoccidioidomycosis: alternative therapy with ajoene, compound from *Allium sativum*, associated with sulfamethoxazole/trimethoprim. **Medical mycology**, v. 46, n. 2, p. 113-118, 2008.

TRISTÃO, Fabrine Sales Massafera et al. The left lung is preferentially targeted during experimental paracoccidioidomycosis in C57BL/6 mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46, n. 10, p. 839-843, 2013.

VAN SPEYBROECK, Michiel et al. Combined use of ordered mesoporous silica and precipitation inhibitors for improved oral absorption of the poorly soluble weak base itraconazole. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, n. 3, p. 354-365, 2010.

VERONESI, Ricardo; FOCACCIA, Roberto. Tratado de infectologia: v. 1 e 2. In: **Tratado de infectologia**: v. 1 e 2. 2005.

WAINWRIGHT, Milton. Miracle cure: The story of penicillin and the golden age of antibiotics. Oxford, UK: Blackwell, 1990.

WANKE, B.; AIDÊ, M. A. Capítulo 6 – Paracoccidioidomicose. Trabalho realizado na Universidade Federal Fluminense -UFF-Niterói-RJ. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.35, n. 12, p.1245-1249, 2009.

WLAŹ, Piotr et al. Activity and safety of inhaled itraconazole nanosuspension in a model pulmonary *Aspergillus fumigatus* infection in inoculated young quails. **Mycopathologia**, v. 180, n. 1-2, p. 35-42, 2015.

YANG, Wei et al. In vitro characterization and pharmacokinetics in mice following pulmonary delivery of itraconazole as cyclodextrin solubilized solution. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, n. 5, p. 336-347, 2010.

ZHOU, Qi Tony et al. Emerging inhalation aerosol devices and strategies: where are we headed? **Advanced drug delivery reviews**, v. 75, p. 3-17, 2014.