

Arlete
in libac.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Pós-Graduação em Farmácia
Área de análises Clínicas

ASSOCIAÇÃO ENTRE ANFOTERICINA B E METRONIDAZOL NO
TRATAMENTO DE CANDIDÍASE EXPERIMENTAL EM
CAMUNDONGOS

LEILA ALMEIDA SANTOS

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Profª Drª Arlete Emily Cury

São Paulo

2002

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Pós – Graduação em Farmácia
Área de análises Clínicas

ASSOCIAÇÃO ENTRE ANFOTERICINA B E METRONIDAZOL NO
TRATAMENTO DE CANDIDÍASE EXPERIMENTAL EM
CAMUNDONGOS

LEILA ALMEIDA SANTOS

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

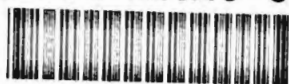
Orientadora:

Profª Drª Arlete Emily Cury

São Paulo

2002

DEDALUS - Acervo - CQ



30100004517

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Santos, Leila Almeida
S237a Associação entre anfotericina B e metronidazol no tratamento
de candidíase experimental em camundongos / Leila Almeida
Santos. -- São Paulo, 2001.
71p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Cury, Arlete Emily

I. Micologia clínica I. T. II. Cury, Arlete Emily, orientador.

616.969 CDD

Leila Almeida Santos

**ASSOCIAÇÃO ENTRE ANFOTERICINA B E METRONIDAZOL NO
TRATAMENTO DE CANDIDÍASE EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS**

**Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre**

**Profa. Dra. Arlete Emily Cury
Orientadora/presidente**

1º examinador

2º examinador

São Paulo, 22 de abril de 2002.

Aos meus pais

**Wilson Maria dos Santos e Josete Almeida Santos,
pelo incentivo, pelo carinho e pelo eterno amor**

dedico este trabalho.

**Agradecimento especial à Professora Dr^a ARLETE EMILY CURY,
pela paciência, disponibilidade e orientação constantes,
sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.**

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. José Luís Guerra, do Instituto de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, pela orientação e análise histopatológica deste trabalho.

Ao funcionário Cláudio Arroyo, do Laboratório de Histopatologia, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, pelos serviços prestados.

Aos colegas da Pós-Graduação, em especial, a funcionária Sônia Caramico, do Laboratório de Micologia, do Departamento de Análises Clínicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela amizade e colaboração.

Aos funcionários do Biotério, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

À grande amiga Valéria de Cássia Barbosa Magalhães, pelo apoio, pela amizade, e pelos serviços de digitação deste trabalho

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELA	ii
RESUMO	iii
SUMMARY	iv
I – INTRODUÇÃO.....	01
1 – Candidíases.....	02
2 – Patogenia.....	04
3 - Manifestações Clínicas.....	05
4 - Terapia Com Antifúngicos.....	06
4.1 – Evolução dos agentes antifúngicos.....	06
4.2 – Antifúngicos mais utilizados na terapia de micoses graves.....	07
4.2.1 – Derivados Poliênicos.....	07
4.2.2 – Derivados azóicos.....	08
4.2.3 – Flucitosina.....	09
4.3 – Perspectiva na aplicação de novas drogas.....	09
4.3.1 – Lipossomas de Anfotericina B.....	09
4.3.2 - Novos Azóis.....	10
4.3.3 – Família Candina.....	11
4.3.4 - Benanomicinas e Pradamicinas.....	12
4.3.5 - Aureobasidina	13
4.3.6 – Outras Drogas.....	13
4.4 – Drogas Combinadas.....	13
4.5 - Aspectos químicos e farmacológicos da Anfotericina B e do Metronidazol.....	15
4.5.1 – Anfotericina B.....	15
4.5.2 – Metronidazol.....	16

II – OBJETIVOS.....	18
III – MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
1 – Leveduras.....	22
2 – Animais.....	22
3 – Drogas.....	22
4 – Meios de Cultura.....	22
5 – Soluções.....	24
6 – Preparação do inóculo.....	25
7 – Administração das drogas e esquema terapêutico.....	26
8 – Delineamento experimental.....	26
9 – Avaliação do tratamento.....	27
IV – RESULTADOS	28
V - DISCUSSÃO.....	43
VI – CONCLUSÃO.....	50
VII – REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS.....	52

LISTA DE FIGURAS

	Página
1- Aspecto de pêlo molhado em camundongo BALB/c infectado com <i>Candida albicans</i>	37
2- Aspecto macroscópico de rins in situ de camundongo BALB/c infectado por <i>Cândida albicans</i>	37
3- Aspecto macroscópico de rins de camundongo BALB/c, em que observa-se o rim direito infectado, apresentando quadro de piodistrofia e hipertrofia, e rim esquerdo sadio, preservado no seu tamanho.....	38
4- Figura anterior em maior resolução	38
5- Fotomicrografia de corte histológico de rim de animal controle positivo da infecção, mostrando acúmulo de exsudato supurativo na pélvis renal (H.E.,x36).....	39
6- Detalhe em maior aumento da fotomicrografia anterior (H.E.,x140).....	39

- 7- Fotomicrografia de corte histológico de rim de animal infectado tratado com AnB 0.5ng/kg, mostrando quadro de perivasculite e nefrite intersticial crônica.....40
- 8- Detalhe em maior aumento da fotomicrografia anterior (H.E.,x140).....40
- 9- Detalhe em maior aumento de área cortical de rim de animal tratado com AnB 0,5mg/kg, com 30 dias de evolução, evidenciando quadro de degeneração vacuolar microgoticular e necrose do epitélio tubular renal (H.E.,x140.....41
- 10- Fotomicrografia de corte histológico de rim de animal tratado com a AnB 0,25mg/kg e Me 22,5mg/kg, mostrando áreas de comprometimento tubular e infiltrado de mononucleares interstício (H.E.,x36).....41
- 11- Fotomicrografia de corte histológico de rim de animal de controle positivo da infecção, onde observa-se abscesso renal visualizando-se blastoconídios e pseudo hifas (H.E., x40).....42
- 12-Fotomicrografia de corte histológico de rim de animal de controle positivo da infecção, mostrando blastoconídios e pseudo hifas (Grocott, x20).....42
-

LISTA DE TABELAS

	Página
1- Análise de efeito do tratamento com AnB isolada e associada a Me na Sobrevida dos animais infectados com <i>Candida albicans</i>	33
2- Recuperação de <i>Candida albicans</i> e unidades formadoras de colônias (ufcs) a partir dos rins dos animais infectados e tratados após infecção.....	33

**ASSOCIAÇÃO ENTRE ANFOTERICINA B E METRONIDAZOL NO
TRATAMENTO DE CANDIDIASE EXPERIMENTAL EM
CAMUNDONGOS**

Autor: LEILA ALMEIDA SANTOS

Orientadora: Profa. Dra. ARLETE EMILY CURY

RESUMO

Desde 1953, anfotericina B (AnB) tem sido usada como droga de escolha no tratamento de micoses profundas. No entanto, a alta capacidade desta droga de provocar graves reações adversas, especialmente nefrotoxicidade, fez com que pesquisadores procurassem outros regimes de terapia na busca da cura destas infecções. Estudos prévios demonstraram sinergismo na combinação das drogas AnB e um derivado nitroimidazólico ativo contra bactérias anaeróbias e protozoários, metronidazol (Me) no tratamento de candidíase sistêmica experimental. O intuito deste experimento foi estudar a ação da AnB, utilizando-se metade da dose usual, associada a Me para tratar infecção por *Candida albicans*, em camundongos da espécie BALB/c, analisando os seguintes parâmetros: alteração do aspecto físico dos animais, como perda de peso; tempo de sobrevivência, aspecto tecidual dos rins e recuperação de leveduras a partir deste órgão. Os animais foram inoculados com $4,2 \times 10^6$ células/ml de *C. albicans*. Os camundongos não tratados tiveram morte, em média, no 10º dia após inoculação. Os camundongos que tiveram tratamento

convencional com AnB (0,5mg/kg) apresentaram sérias lesões no tecido renal observadas por análise histopatológica, em que foram evidenciadas nefrose tóxica. Os animais tratados com a metade da dose (0,25 mg/kg) não apresentaram cura total da enfermidade, obtendo sobrevida média de 23 dias. O tratamento com a associação de AnB na metade da dose usual (0,25mg/kg) com Me nas doses 22,5 mg/kg ou 11,25 mg/kg, mostrou ser mais eficaz que a monoterapia com AnB 0,25 mg/kg, promovendo aumento do tempo de sobrevida dos animais, como também diminuindo o número de colônias da levedura isoladas a partir dos rins desses camundongos. Foram observadas também que as lesões renais ocorridas no tratamento com a associação foram menores quando comparadas aos achados relativos à monoterapia. Devido a alta toxicidade da AnB, estes achados sugerem que a combinação entre as duas drogas pode ser um caminho na utilização de AnB de forma segura e eficaz.

**COMBINATION OF AMPHOTERICIN B AND METRONIDAZOL IN
TREATMENT OF EXPERIMENTAL MURINE CANDIDIASIS**

Author: LEILA ALMEIDA SANTOS

Adviser: Profa. Dra. ARLETE EMILY CURY

SUMMARY

Since 1953, amphotericin B (AnB) has been used as the drug of choice for the treatment of disseminated mycosis. However, its ability to cause serious side effects such as nephrotoxicity, has made researchers find other therapeutic regimes in order to treat these infections. Previous study has shown synergistic and additive interactions of amphotericin B and Metronidazole (Me), a nitroimidazole antiprotozoal agent in the treatment of disseminated candidiasis. The antifungal efficacy of the combination of these two drugs was evaluated in a mouse model of disseminated candidiasis caused by *Candida albicans*. Infection was achieved by intravenous inoculation with $4,2 \times 10^6$ of yeast cells per ml via the lateral tail vein to 3 months old Balb/c mice. Deaths occurred in the 10th day for untreated control group. Therapy schedule was divided into 3 doses with 24 h dosing interval, started on the 2nd day following inoculation, and was continued on the 4th and 6th

days. Groups of mice were treated with AmB alone at 0,5mg/kg and 0,25mg/kg of body weight, and in combination of AmB at 0,25mg/kg with Me at 22,5 and 11,25mg/kg of body weight. Efficacy were evaluated on the basis of comparison among the treatment groups with monotherapy and combined therapy, taking as parameter the viable counts of yeast cells from the right kidneys, in vivo outcomes, weight recovery and histopathologic analysis of kidneys. The group which was treated with monotherapy of AmB at conventional dose, 0,5mg/kg of body weight, has showed serious kidney lesions through histopathologic analysis. Mice treated with monotherapy of AmB at 0,25mg/kg of body weight couldn't recover from illness, and deaths occurred at day 23 on average. Treatment with the combination of the two drugs has showed to be more effective in comparison to AmB alone. AnB at 0,25mg/kg of body weight in combination with Me at 22,5 or 11,25mg/kg of body weight prolonged survival, and reduced tissue yeast counts from kidneys. The combination therapy also promoted an increase in extension of kidney lesion showed by histopathologic analysis. Given to the high toxicity of Amb, these findings suggest that the combination of these two drugs may be a way of using Amb safely and effectively.

I - INTRODUÇÃO

1 - Candidíases

Nas duas últimas décadas houve um significativo aumento no número de infecções fúngicas humanas ^{6,9,64,106,113,114}. Embora essas infecções possam ocorrer em hospedeiros considerados saudáveis, a maioria delas acomete pacientes imunocomprometidos ^{35,64,81,89}, caracterizando as denominadas infecções oportunistas.

Neste contexto, estudos clínicos mostram que qualquer modificação do estado imunológico do hospedeiro pode facilitar a proliferação de fungos endógenos, notadamente de *Candida* spp., gênero que, desde sua descoberta em 1839 pelo cirurgião alemão Bernard Von Langenbeck, mostrou ser agente causador de muitas infecções em diversos sítios anatômicos ⁶⁶. Dependendo da importância da imunodeficiência, membros desse gênero podem provocar doenças que variam desde candidíase mucocutânea localizada benigna até invasões sistêmicas, algumas vezes letais ⁹⁸.

Dentre as espécies do gênero *Candida*, *Candida albicans* é a mais frequente, atuando como agente causador de micoses sistêmicas oportunistas, e representando 60% dos isolados clínicos ^{36,49,86,97}. Embora seja parte da flora microbiana de humanos, colonizando as mucosas oral, vaginal, e trato gastrointestinal ^{100,19,82,38}, essa espécie é considerada como a mais virulenta, conforme relatado por ODDS ⁸⁷ e COLEMAN et al ²⁵. Outras espécies de *Candida* também têm sido ocasionalmente

relacionadas a infecções oportunistas, notadamente *Candida tropicalis*⁹⁸, *C. glabrata*⁶¹, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, e *C. prapsilosis*⁸⁸.

A mudança do caráter dessas leveduras comensais de patógenos infreqüentes para um dos mais importantes agentes causadores de infecções nosocomiais, tem despertado grande interesse na área médica^{4,72,99} e na indústria farmacêutica, que considera os anos 90 como a década dos antimicóticos¹⁰³.

A notícia da emergência de *Candida* spp com as referidas características começou no início dos anos 60 com eventos notáveis, similares àqueles envolvendo a transformação de *Staphylococcus* coagulase-negativo, que de um inofensivo comensal tornou-se um patógeno invasivo³¹.

Essa evolução está relacionada a fatores de risco freqüentemente associados aos avanços dos procedimentos utilizados na medicina moderna³, como utilização de catéter vascular, nutrição parenteral total, hemodiálises¹⁰⁴, implantes de prótese; e fatores de risco que afetam o mecanismo de proteção natural do organismo, como uso prolongado de antibióticos de largo espectro, quimioterapia sistêmica com esteróis ou drogas citotóxicas, imunossupressão pós transplante de órgãos; além de procedimentos cirúrgicos que resultam em tratamento hospitalar prolongado, aumento da sobrevida de pacientes de alto risco^{3,4,20,25,35,89,114,116} e recém-nascidos prematuros¹¹¹. Dentre esses pacientes, as infecções fúngicas sistêmicas podem somar 30% da causa de mortalidade⁹⁵.

De acordo com uma investigação feita nos Estados Unidos pelo NNISS (National Nosocomial Infection Surveillance System), no período de janeiro de 1980 até abril de 1990, foram isolados 27.200 fungos causadores de infecções adquiridas em 180 hospitais. As espécies de *Candida* representaram 19.621 (72,1%) desses

isolados; a proporção de infecções sistêmicas causadas por leveduras do gênero *Candida* aumentou cerca de 487% ao longo da referida década ^{9,33,54,99}.

Com base nessas observações, as espécies de *Candida* passaram do 8º para o 4º lugar como causa de septicemia durante o período de 1984-1988 ^{13,106}, suplantadas apenas por *Staphylococcus* coagulase-negativo, *Staphylococcus aureus*, e *Enterococcus* spp ^{55,104}, correspondendo, assim, a mais de 10% das causas de septicemias nosocomiais ^{1,2,9,80}.

2 – PATOGENIA

Aspectos gerais

Além dos fatores predisponentes necessários às manifestações patogênicas dos fungos oportunistas, deve-se levar em consideração os fatores de virulência das leveduras, como aderência à mucosa do hospedeiro ⁹⁰, variabilidade fenotípica, forma miceliana, produção de enzimas e toxinas ⁸⁷.

Quando a membrana da mucosa normalmente colonizada está danificada, é dada ao fungo a oportunidade de torna-se parasita, iniciando o processo de invasão do tecido pela aderência às células da mucosa do hospedeiro. A penetração se torna mais profunda ou não de acordo com a resposta imunológica do hospedeiro. Se o fungo encontra no percurso resistência mecânica inata de superfícies queratinizadas, pode produzir enzimas hidrolíticas que, junto com a formação da hifas, permite ao agente penetrar mais profundamente no epitélio ^{101,88,100}. Não havendo mais barreiras imunológicas que dificultem a invasão do fungo, como no caso de pacientes que sofrem de leucopenia ou até pancitopenia, observados em casos de leucemia avançada ou após altas dosagens de quimioterapia, a levedura pode atingir a corrente

sangüínea e causar micoses sistêmicas ¹⁰⁰.

3 – MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A candidíase em pacientes imunocomprometidos se manifesta por lesões no fígado, que são ocasionadas pela invasão de *Candida* spp naturalmente presente no intestino, alcançando o fígado e posteriormente evoluindo para abscessos.

Candidíase hepatoesplênica é a forma mais importante da candidíase disseminada crônica. Se a levedura ultrapassa a barreira do fígado enquanto houver leucopenia, pode resultar em septicemia. A manifestação mais freqüente de septicemia por *Candida*, é a candidíase renal, em que o fungo pode invadir a pélvis renal, resultando em elevado número de células leveduriformes na urina. Pacientes portadores de lesões nas valvas cardíacas podem desenvolver endocardite por *Candida*.

