



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ANDREA CRISTINE KOISHI

**SEMI-NESTED PCR PARA A DETECÇÃO MOLECULAR DO  
FUNGO *Paracoccidioides brasiliensis***

---

Londrina  
2009

**ANDREA CRISTINE KOISHI**

**SEMI-NESTED PCR PARA A DETECÇÃO MOLECULAR DO  
FUNGO *Paracoccidioides brasiliensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação, em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Emerson José Venancio

Londrina  
2009

**ANDREA CRISTINE KOISHI**

**SEMI-NESTED PCR PARA A DETECÇÃO MOLECULAR DO  
FUNGO *Paracoccidioides brasiliensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação, em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Emerson José Venancio  
Universidade Estadual de Londrina

---

Profa. Dra. Silvana Petrofeza da Silva  
Universidade Federal de Goiás

---

Profa. Dra. Halha Ostrensky Saridakis  
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 15 de fevereiro de 2009.

## **DEDICATÓRIA**

*à minha Família, em especial, a meus pais  
Leni e Shuichiro Koishi que sempre me apoiaram e incentivaram  
a buscar por meus objetivos, e a minha irmã Bruna Koishi  
pela força e companheirismo durante todos esse anos.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao orientador Prof. Dr. Emerson José Venâncio, pela confiança, paciência e pela oportunidade que tanto contribuíram para meu aprendizado.

À Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano e à Profa. Dra. Maria Angélica Ehara Watanabe pela participação no exame de qualificação e pelas valiosas sugestões.

À todos os professores do Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental pelos conhecimentos compartilhados e aos funcionários do Departamento de Ciências Patológicas.

Aos meus amigos de turma do mestrado, do Laboratório de Imunologia IV e aos agregados, pela amizade, convivência, ajuda, companheirismo, e por todo o apoio a mim conferido. Em especial: Alexandre Sasaki, Amanda Pitz, Ana Paula Cheirubim, Débora Vituri, Denise Kitamura, Eliandro Tavares, Érica Kavati, Fábio Goulart, Jacqueline Bueno, Juliana Tomazi, Luana Soares, Lucimila Luchesi, Narciso Junior Vieira, Priscila Cassolla, Silas Eto, Tatiane Petroni, Thiago Massuda.

À minha família pela confiança e apoio.

A todos em enfim, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, o meu agradecimento sincero.

KOISHI, Andrea Cristine. **Semi-nested PCR para a detecção molecular do fungo *Paracoccidioides brasiliensis***. 2009. 99f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

## RESUMO

*Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo termo-dimórfico e agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica endêmica na América Latina. A PCM é rotineiramente diagnosticada pela observação direta das células do fungo, por cultura celular ou ainda por métodos sorológicos. Entretanto, essas técnicas apresentam limitações que podem levar a atrasos para o início do tratamento ou mesmo a resultados falso negativos. Neste estudo foi desenvolvida uma reação de semi-nested PCR para a detecção do DNA de *P. brasiliensis*, utilizando a seqüência do DNA ribossomal como alvo. Inicialmente, amostras de DNA de *P. brasiliensis* (cepas Pb18 e LDR1) e de outros fungos patogênicos foram extraídas e usadas para se determinar o limite de detecção da reação e a ocorrência de reações cruzadas. Para avaliar a reação de semi-nested, ela foi comparada com os métodos de cultivo e histopatologia quanto à capacidade de detecção de *P. brasiliensis* Pb18 em amostras de tecidos de camundongos experimentalmente infectados. E ainda, a reação desenvolvida neste trabalho foi utilizada para a detecção do fungo em amostras de biópsia bucal de pacientes com suspeita de PCM e solo de tocas de tatu e formigueiros. Na tentativa de otimizar a reação foi desenvolvida uma semi-nested PCR em uma única etapa. A semi-nested PCR mostrou-se específica para *P. brasiliensis* e o limite de detecção foi de 2,5 pg de DNA ou 10 células do fungo. No estudo comparativo a semi-nested PCR e a histopatologia foram positivas para todas as amostras de animais infectados, inclusive quando parafinadas, enquanto que a cultura foi positiva apenas para 60% das amostras. A semi-nested PCR também foi positiva para as 4 amostras de pacientes com PCM e para duas amostras de solo, uma de toca de tatu e outra de formigueiro. A semi-nested PCR em um tubo foi específica para *P. brasiliensis*, porém, com um limite de detecção de 0,25 ng de DNA. Este estudo mostrou a alta sensibilidade e especificidade dessa nova reação de semi-nested PCR para a detecção molecular de *P. brasiliensis* em amostras de biópsias, em tecidos embebidos em parafina e mesmo do solo.

**Palavras-chave:** *Paracoccidioides brasiliensis*. Semi-nested PCR. Detecção molecular. Paracoccidioidomicose.

KOISHI, Andrea Cristine. ***Paracoccidioides brasiliensis* molecular detection by a semi-nested PCR assay**. 2009. 99p. Dissertation (Master's degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

## ABSTRACT

*Paracoccidioides brasiliensis* is a thermally dimorphic fungus and the etiologic agent of paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic mycosis endemic in Latin America. PCM is routinely diagnosed by direct observation of fungi cells, by culture or serological tests. However, these techniques present limitations that could result in delay for the beginning of treatment or even false negatives results. In this study a semi-nested PCR assay for the detection of *P. brasiliensis* was evaluated, using sequences of the rDNA as a target. Initially, DNA samples of two *P. brasiliensis* isolates (LDR1 and Pb18) and other pathogenic fungi were extracted and used to determine the limit of detection and cross-reactivity. To evaluate the semi-nested PCR assay, it was compared to culture and histopathology methods in detecting *P. brasiliensis* Pb18 in tissue samples of experimentally infected mice. Furthermore, the assay developed in this study was used for the fungus detection in oral biopsy specimens of patients with a PCM suspect and in soil of armadillo's burrow and ant-hill. To improve the reaction a one tube semi-nested PCR was also padronized. The semi-nested PCR assay was specific for *P. brasiliensis* and the detection limit was 2,5 pg of DNA or 10 fungi cells. In the comparative study, the semi-nested assay and histopathology were positive for all infected samples, including the paraffin-embedded ones, while only 60% were positive by cellular culture. The semi-nested PCR assay was also positive for 4 PCM patients' samples and in two environmental samples, one from an armadillo burrow and the other one from an ant-hill. One tube semi-nested PCR was specific for *P. brasiliensis*, however, with a detection limit of 0,25 ng of DNA. This study showed the high sensitivity and specificity of this new semi-nested PCR assay for the detection of *P. brasiliensis* in fresh and paraffin-embedded tissues, and soil.

**Keywords:** *Paracoccidioides brasiliensis*. Semi-nested PCR. Molecular detection. Paracoccidioidomycosis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – *P. brasiliensis* na forma leveduriforme corado pela técnica Gomori-Grocott (A) e a fresco (B). ..... 14
- Figura 2** – Distribuição geográfica da paracoccidioidomicose..... 16
- Figura 3** – Diagnóstico laboratorial da paracoccidioidomicose. Cultivo de *P. brasiliensis*: fase micelial (A); fase leveduriforme (B). Exame a fresco em KOH (C). Corado pelo lactofenol mostrando células leveduriformes com múltiplos brotamentos (D). Corte histológico corado pelo método de Grocott (E). Corte histológico corado pelo PAS (F)..... 19
- Figura 4** – Estrutura da região gênica do DNAr (A). Seqüência completa do 5.8S, incluindo as regiões intergênicas e seqüências parciais das regiões 18S e 28S de *P. brasiliensis* GI: 110796947 (B). Setas indicam os sítios de anelamento dos oligonucleotídeos ITS1, ITS4 e MJ03 ..... 34
- Figura 5** – Especificidade da semi-*nested* PCR em eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. Primeira reação com os oligonucleotídeos ITS1 e ITS4 (A). Segunda reação com os oligonucleotídeos ITS1 e MJ03 (B). M. Marcador molecular 100-pb; C. Controle negativo; L. *P. brasiliensis* (LDR1); 18. *P. brasiliensis* (Pb 18); Hc. *H. capsulatum*; Ss. *S. schenckii*; Ca. *C. albicans*; Tr. *T. rubrum* e Cr. *Cryptococcus* sp. .... 39
- Figura 6** – Sensibilidade da semi-*nested* PCR para detecção do DNA de *P. brasiliensis* em eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. Primeira reação com os oligonucleotídeos ITS1 e ITS4 (A). Segunda reação com os oligonucleotídeos ITS1 e MJ03 (B). M. Marcador molecular 100-pb; C. Controle negativo..... 40

- Figura 7** – Sensibilidade da semi-*nested* PCR testada com DNA extraído de tecido pulmonar de camundongo (A) e solo (B) com adição de diferentes quantidades de células leveduriformes de *P. brasiliensis*. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. M. Marcador molecular 100-pb; C. Controle negativo; C+. Controle positivo; amostras com 0 a 10<sup>5</sup> células de *P. brasiliensis* .....41
- Figura 8** – Semi-*nested* PCR com amostras de DNA extraído de tecido pulmonar de camundongo emblocado em parafina. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. M. Marcador molecular 100-pb; C. Controle negativo; L. *P. brasiliensis* (LDR1); 1 e 2 camundongos controle; 3 a 7 camundongos infectados.....42
- Figura 9** – Semi-*nested* PCR com DNA extraído de amostras de solo. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. M. Marcador molecular 100-pb; C. Controle negativo; L. *P. brasiliensis* (LDR1); 1. solo de formigueiro; 2 a 7. solo do interior da toca de tatu; 8. solo de cafezal.....44
- Figura 10** –Otimização da semi-*nested* PCR em uma única etapa, utilizando 1 µM dos oligonucleotídeos ITS1 e MJ03 e diferentes concentrações do ITS4. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. M. Marcador molecular 100-pb; C. Controle negativo; L. *P. brasiliensis* (LDR1); 1. ITS4 0,2 µM; 2. ITS4 0,1 µM e 3. ITS4 0,05 µM. ....44
- Figura 11** –Especificidade (A) e sensibilidade (B) da semi-*nested* PCR em uma única etapa. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. M. Marcador molecular 100-pb; C. Controle negativo; L. *P. brasiliensis* (LDR1); 18. *P. brasiliensis* (Pb 18); Hc. *H. capsulatum*; Ss. *S. schenckii*; Ca. *C. albicans*; Tr. *T. rubrum* e Cr, *Cryptococcus* sp.....45

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Relação dos oligonucleotídeos (oligos) utilizados para detecção molecular de <i>P. brasiliensis</i> .....	22
<b>Tabela 2</b> – Detecção de <i>P. brasiliensis</i> em pulmão de camundongos experimentalmente infectados.....	42
<b>Tabela 3</b> – Dados dos pacientes com hipótese diagnóstica de paracoccidioidomicose. ....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**×g** – Gravidade

**DNA** – Ácido desoxiribonucléico

**DNAr** – DNA ribossômico

**dNTPs** – Deoxinucleosídeos trifosfatados

**EDTA** – Ácido etilenodiaminotetracético

**ELISA** – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

**fg** – Fentograma

**L** – Litro

**LDR1** – *Paracoccidioides brasiliensis* cepa LDR1

**ITS** – *internal transcribed spacer*

**M** – Molaridade

**Mg** – Miligrama

**Min** – Minuto

**mM** – Milimolar

**°C** – Graus Celsius

**pb** – Pares de bases

**Pb** – *Paracoccidioides brasiliensis*

**Pb18** – *Paracoccidioides brasiliensis* cepa Pb18

**PBS** – Tampão fosfato salina

**PCM** – Paracoccidioidomicose

**PCR** – Reação em cadeia da polimerase

**pg** – Picograma

**pH** – Potencial hidrogeniônico

**rpm** – Rotações por minuto

**TE** – Tris-EDTA

**UFC** – Unidade formadora de colônia

**v/v** – Volume/volume

**µg** – Micrograma

**µl** – Microlitro

**µM** – Micromolar

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1 <i>PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS</i> .....	13
1.2 PARACOCCIDIOIDOMICOSE (PCM) .....	15
1.3 DIAGNÓSTICO .....	18
1.4 DETECÇÃO MOLECULAR DE <i>P. BRASILIENSIS</i> .....	21
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	28
2.1 OBJETIVO GERAL .....	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	29
3.1 ANIMAIS .....	29
3.2 AMOSTRAS CLÍNICAS .....	29
3.3 AMOSTRAS DE SOLO .....	29
3.4 MICRORGANISMOS .....	30
3.5 CONTAGEM DE CÉLULAS DE <i>P. BRASILIENSIS</i> .....	30
3.6 EXTRAÇÃO DE DNA .....	30
3.6.1 Fungos em Cultura e Tecidos .....	30
3.6.2 Tecido Parafinado .....	31
3.6.3 Solo .....	31
3.6.4 Análise do produto da extração de DNA .....	32
3.7 QUANTIFICAÇÃO DE DNA .....	32
3.8 OLIGONUCLEOTÍDEOS .....	33
3.9 SEMI-NESTED PCR .....	34
3.9.1 Testes de Especificidade e Sensibilidade .....	35
3.9.2 Tratamento para Eliminar Inibidores de PCR .....	36
3.10 INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE CAMUNDONGOS COM <i>P. BRASILIENSIS</i> .....	36
3.10.1 Análise Histológica .....	36
3.10.2 Semi-Nested PCR .....	37
3.10.3 Cultura .....	37
3.11 SEMI-NESTED PCR EM UMA ÚNICA ETAPA .....	37

<b>4 RESULTADOS</b> .....	39
4.1 ESPECIFICIDADE DA REAÇÃO DE SEMI-NESTED PCR PARA <i>P. BRASILIENSIS</i> .....	49
4.2 SENSIBILIDADE DA REAÇÃO DE SEMI-NESTED PCR PARA <i>P. BRASILIENSIS</i> .....	40
4.3 INFECÇÃO EXPERIMENTAL .....	41
4.4 DETECÇÃO DE <i>P. BRASILIENSIS</i> EM AMOSTRAS CLÍNICAS .....	43
4.5 DETECÇÃO DE <i>P. BRASILIENSIS</i> EM SOLO .....	43
4.6 SEMI-NESTED PCR EM UMA ÚNICA ETAPA.....	44
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	46
<b>CONCLUSÕES</b> .....	52
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	53
<b>ANEXOS</b> .....	62
Outros trabalhos realizados durante o período do mestrado.	
ANEXO I – Detecção Molecular do Fungo <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .....	63
ANEXO II – Oral paracoccidioidomycosis: Differential diagnosis and epidemiological data.....	87

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS*

O fungo *P. brasiliensis* é o agente etiológico da micose sistêmica denominada Paracoccidioidomicose (PCM). Por um longo período foi considerado um fungo imperfeito (família *Moniliaceae*, ordem *Moniliales*) (MARTINEZ, 2004), entretanto com o avanço de técnicas moleculares, *P. brasiliensis* foi classificado como pertencente ao filo *Ascomycota*, ordem *Onygenales*, família *Onygenaceae* (SAN-BLAS *et al.*, 2002). E mais recentemente, uma família distinta de *Onygenaceae* foi proposta, *Ajellomycetaceae* que incluiria os gêneros *Blastomyces*, *Emmonsia*, *Histoplasma* e *Paracoccidioides* (UNTEREINER *et al.*, 2004).

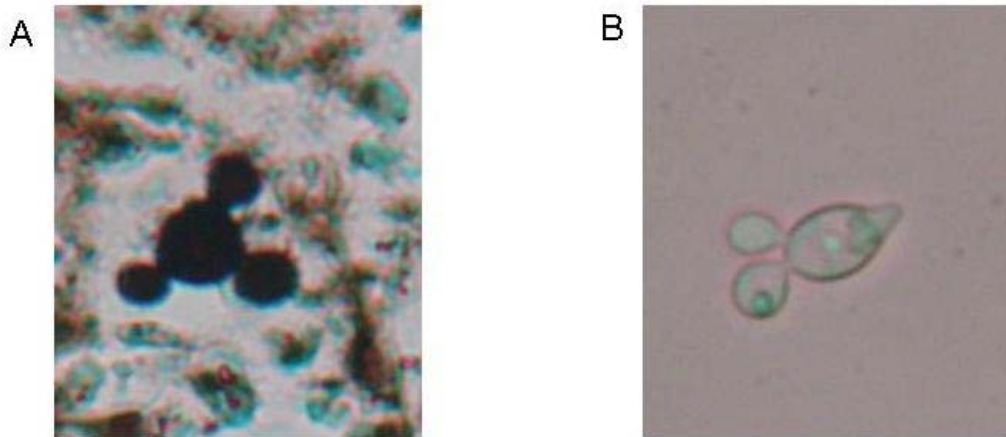
Além disso, *P. brasiliensis* é tradicionalmente considerado uma espécie única, mas baseando-se em métodos moleculares e utilizando dados de oito regiões em cinco loci, Matute *et al.* (2006) propuseram a existência de pelo menos três espécies filogenéticas distintas para este fungo denominadas: S1 (38 isolados), PS2 (6 isolados) e PS3 (com 21 isolados).

O fungo *P. brasiliensis* apresenta dimorfismo dependente de temperatura. O fungo está na forma micelial à temperatura de 25°C e na forma de levedura a 37°C (temperatura encontrada no hospedeiro humano). Esse processo de transformação é reversível e dependente da regulação enzimática da síntese de glucanas que causam modificações na parede celular do fungo (ARRAES *et al.*, 2005).

*P. brasiliensis* possui um ou mais núcleos, e em seu citoplasma foram visualizados vacúolos, retículo endoplasmático e ribossomos. As mitocôndrias são numerosas em células jovens, principalmente na periferia da célula, e os vacúolos aumentam de tamanho com o envelhecimento celular. A parede celular é dupla e refringente; sendo a camada externa elétron-densa, formada por  $\beta$ -1-3 glucana na forma micelial e por  $\alpha$ -1-3 glucana na fase de levedura. A camada interna é elétron-brilhante, formada por quitina e justaposta à membrana citoplasmática (ALMEIDA; JACKS; SCULLY, 2003). A  $\beta$ -1-3 glucana é um polissacarídeo que contém apenas glicose em sua composição e é considerado determinante para o

dimorfismo e também como fator de virulência (SAN-BLAS; NIÑO-VEGA, 2008).

Uma característica importante deste parasita é a formação de novos fungos por brotamentos da parede das células-mãe (Figura 1), resultando numa forma típica de *P. brasiliensis* conhecida como roda-de-leme



**Figura 1** – *P. brasiliensis* na forma leveduriforme corado pela técnica Gomori-Grocott (A) e a fresco (B).

Provavelmente, na natureza o fungo *P. brasiliensis* ocorre na forma micelial, mas diferentemente de outros fungos dimórficos como *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* e *Blastomyces dermatitidis*, que na fase micelial são encontrados no solo, o microhabitat do *P. brasiliensis* permanece desconhecido (RESTREPO *et al.*, 2001). Esta falta de conhecimento tem impedido a adoção de medidas preventivas para o combate a PCM (CONTI DÍAZ, 2007).

Apesar dos poucos dados sobre o habitat e a ecologia do *P. brasiliensis*, acredita-se que o fungo viva saprofitamente em solo úmido, rico em proteínas, cercados por lagos, rios e pântanos, onde as variações de temperatura são mínimas (RESTREPO, 1985).

Evidências que colaboram com essa hipótese são os relatos de isolamento de *P. brasiliensis* do solo na Argentina (NEGRONI, 1966), na Venezuela (ALBORNOZ, 1971) e em uma plantação de café no estado de Minas Gerais, Brasil (SILVA-VERGARA *et al.*, 1998). Conti Diaz (2007) propôs a hipótese de que o solo provavelmente não é o habitat permanente do patógeno, uma vez que os isolamentos são raros e não reprodutíveis. Porém, Franco *et al.* (2000) sugeriram

que o isolamento a partir do solo é raro porque as técnicas microbiológicas tradicionais utilizadas não são sensíveis o suficiente para esse fim. Enquanto, Ono *et al.* (2002) postularam que a presença de pesticidas interfere diretamente nas tentativas de isolamento de *P. brasiliensis* do solo.

Nos últimos anos pesquisadores como Borneman e Hartin (2000) propuseram a utilização de técnicas de amplificação de DNA como estratégia confiável para detectar e identificar microrganismos de diferentes fontes, inclusive solo. Por exemplo, Reid e Schafer (1999) desenvolveram uma reação de *nested* PCR que permitiu a detecção direta de *H. capsulatum* em solo artificialmente contaminado com o fungo, sem a necessidade do método indireto de inocular em camundongo que é mais caro e mais demorado. Alguns trabalhos também utilizam essa técnica para a detecção de *P. brasiliensis* no solo (McEWEN *et al.*, 1995; DIEZ *et al.*, 1999; THEODORO *et al.*, 2005; TERÇARIOLI *et al.*, 2007; RICHINI-PEREIRA *et al.*, 2008).

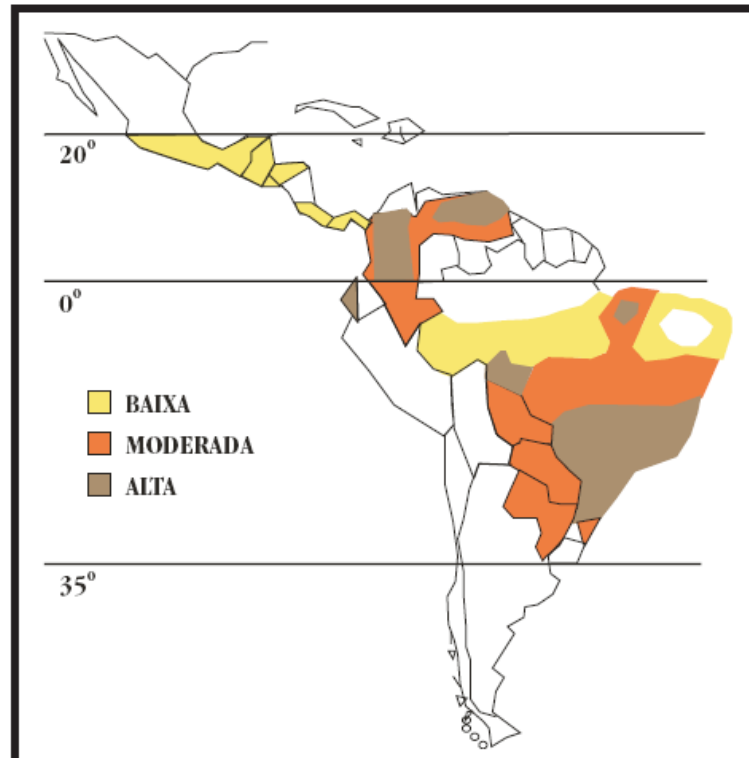
Além do solo, o fungo *P. brasiliensis* também foi isolado de fezes de pingüim (*Pigocelis adelia*) (GEZUELE, 1989); ração de cachorro contaminada (FERREIRA, *et al.*, 1990); e de tatus (*Dasypus novemcinctus*) (SILVA-VERGARA *et al.*, 2000). Provavelmente os tatus têm grande importância na eco-epidemiologia do *P. brasiliensis*, como pode ser deduzido pelo frequente isolamento a partir de vísceras de tatus e pelo relato da presença de lesão granulomatosa no pulmão de um animal, o que sugere que além de ser infectado, o tatu também pode desenvolver a doença (DIEZ *et al.*, 1999). Esta informação, relacionada ao hábito de escavar o solo destes animais atraiu o interesse para o papel deste mamífero na ecologia do *P. brasiliensis* (VERGARA; MARTINEZ, 1999; BAGAGLI *et al.*, 2008).

## **1.2 PARACOCCIDIOIDOMICOSE (PCM)**

Adolph Lutz descreveu a doença em 1908 em dois pacientes com lesões orais e linfadenopatia cervical, sendo que em 1930, Floriano Almeida colocou para o fungo isolado o gênero *Paracoccidioides* (ALMEIDA; JACKS; SCULLY, 2003).

A PCM é uma micose sistêmica que, exceto casos importados

(AJELLO; POLONELLI, 1985; MAYR *et al.*, 2004; MAYAYO *et al.*, 2007), possui uma distribuição geográfica limitada à América Latina, onde ocorre desde o México (23°N) até a Argentina (34°S) (Figura 2).



**Figura 2** – Distribuição geográfica da paracoccidiodomicose.

Fonte: Shikanai-Yasuda, *et al.* (2006).

No Brasil é endêmica em certas áreas, como as regiões Sudeste, Sul e Centro Oeste, sendo os cinco estados que apresentam as maiores taxas de mortalidade por esta doença: São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro (BLOTTA *et al.* 1999; COUTINHO *et al.* 2002).

