



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

BERENICE TOMOKO TATIBANA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE
PARACOCCIDIOIDOMICOSE PELA TÉCNICA LAMP E
AVALIAÇÃO DE NOVA FORMULAÇÃO ANTIFÚNGICA
COMPLEXO ANFOTERICINA B-7-DEHIDROCOLESTEROL**

Londrina
2009

BERENICE TOMOKO TATIBANA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE
PARACOCCIDIOIDOMICOSE PELA TÉCNICA LAMP E
AVALIAÇÃO DE NOVA FORMULAÇÃO ANTIFÚNGICA
COMPLEXO ANFOTERICINA B-7-DEHIDROCOLESTEROL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação,
em Microbiologia da Universidade Estadual de
Londrina, como requisito parcial à obtenção do
título de Doutora em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano

Londrina
2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Tatibana, Berenice Tomoko

M685a Diagnóstico molecular de paracoccidiodomicose pela técnica LAMP e análise de nova formulação antifúngica complexo Anfotericina B-7-dehidrocolesterol.

/ Berenice Tomoko Tatibana. - Londrina : UEL, 2009.

Orientadora: Eiko Nakagawa Itano

TESE (Doutorado) - Universidade Estadual de Londrina

1. Paracoccidiodomicose 2. *Paracoccidioides brasiliensis*
3. AMB-7DC complex 4. Loop-mediated isothermal reaction 5. Anfotericina B

BERENICE TOMOKO TATIBANA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE
PARACOCCIDIOIDOMICOSE PELA TÉCNICA LAMP E
AVALIAÇÃO DE NOVA FORMULAÇÃO ANTIFÚNGICA
COMPLEXO ANFOTERICINA B-7-DEHIDROCOLESTEROL**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra Elisa Yoko Hirooka

Prof. Dr. Emerson Jose Venâncio

Prof. Dr. Mario Augusto Ono

Profa. Dra. Rosa Elisa Carvalho Linhares

Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano

Londrina, 17 de julho de 2009.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Aplicada do Departamento de Ciências Patológicas/Centro de Ciências Biológicas/Universidade Estadual de Londrina; sob orientação da Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano em colaboração com Medical Mycology Research Center (MMRC), Universidade de Chiba, Japão e apoio financeiro JICA/Fundação Araucária/PROAP/UEL.

Para:

DEUS, que me faz instrumento de sua
bondade e amor;

Meu marido Milton Fujita, meus filhos
Mateus Tetsuo Fujita, Sofia Yukie Fujita e
Willian Katsuo Fujita, que são tudo em
minha vida.

AGRADECIMENTOS

- À Profa. Dra. *Eiko Nakagawa Itano*, pela amizade e incentivo irrestrito nestes 11 anos de caminhada conjunta, pesquisa e luta.
- Aos pesquisadores da Universidade de Chiba, Dr. *Jun Uno*, Dra *Ayako Sano*, Dr. *Yuzuru Mikami* e Dr *Makoto Miyaji* que permitiram e viabilizaram este projeto.
- Ao Programa de Pós-graduação Mestrado e Doutorado em Microbiologia.
- Ao médico veterinário *Donizeti Rodrigues Belitardo*, que não poupou esforços para a realização deste projeto.
- À Profa. Dra. *Ana Paula F. L. Bracarense*, pela ajuda e apoio.
- Ao Prof. Dr. *Emerson J. Venâncio*, Prof. *Mario Augusto Ono* que me incentivaram e fizeram presentes ao longo desta jornada.
- Dr. *Zoilo Pires de Camargo*, pelo auxílio.
- Aos meus familiares pelo apoio: *Yoshiko Tatibana*, minha mãe; meus irmãos *Arnóbio Massayuki*, *Hide Akiko T. Tsutsui*, *Amadeu Noriyuki*, *Angela Kazue T. Anabuki*, *Álvaro Takeshi*, *Djalma Tadashi* e *Ricardo Yukio*. Minha sogra *Helena Akemi H. Fujita*, minha prima *Márcia Fujita*, minha cunhada *Luzia Harue Suzukawa*. *Cintia Oliveira* que supriu minha ausência no lar.
- Aos amigos: *Mári S. Kaminami*, *Nilson de Jesus Carlos*, *Audrey de Souza Marques*, *Fernanda Nakanishi*, *Nádia Kamiji*, *Paula Leonello*, *Luciene*, *Káka Oshiro*, *Thiago Massuda*, *Alexandre Sasaki*, *Vander* e *Fabrine Massafra* que souberam partilhar amizade e pela convivência no laboratório e troca de experiência.
- Meus amigos pesquisadores pelo apoio nos momentos difíceis, Dr. *Edson Hirose*, Dra. *Marta Miyazawa*, Dr. *Alexandre Nepomuceno*, Dr. *Geraldo Armoa*.
- Meus amigos de mestrado: *Eliane Blanco Nunes*, *Flávio Lauretti*, *Graziela Braun*, *Jamile Otman*, *Leopoldo Sussumu Matsumoto*, *Luciano Aparecido Panagio*, *Maria Valéria J. B. Beleze*, *Patrícia Vieira Tiago*, *Viviane Krominski Graça* e *Wagner Loyola* pelos laços de amizade.
- Todos que se fizeram presentes e possibilitaram a conclusão deste trabalho, meu muito obrigado.

Lista de Siglas e abreviaturas

AMB-7-DC	Anfotericina B-7-dehidrocolesterol
Ag7	exoantígeno de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucléico)
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ensaio imunoenzimático)
CFU	<i>colony forming units</i> (unidades formadoras de colônias)
gp43	glicoproteína de 43.000 daltons
°	graus
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i> (vírus da imunodeficiência humana)
Ig	imunoglobulina
IL	interleucina
IRMA	teste imunoradiométrico
kDa	kilodalton
kg	kilograma
KOH	hidróxido de potássio
LAMP	<i>Loop mediated isothermal amplification</i> (amplificação circular isotérmica)
L-N	latitude norte
L-S	latitude sul
mg	miligrama
PCM	paracoccidioidomicose
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (reação de polimerase em cadeia)
PHA	<i>passive haemagglutination assay</i> (teste de hemaglutinação passiva)
pg	picogramas
PMN	<i>polymorphonuclear leukocytes</i> (leucócitos polimorfonucleares)
RAPD	<i>random amplified polymorphid DNA</i> (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (ácido ribonucléico)
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
Th-1	linfócito T helper (ou auxiliar) do tipo um
Th-2	linfócito T helper (ou auxiliar) do tipo dois

TATIBANA, Berenice Tomoko. **Diagnóstico molecular de paracoccidioidomicose pela técnica lamp e avaliação de nova formulação antifúngica complexo anfotericina b-7-dehidrocolesterol**. 2009. 55f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RESUMO

Paracoccidioidomicose (PCM) é epidemiologicamente uma das mais importantes micoses da América latina, especialmente no Brasil. A doença ocorre por inalação do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*) e o foco primário ocorre no pulmão do hospedeiro. A PCM pode ser diagnosticada por observação direta da forma característica leveduriforme em amostra clínicas ou de cultura. De forma mais frequente, o diagnóstico é feito de forma indireta por exames sorológicos, principalmente por imunodifusão e teste imunoenzimático. O diagnóstico da PCM fora dos países endêmicos é difícil. Necessita-se desenvolver um diagnóstico mais rápido e específico para PCM. A amplificação circular isotérmica (LAMP) foi usada no presente estudo para detecção da presença de *P. brasiliensis* em amostras de escarro de pacientes com PCM crônica, suspeitos para PCM e controle negativo. O gene alvo gp43 de *P. brasiliensis* foi amplificado em menos de quatro horas em 11 amostras de escarro. O método LAMP possui a vantagem da velocidade e simplicidade quando comparado aos diagnósticos clássicos como o histopatológico ou cultura de material biológico e não requer aparato técnico sofisticado. Pode constituir-se em um importante auxílio nos casos onde o estabelecimento do tratamento rápido pode significar a sobrevivência do paciente, especialmente naqueles imunossuprimidos. Apesar dos avanços significativos em muitas áreas da micologia médica, a PCM permanece com um tratamento de consenso ainda não estabelecido e assim representa a oitava causa comum de morte em doenças predominantemente crônicas ou reemergentes, entre as infecciosas e parasitárias e a mais elevada taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas. A anfotericina B (AMB) permanece como a principal escolha terapêutica para micoses severas. No entanto, sua utilização é limitada pela toxicidade. Para melhorar a eficácia terapêutica e reduzir a toxicidade da AMB em altas doses, muitas estratégias incluindo a utilização de mudança no sistema de veiculação da droga têm sido utilizadas. O complexo anfotericina B-7-dehidrocolesterol (AMB-7DC) é uma nova estratégia para AMB para redução de sua toxicidade, utilizando como solvente HCO-60, tornando-se mais hidrossolúvel e resistente às variações térmicas. Este trabalho apresenta dados preliminares da avaliação de AMB-7DC em relação a anfotericina B comercial (AMB-D, Fungizona). Parâmetros *in vitro* de concentração inibitória mínima (MIC) e teste de hemólise em eritrócito de carneiro foram utilizados. Testes *in vivo* avaliaram a LD50 das drogas, o CFU de pulmão em PCM murina, e a taxa de sobrevivência em modelo agudo de criptococose. Os resultados indicaram uma baixa toxicidade *in vitro* para AMB-7DC que não foi hemolítica nas concentrações testadas enquanto a AMB-D mostrou atividade hemolítica. O MIC demonstrou sensibilidade para ambas as drogas ao *Cryptococcus neoformans*. Os resultados *in vivo* em relação ao CFU mostraram resultados semelhantes na PCM para ambas as drogas, não havendo erradicação do fungo. Já os dados da criptococose foram favoráveis ao grupo tratado com AMB-D, havendo dose dependência para ambas. O presente estudo indica que AMB-7DC possui potencial de utilização e, sendo assim, mais estudos são indicados para sua melhor avaliação.

Palavras-chaves: *Paracoccidioides brasiliensis*. LAMP. Anfotericina B. Anfotericina B-7-dehidrocolesterol. *Cryptococcus neoformans*.

TATIBANA, Berenice Tomoko. **Diagnóstico molecular de paracoccidioidomicose pela técnica lamp e avaliação de nova formulação antifúngica complexo anfotericina b-7-dehidrocolesterol**. 2009. 55f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is one of the most epidemiological important systemic mycoses in Latin America, especially in Brazil. The disease is thought to be acquired by inhaling *P. brasiliensis* fungi and the primary infection is in the host's lungs. PCM can be diagnosed by direct observation of the characteristic yeast forms in clinical specimens or in culture. More frequently, diagnosis is inferred from indirect evidence obtained via serological exams, mainly immunodiffusion and immunoenzymatic assays. The diagnosis of PCM is sometimes difficult outside endemic countries, since the disease is uncommon. Certain and rapid diagnosis for PCM is eagerly requested. The loop mediated isothermal amplification method (LAMP) was used in the present study to detect the presence of *P. brasiliensis* in sputa samples from patients with chronic PCM, suspected PCM and a negative control. The target *P. brasiliensis* gp43 gene was amplified in less than four hours in 11 sputa samples. The LAMP method has the advantage of speed and simplicity compared to the classic diagnostic methods such as the histopathological test or biological material culture and did not require sophisticated technical apparatus. It would be an important aid in cases where immediate treatment would mean patient survival, especially in immune suppressed patients. Despite the significant advances in medical mycology areas of knowledge, no adequate treatments have yet been established for PCM and it represents the eighth most common cause of death from predominantly chronic or recurrent types of infectious and parasitic disease. Amphotericin B (AMB) remains the principal therapeutic choice for severe mycosis. However, its application is limited by toxicity. To improve the therapeutic efficacy and to reduce the toxicity of AMB even at high doses, several strategies including the use of the changes in the drug delivery system have been used. The complex amphotericin B-7-dehydrocolesterol (AMB-7DC) is a new and water soluble strategy to AMB reduce toxicity. This study presents the preliminary data of evaluation the AMB-7DC compared to commercial Amphotericin B (AMB-D, Fungizone). *In vitro* parameters of minimum inhibitory concentration (MIC) and hemolysis test in sheep erythrocytes were used. Tests assessed *in vivo* the DL50 of the drugs, lung CFU in murine paracoccidioidomycosis and the test range of survival in an acute cryptococcosis model. The results indicated the lower *in vitro* toxicity of AMB-7DC that was not hemolytic in tested concentrations; while the AMB-D revealed hemolytic activity. The MIC demonstrated the sensibility of *C. neoformans* to both drugs. The results were similar *in vivo* for CFU in paracoccidioidomycosis, for both drugs but the fungi were not eradicated. The cryptococcosis evaluations demonstrated more survival time for the AMB-D group and there was dose dependence for both drugs. The present study indicated that AMB-7DC is potentially useful, and therefore further evaluation of this compound is warranted.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*. LAMP. Amphotericin B. Amphotericin B-7-dehydrocolesterol. *Cryptococcus neoformans*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 PCM: VISÃO GERAL	11
1.2 DIAGNÓSTICO	13
1.2.1 Diagnóstico imunológico.....	14
1.3 UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS DE MOLECULARES	16
1.4 TRATAMENTO	18
2 OBJETIVOS	22
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
4 ARTIGO – DETECTION OF <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> gp43 GENE IN SPUTA BY LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION METHOD	36
ABSTRACT	36
INTRODUCTION	36
MATERIALS AND METHODS.....	37
Clinical Sputa Specimens	37
Extraction of DNA From Sputa.....	37
LAMP Method.....	38
Double Immunodiffusion in Gel.....	38
RESULTS.....	38
DISCUSSION.....	38
REFERENCES.....	40
5 ARTIGO – ESTUDO <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DE NOVA FORMULAÇÃO ANTIFÚNGICA COMPLEXO ANFOTERICINA B-7- DEHIDROCOLESTEROL TOXICIDADE E AÇÃO NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE E CRIPTOCOCOSE EXPERIMENTAL	41
RESUMO	42
ABSTRACT	43

1 INTRODUÇÃO.....	44
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
Drogas testadas.....	45
Avaliação da toxicidade <i>in vitro</i>	45
Avaliação da susceptibilidade pela Concentração inibitória mínima (CIM).....	45
Dose letal 50 (LD50).....	45
Paracoccidiodomicose (PCM) experimental.....	46
Criptococose experimental.....	46
3 RESULTADOS.....	47
Avaliação da toxicidade.....	47
Avaliação da CIM.....	47
DL50.....	47
Avaliação do efeito das drogas AMB-D e AMB-7DC em PCM e criptococose.....	47
PCM experimental.....	47
Criptococose experimental.....	48
4 DISCUSSÃO.....	48
REFERÊNCIAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

1.1 PARACOCCIDIOIDOMICOSE: VISÃO GERAL

A paracoccidiodomicose (PCM), observada pela primeira vez no Brasil por Adolpho Lutz em 1908, é considerada uma micose sistêmica de ocorrência endêmica. É prevalente na América Latina onde o fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*), agente etiológico desta micose sistêmica, provavelmente encontra seu habitat, com exceção de poucos países, indo do México (23° L-N) até a Argentina (34° L-S) (RESTREPO, 1985; BRUMMER et al.; 1993; TALHARI et al., 1988; BLOTTA et al., 1999; ZEMBRZUSKI et al., 1996).