A maioria dos casos de pneumonia provocada por *Candida*, parece ter origem na disseminação hematogênica, ou, pode se desenvolver a partir de uma bronquite. Outras manifestações hematogênicas comuns incluem afecções do sistema esquelético, especialmente na região vertebral, ou do sistema nervoso central, como meningite crônica e, raramente, encefalite e abscessos cerebrais. Por último, as endoftalmites, que se caracteriza pelo infiltrado branco, denominado “cotton wool”, na retina, acomete cerca de 20% dos pacientes com septicemia por *Candida* ¹⁰⁰.

Em modelos experimentais, após inoculação intravenosa, ocorre infecção visceral disseminada, envolvendo diversos órgãos profundos, notadamente os rins, onde pode-se observar abscessos esbranquiçados a olho nu. Histopatologicamente, essas lesões revelam a presença de hifas e pseudo hifas, com pouca ou nenhuma

evidência de reações inflamatórias. Podem, ainda, apresentar infiltrados de polimorfos e/ou macrófagos e até formação de granuloma. Estas reações também foram relatadas em candidíase sistêmica em humanos. A predileção de *Candida* pelos rins permanece inexplicada ⁸⁷.

4 – TERAPIA COM ANTIFÚNGICOS

4.1 – Evolução dos agentes antifúngicos

Há cerca de três décadas, as micoses sistêmicas eram consideradas infecções raras e poucos médicos estavam envolvidos no tratamento dessas doenças ⁴¹. O tratamento de micoses graves teve início com a descoberta da anfotericina B (AnB), em 1953, a qual ainda é considerada como o único agente antifúngico de amplo espectro e boa eficácia ⁵³.

Esse fármaco, porém, causa efeitos indesejáveis durante a infusão, como febre, calafrios, náusea, rubor e hipotensão, e pode produzir tromboflebite, nefrotoxicidade ^{83,85,86,113} e neurotoxicidade quando administrada em altas doses ⁹⁷.

Após a introdução da anfotericina B, outros agentes antifúngicos de atividade sistêmica e eficazes no tratamento de infecções fúngicas tardaram a aparecer, devido à estagnação de pesquisas envolvendo essas infecções e a falta de interesse no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Até a exacerbação das doenças imunossupressoras, como câncer e AIDS ⁴¹, e de outros fatores que colocam em risco a vida de muitos pacientes ⁷⁷, os fungos não eram considerados, de modo geral, causadores de infecções graves.

Outra razão para a ausência do surgimento de novos antifúngicos, é a semelhança entre as células fúngicas e as células de mamíferos, pois ambas são

eucariotas. Assim, agentes que inibem a biosíntese de componentes da célula fúngica, podem mostrar maior potencial de toxicidade para o homem ³⁹.

Apesar das inúmeras dificuldades no desenvolvimento de novos antifúngicos, encontram-se atualmente disponíveis alguns fármacos, predominando os derivados azólicos, para tratamento sistêmico de candidíases graves. Mesmo assim, são freqüentes os relatos de falência terapêutica, envolvendo resistência celular e clínica a esses antifúngicos ¹¹⁸. Com o objetivo de aprimorar a terapia antifúngica, existem novos agentes em pesquisa, como também experimentos para comprovar a eficácia de drogas combinadas, na busca de maior eficácia e menor toxicidade ^{72,83,110}.

4.2 – Antifúngicos mais utilizados na terapia de micoses graves

Entre os antifúngicos mais indicados na terapia de micoses graves ou invasivas, destacam-se os derivados poliênicos, azólicos e, em ocasiões, a 5-fluorocitosina combinada a outro antifúngico ^{8,40,48,50}.

4.2.1 - Derivados poliênicos

Grupo de drogas derivadas de espécies de bactéria do gênero *Streptomyces* ⁷.

Apenas a nistatina e a anfotericina B (AnB), que ainda hoje é a droga de escolha para tratamento sistêmico da maioria das micoses graves, são utilizadas na terapia humana ^{6,20,51,64,64}.

O seu mecanismo de ação depende do conteúdo em ergosterol da membrana da célula fúngica, ao qual se liga, formando canais na parede celular. Através destes, ocorre perdas de componentes importantes para a célula. Dependendo da concentração, a AnB pode ter atividade inibitória ou letal para o fungo ^{40,49}. Embora

a anfotericina B seja a droga de escolha, ou até, a única solução para tratar muitas infecções fúngicas profundas, o seu uso é limitado devido a nefrotoxicidade que confere por meio de sua ligação aos esteróis da membrana celular de mamíferos . A nefrotoxicidade parece ser mediada, em parte, por meio de um efeito tóxico direto nas células tubulares renais, resultando em necrose tubular aguda ⁵. Além disso, induz vasoconstrição renal, com uma diminuição significativa na taxa de filtração glomerular e há perda de potássio e magnésio renais ⁹⁵.

4.2.2 - Derivados azólicos

Este grupo de antifúngicos inclui os imidazóis e os triazóis.

Os derivados imidazólicos são representados pelo miconazol, clotrimazol, econazol, butoconazol, oxiconazol, sulconazol e cetoconazol, mas apenas o miconazol e o cetocanazol são utilizados para tratamento sistêmico. Os triazóis incluem o fluconazol, o itraconazol ^{8,14,31,50} e o voriconazol ^{58,62}.

Esses fármacos atuam inibindo a enzima 14α demetilase, um membro do grupo do citocromo p450, a qual medeia a primeira fase na conversão do lanosterol a ergosterol, esterol de grande importância na formação da parede celular do fungo. No entanto, a inibição é reversível, o que confere aos azóis uma ação fungistática, e não fungicida ^{14,52}.

Os imidazóis têm afinidade também pela enzima citocromo p450 humana, resultando em certa toxicidade, enquanto que os triazóis possuem menor afinidade por esta enzima ^{8,40,44}

4.2.3 – Fluorocitosina

Este antifúngico, de uso oral, é um análogo da pirimidina que vem sendo usado na clínica por mais de 30 anos². A droga age interferindo na síntese do DNA, através da conversão da flucitosina em fluorouracil. Nas células de mamíferos a droga não consegue fazer tal conversão. Esse mecanismo é importante para a ação seletiva do fármaco⁴. No entanto, ocorrem efeitos colaterais que podem levar à disfunção hepática, assim como à leucopenia e à trombocitopenia⁶².

Alguns casos de sucesso terapêutico têm sido alcançados quando a 5FC é associada à AnB ou ao fluconazol, já que induz elevada resistência quando administrada isoladamente^{62,108}.

4.3 - Perspectivas na aplicação de novas drogas

Como o uso das drogas acima referidas desencadeia reações indesejáveis e/ou resistência, existe um elevado interesse na descoberta e no desenvolvimento de novas formulações de antifúngicos que superem a ação dos fármacos disponíveis ou que complementem a sua aplicação.

Na atualidade, diversas drogas encontram-se em diferentes níveis de estudo, incluindo formulações lipossomais da AnB, novos azóis, ecocandinas, pneumocandinas, benanomicinas, pradamicinas e aureobasidina, além de terapia combinada, mas poucas estão licenciadas.

4.3.1 - Formulações Lipossomais da anfotericina B

As formulações lipídicas da AnB: AmBisome (lipossomas), Amphocil (dispersão coloidal) e Abelcet (complexo lipídico), que surgiram no mercado nestes

últimos anos, têm se mostrado menos tóxicas que a anfotericina B convencional, em modelos animais e estudos clínicos, permitindo o uso de doses maiores que o da apresentação clássica ^{24,54,57,91}. Embora essas formulações sejam bastantes promissoras no que diz respeito à toxicidade, não são consideradas adequadas para a produção em massa, pois são de custo muito elevado ^{32,67,86,113}.

4.3.2 Novos Azóis

Novos antifúngicos azólicos encontram-se em desenvolvimento ⁷⁸, mas alguns já estão no mercado. Estes mostram boa eficácia frente a grande número de patógenos fúngicos, como os triazóis voriconazole (Pfizer), posaconazole (SCH56592, Noxafil - Schering-Plough ^{73,116}, ravuconazole (BMS-207147; Bristol Myers Squibb) ⁵⁶, RIZ0758 (Sankyo), T8581 (Toyama), UR-9746 e UR-9751 (Uriach) ⁴⁶.

O voriconazol e o posaconazol têm espectro de ação mais amplo que o fluconazol, apresentando boa atividade contra espécies de *Aspergillus* já comprovada *in vitro* e *in vivo* ⁵⁶, e o primeiro é eficaz também contra *Penicillium marffeii*, e espécies de *Fusarium* ⁴⁶. No entanto, é provável que essas drogas sejam pouco eficazes contra espécies de *Candida* resistentes ao fluconazol. A toxicidade destes agentes ainda não foi elucidada ^{58,59,62,113}. O voriconazol é quimicamente similar ao fluconazol, com níveis plasmáticos que parecem ser variáveis; não apresenta interações medicamentosas consideráveis como o itraconazol, mas possui efeitos colaterais transitórios importantes, como alucinações ⁴⁶.

O posaconazol apresenta similaridade estrutural ao itraconazol, possui atividade contra uma variedade de leveduras, zigomicetos e outros fungos

patogênicos. Alguns estudos mostraram que o posaconazol é mais ativo do que o itraconazol e o fluconazol contra isolados clínicos de fungos filamentosos como *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Rhizopus* spp., e *Pseudallescheria boydii*. Este antifúngico também mostrou eficácia contra fungos dimórficos como *Blastomyces dermatitidis* e *Histoplasma capsulatum*⁹². Suas propriedades farmacocinéticas são dose-dependentes⁴⁶.

O ravuconazol possui atividade *in vitro* contra espécies de *Blastomyces*, *Coccidioides*, *Histoplasma*, *Fusarium*, *Aspergillus* e leveduras resistentes ao fluconazol. Sua meia vida é a mais longa entre os azóis de uso oral⁴⁶.

4.3.3 – Família candina

Estas drogas representam uma nova classe de lipopeptídeos que atuam na parede celular fúngica inibindo a enzima 1,3-beta-d-glucana sintetase, que é responsável pela formação de polímeros de glucana essenciais na constituição da parede celular do fungo^{46,79,84}. Essa família de antifúngicos foi primeiro descoberta durante os anos 70, quando foi originada a primeira geração destas drogas, representada pela papulocandina. Com espectro de ação restrito à algumas espécies de *Candida*⁸⁰, foi desenvolvida a geração seguinte, a equinocandina B. Seu derivado semi-sintético, Cilofungin (LY 121019), foi descartado de pesquisas devido a nefrotoxicidade do composto utilizado para solubilizar a substância para uso sistêmico⁸⁴.

A terceira geração dessa família é representada por três compostos semi-sintéticos derivados da echinocandina B e pneumocandina B, com espectro de ação mais amplo, incluindo *Aspergillus* spp⁸⁴:

LY303366 (VER-002, V-equinocandin: Versicor) – derivado semi-sintético da equinocandina B;

MK-0991 (casposfungin, cancidas:Merck) – derivado da pneumocandina B com melhor farmacocinética e perfil mais seguro; embora sua atividade seja específica para *Candida albicans* e *C. tropicalis*, possuem citotoxicidade por ação hemolítica, que ocorre naturalmente com os lipopeptídeos, conferindo-lhes restrição no desenvolvimento de estudos clínicos ^{42,94};

FK463 (Micofungin: Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan) esta nova droga possui potente atividade *in vitro* e *in vivo* contra espécies de *Candida*. Estudos mostraram que, em certas doses tem capacidade de inibir a aderência da levedura às células epiteliais. Uma vez que a aderência é o passo inicial para a invasão do fungo no hospedeiro, causando-lhe a infecção, os resultados destes estudos estimulam novas pesquisas para investigar o uso do FK463 no tratamento de micoses sistêmicas ¹²⁰.

4.3.4 - Benanomicinas e Pradamomicinas

São drogas produzidas por actinomicetos. Possuem formulações solúveis em água, que são ativas *in vitro* e *in vivo* contra uma grande variedade de fungos patogênicos, incluindo espécies de *Candida*, *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans*.

Apresentam ação fungicida, resultante de interação físico-química com a membrana da célula fúngica ¹¹³.

4.3.5 - Aureobasidinas

Nova classe de depsipeptídeos cíclicos produzidos a partir do fungo *Aureobasidium pullulans*. Esses fármacos são representados pela aureobasidina, com potente ação *in vitro* contra *Candida* e toxicidade relativamente baixa em culturas de células humanas¹¹³. Segundo estudos recentes, seu mecanismo de ação é baseado na ação contra a fosforilceramida inositol (IPC), uma enzima importante no crescimento do fungo¹¹³.

4.3.6 – Outras drogas

AG 2000 – É a forma ativa do lansoprazol, um novo benzimidazol que possui atividade conhecida apenas sobre a bactéria *Helicobacter pylori*. O lansoprazol está diretamente relacionado ao omeprazol, que é utilizado no tratamento de refluxo gastroesofágico, inibindo a secreção gástrica. Estudos sugerem que, apesar do mecanismo de ação do AG 2000 não estar ainda elucidado, a droga pode inibir o desenvolvimento de hifas de *Candida albicans*, impedindo a aderência da levedura na mucosa de hospedeiros infectados¹¹.

Sordarinas – É uma família de drogas antifúngicas, cujo mecanismo de ação é baseado na inibição da síntese proteica do fungo²⁹. Grupo ainda em estudo devido a similariedade entre o mecanismo de síntese de proteínas dos fungos e de humanos³⁴.

4.4 – Drogas combinadas

Embora exista considerável número de agentes antifúngicos disponíveis no comércio, o tratamento das candidíases sistêmicas ainda representa um problema

complexo. A clínica médica não dispõe de medicamentos que possuam boa eficácia e baixa toxicidade.

Portanto, os estudos de interações entre drogas, têm sido considerados importantes, incluindo aquelas com espectro de ação conhecido, no intuito de se obter efeitos sinérgicos. Assim, será possível a utilização de uma droga de baixa toxicidade e alta eficácia em doses menores que as usuais, possibilitando amplo uso em micoses graves ^{27,31,113}.

Desde o final dos anos 60 já havia tentativa de combinar a AnB com rifampicina ou com 5-fluorocitosina com resultados encorajadores em infecções experimentais e em alguns pacientes ^{58,113}. Desde então, muitos estudos *in vitro* também têm sido realizados envolvendo a AnB e antifúngicos azólicos ^{71,110} ou outras drogas ^{10,22,48,66}, mas são poucos os experimentos que demonstraram a eficácia terapêutica dessas associações como a combinação de AnB e 5-fluorocitosina no tratamento da criptococose e candidíase disseminada ^{83,23}.

Muitos estudos de associação entre a anfotericina B e um derivado azólico mostram resultados controvertidos, pois a utilização dessas duas drogas provavelmente resultaria em antagonismo ⁷⁶. Esse parecer está baseado na hipótese de que inibindo a produção do ergosterol, o azol impediria a formação da molécula-alvo da AnB, na membrana celular do fungo ^{23,112}. No entanto, verificou-se interação aditiva ou sinérgica entre AnB e 5-fluorocitosina, cetoconazol ou miconazol, frente a maioria das cepas de *Candida não albicans* estudadas ⁸⁸.

Em outro estudo, CURY *et al* utilizaram a combinação AnB-metronidazol *in vitro*, o que proporcionou uma potencialização das atividades inibitória e letal de ambas as drogas contra a maioria das cepas avaliadas. Nessa associação, a CIM da

AnB foi 16 vezes menor que a da droga isolada ²⁷.

Para que uma interação entre drogas seja reconhecida, é essencial que se entenda a farmacologia de cada droga envolvida. É necessário, também, que se conheça não apenas os efeitos desejáveis da droga, mas, principalmente, os efeitos adversos. De acordo com Goodman e Gilman ⁸, existem dois tipos principais de interação: a farmacocinética e a farmacodinâmica. Na farmacocinética, a interação da droga envolve mudança na absorção, distribuição, metabolismo ou excreção de ambas as drogas. A farmacodinâmica envolve interação entre agonistas e antagonistas no sítio receptor da droga. Os antifúngicos podem produzir ambos os tipos de interação ¹⁰.