A taxa de mortalidade por PCM foi avaliada no Brasil entre os anos de 1980 e 1998, neste período foram notificadas 551 mortes no Paraná, 316 no Rio Grande do Sul e 154 em Santa Catarina. Sendo assim, o Paraná ocupa o primeiro lugar em número de mortes por PCM entre os estados do sul, e o segundo lugar entre os demais estados, ficando atrás apenas de São Paulo com 1099 mortes por PCM. O estudo também apontou a PCM como quinta causa de morte dentre as infecções crônicas e primeira causa dentre as micoses sistêmicas no Paraná (BITTENCOURT; OLIVEIRA; COUTINHO, 2005).

O início da infecção depende da transformação dimórfica de micélio saprofítico para a forma de levedura e a PCM parece ser adquirida pela inalação de propágulos (ARISTIZABAL *et al.*, 1998).

A PCM tem duas formas clínicas principais, a aguda ou juvenil e a crônica. A forma aguda representa 3-5% de todos os casos, e é caracterizada por um curso rápido (semanas a meses) com envolvimento do sistema reticuloendotelial (baço, fígado, linfonodos e medula óssea). A forma crônica ocorre em mais de 90% dos pacientes e afeta na maioria dos casos homens, trabalhadores rurais. A progressão da doença é vagarosa e pode levar meses ou vários anos para se tornar completamente estabelecida. A PCM crônica, primariamente afeta os pulmões e pode se disseminar para outros órgãos e sistemas, sendo que lesões secundárias aparecem freqüentemente em membranas mucosas, linfonodos, pele e glândula adrenal (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993).

A maior parte dos casos de PCM ocorre em indivíduos do sexo masculino, predominando a faixa etária de 40 anos e cuja profissão é vinculada à agricultura (BICALHO *et al.*, 2001, GODOY; REICHART, 2003, PANIAGO *et al.*, 2003; VERLI *et al.*, 2005).

A proporção homem: mulher acometidos varia de 15 a 22:1. (SEVERO *et al.*, 1998; SILVA, 2008). Esta diferença de incidência da doença entre os sexos é explicada pelas diferenças nos níveis dos hormônios femininos, os quais podem ser protetores contra a progressão da infecção por *P. brasiliensis*. Estudos indicam que o estradiol inibe a transição morfológica alterando os perfis de síntese de proteínas de micélio e levedura (BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002).

A principal defesa do hospedeiro contra *P. brasiliensis* é mediada pela resposta imune celular. Os macrófagos são as principais células de defesa contra o fungo, fagocitando o organismo, que pode sofrer replicação intracelular quando na ausência de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Experimentos mostram que a resistência em camundongos está ligada à resposta imune Th1 (*T-helper* 1), com elevada secreção de IFN- $\gamma$  e interleucina 2 (IL-2), e a suscetibilidade está associada com níveis muito baixos destas citocinas (BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002).

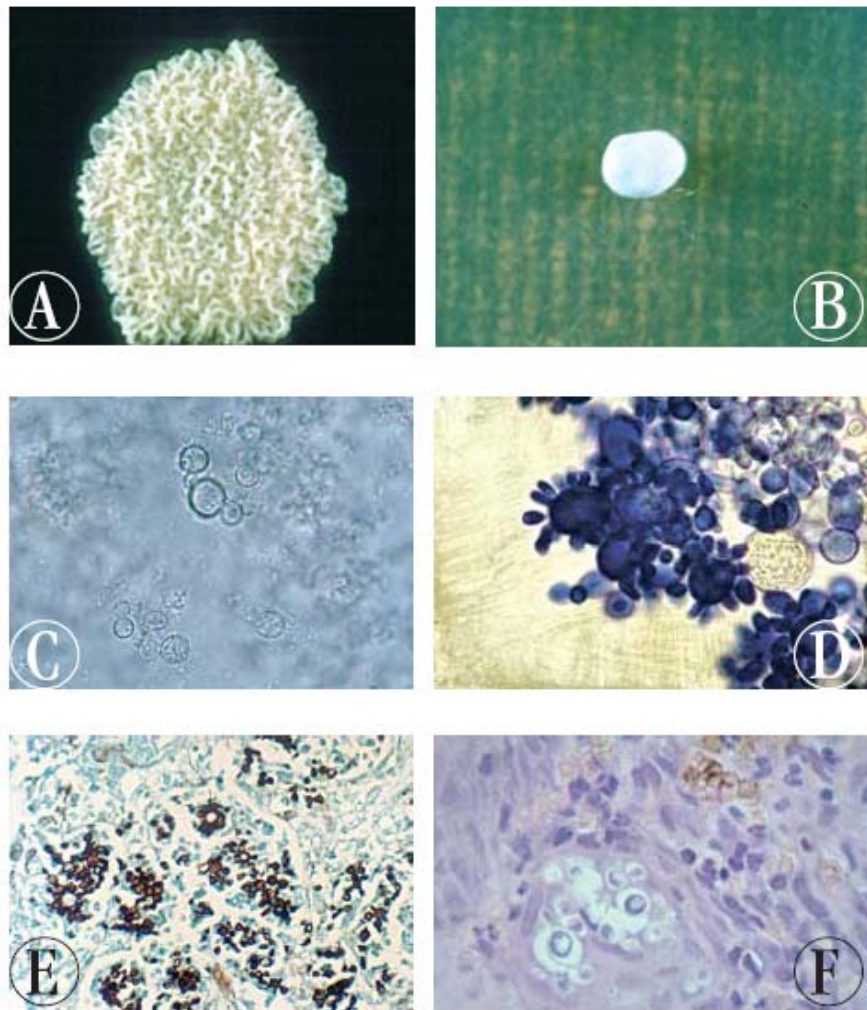
O tratamento da PCM é geralmente prolongado, com pacientes recebendo a terapia durante um a dois anos. Na ausência de terapia com drogas, a doença é frequentemente fatal. Os antifúngicos mais usados são a anfotericina B, os sulfamídicos (sulfadiazina, associação sulfametoxazol/trimetoprim), e os azólicos

(cetoconazol, fluconazol, itraconazol) (LORTHOLARY *et al.*, 1999; SHIKANAI-YASUDA, 2006). Contudo, casos de cepas resistentes têm sido descritos (VISBAL *et al.*, 2005).

### 1.3 DIAGNÓSTICO

Os métodos laboratoriais de diagnóstico de infecções fúngicas são a observação direta e o isolamento por cultura com a posterior identificação pela morfologia. A eficácia desses métodos é dependente de vários fatores como: a experiência e habilidade técnica das pessoas envolvidas e da possibilidade do organismo ser cultivado. Apesar de serem métodos que permitem a identificação definitiva do agente, estes são demorados, não quantitativos e propensos à contaminação e erro, que no caso da patologia médica frequentemente atrasam o tratamento e conseqüentemente acarretam prejuízos ao paciente (ATKINS; CLARK, 2004).

O diagnóstico da PCM é baseado em vários procedimentos laboratoriais (Figura 3). Um dos mais utilizados é a pesquisa da presença do agente em amostras clínicas, utilizando diferentes procedimentos e métodos de coloração e imunofluorescência. Em tecido, os exames histopatológicos com coloração pela hematoxilina e eosina, metanamina de prata, ou pelo *Periodic Acid Schiff* (PAS) são rotineiramente utilizados. O cultivo do fungo é sempre feito na tentativa de isolamento do agente e mais recentemente testes sorológicos para o diagnóstico têm sido propostos, sendo utilizados principalmente para acompanhamento da evolução da doença.



**Figura 3** – Diagnóstico laboratorial da paracoccidioidomicose. Cultivo de *P. brasiliensis*: fase micelial (A); fase leveduriforme (B). Exame a fresco em KOH (C). Corado pelo lactofenol mostrando células leveduriformes com múltiplos brotamentos (D). Corte histológico corado pelo método de Grocott (E). Corte histológico corado pelo PAS (F).

**Fonte:** Shikanai-Yasuda, *et al.* (2006).

Entretanto, todos estes métodos podem apresentar falhas ou deficiências. No cultivo o fungo apresenta crescimento lento (20 a 30 dias) e uma variedade de formas de colônias podem ser obtidas. Como a forma micelial não é distintiva, o dimorfismo deve ser demonstrado por subcultura a 37°C. Além disso, em áreas não endêmicas, um empecilho é a falta de experiência e a necessidade de um alto nível de biosegurança para o cultivo do fungo (BIALEK *et al.*, 2000a). Em cortes

histológicos o agente etiológico pode não ser encontrado ou ainda confundido com outros fungos dimórficos como *Histoplasma* spp. ou *Coccidioides immitis* (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993).

O teste de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) é muito utilizado para detecção e quantificação de anticorpos, mas apesar de possuir uma alta sensibilidade, apresenta a desvantagem de não ser altamente específico. O principal antígeno para o imunodiagnóstico de *P. brasiliensis* é uma glicoproteína de 43-kDa, denominada gp43, localizada na parede do fungo e secretada extracelularmente. Porém, reatividade cruzada entre a gp43 e antígenos de outros microrganismos tem sido descrita e mesmo após o tratamento da gp43 com metaperiodato e processos de adsorção para aumentar a especificidade do exame, não foi possível eliminar toda reação cruzada e obter uma reação de ELISA totalmente específica para o diagnóstico da PCM, obtendo especificidade máxima de 84% (ALBUQUERQUE *et al.*, 2005).

Além disso, esta reação pode ser influenciada por outros fatores, como o isolado do fungo que causou a doença, a resposta imune individual contra um isolado específico que pode carregar diferentes epítomos antigênicos; sendo que muitos resultados não são reproduzíveis (ALBUQUERQUE *et al.*, 2005). Além do mais, o imunodiagnóstico pode ser inútil para pacientes imunocomprometidos devido à reduzida produção de anticorpos. Vidal *et al.* (2005) relataram um caso de resposta sorológica atípica, consistindo na falta de anticorpos anti-gp43 detectáveis em um paciente com PCM disseminada. Neste episódio, o diagnóstico da PCM foi realizado pela detecção do gene para a gp43 por uma reação de *nested* PCR.

Métodos novos e rápidos vêm sendo desenvolvidos e usados em todos os aspectos de diagnóstico de fungos. Estes incluem a tecnologia de sondas DNA/RNA e PCR. Em contraste aos métodos convencionais, as amostras podem ser testadas diretamente, e isolados não exigem cultivo. São rápidos, específicos e podem ser usados para detectar quantidades muito pequenas de DNA. Além disso, a PCR pode ser realizada como rotina e não exige um alto nível de perícia para a interpretação dos resultados (ATKINS; CLARK, 2004).

#### 1.4 DETECÇÃO MOLECULAR DE *P. BRASILIENSIS*

A alta incidência de diversas infecções fúngicas aumenta a necessidade de métodos de identificação rápidos e precisos na micologia clínica. Os métodos moleculares são independentes do cultivo e permitem a detecção dos patógenos em amostras clínicas. (DOBROWOLSKA; BOJARSKI; STACZEK, 2002; LI *et al.*, 2004; SPEERS 2006; De MARCO *et al.*, 2007;). Além disso, essas técnicas são capazes de identificar cepas resistentes a drogas (FIGUEROA; RASHEED, 1991).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi desenvolvida por Mullis e colaboradores na década de 80. É uma técnica para a amplificação *in vitro* de seqüências específicas de DNA utilizando a extensão simultânea de iniciadores complementares às fitas do DNA em estudo (MCPHERSON; QUIRKE; TAYLOR, 1994).

A PCR é uma técnica com ampla aplicação nas ciências básica e aplicada e atualmente é uma importante ferramenta para o diagnóstico. O maior problema para este método é a contaminação das amostras por inibidores da PCR (MOREIRA, 1998), como por exemplo, ácidos húmicos com grupos fenólicos, que possuem solubilidade similar à do DNA (ZHOU *et al.*, 1996).

Uma variação da técnica de PCR é a *nested* PCR que se caracteriza por um processo que utiliza duas PCRs consecutivas, sendo que a primeira contém um par externo de oligonucleotídeos enquanto que a segunda possui um par interno. O fragmento maior produzido na primeira reação é utilizado como molde para a segunda, e o resultado pode ser até 1000 vezes mais sensível que a PCR padrão (McPHERSON *et al.*, 1994). Alguns trabalhos com fungos patogênicos demonstram a maior sensibilidade da reação de *nested* PCR (HU *et al.*, 2003; GUEDES *et al.*, 2003). Outra variação é a reação de *semi-nested* PCR, que utiliza três oligonucleotídeos em duas reações de PCR consecutivas, ou seja, um oligonucleotídeo é comum nas duas reações.

A principal região do DNA usada para a detecção molecular de fungos são os genes ribossomais, presentes em todos os organismos e em grande número de cópias o que auxilia a detecção e sensibilidade da reação de PCR. O DNA ribossomal dos fungos é formado por três genes, o gene para a subunidade

maior (25S ou 28S), para a subunidade menor (18S) e o gene 5.8S, separados por regiões *internal transcribed spacer* (ITS). Esta região ITS é uma área de importância particular para o diagnóstico de fungos, possuindo regiões altamente conservadas e regiões altamente variáveis, sendo ideal para o desenvolvimento de oligonucleotídeos específicos para a identificação de espécies fúngicas (ATKINS; CLARK, 2004).

Nos últimos anos diversos estudos têm investigado a aplicação de métodos moleculares para a detecção do fungo *P. brasiliensis* (Tabela 1).

**Tabela 1** – Relação dos oligonucleotídeos (oligos) utilizados para detecção molecular de *P. brasiliensis*.

Oligos	Seqüências	Par utilizado	Amplificação (pb)	Referências	
P1	5' - ATCAATAAGCGGAGGAAAAG - 3'	P1/P2	800	Sandhu <i>et al.</i> (1995)	
P2	5' - CTCTGGCTTCACCCTATTC - 3'				
U1	5' - GTGAAATTGTTGAAAGGGAA - 3'	U1/U2	200		
U2	5' - GACTCCTTGGTCCGTGTT - 3'				
primer 1	5' - TCGTTATCCTCATCGAA - 3'	1/2	62	Goldani e Sugar (1998)	
primer 2	5' - AAGAGTCTTCCCTCGC - 3'				
ITS1 <sup>a</sup>	5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3'	ITS1/ITS4	620	Diez <i>et al.</i> (1999)	
ITS4 <sup>a</sup>	5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'	gp43-1/gp43-2	1303		
gp43-1	5' - ATGAATTTTAGTCTCTTAACCTGGCTCTT - 3'				
gp43-2	5' - CCTGCATCCACCATACTTCCCTAGCCCA - 3'	gp2/gpM	300		
gp2	5' - TCACCTGTCGACACCATACTTCCCTAGCCCAAATC - 3'				
gpM	5' - GCCATGGTCGACAATGGGCGTGGCATAGGTTTCG - 3'	LO/UP	536		
LO	5' - CACTCTTGGCTTTGGTTGAAG - 3'				
UP	5' - CTGTTGTTTCCGTCCTTGCGC - 3"				
ITS5 <sup>a</sup>	5' - CCGAGTGC GG CCTCTGGGTCC - 3'	ITS5/ITS4	650		Imai <i>et al.</i> (2000)
ITS4 <sup>a</sup>	*				
Pb-ITS1s	5' - CCGCCGGGGACACCGTTG - 3'	Pb-ITS1s/	418		
Pb-ITS3a	5' - AAGGGTGTGATCGAGAG - 3'	Pb-ITS3a			
sense	5' - TCATCTCACGTGCGATCTCACATT - 3'	sense/anti-sense	1030	Silva-Vergara <i>et al.</i> (2000)	
anti-sense	5' - AGCGCCAGATGGTTTGCCCGCTAGGAACGAA - 3'				
(PC1) <sup>b</sup>	*	PC1/PC5	1030	Gomes <i>et al.</i> (2000)	
PC2	5' - ATAGAGGGAGAG CCATATGTACAAGGT - 3'	PC1/PC6	880		
PC3	5' - ATCAAACAACCCTGATCGGCAT - 3'	PC2/PC5	740		
(PC5) <sup>b</sup>	*	PC2/PC6	600		
PC6	5' - GGCTCCTCAAAGTCTGCCATGAGGAAG - 3'	PC3/PC5	490		
para I	5' - AACTAGAATATCTCACTCCCAGTCC - 3'	paral/parall	355		Bialek <i>et al.</i>

para II	5' - TGTAGACGTTCTTGTATGTCTTGGG - 3'			
para III	5' - GATCGCCATCCATACTCTCGCAATC - 3'	parall/paraIV	196	
para IV	5' - GGGCAGAGAAGCATCCGAAATTGCG - 3'			
ITS1 <sup>a</sup>	*	ITS1/ITS4	649	
ITS4 <sup>a</sup>	*			
UNI-R <sup>c</sup>	5' - GGTCCGTGTTTCAAGACG - 3'	ITS1/OL5	496	Motoyama <i>et al.</i>
UNI-F <sup>c</sup>	5' - GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG - 3'	UNI-F/UNI-R	617	(2000)
OL5	5' - TGTGACGAAGCCCCATACG - 3'			
OL3	5' - CTCAGCGGGCACTT - 3'	OL3/UNI-R	203	
MAE	5' - TGCTGCGGCGGGTTAAACCATGTC - 3'	MAE/ATO	589	
ATO	5' - GTTGTGGTATGTGTGATGTAGACG - 3'			
F2	5' - TGGGCCAAAACTCAAATC - 3'	F2/R2	473	
R2	5' - TGGTATGTGTCGATGTAGACGT - 3'			Sano <i>et al.</i>
ITS5 <sup>a</sup>	*	ITS5/ITS4	650	(2001)
ITS4 <sup>a</sup>	*			
Pb-ITS1s <sup>d</sup>	*	Pb-ITS1s/	418	
Pb-ITS3a <sup>d</sup>	*	Pb-ITS3a		
MAE <sup>e</sup>	*	MAE/ATO	589	
ATO <sup>e</sup>	*			
F2 <sup>e</sup>	*	F2/R2	473	Itano <i>et al.</i>
R2 <sup>e</sup>	*			(2002)
F3	5' - GCCAAAACTCAAATCTGAGGG - 3'	F3/R3	463	
R3	5' - GTCGATGTAGACGTTCTTGTAT - 3'			
A	5' - TTCCCAAACggCTTCgA - 3'	A/B	61	Semighini <i>et al.</i>
B	5' - TgTCACCCTTTTgCCAgtTg - 3'			(2002)
ITS4 <sup>a</sup>	*	ITS4/ITS5	634	Theodoro <i>et al.</i>
ITS5 <sup>a</sup>	*			(2005)
PbITSE	5' - GAGCTTTGACGTCTGAGACC - 3'	PbITSE/PbITSR	387	
PbITSR	5' - AAGGGTGTGTCGATCGAGAGAG - 3'			
MG2(1)F	5' - GGGATTCCCTAGGCAAACACTTGTGTGA - 3'	MG2(1)F/ MG2(1)R	285	San-Blas <i>et al.</i>
MG2(1)R	5' - GTGCAGTTATCCACAAGCCATATATTC - 3'			(2005)
MG2(2)F	5' - GGAGATGATCTGACGTTAGTACGTGATG - 3'	MG2(2)F/ MG2(2)R	288	
MG2(2)R	5' - ATGCTAATTTATGTCATTCCGCGTCTG - 3'			

<sup>a</sup>White *et al.* (1990); <sup>b</sup>Silva-Vergara *et al.* (2000); <sup>c</sup>Haynes *et al.* (1995); <sup>d</sup>Imai *et al.* (2000); <sup>e</sup>Sano *et al.* (2001); \*seqüência descrita anteriormente.

**Fonte:** Venancio, Vituri e Koishi (2008).

Em 1997 foi realizado um trabalho pioneiro para a detecção de *P. brasiliensis* por biologia molecular. Para encontrar uma sonda específica para esse fungo, os autores sequenciaram o gene ribossomal 28S de nove cepas de *P.*

*brasiliensis* e compararam com 47 seqüências de outras espécies de fungos depositadas no *GenBank*. Uma sonda de 14 bases foi identificada como sendo específica para *P. brasiliensis*, eliminando reações cruzadas com *H. capsulatum* e *Blastomyces dermatitidis* (SANDHU *et al.*, 1997).

A primeira reação de PCR para detectar o DNA de *P. brasiliensis* foi desenvolvida em 1998. Em um modelo de camundongos experimentalmente infectados, a presença de *P. brasiliensis* foi pesquisada no soro. Nesse trabalho foi feita a comparação entre a sensibilidade da PCR e do cultivo. Uma desvantagem da metodologia desenvolvida é que o produto da PCR é de apenas 62 pares de base e necessita de eletroforese em gel de agarose a 4% para visualização eficiente (GOLDANI; SUGAR, 1998).

Na busca pelo micro-ambiente do *P. brasiliensis*, pesquisadores padronizaram uma PCR que pode ser importante para estudos ecológicos. Os autores utilizaram três pares de iniciadores específicos para dois genes de *P. brasiliensis* que codificam as proteínas de 27 kDa e 43 kDa. Para a detecção do fungo em amostras do solo foi necessária a eliminação de inibidores da PCR. Os autores ainda conseguiram usar a reação para detectar o fungo no linfonodo e no fígado de tatus (*D. novemcinctus*) infectados naturalmente (DIEZ *et al.*, 1999).

Já outro estudo analisou a região genômica contendo o gene 5.8S e os segmentos ITS1 e ITS2 deste fungo. Os autores desenharam oligonucleotídeos específicos para o fungo e o produto da PCR foi detectado em todas as 29 cepas de *P. brasiliensis* estudadas e nenhuma reatividade cruzada foi observada com *Aspergillus fumigatus*, *B. dermatitidis*, *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *H. capsulatum* e *Penicillium marneffeii* (IMAI *et al.*, 2000).

O escarro é um fluido biológico que pode ser útil no diagnóstico de *P. brasiliensis*. O primeiro estudo utilizando PCR para detecção do DNA de *P. brasiliensis* em escarro de pacientes com PCM foi descrito em 2000. A reação foi baseada em oligonucleotídeos para seqüências do gene da gp43 e em condições ótimas foi capaz de detectar até 10 células do fungo por ml de escarro. Os autores testaram 11 amostras de escarro provenientes de pacientes com PCM crônica, e obtiveram resultados positivos para todas as amostras (GOMES *et al.*, 2000).

Uma *nested* PCR foi utilizada para a detecção do DNA de *P. brasiliensis* em extrato de pulmão homogeneizado de camundongos experimentalmente infectados, utilizando a seqüência do gene gp43 como alvo. Dos

23 camundongos infectados, amostras de 21 desses apresentaram resultado positivo na PCR. O limite de detecção observado foi de 0,5 fg até 100 pg por amostra, o que corresponde a aproximadamente 100 cópias do gene (BIALEK *et al.*, 2000a).

Essa mesma reação foi utilizada com sucesso para a detecção de DNA de *P. brasiliensis* no tecido de um paciente com PCM disseminada e com ausência de anticorpos anti-gp43 (VIDAL, *et al.*, 2005). No entanto, quando foi utilizada para a detecção de *P. brasiliensis* em 33 amostras de soro de pacientes com PCM não tratados e com diferentes formas clínicas, apenas uma amostra foi positiva na *nested* PCR (CHARBEL; LEVI; MARTINS, 2006). Essa baixa positividade com amostras de soro também foi observada por outros autores (ITANO *et al.*, 2002).

Em 2000, outra reação de PCR para o diagnóstico e estudos ecológicos e epidemiológicos da PCM foi proposta por Motoyama *et al.* Os autores desenharam dois pares de oligonucleotídeos baseados nas regiões ribossomais 5.8S e 28S. O par de oligonucleotídeos da região 5.8S apresentou reação cruzada com DNA de *H. capsulatum*, já o par de oligonucleotídeos para a região 28S mostrou-se positivo para todas as amostras de *P. brasiliensis* e não apresentou reatividade cruzada com DNA humano e de *A. fumigatus*, *C. albicans*, *C. immitis*, *S. cerevisiae* e *H. capsulatum* (MOTOYAMA *et al.*, 2000).

Em outro estudo, quando *P. brasiliensis* foi isolado pela primeira vez de pulmão de tatus que foram capturados na região de Ibiá, Minas Gerais, a PCR foi utilizada para identificação do fungo. Os autores isolaram o fungo de três animais e fizeram a identificação da espécie por macro e micro-morfologia, termo-dimorfismo, produção de exoantígeno e PCR com iniciadores específicos para o gene *gp43*. A reação de PCR foi positiva para os três isolados testados gerando um produto de 1-kb (SILVA-VERGARA *et al.*, 2000).

Para a detecção de *P. brasiliensis* em tecidos de camundongos infectados com o fungo, fixados em parafina, duas reações de *nested* PCR foram desenvolvidas, uma baseada no gene *gp43* e outra na região do DNA ribossomal (ITS1-5.8S-ITS2). Ambas as reações foram eficientes na detecção deste fungo em tecido fixado em blocos de parafina, e a autenticidade dos produtos da PCR foi confirmada por sequenciamento (SANO *et al.*, 2001).