O fungo *P. brasiliensis* apresenta dimorfismo termo dependente e é conhecido apenas em sua forma assexuada ou imperfeita. Apresenta uma forma miceliana (M), aderente ao meio de cultura, à temperatura de 25°C e uma forma de levedura (L), como células globosas com múltiplos brotamentos, nos tecidos hospedeiros ou a 37° em meio de cultura; sendo este um processo de transformação reversível e dependente de regulação termo-enzimática, com síntese de glucanas que modificam sua parede celular. Sabe-se que uma α -1,3-glucana está presente na fase L e uma β -1,3-glucana a substitui, como polímero de glicose, na forma M. Ambas as formas possuem quitina na parede (BRUMMER et al., 1993; LACAZ et al., 1991; SAN-BLAS et al., 1993).

Dados de inquéritos epidemiológicos realizados com paracoccidiodina no Brasil, Venezuela, Colômbia e Argentina, apontam que, em torno de 50% dos habitantes de zonas endêmicas possivelmente já foram expostos ao agente desta micose. Felizmente, apenas uma proporção muito pequena de indivíduos que tem contato com o fungo desenvolve alguma manifestação clínica (RESTREPO, 1985; CADAVID; RESTREPO, 1993; ZEMBRZUSKI, 1996; VAN GELDEREN DE KOMAID et al., 1999; KALMAR et al., 2004; CERMEÑO et al., 2005; MOREIRA, 2008).

Casos da doença têm sido descritos em outros países da Europa, África, Ásia e América do Norte; nesses casos os pacientes relatam contato com regiões endêmicas da América Latina havendo períodos de latência longos, podendo manifestar a doença anos após a possível infecção (AJELLO; POLONELLI, 1985; BRUMMER et al., 1993). A maior

incidência é na população masculina adulta, naqueles que trabalham em atividades agrícolas (MCEWEN et al., 1995; BRUMMER et al., 1993; BLOTTA et al., 1999). Os baixos índices na população feminina são atribuídos ao efeito inibidor do hormônio β -estradiol na transformação micélio-levedura (RESTREPO et al., 1984).

Após penetrar no organismo, o fungo inalado forma um complexo primário no pulmão e dissemina-se por via linfática e hematogênica onde manifestações polimórficas são freqüentes e acompanhadas quase sempre da formação de ulcerações na mucosa oral (LACAZ, 1991; SCULLY; ALMEIDA, 1992). As lesões iniciais podem não causar sinais e sintomas, tornando-se clinicamente inaparentes. É a chamada *PCM-infecção*, durante a qual pode ocorrer resposta imune-específica, com o aparecimento de anticorpos circulantes e positividade de testes de reação intradérmica (FRANCO, 1987; LACAZ, 1991). Esta fase inicial assintomática pode evoluir de três maneiras: a) lesões do complexo primário e eventuais focos metastáticos envolvem, podendo ocorrer lesões cicatriciais estéreis com cura espontânea; b) as lesões envolvem e cicatrizam permanecendo como focos quiescentes, podendo ocorrer reativação destes focos numa forma secundária por reinfecção endógena; c) há a evolução das lesões do complexo primário e dos eventuais focos metastáticos aparecendo as manifestações clínicas da *PCM-doença* (LACAZ, 1991).

Uma vez estabelecida a *PCM-doença*, ela pode evoluir de duas formas distintas: forma progressiva aguda (ou juvenil) e forma progressiva crônica (do adulto). A forma aguda representa menos de dez por cento da casuística geral desta patologia, sendo considerada mais grave e progride rapidamente com disseminação linfática e hematogênica do fungo para o sistema fagocítico mononuclear envolvendo fígado, baço, linfonodos e medula óssea e podendo levar a deterioração rápida da condição do paciente. Altos títulos séricos de anticorpos específicos e depressão grave da imunidade celular são comumente observados (FRANCO et al., 1987; LACAZ, 1991). A adulta representa 90% dos casos e afeta, em geral, indivíduos adultos do sexo masculino com mais de 30 anos de idade. Pode comprometer um único órgão (unifocal) ou disseminar-se para outros órgãos ou sistemas (multifocal). Sua gravidade é variável, dependendo dos achados clínicos e das condições gerais do paciente, sendo classificada como leve, moderada ou grave. Tem curso indolente e manifesta-se por ulcerações nas mucosas da orofaringe e lesões cutâneas nodulares verrugosas ou ulceradas. Os locais menos freqüentes de acometimento são trato gastrointestinal, adrenais, testículos, epidídimo e esqueleto (BRUMMER et al., 1993; DISMUKES, 1997; SEVERO et al., 1996; SPOSTO et al., 1993). É raro no sistema nervoso central e ocular. Não é considerado fungo oportunista, mas há relatos de casos em pessoas infectadas pelo vírus HIV e transplantados

(SHIKANAI-YASUDA et al., 1995; GOLDANI et al., 1991; GOLDANI; SUGAR, 1995). O tipo de patologia tecidual e seu espectro de doença estão intimamente relacionados à imunidade celular do hospedeiro (LACAZ et al., 1991; MARQUES; SHIKANAI-YASUDA, 1994).

1.2 DIAGNÓSTICO

A demonstração de leveduras com brotamentos múltiplos de *P. brasiliensis* em esfregaços a fresco ou preparações de escarro, pus ou outros líquidos corporais com KOH, ou ainda por colorações especiais para fungos na amostra de biópsia, aliada à cultura positiva de líquidos corporais ou amostra de tecidos, é base do diagnóstico micológico (LACAZ et al., 1991; MATTOS et al., 1991). Dependendo da amostra obtida, estes exames oferecem dificuldades ou falso-negativo pela pequena concentração de *P. brasiliensis*, escassa quantidade de material para exame ou formas muito pequenas de *P. brasiliensis* que podem ser confundidas com outros microorganismos

A busca de um antígeno específico para ser usado principalmente em testes sorológicos, como a glicoproteína de 43 kDa (gp43), tem sido alvo de muitos estudos (BLOTTA; CAMARGO, 1993; MENDES-GIANNINI, 1989; MENDES-GIANINNI et al., 1990; MOURA CAMPOS et al., 1995; STAMBUK et al., 1988; STRAUS, et al., 1996). A gp43 é um componente da superfície celular com atividade proteinase em meio ácido (PUCCIA et al., 1986; PUCCIA; TRAVASSOS, 1991) e, em trabalho de Camargo et al. (1988), ela apresentou reconhecimento em 100% dos soros de pacientes testados. Apresenta atividade via receptor laminina e pode ser responsabilizada pela adesão de leveduras de *P. brasiliensis* à membrana basal e invasão de células do hospedeiro que expressem esse receptor (VICENTINI et al., 1994). Essa glicoproteína é continuamente secretada pela forma leveduriforme de *P. brasiliensis* em sua fase exponencial de crescimento quando em meio de cultivo (STAMBUK et al., 1988). Pode ser processada e secretada através do retículo endoplasmático e secretado por simples exocitose ou através de lamossoma (CAMPO-AASEN et al., 1980; STAMBUK et al., 1988; STRAUS et al., 1996). Os perfis conformacionais diferentes da gp43 podem refletir diferenças na infectividade entre os isolados, demonstrado por Souza et al. (1997), que sugerem que nem todos os epítomos antigênicos estão igualmente presentes nos isolados estudados.

1.2.1 Diagnóstico Imunológico

Durante a infecção por *P. brasiliensis*, o sistema imune humoral responde à estimulação antigênica produzindo anticorpos específicos. Estes anticorpos são utilizados em sorodiagnóstico da PCM para monitoramento da doença e da resposta ao tratamento. Na PCM a produção de anticorpos não se mostra deficiente, mas, sim, com hiperatividade - aumento de IgG, imunoglobulina E (IgE), imunoglobulina A (IgA) - indicando uma ativação policlonal, especialmente durante a fase mais severa da doença (BIAGIONI et al., 1984; CHEQUERBOU-HABIB et al., 1989). Os autores Mendes-Giannini et al. (1990) demonstraram que IgG e IgA antígeno-específicas são produzidas tanto na fase aguda como crônica da PCM e a IgM é mais freqüente na fase aguda o que poderia levar à utilização das duas primeiras imunoglobulinas em sorodiagnósticos.

Através de ELISA de captura, Mamoni et al. (2001), monitoraram 32 pacientes e constataram que nível de IgE foi decrescendo em pacientes com a forma juvenil da PCM durante o tratamento enquanto na forma adulta, manteve-se baixo e constante; confirmando a relação entre nível de IgE anti-*P. brasiliensis* e a severidade da doença.

A IgA pode ser encontrada na forma adulta; relacionada à persistência de lesões na mucosa, onde há rica presença de células de Langerhans (BAIDA et al., 1999; MIURA et al., 2001).

Ao analisarem IgG anti-gp43 e suas subclasses, Baida et al. (1999), relataram que há uma diferença na magnitude da produção e distribuição variada de acordo com a forma clínica da PCM. A forma juvenil apresentou nível de IgG total maior que a adulta; corroborando com a maior disseminação fúngica. IgG1 mostrou-se similar nas duas formas. A forma juvenil mostrou nível de IgG4 maior e concomitantemente nível de IgG2 menor; a forma adulta praticamente não tinha IgG4 e produzia IgG2. Considerando que a mudança para subclasse IgG4 depende de interleucina-4 (IL-4) - citocina do tipo T-helper 2 (Th-2) - e IgG2 de interferon- γ - tipo Th-1- e que Th-2 regula predominantemente a forma juvenil; a constatação da IgG2 na forma adulta sugere uma capacidade de se montar uma resposta Th-1 o que contribui para uma evolução mais benigna da doença. Além do mais, pode-se conjecturar que, na forma juvenil, a IgG4 serve como mecanismo de evasão para *P. brasiliensis* porque competindo com IgG1 pelo mesmo antígeno, pode bloquear a opsonização feito por ela na fase inicial da infecção, interferindo com a ação de leucócitos polimorfonucleares anti-*P. brasiliensis*.

Diversos métodos sorológicos para detecção de anticorpos foram desenvolvidos como auxiliares no diagnóstico e como ferramentas para o seguimento do tratamento. Estes testes incluem imunodifusão, fixação de complemento, eritroimunoensaio, ensaio imunoenzimático (ELISA), ELISA de inibição (inh-ELISA), imunoblot, dot-blot, teste imunoradiométrico (IRMA), contra-imunoeletoforese (BUENO et al., 1997; CAMARGO et al., 1984; DEL NEGRO et al., 1991; FERREIRA da CRUZ et al., 1991; FREITAS-DASILVA; ROQUE-BARREIRA, 1992; HAMILTON, 1998; MARTINS et al., 1997; SANBLAS, 1993; TABORDA; CAMARGO, 1993).

Os testes de ELISA possuem uma gama variada de opções e padronizações havendo variação na técnica, na sensibilização da placa e emprego de diferentes anticorpos monoclonais e a possibilidade de análise de diferentes tipos de amostras (CAMARGO et al., 1994; GÓMEZ et al., 1997; SALINA et al. 1998). Todavia, alguns pacientes podem apresentar níveis baixos ou ausência de anticorpos detectáveis (DEL NEGRO et al., 1991; DEL NEGRO et al., 1995). Apesar da melhoria na sensibilidade, a ocorrência de reação cruzada principalmente com antígenos da histoplasmose, doença de Jorge Lobo, criptococose, candidíase e esporotricose consiste num impedimento para uso como método diagnóstico único (CAMARGO et al., 1998; MENDES-GIANINNI et al., 1984; PUCCIA e TRAVASSOS, 1991). A absorção prévia dos soros com células de *Histoplasma capsulatum* (*H. capsulatum*) diminui essa reação cruzada (MENDES-GIANINNI et al., 1984; MENDES-GIANINNI et al, 1990). Não obstante a existência dessa reação cruzada, mesmo utilizando antígeno específico gp43 ou Ag7 (exoantígeno), o ELISA é utilizado com determinação de uma zona de corte ("cut off") que permite distinção de outras doenças fúngicas (STRAUSS et al., 1996). Diante das diferentes preparações de antígeno empregadas (parcialmente purificado, extratos brutos) torna difícil a comparação de resultados entre os métodos descritos (BRUMMER et al., 1993; CAMARGO et al., 1991; CASOTTO, 1990).

Por haver dificuldades para o estabelecimento do diagnóstico da PCM em exame imunológico único, e a obtenção muitas vezes demoradas e complexas das características morfológicas e fisiológicas que definam de pronto o diagnóstico, torna-se importante o desenvolvimento de ensaios adicionais como detecção de antígenos solúveis ou complexo imune (MIURA et al., 2001), e, principalmente, de testes moleculares que uma vez padronizados, diminuíssem esses problemas por basear-se na detecção de determinada sequência nucleotídica, única para *P. brasiliensis* (GOLDANI et al., 1995; GOMES et al., 1999). Além disso, os testes de detecção de DNA podem distinguir organismos morfológicamente ou antígenicamente similares, além do que os parasitas não precisam ser

viáveis ou cultiváveis.

1.3 UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES

O desenvolvimento da Biologia Molecular, com suas técnicas que possibilitam a amplificação do DNA *in vitro*, proporcionou o diagnóstico direto de diversos agentes etiológicos de enfermidades de importância sanitária e econômica para humanos e animais (WILLIAMS, et al., 1990; CONRAD et al., 1992; AZAMBUJA et al., 1994; BIRKENHEUER et al., 2003; LEW; JORGENSEN, 2005; SPEERS, 2006).

Uma das primeiras metodologias da biologia molecular empregadas foram sondas de DNA marcadas com P32 ou biotina, que reconhecem e hibridizam com seqüências alvos espécies-específicas ou gênero-específicas (MCLAUGHLIN et al., 1986; SINGH, 1997). No incremento da sensibilidade das reações baseadas em DNA, Müllis et al. (1986) desenvolveram a reação da polimerase em cadeia (PCR) que é um processo enzimático *in vitro* para a síntese de milhares de cópias de uma região específica do DNA alvo.

O PCR com uso de oligonucleotídeos específicos é uma técnica sensível, específica e rápida para detecção de muitos microorganismos (EISENTEIN et al., 1990; GOLDANI; SUGAR; 1998; SANDHU et al., 1995; SANDHU et al., 1997; WHITE et al., 1992). Essas características são desejáveis diante do incremento da incidência da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), do aparecimento de novos tratamentos oncológicos e de transplantes de órgãos que elevam o número de pacientes imunossuprimidos e a necessidade de um diagnóstico claro de infecções fúngicas oportunistas e reemergentes. Na PCM, a principal vantagem seria na maior rapidez e especificidade do teste (GOLDANI et al., 1991; SANDHU et al., 1995).

Além disso, formas alternativas de PCR como nested-PCR têm sido desenvolvidas e aplicadas ao diagnóstico com a finalidade de prover a essa técnica uma sensibilidade e aplicabilidade maior (FIGUEROA et al., 1993). A reação de nested-PCR é uma alternativa de execução de PCR que visa proporcionar uma maior sensibilidade onde o produto amplificado (amplicon) é submetido a um segundo processo de amplificação utilizando oligonucleotídeos iniciadores homólogos às seqüências internas do segmento já amplificado. Geralmente na primeira PCR é utilizado um oligonucleotídeo iniciador gênero-específico e na segunda PCR um oligonucleotídeo iniciador espécie-específico do parasita em

estudo (ITANO et al., 2002; RAMPERSAD et al., 2003; QUEIROZ et al., 2004).