4.5 – Aspectos químicos e farmacológicos da anfotericina B e do Metronidazol

4.5.1 – Anfotericina B (AnB)

AnB é um antibiótico macrolídeo poliênico anfotérico, formado por um anel macrolídeo que contém uma cadeia de poli-hidroxil hidrofílica em um dos lados e uma cadeia de hidrocarbono poliênico lipofílico no outro ¹¹⁹, responsáveis pela formação de poros em camadas lipídicas de membranas que contêm esteróis ⁷⁰. É pouco solúvel em água. É produzido por *Streptomyces nodosus*, e desde sua descoberta (1956), tem sido a droga de escolha para o tratamento da maioria das infecções fúngicas sistêmicas ^{35,69}. Como referido, até recentemente era o único antifúngico que podia ser administrado por via sistêmica. Atua ligando-se ao ergosterol da membrana da célula fúngica, por meio de um mecanismo ainda não totalmente elucidado. Acredita-se que altere as porinas da estrutura da membrana,

formando canais por onde extravasam íons intracelares ³⁴. Também produz danos oxidativos na célula fúngica, o que contribuiu para seu efeito letal ¹⁰⁶.

É potencialmente tóxica, notadamente para o rins, mesmo em doses baixas ^{6,8,10}. Possui amplo espectro de ação, apresentando atividade clínica útil contra *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Blasomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Candida glabrata*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Aspergillus* spp., *Penicillium marneffe* e agentes da mucormicose ⁸.

AnB não é eficaz no tratamento de infecções causadas por *Candida lusitanae* ^{14,112} e por alguns poucos mutantes de *C. albicans*, que desenvolvem a habilidade de produzir esteróis alternativos ao ergosterol na sua membrana celular, eliminando, assim, o sítio de ação da droga. Espécies de *Fusarium* spp e *Pseudallescheria boydii* são geralmente resistentes, embora este mecanismo de resistência ainda não tenha sido bem definido ⁴⁰.

Na formulação clássica, a droga é comercializada na forma de pó liofilizado, que contém 50 mg de anfotericina B, 41mg de desoxicolato e uma pequena quantidade de um tampão de fosfato de sódio ⁸.

4.5.2 – Metronidazol (Me)

O metronidazol é um quimioterápico de largo espectro, derivado nitroimidazólico, ativo contra bactérias anaeróbias estritas e protozoários ^{18,65,60}. É amplamente utilizado no tratamento de amebíases comuns, amebíases sistêmicas, giardíases, balantidíases, doença de Crohn, leishmanioses, peritonites causadas por *Bacteroides fragilis* e tricomoníase, como também de infecções por bactérias anaeróbias, como *Gardnerella vaginalis* e *Campylobacter fetus* ⁶⁵. Em muitos

países, é a droga de escolha no tratamento de giardíases ¹⁰⁵.

Seu mecanismo de ação ainda não é totalmente conhecido, mas acredita-se que após penetrar na célula, a droga seja reduzida a um metabólito menos polar, possivelmente pela ação de proteínas transportadoras de elétron, de baixo potencial redox, como as ferredoxinas. Em seguida, liga-se ao DNA degradando-o, mediante a ruptura das ligações entre as cadeias do DNA, o que resulta na morte celular de determinados microrganismos ^{18,105}.

A toxicidade do Me só foi observada em animais de laboratório. Entre elas, teratogenicidade e embriotoxicidade.¹⁸.

II - OBJETIVOS

Propusemo-nos a realizar este trabalho, com os seguintes objetivos:

1- estudar o desenvolvimento da infecção em camundongos tratados com AnB e Me, de modo isolado e combinado, em comparação com camundongos não tratados, mediante os seguintes parâmetros:

- a) alteração no aspecto físico do animal: pêlos, atividade física, peso corpóreo
 - b) tempo de sobrevivência
 - c) aspecto tecidual dos rins
 - d) isolamento de leveduras a partir dos rins.
-

III - MATERIAIS E MÉTODOS

1 Levedura

A cepa de *Candida albicans* ICB 128/98, utilizada neste experimento foi isolada de uma paciente, com candidíases vaginal, atendida no Hospital Infantil Darcy Vargas. Essa cepa foi gentilmente fornecida pelo Laboratório de Micologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

2 - Animais

Foram utilizados 200 camundongos BALB/c ^{6,79,83,99}, machos e fêmeas, com cerca de 30 gramas de peso corpóreo e três meses de idade, provenientes do Biotério do Conjunto das Químicas – USP. Os animais foram distribuídos em grupos de acordo com o tratamento realizado.

Os camundongos foram alimentados com ração fornecida pelo próprio biotério e água de torneira. As gaiolas eram higienizadas a cada dois dias.

3 - Drogas

Foram utilizados produtos disponíveis no comércio sob a forma injetável. O Fungizon[®] (SQUIBB- MYERS Indústria Química S/A) contendo 50mg de anfotericina B, foi gentilmente cedido pelo fabricante. O metronidazol (Flagyl[®], Rhodia), foi adquirido no comércio.

4 - Meios de Cultura

Ágar Sabouraud dextrose ⁶⁰

Composição:

dextrose.....20g
peptona.....10g
ágar.....15g
água destilada qsp.....1000ml

Preparação:

O ágar foi dissolvido na água fervente e, em seguida, os outros componentes foram adicionados. Cerca de 20 ml desse meio foram distribuídos em tubos de ensaios e autoclavados a 120° C, durante 15 minutos. Em seguida, foram inclinados.

Utilização:

Para manutenção da cepa utilizada na inoculação.

Ágar Sabouraud dextrose com antibiótico ⁴⁷

Composição:

dextrose.....20g
peptona.....10g
ágar.....15g
água destilada qsp.....1000ml
cloranfenicol(500mg).....16µg
gentamicina(40mg).....5µg

Preparação:

O ágar foi dissolvido em água fervente e, em seguida, os outros componentes

foram adicionados. Por último, foram incluídos os antibióticos. Em seguida, volumes de 20 ml foram distribuídos em tubos de ensaio, autoclavados a 120° C durante 15 minutos e guardados na geladeira. Sempre que necessário, o meio era fundido em água fervente e vertido em placa de Petri esterilizada.

Utilização:

Recuperação de leveduras provenientes dos rins de camundongos tratados e infectados.

5 – Soluções

Solução Fisiológica a 0,85% ³⁵

Composição

NaCl.....0,85g

água destilada100ml

Preparação

O sal foi dissolvido na água e a mistura foi esterilizada em autoclave a 120° C por 15 minutos.

Utilização

Preparação do inóculo, e na homogeneização dos rins para posterior semeadura em ágar Sabouraud.

Água destilada esterilizada

Utilização

Diluição inicial da AnB (Fungizon) na preparação da solução glicosada.

Solução Glicosada (5%)Composição

glicose.....5g

água destilada100ml

Preparação

A solução foi esterilizada em autoclave a 120° C por 15 minutos. Sempre que necessário, o pH da solução era ajustado (acima de 4,2) com tampão fosfato, antes de completar o volume da água indicado.

Utilização

Para diluições do Fungizon.

Solução TampãoComposição

fosfato de sódio dibásico.....1,59g

fosfato de sódio monobásico.....0,96g

água destilada qsp.....100ml

Preparação

Os componentes foram misturados e, em seguida, esterilizados, em autoclave a 120 ° C por 30 minutos.

Utilização

Adição de 1 a 2 ml durante a preparação do soro glicosado, quando o pH era inferior a 4,2.

Solução de Formol Tamponado

Composição

fosfato monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$).....	4g
fosfato bissódico (Na_2HPO_4).....	4,5g
formol.....	100ml
água destilada.....	900ml

Preparação

Os sais foram dissolvidos na água e, em seguida, o formol foi adicionado. O pH da solução se manteve em torno de 7. Conservação na geladeira.

Utilização

Para manutenção dos rins dos camundongos, para cortes histopatológicos.

6 -Preparação do Inóculo

O inóculo, utilizado para a indução da candidíase sistêmica, foi preparado a partir de cultivo da levedura em ágar Sabouraud dextrose, por 18 h ⁷⁴ a 36° C. Após uma série de inoculações nos animais, foi observado que o tempo de sobrevida desejável para o experimento, cerca de 12 dias, foi obtido com uma suspensão contendo $4,2 \times 10^6$ células/ml da levedura. As células foram lavadas 3 vezes, por centrifugação, em solução fisiológica esterilizada ¹⁰⁹. A suspensão foi ajustada, com o auxílio da câmara de Neubauer ⁷⁹. Inicialmente, foram estudados 5 animais para avaliar o tempo de sobrevida dos mesmos após administração do inóculo em questão. Foram administrados 100µl da suspensão, por meio de injeção na veia lateral da cauda ^{59,79,83}.

7 - Administração das Drogas e Esquema Terapêutico

As doses de AnB foram preparadas segundo instruções do fabricante. Foram administradas a dose máxima indicada da droga e a metade desta. Assim, para a AnB, foram utilizados 0,5 mg/Kg e 0,25mg/Kg. Da mesma maneira, foram estabelecidas as doses para o Me injetando-se 22,5mg/Kg e 11,25mg/Kg. As doses foram ajustadas de acordo com o peso médio do grupo de animais utilizados ⁶.

O tratamento, ministrado também através da veia lateral da cauda, foi iniciado no 2º dia após a infecção, e continuado nos 4º e 6º dias, totalizando um esquema terapêutico de 3 doses.

8 – Delineamento experimental

Os animais, distribuídos ao acaso em 8 grupos, contendo 10 camundongos/grupo, foram tratados como segue:

GRUPO I - animais infectados, sem tratamento (controle positivo da infecção)

GRUPO II - animais não infectados, injetados com solução salina.

GRUPO III – animais não infectados, injetados com AnB na dose 0,5 mg/Kg (dose máxima permitida)

GRUPO IV - animais infectados, tratados com AnB 0,5 mg/Kg

GRUPO V – animais infectados e tratados com AnB na dose 0,25 mg/Kg

GRUPO VI – animais infectados, tratados com Me na dose 22,5 mg/Kg (dose máxima permitida)

GRUPO VII - animais infectados, tratados com a associação AnB 0,25 mg/Kg e Me 22,5 mg/Kg

GRUPO VIII – animais infectados, tratados com a associação AnB 0,25 mg/Kg e Me 11,25 mg/Kg

9 – Avaliação do tratamento

Os parâmetros utilizados para a avaliação do tratamento dos diferentes esquemas terapêuticos, foram: peso médio, tempo de sobrevivência, aspecto físico dos animais, como também, a recuperação de leveduras a partir dos rins e histopatologia renal.

A partir do início do experimento, os animais foram pesados diariamente, e ao completarem 30 dias, quando todos os animais foram sacrificados. Os rins dos animais durante esse ou no final desse período, foram retirados e pesados. Em seguida, metade foi separada e pesada. Esta fração foi homogeneizada em 1 ml de solução fisiológica e um volume de 100µl foi semeado em ASD com antibióticos. Após 24 de incubação a 36°C, procedeu-se a contagem de ufc^{47,59,109}.

O restante do órgão foi fixado em solução de formol, para posterior exame histopatológico, por meio de coloração com HE (Hematoxilina Eosina) e Grocott. Além das alterações histopatológicas, esse exame teve a finalidade de quantificar as células fúngicas presentes no corte, a partir de contagem por campo microscópico (x400). Esses achados foram relatados como: raras, quando encontradas menos de uma célula fúngica; pequena quantidade de 1 a 5; moderada quantidade, de 6 a 25, e grande quantidade quando observadas mais de 30 células²³.

IV – RESULTADO

Foram observados os seguintes resultados :

Aspecto Físico

Após 24 horas da inoculação de $4,2 \times 10^6$ células /ml, os animais de todos os grupos infectados apresentaram considerável perda de peso e aspecto de pêlo molhado (Figura 1), além de diminuição de atividade física.

No Grupo III, verificou-se alteração de motilidade e equilíbrio similar à labirintite. Alguns destes animais foram sacrificados devido a intensidade deste distúrbio. O mesmo quadro foi observado em alguns animais do Grupo IV.

Os animais incluídos nos Grupos VI e I mostraram acentuada perda de peso que progrediu até a morte dos mesmos (Gráfico 1)

Verificou-se que os animais dos Grupos V, e III mantiveram o peso constante, após a perda inicial no começo do experimento, embora apenas 40% dos animais do Grupo V tenham sobrevivido até o final do 30º dia (Gráfico 2).

Entre os animais infectados e tratados, a recuperação do peso inicial foi evidenciada apenas para aqueles do Grupo VIII (Gráfico 3), submetidos a tratamento com a associação (AnB 0,25 mg/Kg e Me 11,25 mg/Kg). Esta recuperação não foi observada nos camundongos tratados somente com a dose usual de AnB (Grupo IV – AnB 0,5 mg/Kg)

Sobrevida

A sobrevida média dos animais do Grupo I e do Grupo VI correspondeu a 12 e 10 dias respectivamente. Em cada um desses grupos, a primeira morte ocorreu no 7º ou no 8º dia após a infecção e a última no 19º dia. A diferença entre esses grupos, do ponto de vista estatístico, foi significativa ($p= 0,001$)

Os animais do Grupo V apresentaram sobrevida média de 23 dias, com morte de 60% deles, antes de completar o período do experimento.

Os animais que receberam monoterapia com dose máxima de AnB (0,5 mg/Kg, Grupo IV) sobreviveram, em média, 29 dias, assim como os do Grupo III, que livres de infecção e injetados com 3 doses de AnB (0,5 mg/Kg). Ao final do experimento, 80% dos animais de ambos os grupos permaneceram vivos.

Os Grupos VIII e VII, de animais que receberam terapia associada (respectivamente, AnB 0,25 mg/Kg + Me 22,5 mg/Kg e AnB 0,25 mg/Kg + Me 11,25 mg/kg), sobreviveram, até o final do experimento (tabela 1).

Isolamento de Colônias

A recuperação de leveduras a partir de todos os animais dos Grupos VI e I foi $> 10^7$ unidades formadoras de colônias por grama (ufcs/g) de rim. De animais do Grupo V que receberam monoterapia com a menor dose de AnB (0,25mg/Kg) foram recuperados 3×10^4 ufcs/g de rim em média.

A partir de animais do Grupo IV, submetidos a monoterapia com a maior dose AnB (0,5mg/Kg), a recuperação foi visivelmente menor, alcançando 10^3 ufcs/g de rim em 30% dos camundongos. De 40% dos animais do Grupo VII, tratados com AnB (0,25mg/Kg) e Me (22,5 mg/Kg) foram recuperadas 3×10^3 ufcs/g de rim.

Também a partir e 40% dos animais do Grupo VIII, cujo tratamento fora semelhante ao dos animais do Grupo VII (diferenciando-se apenas na dose de metronidazol que, neste caso, foi de 11,25mg/Kg) foram isoladas 2×10^3 ufc/g de rim (Tabela 2).

Avaliação macroscópica do rim

Ao exame macroscópico dos rins dos animais do grupo controle positivo da infecção e do grupo tratado com Me isolada, foram observados abscessos em um ou ambos os rins. Em adição, foi evidenciada hipertrofia ou hipotrofia, além de hipocromia destes órgãos (Figuras 3 e 4).

Embora menos intensas, essas alterações foram também encontradas em rins de alguns animais tratados apenas com AnB 0,25. Nos demais grupos não foram observadas alterações sugestivas de degeneração tecidual.

Análise histopatológica do rim

Coloração com H.E.(Hematoxilina Eosina)

Para os animais controle-positivos da infecção (Grupo I), evidenciou-se acúmulo de exsudato supurativo na pélvis renal e presença de intenso infiltrado inflamatório perivascular, assim como de múltiplos microabscessos intraepiteliais (Figuras 5 e 6). Nestes grupos também foi possível a visualização de grande quantidade de blastoconídios e pseudo-hifas no abscesso renal (Figura 11).

As amostras provenientes de animais tratados apenas com a maior dose de AnB (Grupo III), apresentaram perivasculite, degeneração vacuolar no epitélio tubular (Figuras 7 e 8), extensa nefrite intersticial crônica e necrose do epitélio tubular renal, caracterizando nefrose tóxica (Figura.9); neste grupo não foi possível a

visualização de blastoconídios ou pseudo hifas. Os cortes histológicos dos rins dos animais submetidos a monoterapia com a menor dose de AnB (0,25mg/Kg) apresentaram microabscessos e infiltrado intersticial, além de piócitos no lúmen tubular, como também, moderada quantidade de células leveduriformes em amostras de alguns animais desse grupo.

Para os animais tratados com a associação de drogas observaram-se áreas de comprometimento tubular e infiltrado de células mononucleares no interstício. Também foram evidenciadas, embora em campos restritos do órgão, necrose tubular e degeneração nuclear (Figura 10). Não foi possível a visualização de células leveduriformes nas amostras desses grupos.

Coloração com Grocott

Por meio dessa coloração, que permite a observação de células fúngicas no tecido renal, verificou-se a presença de blastoconídios e pseudo-hifas (Figura 12) nas amostras de todos os animais dos grupos controle-positivo da infecção (Grupo I), e tratados com monoterapia por Me (Grupo VI). Também foram evidenciadas moderada quantidade dessas células em cerca de 40% dos animais tratados com a monoterapia na menor dose de AnB (Grupo V).