Em 2005 foi desenvolvida uma reação de PCR específica para *P.*

*brasiliensis* com limite de detecção de 10 pg ou 10 células/ml. A reação também foi usada para investigar a presença do fungo em sete amostras de escarro e uma de fluido cérebro espinhal de pacientes suspeitos de estarem com PCM. A reação de detecção molecular foi capaz de identificar corretamente os casos de PCM e descartar o caso de um paciente que não estava acometido pela a doença. Testes feitos com sangue ou soro foram todos negativos (SAN-BLAS *et al.*, 2005).

Nesse mesmo ano foi relatada uma *nested* PCR para a detecção molecular de *P. brasiliensis* no solo. Os resultados obtidos mostraram que a reação de *nested* PCR proposta foi mais eficiente que a cultura e a inoculação em animais para a detecção do fungo *P. brasiliensis*. Além disso, foi possível a detecção do fungo em três de quatro amostras de solo analisadas (THEODORO *et al.*, 2005).

Essa *nested* PCR desenvolvida por Theodoro *et al.* (2005) foi utilizada para verificar a presença do fungo em amostras de tecidos de 19 animais atropelados em estradas; dentre eles: cobaia (*Cavia aperea*), cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), tatu-galinha (*D. novemcinctus*), tatuí (*Dasyus septemcinctus*), gambá-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*), irara (*Eira barbara*), furão (*Gallictis vittata*), guaxinim (*Procyon cancrivorus*) e porco-espinho (*Sphiggurus spinosus*). Fragmentos específicos foram detectados em 2 tatus-galinha, 1 cobaia, 1 porco-espinho, 1 guaxinim e 1 furão. Este estudo foi importante para mostrar que as técnicas moleculares são úteis para detectar novos hospedeiros e mapear áreas *hot spot* de PCM (RICHINI-PEREIRA *et al.* 2008).

Mais recentemente, foi utilizada uma *primer-extension-preamplification* (PEP)-*nested* PCR, baseada na região do gene *gp43*, para detecção do DNA de *P. brasiliensis* em 107 biópsias de tecidos em parafina de pacientes com PCM. Utilizando esta técnica obtiveram resultado positivo em 29% das amostras de tecidos em parafina, sendo que somente 5% das amostras foram positivas utilizando somente a *nested*-PCR (RICCI *et al.*, 2007).

Outras metodologias têm sido propostas para a detecção molecular de *P. brasiliensis*. A técnica de PCR-EIA (PCR-*Enzyme ImmunoAssay*) consiste de uma combinação de PCR e detecção enzimática colorimétrica, sendo utilizada para detectar diversos fungos patogênicos inclusive *P. brasiliensis*. Este método é potencial para automação e pode ser muito útil para aplicação em laboratórios clínicos, embora ainda não tenha sido testada para a detecção de fungos em tecido (LINDSLEY *et al.*, 2001).

Foi ainda desenvolvido um teste para detecção de *P. brasiliensis* denominado ensaio 5' nuclease. Esta é uma reação de PCR em tempo real que utilizou uma sonda fluorescente baseada no gene *gp43*. A reação foi capaz de detectar pelo menos 10 cópias desta seqüência de DNA (SEMIGHINI *et al.*, 2002).

Outro método testado foi o LAMP (*Loop-mediated Isothermal Amplification*), no qual o gene da proteína *gp43* específica de *P. brasiliensis* foi encontrado em 22 isolados clínicos e 7 isolados derivados de tatu. Além disso, os autores obtiveram resultados positivos com DNA extraído de amostras de tecido de pacientes com PCM embebidas em parafina (ENDO *et al.*, 2004).

Apesar dos bons resultados obtidos em trabalhos anteriores, ainda é necessária uma técnica de PCR específica para *P. brasiliensis*, com um bom limite de detecção, capaz de identificar o fungo tanto em amostras ambientais de solo, auxiliando no estudo ecoepidemiológico do patógeno, como em amostras de pacientes com PCM, auxiliando no diagnóstico e tratamento da doença.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar uma reação de semi-*nested* PCR para a detecção molecular do fungo patogênico *P. brasiliensis*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar oligonucleotídeos para uma reação de semi-*nested* PCR para detecção de *P. brasiliensis* em amostras de tecidos frescos ou embebidos em parafina, e de solo.

Comparar a semi-*nested* PCR para detecção de *P. brasiliensis* em camundongos experimentalmente infectados com os métodos de cultivo e histopatologia.

Avaliar uma reação de semi-*nested* PCR em uma única etapa para detecção de *P. brasiliensis*.

### **3 MATERIAS E MÉTODOS**

#### **3.1 ANIMAIS**

Foram utilizados 9 camundongos machos adultos Swiss que foram mantidos no biotério do Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina, alimentados *ad libitum* com ração peletizada e água.

#### **3.2 AMOSTRAS CLÍNICAS**

Cinco amostras de biópsia bucal de pacientes com suspeita de paracoccidiodomicose foram coletadas de Janeiro de 2007 a Julho de 2008 no Centro Odontológico da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil. Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina conforme o parecer nº 301/06.

#### **3.3 AMOSTRAS DE SOLO**

Amostras de solos foram coletadas e armazenadas em sacos plásticos. Cinco amostras foram coletadas de formigueiros no Campus da Universidade Estadual de Londrina, na cidade de Londrina, Paraná, localizada a uma latitude 23°18'37"S e longitude 51°09'46"O, com clima subtropical úmido.

Outras seis amostras foram coletadas de região de cafezal e capoeira da "Chácara 2 Irmãos" em Nova Bandeirantes, Mato Grosso a uma latitude 09°50'59"S e longitude 57°48'38"O, com clima predominante tropical, caracterizado por temperaturas elevadas e de grande umidade. Destas, cinco amostras foram coletadas do interior da toca de tatus.

### 3.4 MICRORGANISMOS

Os fungos *P. brasiliensis* cepas LDR1 e Pb18 (cedidos pelo Prof. Dr. Mario Augusto Ono) e *Cryptococcus* sp (cedido pela Profa. Regina Mariuza Borsato Quesada) foram mantidos a 37°C. *Candida albicans* cepa CR15 (cedido pela Profa. Dra. Ionice Felipe), *Sporothrix schenckii*, *Histoplasma capsulatum* (cedidos pela Profa. Dra. Halha Ostrensky Saridakis) e *Trichophyton rubrum* (cedido pela Profa. Regina Mariuza Borsato Quesada) foram mantidos a temperatura ambiente (22°C). Todos os fungos foram cultivados em ágar Sabouraud dextrose (Biobrás) e repicados a cada 15 dias.

### 3.5 CONTAGEM DE CÉLULAS DE *P. BRASILIENSIS*

*P. brasiliensis* foi cultivado em meio ágar Sabouraud dextrose inclinado a 37°C por uma semana. Para a infecção experimental dos camundongos as colônias do fungo foram raspadas do meio e lavadas com 3 ml de PBS estéril e centrifugado a 4.000 rpm por 10 min (processo repetido 3 vezes). Contagem de células em Câmara de Neubauer.

### 3.6 EXTRAÇÃO DE DNA

#### 3.6.1 Fungos em Cultura e Tecidos

Aproximadamente 100 mg do fungo em cultura ou das amostras de tecido foram macerados em nitrogênio líquido até se obter um pó fino. O material foi recuperado em um tubo de microcentrífuga contendo 300 µl de fenol- clorofórmio (v/v) e 200 µl de água estéril. A mistura foi centrifugada (Cientec, CT-14000) a 14.000 ×g por 10 min (2 repetições) e o sobrenadante transferido para um novo

tubo. A precipitação do DNA foi feita com 0,1 volumes de acetato de sódio e 2,5 volumes de etanol absoluto, incubado a 4°C por no mínimo 2h, seguido de centrifugação a 14.000 ×g por 10 min e lavagem com etanol 70%. Após secagem, o precipitado foi ressuspendido em 50 µl de água ultra pura.

### 3.6.2 Tecido Parafinado

Inicialmente a parafina foi removida segundo Bialek *et al.* (2003). Duas secções de 10 µm da peça parafinada foram submetidas a duas lavagens de 5 min com xilol (10.000 ×g por 2 min) e posteriormente com etanol absoluto (10.000 ×g por 3 min). A extração de DNA foi feita segundo Hu *et al.* (2003) com modificações. Às amostras desparafinadas foram adicionados 100 µl de água estéril e 100 µl de tampão de extração (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10 mM EDTA, 0.15M NaCl, 2% sódio dodecil sulfato), proteinase K para uma concentração final de 0.5 mg/mL. A mistura foi incubada a 55°C por 16h e a proteinase K foi inativada por aquecimento a 95°C por 10 min. Para romper as células do fungo, as amostras foram expostas a três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido por 1 min e fervura por 5 min. Após resfriamento à temperatura ambiente, foi adicionado um volume igual de fenol-clorofórmio (v/v) e a mistura centrifugada (Cientec, CT-14000) a 14,000 ×g por 5 min. O DNA foi precipitado com 0,1 volumes de acetato de sódio e 2,5 volumes de etanol 100% a 4°C, centrifugado a 14.000 ×g por 10 min e lavado com etanol 70%. Após secagem do precipitado o DNA foi ressuspendido em 50 µl de água ultra pura, sendo 5 µl utilizados na semi-nested PCR.

### 3.6.3 Solo

A extração de DNA foi feita segundo Volossiuk, Robb e Nazar (1995) com modificações. Inicialmente, 0,5 g das amostras de solo foram macerados em nitrogênio líquido por cerca de 5 min ou até se obter um pó fino. Depois disso foram adicionados 500 µl de solução de leite (0,1 g de leite em pó em 25 ml de

água) e misturado por vórtex (Vertex, QL-901). Após centrifugação a 14,000 ×g por 10 min (Cientec, CT-14000), o sobrenadante foi recuperado e homogeneizado com 500 µl de tampão de extração (0.3% SDS; 0.14 M de NaCl, 50 mM de acetato de sódio, pH 5.1). A seguir foi adicionado fenol-clorofórmio (v/v), e a solução foi misturada vigorosamente por vórtex intermitente. A amostra foi então centrifugada (14,000 ×g por 10 min) e a fase aquosa foi recuperada. Os ácidos nucleicos da fase aquosa foram precipitados como descrito no item 3.6.1. O volume de 5 µl foram utilizados na semi-*nested* PCR.

#### **3.6.4 Análise do produto da extração de DNA**

Após a extração de DNA, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% e analisadas quanto à integridade do DNA. No caso de contaminação com RNA, foi adicionado RNase A para uma concentração final de 10 µg/ml e a mistura foi incubada a 37°C por 1h, e em seguida submetida a extração com fenol- clorofórmio como descrito no item 3.6.1.

### **3.7 QUANTIFICAÇÃO DE DNA**

A concentração do DNA extraído das colônias de fungos foi obtida através de leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 260 nm, de acordo com a seguinte relação: 1OD = 50 ng/µl de DNA dupla fita (HAQUE *et al.*, 2003); e sua pureza determinada pela razão  $A_{260/280}$  e  $A_{260/230}$ .

Na razão  $A_{260/280}$  um valor >1.7 é indicativo de DNA puro, enquanto uma razão baixa indica contaminação por proteínas. Na razão  $A_{260/230}$  um valor >2 é indicativo de DNA puro, enquanto que uma razão baixa indica contaminação por fenol/ácidos húmicos (STEFFAN *et al.*, 1988).

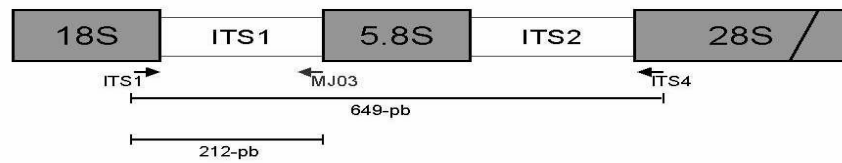
### 3.8 OLIGONUCLEOTÍDEOS

Os oligonucleotídeos ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') foram descritos por White *et al.* (1990), são universais para fungos e correspondem à seqüências nas regiões 18S e 28S que flanqueiam o DNA ribossômico 5.8S e regiões ITS, em *P. brasiliensis* amplificam um fragmento de 649 pares de base.

O oligonucleotídeo MJ03 (5' GTC TCA GAC GTC AAA GCT CC 3'), foi desenhado a partir de seqüências de *P. brasiliensis* (AB304414, AB304421, AB304431, AB304437, AB035710, AY374336, AB038164, AY631234, AY445662, AF416745, AF038360, AY618990, AY618999, AF092903, AF322389), e espécies relacionadas (AB071821, AB071822, AB071823, AB232890, AB232891, AB232893, ADU18364, AF038355, AF038356, AB122038, AB122039, AB122040) depositadas no GenBank. É específico para *P. brasiliensis* sendo localizado no final da região ITS1 (Figura 4). Em *P. brasiliensis* o oligonucleotídeo MJ03 quando usado com ITS1 amplifica um fragmento de 212 pares de base.

Também foram utilizados os oligonucleotídeos GAPDH sense (5' ATG GTG AAG GTC GGT GTG AAC G 3') e anti-sense (5' GTT GTC ATG GAT GAC CTT GGC C 3') (BAECHER-ALLAN; BARTH, 1993) que amplificam um fragmento de 495-pb da seqüência do gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de camundongos.

A



**B**

**ITS1**

1 GGAAGTAAAA GTCGTAACAA GGT**TCCGTA GGTGAACCTG** CGGAAGGATC ATTAACGCGC

61 CGTGGGGGGA CGGGGCCGA TCGGGTTCCC GGCCCTCTCA CCTGGCCACC CTTGTCTATT

121 CTACCTGTTG CTTCCGCGGG CCTGCAGCGA TGCTGCCGGG GGGGCTCGGC CTCCCGGGCT

181 CGTGCCCGCC GGGGACACCG TTGAACTTCT GGTTC**GGAGC TTTGACGTCT GAGAC**CTATC

**MJ03**

241 ATAATCAGTA **AAACTTTC** ACAACGGATC TCTTGGTTCC GACATCGATG AAGAACGCAG

301 CGAAATGCGA TAAGTAATGT GAATTGCAGA ATTCCGTGAA TCATCGAATC TTTGAACGCA

361 CATTGCGCCC TCTGGTATTC CGGGGGGCAT GCCTGTCCGA GCGTCATTTT AACCTCAAG

421 CGCGGCTTGC GTGTTGGGCC CGCGTCCCC CGTGGACGTG CCCGAAATGC AGCGGCGGCG

481 TCGCGTTCCG GTGCCGAGC GTATGGGGCT TCGTCACACG CTCTCAGAGG CCCGGCCGAC

541 TCCGGCCCCA CTCATCGACC CCGGCGGGG GGAAAAAGGT GTCCTCTCTC GATCGACACC

601 CTTCCCCCTT GCCGACCAAG **GTTGACCTCG GATCAGGTAG** GGATACCCGC TGAACTTAA**C**

**ITS4**

661 **CATATCAATA AGCGGAGGA**

**Figura 4** – Estrutura da região gênica do DNAr (A). Seqüência completa do 5.8S, incluindo as regiões intergênicas e seqüências parciais das regiões 18S e 28S de *P. brasiliensis* GI: 110796947 (B). Setas indicam os sítios de anelamento dos oligonucleotídeos ITS1, ITS4 e MJ03.

### 3.9 SEMI-NESTED PCR

Após a padronização da reação com a determinação da concentração ótima de  $Mg^{2+}$ , da temperatura de anelamento ótima e do número de ciclos ideal foi estabelecida a seguinte reação de semi-nested PCR. A primeira reação foi feita com volume final de 25  $\mu$ l, contendo 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil), tampão de reação 1X (20mM Tris-HCl [pH8.4], 50mM KCl) (Invitrogen, Brasil), 2mM de  $MgCl_2$ , 0,25 mM dNTPs (Amresco) e 0,2  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo (Invitrogen, Brasil). Para a segunda reação utilizou-se 1 $\mu$ l do produto da primeira reação e as mesmas condições, exceto 2  $\mu$ M de cada

oligonucleotídeo.

As reações foram feitas em termociclador (Biocycler MJ25) com o seguinte programa: denaturação inicial a 95°C/2min; seguido de 35 ciclos de denaturação a 95°C/30seg, anelamento dos oligonucleotídeos a 55°C/30seg, extensão a 72°C/1min; e extensão final a 72°C/5min.

Foi utilizado como controle negativo, água ultrapura no lugar do DNA. E como controle positivo, DNA de *P. brasiliensis* LDR1 na concentração final de 2,5 ng.

Os produtos da semi-*nested* PCR foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. A coloração por prata foi feita segundo Herring *et al.* (1982) com modificações. O gel foi colocado em solução fixadora (ácido acético 0,5% e etanol 10%) por 20 min, depois disso em solução de prata 0,15% por mais 20 min, o gel foi então lavado rapidamente em água e deixado em solução reveladora (formaldeído 1% e hidróxido de sódio 1,5%) até o aparecimento das bandas.

### 3.9.1 Testes de Especificidade e Sensibilidade

A determinação da especificidade da reação foi feita com DNA (25 ng) extraído de todos os fungos descritos no item 3.4.

Para determinar o limite mínimo de detecção do teste, foram realizadas reações utilizando diluição seriada do DNA de *P. brasiliensis* LDR1 com concentrações entre 2,5 ng - 0,25 fg.

Além disso, foi avaliado o limite de detecção da reação em tecido pulmonar de camundongos (100 mg) e em 0,5g de solo experimentalmente infectados. Às amostras de tecido pulmonar e solo foram adicionados 100 µl de suspensão de 10, 10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> e 10<sup>5</sup> células de *P. brasiliensis* em PBS. Após extração de DNA, 5 µL das amostras foram utilizados na semi-*nested* PCR.

### 3.9.2 Tratamento para Eliminar Inibidores de PCR

O tratamento para eliminar inibidores da PCR foi feito segundo Moreira (1998) com modificações. Inicialmente um volume de agarose de baixo ponto de fusão 1,6% (Bio Products) foi adicionado às amostras DNA de solo obtidas no item 3.6.3. A mistura foi colocada em um molde com volume de 200  $\mu$ L estéril. Os blocos de agarose foram então dialisados contra 15 mL de tampão TE (10mM de Tris-HCL e 1 mM de EDTA) por 24h, esse procedimento foi repetido 2 vezes. As reações de semi-*nested* PCR foram feitas com 5  $\mu$ L obtidos dos blocos de agarose aquecidos (60°C).

### 3.10 INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE CAMUNDONGOS COM *P. BRASILIENSIS*

Os camundongos foram manipulados conforme normas e autorização do Comitê de Ética em experimentação animal da Universidade Estadual de Londrina sob o nº 26/08, processo 17017/2008.

Foram utilizados dois grupos de animais. O grupo experimental (n=5) foi inoculado com  $1,5 \times 10^6$  células leveduriformes de *P. brasiliensis* Pb18 através da veia caudal; e o grupo controle (n=2) apenas com PBS. Os animais foram sacrificados aproximadamente 16h pós infecção por deslocamento cervical. O pulmão direito foi retirado sob condições estéreis e dividido para análise histológica, semi-*nested* PCR e cultura.

#### 3.10.1 Análise Histológica

Parte do pulmão foi imediatamente fixado em formalina 10% por pelo menos 24 h e conservado em álcool 70% até o momento da inclusão em paraplast (TOLOSA *et al.*, 2003). Depois de fixado o tecido foi submetido à desidratação progressiva em série crescente de álcoois (2 banhos de 30 min em álcool comercial, 4 banhos de 30 min em álcool absoluto e 1 banho em álcool/xilol (v/v) por 30 min). A

seguir procedeu-se a diafanização com xilol (4 banhos de 30 min, sendo o último em estufa a 56°C) e a adição do paraplast (4 banhos de 30 min a 56°C). Após montagem em blocos, foram realizados os cortes em micrótomo rotativo. Os cortes foram então colocados em lâminas, desparafinados e o tecido hidratado para receber a coloração por hematoxilina e eosina (HE). Análise das lâminas foi feita em microscópio de luz.

### **3.10.2 Semi-Nested PCR**

Tecidos pulmonares foram congelados a -20°C para posterior extração de DNA e semi-nested PCR. Inicialmente os tecidos pulmonares foram processados como descrito no item 3.6.1 e 5 µL do DNA obtido foi usado como molde na reação de PCR com os oligonucleotídeos GAPDH (BAECHER-ALLAN; BARTH, 1993) e na semi-nested PCR descrita no item 3.9.

### **3.10.3 Cultura**

Parte do pulmão foi removida sob condições assépticas, pesado e homogeneizado em PBS (100 µL a cada 0,02g de tecido). Plaqueado em meio ágar BHI (*Brain Heart Infusion*) suplementado com soro equino 4%, fator de crescimento 5% (filtrado de cultura de *P. brasiliensis*) (SINGER-VERMES *et al.*, 1992), e solução antibiótica 1% (estreptomicina e penicilina). Incubado a 37°C por 30 dias, as colônias foram contadas e o número de UFC/g de tecido calculado.

### **3.11 SEMI- NESTED PCR EM UMA ÚNICA ETAPA**

Para semi-nested PCR em uma única etapa as reações foram feitas com volume total de 25 µl e concentração final de 1 U de *Taq* DNA polimerase

(Invitrogen, Brasil), tampão de reação 1X (20mM Tris-HCl [pH8.4], 50mM KCl), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,3 mM de dNTPs (Amresco). Foram testadas as seguintes concentrações para os oligonucleotídeos ITS1 e MJ03 (0,4μM e 1μM) e para ITS4 (0,05μM; 0,1μM; 0,2μM). O programa de PCR utilizado inicia com denaturação a 95°C/ 2min; seguida de 30 ciclos (95°C/ 30seg, 60°C/ 30seg, 72°C/ 1min), e 35 ciclos (95°C/ 30seg, 55°C/ 30seg, 72°C/ 1min); e extensão final a 72°C/ 5min.

Os produtos da semi-*nested* PCR foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata, como descrito anteriormente.

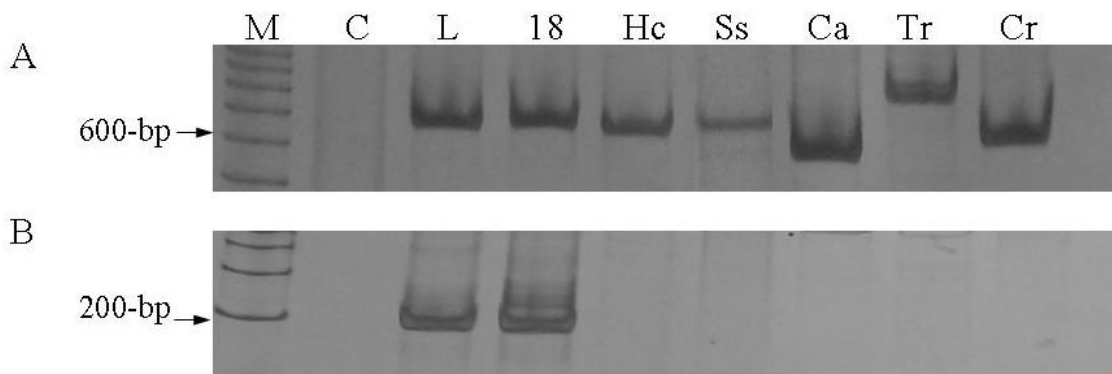
A determinação da especificidade da reação foi feita com DNA extraído de todos os fungos descritos no item 3.4. E para determinar o limite mínimo de detecção do teste, foram realizadas reações utilizando diluição seriada do DNA de *P. brasiliensis* LDR1 com concentrações entre 25 ng - 25 fg.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ESPECIFICIDADE DA REAÇÃO DE SEMI-NESTED PCR PARA *P. BRASILIENSIS*

A figura 5A mostra o resultado da primeira reação da semi-nested PCR com 0,2  $\mu$ M dos oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4, com DNA genômico (25 ng) de *P. brasiliensis* (LDR1 e Pb18), *S. schenckii*, *H. capsulatum*, *C. albicans*, *T. rubrum* e *Cryptococcus* sp. Como pode ser observado, produtos de amplificação de aproximadamente 550 a 800-pb foram obtidos com DNA dos fungos utilizados. Não houve amplificação na ausência de DNA (controle negativo).