Em estudo utilizando isolado Pb01, Motoyama et al. (2000) descreveram dois pares de oligonucleotídeos, ITS1-OL5 e OL3-UNIR, para utilização em PCR. Amplificaram e seqüenciaram genes DNA ribossomal 5.8S e 28S e regiões intergênicas do fungo. Recomendaram sua aplicação no diagnóstico de PCM e em estudos ecológicos, moleculares e epidemiológico de *P. brasiliensis*. Demonstraram que os oligonucleotídeos ITS1 e OL5 são capazes de identificar *P. brasiliensis*, incluindo diferentes isolados. Apesar não haver reação cruzada com outros fungos como *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Coccidioides immitis*, *Saccharomyces cerevisiae* e nem com DNA humano, apresentavam com *H. capsulatum* e por isso desenvolveram outro par OL3-UNIR. Propuseram, então, o uso de duplo PCR com esses dois pares de oligonucleotídeos para identificação específica de *P. brasiliensis*.

Trabalhos também foram desenvolvidos com fins diagnósticos, como a detecção em escarro por PCR de *P. brasiliensis* com sensibilidade de 10 células fúngicas/mL de escarro (GOMES et al., 2000); a detecção em amostra de soro de PCM experimental de 10 picogramas (pg) de DNA (GOLDANI; SUGAR, 1998); a utilização de nested-PCR em amostras de tecido parafinado ou homogenizado de pulmão utilizando seqüência da gp43 ou de RNA ribossomal ITS1-5.8S-ITS2 (BIALEK et al., 2000; SANO et al., 2001). Além disso, avanços com outras ferramentas moleculares como a utilização de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), permitem a caracterização genotípica de diferentes isolados e diferenciação do grau de virulência (MOLINARI-MADLUM et al., 1999; SOARES et al., 1995). Trabalhos recentes utilizam de técnica molecular para classificar os isolados de *P. brasiliensis* em três espécies filogenéticas distintas, a saber: S1, PS2 e PS3 (MATUTE et al., 2005; MATUTE et al., 2006; MATUTE et al., 2007) além de possibilitar caracterização de isolado atípico (TAKAYAMA et al., 2009). A utilização de sondas marcadas permite a identificação precisa do fungo (SANDHU et al., 1997); e o desenvolvimento de oligonucleotídeos específicos com potencial uso em estudos ecológicos (DÍEZ et al., 1999; IMAI et al., 2000; MCEWEN et al., 1995; MCEWEN et al., 2000; SANO et al., 1999a; SANO et al., 1999b), demonstram os avanços dos estudos moleculares nos últimos tempos e a consolidação da importância destas pesquisas.

Notomi et al. (2000) desenvolveram uma técnica de alta especificidade que amplifica DNA com eficiência e rapidez sob condições de isoterma (aproximadamente 60°C a 65°C). Esse método denominado amplificação circular isotérmica (“Loop mediated isothermal amplification” - LAMP) utiliza DNA polimerase e quatro conjuntos de

oligonucleotídeos específicos que reconhecem um total de seis seqüências distintas no DNA molde. Uma das primeiras aplicações da LAMP foi para diagnóstico do vírus da hepatite B (NOTOMI et al., 2000). Encontra-se em uso na detecção direta do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* em amostras de escarro (IWAMOTO et al., 2003) e *Plasmodium falciparum* (POON et al., 2006). Para a PCM, o primeiro trabalho utilizando LAMP foi de Endo et al. (2004), onde se comprovou a especificidade detectando o gene da gp-43 em um tempo de apenas três horas e, não obstante a aplicação em uma única amostra de tecido processado, indicou a perspectiva de sua utilização em diagnóstico clínico.

Dentro deste contexto, o presente estudo agora comprova a utilização desta técnica LAMP para o diagnóstico da PCM em amostras de escarro (TATIBANA et al., 2009).

1.4 TRATAMENTO

O tratamento da PCM persiste como não estabelecido. Inclui medidas de suporte às complicações clínicas associadas ao envolvimento de diferentes órgãos pela micose além da terapêutica antifúngica (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

Diferente de outros fungos patogênicos, *P. brasiliensis* é sensível à maioria das drogas antifúngicas, inclusive aos sulfamídicos. Sendo assim, permite a utilização de um leque de opções para o tratamento, tais como anfotericina B, sulfamídicos (sulfadiazina, associação sulfametoxazol/trimetoprim), azólicos (cetoconazol, fluconazol, itraconazol) (DEL NEGRO; 1987, SHIKANAI-YASSUDA et al, 2006). Estas drogas compreendem então, três grupos principais: anfotericina B, do grupo de antibióticos poliênicos; sulfadiazina e outros compostos sulfanilamídicos; e o grupo de drogas azólicas com atuação sistêmica (MARTINEZ, 2004).

O emprego dos derivados azólicos como cetoconazol, fluconazol e itraconazol é eficaz para a PCM. O fluconazol pode ser administrado por via oral ou intravenosa, a absorção não é afetada pela alimentação ou pelo suco gástrico e aproximadamente 80% da dose é excretada na urina. A resistência fúngica a esta droga, mesmo quando usada por longos períodos, parece incomum, a não ser nos casos de portadores da SIDA (COMO; DISMUKES, 1994; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

As sulfas também são eficazes no tratamento da PCM e podem ser obtidas

gratuitamente no sistema público brasileiro. A posologia apresenta a desvantagem de várias administrações diárias. Podem ocorrer efeitos colaterais como reação de hipersensibilidade, e a duração da terapia é mais prolongada quando comparada com outros fármacos (MARTINEZ, 2004; SHIKANAI-YASUDA, 2006).

O tratamento da PCM consiste geralmente de duas fases distintas: ataque e manutenção. O tratamento de ataque objetiva controle imediato dos sinais e sintomas da doença, bem como a redução da carga parasitária para a recuperação da imunidade celular do hospedeiro, fundamental para o êxito do tratamento. A terapêutica da manutenção é realizada por tempo longo, até que se obtenham critérios de cura clínica, radiológica e sorológica, buscando reduzir o risco de recidiva da doença (BISINELLI; FERREIRA, 2002).

Os pacientes com formas graves de PCM, que apresentam indicação de tratamento em regime hospitalar por apresentarem perda de peso maior que dez por cento, associada à dificuldade de deglutição, comprometimento do estado geral, insuficiência respiratória, sinais ou sintomas neurológicos ou evidências de comprometimento de adrenais; recebem a anfotericina B, na dose de 1mg/kg/dia ou solução intravenosa de sulfametoxazol/trimetoprim, na dose de duas ampolas cada oito horas até melhora clínica do paciente que permita a introdução da medicação antifúngica oral (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

Ao lado de sua comprovada eficácia, a anfotericina B é uma droga tóxica que requer longo período de hospitalização para sua administração (CAMPOS et al., 1984). Os efeitos imediatos da anfotericina B são caracterizados por febre, mal-estar geral, calafrios, taquicardia, taquipnéia e hipertensão arterial. Estas reações podem ser minimizadas com uso de dipirona e diminuição da velocidade de infusão. Especial atenção deve ser dada à função renal, devido a sua alta nefrotoxicidade. Ela causa um decréscimo na taxa de filtração glomerular, bem como hipocalemia, hipomagnesemia, acidose tubular renal e nefrocalcinose. Os níveis séricos de creatinina devem ser medidos semanalmente em pacientes recebendo anfotericina B (BERNARD et al, 1995, NETO et al.; 1998).

Apesar da indicação restrita às formas graves da PCM, sua comprovação terapêutica mantém sua indicação. De 29 pacientes avaliados de nove a 14 anos após o uso de anfotericina B, apresentavam-se clínica, radiológica e sorologicamente curados uma porcentagem de 51,72% (DILLON, 1972). Vale (1988), em estudo retrospectivo e prospectivo de 500 casos de PCM tratados com sulfamídicos, anfotericina B, micosel, cetoconazol e itraconazol e associação sulfametoxazol e trimetoprim, conclui que as drogas mostram eficácia semelhante. Dillon (1990) na evolução terapêutica de doentes de

paracoccidioidomicose tratados com anfotericina B, sulfamídicos e cetoconazol, observaram que a melhora clínica com cicatrização de lesões e melhora radiológica, ocorre mais rapidamente com anfotericina B, isto em períodos variáveis de 15 dias a um mês com dose de 1,5 mg/kg peso/dia.

Diante desta efetividade terapêutica circunscrita pela toxicologia e reações adversas da droga que não permitem o uso de doses elevadas, mais efetivas (acima de 1,5 mg/kg/dia), bem como seu uso profilático; nestes últimos anos têm-se buscado formulações lipídicas para veiculação da anfotericina. Nessa tentativa de melhorar a especificidade, diminuindo a reação com o colesterol das células mamárias e sua toxicidade, muitos trabalhos foram direcionados ao desenvolvimento de preparações lipídicas, chegando às formulações veiculadas em lipossomas, p. ex. AmBisome (LOPEZ-BERESTEIN et al., 1983; HOSPENTHAL et al., 1988; HOSPENTHAL et al., 1989; CHOPRA et al., 1991), complexos lipídicos, p.ex. ABLC (JANOFF et al., 1988; BALAKRISHNAN; EASWARAN, 1993) e emulsões (MIYAZAKI et al., 1990; CHAVANET et al., 1992a; CHAVANET et al., 1992b; SOUZA et al., 1993). Estas formulações são diferentes em relação à estrutura, forma, tamanho, composição lipídica e conteúdo de anfotericina (DISMUKES, 2000).

A possibilidade do emprego de concentrações mais altas de anfotericina veiculada em formulações lipídicas ainda menos tóxicas, tem relevada importância, contudo, efeitos indesejáveis como febre, calafrio, rigidez, sonolência, discreta elevação dos testes de função hepática, disfunção renal e toxicidade cardiopulmonar foram documentadas em pacientes que receberam AmBisome (WALSH et al., 1998). Além disso, foram constatados casos de reações anafiláticas. O primeiro foi de dois casos em pacientes com candidíase sistêmica e a reação foi relacionada aos componentes lipossômicos, pois após reverter o quadro de anafilaxia, o tratamento antifúngico com anfotericina deoxicolato foi retomado e não houve mais desenvolvimento de reações anafiláticas (LAING et al., 1994). Outros relatos foram de um caso de uma criança de dois anos (VAIDYA et al., 2002) e de um paciente com aspergilose semi-invasiva (LAMPO et al., 2003), que estavam sendo tratados com AmBisome e não eram alérgicos à anfotericina deoxicolato, confirmando a hipótese de a reação ter ocorrido em função dos componentes lipídicos da formulação.

Na PCM, Dietz et al. (1999) relataram a falha terapêutica da anfotericina B coloidal (Amphocil®), utilizada na dose de 3mg/kg/dia por 28 dias, em quatro pacientes de forma juvenil, um dos quais portador de co-infecção pelo HIV. Apesar da boa resposta inicial, com cura aparente, os três pacientes recaíram no prazo de seis meses do término do esquema proposto. Um deles não respondeu desde o início do tratamento.

Desta forma, na tentativa de aumentar o índice terapêutico da anfotericina, vários grupos de pesquisadores em todo o mundo continuam desenvolvendo estratégias para redução de toxicidade e manutenção do antifúngico mais efetivo para micoses sistêmicas. Dentre estes, da Universidade de Chiba, no Japão, encontra-se os pesquisadores do Centro de Pesquisa de Micologia Médica que desenvolveram uma formulação nova da anfotericina deoxicolato, denominado Complexo Anfotericina B-7-dehidrocolesterol e que, no presente trabalho, propõe-se, com utilização de parâmetros “*in vitro*” e “*in vivo*”, iniciar sua análise para futura aplicação na terapêutica de PCM.

2 OBJETIVOS

- Analisar a aplicação da técnica LAMP no diagnóstico da PCM utilizando amostras clínicas de escarro.
- Investigar a toxicidade e aplicabilidade terapêutica da nova formulação AMB -7-DC em infecções fúngicas: PCM e criptococose experimental murina.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJELLO, L.; POLONELLI, L. Imported paracoccidioidomycosis: a public health problem in non-endemic areas. **Eur. J. Epid.**, 1(3), p.160-165, 1985.

AZAMBUJA, C.; GAYO, V.; SOLARI, M.; SUAREZ, M.; STOLL, M. Biotechnology applied to the detection of infectious agents in cattle. Diagnosis of Babesia bovis by PCR. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 3(1), p. 1-4, 1994.

BAIDA, H.; BISELLI, P. J. C.; JUVENALE, M.; DEL NEGRO, G. M. B.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; DUARTE, A. J. S.; BENARD, G.. Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. **Microb. Infect.**, 1(4), p.273-278, 1999.

BALAKRISHNAN, A. R.; EASWARAN, K. R. K. Lipid amphotericin B complex structure in solution: a possible first step in the aggregation process in cell membranes. **Biochemistry**, 32(15), p. 4139-4144, 1993.

BERNARD, G; NEUGS, C.P.; GRYSCHKEK, R.C.B; DUARTE, J. S. Severe juvenile type Paracoccidioidomycosis in an Adult. **J. Med. Vet. Mycol.**, 33(1), p. 67-71, 1995.

BIAGIONI, L.; SOUZA, M. J.; CHAMMA, L. G.; MENDES, R. P.; MARQUES, S. A.; MOTA, N. G. S.; FRANCO, M. Serology of paracoccidioidomycosis. II. Correlation between class-specific antibodies and clinical forms of the disease. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, 78(5), p.617-621, 1984.

BIALEK, R.; IBRICEVIC, A.; AEPINUS, C.; NAJVAR, L.; FOTHERGILL, A. W.; KNOBLOCH, J.; GRAYBILL, J. R. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a nested PCR assay. **J. Clin. Microbiol.**, 38(8), p. 2940-2942, 2000.

BIRKENHEUER, A. J.; LEVY M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and Evaluation of a Seminested PCR for Detection and Differentiation of Babesia gibsoni (Asian Genotype) and B. canis DNA in Canine Blood Samples. **J. Clin. Microbiol.**, 41(9), p. 4172-4177, 2003.

BISINELLI, J. C.; FERREIRA, M. L. S. Doenças infecciosas: paracoccidioidomycose (blastomycose sul-americana). In: TOMMASI, A. F. **Diagnóstico em patologia bucal**. 3ª ed. São Paulo: Pancast; p. 202-9, 2002.

BLOTTA, M. H.; CAMARGO, Z. P. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, 31(3), p.671-676, 1993.

_____ ; MAMONI, R. L.; OLIVEIRA, S. J.; NOUER, S. A.; PAPAORDANOU, P. M., GARCIA, A.; CAMARGO, Z. P. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast regions. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 61(3), p.390-394, 1999.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin. Microbiol. Rev.**, 6(2), p. 89-117, 1993.

BUENO, J. P.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; DEL NEGRO, G. M. B.; ASSIS, C. M.; TAKIGUTI, C. K.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. IgG, IgM and IgA antibody response for the diagnosis and follow-up of paracoccidioidomycosis: comparison of counterimmunoelectrophoresis and complement fixation. **J. Med.Vet. Mycol.**, 35(3), p.213-217, 1997.

CADAVID D., RESTREPO A. Factors associated with *Paracoccidioides brasiliensis* infection among permanent residents of three endemic areas in Colombia. **Epidemiol. Infect.**, 111(1), p. 121-33, 1993.

CAMARGO, Z. P.; GUESDON, J. L.; DROUHET, E.; IMPROVISI, L. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the paracoccidioidomycosis. **Mycopathol.**, 88(1), p.31-37, 1984.

_____ ; UNTERKIRCHER, C. CAMPOY, S. P.; TRAVASSOS, L. R. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. **J. Clin. Microbiol.**, 26(10), p. 2147-2151, 1988.

_____ ; TABORDA, C. P.; RODRIGUES, E. G.; TRAVASSOS, I. R. The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. **J. Med. Vet. Mycol.**, 29(1), p.31-38, 1991.