Nenhuma célula leveduriforme foi identificada nas amostras dos animais do grupo tratado com a maior dose de AnB (Grupo IV)

Nos dois grupos tratados com a associação das drogas (Grupo VII e VIII), foram evidenciadas, em algumas lâminas, a presença de raros blastoconídios e pseudo-hifas.

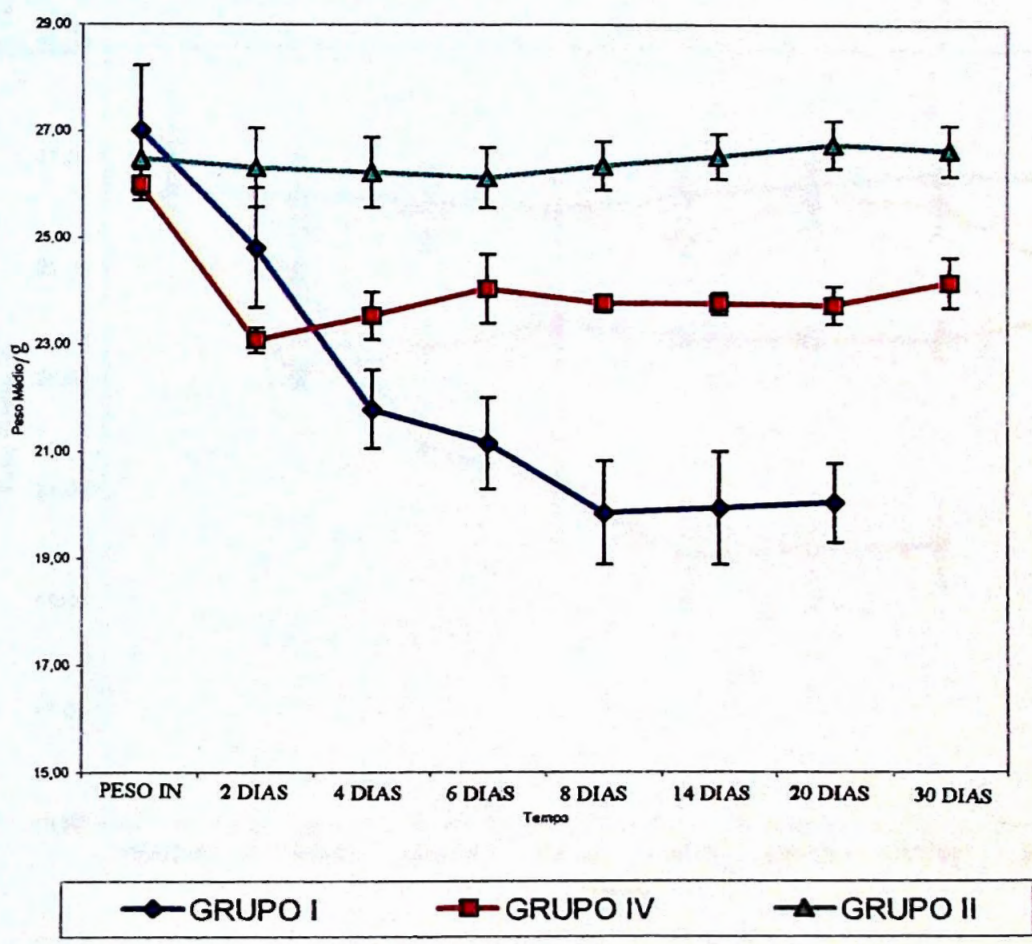
Tabela 1 – Análise do efeito do tratamento com AnB isolada e associada a Me na sobrevida dos animais infectados com *C. albicans*.

Grupo	Dose (mg/Kg)	Sobrevida média (dias)	Número de sobreviventes
Grupo I	Controle positivo	12	0
Grupo II	Controle negativo	30	10
Grupo III	AnB 0,5-não infectado	29	08
Grupo IV	AnB 0,5	29	08
Grupo V	AnB 0,25	23	04
Grupo VI	Me 22,5	10	0
Grupo VII	AnB 0,25+Me 22,5	30	10
Grupo VIII	AnB0,25+11,25	30	10

Tabela 2 – Recuperação de *C. albicans* e unidades formadoras de colônias (ufcs) a partir dos rins dos animais infectados e tratados após infecção.

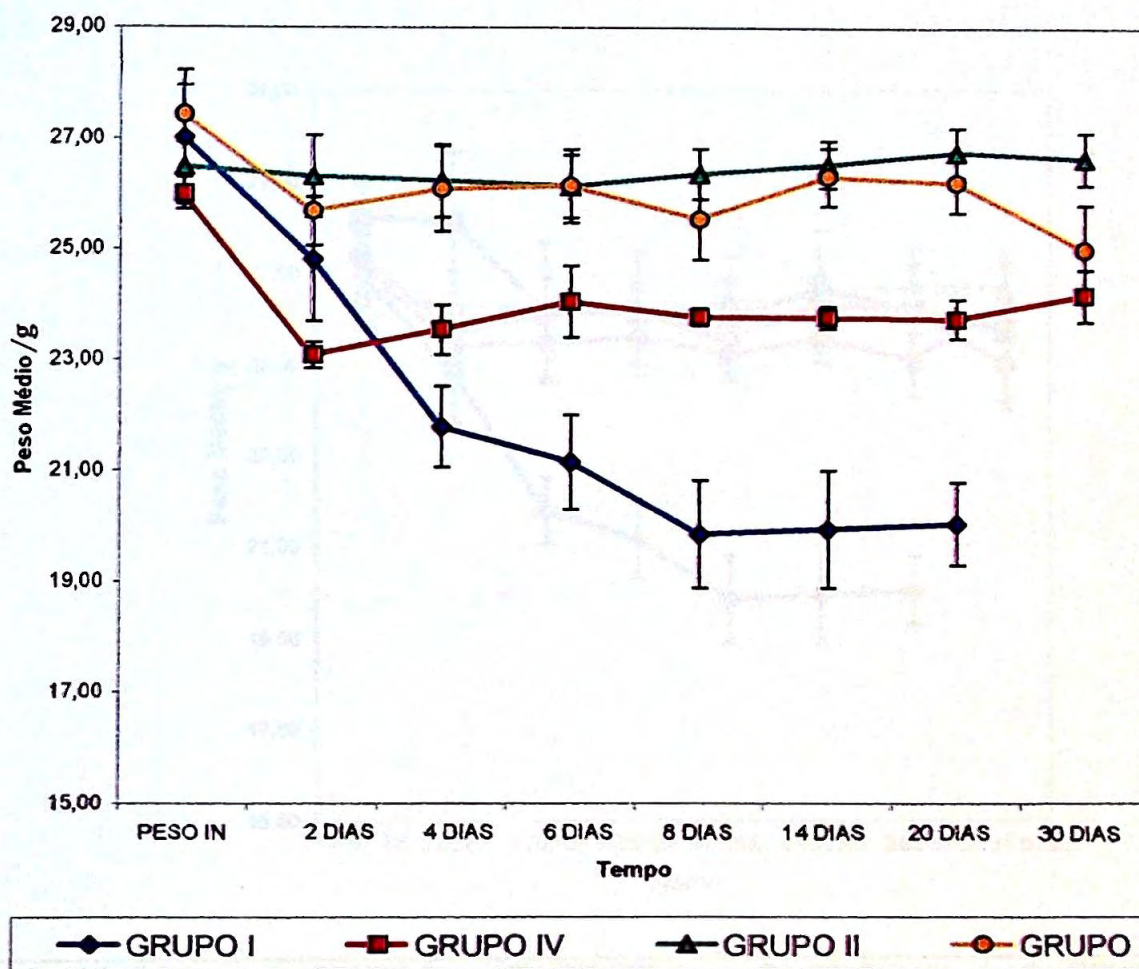
Grupo	Dose (mg/Kg)	Rec. de leveduras (n°positivos/testados)	Média de ufcs/g de rim
Grupo I	Controle positivo	10/10	$>10^7$
Grupo II	Controle negativo	-	-
Grupo III	AnB 0,5 não infectado	-	-
Grupo IV	AnB 0,5	3/10	10^3
Grupo V	AnB 0,25	6/10	3×10^4
Grupo VI	Me 22,5	10/10	$>10^7$
Grupo VII	AnB 0,25+Me 22,5	4/10	3×10^3
Grupo VIII	AnB 0,25+Me 11,25	4/10	2×10^3

Gráfico 1 - Comparação do Peso Médio dos Grupos I,II e IV ao longo do tempo (com barra de erro padrão)



Legenda:
Grupo I – Controle positivo
Grupo II – Controle negativo
Grupo IV – AnB 0,5 (mg/Kg)

Gráfico 2 - Comparação do Peso Médio dos Grupos I,II,IV e VII ao longo do tempo (com barra de erro padrão)



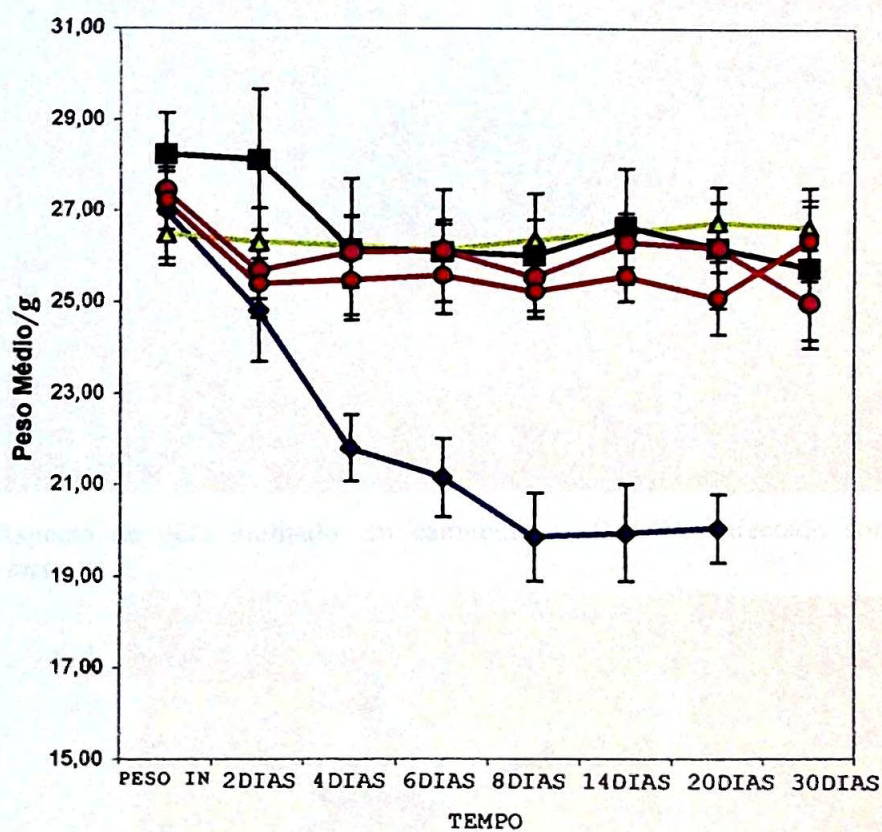
Grupo I – Controle positivo

Grupo II – Controle negativo

Grupo IV – AnB 0,5 (mg/Kg)

Grupo VII – AnB 0,25(mg/Kg) +Me 22,5 (mg/Kg)

Gráfico 3 - Comparação do Peso Médio dos Grupos I,II,V,VII e VIII ao longo do tempo (com barra de erro padrão)



GRUPO I
 GRUPO II
 GRUPO V
 GRUPO VII
 GRUPO VIII

Legenda:

Grupo I – Controle positivo

Grupo II – Controle negativo

Grupo V – AnB 0,25 (mg/Kg)

Grupo VII – AnB 0,25 (mg/Kg) + 22,5 (mg/Kg)

Grupo VIII – AnB 0,25 (mg/Kg) + 11,25 (mg/Kg)



Figura 1 – Aspecto de pêlo molhado em camundongo BALB/c infectado com *Candida albicans*.

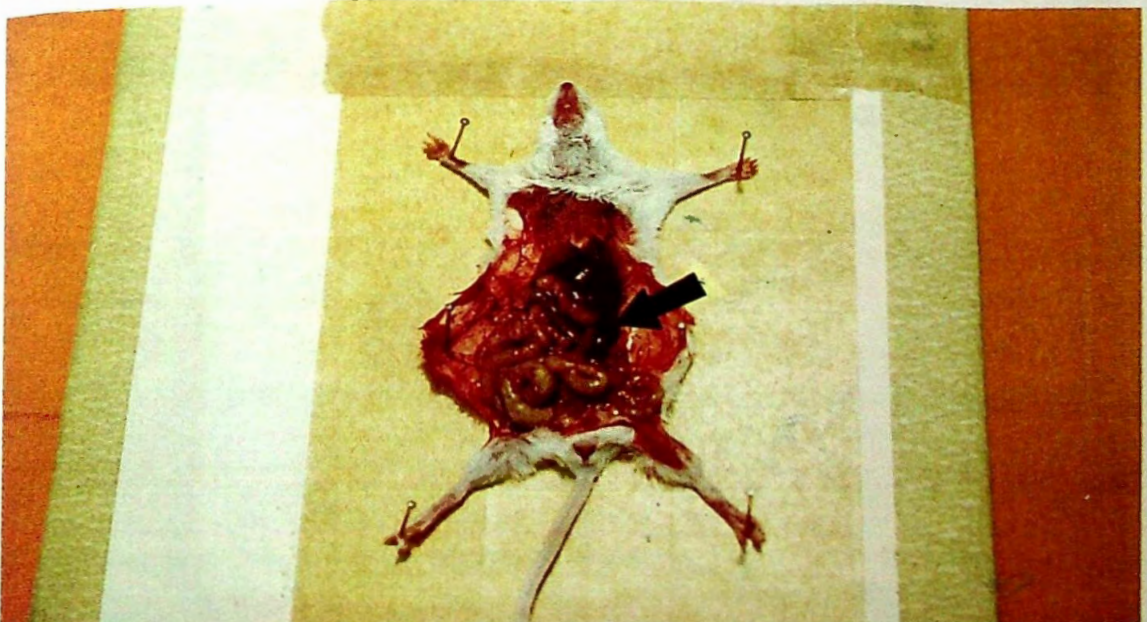


Figura.2 – Aspecto macroscópico de rins *in situ* de camundongo BALB/c infectado por *Candida albicans*.

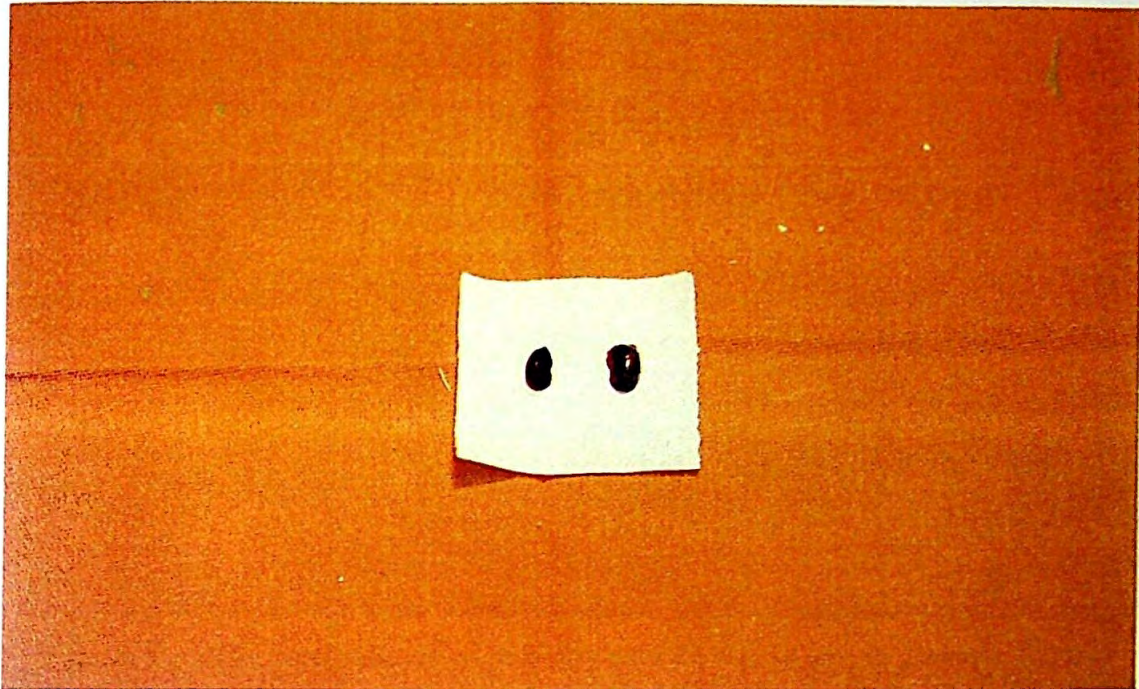


Figura. 3 – Aspecto macroscópico de rins de camundongos BALB/c, em que observa-se o rim direito infectado, apresentando quadro de piodenofrose e hipertrofia rim esquerdo sadio, preservado no seu tamanho.