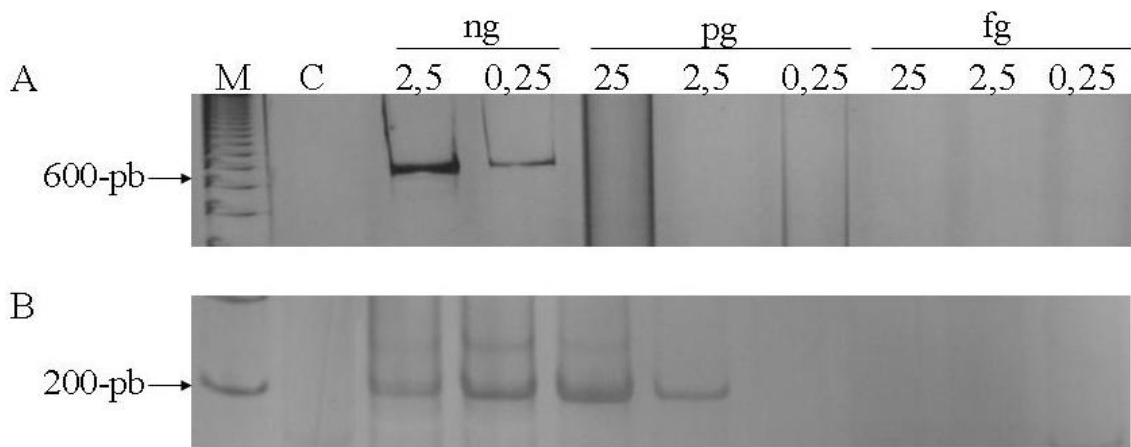
A segunda reação da semi-nested PCR foi feita com 1  $\mu$ l da primeira reação e 2  $\mu$ M dos oligonucleotídeos ITS1 e MJ03, sendo esse último específico para *P. brasiliensis*. A figura 5B mostra os resultados da segunda reação da semi-nested PCR, na qual apenas com DNA de *P. brasiliensis* foi obtido um produto de amplificação de 212-pb. Na presença de DNA dos outros fungos ou na ausência de DNA não houve amplificação.



**Figura 5** – Especificidade da semi-nested PCR em eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. Primeira reação com os oligonucleotídeos ITS1 e ITS4 (A). Segunda reação com os oligonucleotídeos ITS1 e MJ03 (B). M. Marcador molecular 100-pb; C. Controle negativo; L. *P. brasiliensis* (LDR1); 18. *P. brasiliensis* (Pb18); Hc. *H. capsulatum*; Ss. *S. schenckii*; Ca. *C. albicans*; Tr. *T. rubrum* e Cr. *Cryptococcus* sp.

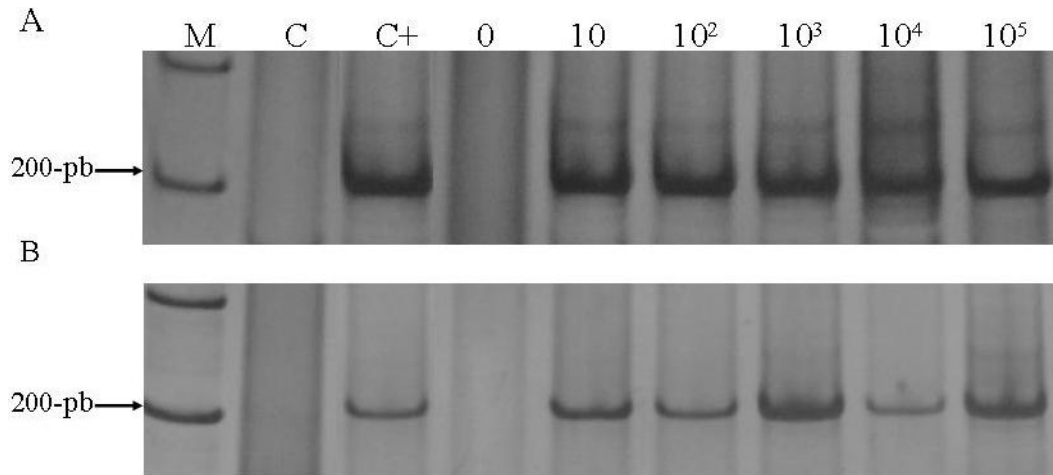
## 4.2 SENSIBILIDADE DA REAÇÃO DE SEMI-NESTED PCR PARA *P. BRASILIENSIS*

A sensibilidade da semi-nested PCR foi avaliada usando uma diluição seriada de DNA extraído de *P. brasiliensis* (LDR1) com concentrações variando de 2,5 ng a 0,25 fg. O limite de detecção da primeira reação foi de 0,25 ng enquanto o limite da segunda reação foi de 2,5 pg (Figura 6). Como esperado a sensibilidade da semi-nested PCR foi maior que na primeira reação de PCR.



**Figura 6** – Sensibilidade da semi-nested PCR para detecção do DNA de *P. brasiliensis* em eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. Primeira reação com os oligonucleotídeos ITS1 e ITS4 (A). Segunda reação com os oligonucleotídeos ITS1 e MJ03 (B). M. Marcador molecular 100-pb; C. Controle negativo.

Além disso, a sensibilidade foi avaliada pela semi-nested PCR utilizando 5  $\mu$ l das amostras de DNA extraídas de tecido pulmonar de camundongo e solo adicionados de 0 a  $10^5$  células leveduriformes de *P. brasiliensis*. O resultado foi positivo para todas as amostras em ambos os testes, sendo o limite de detecção de 10 células de *P. brasiliensis* (Figura 7).



**Figura 7** – Sensibilidade da semi-*nested* PCR testada com DNA extraído de tecido pulmonar de camundongo (A) e solo (B) com adição de diferentes quantidades de células leveduriformes de *P. brasiliensis*. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. M. Marcador molecular 100-pb; C. Controle negativo; C+. Controle positivo; amostras com 0 a 10<sup>5</sup> células de *P. brasiliensis*.

#### 4.3 INFECÇÃO EXPERIMENTAL

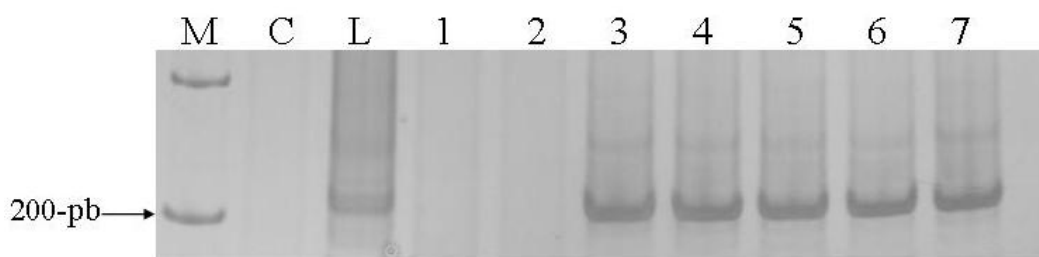
Camundongos foram experimentalmente infectados com células de *P. brasiliensis* e após 16h o pulmão direito foi retirado e utilizado para teste molecular, cultura e histologia. Os resultados obtidos mostram que o cultivo foi capaz de detectar *P. brasiliensis* em três das cinco amostras analisadas, enquanto a análise histopatológica e a análise molecular detectaram a presença do fungo em todas as amostras dos animais infectados. Como esperado, a presença do fungo não foi observada no grupo não inoculado independente da técnica utilizada (Tabela 2). O resultado negativo obtido por PCR do grupo controle não é devido à qualidade do DNA obtido, uma vez que a reação para detecção do gene GAPDH foi positiva com essas amostras amplificando um fragmento de 495-pb.

**Tabela 2** – Detecção de *P. brasiliensis* em pulmão de camundongos experimentalmente infectados.

Camundongo no.	Cultivo	Histologia (HE)	<i>P. brasiliensis</i> Semi-nested PCR	GAPDH PCR
1	-	-	-	+
2	-	-	-	+
3	+	+	+	+
4	-	+	+	+
5	-	+	+	+
6	+	+	+	+
7	+	+	+	+

+, positivo; -, negativo; 1 e 2 animais não infectados; 3 a 7 animais infectados.

Considerando a possibilidade da utilização dessa reação para estudos retrospectivos a partir de material biológico embocado e mantido em arquivos histológicos, parte do pulmão fixado em formalina e embebido em parafina foi utilizado para extração de DNA e 5 µl dessas amostras submetidas à análise por semi-nested PCR. A reação foi capaz de detectar o DNA de *P. brasiliensis* em todas as amostras (Figura 8).



**Figura 8** – Semi-nested PCR com amostras de DNA extraído de tecido pulmonar de camundongo embebido em parafina. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. M. Marcador molecular 100-pb; C. Controle negativo; L. *P. brasiliensis* (LDR1); 1 e 2 camundongos controle; 3 a 7 camundongos infectados.

#### 4.4 DETECÇÃO DE *P. BRASILIENSIS* EM AMOSTRAS CLÍNICAS

Todos pacientes apresentavam a hipótese diagnóstica de PCM. Posteriormente, dos 5 pacientes 4 foram positivos para PCM por histopatologia, enquanto um deles foi diagnosticado como portador de leishmaniose.

As idades dos pacientes com PCM variaram entre 35 e 61 sendo a média de 42 anos, todos eram do sexo masculino. As 4 amostras de lesão bucal de PCM foram positivas quando analisadas pela *semi-nested* PCR, e a amostra de lesão por leishmaniose foi negativa na reação (Tabela 3).

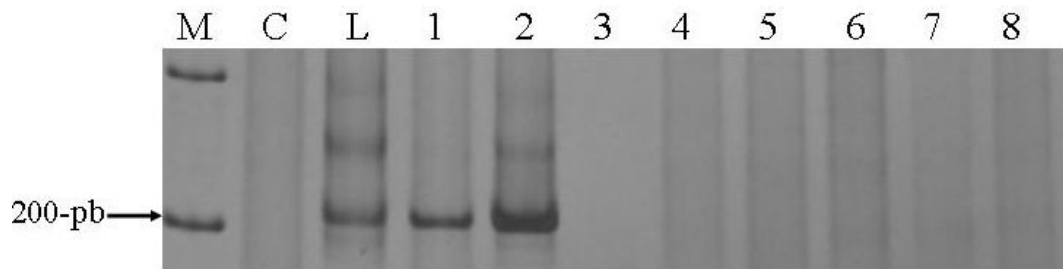
**Tabela 3** – Dados dos pacientes com hipótese diagnóstica de paracoccidioidomicose.

Pacientes	Gênero (idade em anos)	Biópsia	Histopatologia	Diagnóstico Molecular por <i>semi-nested</i> PCR
1	M (35)	Rebordo alveolar	PCM Oral	PCM
2	M (33)	Palato	Leishmaniose	-
3	M (38)	Lábio	PCM Oral	PCM
4	M (44)	Fundo de sulco	PCM Oral	PCM
5	M (61)	Rebordo alveolar	PCM Oral	PCM

M. masculino; -. negativo.

#### 4.5 DETECÇÃO DE *P. BRASILIENSIS* EM SOLO

O método de extração de DNA associado à técnica de eliminar inibidores de PCR (MOREIRA, 1998) forneceu DNA amplificável. A *semi-nested* PCR foi positiva para 2 das 11 amostras ambientais testadas, sendo uma do interior de toca de tatu, MT; e a outra de formigueiro, PR (Figura 9).



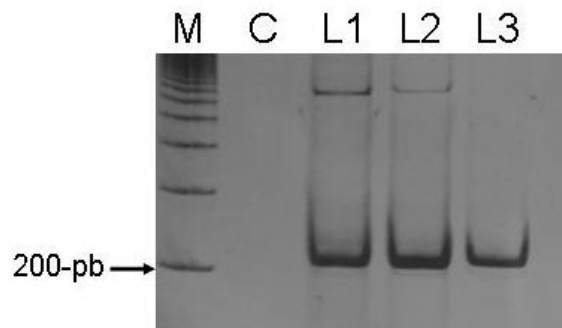
**Figura 9** – Semi-nested PCR com DNA extraído de amostras de solo. Eletroforese em gel de poli-acrilamida 8% corado com nitrato de prata. M. Marcador molecular 100-pb; C. Controle negativo; L. *P. brasiliensis* (LDR1); 1. Solo de formigueiro; 2 a 7. Solo do interior da toca de tatu; 8. Solo de cafezal.

#### 4.6 SEMI-NESTED PCR EM UMA ÚNICA ETAPA

Para otimização do ensaio foram testadas diferentes concentrações dos oligonucleotídeos. A figura 10 mostra os resultados obtidos com ITS1 e MJ03 a  $1\mu\text{M}$  e o teste com as concentrações de  $0,2\mu\text{M}$ ;  $0,1\mu\text{M}$  e  $0,05\mu\text{M}$  para o ITS4.

A reação de semi-nested PCR em uma única etapa foi positiva com DNA de *P. brasiliensis* LDR1 amplificando um fragmento de aproximadamente 212-pb. Além disso, em algumas condições (Figura 10) o fragmento de 649-pb aparece, evidenciando que também está ocorrendo amplificação com o par de oligonucleotídeos ITS1/ITS4.

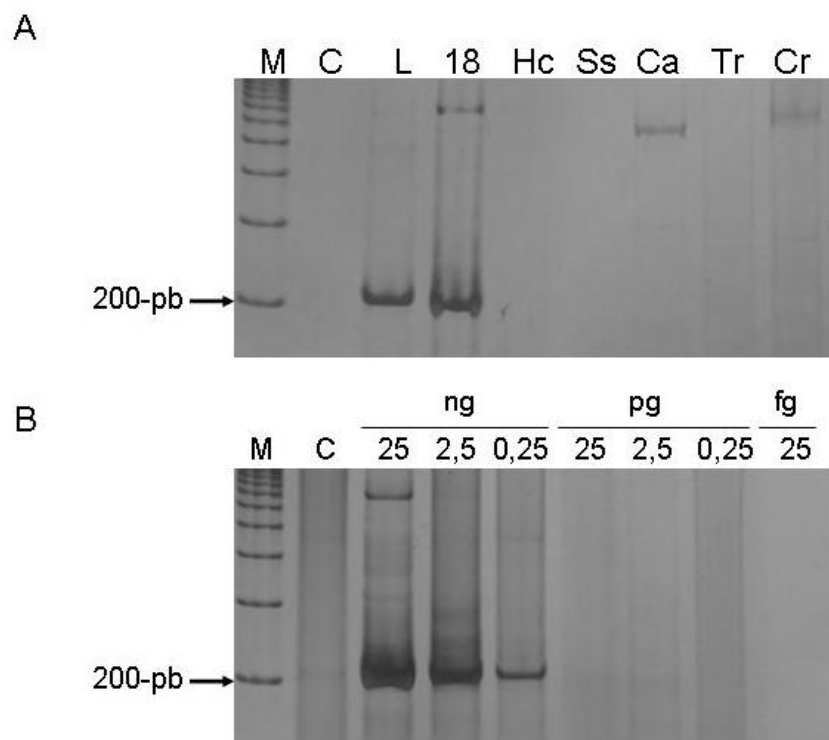
Para maior sensibilidade do teste foi escolhido  $1\mu\text{M}$  para ITS1 e MJ03 e  $0,1\mu\text{M}$  para ITS4.



**Figura 10** – Otimização da semi-nested PCR em uma única etapa, utilizando  $1\mu\text{M}$  dos oligonucleotídeos ITS1 e MJ03 e diferentes concentrações do ITS4. Eletroforese em gel de poli-acrilamida 8% corado com nitrato de prata. M. Marcador molecular 100-pb; C. Controle negativo; L. *P. brasiliensis* (LDR1); 1. ITS4  $0,2\mu\text{M}$ ; 2. ITS4  $0,1\mu\text{M}$  e 3. ITS4  $0,05\mu\text{M}$ .

Para determinar a especificidade da reação, 25 ng do DNA genômico de 2 cepas de *P. brasiliensis* e 5 outros fungos foram usados como molde para o ensaio. Apenas DNA de *P. brasiliensis* foi amplificado resultando em um fragmento de aproximadamente 212-pb. Não houve amplificação na ausência de DNA (Figura 11A). Foram observados produtos próximos a 600-pb em algumas amostras correspondendo à amplificação pelo par de oligonucleotídeos ITS1/ITS4 universal para fungos.

O limite de detecção para *P. brasiliensis* foi de 0,25 ng (Figura 11B).



**Figura 11** – Especificidade (A) e sensibilidade (B) da semi-nested PCR em uma única etapa. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. M. Marcador molecular 100-pb; C. Controle negativo; L. *P. brasiliensis* (LDR1); 18. *P. brasiliensis* (Pb 18); Hc. *H. capsulatum*; Ss. *S. schenckii*; Ca. *C. albicans*; Tr. *T. rubrum* e Cr, *Cryptococcus* sp.

## 5 DISCUSSÃO

Métodos moleculares para detecção e caracterização de microrganismos têm revolucionado o diagnóstico microbiológico, evitando os problemas de baixa sensibilidade e atraso associados aos métodos convencionais. A técnica de PCR tem grande importância nesse aspecto (SPEERS, 2006). No caso da PCM a PCR pode resultar em um diagnóstico mais rápido e sensível e trabalhos recentes descrevem protocolos para este fim (BIALEK *et al.*, 2000b; MENESES-GARCIA *et al.*, 2002; SAN-BLAS *et al.*, 2005; CHARBEL; LEVI; MARTINS, 2006).

Algumas vezes a quantidade de DNA nas amostras é escassa, assim a extração de DNA é uma etapa crítica para a eficiência do diagnóstico por métodos moleculares. Neste trabalho, optamos pela maceração das células fúngicas em nitrogênio líquido para liberação do DNA. Este método é um dos mais eficientes para extração de DNA de fungos como mostrado em um estudo com 16 espécies de fungos de relevância médica submetidos a métodos físicos, químicos e enzimáticos para ruptura da parede celular (KARAKOUSIS *et al.*, 2006).

As seqüências dos genes *gp43* e do DNAr são os alvos mais utilizados para detecção molecular de *P. brasiliensis*. O genoma de *P. brasiliensis* contém pelo menos duas cópias do gene *gp43* (CANO *et al.*, 1998), enquanto as seqüências para o DNAr são encontradas em grande número de cópias auxiliando a detecção e sensibilidade da reação de PCR (ATKINS; CLARK, 2004).

Neste trabalho é descrita uma reação de semi-*nested* PCR para amplificar o segmento do DNAr contendo a região ITS1-5.8S-ITS2. As reações de *nested* e semi-*nested* PCR são consideradas até 1000 vezes mais sensíveis que uma PCR convencional (MCPHERSON; QUIRKE; TAYLOR, 1994). Para melhorar ainda mais a sensibilidade da reação, os produtos da semi-*nested* PCR foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata que é mais sensível que a detecção em agarose corado com brometo de etídio (MITCHELL *et al.*, 1996).

A primeira reação da semi-*nested* PCR foi realizada com os oligonucleotídeos ITS1 e ITS4 e a segunda reação com ITS1 e MJ03. Os oligonucleotídeos ITS1 e ITS4 são considerados universais para espécies fúngicas, pois anelam a seqüências em regiões conservadas entre esses microrganismos. Já

o oligonucleotídeo MJ03 anela em um segmento variável entre estas espécies, sendo específico para *P. brasiliensis*. Recentemente, as regiões ITS1 e 5.8S foram usadas para o desenho dos oligonucleotídeos PbitSE e PbitSR específicos para *P. brasiliensis* em uma *nested* PCR (THEODORO *et al*, 2005). PbitSE está localizado na mesma região ITS1 que o oligonucleotídeo MJ03, mas na direção inversa.

Os resultados mostram que a *semi-nested* PCR é específica para *P. brasiliensis*. Como esperado, na primeira reação foram gerados fragmentos de diferentes tamanhos a partir de DNA de todos os fungos testados, o que é explicado pela variação de tamanho da região intergênica de um organismo para outro. A segunda reação amplificou um fragmento de 212-pb com DNA de *P. brasiliensis*, mas não com DNA de *H. capsulatum*, *S. schenckii*, *C. albicans*, *T. rubrum* e *Cryptococcus* sp., comprovando a especificidade da reação. Um estudo prévio usando a região ITS1-5.8S-ITS2 como alvo, mostrou reação cruzada entre *P. brasiliensis* e *H. capsulatum* (MOTOYAMA *et al*, 2000).

Em relação à sensibilidade, a reação de *semi-nested* PCR foi capaz de detectar 2,5 pg do DNA de *P. brasiliensis*, sensibilidade maior que alguns relatos anteriores (GOLDANI; SUGAR, 1998, SAN-BLAS *et al.*, 2005) e menor que uma *nested* PCR para *S. schenckii* com limite de detecção de 40 fg (HU *et al.*, 2003). O bom limite de detecção do teste provavelmente é resultado da associação entre a *semi-nested* PCR com a detecção dos produtos amplificados pela metodologia de eletroforese em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata (HERRING *et al.*, 1982).

Para mostrar o potencial de aplicação da *semi-nested* PCR na detecção molecular do *P. brasiliensis* em amostras clínicas, inicialmente, concentrações crescentes de células leveduriformes de *P. brasiliensis* foram adicionadas a amostras de pulmão de camundongo. Após a extração de DNA, as amostras foram submetidas à *semi-nested* PCR, sendo observado o limite de detecção de 10 células/100mg de tecido. Resultados semelhantes foram observados em uma *semi-nested* PCR para a detecção de *H. capsulatum* (BRACCA *et al.*, 2003) e para detecção de *P. brasiliensis* por PCR em amostras de escarros adicionados de células do fungo (GOMES *et al.*, 2000, SAN-BLAS *et al.*, 2005). Esse resultado mostrou a possibilidade da aplicação dessa técnica para a detecção de *P. brasiliensis* em amostras de tecidos.

Após essa etapa, foi realizada a infecção experimental de

camundongos com *P. brasiliensis* para fazer o teste comparativo entre cultura, análise histopatológica e semi-nested PCR. A análise histopatológica e a semi-nested PCR detectaram *P. brasiliensis* em todas as amostras de camundongos infectados, enquanto que a cultura teve uma positividade de apenas 60%. Apesar do pequeno número de amostras, o resultado obtido está de acordo com outros trabalhos que mostram a baixa sensibilidade da cultura. Além disso, os resultados da cultura levaram cerca de 20 dias, enquanto que pela semi-nested PCR apenas dois dias e a análise histopatológica em média 4 dias. A análise histopatológica, por sua vez, é um método de fácil execução e que possibilita o estabelecimento de procedimentos laboratoriais de rotina. Contudo, apresenta algumas limitações, como por exemplo a presença de formas atípicas do fungo e ausência do fungo no campo (corte) analisado (LACAZ, 1994).

Considerando que o arquivo mais comum de amostras humanas é o tecido fixado em formalina e embebido em parafina, alguns trabalhos propõem a utilização de métodos moleculares para análise retrospectiva deste arquivo que pode identificar falhas no diagnóstico histopatológico da PCM (SANO *et al.*, 2001; RICCI *et al.*, 2007; SILVA, 2008). Por isso, testamos a reação de semi-nested PCR para a detecção de *P. brasiliensis* nas mesmas amostras utilizadas nas análises histopatológicas, obtendo resultado positivo em todas as amostras de camundongos infectados e negativo nas mostras dos camundongos controle.

Silva (2008) realizou um estudo retrospectivo por método molecular, utilizando 29 amostras de lesão bucal de PCM embebidas em parafina confirmadas por histopatologia e obteve resultado positivo para *P. brasiliensis* em 24 amostras. Baseado no polimorfismo do gene *gp43*, Ricci *et al.* (2008) realizaram a genotipagem do *P. brasiliensis* a partir de 10 amostras de tecidos embebidos em parafina; conseguindo distinguir entre as três espécies filogenéticas proposta para este fungo: S1, PS2 e PS3 (MATUTE *et al.*, 2006), sendo que 3 sequências foram idênticas a isolados do grupo S1, e 2 foram idênticas a isolados do grupo PS2, este método poderia ajudar nos estudos epidemiológicos de PCM e até mesmo identificar o local de origem deste fungo.

Para testar a aplicação clínica da semi-nested desenvolvida nesse trabalho, realizamos a reação em amostras de pacientes com suspeita de PCM. O teste em amostras clínicas foi realizado em biópsias de lesão bucal, coletadas de pacientes com suspeita de PCM no Centro Odontológico da Universidade Estadual

de Londrina, onde foram registrados 70 casos de PCM entre os anos de 1991 a 2006 (SILVA, 2008). A *semi-nested* PCR foi capaz de detectar DNA de *P. brasiliensis* nas 4 amostras confirmadas como PCM por histologia. Além disso, a única amostra negativa na reação de *semi-nested* PCR foi originada de um paciente que posteriormente foi diagnosticado com leishmaniose. Apesar do pequeno número de amostras os resultados mostram a alta sensibilidade e especificidade da reação.

Além de poder auxiliar no diagnóstico de doenças, os métodos moleculares vêm sendo importantes para estudos de aspectos filogenéticos e ecológicos do *P. brasiliensis* e outros microrganismos (SILVA-VERGARA *et al.*, 2000; THEODORO *et al.*, 2005; BAGAGLI, *et al.*, 2008). Reid e Shafer (1999) desenvolveram uma reação de *nested* PCR com base nas seqüências do DNA para detectar pequenas quantidades de esporos de *H. capsulatum*, como método alternativo aos convencionais de isolamento direto e indireto.

A principal vantagem é que os resultados a partir de PCR podem ser finalizados em menos de 2 dias enquanto que a cultura (isolamento direto) demora de 20 a 30 dias, e a inoculação em animais (isolamento indireto) além de mais cara, demora de 6 a 8 semanas (REID, SHAFER, 1999). Além disso, é um método pouco sensível para triagem de campo, onde o fungo deve estar em baixa concentração (THEODORO *et al.*, 2005).