_____ ; GESZTESI, J. L.; SARAIVA, E. C. O.; TABORDA, C. P.; VICENTINI, A. P.; LOPES, J. D. Monoclonal antibody capture enzyme immunoassay for detection of *Paracoccidioides brasiliensis* antibodies in paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, 32(10), p.2377-2381, 1994.

_____ ; BARUZZI, R. G.; MAEDA, S. M.; FLORIANO, M. C. Antigenic relationship between *Loboa lobo* and *Paracoccidioides brasiliensis* as shown by serological methods. **Med. Mycol.**, 36(6), p.413-417, 1998.

CAMPOS, E. P; SARTORI, J. C; HETCH, M. L.; FRANCO, F. Clinical and Serologic features of 47 patients with Paracoccidioidomycosis treated by Amphotericin B. **Rev. Inst. Med. Trop.** , 26(4), p. 212-217, 1984.

CAMPO-AASEN, I.; CABRAL N. A.; YARZABAL, L. Subcellular localization of antigen E/2 of *Paracoccidioides brasiliensis*: an immunoenzymatic electron microscopy study. **Saboraudia**, 18, p. 167-171, 1980.

CASOTTO, M.. Characterization of the cellular antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form. **J. Clin. Microbiol.**, 28(6), p. 1188-1193, 1990.

CERMEÑO J. R.; CERMEÑO J. J.; HERNÁNDEZ I.; GODOY G.; CERMEÑO J. J.; CABELLO I.; ORELLÁN Y.; BLANCO Y.; PENNA S. Histoplasmine and paracoccidioidine epidemiological study in Upata, Bolívar state, Venezuela. **Trop. Med. Int. Health.**, 10(3), p. 216-219, 2005.

CHAVANET, P. Y.; GARRY, I.; CHARLIER, N.; CAILLOT, D.; KISTERMAN, J. P.; D'ATHIS, M.; PORTIER, H. Trial of glucose versus fat emulsion in preparation of amphotericin for use in HIV infected patients with candidiasis. **BMJ.**, 305(6859), p. 921-925, 1992a.

CHAVANET, P.; CHARLIER, N.; BRENET, A.; GOUX, A.; MUGGÉO, E.; CAILLOT, D.; CASASNOVAS, O.; KISTERMANN, J. P.; WALDNER, A.; PORTIER, H. Emulsion of amphotericin B in Intralipid 20%: *in vitro* and *in vivo* efficacy. **Pathol. Biol.**, 40(5), p. 507-512, 1992b.

CHEQUER-BOU-HABIB, D.; RIBEIRO, C. D.; BANIC, D. M.; DO VALLE, A. C. F.; CASTRO, B. G. Polyclonal B cell activation in paracoccidioidomycosis. **Mycopathol.**, 108, p. 89-93, 1989.

CHOPRA, R.; BLAIR, S.; STRANG, J.; CERVI, P.; PATTERSON, K. G.; GOLDSTONE, A. H. Liposomal amphotericin B (AmBisome) in the treatment of fungal infections in neutropenic patients. **J. Antimicrob. Chemother.**, 28(Suppl B), p. 93-104, 1991.

COMO, J. A.; DISMUKES W. E. Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. **N. Engl. J. Med.**, 330(4), p.263-272, 1994.

CONRAD, P.A.; THOMFORD, J.W.; MARSH, A.; TELFORD, S.R.; ANDERSON, J. F.; SPIELMAN, A.; SABIN, E. A.; YAMANE, I.; PERSING, D.H. Ribosomal DNA probe for differentiation of *Babesia microti* and *B. gibsoni* isolates. **J. Clin. Microbiol.**, 30(5), p. 1210-1215, 1992.

DEL NEGRO, G. Avanços terapêuticos em micoses profundas, com ênfase à paracoccidiodomicose. **An. Bras. Dermatol.**, 62(4), p. 209-212, 1987.

_____; M. B.; GARCIA, N. M.; RODRIGUES, E. G.; CANO, M. I. N.; AGUIAR, M. S. M. V.; LÍRIO, V. S.; LACAZ, C. S. The sensitivity, specificity and efficiency values of some serological tests used in the diagnosis of paracoccidiodomycosis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 33(4), p. 277-280, 1991.

_____; BERNARD, G.; ASSIS, C. M.; VIDAL, M. S. M.; GARCIA, N. M.; OTANI, C.; SHINKAI-YASUDA, M. A.; LACAZ, C. S. Lack of reactivity of paracoccidiodomycosis sera in the double immunodiffusion test with the gp43 antigen: report of two cases. **J. Med. Vet. Mycol.**, 33(2), p. 113-116, 1995.

DÍEZ, S.; GARCIA, E. A.; PINO, P. A.; BOTERO, S.; CORREDOR, G. G.; PERALTA, L. A.L.; CASTAÑO, J. H.; RESTREPO, A.; McEWEN, J. G. PCR with *Paracoccidoides brasiliensis* specific primers: potential use in ecological studies. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 41(6), p. 351-357, 1999.

DILLON, N. L. **Tratamento da Paracoccidiodomicose pela Anfotericina B. Avaliação de 14 Anos.** São Paulo. 1972. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo.

_____; MARQUES, S. A. Vantagens e desvantagens da anfotericina B no tratamento da paracoccidiodomicose. **Na. Bras. Dermatol.**, 65(5): 226-227, 1990.

DISMUCKES, W. E. Paracoccidiodomicose. IN: BENNETT, J. C.; PLUM, F. **Cecil - Tratado de medicina interna**, parte XXI, 351, 20. ed., v. 2, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

DISMUCKES, W. E. Introduction to antifungal drugs. **Clin. Infect. Dis.**, 30(4), p. 653-657, 2000.

EINSENSTEIN, B. I. New molecular techniques for microbial epidemiology and diagnosis of infectious diseases. **J. Infect. Dis.**, v.161(4), p. 595-602, 1990.

ENDO, S.; KOMORI K.; RICCI, G.; SANO A.; YOKOYAMA K.; OHORI K.; KAMEI K.; FRANCO M., MIYAJI M.; NISHIMURA K. Detection of *gp43* of *Paracoccidioides brasiliensis* by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. **FEMS Microbiol. Lett.**, 234(1), p. 93–97, 2004.

FERREIRA DA CRUZ, M. F.; CASTRO, B. G.; RIBEIRO, C. T. D. Sensitive immunoradiometric assay for the detection of *Paracoccidioides brasiliensis* antigens in human sera. **J. Clin. Microbiol.**, 29(6), p. 1202-1205, 1991.

FIGUEROA, J. V.; CHIEVES L. P.; JOHNSON G. S.; BUENING; G. M. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. **Vet. Parasitol.**, 50(1-2), p.69-81, 1993.

FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R.; MENDES, R. P.; MARQUES, S. A.; DILLON, N. L.; MOTA, N. G. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of this clinical forms. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 27(9), p.129-132, 1987.

FREITAS-DA-SILVA, G.; ROQUE-BARREIRA M. C. Antigenemia in paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, 30(2), p. 381-385, 1992.

GOLDANI, L. Z.; COELHO, I. C. B.; MACHADO, A. A.; MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycosis and aids. **Scan. Infect. Dis.**, 23(3), p. 393, 1991.

_____ ; MAIA, A L.; SUGAR, A M. Cloning and nucleotide sequence of a specific DNA fragment from *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Clin. Microbiol.**, 33(6), p. 1652-1654, 1995.

_____ ; SUGAR, A. M. Paracoccidioidomycosis and aids. **Clin. Infect. Dis.**, 21, p. 1275-1281, 1995.

_____ ; SUGAR, A. M. Short report: use of the polymerase chain reaction to detect *Paracoccidioides brasiliensis* in murine paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 58(2), p. 152-153, 1998.

GOMES, G. M. **Padronização da técnica de PCR para diagnóstico de paracoccidioidomycose baseada em seqüências do gene da gp43 de *Paracoccidioides brasiliensis***. São Paulo, 1999. Dissertação (Mestrado em Microbiologia e Imunologia)-Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina.

GÓMEZ, B. L.; FIGUEROA, J. I.; HAMILTON, A. J.; ORTIZ, B.; ROBLEDO, M. A.; HAY, R. J.; RESTREPO, A. Use of Monoclonal antibodies in diagnosis of paracoccidioidomycosis: new strategies for detection of circulating antigens. **J. Clin. Microbiol.**, 35(12), p. 3278-3283, 1997.

_____ ; CISALPINO, P. S.; TABORDA, C. P.; CAMARGO, Z. P. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, 38(9), p. 3478-3480, 2000.

HAMILTON, A. J. Serodiagnosis of histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and penicilliosis marneffeii; current status and future trends. **Med. Mycol.**, 36(6), p. 351-364, 1998.

HOSPENTHAL, D. R.; ROGERS, A. L.; MILLS, G. L. Development of amphotericin B liposomes bearing antibody specific to *Candida albicans*. **Mycopathol.**, 110(1), p. 37-45, 1988.

HOSPENTHAL, D.; GRETZINGER, K.; ROGERS, A. Treatment of a murine model of systemic candidiasis with liposomal amphotericin B bearing antibody to *Candida albicans*. **J. Med. Microbiol.**, 30(3), p. 193-197, 1989.

IMAI, T.; SANO, A.; MIKAMI, Y.; WATANABE, K.; AOKI, F. H.; BRANCHINI, M. L. M.; NEGRONI, R.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. A new PCR primer for the identification of *Paracoccidioides brasiliensis* based on rRNA sequences coding the internal transcribed spacers (ITS) and 5.8s regions. **Med. Mycol.**, 38(4), p. 323-326, 2000.

ITANO, E. N. ; Uno J ; SANO, A. ; YARITA, K. ; MIYAJI, M. ; NISHIMURA, K. ; MIKAMI, Y. . Detection of the gp43 gene and (1-3) β -D-glucan of *Paracoccidioides brasiliensis* in the blood of experimentally infected mice. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*, Japan, v. 49, p. 29-35, 2002.

IWAMOTO, T.; SONOBE, T.; HAYASHI, K. Loop- mediated isothermal amplification for direct detection of *Micobacterium tuberculosis* complex, *M. avium* and *M. intracelulare* in sputum sample. **J. Clin. Microbiol.**, 41(6), p. 2616-2622, 2003.

JANOFF, A. S.; BONI, L. T.; POPESCU, M. C.; MINCHEY, S. R.; CULLIS, P. R.; MADDEN, T. D.; TARASCHI, T.; GRUNER, S. M.; SHYAMSUNDER, E.; TATE, M. W.; MENDELSON, R.; BONNER, D. Unusual lipid structures selectively reduce the toxicity of Amphotericin B. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, . 85(16), p. 6122-6126, 1988.

KALMAR, E. M.; ALENCAR, F. E.; ALVES, F. P.; PANG, L. W.; DEL NEGRO, G. M.; CAMARGO, Z. P.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. Paracoccidioidomycosis: an

epidemiologic survey in a pediatric population from the Brazilian Amazon using skin tests. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 71(1), p. 82-6, 2004.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. Paracoccidioidomicose. IN: **Micologia Médica - fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**, Cap. 13, p. 248-297, São Paulo: Sarvier, 1991.

LAING, R. B. S.; MILNE, L. J. R.; LEEN, C. L. S.; MALCOM, G. P.; STEERS, A. J. W. Anaphylactic reactions to liposomal amphotericin. **Lancet**, 344(8923), p. 682,1994.

LAMPO, N.; SPILIOPOULOS, A.; LICKER, M.; TSCHOPP, J. M. Management of postpneumectomy Aspergillus empyema extending into the thoracic wall: a plea for radical surgery and caution when using liposomal amphotericin B. **Inter. Cardiovasc. Thoracic. Surg.**, 2(4), p. 682-684, 2003.

LEW, A.; JORGENSEN, W. Molecular approaches to detect and study the organisms causing bovine tick borne diseases: babesiosis and anaplasmosis. **Afr. J. Biotechnol.**, 4, 292-302, 2005.

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. Dis.**, 147(5), p. 939-945, 1983.

MAMONI, R. L.; ROSSI, C. L.; CAMARGO, Z. P.; BLOTA, M. H. S. L. Capture enzyme-linked immunosorbent assay to detect specific immunoglobulin e in sera of patients with paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 65(3), p. 237-241, 2001.

MARQUES, S. A.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. Paracoccidioidomycosis associated with immunosuppression, aids and cancer. IN: FRANCO, M; LACAZ, C. S.; RESTREPO, A. M.; DEL-NEGRO, G. (ed.) **Paracoccidioidomycosis**, EUA: CRC Press, 1994.

MARTINEZ, R. Paracoccidioidomicose. In: SIDRIM, J. J. C.; Rocha, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 204-21, 2004.

MARTINS, R.; MARQUES, S.; ALVES, M.; FECCHIO, D.; FRANCO, M. F. Serological follow-up of patients with paracoccidioidomycosis treated with itraconazole using dot-blot, Elisa and western-blot. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 39(5), 1997.

MATTOS, M. C. Sputum cytology in the diagnosis of pulmonary paracoccidioidomycosis. **Mycopathol.**, 114(3), p. 187-191, 1991.

MATUTE, D. R.; MCEWEN, J. G.; PUCCIA, R.; MONTES, B. A.; SAN-BLAS, G.; BAGAGLI, E.; RAUSCHER, J. T.; RESTREPO, A.; MORAIS, F.; NIÑO-VEJA, G.; TAYLOR, J. W. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol. Biol. Evol.**, 23(1), p.65-73, 2005.

_____; D. R.; SEPULVEDA, V. E.; QUESADA, L. M.; GOLDMAN, G.H.; TAYLOR, J. W.; RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G. Microsatellite analysis of three phylogenetic species of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Clin. Microbiol.**, 44, p.2153-2157, 2006.

_____; TORRES, I. P.; SALGADO-SALAZAR, C.; RESTREPO, A.; MCEWEN J. G. Background selection at the chitin synthase II (*chs2*) locus in *Paracoccidioides brasiliensis* species complex. **Fungal Genet. Biol.**, 44:, p. 357-367, 2007.

MCEWEN, J.G.; GARCIA, A. M. ORTIZ, B. L.; BOTERO, S.; RESTREPO, A. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Arch. Med. Res.**, 26(3), p. 305-306, 1995.

_____; TAYLOR, J. W.; CARTER, D.; XU, J.; FELIPE, M. S. S.; VILGALYS, R.; MITCHELL, T. G.; KASUGA, T.; WHITE, T.; BUI, T.; SOARES, C. M. A. Molecular typing of pathogenic fungi. **Med. Mycol.**, 38(1), p. 189-197, 2000.

MCLAUGHLIN, G. L.; EDLIND, T. D.; IHLER, G. M. Detection of *Babesia bovis* using DNA hybridization. **J. Protozool.**, 33(1): 125-128, 1986.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; CAMARGO, M. E.; LACAZ, C. S.; FERREIRA, A. W. Immunoenzymatic absorption test for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, 20(1), p. 103-108, 1984.

_____, M. J. S.; BUENO, J. P.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; FERREIRA, A. W.; MASUDA, A. Detection of the 43,000-molecular-weight glycoprotein in sera of patients with paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, 27(12), p. 2842-2845, 1989.

_____, M. J. S.; BUENO, J. P.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; STOLF, A. M. S.; MASUDA, A. AMATO-NETO, V.; FERREIRA, A. W. Antibody response to the 43 Kda glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as a marker for the evaluation of patients under treatment. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 43(2), p. 200-206, 1990.