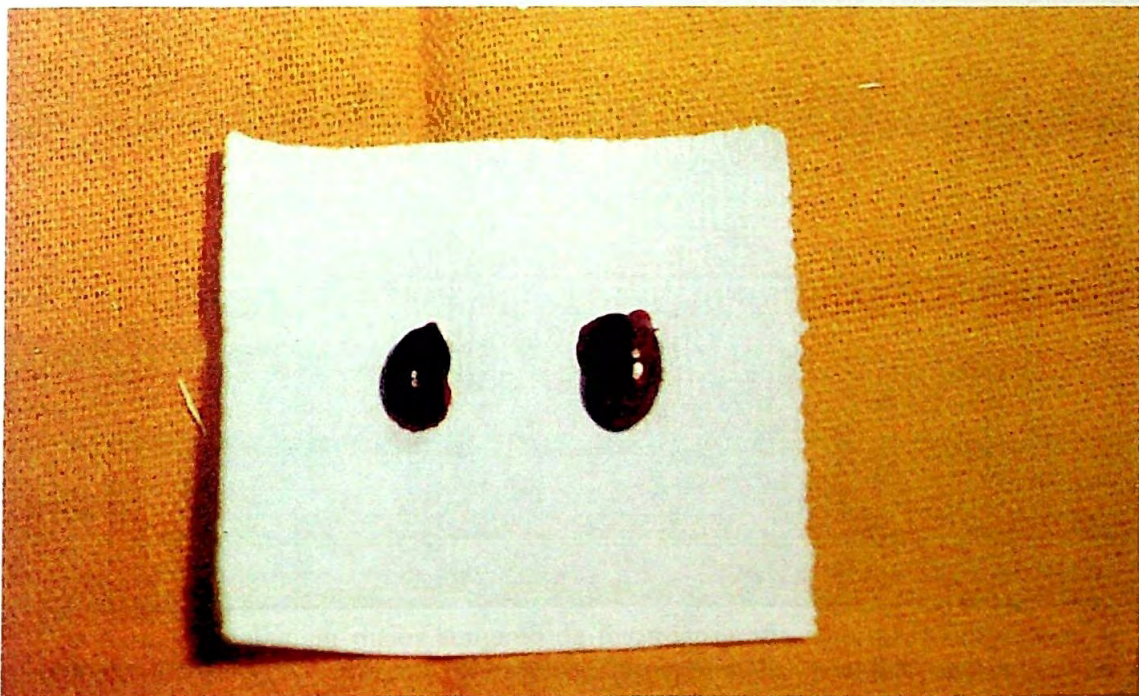


Figura.4 – Foto anterior em maior resolução.



Figura. 5 – Fotomicrografia de corte histológico de rim de animal controle positivo da infecção, mostrando acúmulo de exsudato supurativo na pélvis renal. Nota-se, ainda, epitélio de transição, revestindo a pélvis e, à esquerda, infiltrado inflamatório perivascular, ao redor da arteríola e vênula. (H.E., x 36).

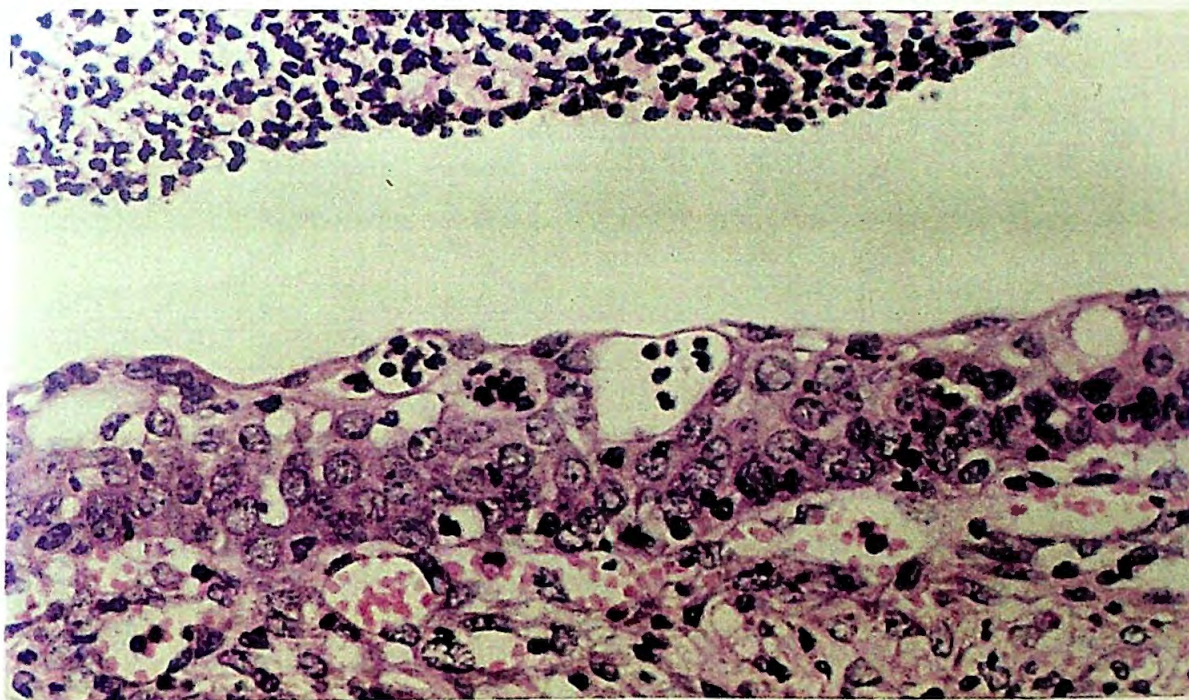


Figura. 6 – Detalhe em maior aumento da fotomicrografia anterior, evidenciando o epitélio de transição com microabscessos intraepiteliais, exsudato supurativo no espaço pélvico e infiltrado discreto de mononucleares na matriz extracelular da região subepitelial. (H.E., x140).

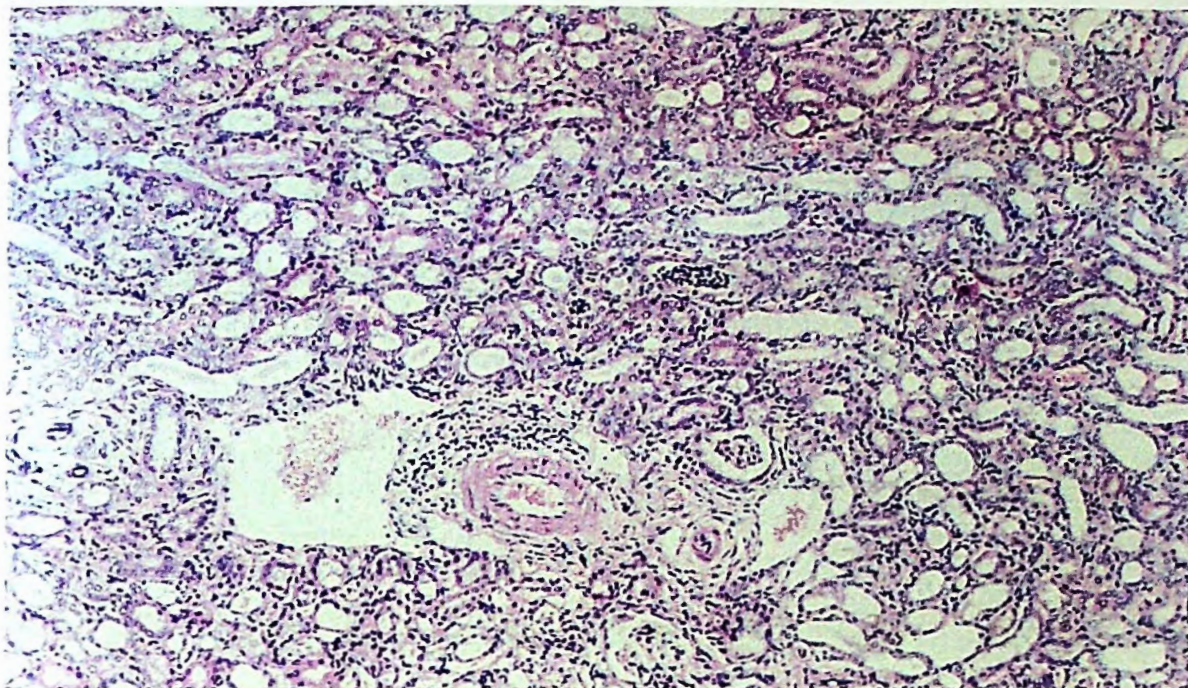


Figura. 7 – Fotomicrografia de corte histológico de rim de animal infectado tratado com AnB 0,5 mg/Kg, mostrando quadro de perivascularite e nefrite intersticial crônica. (H.E., x36).

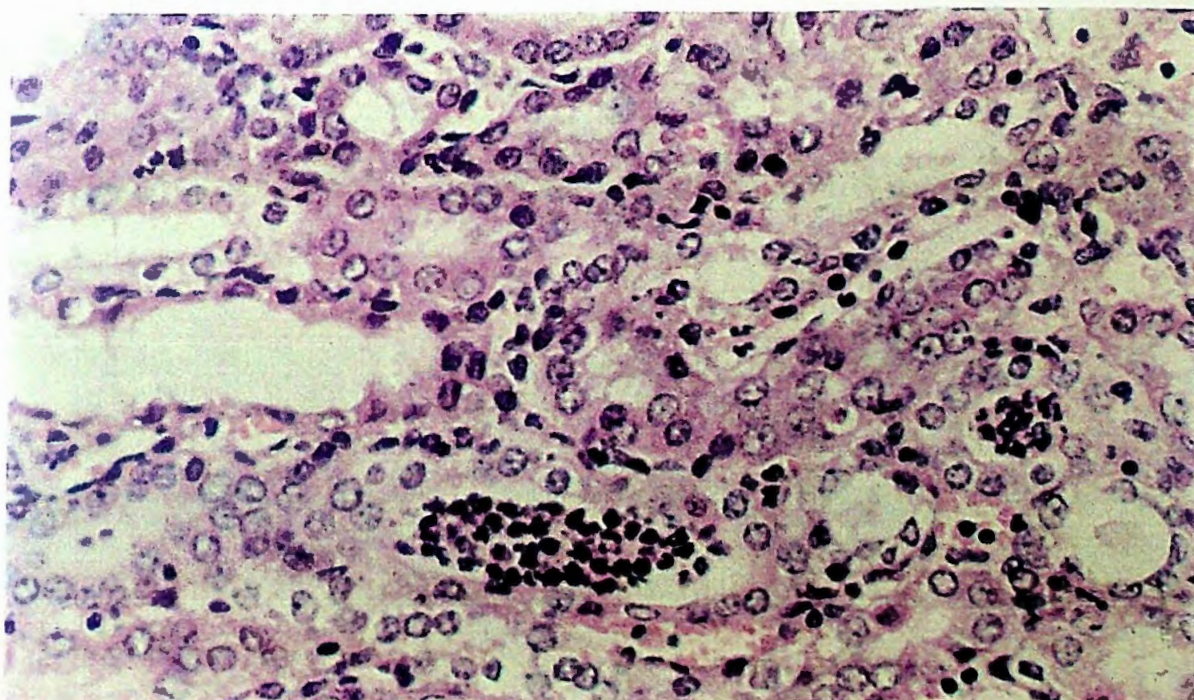


Figura. 8 – Detalhe em maior aumento da fotomicrografia anterior, evidenciando infiltrado predominantemente de mononucleares no interstício, túbulos repletos de neutrófilos com o epitélio tubular exibindo degeneração vacuolar. (H.E., x140).

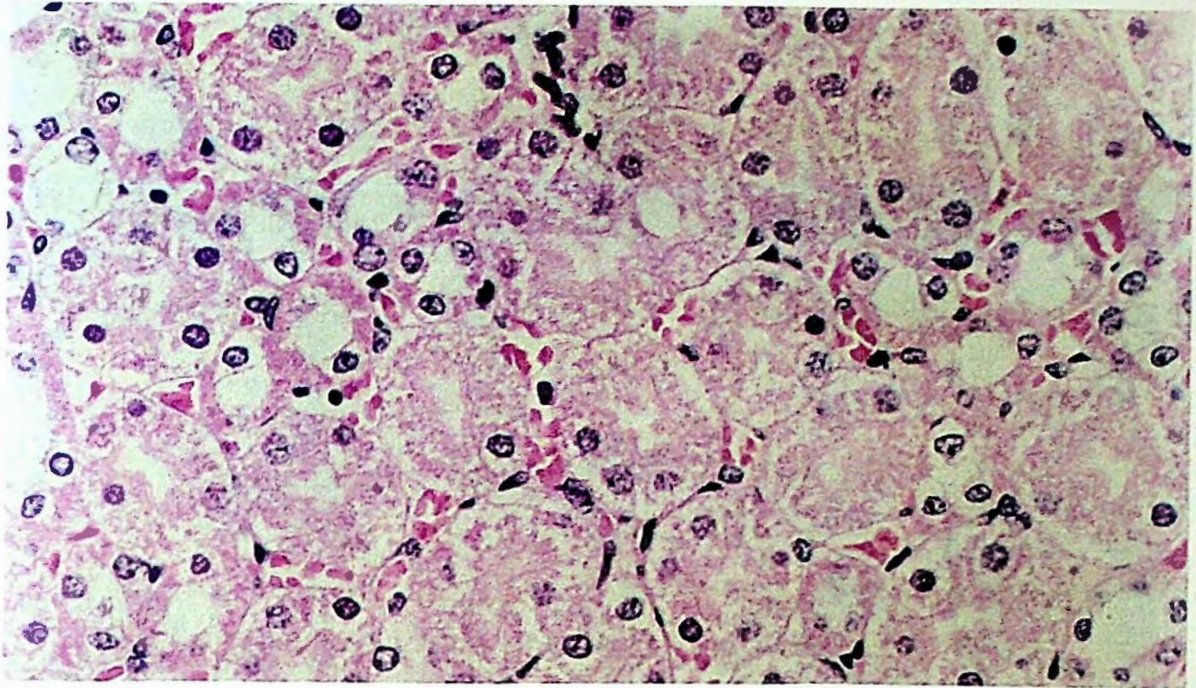


Figura.9 – Detalhe em maior aumento de área cortical de rim de animal tratado com AnB 0,5 mg/kg, com 30 dias de evolução, evidenciando quadro de degeneração vacuolar microgoticular e necrose do epitélio tubular renal, caracterizando quadro de nefrose tóxica. (H.E., x140).

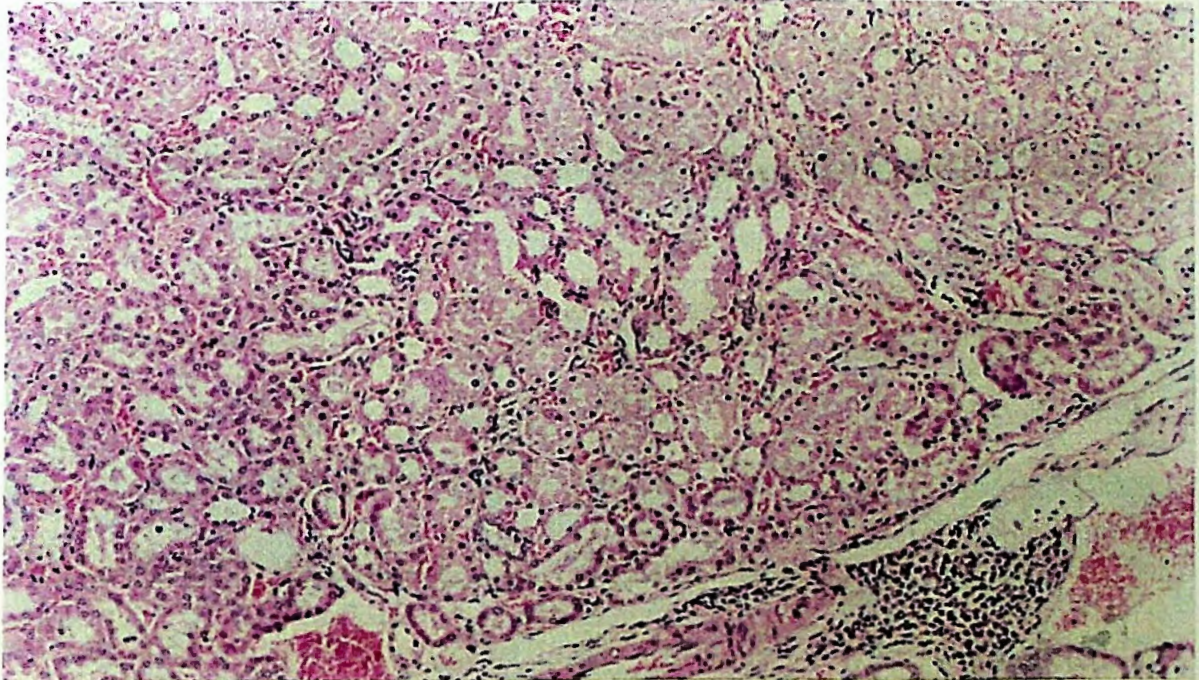


Figura.10 – Fotomicrografia de corte histológico de rim de animal tratado com a associação AnB 0,25mg/kg e Me 22.5mg/kg, mostrando áreas com comprometimento tubular e infiltrado de mononucleares no interstício. (H.E.,x36).