Nesse trabalho, utilizamos a reação de *semi-nested* PCR para *P. brasiliensis* para a detecção do fungo em amostras de solo de duas regiões diferentes. Foram utilizadas amostras de solo de uma plantação de café de uma área de capoeira, inclusive do interior da toca de tatus, coletadas no município de Nova Bandeirantes, estado do Mato Grosso, com clima predominante tropical, caracterizado por temperaturas elevadas e de grande umidade.

Foram utilizadas também amostras de solo coletadas de formigueiros no campus da Universidade Estadual de Londrina, na cidade de Londrina, Paraná, com clima subtropical úmido. Os formigueiros assim como as tocas de outros animais podem constituir um ambiente sem grandes alterações de temperatura e umidade que poderia favorecer o crescimento do fungo, além disso, existe a hipótese de associação do *P. brasiliensis* com artrópodes (CONTI-DÍAZ; RILLA, 1989).

Para a reação de *semi-nested* a partir de amostras de solo, foi escolhido o método de extração de DNA baseado na maceração em nitrogênio

líquido com os abrasivos naturais do solo, associado com reagentes que auxiliam a diminuir perdas devido à adsorção e degradação (VOLOSSIOUK; ROBB; NAZAR, 1995) e que resultou na obtenção de DNA amplificável por PCR.

De todas as amostras de solo analisadas neste trabalho apenas duas foram positivas. Uma amostra era proveniente do interior da toca de tatu e outra de formigueiro.

A detecção de *P. brasiliensis* em tocas de tatu foi descrita por outros autores (THEODORO *et al.*, 2005). Em um estudo ecológico sobre o *P. brasiliensis* a detecção molecular por semi-nested PCR foi positiva apenas em amostras coletadas do interior de tocas de tatu (TERÇARIOLI *et al.*, 2007). A detecção do DNA de *P. brasiliensis* em tocas de tatu mostra o possível envolvimento deste animal com o fungo como sugerido por diversos trabalhos (BAGAGLI *et al.*, 1998; VERGARA; MARTINEZ, 1999; SILVA-VERGARA *et al.*, 2000, BAGAGLI *et al.*, 2006).

O resultado positivo em formigueiro aponta para o possível envolvimento das formigas com *P. brasiliensis*. Conti-Díaz (2007) sugere a participação de anfíbios, moluscos, peixes e artrópodes na ecologia do *P. brasiliensis*, sendo que estes forneceriam nutrientes e umidade para a sobrevivência do fungo.

Por utilizar duas reações consecutivas, uma desvantagem da semi-nested PCR é a possibilidade de contaminação devido à manipulação dos fragmentos amplificados entre uma reação e outra. Com a finalidade de manter a sensibilidade do teste e prevenir a contaminação, foi avaliada uma técnica que utiliza os três oligonucleotídeos ITS1, ITS4 e MJ03 em uma única reação (semi-nested PCR em um tubo) como descrito por Prariyachatigul *et al.*, (2003) para a detecção de *P. marneffe*.

Nas condições testadas neste estudo, a semi-nested PCR em uma única etapa amplificou produtos de aproximadamente 649-pb e 212-pb para *P. brasiliensis*, não houve amplificação do produto de 212-pb para *H. capsulatum*, *S. schenckii*, *C. albicans*, *T. rubrum* e *Cryptococcus* sp. Um fragmento com cerca de 600-pb foi observado em dois outros fungos, correspondendo à amplificação pelos oligonucleotídeos universais para fungos ITS1/ITS4.

O limite de detecção foi de 0,25 ng de DNA de *P. brasiliensis*, 100 vezes menor que a reação em dois tubos descrita anteriormente. Isso pode ser explicado pela limitação de dNTPs e *Taq* DNA polimerase em uma reação longa (65

ciclos). Atualmente testes estão sendo realizados para melhorar a eficiência da *semi-nested* PCR em uma única etapa.

Uma desvantagem potencial para o ensaio relatado aqui é a presença de inibidores específicos da PCR nas amostras (BIALEK *et al.*, 2000b). Entretanto, existem métodos para evitar este problema, como por exemplo a diálise de blocos de agarose contendo a amostra contra grandes volumes de tampão, o DNA fica preso à malha de agarose e os contaminantes não, resultando em DNA genômico limpo e de alta qualidade (MOREIRA, 1998). A amplificação de DNA proveniente de amostras de solo foi melhorada após a utilização desta técnica.

A técnica de *semi-nested* PCR descrita neste estudo é altamente específica, sensível, rápida e poderá ser útil na detecção da presença de DNA de *P. brasiliensis* em cultura, solo, e em tecido fresco ou embebido em parafina.

## CONCLUSÕES

- Foi desenvolvida uma reação de semi-*nested* PCR específica para *P. brasiliensis* que amplifica um fragmento de 212-pb. Não houve reação cruzada com *S. schenckii*, *H. capsulatum*, *C. albicans*, *T. rubrum* e *Cryptococcus sp.*
- O limite de detecção foi de 2,5 pg de DNA de *P. brasiliensis* ou de 10 células leveduriformes do fungo quando adicionadas a tecido ou solo.
- Na infecção experimental e comparação entre a semi-*nested* PCR, histopatologia e cultura celular, a semi-*nested* PCR foi capaz de detectar o DNA de *P. brasiliensis*, assim como o fungo foi evidenciado pela histopatologia, em todos os animais infectados. A cultura foi positiva em 60% das amostras de pulmão plaqueado.
- A reação descrita foi capaz de amplificar DNA de *P. brasiliensis* em amostras de tecido emblocado em parafina, amostras clínicas de biópsia bucal e solo.
- A semi-*nested* PCR em uma única etapa foi específica para *P. brasiliensis* e teve limite de detecção de 0,25 ng.

### Perspectivas:

- Teste de detecção de *P. brasiliensis* pela semi-*nested* PCR em amostras de escarro de pacientes com PCM, método não invasivo diferente da biópsia.
- Análise de material humano embebido em parafina pela semi-*nested* PCR, casos com hipótese de PCM e diagnóstico inconclusivo pela histopatologia; assim como casos confirmados de PCM para checar para possíveis erros.
- Triagem de solo, para a detecção de *P. brasiliensis* pela semi-*nested* PCR, especialmente em formigueiros.
- Sequenciamento das amostras positivas para *P. brasiliensis* e divisão entre as três espécies filogenéticas para este fungo: S1, PS2 e pS3.
- Otimização e aplicação da semi-*nested* PCR em uma única etapa.

## REFERÊNCIAS

AJELLO, L.; POLONELLI, L. Imported paracoccidioidomycosis: a public health problem in non-endemic areas. **European Journal of Epidemiology**, v.1, n. 3, p.160-165, 1985.

ALBORNOZ, M.B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**, v.9, n.3, p.248-253, 1971.

ALBUQUERQUE, C.F.; MARQUES DA SILVA, S.H.; CAMARGO, Z.P. Improvement of the specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.4, p. 1944-1946, 2005.

ALMEIDA, O.P.; JACKS, J.Jr.; SCULLY, C. Paracoccidioidomycosis of the mouth: an emerging deep mycosis. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.14, n.5, p.377-383, 2003.

ARISTIZABAL, B.H. *et al.* Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. **Infection and Immunity**, v.66, n.11, p.5587-5591, 1998.

ARRAES, F.B.M. *et al.* General metabolism of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Genetics and Molecular Research**, v.4, n.2, p.290-308, 2005.

ATKINS, S.D.; CLARK, I.M. Fungal molecular diagnostics: a mini review. **Journal of Applied Genetics**, v.45, n.1, p.3-15, 2004.

BAECHER-ALLAN, C.M.; BARTH, R.K. PCR analysis of cytokine induction profiles associated with mouse strain variation in susceptibility to pulmonary fibrosis. **Regional Immunology**, v.5, n3-4, p. 207-217, 1993.

BAGAGLI, E. *et al.* Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.58, n.4, p.505-512, 1998.

BAGAGLI, E. *et al.* Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. **Infection, Genetics and Evolution**, v.6, n.5, p.344-351, 2006.

BAGAGLI, E. *et al.* *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia**, v.165, n.4-5, p.197-207, 2008.

BIALEK, R. *et al.* Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a nested PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.8, p.2940-2942, 2000a.

BIALEK, R. *et al.* Small subunit ribosomal DNA sequence shows *Paracoccidioides brasiliensis* closely related to *Blastomyces dermatitidis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.9, p.3190-3193, 2000b.

BIALEK, R. *et al.* Nested PCR assays for detection of *Blastomyces dermatitidis* DNA in paraffin-embedded canine tissue. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.1, p.205-208, 2003.

BICALHO, R.N. *et al.* Oral paracoccidioidomycosis: a retrospective study of 62 Brazilian patients. **Oral Diseases**, v.7, p.56-60, 2001.

BITTENCOURT, J.I.M.; OLIVEIRA, R.M.; COUTINHO, Z.F. Paracoccidioidomycosis mortality in the State of Paraná, Brazil, 1980/1998. **Cadernos de Saúde Pública**, v.21, n.6, p.1856-1864, 2005.

BLOTTA, M.H.S.L. *et al.* Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.61, n.3, p. 390-394, 1999.

BORGES-WALMSLEY, M.I. *et al.* The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends in Microbiology**, v.10, n.2, p.80-87, 2002.

BORNEMAN, J.; HARTIN, R.J. PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.10, p.4356-4360, 2000.

BRACCA, A. *et al.* Molecular detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in human clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.4, p.1753-1755, 2003.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clinical Microbiology Reviews**, v.6, n.2, p.89-117, 1993.

CANO, M.I. *et al.* Electrophoretic karyotypes and genome sizing of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.3, p.742-747, 1998.

CHARBEL, C.E.; LEVI, J.E.; MARTINS, J.E. Evaluation of polymerase chain reaction for the detection of *Paracoccidioides brasiliensis* DNA on serum samples from patients with paracoccidioidomycosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, n.2, p.219-221, 2006.

CONTI DÍAZ, I.A. On the unknown ecological niche of *Paracoccidioides brasiliensis*: our hypothesis of 1989: present status and perspectives. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.49, n.2, p.131-134, 2007.

CONTI-DÍAZ, I.A, RILLA, F.D. Hipótesis sobre el nicho ecológico de *Paracoccidioides brasiliensis*. **Revista Médica del Uruguay**, v.5, p. 97-103, 1989.

COUTINHO, Z.F. *et al.* Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cadernos de Saúde Pública**, v.18, n.5, p.1441-1454, 2002.

De MARCO, D. *et al.* Development and validation of a molecular method for the diagnosis of medically important fungal infections. **The New Microbiológica**, v.30, n.3, p.308-312, 2007.

DIEZ, S. *et al.* PCR with *Paracoccidioides brasiliensis* specific primers: potential use in ecological studies. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.41, n.6, p.351-358, 1999.

DOBROWOLSKA, A.; BOJARSKI, L.; STACZEK, P. Molecular methods and techniques used in diagnosis and epidemiology of infections caused by pathogenic fungi. **Wiadomości parazytologiczne**, v.48, n.3, p.241-255, 2002.

ENDO, S. *et al.* Detection of gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis* by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. **FEMS Microbiology Letters**, v.234, n.1, p.93-97, 2004.

FERREIRA, M.S. *et al.* Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from a dogfood probably contaminated with soil in Uberlândia, Brazil. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.28, n.3, p.253-256, 1990.

FIGUEROA, M.E.; RASHEED, S. Molecular pathology and diagnosis of infectious diseases. **American Journal of Clinical Pathology**, v.95, n.4, p.8-21, 1991.

FRANCO, M. *et al.* A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. **Medical Mycology**, v.38, n.3, p.185-191, 2000.

GEZUELE, E. Aislamiento de *Paracoccidioides* sp de heces de pinguino de la Antártida. In: Encuentro Internacional Sobre Paracoccidioidomycosis, n.4, 1989, Caracas. **Anais**. p. B-2.

GODOY, H.; REICHART, P.A. Oral manifestations of paracoccidioidomycosis. Report of 21 cases from Argentina. **Mycoses**, v.46, p.412-417, 2003.

GOLDANI, L.Z.; SUGAR, A.M. Short report: Use of the polymerase chain reaction to detect *Paracoccidioides brasiliensis* in murine paracoccidioidomycosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.58, n.2, p.152-153, 1998.

GOMES, G.M. *et al.* PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.9, p.3478-3480, 2000.

GUEDES, H.L.M. *et al.* PCR Assay for identification of *Histoplasma capsulatum* based on the nucleotide sequence of the M antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.2, p. 535-539, 2003.

HAQUE, K. A. *et al.* Performance of high-throughput DNA quantification methods. **BMC Biotechnology**, v. 20, n. 6, 2003.

HAYNES, K.A. *et al.* Rapid detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain reaction amplification of large subunit ribosomal DNA. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.33, p.319-325, 1995.

HERRING, A.J. *et al.* Rapid Diagnosis of Rotavirus Infection by Direct Detection of Viral Nucleic Acid in Silver-Stained Polyacrylamide Gels. **Journal of Clinical Microbiology**, v.16, n.3, p.473-477, 1982.

HU, S. *et al.* Detection of *Sporothrix schenckii* in clinical samples by a nested PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.4, p.1414-1418, 2003.

IMAI, T. *et al.* A new PCR primer for the identification of *Paracoccidioides brasiliensis* based on rRNA sequences coding the internal transcribed spacers (ITS) and 5.8S regions. **Medical Mycology**, v.38, n.4, p.323-326, 2000.

ITANO, E.N. *et al.* Detection of the gp43 gene and (1-3)-beta-D-glucan of *Paracoccidioides brasiliensis* in the blood of experimentally infected mice. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v.43, n.1, p.29-35, 2002.

KARAKOUSIS, A. *et al.* An assessment of the efficiency of fungal DNA extraction methods for maximizing the detection of medically important fungi using PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v.65, p.38-48, 2006.

LACAZ, C.S. Mycological diagnosis. *In*: FRANCO, M. *et al.* **Paracoccidioidomycosis**. CRC Press, 1994. p.339-344.

LI, R.Y. *et al.* Application of molecular biology techniques in the identification of pathogenic fungi and the diagnosis of fungal infection. *Beijing Da Xue Xue Bao*, v.36, n.5, p.536-539, 2004.

LINDSLEY, M.D. *et al.* Rapid identification of dimorphic and yeast-like fungal pathogens using specific DNA probes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.10, p.3505-3511, 2001.

LORTHOLARY, O. *et al.* Endemic mycoses: a treatment update. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.43, n.3, p.321-331, 1999.

MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycose. *In*: SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.204-221.

MATUTE, D.R. *et al.* Microsatellite analysis of three phylogenetic species of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.6, p.2153-2157, 2006.

MAYAYO, E. *et al.* Report of an imported cutaneous disseminated case of paracoccidioidomycosis. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.24, n.1, p.44-46, 2007.

MAYR, A. *et al.* Chronic paracoccidioidomycosis in a female patient in Austria. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.23, n.12, p.916-919, 2004.

McEWEN, J.G. *et al.* In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Archives of Medical Research**, v.26, n.3, p.305-306, 1995.

McPHERSON, M.J.; QUIRKE, P.; TAYLOR, G.R. **PCR a Pratical Approach**. New York: Oxford University, 1994.

MENESES-GARCIA, A. *et al.* Paracoccidioidomycosis: report of 2 cases mimicking squamous cell carcinoma. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v.94, n.5, p.609-613, 2002.

MITCHELL, L.G. *et al.* Use of silver staining to detect nucleic acids. **Methods in Molecular Biology**, v.58, p.97-103, 1996.

MOREIRA, D. Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. **Nucleic Acids Research**, v.26, n.13, p.3309-3310, 1998.

MOTOYAMA, A.B. *et al.* Molecular identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by PCR amplification of ribosomal DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.8, p.3106-3109, 2000.

NEGRONI, P. The *Paracoccidioides brasiliensis* lives saprophytically in the soil of Argentina. **Prensa Médica Argentina**, v.53, n.39, p.2381-2382, 1966.

ONO, M.A. *et al.* Inhibition of *Paracoccidioides brasiliensis* by pesticides: is this a partial explanation for the difficulty in isolating this fungus from the soil? **Medical Mycology**, v.40, n.5, p.493-499, 2002.

PANIAGO, A.M.M. *et al.* Paracoccidioidomycosis: a clinical and epidemiological study of 422 cases observed in Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v 36, n.4, p.455-459, 2003.

PRARIYACHATIGUL, C. *et al.* Development and evaluation of a one-tube seminested PCR assay for the detection and identification of *Penicillium marneffe*. **Mycoses**, v.46, n.11-12, p.447-454, 2003.

REID, T.M., SCHAFER, M.P. Direct detection of *Histoplasma capsulatum* in soil suspensions by two-stage PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v.13, n.4, p.269-273, 1999.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Sabouraudia**, v.23, n.5, p.323-334, 1985.

RESTREPO, A. *et al.* The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Medical Mycology**, v.39, n.3, p.233-241, 2001.

RICCI, G. *et al.* Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* by PCR in biopsies from patients with paracoccidioidomycosis: correlation with the histopathological pattern. **Pathologica**, v.99, n.2, p.41-45, 2007.

RICCI *et al.* Genotyping of *Paracoccidioides brasiliensis* directly from paraffin embedded tissue. **Medical Mycology**, v.46, n.1, p.31-34, 2008.

RICHINI-PEREIRA, V.B. *et al.* Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. **Medical Mycology**, v.46, n.1, p.35-40, 2008.

SAN-BLAS, G. *et al.* *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Medical Mycology**, v. 40, p. 225-242, 2002.

SAN-BLAS, G. *et al.* Primers for clinical detection of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.8, p. 4255-4257, 2005.

SAN-BLAS, G; NIÑO-VEGA, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. **Mycopathologia**, v.165, n.4-5, p.183-95, 2008.

SANDHU, G.S. *et al.* Molecular detection and identification of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n.7, p.1894-1896, 1997.

SANO, A. *et al.* Detection of gp43 and ITS1-5.8S-ITS2 ribosomal RNA genes of *Paracoccidioides brasiliensis* in paraffin-embedded tissue. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v.42, n.1, p.23-27, 2001.

- SEMIGHINI, C.P. *et al.* Molecular identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by 5' nuclease assay. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.44, n.4, p.383-386, 2002.
- SEVERO, L.C. *et al.* Paracoccidioidomycosis in women. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.15, p.88-89, 1998.
- SHIKANAI-YASUDA, M.A. *et al.* Guidelines in paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.3, p.297-310, 2006.
- SILVA, D.F.V.R. **Detecção molecular de *Paracoccidioides brasiliensis* por PCR em biópsias de lesão bucal de paracoccidioidomicose**. 2008. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental), Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- SILVA-VERGARA, M.L. *et al.* Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibia, State of Minas Gerais, Brazil. **Medical Mycology**, v.36, n.1, p.37-42, 1998.
- SILVA-VERGARA, M.L. *et al.* Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. **Medical Mycology**, v.38, n.3, p.193-199, 2000.
- SINGER-VERMES, L.M. *et al.* The source of the growth-promoting factor(s) affects the plating efficiency of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.30, p.261-264, 1992.
- SPEERS, D.J. Clinical applications of molecular biology for infectious diseases. **The Clinical Biochemist. Reviews**, v.27, p.39-51, 2006.
- STEFFAN, R.J. *et al.* Recovery of DNA from soils and sediments. **Applied and environmental microbiology**, v.54, n.12, p.2908-2915, 1988.
- TERÇARIOLI, G.R. *et al.* Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. **BMC Microbiology**, v.92, n.7, 2007.
- THEODORO, R.C. *et al.* Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. **Medical Mycology**, v.43, n.8, p.725-729, 2005.

TOLOSA, E.M.C.; *et al.* **Manual de técnicas para histologia normal e patológica.** São Paulo: Manole, 2003.

UNTEREINER, W.A. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. **Mycologia**, v.96, n.4, p.812–821, 2004.

VENANCIO, E.J.; VITURI, D.F.; KOISHI, A.C. Detecção Molecular do Fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. IN: WATANABE, M.A.E. *et al.* **Tópicos em Patologia Experimental**, Londrina: EDUEL, 2008. p.37-53.

VERGARA, M.L.; MARTINEZ, R. Role of the armadillo *Dasypus novemcinctus* in the epidemiology of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v.144, n.3, p.131-133, 1999.

VERLI, F.D. *et al.* Perfil clínico-epidemiológico dos pacientes portadores de paracoccidioidomicose no Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.38, n.3, p.234-237, 2005.

VIDAL, M.S.M. *et al.* Atypical serological response marked by a lack of detectable anti-gp43 antibodies in a patient with disseminated paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.6, p.3014-3016, 2005.

VISBAL, G. *et al.* *Paracoccidioides brasiliensis*, paracoccidioidomycosis, and antifungal antibiotics. **Current Drug Targets. Infectious Disorders**, v.5, n.3, p.211-226, 2005.

VOLOSSIOUK, T.; ROBB, E.J.; NAZAR, R.N. Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms. **Applied and environmental microbiology**, v.61, n.11, p.3972-3976, 1995.

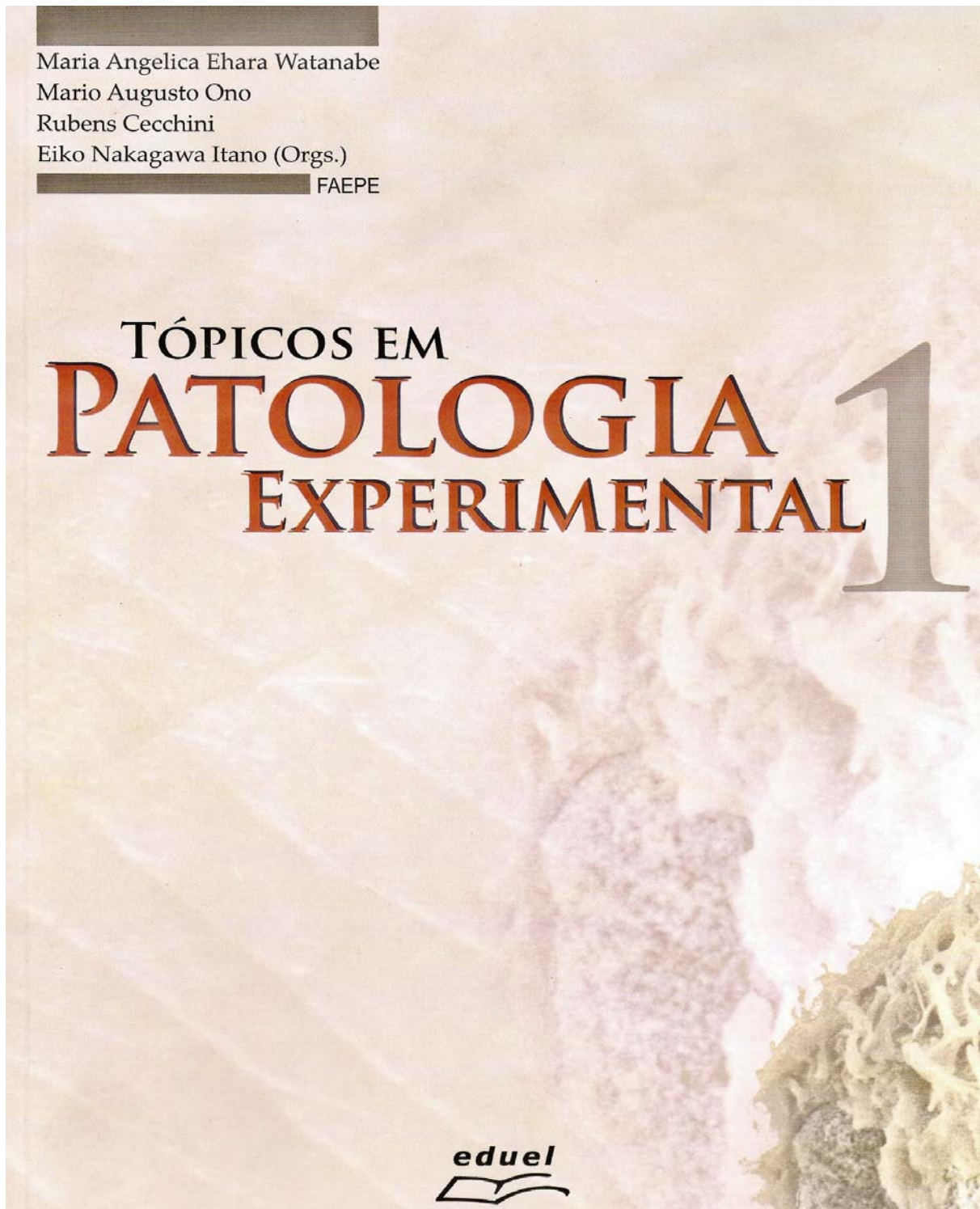
WHITE, T.J. *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*. INNIS, M. A. *et al.* **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p315-322.

ZHOU, J.; BRUNS, M.A.; TIEDJE, J.M. DNA recovery from soils of diverse composition. **Applied and environmental microbiology**, v.62, n.2, p.316-322, 1996.