MIURA, C. S.; ESTEVÃO, D.; LOPES, J. D.; ITANO, E. N. Levels of specific antigen (gp43), specific antibodies, and antigen-antibody complexes in saliva and serum of paracoccidioidomycosis patients. **Med. Mycol.**, 39(5), p. 423-428, 2001.

MIYAZAKI, T.; KOHNO, S.; YASUOKA, A.; MAESAKI, S.; YAMADA, H.; SASAYAMA, K.; DOHTSU, Y.; YAMAGUCHI, K.; HIROTA, M. A lipid emulsion formulation of amphotericin B for the treatment of murine candidiasis and cryptococcosis. **Chemotherapy**, 38, p. 548-551, 1990.

MOLINARI-MADLUM, E. E. W.; FELIPE, M. S.; SOARES, C. M. A. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates can be correlated to groups defined by random amplified polymorphic DNA analysis. **Med. Mycol.**, 37(4), p. 269-276, 1999.

MOREIRA, A. P. V. Paracoccidioidomicose: histórico, epidemiologia, patogênese, formas clínicas, diagnóstico laboratorial e antígenos. **BEPA-Boletim Epidemiológico Paulista**. 5(51), 17 p. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa51_paracocci.htm>. Acesso em: 25 junho 2008.

MOTOYAMA, A. B.; VENANCIO, E. J.; BRANDÃO, G. O.; PETROFEZA-SILVA, S.; PEREIRA, I. S.; SOARES, C. M. A.; FELIPE, M. S. S. Molecular identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by amplification of ribosomal DNA. **J. Clin. Microbiol.**, 38(8), p. 3106-3109, 2000.

MOURA CAMPOS, M. C. R.; GESZTESI, J. L.; VINCENTINI, A. P.; LOPES, J. D.; CAMARGO, Z. P. Expression and isoforms of gp43 in different strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, 33(4), p. 223-227, 1995.

MÜLLIS, K. B.; FALOONA, F. A.; SCHARF, S. J.; SAIKI, R. K., HORN G. T.; ERLICH H. A. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The Polymerase Chain Reaction. **Cold Spring Harbor Symp. Biol.**, 51 Pt 1, p. 263-273, 1986.

NETO, A. F. O.; PAIS, L. P. F.; ALVES, S. T. Utilização da anfotericina b no tratamento da paracoccidioidomicose. **R. Un. Alfenas**, 4, p. 71-74, 1998.

NOTOMI, T.; OKAYAMA, H.; MASUBUCHI, H.; YONEKAWA, T., WATANABE, K.; AMINO, N.; HASE, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucl. Ac. Res.**, 28(12), E63, 2000.

POON, L. L. M.; WONG, B. W. Y.; MA E. H. T.; CHAN, K. H.; CHOW L. M. C.; ABEYEWICKREME, W.; TANGPUKDEE N.; YEN K. Y.; GUAN Y.; LOOAREESUWAN

S.; PEIRIS, M. Sensitive and inexpensive molecular test for *Plasmodium falciparum* Malaria: detecting *Plasmodium falciparum* DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification. **Cl. Chem.**, 52(2), p.303-306, 2006.

PUCCIA, R.; SCHENKMAN, S.; GORIN, P. A. J.; TRAVASSOS, L. R. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. **Infect. Immun.**, 53(1), p. 199-206, 1986.

_____, R.; TRAVASSOS, L. R. 43-Kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: Immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. **J. Clin. Microbiol.**, 29(8), p. 1610-1615, 1991.

QUEIROZ, P. R.; VALADARES-INGLIS, M. C.; INGLIS, P. W. Survival in soil and detection of cotransformed *Trichoderma harzianum* by nested PCR. **Pesq. Agrop. Bras.**, 39, p. 403-405, 2004.

RAMPERSAD, J. N.; CESAR, E.; CAMPBELL, M. D.; SAMLAL, M.; AMMONS, D. A field evaluation of PCR for the routine detection of *Babesia equi* in horses. **Vet. Parasitol** 114(2), p. 81-87, 2003.

RESTREPO, A.; SALAZAR, M. E. CANO, L. E.; STOVER, E. P. FELDMAN, D. STEVENS, D. A. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, 46(2), p. 346-353, 1984.

_____ The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis* : a puzzle still unsolved. **J. Med. Vet. Mycol.**, V.23, p. 323-334, 1985.

SALINA, M. A.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; MENDES, R. P.; BARRAVIERA, B.; GIANNINI, M. J. S. M. Detection of Circulating *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in urine of paracoccidioidomycosis patients before and during treatment. **J. Clin. Microbiol.**, 36(6), p. 1723-1728, 1998.

SAN-BLAS, G. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, 31, p. 99-113, 1993.

SANDHU, G. S.; KLINE, B. C.; STOCKMAN, L.; ROBERTS, G. D.. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. **J. Clin. Microbiol.**, 33(11), p. 2913-2919, 1995.

_____ ; ALEFF, R. A.; KLINE, B. C.; LACAZ, C. S. Molecular detection and identification of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Clin. Microbiol.**, 35(7), p. 1894-1896, 1997.

SANO, A.; DEFAVERI, J.; TANAKA, R.; YOKOYAMA, K.; KURITA, N.; FRANCO, M.; COELHO, K. I. R.; BAGAGLI, E.; MONTENEGRO, M. R.; MIYAJI, M. NISHIMURA, K. Pathogenicities and GP43kD gene of three *Paracoccidioides brasiliensis* isolates originated from a nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*). **Mycopathol.**, 144, p. 61-65, 1999a.

_____ ; TANAKA, R.; YOKOYAMA, K.; FRANCO, M.; BAGAGLI, E.; MONTENEGRO, M. R.; MIKAMI, Y.; MIYAJI, M.; NISHIMURA, K. Comparison between human and armadillo *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. **Mycopathol.**, 143, p. 165-169, 1999b.

_____ ; YOKOYAMA, K.; TAMURA, M.; MIKAMI, Y.; TAKAHASHI, I.; FUKUSHIMA, K.; MIYAJI, M.; NISHIMURA, K. Detection of gp43 and ITS1-5.8S-ITS2 Ribosomal RNA genes of *Paracoccidioides brasiliensis* in paraffin-embedded tissue. **Jpn. J. Med. Myc.**, 42, p. 23-27, 2001.

SCULLY, C.; ALMEIDA, P. Orofacial manifestations of the systemic mycoses. **J. Oral Pathol. Med.**, 21(7-10), p. 289-294, 1992.

SEVERO, L. C.; AGOSTINI, A. A.; LONDERO, A. T. Acometimento ósseo na paracoccidioidomicose crônica disseminada. Relato dos primeiros casos no Rio Grande do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 29(3), p. 241-244, 1996.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; DUARTE, M. I. S.; NUNES, D. F.; LACAZ, C. S.; SABAGGA, E.; ABDALA, E.; DUARTE, A. J. S.; LOPES, M. H. Paracoccidioidomycosis in a renal transplant recipient. **J. Med. Vet. Mycol.**, 33, p. 411-414, 1995.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; TELLES FILHO, F. Q.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; MORETTI, M. L. e Grupo de Consultores do Consenso em Paracoccidioidomicose. Consenso em paracoccidioidomicose. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 39(3), p. 297-310, 2006.

SINGH, B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. **Int. J. Parasitol.**, 27(10), p. 1135-1145, 1997.

SOARES, C. M. A.; MOLLINARI MADLUN, E. E. W. I.; SILVA, S. P., PEREIRA, M.; FELIPE, M. S. S. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. **J. Clin. Microbiol.**, 33(2), p. 505-507, 1995.

SOUZA, L. C.; MARANHÃO, R. C.; SCHREIER, S.; CAMPA, A. In-vitro and iv-vivo studies of the decrease of amphotericin B toxicity upon association with a triglyceride-rich emulsion. **J. Antimicrob. Chemother.**, 32(1), p. 123-132, 1993.

SOUZA, M. C.; GESZTESI, J. L.; SOUZA, A. R.; MORAES, J. Z.; LOPES, J. D.; CAMARGO, Z. P. Differences in reactivity of paracoccidioidomycosis sera with gp43 isoforms. **J. Med. Vet. Mycol.**, 35(1), p. 13-18, 1997.

SPEERS, D. J.. Clinical Applications of Molecular Biology for Infectious Diseases. **Clin. Biochem. Rev.**; 27(1), p. 39-51, 2006.

SPOSTO, M. R. Oral paracoccidioidomycosis. **Oral Surg. Oral Med. Oral Path.**, 75(4-6), p. 461-465, 1993.

STAMBUK, B. U.; PUCCIA, R.; ALMEIDA, M. L. C.; TRAVASSOS, L. R.; SCHENKMAN, S. Secretion of the 43 kDa glycoprotein antigen by *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**; 26(6), p. 367-373, 1988.

STRAUS, A. H.; FREYMÜLLER, E.; TRAVASSOS, L. R.; TAKAHASHI, H. K. Immunochemical and subcellular localization of the 43 kDa glycoprotein antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* with monoclonal antibodies. **J. Med. Vet. Mycol.**, 34(3), p. 181-186, 1996.

TABORDA, C. P.; CAMARGO, Z. P. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by passive haemagglutination assay of antibody using a purified and specific antigen gp43. **J. Med. Vet. Mycol.**, 31(2), p. 155-160, 1993.

TAKAYAMA A, ITANO EN, SANO A, ONO MA, KAMEI K. An atypical *Paracoccidioides brasiliensis* clinical isolate based on multiple gene analysis. **Med Mycol.**, 19, p.1-9, 2009. [no prelo]

TALHARI, S.; CUNHA, M. G. S.; SCHETTINI, A. P. M.; TALHARI, A. C. Deep mycoses in Amazon Region. **Intern. J. Dermat.**, 27(7), p. 481-483, 1988.

TATIBANA, B. T.; SANO, A.; UNO, J.; KAMEI, K.; IGARASHI, T., MIKAMI, Y., MIYAJI M.; NISHIMURA, K., ITANO, E. N. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* gp43 gene in sputa by loop-mediated isothermal amplification method. **J. Clin. Lab. Anal.**, 23(2), p.139-43, 2009.

VAIDYA, S. J.; SEYDEL, C.; PATEL, S. R.; ORTIN, M. Anaphylactic reaction to liposomal amphotericin B. **Ann. Pharmacother.**, 36(9), p. 1480-1481, 2002.

VALLE, A. C. F. Tratamento da Paracoccidioidomicose, Análise de 500 Casos Observados no Hospital Evandro Chagas. Fundação Oswaldo Cruz, no período de 1960 a 1986. Rio de Janeiro, 1988. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

VAN GELDEREN DE KOMAID, A.; DURÁN, E.; BORGES DE KESTELMAN, I. Histoplasmosis and Paracoccidioidomycosis in northwestern Argentina III. Epidemiological survey in Vipos, La Toma, and Choromoro - Trancas, Tucumán, Argentina. **Eur. J. Epidemiol.**, 15(4), p. 383-8, 1999.

VICENTINI, A. P.; GESZTESI, J. L.; FRANCO, M. F.; SOUZA, W.; MORAES, J. Z.; TRAVASSOS, L. R.; LOPES, J. D. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infect. Immun.**, 62(4), p. 1465-1469, 1994.

WALSH, T. J.; YELDANDI, V.; MCEVOY, M.; GONZALES, C.; CHANOCK, S.; FREIFELD, A.; SEIBEL, N. I.; WHITCOMB, P. O.; JARASINSKI, P.; BOSWELL, G.; BEKERSKY, I.; ALAK, A.; BUELL, D.; BARRET, J.; WILSON, W. Safety, tolerance, and pharmacokinetics of a small unilamellar liposomal formulation of amphotericin B (AmBisome) in neutropenic patients. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 42(9), p. 2391-2398, 1998.

WHITE, T. J.; MADEJ, R.; PERSINGT, D. H. The polymerase chain reaction: clinical applications. **Adv. Clin. Chem.**, v.29, p. 161-196, 1992.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A.; LIVAK, K.; RAFALSKY, J. A.; TINGERY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucl. Acids Res.**, 18, p. 6531-6535, 1990.

ZEMBRZUSKI, M. M.; BASSANESI, M. C.; WAGNER, L. C.; SEVERO, L. C. Inquérito intradérmico com histoplasmina e paracoccidioidina em duas regiões do Rio Grande do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 28(1), p. 1-3, 1996.

Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* gp43 Gene in Sputa by Loop-Mediated Isothermal Amplification Method

B. T. Tatibana,¹ A. Sano,² J. Uno,² K. Kamei,² T. Igarashi,² Y. Mikami,² M. Miyaji,² K. Nishimura,² and E. N. Itano^{3*}

¹Microbiology Post Graduation Program, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

²Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University, Chiba, Japan

³Department of Pathology Sciences, CCB, State University of Londrina - Londrina, PR, Brazil

The fungus *Paracoccidioides brasiliensis* is the pathogen of paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic mycosis prevalent in Latin America. The loop-mediated isothermal amplification method (LAMP) was used in this study to detect the presence of *P. brasiliensis* in sputa samples from patients with chronic PCM, suspected PCM, and a negative control. The target *P. brasiliensis* gp43 gene was amplified in less than 4 hr in 11 of 18 sputa samples tested. The LAMP

method had the advantage of speed and simplicity compared with the classic diagnostic methods such as the histopathological test or biological material culture and did not require sophisticated technical apparatus. It would be an important aid in cases where immediate treatment would mean patient survival, especially in immune-suppressed patients. *J. Clin. Lab. Anal.* 23:139–143, 2009. © 2009 Wiley-Liss, Inc.

Key words: gp43 gene; *Paracoccidioides brasiliensis*; paracoccidiomycosis; LAMP

INTRODUCTION

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by the *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*) fungus. To date, the natural habitat and saprophytic life conditions of *P. brasiliensis* have not been totally clarified (1). There are reports of isolation from penguin feces from Antarctica (2), soil samples (3), dog meal, soil-contaminated (4), fructivore bat gut (5), and armadillo gut (6).

The geographic distribution of the mycosis is restricted to Latin American countries (5,7). As it is not a disease with obligatory notification, its true prevalence cannot be calculated. In endemic countries, such as Brazil, it is estimated that the annual rate of incidence in the population is 1–3 per 100,000 inhabitants and mortality of 0.14 per 100,000 inhabitants (8). It is estimated that in these regions there are approximately 10 million persons infected by *P. brasiliensis* and most have no clinical symptoms (1).

The PCM infection mechanism occurs by conidia installation, which can be destroyed in the lung parenchyma or produce a focus of infection drained to the lymph node region, forming the primary infection complex. It can disseminate by the hematogenic and/or

lymphatic path, reaching other organs and causing the juvenile or acute form (9) or remain with a primary scar focus with viable fungi called a “quiescent lesion,” which evolves to chronic PCM (10).

Diagnosis is based on culture, histopathology, and antibody detection in clinical samples. The latter can be problematic depending on the antigen used, with the occurrence of cross-reaction, and false-positive or false-negative results (11). In cases of patients with immune problems, although it is not considered an opportunist fungus, immunological diagnosis can be hindered by reduced antibody production. In histological sections, *P. brasiliensis* might be missed or confused with other dimorphic fungi such as *Histoplasma* spp. or *Coccidioides immitis* (12).