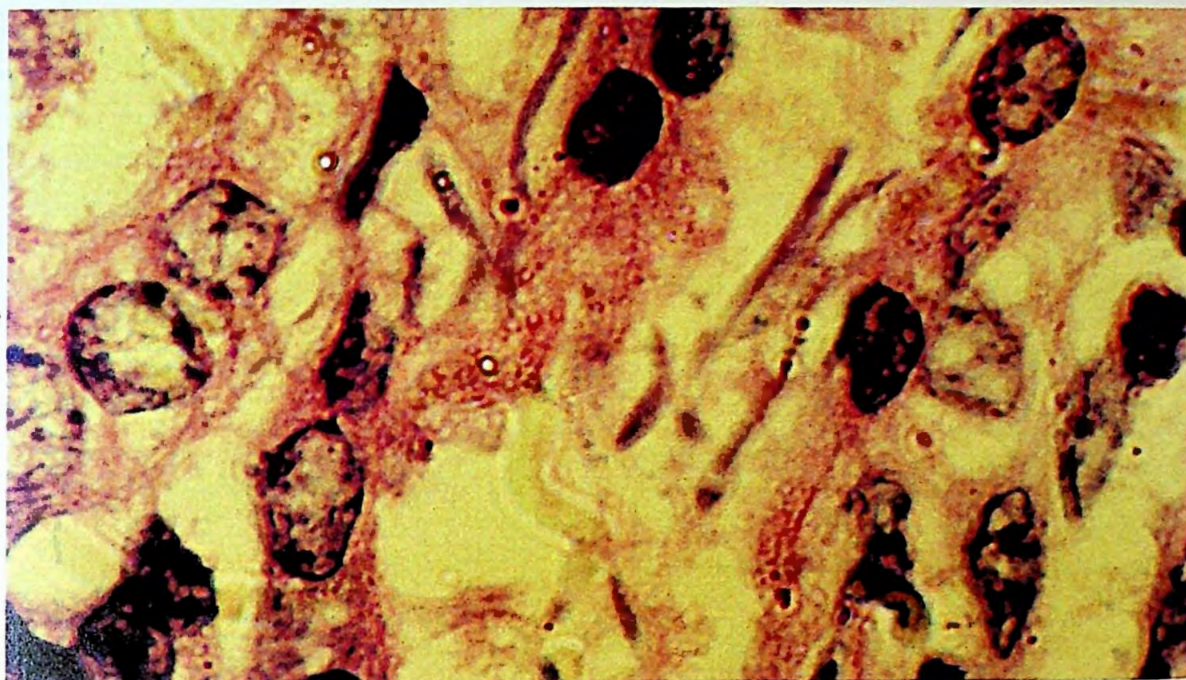


Figura 11 – Fotomicrografia de corte histológico de rim de animal de controle positivo da infecção, onde observa-se abscesso renal visualindo-se blastoconídios e pseudo hifas (H.E., x40).

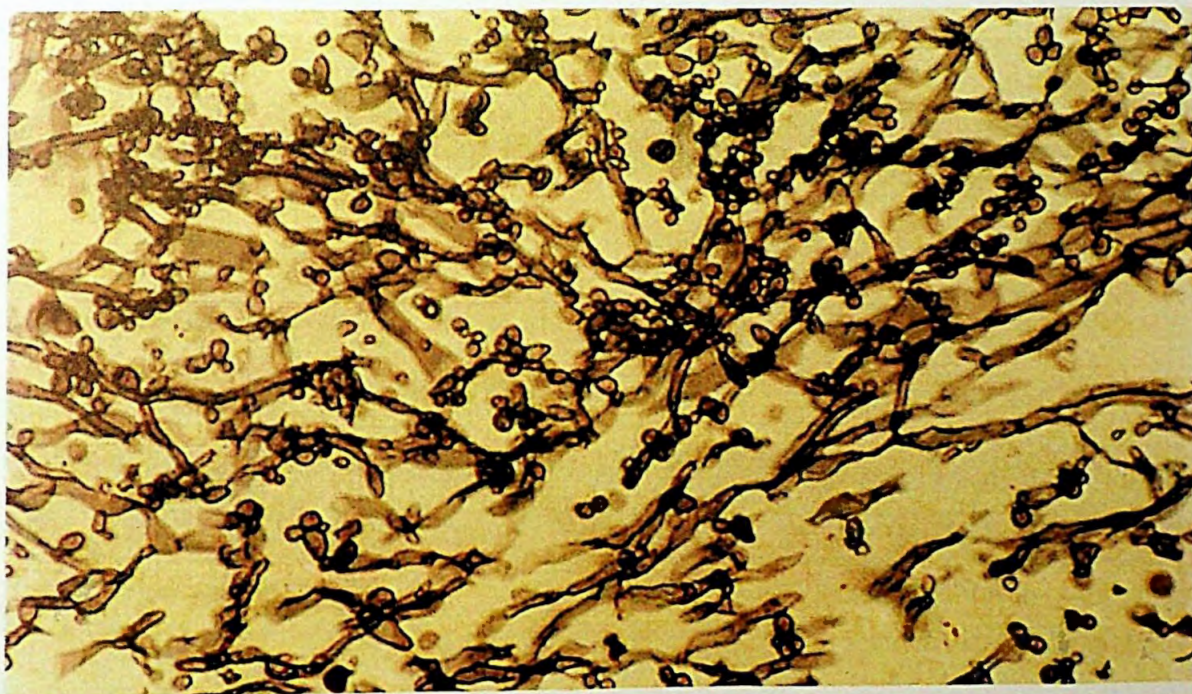


Figura.12 – Fotomicrografia corte histológico de rim de animal de controle positivo da infecção, mostrando blastoconídios e pseudo hifas. (Grocott, x20).

V - DISCUSSÃO

Desde 1953, a anfotericina B tem sido a droga de escolha para o tratamento de micoses invasivas, causadas notadamente por espécies de *Candida* ^{20,58,118}. Na atualidade, essas espécies são as principais causas de infecções oportunistas em indivíduos imunocomprometidos, chegando a alcançar um índice de mortalidade de 46% a 75%, mesmo entre os pacientes portadores de candidemia, que apresentam boa resposta à terapia antifúngica em relação à outras micoses ⁹⁶. No entanto, a utilização desse fármaco é complicada devido aos diversos efeitos adversos que provoca, incluindo: febre, náusea e vômito, anormalidades eletrolíticas, (como hipocalcemia ^{32,83}, hipomagnesemia, hipernatremia e acidose metabólica ⁹⁶. e especialmente a nefrotoxicidade ^{6,51,71}. Esta acomete cerca de 80% de todos os indivíduos em tratamento com AnB ^{26,86}, notadamente aqueles que recebem doses cumulativas de mais de 5 gramas ⁹⁶. As drogas da classe dos azóis possuem perfis mais seguros, o que encorajou o uso em larga escala. Devido a este fator, cepas resistentes a este grupo de antifúngicos se tornaram cada vez mais frequentes nos achados clínicos ⁹⁰. Até o momento, não foi desenvolvida nenhuma droga com ação fungicida e baixa toxicidade que permita administração por via oral e parenteral ⁴⁰. No mundo inteiro, vários pesquisadores buscam ainda uma solução para esse problema. Estão sendo desenvolvidas novas classes de drogas antifúngicas, como novos derivados azólicos, alilaminas, tiocarbamatos e fluoropirimidinas, que vêm sendo frequentemente utilizados na clínica. Entretanto, tem sido crescente o número

de relatos sobre a ocorrência de resistência aos novos fármacos ¹³. As formas lipossomais da anfotericina B têm-se mostrado menos tóxicas que a AnB convencional, possibilitando a administração de doses mais altas. No entanto, os poucos dados disponíveis no que diz respeito a equivalência terapêutica ⁹⁶ e ao custo muito elevado para obter tais formulações, impossibilita a produção em larga escala ^{94,32}.

Apesar da descoberta de novas drogas ser bastante promissora, a tentativa de otimizar a eficácia e limitar a toxicidade dos agentes antifúngicos já conhecidos e utilizados na clínica, por meio de estudos em busca de novos regimes terapêuticos, parece ter maior impacto imediato ^{97,80}. A associação entre drogas, disponíveis no comércio, com atividades farmacodinâmicas e farmacocinéticas conhecidas, assim como os efeitos tóxicos, pode ser um caminho a ser levado em consideração. Comprovou-se que a anfotericina B associada à 5-fluorocitosina pode ser eficaz no tratamento de algumas candidíases ^{35,64}. Outra associação bem sucedida, utilizando anfotericina B e fluconazol, mostrou interação sinérgica no tratamento de meningites causadas por *Cryptococcus neoformans* ²⁸.

No intuito de contribuir para o encontro de um tratamento eficaz contra a candidíase sistêmica, sem os efeitos indesejáveis da AnB, neste trabalho o poliênico foi utilizado em associação com o Me, um antiparasitário empregado no tratamento de infecções causadas por protozoários e bactérias ⁶⁵ e considerado uma droga segura por não provocar efeitos colaterais importantes, além de ser de custo baixo e passível de administração por via oral e parenteral ¹⁷. Comprovou-se em estudos anteriores, por meio de experimentos *in vitro* e *in vivo*, que o Me usado isoladamente não apresentava atividade antifúngica frente a espécies de *Candida* testadas. No mesmo experimento, foi demonstrado que Me combinada a AnB potencializava a ação do

poliênico, reduzindo os valores de CIMs (Concentração Inibitória Mínima) e CFMs (Concentração Fungicida Mínima) nos testes *in vitro*^{23,27}. Além disso, verificou-se que essa associação apresentava sinergia *in vivo*, principalmente quando era utilizada metade da concentração usual de AnB e a concentração usual de Me, ministradas, em associação, em duas doses alternadas²³.

Considerando-se os resultados promissores do experimento realizado por Chang, em que a cura clínica foi alcançada em muitos dos animais que utilizaram a associação entre as duas drogas, além dos dados obtidos em uma pesquisa elaborada em um hospital comunitário, em que a dose cumulativa máxima em pacientes foi de 840 mg, (dose considerada inferior a usual utilizada no tratamento de candidíases sistêmicas) e apenas 15% dos pacientes desenvolveram toxicidade renal⁹⁶, e outro trabalho, que sugere a administração da AnB em doses mais espaçadas, ou seja, a cada 48 horas, na tentativa de aumentar o pico do nível sérico da droga e diminuir a toxicidade¹, a opção de utilizar a associação de drogas, visando diminuir a dose de AnB, pode ter resultados animadores na busca do tratamento ideal para candidíases sistêmicas.

Para avaliar a eficácia do tratamento da associação em questão, utilizou-se um modelo experimental com animais, visto que, de acordo com ODDS, o uso de experimentos com animais de laboratório proporciona condições reprodutivas e permite controlar a evolução de infecções causadas por leveduras do gênero *Candida*. Dentre os animais utilizados em ensaios, o camundongo da linhagem BALB/c se destaca devido à sua inerente sensibilidade intermediária a testes intravenosos com *Candida albicans*^{59, 93}. A injeção intravenosa de um inóculo adequado de *C. albicans*, que pode variar de 10^4 a 10^6 células de levedura, em

camundongo sadio, é normalmente suficiente para estabelecer uma infecção visceral aguda e disseminada. A injeção do inóculo via intraperitoneal também leva à uma infecção disseminada, mas a concentração do inóculo deve ser cerca de 10 vezes mais alta do que o inóculo utilizado por via intravenosa para se obter lesões semelhantes⁵⁹.

Nas primeiras horas após a inoculação intravenosa de *C. albicans*, a maior concentração fúngica é encontrada nos pulmões, fígado e baço. Um ou dois dias após a infecção, dependendo da concentração do inóculo, o rim torna-se o órgão com a maior população de células fúngicas viáveis¹⁰⁸, enquanto que a quantidade de leveduras nos outros órgãos tende a diminuir com o tempo⁵⁹.

Analisando os resultados do presente trabalho, é possível verificar que o grupo tratado com metade da dose usual (0,25mg/Kg) de AnB, sofreu perda de peso bastante significativa, e mesmo obtendo uma pequena melhora no aspecto geral durante o tratamento, foram recuperadas leveduras dos rins de todos os animais deste grupo e apenas 40% dos mesmos conseguiram sobreviver até o término do experimento. Já os do grupo tratado com AnB, também na metade da dose usual, mas em associação com o Me, na sua dose usual, ou metade desta, obtiveram ganho de peso, como também 100% dos animais sobreviveram ao término do experimento (Tabela 1). Nessas condições, o número de animais infectados e o de sobreviventes até o final do experimento, e o de ufc/g rim, permitem inferir que a terapia combinada foi, de modo geral, mais eficaz que a monoterapia com AnB. Além disso, a gravidade e a intensidade das alterações renais foram visivelmente menores no tratamento combinado, permitindo cura clínica e micológica compatíveis com a terapia clássica, mas com efeitos secundários aparentemente menos intensos.

A sinergia entre esses fármacos pode estar relacionada ao mecanismo de ação dos mesmos. Assim, a alteração de membrana produzida pela AnB facilitaria a penetração e a conseqüente ação do metronidazol no interior da célula fúngica ²³.

Como o esquema terapêutico deste trabalho possui apenas uma dose a mais em relação ao de CHANG ²³, foi possível observar que os resultados são, de modo geral, bastante próximos, no que diz respeito à recuperação de leveduras e tempo de sobrevivência. No entanto, diferente do estudo de Chang, os tratamentos combinados foram compatíveis entre si. Na questão da análise histológica dos rins, observou-se que, mesmo utilizando a menor dose de AnB na associação entre as drogas, não foi possível evitar ocorrência de lesão nesses órgãos, embora a mesma tenha se apresentado em menor proporção em relação à monoterapia.

A histopatologia dos cortes das lesões coradas com H.E. foi possível visualizar subjetivamente a diferença na extensão da lesão nos animais submetidos à terapia combinada, quando comparados aos dos outros grupos, embora apenas uma análise morfométrica destas lesões poderá permitir avaliar, com mais precisão, a extensão da área afetada.

Um fato importante a levar em consideração é que, de acordo com a conduta geral na utilização de AnB no tratamento clássico, o fármaco deve ser ministrado por infusões endovenosas lentas durante um período de 4 a 6 horas, em doses iniciais que variam de 0,4 a 0,6 mg/Kg /dia por cerca de 4 semanas ⁶⁰. Em experimentos com animais pequenos, fica difícil avaliar o período em que a infusão do medicamento deve durar, já que a quantidade injetada é muito pequena. Assim, pode-se supor que, se o modo de ministrar a droga for mais lenta no modelo experimental, a terapia combinada se torne ainda menos agressiva.

Ainda assim, esses resultados são promissores, sugerindo a implementação da associação em terapia com maior número de doses administradas em intervalos de até 72 horas, após a inoculação da primeira dose às 24 ou 48 horas do início da infecção.

VI - CONCLUSÃO

A anfotericina B é a droga de escolha para o tratamento de micoses sistêmicas, mesmo que provoque reações adversas severas, como a nefrotoxicidade. O metronidazol é um agente antiparasitário que não promove ação antimicótica quando utilizado isoladamente, mas que possui poucos efeitos colaterais importantes.