**ANEXOS**

## ANEXO I –

Capítulo do livro Tópicos em Patologia Experimental 1.

Detecção Molecular do Fungo *Paracoccidioides brasiliensis*

# CAPÍTULO 3

---

*Emerson José Venancio*

*Débora Fonseca Vituri*

*Andrea Cristine Koishi*

---

## DETECÇÃO MOLECULAR DO FUNGO

### *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS*

#### INTRODUÇÃO

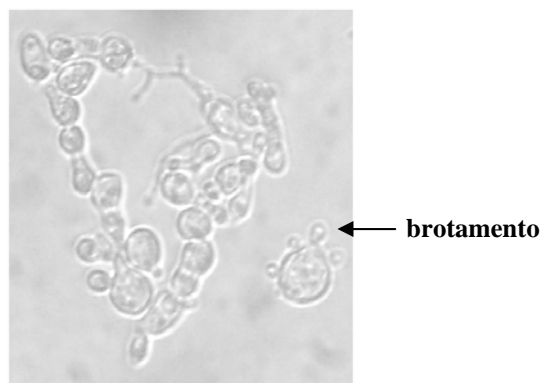
---

*Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo dimórfico que causa Paracoccidioidomicose (PCM). O fungo é classificado como pertencente ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Ordem Onygenales, Família Onygenaceae, Gênero *Paracoccidioides*, Espécie *Paracoccidioides brasiliensis*<sup>1,2</sup>.

As células de *P. brasiliensis* têm um ou mais núcleos e, em seu citoplasma, foram detectadas mitocôndrias, vacúolos, retículo endoplasmático e ribossomos. As mitocôndrias são numerosas em células jovens, principalmente na periferia da célula, e os vacúolos aumentam de tamanho com o envelhecimento celular. Por outro lado, o

complexo de Golgi e lisossomos ainda não foram observados. A parede celular apresenta duas camadas, sendo a externa elétron-densa, formada por fibrilas de  $\beta$ -1-3 glucana na forma micelial e por fibrilas de  $\alpha$ -1-3 glucana na fase de levedura<sup>2,3</sup>.

A principal característica deste fungo é a formação de novos fungos por brotamentos da parede das células-mãe (Figura 1), resultando numa forma típica de *P. brasiliensis* conhecida como roda-de-leme.



**Figura 1.** *P. brasiliensis* na forma leveduriforme, microscopia óptica (400x)

Diferentemente de outros fungos dimórficos, como *Histoplasma capsulatum* que na forma saprofítica vive em solos ricos e é encontrado em excretas de pássaros ou morcegos<sup>4</sup>, o microhabitat do fungo *P. brasiliensis* ainda permanece desconhecido. Porém, acredita-se que *P. brasiliensis* seja encontrado em áreas de solo úmido, rico em proteínas, próximas a lagos, rios e pântanos, onde as variações de temperatura são mínimas<sup>5</sup>. O fungo tem sido isolado do solo na Argentina<sup>6</sup>, na Venezuela<sup>7</sup> e no Brasil<sup>8</sup>. E, possivelmente, animais como o tatu *Dasypus novemcinctus* tenham um importante papel na ecologia deste patógeno<sup>9</sup>.

A PCM é uma micose sistêmica com uma distribuição geográfica limitada à América Latina, onde ocorre desde o México (23°N) até a Argentina (34°S). Raros

casos de PCM são relatados em outras regiões e sempre são casos referentes a pessoas que estiveram em países Latino-Americanos. A PCM é uma doença endêmica no Brasil, Colômbia, Venezuela e Argentina<sup>10</sup>. No Brasil ela ocorre freqüente nas regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste. As maiores taxas de mortalidade são registradas nos estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro<sup>11</sup>.

A maior parte dos casos de PCM ocorre em indivíduos do sexo masculino, e predominam indivíduos da faixa etária dos 40 anos, os quais exercem profissões relacionadas à agricultura<sup>12,13,14,15</sup>. A relação homem:mulher com PCM é variável, dependendo da idade. A maioria dos trabalhos aponta para uma proporção de 10:1 a 22:1<sup>16,15</sup>. Esta diferença de incidência da doença entre os sexos pode ser explicada pela ação dos hormônios femininos. Estudos mostram que o estradiol inibe a transição morfológica, alterando os perfis de síntese de proteínas de micélio e levedura<sup>17</sup>.

Há duas principais formas clínicas da PCM. A forma aguda ou juvenil, caracterizada por uma evolução rápida, com envolvimento do sistema reticuloendotelial (baço, fígado, linfonodos e medula óssea), mas as lesões pulmonares raramente estão presentes. A forma aguda corresponde por 3 a 5% dos casos da doença e atinge principalmente crianças e adolescentes de ambos os gêneros. A forma crônica apresenta uma progressão mais lenta e, geralmente, a infecção primária ocorre nos pulmões, podendo levar anos até que seja diagnosticada. A PCM crônica ocorre em aproximadamente 90% dos pacientes e predomina mais no gênero masculino<sup>2</sup>. A forma crônica pode ser unifocal, quando a micose está restrita a somente um órgão, ou pode ser multifocal, quando a doença se dissemina por via linfática ou sangüínea para outros órgãos, formando uma lesão secundária em tecidos mucosos, pele, linfonodos e glândulas adrenais, de modo que mais de um órgão é envolvido simultaneamente<sup>18</sup>.

Acredita-se que o mecanismo de defesa mais importante no hospedeiro contra *P.*

*brasiliensis* seja mediado pela resposta imune celular. Estudos experimentais mostram que a resistência em camundongos está ligada à resposta imune Th1 (*T-helper* 1), com elevada secreção de IFN- $\gamma$  e interleucina 2 (IL-2), enquanto a suscetibilidade está associada com níveis muito baixos desta<sup>17</sup>.

O tratamento da PCM é geralmente prolongado, com pacientes recebendo a terapia entre um a dois anos. Na ausência de terapia com drogas, a doença é freqüentemente fatal. Os antifúngicos mais usados são sulfametoxazol-trimetropin, o itraconazol e a anfotericina B. Casos de cepas resistentes a estes antifúngicos tem sido descritos<sup>19</sup>.

Diversos métodos para o diagnóstico de micoses são disponíveis, como o isolamento, a cultura celular, e testes sorológicos<sup>20</sup>.

O diagnóstico da PCM é baseado em vários procedimentos laboratoriais, podendo ser feito pela análise direta de amostras clínicas, e nele se utilizam diferentes procedimentos e métodos de coloração. Também são realizados exames histopatológicos com coloração pela hematoxilina e eosina, metanamina de prata, ou pelo *Periodic Acid Schiff* (PAS), e imunofluorescência indireta<sup>21</sup>. Entretanto, em cortes histológicos, o agente etiológico pode não ser encontrado ou ainda confundido com outros fungos dimórficos como *Histoplasma spp.* ou *Coccidioides immitis*.

O diagnóstico pode ser feito por cultura, contudo, o crescimento é lento (20 a 30 dias) e uma variedade de formas de colônias podem ser obtidas. Como a forma micelial não é distintiva, o dimorfismo deve ser demonstrado por subcultura a 37°C. Além disso, em áreas não endêmicas, um empecilho para o diagnóstico é a falta de experiência e a necessidade de um alto nível de biosegurança para o crescimento do fungo<sup>22</sup>.

Para os casos em que *P. brasiliensis* não é observado pelo exame direto ou pela cultura celular, diversos testes sorológicos têm sido desenvolvidos para detecção de

anticorpos contra o fungo. O teste de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) é muito utilizado para detecção e quantificação de anticorpos e possui uma alta sensibilidade, porém, reações cruzadas têm sido observadas.

O principal antígeno para o diagnóstico sorológico de *P. brasiliensis* é a glicoproteína de 43-kDa, denominada gp43, localizada na parede do fungo e secretada extracelularmente. Testes sorológicos que utilizam este antígeno têm mostrado a presença de reatividade cruzada com outras infecções fúngicas. Tentativas para melhorar a especificidade dos testes utilizando a gp43 têm sido feitas, e mesmo após o tratamento do antígeno gp43 com metaperiodato e processos de adsorção para aumentar a especificidade do exame, este foi ineficiente em eliminar toda reação cruzada e obter uma reação de ELISA totalmente específica para o diagnóstico de PCM, obtendo-se uma especificidade máxima de 84 %<sup>23</sup>. Além disso, essa reação pode ser influenciada por outros fatores, como as características individuais de cada soro, o isolado do fungo que causou a doença e a resposta imune individual contra um isolado específico que pode carregar diferentes epítomos antigênicos, e muitos dos resultados obtidos não são reprodutíveis<sup>23</sup>. Além do mais, o imunodiagnóstico pode ser de pouca utilidade para pacientes imunocomprometidos devido à reduzida produção de anticorpos.

#### **DETECÇÃO MOLECULAR DO FUNGO *P. BRASILIENSIS***

---

Para auxiliar o diagnóstico da PCM e os estudos da ecologia de *P. brasiliensis*, diversas técnicas moleculares de detecção do fungo têm sido desenvolvidas. Os métodos moleculares podem ser agrupados em duas categorias: as reações de hibridação e as reações de polimerização. Nas primeiras são usadas sondas específicas para evidenciar a presença do DNA do fungo. E nas reações de polimerização há amplificação de uma

região específica do DNA do fungo usando oligonucleotídeos iniciadores.

Nos últimos anos muitos estudos têm investigado a aplicação de metodologias moleculares para a detecção do fungo *P. brasiliensis* (Tabela 1).

Tabela 1. Relação dos oligonucleotídeos (oligos) iniciadores utilizados nos diversos trabalhos de detecção molecular.

Oligos	Seqüências	Par utilizado	Amplificação (pb)	Referências
primer 1	5' - TCGTTATCCTCATCGAA - 3'	1/2	62	Goldani (1998) <sup>24</sup>
primer 2	5' - AAGAGTCTTCCCTCGC - 3'			
ITS1a	5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3'	ITS1/ITS4	620	
ITS4 <sup>a</sup>	5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'			
gp43 -1	5' - ATGAATTTTAGTTCTCTTAACCTGGCTCTT - 3'	gp43-1/gp43-2	1303	
gp43-2	5' - CCTGCATCCACCATACTTCCCTAGCCCA - 3'			
gp2	5' - TCACCTGTCGACACCATACTTCCCTAGCCCAAATC - 3'	gp2/gpM	300	Diez (1999) <sup>31</sup>
gpM	5' - GCCATGGTTCGACAATGGGCGTGGCATAGGTTTCG - 3'			
LO	5' - CACTCTTGGCTTTGGTTGAAG - 3'	LO/UP	536	
UP	5' - CTGTTGTTTCCGTCCTTGC - 3"			
ITS5 <sup>a</sup>	5' - CCGAGTGC GGCTCTGGGTCC - 3'	ITS5/ITS4	650	Imai (2000) <sup>32</sup>
ITS4 <sup>a</sup>	*			
Pb-ITS1s	5' - CCGCCGGGACACCGTTG - 3'	Pb-ITS1s/Pb-ITS3a	418	
Pb-ITS3a	5' - AAGGGTGTGATCGAGAG - 3'			
sense	5' - TCATCTCACGTGCGATCTCACATT - 3'	sense/anti-sense	1030	Silva-Vergara (2000) <sup>38</sup>
anti-sense	5' - AGCGCCAGATGGTTTGCCCGCTAGGAACGAA - 3'			
(PC1) <sup>b</sup>	*	PC1/PC5	1030	
PC2	5' - ATAGAGGGAGAG CCATATGTACAAGGT - 3'	PC1/PC6	880	
PC3	5' - ATCAAACAAACCCTGATCGGCAT - 3'	PC2/PC5	740	Gomes (2000) <sup>33</sup>
(PC5) <sup>b</sup>	*	PC2/PC6	600	
PC6	5' - GGCTCCTCAAAGTCTGCCATGAGGAAG - 3'	PC3/PC5	490	
para I	5' - AACTAGAATATCTCACTCCCAGTCC - 3'	paraI/paraII	355	
para II	5' - TGTAGACGTTCTTGATGTCTTGGG - 3'			
para III	5' - GATCGCCATCCATACTCTCGCAATC - 3'	paraIII/paraIV	196	Bialek (2000) <sup>22</sup>
para IV	5' - GGGCAGAGAAGCATCCGAAATTGCG - 3'			
ITS1 <sup>a</sup>	*	ITS1/ITS4	649	Motoyama (2000) <sup>37</sup>
ITS4 <sup>a</sup>	*	ITS1/OL5	496	
UNI-R <sup>c</sup>	5' - GGTCCGTGTTTCAAGACG - 3'			

UNI-F <sup>c</sup>	5' - GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG - 3'	UNI-F/UNI-R	617	
OL5	5' - TGTGACGAAGCCCCATACG - 3'	OL3/UNI-R	203	
OL3	5' - CTCAGCGGGCACTT - 3'			
MAE	5' - TGCTGCGGCGGGGTTAAACCATGTC - 3'	MAE/ATO	589	
ATO	5' - GTTGTGGTATGTGTCGATGTAGACG - 3'			
F2	5' - TGGGCCAAAAACTCAAATC - 3'	F2/R2	473	
R2	5' - TGGTATGTGTCGATGTAGACGT - 3'			
ITS5 <sup>a</sup>	*	ITS5/ITS4	650	Sano (2001) <sup>39</sup>
ITS4 <sup>a</sup>	*			
Pb-ITS1s <sup>d</sup>	*	Pb-ITS1s/Pb-ITS3a	418	
Pb-ITS3a <sup>d</sup>	*			
MAE <sup>e</sup>	*	MAE/ATO	589	
ATO <sup>e</sup>	*			
F2 <sup>e</sup>	*	F2/R2	473	Itano (2002) <sup>36</sup>
R2 <sup>e</sup>	*			
F3	5' - GCCAAAAACTCAAATCTGAGGG - 3'	F3/R3	463	
R3	5' - GTCGATGTAGACGTTCTTGAT - 3'			
A	5' - TTCCCAAACggCTTCgA - 3'	A/B	61	Semighini (2002) <sup>40</sup>
B	5' - TgTCACCCTTTTgCCAgtTg - 3'			
ITS4 <sup>a</sup>	*	ITS4/ITS5	634	
ITS5 <sup>a</sup>	*			Theodoro (2005) <sup>42</sup>
PbITSE	5' - GAGCTTTGACGTCTGAGACC - 3'	PbITSE/PbITSR	387	
PbITSR	5' - AAGGGTGTGTCGATCGAGAGAG - 3'			
MG2(1)F	5' - GGGATTCCCTAGGCAAACACTTGTGTGA - 3'	MG2(1)F/ MG2(1)R	285	
MG2(1)R	5' - GTGCAGTTATCCACAAGCCATATATTC - 3'			San-Blas (2005) <sup>41</sup>
MG2(2)F	5' - GGAGATGATCTGACGTTAGTACGTGATG - 3'	MG2(2)F/ MG2(2)R	288	
MG2(2)R	5' - ATGCTAATTATGTCATTCCGCGTCTG - 3'			

<sup>a</sup> White (1990)<sup>49</sup>; <sup>b</sup> Silva-Vergara (2000)<sup>38</sup>; <sup>c</sup> Haynes (1995)<sup>50</sup>; <sup>d</sup> Imai (2000)<sup>32</sup>; <sup>e</sup> Sano (2001)<sup>39</sup>; \* sequência descrita acima.

Em fungos, os genes que codificam para os RNAs ribossomais são constantemente utilizados para o desenvolvimento de reações de detecção molecular. Os genes ribossomais estão presentes em todos os organismos e em grande número de cópias, característica que contribui para o aumento da sensibilidade da reação de PCR. O DNA ribossomal dos fungos é formado por três genes, o da subunidade maior (25S ou 28S), da subunidade menor (18S) e o gene 5.8S, separados por regiões *internal*

*transcribed spacer* (ITS). Esta região ITS é uma área de importância particular para o diagnóstico de fungos, por possuir regiões altamente conservadas e regiões altamente variáveis e torna-se ideal para o desenvolvimento de oligonucleotídeos específicos para a identificação de espécies fúngicas<sup>20</sup>. Outro gene utilizado para as reações de detecção molecular de *P. brasiliensis* é o que codifica para a proteína gp43. O gene para gp43 tem uma fase aberta de leitura de 1329 pares de bases, e ela é interrompida pela presença de um *intron* de 78 nucleotídeos. Um terceiro alvo para o desenvolvimento de reação de detecção molecular é o gene para uma proteína de 27-kDa, de função desconhecida. Ainda foram desenvolvidas reações de detecção molecular utilizando outras seqüências espécie específicas de função desconhecida<sup>24</sup>.

## **PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)**

---

A reação da polimerase em cadeia (PCR) é uma técnica para a amplificação *in vitro* de seqüências específicas de DNA, por meio da extensão simultânea de oligonucleotídeos iniciadores complementares às fitas do DNA<sup>25</sup>. O maior problema deste método é a presença de inibidores da reação nas amostras, pois eles podem levar a resultados falso negativos<sup>26</sup>.

A PCR é rápida, específica, pode ser usada para detectar quantidades muito pequenas de DNA e não exige um alto nível de perícia para a interpretação dos resultados<sup>20</sup>. Pode, assim, ser utilizada como estratégia confiável para detectar e identificar microrganismos de diferentes fontes, inclusive em tecidos, sangue, escarro e solo<sup>27</sup>.

Componentes necessários para uma reação de PCR são: DNA molde contendo a seqüência-alvo, região a ser amplificada; dois oligonucleotídeos iniciadores específicos;

deoxiribonucleosídeos trifosfatados (dNTPs), que são adicionados para formar as novas fitas de DNA (dATP, dTTP, dCTP, dGTP); a enzima DNA polimerase termo-estável, como, por exemplo, a *Taq* DNA polimerase. A reação é feita em um termociclador, aparelho onde ciclos de temperatura e tempo pré-estabelecidos são ajustados conforme a necessidade.

A PCR consiste na repetição de 3 etapas (Figura 2A):

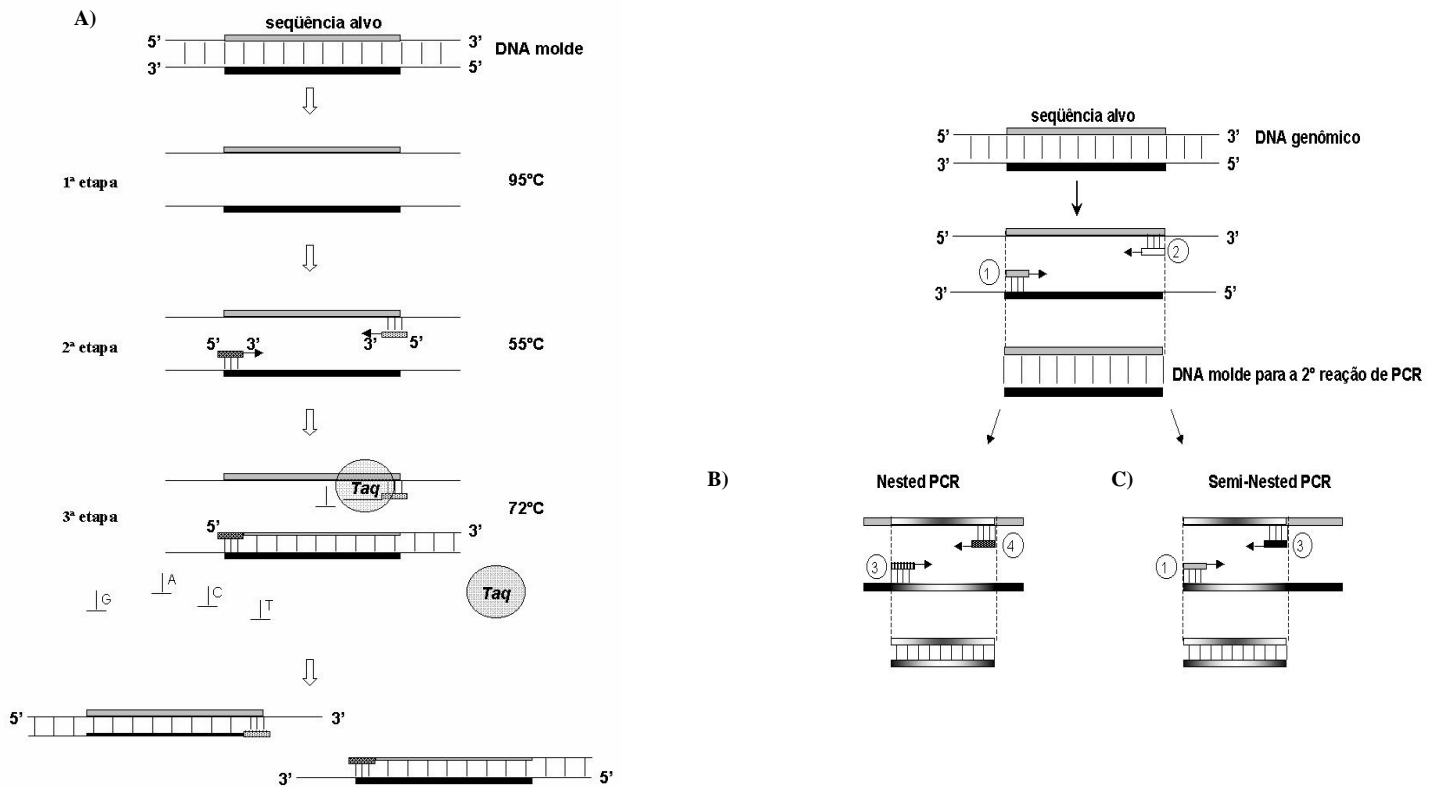
1ª etapa: separação da dupla fita de DNA. As duas fitas da molécula de DNA parental são separadas aquecendo-se a mistura a 94/95°C; 2ª etapa: hibridação dos oligonucleotídeos iniciadores. A mistura é resfriada a 50-60°C para permitir que cada oligonucleotídeo iniciador se ligue à fita de DNA complementar a sua seqüência. Cada oligonucleotídeo hibrida em uma das fitas, e o DNA parental não forma dupla fita novamente, pois os oligonucleotídeos estão presentes em grande excesso; 3ª etapa: síntese de DNA. A mistura é aquecida a 72°C, temperatura ótima para a *Taq* DNA polimerase. Essa enzima sintetiza a nova fita a partir de ambos os oligonucleotídeos.

Esses três passos são repetidos diversas vezes e os novos fragmentos sintetizados servem como DNA molde para os próximos ciclos. Após 20 ciclos a amplificação é de 1 milhão de cópias e após 30 ciclos, 1 bilhão de cópias da seqüência alvo de DNA<sup>28</sup>. O resultado de uma reação de PCR é geralmente analisado após uma eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida.

Uma variação da técnica de PCR é a *nested* PCR, que se caracteriza por um processo que utiliza duas PCRs consecutivas, das quais a primeira contém um par de oligonucleotídeos iniciadores externos, enquanto a segunda possui um par interno (Figura 2B). O fragmento maior produzido na primeira reação é utilizado como molde para a segunda, e o resultado pode ser 1000 vezes mais sensível que a PCR padrão<sup>29</sup>.

Outra variação da PCR é a reação de *semi-nested* PCR, que se assemelha à

reação de *nested* PCR. A diferença entre ambas está no par de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na segunda reação, que é composto de um oligonucleotídeo comum a primeira reação e um novo oligonucleotídeo interno (Figura 2C).



**Figura 2.** Esquema do primeiro ciclo de uma reação de PCR (A). *Nested* PCR (B). *Semi-Nested* PCR (C).

Em 1998 foi realizado o primeiro trabalho acerca de uma reação de PCR para detectar *P. brasiliensis*. Os autores utilizaram oligonucleotídeos iniciadores baseados na seqüência de DNA específica de *P. brasiliensis*, previamente identificada<sup>30</sup>. No trabalho, foi feita a comparação entre a sensibilidade da PCR e da cultura celular, e a PCR foi capaz de detectar até 10 pg de DNA do fungo em todas as amostras de soro dos camundongos infectados. Por outro lado, a cultura celular, feita a partir do soro dos mesmos animais, foi positiva em apenas 40% dos casos. Porém uma desvantagem da metodologia proposta é que o produto dessa PCR é de apenas 62 pb e necessita de uma

eletroforese em gel de agarose a 4% para uma visualização eficiente<sup>24</sup>.