In non-endemic areas, diagnosis is problematic for clinicians, pathologists, and microbiologists unfamiliar

*Correspondence to: E. N. Itano, Departamento de Ciências Patológicas, CCB, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, 86051-970 Londrina, PR, Brazil. E-mail: itanoeciko@hotmail.com

Received 16 March 2008; Accepted 8 January 2009

DOI 10.1002/jcla.20304

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

140 Tatibana et al.

with PCM and its etiological agent (13). To improve the sensitivity and specificity of PCM diagnosis, *P. brasiliensis* identification has been attempted by molecular techniques. Recently the LAMP technique was used by Endo et al. (14) to identify the species-specific gene gp43 of *P. brasiliensis* without cross-reaction with other fungus isolates. Using only one sample of histological cuts, it was suggested that the method could be used in other types of clinical samples.

The LAMP method was assessed in this study for PCM diagnosis in human sputa samples using the same primers that were used by Endo et al. (14). It is a fast and specific alternative method; the use of sputa is a non-invasive sample collection technique and does not expose the patients to risks. It can be used as a complementary technique especially in cases where a delay in diagnosis may put patients at risk.

MATERIALS AND METHODS

Clinical Sputa Specimens

The sputa samples obtained from 17 patients with chronic PCM (male, aged 28–72 years) with a diagnosis established by X-ray, clinical data, and isolation by culture and/or serological tests (Table 1, samples 2–16 and 18–19), one suspected PCM (Table 1, sample 17) and 01 negative PCM control (Table 1, sample 20) from the Pneumology and Infectious Disease Sector,

University Hospital, State University of Londrina, Londrina, Paraná, and Sanitary Pneumology Sector of Integral Infection-contagious Center, Municipal Health Service, Londrina, Paraná were collected in Brazil between November 2000 and June 2003. The backgrounds are shown in Table 1 (Samples 2–20). The sputa were defrosted and fixed with 70% ethanol overnight, dried in Brazil at room temperature, and analyzed in Japan. The dried sputa were washed with distilled water three times with centrifuging, and processed for DNA extraction.

A 44-year-old male who was 3rd generation of Japanese-descendant Brazilian was diagnosed with PCM by clinical manifestation, cytological observation of the sputum, and fungal culture in Japan (15). The preliminary study for detection of gp43 of *P. brasiliensis* from the sputum by the LAMP method was positive (Table 1, sample 1). The sputum was fixed with 70% ethanol for overnight, rinsed with distilled water three times, and processed for DNA extraction.

Extraction of DNA From Sputa

DNA was extracted with DEXPAT® (TaKaRa Biomedical, Inc., Ohtsu, Japan) according to the manufacturer's instructions. Five hundred microliters of the extract solution was added to the washed pellet of sputum, whose volume was approximately 50 µl. The mixture was incubated at 100°C for 10 min and

TABLE 1. Patient's backgrounds and results of diagnoses

Sample number	Age	Involvement	Chest X-ray	Immunological test		Cytology or biopsy	Fungal isolation	LAMP
				ELISA	ID			
1	44	P	+	ND	ND	+	+	+
2	65	M	+	1/800	1/16	+	+	–
3	46	M	+	1/400	1/4	+	–	–
4	45	MP	+	1/200	1	+	–	+
5	50	M	+	1/400	1/8	+	–	+
6	72	P	+	1/800	1/16	–	–	–
7	53	P	+	1/400	–	–	–	+
8	65	L	+	1/200	1/8	–	–	+
9	46	M	+	1/200	–	+	–	+
10	67	M	+	1/800	1/8	–	–	+
11	70	P	+	1/800	–	+	–	+
12	52	P	+	1/800	1/16	+	–	–
13	51	M	+	1/800	1/4	+	–	–
14	41	P	+	1/200	1/4	–	–	+
15	50	M	+	1/400	–	–	–	+
16	50	M	+	1/800	1	+	+	–
17	70	P	+	1/800	–	–	–	–
18	40	P	+	1/200	–	–	–	+
19	77	P	+	1/800	1	–	–	–
20	28	Control	–	–	–	ND	ND	–

All patients are male. P = pulmonary involvement, M = mucocutaneous involvement, and L = lymphatic involvements (ND = not done; – = negative result). 1 = Patient diagnosed in Japan, 2–19 = patient diagnosed in Brazil, and 20 = healthy control.

centrifuged at 12,000 rpm (13,201 g) for 10 min. The supernatant was then processed for the LAMP.

LAMP Method

The LAMP method used in this study was developed by Endo et al. (14) and detects the gp43 gene with a combination of F3 for LAMP, B3, FIP, and BIP primers designed from the partial sequence of gp43 (GenBank accession number U26160) by a registration system primer designing web site (FUJITSU Ltd., Tokyo, Japan: "LAMP PIMER EXPLORER" web site in "Netlaboratory" homepage <http://venus.netlaboratory.com/partner/lamp/index.html>). These primers recognize an area of gp43 where variation among strains has not been reported.

The primer sequences were as follows: F3 for LAMP, 5'-TCA CGT CGC ATC TCA CAT TG-3' used in the species-specific forward primer; B3, 5'-AAG CGC CTT GTC CAA ATA GTC GA-3' used in the species-specific reverse one; FIP, 5'-TGG CTC CAG CAA TAG CCA CCC GTC AAG CAG GAT CAG CAA T-3' designed from the forward sequence of 425th–445th and the complementary sequence of 464th–485th; and BIP: 5'-CAT GTC AGG ATC CCG ATC GGG CCT TGT ACA TAT GGC TCT CCC T-3' designed from the forward sequence from 648th to 668th and the complementary sequence from 691st to 712th. One microliter of 10 ng/ml DNA template, and 40 pmol each of the FIP and BIP primers, and 5 pmol each of the F3 for LAMP and B3 primers were mixed with 12.5 µl of 2 reaction mix in the kit (Loop AMP, Eiken Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan) in a final volume of 23.0 µl. DNA mixtures were incubated at 63°C for 120 min. The reaction was stopped by heating the mixture at 80°C for 2 min to inactivate the enzyme of LAMP amplification. The amplified products were electrophoresed in 1.0% agarose gels in TAE buffer (40 mM Tris base, 20 mM acetic acid, and 1 mM EDTA) and stained with ethidium bromide. DNA extracted from a *P. brasiliensis* isolate (IFM 41621, Pb-18) was used as a positive control for the amplification.

Double Immunodiffusion in Gel

Six glass slides (2.5 × 7.5 cm) were covered with a 3.0 mm-thick layer of agar (1% agar, 0.85% NaCl, and 0.02% sodium azide) with seven wells (one central and six peripheral). The *P. brasiliensis* exoantigen sample was applied to the central well, and serum sample in duplicate with no dilution, and 1:2–1:32 dilutions were applied to the peripheral wells. The samples were incubated in a humid chamber at room temperature for 24 hr. The gel was washed, dried, and stained with amido black.

RESULTS

LAMP-amplified products appeared as a ladder of bands on electrophoretic gels. The preliminary trial of the sputum from a Japanese patient is shown in Figure 1(a). It was possible to amplify the target gene in 11 out of 18 sputa samples from Brazilian PCM (Fig. 1: (b, c)).

LAMP-positive samples included cases that were negative by cytology/biopsy and fungal isolation (Table 1). Without correlation to LAMP, 12 out of 18 patients were positive in immunodiffusion (ID) test for PCM. LAMP-negative samples included 8 samples that are positive by ELISA (Table 1 samples 2, 3, 6, 12, 13, 16, and 19), 7 samples positive by ID (Table 1 samples 2, 3, 6, 12, 13, 16, and 19), by biopsy (Table 1 samples 2, 3, 12, 13, and 16) and by biological material culture (Table 1 samples 2 and 16).

DISCUSSION

There is difference in sensitivity and specificity for immunological test to confirm PCM diagnosis. Morphological and physiological characteristics used in classic diagnostic methods are complex. Developing simpler and complementary techniques has become important, especially due to the increase in the number of immune-suppressed patients. Therefore, a clear diagnosis of fungal infections is necessary.

The certainty diagnosis of PCM consists in showing the pathogen in histological preparations, visualization in fresh or in culture exams (16). However, there are cases where physical or clinical state prevents access to the lesion because invasive methods are usually used for collection. In these cases, serological techniques provide important auxiliary diagnosis. Although the serological techniques such as ID and ELISA are used to confirm PCM diagnosis, the rates of false-positive and false-negative results are still very high, and the specificity and sensitivity of the technique are directly related to the antigen or antibody used (17).

ID was the method used by clinical laboratories because it is an easy procedure, but the results can vary because of different parameters, including the antigen preparation, the form of the disease, and the starting of treatment (18). The follow-up of patients receiving treatment for PCM has shown that the antibody titers obtained by the ID test frequently do not correlate with the clinical status of the patient (19). In some patients, high antibody titers were observed until the end of the treatment when the patients were clinically cured. On the other hand, low antibody titers are related to the absence of clinical symptoms in most patients. However, in some cases low titers are present although clinical symptoms are present (20).

142 Tatibana et al.

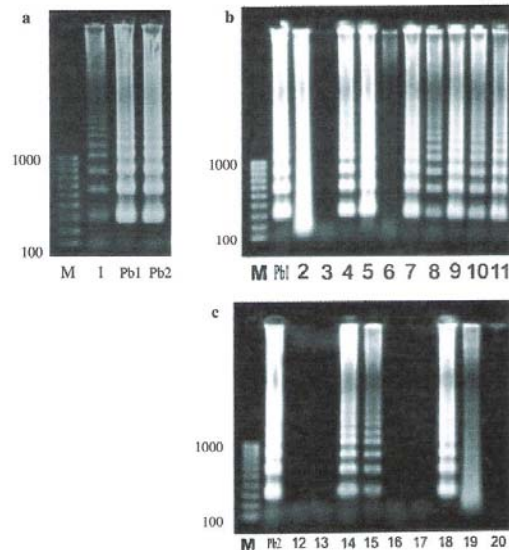


Fig. 1. The detection of gp43 gene of *P. brasiliensis* by the LAMP method. (a) 1 = First PCM case diagnosed in Japan by LAMP; (b, c) 2–19 = Brazilian PCM patients and 20 = Healthy control (Table 1). The specific DNA banding patterns for the gp43 gene of *P. brasiliensis*: Pb1 = IFM 41621, Pb2 = Pb 18, and M = marker.

The ELISA test has been used to detect antibodies in most systemic mycosis. In spite of this, compared with the immune diagnosis of PCM, the technique still offers high percentages of crossed reactivity, especially in patients with histoplasmosis, candidiasis, “Jorge Lobo” disease, and recently against sera from apparently healthy persons, resident in PCM endemic areas (11).

Against other molecular tests, LAMP has shown the advantage of greater sensitivity, because using clinical samples and the same target *P. brasiliensis* DNA, a minimum of 1 ng was detected by the PCR technique (21), whereas in LAMP, the minimum sensitivity reported was 100 fg (14). Moreover, LAMP does not require sophisticated technical apparatus, neither high biosafety.

In the first instance, the results presented here can be interpreted as false negatives or with low sensitivity because from 18 potentially positive samples, 11 were confirmed. However, when analyzed case-by-case, we can state that the LAMP method was successful in the proposed task.

The negative sample by LAMP number 17 (Table 1) was from a patient who presented a non-specific lung clinical condition, later diagnosed as candidiasis, which explained the ELISA reagent by a crossed reaction. This assertion was supported by the non-demonstration of

P. brasiliensis on the histopathological tests and negative attempt of isolation by culture.

Most samples (Table 1 samples 2, 3, 6, 13, and 16), before collecting the sputa samples, received medication treatment with sulfametoxazol and trimetoprima, which explained the non-presence of the fungus in sputa but in the tissues confirmed by the highly reactive ELISA (majority with 1/800, except for sample 3) and the positive isolation in two biopsy tissue samples (Table 1, samples 2 and 16).

In group of negative LAMP, the form classified as lung (Table 1, sample 6) was negative for culture and for visualization of the fungus by histopathology, which was in fact, a sample from a patient considered cured. Two cases were of tuberculosis, where there was no *P. brasiliensis* isolation (Table 1 samples 12 and 19), only visualizing on a histopathology slide (Table 1 sample 12). This would be expected because the lesions can remain surrounded by tissue for years in lesions with viable fungi, which does not mean active fungemia (17). There is a possibility that, at the moment when the sputa samples were collected from this group, except on sample number 3 where the etiological agent was different, there was a PCM infection. The positive radiological result in these cases are due to so-called “radiological lung scars” (12).

Paracoccidioides brasiliensis gp43 Gene in Sputa 143

On the other hand, the 11 positive samples were of PCM disease, in its chronic form, with lesions in the oropharynx, in the process of acute clinical condition. All these patients were from centers of reference for long-term PCM treatment, with an average of 10 years treatment, with previous diagnosis demonstration by biopsy or culture. Medication treatment was quickly established, which led to clinical improvement and normalization of serological tests (data not shown). Through assertive treatment, the results by culture were all negative. This supports the need for other techniques for *P. brasiliensis* detection, because although it is considered the diagnostic gold standard, the small trace of fungus found in the biopsy tissue can lead to non-isolation (9, 11, 17).

Thus, the LAMP method can complement PCM diagnosis. It has the advantage that cross-reactivity does not occur. It is fast, sensitive, and false-positive results do not occur because it uses a single diagnostic parameter. It is the detection of the single nucleotide sequence for *P. brasiliensis*, unlike some immunological tests that use indirect detection methodology of microorganisms, which depends on many unknown factors of parasite-host relationship for certain diagnosis.

REFERENCES

- Restrepo A, McEwen JG, Castaneda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: How far from solving the riddle? *Med Mycol* 2001;39:233-241.
- Guezelle E. Aislamiento de *Paracoccidioides* sp. de heces de pinguino de la Antártida, res. B2. In: Resúmenes IV Encuentro Internacional sobre Paracoccidioidomicosis. Caracas: Venezuela, 1989.
- Terçarioli GR, Bagagli E, Reis GM, et al. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: Growth ability, conidia production and molecular detection. *BMC Microbiol* 2007;7:92.
- Ferreira MS, Freitas LH, Lacaz CS, et al. Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from a dog food probably contaminated with soil in Uberlandia, Brazil. *J Med Vet Mycol* 1990;28:253-256.
- Grosse E, Tamsitt J. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia S.A. *Sabouraudia* 1965;4:124-125.
- Bagagli E, Sano A, Coslho KIR, et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* 1998;58:505-512.
- Calle D, Rosero DS, Orozco LC, Camargo D, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis in Colombia: An ecological study. *Epidemiol Infect* 2001;126:309-315.
- Coutinho ZF, Silva D, Lazera M, Petri V, Oliveira RM, Sabroza PCI. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saúde Pública* 2002;18:1441-1454.
- Londero AT, Del Negro G. Paracoccidioidomicose. *J Pneumol* 1986;12:41-60.
- Franco M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* 1986;25:5-18.
- Elias Costa MR, Da Silva Lacaz C, Kawasaki M, De Camargo ZP. Conventional versus molecular diagnostic tests. *Med Mycol* 2000;38:139-145.
- Wanke B, Londero AT. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: L Ajello, RJ Hay, editors. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Medical Mycology*, Vol. 4, Ninth edition. London, England: Arnold, 1998.
- Ajello L, Polonelli L. Imported paracoccidioidomycosis: A public health problem in non-endemic areas. *Eur J Epidemiol* 1985;1:160-165.
- Endo S, Komori T, Ricci G, et al. Detection of gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis* by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *FEMS Microb Lett* 2004;23:93-97.
- Igarashi T, Kurose T, Itabashi K, et al. A case of chronic pulmonary paracoccidioidomycosis. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi* 2004;42:629-633.
- Camargo ZP, Franco MF. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev Iberam Micol* 2000;17:41-48.
- Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: An update. *Clin Microbiol Rev* 1993;6:89-117.
- Siqueira AM. Avaliação da sensibilidade e especificidade de algumas provas sorológicas no diagnóstico, prognóstico e controle de cura da paracoccidioidomicose. Caracterização do antígeno E₂ de *Paracoccidioides brasiliensis*. [Tese de Doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1982.
- Neves AR, Mamoni RL, Rossi CL, Camargo ZP, Blotta MHS. Negative immunodiffusion test results obtained with sera of paracoccidioidomycosis patients may be related to low-affinity immunoglobulin G2 antibodies directed against carbohydrate epitopes. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10:802-807.
- Silva SHM, de Mattos Grosso D, Lopes JD, et al. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* gp70 circulating antigen and follow-up of patients undergoing antimycotic therapy. *J Clin Microbiol* 2004;42:4480-4486.
- Gomes GM. Padronização da técnica de PCR para diagnóstico de paracoccidioidomicose baseada em sequências do gene da gp43 de *Paracoccidioides brasiliensis*. [Dissertação de mestrado] São Paulo: Escola Paulista de Medicina, 1999.