A partir de resultados obtidos em estudo anterior, em que foi comprovada o sinergismo entre essas duas drogas, tanto em ensaios *in vitro*, como *in vivo*, esse novo experimento pôde proporcionar a confirmação dos benefícios desta associação, demonstrando, assim, que a combinação desses fármacos pode alcançar melhorias na eficácia e na segurança do uso de AnB, uma vez que doses menores poderão ser utilizadas sem provocar a perda da resposta clínica desejável.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ANDES, D., STAMSTED, T., CONKLIN, R. – Pharmacodynamics of Amphoterin B in a Neutropenic-mouse disseminated-candidiasis model. **Antimic. Agents Chemother.**, v.45, n.3, p.922 – 926, 2001.
 - 2- ANDES, D. – In vivo characterization of the pharmacodynamics of flucytosine in a neutropenic murine disseminated candidiasis model. **Antimic. Agents Chemother.**, v.44, n.4, p.938-942, 2000.
 - 3- BAILLIE, G.S., DOUGLAS, L.J. – Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilm to antifungal agents. **Antimic. Agents Chemother.**, v.42, n.8, p.1.900–1905, 1998.
 - 4- BAILLIE, G.S., DOUGLAS, L.J. – Iron-limited biofilms of *Candida albicans* and their susceptibility to amphotericin B. **Antimic. Agents Chemother.** V. 42, n.8, p. 2146 - 2149, 1998.
 - 5- BATES,D.W., SU,D.,YU,D.T., CHERTOW,G.M., SEGER,D.L., GOMES,D.R.J., DASBACH, E.J., PLATT, R. – Mortality and costs of acute renal failure associated with amphotericin B therapy. **Clin. Infect. Dis.**, v.32, p.686-693, 2001.
 - 6- BARWICZ, J., CHRISTIAN, S., GRUDA, I. – Effects of the aggregation state of amphotericin B on its toxicity to mice. **Antimic. Agents Chemother.**, v, 36, n.10, p.2310 – 2315, 1992.
 - 7- BEKERSKY, I., FIELDING, R. M., BUELL, D., LAWRENCE, I. – Lipid-based amphotericin B formulations: from animals to man. **Pharmac. Science Technol. Today**, v.2, n.6, p.230-236, 1999.
-

- 8- BENNETT, J.E. – Fármacos antifúngicos in: GOODMAN AND GILMAN, **Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 8^a ed. , MacMillan, p. 864 – 875, 1990.
 - 9- BERROUANE, Y. F., HERWALDT, L.A., PFALLER, M. A. – Trends in antifungal use and epidemiology of nosocomial yeast infections in a university hospital. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, n.3, p. 531 – 537, 1999
 - 10- BICKERS, D.R.- Antifungal therapy: potential interactions with other classes of drugs. **J. Am. Acad. Dermatol.** v.31, p. S87 - S90, 1994.
 - 11- BISMAS, S.K., KAMEI, K.Y., NISHIMURA, K., MIYAJI, M. – Inhibition of hyphal growth of *Candida albicans* by activated lanzoprazole, a novel benzimidazole proton pump inhibitor. **Medical Micol.** v.39, p. 283-285, 2001.
 - 12- BLONDELLE, S.E., CROOKS, E., OSTRESH, J. M., HOUGHTEN, R.A. – Mixture-based heterocyclic combinatorial positional scanning libraries: discovery of bicyclic guanidines having potent antifungal activities against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. **Antimic. Agents Chemother.**, v. 43, n.1, p. 106 – 114, 1999.
 - 13- BLUMBERG, H.M., JARVIS, W.R., SOUCIE, J.M, EDWARDS, J.E., PATTERSON, J.E., PFALLER, M., RANGEL-FAUSTO, M.S., RINALDI, M.G., SAIMAN, L., WIBLIN, R.T., WENZEL, R.P., NEMIS STUDY GROUP – Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical Intensive Care Unit patients: The NEMIS prospective multicenter study. **Clin. Infect. Dis.**, v.33, p.177-186, 2001.
 - 14- BOSSCHE, H.V. – Mechanism of antifungal resistance. **Rev. Iberoam. Micol.**, n. 14, p. 44 – 49, 1997.
-

- 15-BOSSCHE, H.V., DROMER, F., IMPROVISI, I., LOZANO-CHIO, M., REX,J.H., SANGLARDS, D. – Antifungal drug resistance in pathogenic fungi. **Medical Micol.** v.36, s.1, p. 119 – 128, 1998.
- 16-BOSWELL, G.W., BEKERSKY, I., BUELL, D., HILES, R., WALSH, T.J.- Toxicological profile and pharmacokinetics of a unilamellar liposomal vesicle formulation of amphotericin B in rats. **Antimic. Agents Chemother.**, v. 42, n.2, p. 263 – 268 , 1998.
- 17-BRAJTBURG, J., KOBAYASHI, D., MEDOFF, G., KOBAYASHI, G.S. – Antifungal action of amphotericin B in combination with other polyene or imidazole antibiotics. **J. Infect. Diseases**, v. 146, n. 2, p. 138 – 146, 1982.
- 18-BROGDEN, R.N., HEEL, R.C., SPEIGHT, T.M., AVERY, G.S. - Metronidazol in anaerobic infection: a review of its activity, pharmacokinetics and therapeutic use. **Drugs**, v.16, p. 387 – 417, 1978.
- 19-CALERA, J.A ., CALDERONE, R. – Histidine kinase, two-component signal transduction proteins of *Candida albicans* and the pathogenesis of candidosis. **Mycoses**, v.42, suppl.2, p.49-53, 1999.
- 20-CAMP, M.J., WINGARD, J.R., GILMORE, C.E., LIN, L.S., DIX, S.D, DAVIDSON G.T., GELLER, R.B. – Efficacy of low-dose dopamine in preventing amphotericin B nephrotoxicity in bone marrow transplant patients and leukemia patients. **Antimic. Agents Chemother.**, v.42, n.12, p. 3103 – 3106, 1998.
- 21-CANDIDO, R.C., FISCHMAN, O. ITO, I.Y., PAULA, C.R. – *Candida albicans*: biotyping by susceptibility to antimycotics. **Revista de Microbiologia**, n. 27, p. 83 – 86, 1996.
-

- 22-CHANG, M.R., CURY, A . E. – Amphotericin B-metronidazol combination against *Candida* spp. **Rev. Iberoam. Micol.**, n. 15, p. 78 – 80, 1998.
- 23-CHANG, M.R.- Eficácia da associação entre anfotericina B e metronidazol na candidose experimental em camundongos. São Paulo, 1996, 106p [Dissertação – Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo].
- 24-CLEMONS, K.V., STEVENS, D.A. – Comparison of Fungizon, Amphotec, AmBisome, and Abelcet for treatment of sistemic murine cryptococcosis. **Antimic. Agents Chemother.**, v. 42, n. 4, p. 899 – 902, 1998.
- 25-COLEMAN, D.C, RINALDI, M.G., HAYNES, K.A.,REX, J.H., SUMMERBELL, R.C., ANAISSIE, A.L., SULLIVAN, D.J. - Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. **Medical Mycology**, v. 36, s. 1, p. 156 – 165, 1998.
- 26-CONLY, J., RENNIE, R., JOHNSON, J., FARAH, S., HELLMAN, L. – Disseminated candidiasis due to amphotericin B – resistant *Candida albicans*. **J. Infect. Dis.**, n. 165, p. 761 – 764, 1992.
- 27-CURY, A.E., HIRSCHFELD, M.P.M. – Interactions between amphotericin B and nitroimidazoles against *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 40, n. 26, p. 187 – 192, 1996.
- 28-DIAMOND, D.M., BAUER, M., DANIEL, B.E., LEAL, M.A.E., JOHNSON, D., WILLIAMS, B.K., THOMAS, A.M., DING, J.C., NAJVAR, L., GRAYBILL, J.R., LARSEN, R.A. – Amphotericin B colloidal dispersion combined with flucytosine with or without fluconazole for treatment of murine cryptococcal meningitis. **Antimic. Agents Chemother.**, v. 42, n. 3, p. 523 – 533, 1998.
-

- 29-DOMINGUEZ, J.M., MARTIN,J.J.- Identification of elongation factor 2 as the essential protein targeted by sordarins in *Candida albicans*. **Antimic. Agents Chemother.**, v.42, n.9, p.2279-2283, 1998.
- 30-DOMINGUEZ,J.M., KELLY, V.A, KINSMAN, O.S., MARRIOTT,M.S., HERAS, F.G., MARTIN, J.J.- Sordarins: a new class of antifungals with selective inhibition of the protein synthesis elongation cycle in yeasts.. **Antimic. Agents Chemother.**, v.42,n.9,p.2274-2278, 1998.
- 31-DROUHET, E., DUPONT, B. – Evolution of antifungal agents: past, present, and future. **Reviews Infect. Dis.**, v. 9, s. 1, p. s4 – s13, 1987.
- 32- ECHEVARRIA, I., BARTURES,C., RENEDO, M.J.,TRONCONIZ,I.F., DIOS-VIEITEZ, M.C.- Comparative pharmacokinetics, tissue distributions , and effects on renal function of novel polymeric formulations of amphotericin B and amphotericin B-deoxycholate in rats. **Antimic. Agents Chemother.**, v.44,n.4,p.898-904,2000.–
- 33-EDWARDS, J.E. – Invasive candida infections. **New England J. med.**, v. 324, n. 15, p. 1060 – 1062, 1991.
- 34-EDWARDS, J.E., FILLER S.G., Current strategies for treating invasive candidiasis: emphasis infections in nonneutropenic patients. **Clin. Infect. Dis.** , v.14, s.1, p. s106 - s113, 1992
- 35-FRANKENBURG,S., GLICK, D., KLAUS, S., BARENHOLZ, Y. – Efficacious topical treatment for murine cutaneous leishmaniasis with ethanolic formulation of amphotericin B. **Antimic. Agents Chemother.**, v. 42, n. 12, p. 3092 – 3096, 1998.
- 36-FRANZ, R., KELLY, S.L., LAMB, D.C., KELLY, D.E., RUHNKE, M.,
-

- MORSCHHAUSER, J. – Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. **Antimic. Agents Chemother.**, v. 42, n. 12, p. 3065 – 3072, 1998.
- 37-FREYDIÈRE, A ., GUINET, R. – Rapid methods for identification of the most frequent clinical yeasts. **Rev. Iberoam. Micol.**, n. 14, p. 85 – 89, 1997.
- 38-FUSSLE, R., Diagnosis of fungal infections. **Mycoses**, n.40, suppl.2, p.13-15, 1997.
- 39-GEORGOPAPADAKOU, N.H., WALSH, T.J. – Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. **Antimic.Agents Chemother.**, v.40, n.2, p.279-291, 1996.
- 40-GRAYBILL, J.R. – Antifungal drugs and resistance. **Antimicrobial Resistance: A Crisis in Health Care**, Plenum Press, p. 217 – 234, 1995.
- 41-GRAYBILL, J.R. – Future directions of antifungal chemotherapy. **Clinic. Infect. Dis.**, v. 14, s.1, p. s170 – s181, 1992.
- 42-GREEN, L.J., MARDER, P., MANN, L.L., CHIO, L.C., CURRENT,W.C. – LY303366 exhibits rapid and potent fungicidal activity in flow cytometric assays of yeast viability. **Antimic. Agents Chemother.**, v.43. n.4, p.830-835, 1999.
- 43-GROLL, A .H., PETRAITIS, V., PETRAITIENE, R., FIELD-RIDLEY, A ., CALENDARIO, M., BACHER, J., PISCITELLY, S.C., WALSH, T.J. - Safety and efficacy of multilamellar liposomal nystatin against disseminated candidiasis in persistently neutropenic rabbits. **Antimic. Agents Chemother.**, v. 43, n. 10, p.2463 – 2467, 1999.
-

- 44-GUPTA, A . K., SAUDER, D.N., SHEAR, N.H. – Antifungal agents: an overview. Part I. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.30, n.5, p.677-698, 1994.
- 45-GUPTA, A .K., SAUBER, D.N., SHEAR, N.H. – Antifungal agents: an overview. Part II. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 30, n.6, p. 911 – 924, 1994
- 46-HANEKE,E.- New antifungal agents. **Mycose**, v.44,s.1, p.3-83,2001.–
- 47-HANEL, H., RAETHER, W., UPHOFF,M., BRAUN, B., KALISH, J., PASTOWSKY, S. – A modified method for experimental candidosis in mice avoiding lethality. **Mycoses**, v.35, p. 83 – 88, 1992
- 48-HARDIN, T.C., NAJVAR, L.K., RIZZO, J., FORTHERGILL, A .W., RINALDI, M.G., GRAYBILL, J.R. – Discrepancy between in vitro and in vivo antifungal activity of albendazole. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 35, p. 153 – 158, 1997
- 49- HAY, R.J. – Antifungal on the horizon. **J . Am. Acad. Dermatol.**, v. 31, p. s82 – s85, 1994.
- 50-HAY, R. J. – Antifungal therapy of yeast infections. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 31, p. s6 – s9, 1994.
- 51-HEIDEMANN, H.T., BRUNE, K.H., SABRA, R., BRANCH, R.A .- Acute and chronic effects of flucytosine on amphotericin B nephrotoxicity in rats. **Antimic. Agents Chemother.**, v. 36, n. 12, p. 2670 – 2675, 1992.
- 52-HERNAEZ, M.L., PLA, J., NOMBELA, C. - Aspectos moleculares y genéticos de la reistencia a azoles en *Candida albicans*. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 14, p. 150 – 154, 1997.
-

- 53-HOEPRICH, P.D. – Clinical use of amphotericin B and derivatives: lore, mystique, and fact. **Clin. Infect. Dis.**, v. 14, s. 1, p. s114 – s 119, 1992.
- 54-HOSETLER, J.S., CLEMONS, K.V., HANSON, L.H. – Efficacy and safety of amphotericin B colloidal dispersion compared with those of amphotericin B deoxycholate suspension for treatment of disseminated murine cryptococcosis. **Antimic. Agents Chemother.**, v. 36, n. 12, p. 2656 – 2660, 1992.
- 55-INGROFF, A .E., PFALLER, M.A . – Antifungal agents and susceptibility testing. **Manual Clin. Microb.**, 6th ed, ASM Press, p. 1405 – 1414, 1994.
- 56-INGROFF,A, E.- Germinated and nongerminated conidial suspensions for testing of susceptibilities of *Aspergillus* spp. To amphotericin B, itraconazole, posaconazole, ravuconazole, and voriconazole. **Antimic. Agents Chemother.**, v.45,n.2, p. 605-607,2001.–
- 57-JOHNSON, E.M., OJWANG, J.O ., SZEKELY, A ., WALLACE, T.L., WARNOCK, D.W.- Comparison of in vitro antifungal activities of free and liposome-encapsulated nystatin with those of four amphotericin B formulations. **Antim. Agents Chemother.**, v. 42, n. 6, p. 1412 – 1416, 1998.
- 58-KAPPE, R. – Antifungal activity of the new azole UK-109, 496 (voriconazole). **Mycoses**, v.42, suppl.2, p. 83-86, 1999.
- 59-KARYOTAKIS, N.C., ANAISSIE, E.J., HACHEM,R., DIGNANI, M.C., SAMONIS,G. – Comparison of the efficacy of polyenes and triazoles against hematogenous *Candida krusei* infection in neutropenic mice. **J. Infect. Dis.**, v. 168, p. 1311 – 1313, 1993.
- 60-KATZUNG, B.G. – **Farmacologia Básica e Clínica**, 5ª ed., p.515-518, 1992.
-

- 61-KAUFFMAN, C.A ., VAZQUEZ, J.A . , SOBEL, J.D., GALLIS, J.A ., McKINSEY, D.S., KARCHMER, A .W., SUGAR, A .M., SHARKEY, P.K., WISE, G.J., MANGI,R., MOSHER, A ., LEE, J. Y., DISMUKES, W.E., NIAID – Prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. **Clin. Infect. Dis.**, v.30, p. 14-18, 2000.
- 62-KLEPSEK, M.E., MALONE, D., LEWIS, R.E., ERNST, E.J., PFALLER, M.A . – Evaluation of voriconazole pharmacodynamics using time-kill methodology. **Antimic. Agentes Chemother.**, v.44, n.7, p.1917-1920, 2000.
- 63-KOBAYASHI, G.S., MEDOFF, F. – Measurement of activity of fungal drugs. In: HOWARD, D.H., ed, **Fungi Pathogenic for Humans and Animals** . MerceL Dekker, v. 3, p. 371 – 375, 1983.
- 64-KOIZUMI, T., KUBO, K., KANEKI, T., MASAYUKI, H., HAYANO, T., MIYAHARA, T., KAZUYOSHI, O ., FUJIMOTO, K., YAMAMOTO, H., KOBAYASHI,T., SEKIGUSHI, M. - Pharmacokinetic evaluation of amphotericin B in lung tissue: Lung lymph distribution after intravenous injection and airspace distribution after aerosolization and inhalation of amphotericin B. **Antim. Agentes Chemother.**, v. 42, n. 7, p. 1597 – 1600, 1998.
- 65-KOROLKOVAS, A . – **Dicionário Terapêutico Guanabara**. Ed. 1994/1995, p.10.21, 1995.
- 66-KUIPERS, M.E., VRIES, H.G., EIKELBOOM, M.C., D.K.F. MEIJER, SWART, P.J. – Synergistic fungistatic effects of lactoferrin in combination with antifungal drugs against clinical *Candida* isolates. **Antim. Agents Chemother.**, v. 43, n. 11, p. 2635 – 2641, 1999.
- 67-KWONG, E.H., RAMASWAMY, M., BAUER, E.*, HARTSEL,S.C., WASAN,