Na busca pelo micro-ambiente do *P. brasiliensis*, pesquisadores padronizaram uma PCR que pode ser importante para estudos ecológicos. Os autores utilizaram três pares de oligonucleotídeos iniciadores específicos para dois genes de *P. brasiliensis*, que codificam as proteínas de 27 kDa e 43 kDa. Os oligonucleotídeos LO e UP foram usados para a detecção do gene p27 por PCR, enquanto os oligonucleotídeos gp43-1/gp43-2 e gp2 e gpM foram usados numa reação de *nested*-PCR para a detecção do gene gp43. Os resultados obtidos mostram que os oligonucleotídeos utilizados são específicos para *P. brasiliensis*, não havendo reação cruzada com outros fungos como *Histoplasma capsulatum*, *B. dermatitidis*, *S. cerevisiae*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *S. schenckii* e *Aspergillus fumigatus*. Os mesmos dados mostram que a sensibilidade da reação com os oligonucleotídeos LO/UP é de 3 pg (aproximadamente 90 células), porém, quando usado para a detecção de amostras de solo artificialmente contaminadas, o limite de detecção observado foi de 40 ng ( $1.2 \times 10^6$  células). Para a detecção do fungo em amostras do solo, foi necessária a eliminação de inibidores da PCR. Os autores ainda conseguiram usar a reação com os oligonucleotídeos LO/UP para detectar o fungo no linfonodo e no fígado de tatus (*Dasypus novemcinctus*) infectados naturalmente<sup>31</sup>.

Em outro estudo, foi analisada a região 5.8S do DNA ribossomal de *P. brasiliensis* e para isso, a região genômica contendo o gene 5.8S e os segmentos ITS1 e ITS2 foi seqüenciada. Baseado na seqüência obtida, os oligonucleotídeos Pb-ITS1s e Pb-ITS3a, que correspondem às regiões ITS1 e ITS2, respectivamente, foram desenhados. O produto da PCR com os oligonucleotídeos Pb-ITS1s e Pb-ITS3a é 418 pb, e foi detectado em todas as 29 cepas de *P. brasiliensis* estudadas. Nenhuma reatividade cruzada foi observada com *A. fumigatus*, *B. dermatitidis*, *C. albicans*, *C.*

*neoformans*, *H. capsulatum* e *Penicillium marneffei*<sup>32</sup>.

O escarro é um fluido biológico que pode ser útil no diagnóstico de *P. brasiliensis*. O primeiro estudo utilizando PCR para detecção do DNA de *P. brasiliensis* em escarro de pacientes com PCM foi descrito em 2000. Nesse estudo, foram desenhados 5 oligonucleotídeos utilizados em diferentes combinações para amplificar 5 produtos de tamanhos diferentes. Todas as combinações de oligonucleotídeos utilizadas foram positivas para *P. brasiliensis* para a detecção de até 10 células por ml de escarro. Além disso, uma *nested* PCR com os oligonucleotídeos PC1/PC5 na 1º reação e os oligonucleotídeos PC2/PC6 na 2º reação foram positivas com amostras de escarros obtidos de pacientes com PCM crônica<sup>33</sup>.

Outra reação de *nested* PCR foi relatada para a detecção do DNA de *P. brasiliensis* em extrato de pulmão homogeneizado de camundongos experimentalmente infectados, utilizando a seqüência do gene do antígeno gp43 como alvo. Na primeira reação, foram utilizados os oligonucleotídeos paraI/II e, na segunda, os oligonucleotídeos paraIII/IV. O produto de amplificação gerado na *nested* PCR foi de 196 pares de base. Dos 23 camundongos infectados, amostras de 21 produziram resultado positivo na PCR. Por outro lado, todas as amostras foram positivas na cultura. Dos dois resultados negativos, um foi devido à presença de inibidores específicos da PCR em uma amostra, enquanto na outra havia baixa contagem de CFU. O limite de detecção da reação foi de 0,5 fg, que corresponde a aproximadamente 100 cópias do gene, até 100 pg por amostra<sup>22</sup>. A mesma reação foi utilizada com sucesso para a detecção de DNA de *P. brasiliensis* no tecido de um paciente com PCM disseminada e com ausência de anticorpos anti-gp43<sup>34</sup>. E, ainda, a mesma reação de *nested* PCR foi utilizada para a detecção de *P. brasiliensis* em 33 amostras de soro de pacientes com PCM não tratados e com diferentes formas clínicas. Apenas 1 amostra das 33 amostras

testadas foi positiva na *nested* PCR<sup>35</sup>. Esse resultado estava de acordo com outro trabalho que mostra uma baixa positividade em amostras de soro de pacientes, quando analisadas por PCR<sup>36</sup>.

Na busca de uma reação de PCR para o diagnóstico e estudos ecológicos e epidemiológicos da PCM, os oligonucleotídeos iniciadores OL5 e OL3 foram construídos, baseando-se nas regiões ribossomais 5,8S e 28S, respectivamente. O oligonucleotídeo OL5 foi usado em conjunto com o oligonucleotídeo ITS1 que é universal para fungos. O produto da reação foi 496 pb para todas as amostras de *P. brasiliensis* analisadas. Porém, um produto de amplificação de 500 bp com DNA de *Histoplasma capsulatum* foi também observado. Por outro lado, a reação com o oligonucleotídeo OL3 em conjunto com o oligonucleotídeo UNIR mostrou-se positiva para todas as amostras de *P. brasiliensis* e não apresentou reatividade cruzada com DNA de humano, de *A. fumigatus*, *C. albicans*, *C. immitis*, *S. cerevisiae* e *H. capsulatum*<sup>37</sup>.

Uma outra reação de PCR foi proposta para identificação de *P. brasiliensis* isolados a partir de tatus capturados na região de Ibiá, Minas Gerais, onde foi feito um dos poucos isolamentos de *P. brasiliensis* do solo. Os autores detectaram amostra do fungo em 3 animais e fizeram a identificação da espécie por macro e micro-morfologia, termo-dimorfismo, produção de exoantígeno e por PCR com iniciadores específicos, oligonucleotídeos sense e anti-sense, para uma região do gene *gp43*. A reação de PCR foi positiva para os três *isolados testados gerando um produto de 1 kb*<sup>38</sup>.

Para a detecção de tecidos de camundongos infectados com *P. brasiliensis* fixados em parafina, duas reações de *nested* PCR foram desenvolvidas, uma utilizando oligonucleotídeos baseados no gene da *gp43* MAE/ATO na 1ª e F2/R2 na 2ª reação e outra *nested* PCR com oligonucleotídeos ITS5/ITS4 para a 1ª e Pb ITS1/Pb ITS3 na 2ª

reação, para a região ITS1- 5,8S- ITS2 do DNA ribossomal do *P. brasiliensis*. Ambas as reações foram eficientes na detecção desse fungo, em tecido fixados em blocos de parafina<sup>39</sup>.

Posteriormente, o mesmo grupo comparou a sensibilidade de um reação de *nested PCR* para a detecção do gene *gp43* e um kit comercial para a detecção da (1→3)- $\beta$ -D-glucana em sangue de camundongos experimentalmente infectados. A reação de *nested PCR* consistiu de 3 reações em seqüência com os oligonucleotídeos MAE/ATO, F2/R2<sup>39</sup> e F3/R3 respectivamente, e foi capaz de detectar o fungo em 100% em amostras de coágulo de sangue de camundongos infectados experimentalmente. Por outro lado, a reação proposta não foi eficiente na detecção de *P. brasiliensis* em amostras de plasma dos mesmos animais. E ainda detectou a presença do fungo em apenas 25% das amostras de soro de pacientes com a forma crônica da doença<sup>36</sup>.

Outro teste para detecção de *P. brasiliensis* foi chamado de ensaio 5' nuclease. Esta é uma reação de Real-time PCR baseada na atividade 5' nuclease da *Taq* DNA polimerase, que pode ser utilizada para a quebra de oligonucleotídeos contendo na sua extremidade 5' um corante fluorescente e, na sua extremidade 3', um acceptor para a fluorescência. Quando a *Taq* quebra a extremidade 5' o corante fluorescente é liberado e a fluorescência emitida<sup>40</sup>. Este método foi capaz de detectar até 10 cópias da seqüência do DNA do gene que codifica a *gp43*, mostrando ser específico para o diagnóstico da PCM.

Utilizando uma seqüência de 0.72 kb, gerada por PCR com o oligonucleotídeo OPG18, foram desenhados os pares de oligonucleotídeos MG2(1)F/ MG2(1)R e MG2(2)F/ MG2(2)R. Ambos os pares mostraram-se específicos para *P. brasiliensis* e resultaram num limite de detecção de 10 pg ou 10 células/ml. O par MG2(1)F/ MG2(1)R foi usado para investigar a presença do fungo em 7 amostras de escarro e uma

de fluido cérebro espinhal de pacientes suspeitos de estarem com PCM. A reação de detecção molecular foi capaz de identificar corretamente os casos de PCM e descartar um caso se um paciente que não estava acometido de PCM. Os testes feitos com sangue ou soro foram todos negativos<sup>41</sup>.

Em uma comparação entre a cultura celular, a inoculação em animais e a *nested* PCR para a detecção molecular de *P. brasiliensis* no solo foram desenvolvidos dois novos oligonucleotídeos (PbITSE e PbITSR) para a região ITS/5.8S. A reação de *nested* PCR consistia de uma 1ª reação com os oligonucleotídeos ITS4/ITS5 e uma 2ª reação com os oligonucleotídeos PbITSE/PbITSR. Os resultados obtidos mostraram que a reação de *nested* PCR proposta é mais eficiente que a cultura e a inoculação em animais para a detecção do fungo *P. brasiliensis*. Com a *nested* PCR foi possível detectar a presença do fungo em três das quatro amostras de solo analisadas<sup>42</sup>. Os mesmos autores também observaram que a reação de *nested* PCR com os oligonucleotídeos PbITSE/PbITSR é mais sensível do que a reação de PCR com os oligonucleotídeos específicos para o gene *p27*<sup>31</sup>. Provavelmente, esse fato é devido ao grande número de cópias da região que codifica para os RNA ribossomais no genoma de *P. brasiliensis*.

Mais recentemente, foi utilizada uma *primer-extension-preamplification* (PEP)-*nested* PCR, baseada nos oligonucleotídeos iniciadores para o gene da *gp43*<sup>22</sup>, na detecção do DNA de *P. brasiliensis* em 107 biópsias de tecidos em parafina de pacientes com PCM. A PEP-*nested*-PCR consiste na pré amplificação do DNA genômico com o uso de um oligonucleotídeo degenerado de 15 pb, seguida de uma *nested*-PCR. Acredita-se que a pré-amplificação gere pelos menos 30 cópias do DNA genômico original e com isso aumente a eficiência da PCR. Os autores compararam a eficiência da PEP-*nested*-PCR com a *nested*-PCR. Com a PEP-*nested* PCR obtiveram resultado positivo em 32 (29%) amostras das 107 amostras de tecidos em parafina, e

somente 5% das amostras foram positivas, utilizando somente a *nested*-PCR. A baixa positividade da PCR para a detecção de *P. brasiliensis* de biópsias em parafina, provavelmente, se deve a alguns fatores como: diferentes métodos de fixação, emblocamento e estocagem do material (podem degradar o DNA das amostras), e o uso dos oligonucleotídeos para o gene *gp43*<sup>43</sup>.

E ainda, a presença do fungo *P. brasiliensis* foi investigada por uma reação de *nested* PCR em amostras de tecidos de 19 animais atropelados em estradas; dentre eles: 3 *Cavia aperea* (cobaia), 5 *Cerdocyon thous* (cachorro-do-mato), 1 *Dasyus novemcinctus* (tatu-galinha), 1 *Dasyus septemcinctus* (tatuí), 2 *Didelphis* (gambá-de-orelha-branca), 1 *Eira barbara* (irara), 2 *Gallictis vittata* (furão), 2 *Procyon cancrivorus* (guaxinim) e 2 *Sphiggurus spinosus* (porco-espinho). Fragmentos específicos foram detectados em diversos órgãos de 2 tatus-galinha e 1 cobaia, pulmão e fígado de porco-espinho e pulmões de guaxinim e furão. Apontam as técnicas moleculares como úteis para detectar novos hospedeiros e mapear áreas *hot spot* de PCM<sup>44</sup>.

### **PCR-EIA (PCR-ENZYME IMMUNOASSAY)**

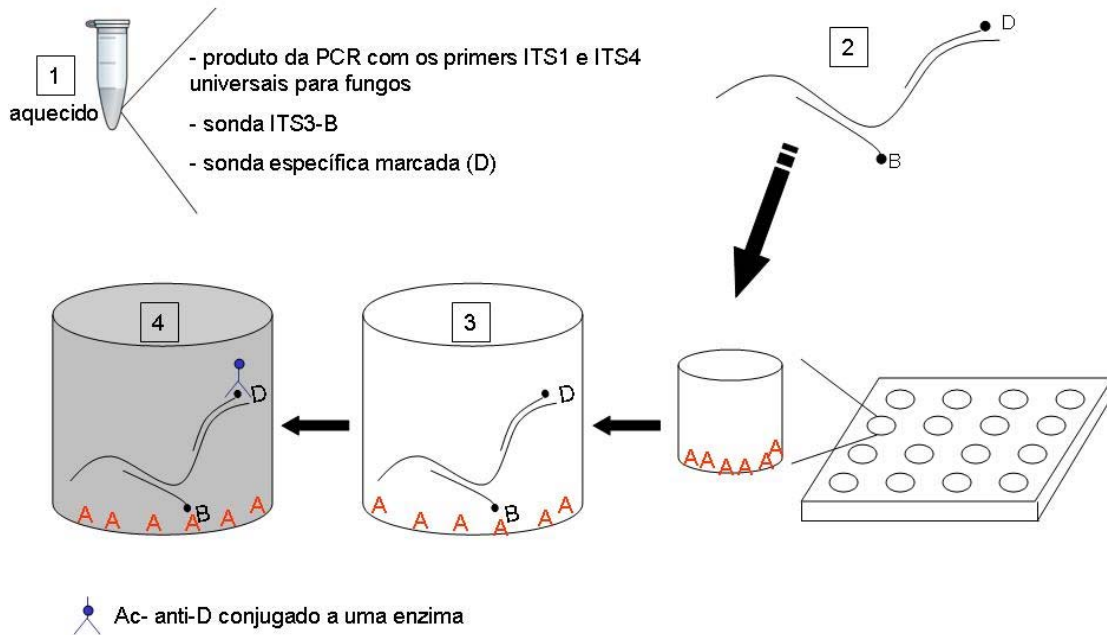
---

O método de PCR-ensaio imunoenzimático (EIA) permite a amplificação e identificação específica de DNA de uma grande variedade de microorganismos, utilizando um método conveniente que requer equipamento pouco especializado. O método consiste de uma combinação de PCR e de detecção enzimática colorimétrica (Figura 3).

Em um estudo em que se utilizou a reação de PCR-EIA para detectar diversos fungos patogênicos, inclusive *P. brasiliensis*, os DNAs dos fungos estudados foram inicialmente amplificados por PCR usando os oligonucleotídeos universais para fungos

ITS1 e ITS4, específicos para a região que codifica para o RNA ribossomal. O produto da reação de PCR é um fragmento de aproximadamente 600 pb que contém o gene 5.8S ribossomal, no qual está presente a sequência correspondente a outro oligonucleotídeo universal para fungos, chamado ITS3.

Os produtos da PCR com os oligonucleotídeos ITS1/ITS4 são aquecidos a 95°C por 5 minutos e incubados no gelo na presença do oligonucleotídeo ITS3 marcado, com biotina (ITS3-B), e do oligonucleotídeo espécie específico marcado com digoxigenina. Então, a solução é incubada a 37°C por 1 hora e transferida para placas de 96 poços recobertos com streptavidina (A). A seguir, é adicionado anticorpo anti-digoxigenina (Ac-anti-D) conjugada a peroxidase. Quando se adiciona o substrato desta enzima, ocorre uma reação química que gera um produto colorido e a densidade óptica é então lida em 650 nm em um leitor de microplaca. Este método é potencial para automação e pode ser muito útil para aplicação em laboratórios clínicos, entretanto, ainda não foram feitos testes para a detecção de fungos em tecido<sup>45</sup>.



**Figura 3.** Esquema da PCR-EIA  
**MÉTODO LAMP (LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION)**

LAMP é um método de amplificação de ácidos nucléicos simples, rápido e específico. O teste é caracterizado pelo uso de 4 oligonucleotídeos diferentes, especificamente definidos para reconhecer 6 regiões distintas no gene alvo. Diferentemente da PCR, a reação ocorre a uma temperatura constante. A amplificação e a detecção de um gene ocorrem em um único passo, incubando a amostra, oligonucleotídeos, DNA polimerase com atividade de separar a dupla fita, a uma temperatura constante (60-65°C). Promove alta eficiência de amplificação, com DNA sendo amplificado  $10^9$ - $10^{10}$  vezes de 15 a 60 min. Por sua grande especificidade, a presença de produto amplificado indica a presença do gene de interesse. Em eletroforese o DNA amplificado aparece como uma “escada” com um padrão específico de bandas<sup>46</sup>.

Usando o método LAMP, o gene da proteína gp43 específica de *P. brasiliensis*

foi detectado em 22 isolados clínicos e 7 isolados derivados de tatu. Além disso, obtiveram resultados positivos com DNA extraído de amostras de tecido de pacientes com PCM embebidas em parafina. Os autores sugerem que este método pode atingir aplicação clínica no futuro, não apenas para diagnóstico de PCM, mas também para uma série de outras doenças<sup>47</sup>.

## **REAÇÃO DE HIBRIDAÇÃO**

---

A reação de hibridação foi a primeira reação de detecção molecular para *P. brasiliensis*. Inicialmente, foi sintetizada uma sonda de 14 nucleotídeos (ACTCCCCCGTGGTC), baseada na extremidade 5' do gene ribossomal 28S, região que apresenta uma identidade próxima a 100% entre diferentes isolados de *P. brasiliensis*. A sonda obtida foi capaz de identificar o DNA de *P. brasiliensis* dentre um conjunto de 47 amostras de DNA de outros fungos. Além disso, a mesma sonda foi utilizada com sucesso em testes de hibridação *in situ* para discriminar *P. brasiliensis* de *Lacazia loboi*, uma espécie relacionada ao *P. brasiliensis*. Porém, devido a popularização da reação de PCR, as reações de hibridação não têm sido utilizadas para o desenvolvimento de reações de detecção/quantificação de *P. brasiliensis*<sup>48</sup>.

Desde a introdução da PCR nos meados da década de 80, a tecnologia tem avançado, tornando-se mais difundida e acessível. A cada ano, a tecnologia é melhorada e novos aspectos são considerados e testados e o futuro aguarda muitos desafios. O diagnóstico molecular vem causando um grande impacto na pesquisa em micologia e, com o tempo, sua importância irá favorecer: o monitoramento, detecção, quantificação e identificação de fungos, levando a um melhor entendimento do diagnóstico, tratamento, ecologia e epidemiologia de *P. brasiliensis*.

## BIBLIOGRAFIA

---

1. SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA G.; ITURRIAGA T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med. Mycol.**, 40: 225-242, 2002.
2. ALMEIDA, O.P.; JACKS, J.Jr.; SCULLY, C. Paracoccidioidomycosis of the mouth: an emerging deep mycosis. **Crit. Rev. Oral. Biol. Med.**, 14: 377-383, 2003.
3. LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. *Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico*. 8 ed, São Paulo: Sarvier, 1991.
4. WOODS, J.P. *Histoplasma capsulatum* molecular genetics, pathogenesis, and responsiveness to its environment. **Fungal Genet. Biol.**, 35: 81-97, 2002.
5. RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Sabouraudia**, 23: 323-334, 1985.
6. NEGRONI, P. The *Paracoccidioides brasiliensis* lives saprophytically in the soil of Argentina. **Prensa Med. Argent.**, 53: 2381-2382, 1966.
7. ALBORNOZ, M.B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**, 9: 248-253, 1971.
8. SILVA-VERGARA, M.L.; MARTINEZ, R.; CHADU, A.; MADEIRA, M., FREITAS-SILVA, G.; LEITE MAFFEI, C.M. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibia, State of Minas Gerais, Brazil. **Med. Mycol.**, 36: 37-42, 1998.
9. SILVA-VERGARA, M.L.; MARTINEZ, R. Role of the armadillo *Dasypus novemcinctus* in the epidemiology of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, 144: 131-133, 1999.
10. BLOTTA, M.H.S.L.; MAMONI, R.L.; OLIVEIRA, S.J.; NOUER, S.A.; PAPAIRDANOU, P.M.; GOVEIA, A.; CAMARGO, Z.P.. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 61: 390-394, 1999.
11. COUTINHO, Z.F.; SILVA, D.; LAZÉRA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R.M.; SABROZA, P.C.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad. Saúde Pública**, 18:1441-1454, 2002.
12. BICALHO, R.N; SANTO, M.F.; DE AGUIAR, M.C.; SANTOS, V.R.. Oral paracoccidioidomycosis: a retrospective study of 62 Brazilian patients. **Oral Diseases**, 7: 56-60, 2001.
13. GODOY, H.; REICHART, P.A. Oral manifestations of paracoccidioidomycosis. Report of 21 cases from Argentina. **Mycoses**, 46: 412-417, 2003.

14. VERLI, F.D.; MARINHO, S.A.; SOUZA, S.C.; FIGUEIREDO, M.A.; YURGEL, L.S.. Perfil clínico-epidemiológico dos pacientes portadores de paracoccidioidomicose no Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 38: 234-237, 2005.
15. PANIAGO, A.M.; AGUIAR, J.I.; AGUIAR, E.S.; DA CUNHA, R.V.; PEREIRA, G.R.; LONDERO, A.T.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis: a clinical and epidemiological study of 422 cases observed in Mato Grosso do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 36: 455-459, 2003.
16. SEVERO, L.C.; ROESCH, E.W.; OLIVEIRA, E.A.; ROCHA, M.M.; LONDERO, A.T. Paracoccidioidomycosis in women. **Rev. Iberoam. Micol.**, 15: 88-89, 1998.
17. BORGES-WALMSLEY, M. I.; CHEN, D.; SHU, X.; WALMSLEY, A.R. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends Microbiol.**, 10: 80-87, 2002.
18. SHIKANAI-YASUDA, M.A.; TELLES FILHO, F.Q.; MENDES, R.P.; COLOMBO, A.L.; MORETTI, M.L. Guidelines in paracoccidioidomycosis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 39: 297-310, 2006.
19. VISBAL, G.; SAN-BLAS, G.; MURGICH, J.; FRANCO, H. *Paracoccidioides brasiliensis*, paracoccidioidomycosis, and antifungal antibiotics. **Curr. Drug. Targets Infect. Disord.**, 5: 211-226, 2005.
20. ATKINS, S.D.; CLARK, I.M. Fungal molecular diagnostics: a mini review. **J. Appl. Genet.**, 45:1, 3-15, 2004.
21. BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin. Microbiol. Rev.**, 6: 89-117, 1993.
22. BIALEK, R.; IBRICEVIC, A.; AEPINUS, C.; NAJVAR, L.K.; FOTHERGILL, A.W.; KNOBLOCH, J.; GRAYBILL, J.R. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a nested PCR assay. **J. Clin. Microbiol.**, 38: 2940-2942, 2000.
23. ALBUQUERQUE, C. F.; MARQUES DA SILVA, S. H.; CAMARGO, Z. P. Improvement of the specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, 43: 1944-1946, 2005.
24. GOLDANI, L.Z.; SUGAR, A.M. Short report: Use of the polymerase chain reaction to detect *Paracoccidioides brasiliensis* in murine paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 58: 152-153, 1998.
25. ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Molecular Biology of the Cell. 4ed, Nova York e Londres: Garland Science, 2002.
26. MOREIRA, D. Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. **Nucleic Acids Res.**, 26: 3309-3310, 1998.
27. BORNEMAN, J. HARTIN, R.J. PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. **Appl. Environ. Microbiol.**, 66: 4356-4360, 2000.

28. BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. Biochemistry. Nova York: W. H. Freeman e Co.; 2002.
29. McPHERSON, M.J.; QUIRKE, P.; TAYLOR, G.R. PCR a pratical approach. Nova York: Oxford University, 1994.
30. GOLDANI, L.Z.; MAIA, A.L.; SUGAR, A.M. Cloning and nucleotide sequence of a specific DNA fragment from *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Clin. Microbiol.**, 33: 1652-1654, 1995.
31. DIEZ, S.; GARCIA, E.A.; PINO, P.A.; BOTERO, S.; CORREDOR, G.G.; PERALTA, L.A.; CASTANO, J.H.; RESTREPO, A.; MCEWEN, J.G. PCR with *Paracoccidioides brasiliensis* specific primers: potential use in ecological studies. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.**, 41: 351-358, 1999.
32. IMAI, T.; SANO, A.; MIKAMI, Y.; WATANABE, K.; AOKI, F.H.; BRANCHINI, M.L.; 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: 323-326, 2000.
33. GOMES, G.M.; CISALPINO, P.S.; TABORDA, C.P.; CAMARGO, Z.P. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, 38: 3478-3480, 2000.
34. VIDAL, M.S.M.; BENARD, G.; BRITO, T.; DANTAS, K.C.; PEREIRA, C.N.; FRANCA, F.O.; SILVA, A.M.; MARTINS, J.E. Atypical serological response marked by a lack of detectable anti-gp43 antibodies in a patient with disseminated paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, 43: 3014-3016, 2005.
35. CHARBEL, C.E.; LEVI, J.E.; MARTINS, J.E. Evaluation of polymerase chain reaction for the detection of *Paracoccidioides brasiliensis* DNA on serum samples from patients with paracoccidioidomycosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, 101: 219-221, 2006.
36. ITANO, E.N.; UNO, J.; SANO, A.; YARITA, K.; KAMEI, K.; MIYAJI, M.; NISHIMURA, K.; MIKAMI, Y. Detection of the gp43 gene and (1 $\beta$ )-D-glucan of *Paracoccidioides brasiliensis* in the blood of experimentally infected mice. **J. Med. Mycol.**, 43: 29-35, 2002.
37. MOTOYAMA, A.B.; VENANCIO, E.J.; BRANDAO, O.; PETROFEZA-SILVA, S.; PEREIRA, I.S.; SOARES, C.M.; FELIPE, M.S. Molecular identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by PCR amplification of ribosomal DNA. **J. Clin. Microbiol.**, 38: 3106-3109, 2000.
38. SILVA-VERGARA, M.L.; MARTINEZ, R.; CAMARGO, Z.P.; MALTA, M.H.; MAFFEI, C.M.; CHADU, J.B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasybus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. **Med Mycol.**, 38: 193-199, 2000.
39. SANO, A.; 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. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, 42: 23-27, 2001.