Estudo *in vitro* e *in vivo* de nova formulação antifúngica Complexo Anfotericina B-7-Dehidrocolesterol: toxicidade e ação na paracoccidioidomicose e criptococose experimental

B. T. Tatibana¹, J. Uno², P. Leonello³, E. N. Itano⁴

¹ Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil.

² Medical Mycology Research Center (MMRC), Chiba University, Chiba, Japan.

³ Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil.

⁴ Departamento de Ciências Patológicas, CCB, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil.

RESUMO

Este trabalho apresenta dados da avaliação do complexo anfotericina B-7-dehidrocolesterol (AMB-7DC) frente à anfotericina B comercial (AMB-D, Fungizona). Utiliza como parâmetro dados *in vitro* de concentração inibitória mínima (CIM) e teste de hemólise em eritrócitos de carneiro. Para a avaliação *in vivo*, foi determinada a DL50 das drogas, CFU de pulmão na paracoccidiodomicose murina e teste de sobrevivência em modelo agudo de criptococose. Os resultados apontam para uma baixa toxicidade da droga AMB-7DC *in vitro* nas concentrações testadas; enquanto a AMB-D mostrou-se com atividade tóxica a partir da concentração de 0,0156 até 2 mg/mL em teste de hemólise. O CIM apontou sensibilidade para ambas as drogas frente ao *Cryptococcus neoformans*. Os resultados *in vivo* em relação ao CFU foram semelhantes na paracoccidiodomicose para ambas as drogas, não havendo erradicação do fungo. Já os dados da criptococose mostraram-se favoráveis ao grupo tratado com AMB-D, havendo dose dependência para ambas. O presente estudo indica que AMB-7DC possui potencial de utilização e, sendo assim, mais estudos são indicados para sua avaliação.

Palavras-chave: Paracoccidiodomicose. Anfotericina B. Complexo anfotericina B-7-dehidrocolesterol. *Cryptococcus neoformans*

ABSTRACT

This work presents data of evaluation the Complex amphotericin B-7-dehydrocholesterol (AMB-7DC) front to commercial amphotericin B (AMB-D, Fungizone). Parameter *in vitro* of minimum inhibitory concentration (MIC) and hemolysis test in sheep's erythrocytes were used here. For the *in vivo* evaluation was found the LD50 of the drugs, CFU of lung in murine paracoccidioidomycosis and test range of survival in acute model of cryptococcosis. The results indicated the lower *in vitro* toxicity of AMB-7DC in tested concentrations; while the AMB-D revealed toxic activity in the concentration of 0.0156 until 2 mg/mL in hemolysis test. The MIC demonstrated the sensibility of *Cryptococcus neoformans* for both drugs. In paracoccidioidomycosis the CFU's results showed similar *in vivo*, for both drugs; not having eradication of fungi. On the other hand, the cryptococcosis evaluations demonstrate more survival time for AMB-D group, having dose dependence for both drugs. The present study indicates that AMB-7DC has potentially useful, and therefore further evaluation of this compound is warranted.

Keywords: Paracoccidioidomycosis. Amphotericin B. Complex amphotericin B-7-dehydrocholesterol. *Cryptococcus neoformans*

1. INTRODUÇÃO

A anfotericina B (AMB) é antibiótico poliênico de administração intravenosa em uso há mais de 40 anos. Sendo droga de escolha no tratamento de micose sistêmica humana, apesar de baixa solubilidade e diversos efeitos colaterais, a droga permanece indicada principalmente em casos extremos de infecções fúngicas, em estado mórbido e em hospedeiros imunossuprimidos devido ao amplo espectro de ação aliado a baixos níveis de resistência encontrados (1,2).

Para melhorar a eficácia terapêutica e reduzir toxicidade de AMB, tem sido desenvolvido novos sistemas de veiculação da droga, baseado em formulações lipossomais. (AmBisome); complexos lipídicos (ABLIC); emulsões e dispersões coloidais, com aplicabilidades clínicas já definidas (3, 4, 5,6).

O complexo anfotericina B-7-dehidrocolesterol (AMB-7DC) é produzido a partir da ligação da anfotericina B comercial (AMB-D, Fungizona, Bristol-Myers K.K., Tóquio, Japão) com o radical 7-dehidrocolesterol utilizando como solvente HCO-60 (patente número 2915296; Nipro Co. Ltda, Japão). A ligação com o radical 7-dehidrocolesterol objetiva produzir um composto com menor reatividade com o colesterol da membrana celular de mamífero diminuindo os efeitos colaterais inerentes ao uso da AMB deoxicolato. Teste de hemólise *in vitro* utilizando célula de mamífero e AMB-7DC demonstraram a redução da toxicidade, sem diminuir a atividade antimicótica frente à *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. brucei*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. guilliermondii* e *Cryptococcus neoformans* (*C. neoformans*). Diferente de AMB, este complexo mostrou-se bastante hidrossolúvel e adequadamente resistente à luz e às variações térmicas (7).

Apresentam-se no presente estudo, os resultados das provas *in vitro* de toxicidade e concentração inibitória frente a *C. neoformans* e demonstram os dados preliminares da ação *in vivo* do complexo AMB-7DC na criptococose e na paracoccidiodomicose (PCM), ambas, infecções oportunistas quando associadas à imunodepressão, como na SIDA, podendo disseminar-se para o sistema nervoso central (meninges) e outros órgãos após uma fase pulmonar primária (8,9). Os agentes etiológicos da criptococose e PCM, respectivamente, são *C. neoformans* e *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*).

Estes dados sugerem ser a ação do complexo AMB-7DC comparável à tradicional AMB-D com a vantagem de apresentar menor efeito tóxico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

DROGAS TESTADAS

As drogas utilizadas nos testes *in vivo* e *in vitro* foram AMB-D (Fungizona, Bristol-Myers K.K., Tóquio, Japão) e AMB-7DC (Nipro Co. Ltda., Japão).

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *in vitro*

Utilizou-se protocolo segundo Larabi et al. (10), com algumas modificações. Eritrócitos de carneiro (ECs) foram suspensos em tampão salina fosfato (PBS, 5% vol/vol), lavados duas vezes no mesmo tampão e centrifugados (3.000 x g por 10 minutos). A reação de hemólise foi realizada em tubos contendo 0,1 ml de AMB-D (Grupo AMB-D) ou AMB-7DC (Grupo AMD-7DC) e controles somente com a suspensão de ECs (Grupo controle). As concentrações testadas foram de 2 mg/ml~0.0019 mg/ml, em diluição seriada 1:2, em suspensão de 0,9 ml de 2% ECs (aproximadamente 2×10^8 cells/ml). Os resultados foram avaliados por espectrofotometria à 550 nm (Multiskan® EX, Thermo Cientific), após uma hora de incubação a 37°C em banho-maria .

Avaliação da susceptibilidade pela concentração inibitória mínima (CIM)

Os testes de susceptibilidade foram realizados utilizando as duas drogas, AMB-D e AMB-7DC. A amostra de fungo testada foi de *C. neoformans* (cepas IFM 40215, IFM 40216, IFM 5809). O protocolo seguido foi o estabelecido pelo documento M27-A2 (11) utilizando meio sintético RPMI (Difco Co, Ltd) e solução tampão MOPS [ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico] (concentração final de 0,165 mol/L, pH 7,0). As diluições das drogas foram distribuídas em placas de 96 poços e os inóculos, nas concentrações ajustadas de 10^3 CFU/mL, foram aplicados em alíquotas de 100µL e procedida a incubação a 35°C por 72 horas.

Dose letal 50 (DL50)

Em camundongos ICR (Charles River Inc., Japão). administrou-se dose única pela veia lateral da cauda, AMB-D (concentrações de 4 mg/Kg, 5 mg/Kg e 6 mg/Kg, peso corpóreo) e AMB-7DC (25 mg/Kg, 30 mg/Kg, 35 mg/Kg e 50 mg/Kg, peso corpóreo) num total de 5 animais por grupo. Os sobreviventes à aplicação foram

monitorados diariamente por sete dias. Decorridos estes prazo foi determinada a DL50, segundo Reed e Müench (12).

Paracoccidiodomicose (PCM) experimental

Camundongos BALB/c foram inoculados com 100 µL de suspensão contendo 1.2×10^6 cells/ml de *P. brasiliensis* (isolado Pb18). Foram separados em cinco grupos de nove camundongos cada. Dois grupos foram controles (C-: não infectados e não tratados, C+: infectados e não tratados). Um grupo foi para teste de AMB-D (AMB-D1: infectado e tratado com 1mg/Kg de peso corporal/dia) e dois para AMB-7DC (AMB-7DC1: infectado e tratado com 1 mg/Kg peso corporal/dia e AMB-7DC8: infectado e tratado com 8 mg/Kg peso corporal/dia). Os tratamentos iniciaram 72 horas após a infecção, em dose única diária, em dias alternados, totalizando nove doses, aguardando-se, da última dose, 48 horas para o sacrifício. O pulmão foi removido pesado e processado para realização do CFU que foi conduzido em meio ágar BHI suplementado com soro de cavalo a 4% e filtrado de *P. brasiliensis* a 5% (13). A avaliação do CFU foi feita decorridos quatorze dias. Para análise estatística empregou-se o software SPSS (Statistical Package for Social Sciences) versão 15.0, utilizando o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de ajustamento para comparações múltiplas de Bonferroni.

Criptococose experimental

Foram utilizados camundongos machos de quatro semanas, da linhagem ICR (Charles River Inc., Japão), livres de patógenos, pesando 18-20g. Mantidos com água e comida *ad libitum*. Os camundongos foram imunossuprimidos com uma dose única de ciclofosfamida (200 mg/Kg peso corporal), produzindo neutropenia profunda. *C. neoformans* foi cultivado em ágar batata dextrose (Oxoid Ltd, Reino Unido) a 37°C por 10 dias. Conídios foram coletados em solução salina fosfato tamponada contendo 0,05% de Tween 80 (PBS-T), determinou-se a viabilidade por plaqueamento seriado. Os camundongos foram inoculados por via endovenosa pela veia lateral da cauda, com suspensão contendo 1×10^6 células/mL de *C. neoformans* em solução salina estéril. Cada grupo foi constituído de 10 animais, sendo um grupo controle administrado solução salina estéril e grupos tratamentos de 0,1 mg/Kg peso corpóreo/dose, 0,25 mg/Kg peso corpóreo/dose e 0,5 mg/Kg peso corpóreo/dose de ambas as drogas, AMB-D e AMB-7DC. O tratamento iniciou-se 18 horas após a infecção e permaneceu por sete dias consecutivos. A porcentagem de sobrevivência foi avaliada num período total de 30 dias.

3. RESULTADOS

Avaliação da toxicidade

Foi determinada pela hemólise dos ECs. Para sua análise, foi utilizado teste Kruskal-Wallis, software SPSS versão 15.0. Houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre o grupo AMB ($0,287 \pm 0,316$) e o grupo AMB-7DC ($0,067 \pm 0,043$), sendo AMB o grupo mais hemolítico (FIGURA 1).

Avaliação da CIM

A avaliação da CIM foi realizada para *C. neoformans* havendo sensibilidade frente a AMB-D, numa concentração de $0,25 \mu\text{g/mL}$ (IFM 40215), $0,5 \mu\text{g/mL}$ (IFM 40216) e $0,06$ (IFM 5809), e, para AMB-7DC de $0,03 \mu\text{g/mL}$ (IFM 40215 e IFM 5809) e $0,06 \mu\text{g/mL}$ (IFM 40216), conforme a NCCLS M27-A2, que a define como a menor concentração que impede qualquer grau de crescimento discernível. Não houve pontos finais da reação mal definidos (TABELA 1).

DL50

Os resultados são apresentados na TABELA 2. Para AMB-7DC a DL50 foi de $30,8 \text{ mg/kg}$. Para esta droga a dose de 50 mg/kg foi letal com 100% de óbitos. Para a AMB-D a LD50 foi de $4,9 \text{ mg/kg}$ e a dose letal dentre as avaliadas, foi de 6 mg/kg .

Avaliação do efeito das drogas AMB-D e AMB-7DC em PCM e criptococose experimental

PCM experimental

Para avaliação do efeito das drogas na PCM, o parâmetro adotado foi o CFU do pulmão (dado não mostrado). Assim, no décimo quarto dia foi realizada a contagem do CFU. No C- não houve crescimento. Nos grupos tratados, houve apenas duas placas de crescimento zero (uma em cada grupo: AMB-7DC1 e AMB-7DC8). Na análise estatística, não houve diferença significativa entre os grupos. Neste parâmetro, erradicação de *P. brasiliensis* no pulmão, o resultado dos grupos de tratamento foram estatisticamente iguais.

Criptococose experimental

Para avaliação da criptococose, foi acompanhada a sobrevivência num total de 30 dias após a infecção. No grupo controle, houve sobrevivência até o dia 12 pós-infecção. Após este dia, não houve sobrevivência (0/10). No grupo infectado tratado AMB-D de 0,1 mg/Kg peso corpóreo/dose houve sobrevivência até o dia 21 (0/10). No tratamento de 0,25 mg/Kg peso corpóreo/dose, as mortes ocorreram até o dia 26 (5/10). Em 0,5 mg/Kg peso corpóreo/dose, somente um não sobreviveu (9/10), observada sua morte 28 dias após a infecção. Já no grupo infectado e tratado com AMB-7DC, em 0,1 mg/Kg peso corpóreo/dose houve sobrevivência até o dia 16 (0/10). Para 0,25 mg/Kg peso corpóreo/dose as mortes ocorreram até o dia 26 (1/10) com apenas um sobrevivente. E, em 0,5 mg/Kg peso corpóreo/dose, houve seis sobreviventes (6/10) (FIGURA 2).

4. DISCUSSÃO

Os fungos por serem eucariotos, como o ser humano, apresentam similaridades fisiológicas e bioquímicas que impõe limitação à terapêutica medicamentosa. A AMB apresenta o maior espectro de ação entre os antifúngicos, sendo particularmente indicada nas infecções fúngicas invasivas. Possui atividade para *Histoplasma capsulatum*, *P. brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis*, *C. neoformans*, *Sporothrix schenckii*, *Candida spp*, *Aspergillus fumigatus*, além de protozoários como *Leishmania donovani* e *Leishmania brasiliensis* (2, 5, 6). As drogas antifúngicas, principalmente a AMB, tendem a apresentar um aspecto tóxico significativo, exigindo muitos cuidados na aplicação clínica (1, 4, 6, 14).