- K.M.- Heat treatment of amphotericin B modifies its serum pharmacokinetics, tissue distribution, and renal toxicity following administration of a single intravenous dose to rabbits. **Antim. Agents Chemother.** v.45,n.7,p.2060-2063, 2001.
- 68-LARUSSO, N.F., TOMASZ, M., KAPLAN, D., MULLER, M. – Absence of strand breaks in deoxyribonucleic acid treated with metronidazol. **Antimic. Agents Chemother.**, v. 13, n.1, p.19-24, 1978.
- 69-LEBRUN, M., GRENIER, L., BERGERON, M.G., THIBAUT, L., LEBRECQUE, G., BEAUCHAMP, D. – Effect of fasting on temporal variation in the nephrotoxicity of amphotericin B in rats. **Antimic. Agents Chemother.**, v.43, n. 3, p. 520 – 524, 1999.
- 70-LEVY.M.Y.,POLACHECK,I.,BARENHOZ,Y., BENITA,S.- Efficay evaluation of a novel submicron amphotericin B emulsion in murine candidiasis. **Med. Vet. Mycol.**,v.31,p.207-218, 1993.
- 71-LEWIS, R.E., LUND, B.C., KLEPSE, M.E., ERNST, E.J., PFALLER, M.A . – Assessment of antifungal activities of fluconazol and amphotericin B administred alone and in combination against *Candida albicans* by using a dynamic in vitro mycotic infection model. **Antimic. Agents Chemother.**, v. 42, n. 6, p. 1382 – 1386, 1998.
- 72-LIAO, R.S., RENNIE, R.P., TALBOT, J.A . – Assessment of the effect on amphotericin B on the vitality of *Candida albicans*. **Antimic. Agents Chemother.**, v. 43, n. 5, p. 1034 – 1041, 1999.
- 73-LOEBENBERG, D., HARE, R. S. , SABATELLI, F. , MUKWAYA , G.- Posaconazole, a third-generation triazole antifungal, **Mycoses**, v.44,s.1,p.8-83, 2001.

- 74- LOPEZ-BERESTEIN, G., MEHTA, R., HOPFER,R.L., MILLS;K,
KASI,L.,MEHTA,K.,FAINSTEIN,V, LUNA,M.,HERSH,E.M.,
JULIANO,R.- Treatment and Prophylaxis of disseminated infection due to
Candida albicans in mice with liposome-encapsulated amphotericin B. **J. Infect. Diseases**, v.147, n.5. p.939-945,1983.
- 75- LOUIE,A ., DRUSANO, G.L., BANERJEE, P., LIU, Q., LIU,W., KAU, P.,
SHAYEGANI, M., TABER, H., MILLER, M.H. - Pharmacodynamics of
fluconazole in a murine model of systemic candidiasis. **Antimic. Agents
Chemother.**, v. 42, n. 5, p. 1105 – 1109, 1998.
- 76- LOUIE, A ., BANERJEE, P., DRUSANO, G.L., SHAYEGANI, M., MILLER,
M.H. – Interaction between fluconazole and amphotericin B in mice with
systemic infection due to fluconazole-susceptible or resistant strains of
Candida albicans. **Antimic. Agents Chemother.**, v. 43, n.12, p.2841-
2847,1999.
- 77- LOUIE,A.,BANERJEE,P.,DRUSANO,G.L., SHAYEGANI, M., MILLER,M.H.-
Interaction between fluconazole and Amphotericin B in mice with systemic
infection due to fluconazole-susceptible or –resistant strains of *Candida
albicans*. **Antimic.Agents Chemother.**, v. 43,n.12, p.2841-2847,1999.
- 78- LURIGADOS, C., IZQUIERDO,I.,PEREZ,I., TURMO,E., NIETO,C.- Safety
and pharmacokinetics profile of the new triazole UR-9825 after repeated oral
doses in healthy volunteers. **Mycoses**, v.44, s.1, p.3-83, 2001.
- 79- MAEKASI,S., HASSAIN,M.A, MIYAZAKI, Y., TOMONO,K., TASHIRO,T.,
KOHNO,S.- Efficacy of FK463, a (1,3)- β -D-glucan synthase inhibitor, in
disseminated azole-resistant *Candida albicans* infection in mice. **Antimic.
Agents Chemother.**, v.44,n.6,p.1728-1730, 2000.

- 80-MANAVATHU, E.K., DIMMOCK, J.R., VASHISHTHA, S.C., CHANDRASEKAR, P.H. – Proton-pumping ATPase-targeted antifungal activity of a novel conjugated styryl ketone. **Antimic. Agents Chemother.**, v.43,n.12, p. 2950-2959, 1999.
- 81-MARR, K.A ., LYONS, C.N., RUSTAD, T., BOWDEN, R.A . - Rapid, transient fluconazole resistance in *Candida albicans* is associated with increased mRNA levels of CDR. **Antimic. Agents Chemother.**, v. 42, n. 10, p. 2584 – 2589, 1998.
- 82-MENCACCI, A ., CENCI, E., DEL SERO, G., D'OSTIANI, C.F., MONTAGNOLI, C., BACCI, A ., BISTONI, F., ROMANI, L. – Innate and adaptive immunity to *Candida albicans*: a new view of an old paradigm. **Rev. Iberoam. Micol.**, v.16, p.4-7, 1999.
- 83-MEYER, R.D.- Current role of therapy with amphotericin B. **Clin. Infect. Dis.**, v.14, s1, p. s154 – s160, 1992.
- 84-MULLER, F.M.C.- Attack the fungal cell wall – A Story of the candin family. **Mycoses**, v.44,s.1, p.3-83, 2001.
- 85-NATH, C.E., SHAW, P.J., GUNNING, R., MCLACHLAN, A . J., EARL, J.W.- Amphotericin B in children with malignant disease: a comparison of the toxicities and pharmacokinetics of amphotericin B administered in dextrose versus lipid emulsion. **Antimic. Agentes Chemother.** , v. 43, n. 6, p. 1417 – 1423, 1999.
- 86-NUCCI, M., LOUREIRO, M., SILVEIRA, F., CASALI, A .R., BOUZAS, L.F., VELASCO, E., SPECTOR, N., PULCHERI, W. – Comparison of the toxicity of amphotericin B in 5% dextrose with that of amphotericin B in fat emulsion in a randomized trial with cancer patients. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 43, n. 6, p. 1445 – 1448, 1999.
-

- 87-ODDS, F.C. – *Candida and candidosis*. 2.ed. London: Bailliere Tindall, 468p, 1988.
- 88-ODDS, F.C., BEERSE, P. – Pathogenesis of *Candida* infections. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v.31, n.3, p.s2-s5, 1994.
- 89-ODDS, F.C. – Interactions among amphotericin B, 5 fluorocytosine, ketoconazole and miconazole against pathogenic fungi in vitro. *Antimic. Agents Chemother.*, v.22, n. 5, p. 763 – 770, 1982.
- 90-ONISH,J., MEINS,M., CUROTTO,J., DREIKORN,S., ROSENBACH,M., DOUGLAS,C., ABRUZZO,G., FLATTERY,A , KONG,L.,CABELLO, A , VICENTE,F., PELAES,F., DIEZ,M.T., MARTIN,I., BILLS,G., GIACOBBE,R., DOMBROWSKI,A , SCHAWARTZ,R., MORRIS,S., HARRIS,G., , TSIPOURAS, A , WILSON,K., KURTZ,M.B. - Discovery of novel antifungal (1,3)- β -D-glucan synthase inhibitors. *Antimic. Agents Chemother.*, v.44, n.2, p.368-377, 2000.
- 91-OTSUBO, T., MAESAKI, S., HOSSAIN, M.A ., YAMAMOTO, Y., TOMONO, K., TASHIRO, T., SEKI, J., TOMII, Y., SONOKE, S., KOHNO, S. – In vitro na in vivo activities of NS – 718, a new lipid nanosphere incorporating amphotericin B, against *Aspergillus fumigatus*. *Antimic. Agents Chemother.*, v. 43, n. 3, p. 471 – 475, 1999.
- 92-PETRAITIENE, R., PETRAITIS,V., GROLL,A , H., SEIN,T., PISCITELLI,S., CANDELARIO, M., FIELD-RIDLEY, A , AVILA, N., BACHER,J., WALSH, T.J.- Antifungal activity and pharmacokinetics of posaconazole (SCH 56592) in treatment and prevention of experimental invasive pulmonary aspergilosis: correlation with galactomannan antigenemia. *Antimic. Agents Chemother.*, v.45,n.3,p.857-869, 2001.
-

- 93-PITARCH, A , DIEZ-OREJAS,R., MOLERO,G., PARDO,M., SANCHEZ,M., GIL,C., NOMBELA,C. – Study of the serologic response to *Candida albicans* systemic infection in a murine model by 2d-page. **Mycoses**, v.44,s.1,p.3-83, 2001.
- 94-RADDING, J.A ., HEIDLER, S.A ., TURNER, W.W. – Photoaffinity analog of the semisynthetic echinocandin LY303366: identification of echinocandin targets in *Candida albicans*. **Antimic. Agents Chemother.**, v. 42, n.5, p.1187-1194, 1998.
- 95-RAMASWAMY, M., PETEHERYCH, K., KENNEDY, A ,L., WASAN, K.M. – Amphotericin B lipid complex or amphotericin B multiple-dose administration to rabbits with elevated plasma cholesterol levels: pharmacokinetics in plasma and blood, plasma lipoprotein levels, distribution in tissues, and renal toxicities. **Antimic. Agents Chemother.**, v.45, n.4, p. 1184-1191, 2001.
- 96-RESTREPO, M.I., NAJVAR, L.K., FOTHERGILL, A .,W., GRAYBILL, J.R. - Prandamicin therapy of disseminated *Candida tropicalis* infection in the mouse. **Med. Mycology**, v.36, p. 181-184, 1998.
- 97-REUHL, K.R., VAPIWALA, M., RYZLAK, M.T., SCHAFFNER, C.P. – Comparative neurotoxicities of amphotericin B and its mono-methyl ester derivative in rats. **Antimic. Agents Chemother.**, v. 37, n. 3, p. 419 – 428, 1993.
- 98-REX, J.H., WALSH, T.J., SOBEL, J.D., FILLER, S.G., PAPPAS, P.G., DISMUKES, W.E., EDWARDS, J.E. – Practice guidelines for the treatment of candidiasis. **Clin. Infect. Dis.**, v.30, p.662-678, 2000.
- 99-RINALDI, M.G. – Laboratory evaluation of antifungal agents: a brief overview. **Clinic. Infect. Dis.**, v. 14, s.1, p. s130 – s133, 1992.

- 100- RUCHEL, R. – Clinical presentation of invasive *Candida* mycoses. **Mycoses**, n.40, suppl.2, p.17-20,1997.
- 101- SEGAL, E. – Experimental candidosis. Pathogenesis, prevention, therapy. **Mycoses**, n.42, suppl.2, p.55-59,1999.
- 102- SENET, J.M.- Risk factors and physiopathology of candidiasis. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 14, p. 6 – 13, 1997.
- 103- SOBEL, J.D. - Practice guidelines for the treatment of fungal infections. **Clin. Infect. Dis.**, v.30, p.652-657, 2000.
- 104- SOBEL, J.D., REX, J.H. – Invasive candidiasis: turning risk into a practical prevention policy? **Clin. Infect. Dis.**, v.33, p.187-190, 2001.
- 105- SOUSA, M.C., SILVA. J.P. – A new method for assessing metronidazole susceptibility of *Giardia lamblia* trophozoites. **Antimic. Agents Chemother.**, v.43, n.12, p.2939-2942,1999.
- 106- SPERRY, P.J., WETZEL, S.A., ADLER-MOORE, J.P. – Antimicrobial activity of AmBisome and non-liposomal amphotericin B following uptake of *Candida glabrata* by murine epidermal langerhans cells. **Med. Mycol.**, v. 36, p. 135 – 141, 1998.
- 107- STENCEL, C. – Experts probe complexity of *Candida*. **ASM News**, v. 65, n. 8, p. 542 – 546, 1999.
- 108- STILLER, R.L., BENNETT, J.E., SCHOLER,H.J., WALL,M.,POLAK,A, STEVENS,D.A.- Correlation of in vitro susceptibility test results with in vivo response: flucytosine therapy in a systemic candidiasis model. **J.Infect. Dis.**, v.147,n.6, p. 1070-1077, 1983
-

- 109- SUGAR, A .M. – Interactions of amphotericin B and SCH 39304 in the treatment of experimental murine candidiasis: lack of antagonism of a polyene-azole combination. **Antimic. Agents Chemother.**, v. 35, n. 8, p. 1660 – 1671, 1991.
- 110- SUGAR, A .M., HITCHCOCK, C.A ., TROKE, P. F., PICARD, M. – Combination therapy of murine invasive candidiasis with fluconazole and amphotericin B. **Antimic. Agents Chemother.**, v. 39, n. 3, p. 598 – 601, 1995.
- 111- VARLAM, D.E., SIDDIQ, M.M., PARTON, L.A ., RUSSMANN, H. – Apoptosis contributes to amphotericin B – Induced nephrotoxicity. **Antimic. Agents Chemother.** V.45,n.3,p.679-685, 2001.
- 112- VAZQUEZ, J.A . , ARGANOZA, M.T., BOIKOV, D., YOON, S., SOBEL, amphotericin B conferred by preexposure to subinhibitory levels of azoles. **J. Clinic. Microb.**, v. 36, n. 9, p. J.D., AKINS, R.A . - Stable phenotypic resistance of *Candida* species to. 2690 – 2695, 1998.
- 113- VIVIANI, M.A ., DE MARIE, S., GRAYBILL, J.R., YAMAGUCHI, H., ANAISSIE, E., CAILLOT, D. - New approaches to antifungal chemotherapy. **Med. Mycol.**, v. 36, s.1, p. 194 – 206, 1998.
- 114- WAKABAYASHI, H., AGE, S., TERAGUCHI, S., HAYASAWA, H., YAMAGUCHI, H.- Inhibition of hyphal growth of azole-resistant strains of *Candida albicans* by triazole antifungal agents in the presence of lactoferrin-related compounds. **Antimic. Agents Chemother.**, v. 42, n. 7, p. 1587 – 1591, 1998.
- 115- WALSH, T .J., LEE, J.W., ROILIDES, E., FRANCIS, P., BASCHER, J., LYMAN,C.A ., PIZZO, P.A . – Experimental antifungal chemotherapy in granulocytopenic animal models of disseminated candidiasis: approach

to understanding investigational antifungal compounds for patients with neoplastic diseases. **Clin. Infect. Dis.**, v. 14, s.1, p. s139 – s147, 1992.

- 116- WARNOCK, D.W. – Characteristics and in vitro susceptibility testing of new antifungals. **Mycoses**, v.44,s.1,p.3-83, 2001.
- 117- WASSAN, K.M., KENNEDY, A .L., CASSIDY, S.M, RAMASWAMY, M., HOLTORF L., CHOU, J .W., PRITCHARD, P.H. - Pharmacokinetics, distribution in serum lipoproteins and tissues, and renal toxicities of amphotericin B and Amphotericin B lipid complex in a Hypercholesterolemic rabbit model: single-dose studies. **Antimic. Agents Chemother.**, v. 42, n. 12, p. 3146 – 3152, 1998.
- 118- WHITE, T.C. – Antifungal drug resistance in *Candida albicans*. **ASM News**, v. 63, p. 4227-433, 1998.
- 119- ZARIF,L., GRAYBILL,J.R., PERLIN,D., NAJVAR, L., BOCANEGRA,R., MANNINO,R.J. – Antifungal activity of amphotericin B cochleates against *Candida albicans* infection in a mouse model. **Antimic. Agents Chemother.** v. 44, n.6,p. 1463-1469, 2000.
- 120- ZEPELIN, M.B., ZASCHKE, K., GROB,U., MULLER, F.M.C.- Effect of FK 463 on adherence of paired azole-susceptible and azole-resistant *Candida albicans* isolates to epithelial cells. **Mycoses**, v.44,s.1,p.3083, 2001.
-