40. SEMIGHINI, C.P.; CAMARGO, Z.P.; PUCCIA, R.; GOLDMAN, M.H.; GOLDMAN, G.H. Molecular identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by 5' nuclease assay. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, 44: 383-386, 2002.
41. SAN-BLAS, G.; NINO-VEJA, G.; BARRETO, L.; HEBELER-BARBOSA, F.; BAGAGLI, E.; OLIVERO DE BRICENO, R.; MENDES, R.P. Primers for clinical detection of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Clin. Microbiol.**, 43: 4255-4257, 2005.
42. THEODORO, R.C.; CANDEIAS, J.M.; ARAUJO, J.P. JR.; BOSCO, S.M.; MACORIS, S.A.; PADULA, L.O.; FRANCO, M.; BAGAGLI, E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. **Med. Mycol.**, 43: 725-729, 2005.
43. RICCI, G.; SILVA, I.D.; SANO, A.; BORRA, R.C.; FRANCO, M. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* by PCR in biopsies from patients with paracoccidioidomycosis: correlation with the histopathological pattern. **Pathologica**, 99: 41-45, 2007.
44. RICHINI-PEREIRA, V.B.; BOSCO, S.D.; GRIESE, J.; THEODORO, R.C.; MACORIS, S.A.; SILVA, R.J.; BARROZO, L.; TAVARES, P.M.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; BAGAGLI, E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. **Med. Mycol.**, 18: 1-6, 2007.
45. LINDSLEY, M.D.; HURST, S.F.; IQBAL, N.J.; MORRISON, C.J. Rapid identification of dimorphic and yeast-like fungal pathogens using specific DNA probes. **J. Clin. Microbiol.**, 39: 3505-3511, 2001.
46. NOTOMI, T.; OKAYAMA, H.; MASUBUCHI, H.; YONEKAWA, T.; WATANABE, K.; AMINO, N.; HASE, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research.**, 28:12, 2000.
47. ENDO, S.; KOMORI, T.; RICCI, G.; SANO, A.; YOKOYAMA, K.; OHORI, A.; 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: 93-97, 2004.
48. SANDHU, G.S.; ALEFF, R.A.; KLINE, B.C.; LACAZ, C.S. Molecular detection and identification of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Clin. Microbiol.**, 35: 1894-1896, 1997.
49. WHITE, T. J.; BRUNS, T.S. LEE; TAYLOR, J. PCR protocols: a guide to methods and applications, Nova York: Academic Press, Inc., 1990.
50. HAYNES, K. A.; WESTERNENG, T. J.; FELL, J. W.; MOENS, W. Rapid detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain reaction amplification of large subunit ribosomal DNA. **J. Med. Vet. Mycol.**, 33: 319-325, 1995.

**ANEXO II –**

Artigo submetido à revista *Community Dentistry and Oral Epidemiology*.

Oral paracoccidioidomycosis: Differential diagnosis and epidemiological data



### Oral paracoccidioidomycosis

Journal:	<i>Community Dentistry and Oral Epidemiology</i>
Manuscript ID:	draft
Manuscript Type:	Original Manuscript
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Vituri, Débora; Londrina State University, Pathological Sciences Koishi, Andrea; Londrina State University, Pathological Sciences Neto, Antônio; Londrina State University, Oral Medicine and Pediatric Odontology Ito, Fábio; Londrina State University, Oral Pathology Venancio, Emerson; Londrina State University, Pathological Sciences
Keywords:	Microbiology, Oral mucosal lesions, Oral pathology
Abstract:	OBJECTIVE(s): The purpose of this study was to evaluate differential diagnosis and epidemiological data of patients presenting oral paracoccidioidomycosis (PCM). STUDY DESIGN: Age, gender, occupation, smoking and drinking habits, oral lesion frequency and location and differential diagnosis of 70 cases presenting histologically confirmed oral PCM were tabulated. RESULTS: A predominance of male patients (95.7%) occurred. Most of the patients were rural farm workers (55.7%), tobacco smokers (91.4%), alcoholics (90.0%) and presented multiple lesions (50.0%). The alveolar process and gingiva were the most commonly affected sites (25.9%) and squamous cell carcinoma appeared in the differential diagnosis for oral PCM lesions in 33 (47.1%) cases. CONCLUSION: This study described the clinical records of a specific population diagnosed with oral paracoccidioidomycosis. The major finding observed was that squamous cell carcinoma is the oral pathology that most resembles paracoccidioidomycosis oral lesions and may lead to erroneous diagnosis.



1  
2 Dear Dr A. John Spencer , Editor-in-Chief  
3  
4  
5

6  
7 I would like to submit the attached manuscript, "Oral paracoccidioidomycosis: Differential  
8  
9 diagnosis and epidemiological data", for consideration regarding publication in *Community*  
10  
11 *Dentistry and Oral Epidemiology*. In this paper we discuss epidemiological and clinical data from  
12  
13 70 Brazilian patients who presented oral paracoccidioidomycosis, including differential diagnoses.  
14  
15 Observation showed that squamous cell carcinoma is the oral pathology that most resembles  
16  
17 paracoccidioidomycosis oral lesions and may lead to erroneous diagnosis. This paper is an original  
18  
19 unpublished work. The entire article was revised by a British-born scientific text editor.  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27

28 Sincerely,  
29

30 Emerson José Venancio  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2 **Débora Fonseca Vituri<sup>1</sup>, Andrea Cristine Koishi<sup>1</sup>, Antônio Carrilho Neto<sup>2</sup>, Fábio Augusto Ito<sup>3</sup>,**  
3  
4 **Emerson José Venancio<sup>4</sup>.**  
5  
6  
7

8  
9 <sup>1</sup>Postgraduate students of the Program in Experimental Pathology, Department of Pathological  
10 Sciences, Londrina State University, Brazil. <sup>2</sup>Associate Professor, Department of Oral Medicine and  
11 Pediatric Odontology, Londrina State University, Brazil. <sup>3</sup>Collaborating Professor, Department of  
12 Oral Pathology, University Hospital, Londrina State University, Brazil. <sup>4</sup> Adjunct Professor,  
13 Department of Pathological Sciences, Londrina State University, Brazil.  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22

23 Address: Londrina State University, Campus Universitário, Londrina, Paraná, CP 6001, CEP  
24 86051-990, Brazil.  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Oral paracoccidioidomycosis**

**Differential diagnosis and epidemiological data**

Manuscript Copy

**Abstract**

OBJECTIVE(s): The purpose of this study was to evaluate differential diagnosis and epidemiological data of patients presenting oral paracoccidioidomycosis (PCM). STUDY DESIGN: Age, gender, occupation, smoking and drinking habits, oral lesion frequency and location and differential diagnosis of 70 cases presenting histologically confirmed oral PCM were tabulated. RESULTS: A predominance of male patients (95.7%) occurred. Most of the patients were rural farm workers (55.7%), tobacco smokers (91.4%), alcoholics (90.0%) and presented multiple lesions (50.0%). The alveolar process and gingiva were the most commonly affected sites (25.9%) and squamous cell carcinoma appeared in the differential diagnosis for oral PCM lesions in 33 (47.1%) cases. CONCLUSION: This study described the clinical records of a specific population diagnosed with oral paracoccidioidomycosis. The major finding observed was that squamous cell carcinoma is the oral pathology that most resembles paracoccidioidomycosis oral lesions and may lead to erroneous diagnosis.

**Keywords:** oral paracoccidioidomycosis; *Paracoccidioides brasiliensis*; squamous cell carcinoma; differential diagnosis.

## Introduction

Paracoccidioidomycosis (PCM) is caused by *Paracoccidioides brasiliensis* and is one of the most important systemic deep mycoses in Latin America (Almeida *et al.*, 2003). PCM is endemic in Brazil, especially in the states of São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul and Paraná (Brummer *et al.*, 1993; Bisinelli *et al.*, 2001; Paniago *et al.*, 2003; Verli *et al.*, 2005). It is generally accepted that *P. brasiliensis* grows as a mycelium in humid soil, rich in organic materials, without drastic temperature variations (around 20°C) and covered by vegetation. Probably the conidia produced by mycelium act as infectious propagules and when inhaled the dimorphic transformation into yeast occurs in tissues of the human host, with primary infection of the lungs and dissemination via lymphatic and blood vessels (Almeida *et al.*, 2003).

Two different forms of PCM exist, acute (juvenile) and chronic (adult). The acute form represents only 3 to 5% of all cases; affecting mainly children and adolescents of both genders, it displays a more rapid and severe course and lung lesions are rarely present. The chronic form occurs in more than 90% of patients and most are adult males. Primary infections occur in the lungs, proceed slowly and may take months or even years to become established (Almeida *et al.*, 2003). The chronic form is classified as unifocal when the lungs are the only system clinically affected and multifocal when disease dissemination occurs via lymphatic and blood vessels, forming secondary lesions in other tissues, such as the oral mucosa, skin, lymph nodes and adrenal glands (Shikanai-Yasuda, 2006).

In many cases, the first and main clinical manifestation is oral lesions. Usually, the oral lesions are multiple, involving the lip, gingiva, mucosa buccal, palate, tongue and floor of the mouth (Almeida *et al.*, 2003). The alveolar process and the gingiva are the sites most frequently involved and it is well-established that most patients presenting oral PCM are adult males (Bicalho *et al.*, 2001). This preference for gender results from the protective role of estrogen, this female hormone inhibits the transition of conidia-mycelial propagules to the yeast form, a critical step in

1  
2 the disease pathogenesis (Restrepo *et al.*, 1984; Salazar *et al.*, 1988).

3  
4 The oral lesions do not always show an erythematous finely granular hyperplasia, speckled  
5  
6 with pinpoint hemorrhages, and a mulberry-like surface called “moriforme” stomatitis (Almeida *et*  
7  
8 *al.*, 2003); microulcerations or deep ulcers also may eventually appear (Almeida *et al* 1991; Sposto  
9  
10 *et al.*, 1993).

11  
12  
13 The clinical polymorphism of oral PCM is responsible for difficult diagnosis, leading to  
14  
15 confusion with many oral lesions, such as tuberculosis, histoplasmosis, sarcoidosis and neoplastic  
16  
17 disease (Blotta *et al.*, 1999; Bicalho *et al.*, 2001) and especially with squamous cell carcinoma  
18  
19 (SCC) (Menezes-Garcia *et al.*, 2002).

20  
21  
22 PCM lesions are diagnosed by histopathology (Almeida *et al.*, 1991). Microscopically,  
23  
24 granulomatous chronic inflammations occur that are rich in giants cells, lymphocytes, neutrophils,  
25  
26 eosinophils, plasma cells, and intra-extracellular fungi cells, corresponding to *P. brasiliensis*, which  
27  
28 often remain hidden or are confused with other dimorphic fungi (Brummer *et al.*, 1993). The  
29  
30 epithelium displays exocystosis, microabscesses and pseudoepitheliomatous hyperplasia that  
31  
32 resemble SCC so closely that it is possible to mistake one for the other (Menezes-Gracia *et al.*,  
33  
34 2002).

35  
36  
37 This paper describes the epidemiological data, occupation, use of tobacco and alcoholic  
38  
39 beverages and the clinical differential diagnosis of patients presenting oral PCM.  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Materials and Methods

Files of the University Dentistry Center at the State University of Londrina, Paraná state, Brazil, from 1991 to 2001 were retrieved and 70 cases of oral PCM were analyzed. All the patients presented a diagnosis of histologically confirmed paracoccidioidomycosis. Data referring to the patient's age, gender, occupation, smoking and drinking habits, oral lesion frequency, location and differential diagnosis were recorded.

Manuscript Copy

## Results

The great majority of patients presenting oral PCM lesions are adults. At the time of diagnosis, the age of the patients ranged from 20 to 87 years-old, with a mean age of 51 years-old, and the peak incidence was from 50 to 69 years-old. Sixty-seven patients were male and three female, showing a male to female ratio of 22:1. Most of the patients, 39 cases, were rural workers followed by bricklayers, 10 cases, and another 21 cases were distributed among merchants (6), salesmen (4), pensioners (4), businessmen (3), wood-workers (2), a midwife (1) and a housewife (1). Of the 70 patients, 64 (91.43%) were tobacco smokers. Chronic patients that consumed alcoholic beverage daily were present in 35 (50.0%) cases; among nonchronic patients this was 28 (40.0%) cases. However, both habits were present in 59 (84.3%) cases (Table 1).

According to the frequency of the oral lesions in each patient at the moment of diagnosis, 35 (50.0%) presented three or more lesion, 14 presented two lesions (20.0%) and 21 presented one lesion (30.0%) (Table 2).

Regarding the location of 181 oral lesions found in these 70 patients, the alveolar process/gingival were the sites most frequently involved, with 47 (26.0%) lesions, followed by the lips (18.2%), palate (17.1%), jugal mucosa (12.15%), buccal vestibule (8.3%), floor of the mouth (7.1%), tongue (5.0%), labial commissure (3.3%), and pharynx (2.8%) (Table 3).

Data collected show that PCM was the initial clinical diagnosis in 29 (41.4%) cases. SCC appears in the differential diagnosis for oral PCM lesions in 33 (47.1%) cases and in 3 cases SCC was the clinical diagnosis after the initial clinical examination. Other results show that in one case no differential diagnosis was made and in four cases the differential diagnosis for oral PCM included leishmaniasis (n=3) and histoplasmosis (n=1) (Table 4).

## Discussion

Epidemiological surveys in humans and dogs show that Northern Paraná State is an endemic area of PCM (Ono *et al.*, 2001; Fornajeiro *et al.*, 2005). At the Dentistry Center of the State University of Londrina, 70 cases of PCM were diagnosed between 1991 and 2006. Most of the patients were adults males, aged between 20 and 87 years-old, with a mean age of 51 years-old, 55.7% were rural worker and the male to female ratio was 22:1. Many studies have shown that PCM is a chronic disease that afflicts mainly adult males and rural workers (Sposto *et al.*, 1993; Paniago *et al.*, 1995; Blotta *et al.*, 1999; Bicalho *et al.*, 2001; Bisinelli *et al.*, 2001; Verli *et al.*, 2005). *P. brasiliensis* may survive as mycelium in the soil of tropical and subtropical areas of Latin American and switches to a yeast-like form in humans. The mycelium to yeast transformation is most probably inhibited by estrogen (Almeida *et al.*, 2003).

Alcoholism and tobacco smoking are frequently associated with PCM (Blotta *et al.*, 1999). In this study, the majority of patients were alcoholics. Several studies have shown that many patients presenting PCM have a history of alcohol consumption and show an increase in relative risk for PCM development (Blotta *et al.*, 1999; Menezes-Garcia- *et al.*, 2002; Paniago *et al.*, 2003). The association between PCM and alcoholism might be explained by the reduction of mucociliar function and surfactant production, alterations in immunity and malnutrition in these patients. Regarding smokers, in the present study, 91.4% of patients were tobacco smokers. Other studies have shown that patients presenting PCM are generally tobacco smokers and that the consumption of 20 or more cigarettes/day is associated with a high probability of becoming ill an average of eight years before other individuals. Tobacco is a fume irritant substance and one of the consequences is an alteration in macrophage activity that may lead to the development of chronic bronchial inflammation and alveolar destruction, favoring the appearance of respiratory infections (Santos *et al.*, 2003). Alcoholic patients and tobacco smokers usually show alterations in immunity and malnutrition, presenting a similar profile to patients that develop SCC (Menezes-Garcia *et al.*, 2002).

1  
2 The oral cavity is the site most often affected by chronic PCM lesions (Bicalho *et al.*, 2001).  
3  
4 Patients develop multiple oral lesions that are mulberry-like in appearance, ulcerated, with pinpoint  
5  
6 hemorrhages that primarily affect the gingiva and alveolar process (Sposto *et al.*, 1993; Bicalho *et*  
7  
8 *al.*, 2001); however, the palate, lips and buccal mucosa are also frequently involved. In this study  
9  
10 70% of patients presented multiple oral lesions and the sites most often involved were the alveolar  
11  
12 process/gingival, lip, palate and jugal mucosa. The tongue and floor of mouth were affected to a  
13  
14 lesser degree. These results are in agreement with those reported by other research groups (Sposto  
15  
16 *et al.*, 1993; Sposto *et al.*, 1994; Verli *et al.*, 2005).  
17  
18  
19

20  
21 Untreated isolated lesions of oral PCM spread and become ulcerative and proliferative,  
22  
23 covering large areas of the affected oral mucosa. Due to the chronic character and the progressive  
24  
25 extension of the ulcerated oral lesion, they may resemble neoplastic disease, especially SCC  
26  
27 (Menezes-Garcia *et al.*, 2002; Kaminagakura *et al.*, 2003). As a rule, any chronic ulceration of the  
28  
29 oral mucosa that does not tend to heal after 2 weeks is considered a malignant neoplasm or a  
30  
31 specific infection, unless a biopsy demonstrates a different diagnosis (Menezes-Garcia *et al.*, 2002).  
32  
33  
34

35  
36 The differential diagnosis of oral PCM included SCC and other granulomatous diseases  
37  
38 (Bisinelli *et al.*, 2001; Menezes-Garcia *et al.*, 2002). In this study, SCC was included in the  
39  
40 differential diagnosis for oral PCM in 33 cases. Furthermore, in three patients presenting isolated  
41  
42 lesions, SCC was the only clinical diagnosis. These results show oral PCM resembles SCC in most  
43  
44 patients and in all cases a biopsy is necessary to establish the final diagnosis (Menezes-Garcia *et al.*,  
45  
46 2002; Kaminagakura *et al.*, 2003). It should be noted that small specimens may lead to erroneous  
47  
48 diagnosis (Menezes-Garcia *et al.*, 2002).  
49  
50

51  
52 This study showed that most of the patients were rural workers, tobacco smokers, alcoholics,  
53  
54 presented multiples lesions and that the alveolar process and gingiva are the most commonly  
55  
56 affected sites. Regarding differential diagnosis, observation showed that squamous cell carcinoma is  
57  
58 the oral pathology that most resembles oral paracoccidioidomycosis lesions and may lead to  
59  
60 erroneous diagnosis.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Acknowledgments**

We thank the Program in Experimental Pathology for technical and administrative support.

This study was supported by CAPES and CNPq, Brazil. DFV have fellowship from CNPq.

Manuscript Copy

**References:**

Almeida OP, Jacks JJ, Scully C. Paracoccidioidomycosis of the mouth an emerging deep mycosis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14: 268-74.

Almeida OP, Jorge JJ, Scully C, Bozzo L. Oral manifestations of paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; 72: 430-5.

Bicalho RN, Santo MF, Aguiar MC, Santos VR. Oral paracoccidioidomycosis: a retrospective study of 62 Brazilian patients. *Oral Diseases* 2001; 7: 56-60.

Bisinelli JC, Telles FQ, Sobrinho JA, Rapoport A. Stomatological manifestation of paracoccidioidomycosis. *Rev Bras Otorrinol* 2001; 67: 683-87.

Blotta MH, Manoni RL, Oliveira SJ, Coger SA, Papaiordanou PM, Goveia A, et al. Endemic Regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61: 390-94.

Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6: 89-117.

Fornajeiro N, Maluf MLF, Takahachi G, Svidzinski TIE. Inquérito epidemiológico sobre a paracoccidioidomicose utilizando a gp43 em dois municípios do noroeste do Paraná, Brasil. *Rev Soc Brasil de Med Trop* 2005; 38: 191-193.

Menezes-Garcia A, Taylor AM, Luz RM, Rivera MR. Paracoccidioidomycosis: report of 2 cases mimicking squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 94: 609-13.

Kaminagakura E, Graner E, Almeida OP, Hipolito OJ, Lopes MA. Oral paracoccidioidomycosis or squamous cell carcinoma?. *Gen Dent* 2003;. 52: 48-50.

Ono MA, Bacarense AP, Morais HS, Trapp SM, Belitard DR, Camargo ZP. Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. *Med Mycol* 2001; 39:277-82.

Paniago AM, Aguiar JI, Aguiar ES, Cunha RV, Pereira GR, Londero AT, et al. Paracoccidioidomycosis: a clinical and epidemiological study of 422 cases observed in Mato

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Grosso do Sul. Rev Soc Brasil de Med Trop 2003; 36: 455-459.

Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover P, Feldman D, Stevens DA. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. Infect and Immun 1984; 46: 346-53.

Salazar ME, Restrepo A, Stevens DA. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Infect and Immun 1988; 56: 711-3.

Santos WA, Silva BM, Passos ED, Zandonade E, Falqueto A. Associação entre tabagismo e paracoccidioidomicose: um estudo de casos-controle no estado do Espírito santo, Brasil. Cad. Saúde Pub 2003; 19: 245-53.

Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho FQ, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. Guidelines in paracoccidioidomycosis. Rev Soc Brasil de Med Trop 2006; 39: 297-310.

Sposto MR, Scully C, Almeida OP, Bozzo L. Oral paracoccidioidomycosis: a study of 36 south american patients. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1993; 75: 461-5.

Sposto MR, Mendes-Giannini MJ, Moraes RA, Branco FC, Scully C. Paracoccidioidomycosis manifesting as oral lesions: clinical, cytological and serological investigation. J Oral Pathol Med 1994; 23: 85-7.

Verli FD, Marinho SA, Souza SC, Figueiredo MA, Yurgel LS. Perfil clínico-epidemiológico dos pacientes portadores de paracoccidioidomicose no serviço de estomatologia do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Ver Soc Brasil de Med Trop 2005; 38: 234-7.

**Legend**

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7 Table 1- Clinical data of the 70 patients presenting oral PCM  
8  
9  
10  
11 Table 2- Number of the intra oral lesions in patients presenting paracoccidioidomycosis  
12  
13  
14  
15  
16 Table 3- Location of the intra oral lesions in patients presenting PCM  
17  
18  
19  
20  
21 Table 4- Differential diagnosis of patients presenting PCM oral lesions  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Table 1. Clinical data of the 70 patients with oral PCM

Years	n	%
≤ 20	00	0.0
21 – 30	02	2.9
31- 40	13	18.6
41 – 50	21	30.0
51 – 60	19	27.1
≥ 61	15	21.4
Gender		
Male	67	95.7
Female	03	4.3
Occupation		
Rural workers	39	55.71
Bricklayers	10	14.3
Others	21	30.0
Tobacco smokers		
Yes	64	91.4
No	06	8.6
Alcohol consumption		
Chronic	35	50.0
Not chronic	28	40.0
Not alcoholics	07	10.0
Tobacco smokers and alcoholics	59	84.3

**Table 2. Number of the intra oral lesions in patients with paracoccidioidomycosis**

Number of lesions/patient	N	%
1	21	30.0
2	14	20.0
≥ 3	35	50.0

Manuscript Copy

**Table 3. Localization of the intra oral lesions in patients with PCM**

Intra oral lesion sites	n	%
Process alveolar/gingiva	47	26.0
Lips	33	18.2
Palate	31	17.1
Jugal mucosa	22	12.1
Vestibule buccal	15	8.3
Floor of mouth	13	7.2
Tongue	09	5.0
Labiorum commissure	06	3.3
Pharynx	05	2.8

**Table 4. Differential diagnosis of patients with PCM oral lesion**

Differential diagnosis	n	%
PCM	29	41.4
PCM/SCC	33	47.1
SCC	03	4.3
WCD	01	1.4
PCM/Others*	04	5.7

PCM – patients with diagnosis of PCM at initial clinical exam; PCM/SCC – patients with either PCM or SCC at initial clinical exam; SCC – patients with diagnosis of SCC at initial clinical exam; WCD – without clinical diagnosis at initial clinical exam; PCM/Others – patients with either PCM or leishmaniosis (n=3) or histoplasmosis (n=1) at initial clinical exam.