Na análise dos dados *in vitro* no presente estudo, AMB-7DC confirmou sua ação com CIM sensível para *C. neoformans* e a baixa toxicidade para célula de mamífero em teste com ECs. A AMB, por sua vez também foi ativa para *C. neoformans*, mas manteve sua característica tóxica (10). Estes dados tornam-se mais interessantes quando aliados ao fato da AMB-7DC ser hidrossolúvel e termicamente mais estável do que a AMB, permitindo aquecimento, requerendo um menor cuidado no transporte e armazenamento. Pela menor toxicidade AMB-7DC, poderá permitir a utilização de doses maiores em estudos *in vivo*, e com isso um tempo maior de circulação da droga, um maior acúmulo nos tecidos afetados e um tempo maior de tratamento, o que requer estudos adicionais. A análise da DL50, confirmou-se a maior segurança de AMB-7DC que apresentou uma concentração seis vezes mais segura em relação a AMB-D, nas concentrações testadas. Este resultado foi compatível com o encontrado *in vitro* na avaliação da toxicidade em ECs.

Quanto ao parâmetro da erradicação fúngica no pulmão, avaliado pelo CFU na PCM, talvez este não seja o melhor critério a ser adotado para esta micose sistêmica que muitas vezes progride para o fenômeno da auto-cura ou torna-se crônica, sendo interessante o emprego de outras técnicas para avaliação, como as sorológicas de antigenemia ou outra que permitisse uma quantificação de forma mais rápida e ao longo de um tempo de tratamento maior (14, 15, 16, 17). Mesmo na PCM humana, AMB ainda mantém-se como tratamento de ataque nos casos graves não sendo utilizada objetivando a erradicação de *P. brasiliensis* neste primeiro momento mas, apoiar uma melhora na imunidade celular para depois realizar o tratamento de manutenção de forma prolongada com outra medicação para procurar a erradicação do fungo (18, 19).

Na avaliação do critério de porcentagem de sobrevivência frente a uma micose aguda, a AMB-D obteve melhor resultado, em média com 46,6% de sobrevivência contra 23% obtido pelo AMB-7DC na criptococose. Talvez isto esteja correlacionado a baixa concentração utilizada que não permitiu um nível terapêutica ideal, necessitando, como em outras formulações lipídicas, uma dose maior (5, 6). Podemos observar a dose dependência porque, na AMB-7DC, p. ex, a taxa de sobrevivência torna-se 50% maior dobrando a concentração do tratamento. Sendo assim, fica indicado testar-se outras posologias de tratamento. Diante destes resultados, ainda é prematuro afirmar que AMB-7DC é efetiva e segura para uso clínico.

Sabe-se que o índice terapêutico foi significativamente melhorado com as formulações lipídicas de AMB, porém, também houve diminuição da atividade relatada em estudo de avaliação de benefício, limite e indicação destas novas formulações de AMB (5, 6, 20). Além disso, há relato de anafilaxia após administração de AmBisome em pacientes não anteriormente alérgicos à AMB-D (21). Sendo assim, uma nova formulação, como a AMB-7DC, apresenta-se como uma alternativa interessante de estudo na busca de dados de dosagem segura e efetiva para tratamento de diferentes patologias e comparativamente às drogas de referência, avaliando duração ideal da terapia e se é apropriada para pacientes imunocomprometidos, a principal indicação da AMB-D.

REFERÊNCIAS

1. Lacaz CS; Sampaio SAP. Tratamento da Blastomicose Sul- Americana com Anfotericina B. Resultados Preliminares. *Rev Paul Med.* 1958, 52:443–450.
2. .Gallis HA, Drew RH, Pickard WW. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Rev. Infect. Dis.* 1990, 12:308-329.

3. Lopez-Berestein G., Mehta R, Hopfer R, Mills K, Kasi L.; Mehta K, Fainstein V, Luna M, Hersh EM, Juliano R. Treatment and prophylaxis of disseminated infection due to *Candida albicans* in mice with liposome-encapsulated amphotericin B. *J. Infect. Dis.* 1983, 147(5): 939-945.
4. Janoff AS, Boni LT, Popescu MC, Minchey SR, Cullis PR, Madden TD, Taraschi T, Gruner SM, Shyamsunder E., Tate MW, Mendelsohn R, Bonner D. Unusual lipid structures selectively reduce the toxicity of Amphotericin B. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1988, 85(16):6122-6126.
5. Gallis HA. Amphotericin B: a commentary on its role as an antifungal agent and as a comparative agent in clinical trials. *Clin Infect Dis.* 1996, 22:(Suppl. 2):S145-S147.
6. Dupont B. Overview of lipid formulations of Amphotericin B. *J Antim Chem.* 2002, 49 (suppl S1): 31-36, 2002.
7. Uno J, Yarita K, Kamei K, Mikami Y, Terada Y. Study of antimycotic action and a side effect of an Amphotericin B-7-dehydrocholesterol complex : 12th Mycoses Forum “ Early Presumptive Therapy ”, Abstract p45, Jan, 2001, Tokyo, Japan.
8. Chuck SL, Sande MA. Infections with *Cryptococcus neoformans* in the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *N Engl J Med.* 1989, 21:794-799.
9. Goldani LZ, Sugar AM. Paracoccidioidomycosis and AIDS: An overview. *Clin Infec Dis.* 1995, 21: 1275-1281.
10. Larabi M, Yardley V, Loiseau PM, Appel M, Legrand P, Gulik A, Bories C, Croft SL, Barratt G. Toxicity and Anti leishmanial Activity of a New Stable Lipid Suspension of Amphotericin B. *Antim Agents Chem.* 2003, 47: 3774–3779.
11. National Committee For Clinical Laboratory Standards (NCCLS) - Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard. 2. ed. Wayne, 2002. (Document M 27 A2. vol. 22, No. 15).
12. Reed LJ; Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg.* 1938, 27: 493-497.
13. Singer-Vermes LM, Ciavaglia MC, Kashino SS, Burguer E, Calich VLG. The source of the growth-promoting factor(s) affects the plating efficiency of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol.* 1992; 30:261-264.
14. Chapman SW, Sullivan DC, Cleary JD. In Search of the Holy Grail of Antifungal Therapy. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2008, 119: 197–216.

15. Gomez BL, Figueroa JI, Hamilton AJ, Ortiz B, Robledo MA, Hay RJ, Restrepo A. Use of monoclonal antibody in diagnosis of paracoccidioidomycosis: new strategies for detection of circulating antigens. *J Clin Microbiol.* 1997, 35:3278–3283.
16. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev.* 1993, 6:89-117.
17. Freitas-da-Silva G, Roque-Barreira MC. Antigenemia in paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 1992, 30(2): 381-385.
18. Mackinnon JE. Amphotericin B en la blastomicosis sudamericana experimental. *An. Fac. Med. Montevideo.* 1958, 43:201-206.
19. Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho FQ, MendesRP, Colombo AL, Moretti ML. e Grupo de Consultores do Consenso em Paracoccidioidomicose. Consenso em paracoccidioidomicose. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2006, 39(3):297-310.
20. Dillon NL, Sampaio SAP, Habermann, Marques SA, Lastória JC, Stolf HO, Silva NCA, Curi PR. Delayed results of treatment of paracoccidioidomycosis with amphotericin B plus sulfamides versus amphotericin B alone. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 1986, 28(4): 263-266.
21. Laing RBS, MilneLJR, Leen CLS, Malcom GP, Steers AJW. Anaphylactic reactions to liposomal amphotericin. *Lancet.* 344:682,1994.

TABELA 1 – Determinação da Concentração inibitória mínima para *C. neoformans* frente as drogas AMB-7DC e AMB, conforme NCLLS M27-A2

Organismo		CIM ($\mu\text{g/ml}$)	
		AMB-7DC	AMB
<i>Cryptococcus neoformans</i>	IFM 40215 ^a	$\square \dots \leq 0.03$	0.25
	IFM 40216 ^a	0.06	0.5
	IFM 5809 ^b	$\square \square \leq 0.03$	0.06

^a=cepa de referência, ^b=isolado.

TABELA 2 – DL50 em camundongos tratados com AMB-7DC e AMB em dose única de várias concentrações com seguimento de sete dias

Droga	Dose (mg/kg, e.v.)	No. de sobreviventes/total							Taxa de Sobrevivência (%)	DL50 (mg/kg, e.v.)
		Dias								
		1	2	3	4	5	6	7		
AMB-7DC	25	5/5	5/5	4/5	4/5	4/5	4/5	4/5	80	30,8
	30	5/5	5/5	4/5	3/5	3/5	3/5	2/5	40	
	35	5/5	5/5	2/5	2/5	2/5	2/5	2/5	40	
	50	5/5	3/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0	
AMB-D	4	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	100	4,9
	5	3/5	3/5	2/5	2/5	2/5	2/5	2/5	40	
	6	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0	

AMB-7DC: Complexo anfotericina B-7-dehidrocolesterol, AMB-D: Fungizona. e.v.: endovenosa.

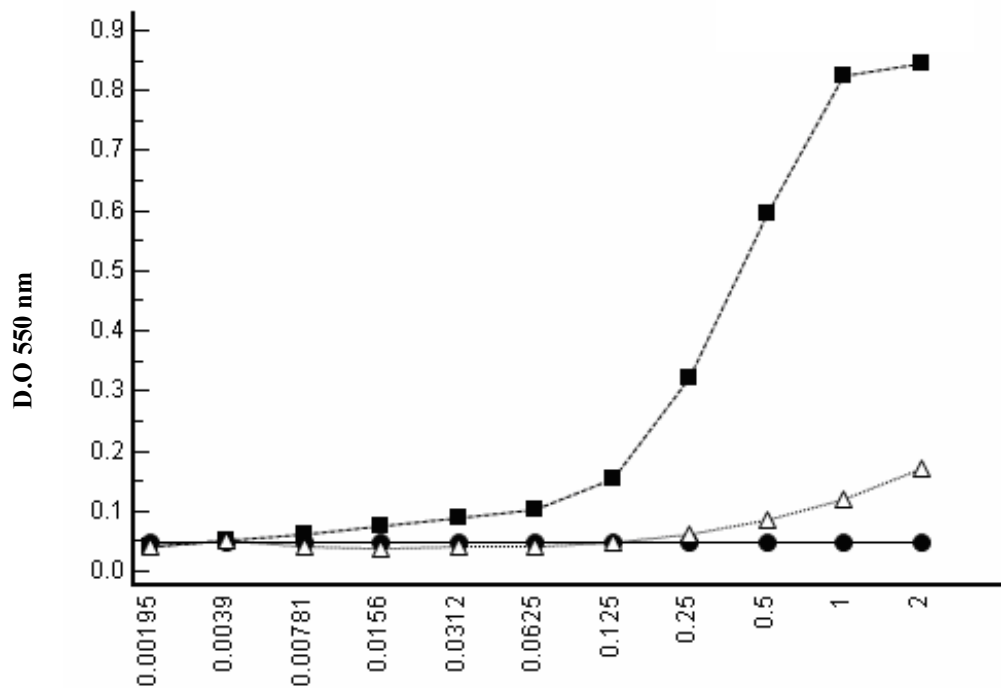
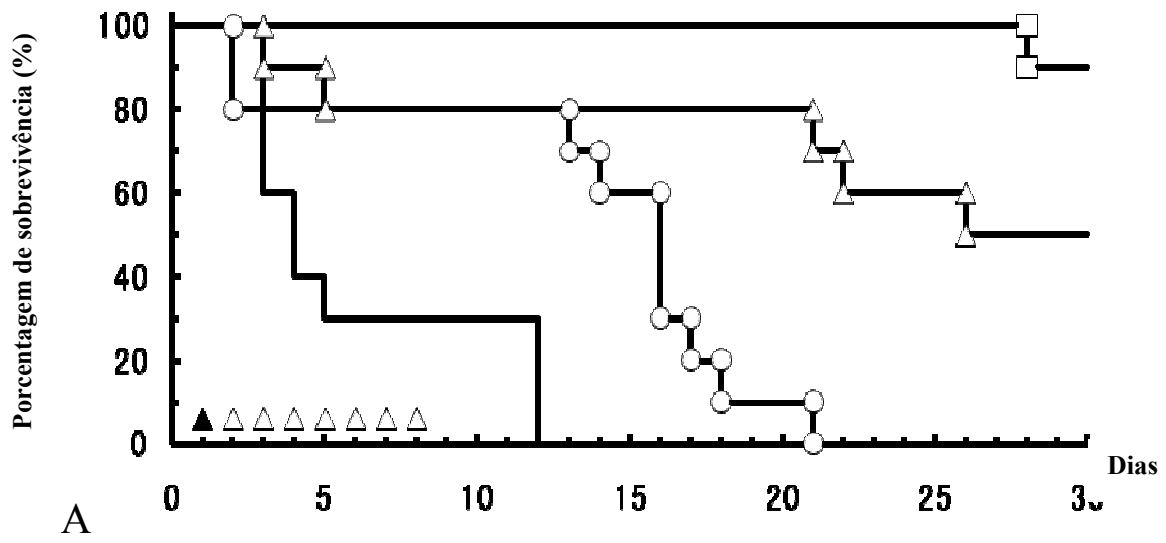


FIGURA 1 – Determinação da toxicidade *in vitro* pela hemólise de eritrócitos de carneiro: grupo AMB (■), grupo AMB-7DC (Δ), Controle (●)



B

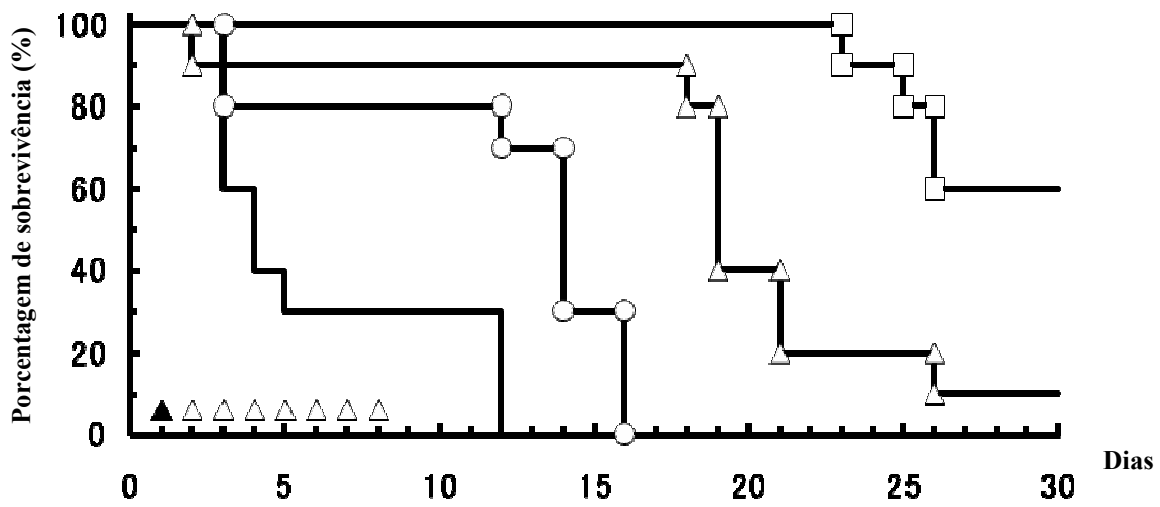


FIGURA 2 – Efeito terapêutico de AMB-D (A) e AMB-7DC (B) em criptococose experimental murina

avaliando porcentagem de sobrevivência. —: controle, —○—: 0.1mg/kg, —△—: 0.25mg/kg, —□—:

0.5mg/kg, ▲: infecção, △: tratamento.