



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DÉBORA FONSECA VITURI RODRIGUES DA SILVA

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *Paracoccidioides brasiliensis*
POR PCR EM BIÓPSIAS DE LESÃO BUCAL DE
PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

Londrina
2008

DÉBORA FONSECA VITURI RODRIGUES DA SILVA

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *Paracoccidioides brasiliensis*
POR PCR EM BIÓPSIAS DE LESÃO BUCAL DE
PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

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 Venâncio

Londrina
2008

DÉBORA FONSECA VITURI RODRIGUES DA SILVA

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *Paracoccidioides brasiliensis*
POR PCR EM BIÓPSIAS DE LESÃO BUCAL DE
PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

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. Suely Fumie Yamada Ogatta
Universidade Estadual de Londrina

Profa.. Dra. Eiko Nakagawa Itano
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 29 de fevereiro de 2008.

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Osvaldo e Marly ao meu marido Delmiro e filho João Pedro, pelo apoio, incentivo e investimento em minha formação.

AGRADECIMENTOS

Ao orientador e professor Dr. Emerson José Venancio, pela dedicação, pela amizade, pelo exemplo, pela orientação e visão científica a qual foi de fundamental importância para minha formação científica.

Aos professores Ms. Antônio Carrilho Neto e Dr. Fábio Augusto Ito, pela importante colaboração sem a qual este trabalho não poderia ser concluído.

Às professoras Dr^a. Halha Ostrensky Saridakis, Dr^a. Maria Angélica Ehara Watanabe e Dr^a. Suely Fumie Yamada Ogatta e ao professor Dr. Rubéns Cecchini, pela disponibilização dos aparelhos em seus laboratórios.

Ao professor Ms. Alexandre Yukio Saito pela paciência em ajudar a realizar procedimentos de grande importância para esse trabalho.

Aos funcionários Ana Maria Rodrigues e Pedro Sebastião Raimundo Dionízio Filho pelo auxílio em pequenos momentos, porém de grande valia para os resultados desse trabalho.

A todas as funcionárias do Centro Odontológico Universitário que colaboraram com minha pesquisa.

Em especial aos meus amigos Andréia Cristine Koishi, Eliandro Reis Tavares, Juliana Torres Tomazi Fritzen, Thiago Yuiti Castilho Massuda, Priscila Cassolla e Tatiane Ferreira Petroni que muito me ajudaram e fazem parte desse grande trabalho.

Com todo meu carinho a minha família que sempre esteve comigo e torceram pelo meu sucesso.

A todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

SILVA, Débora FVR. **Detecção molecular de *Paracoccidioides brasiliensis* por PCR em biópsias de lesão bucal de paracoccidioidomicose.** 2008 87f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

RESUMO

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença fúngica considerada um problema de saúde pública no Brasil. Na cavidade oral o processo alveolar e a gengiva são as localizações mais afetadas. A lesão bucal tipicamente se manifesta como uma hiperplasia granular eritematosa, com vários pontos hemorrágicos e uma superfície com aspecto de amora chamada de estomatite “moriforme”. O polimorfismo clínico da PCM bucal às vezes dificulta o diagnóstico especialmente quando confundido com carcinoma espinho celular (CEC). A PCM bucal geralmente é diagnosticada por histopatologia, entretanto, em alguns casos, o agente etiológico pode não ser encontrado ou confundido com outros fungos dimórficos e peças pequenas podem levar a um erro de diagnóstico. As técnicas moleculares são promissoras, facilitando um diagnóstico mais conclusivo, com uma alta especificidade e sensibilidade para *P. brasiliensis*, em particular através da utilização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Peças de tecidos parafinizados vêm sendo utilizadas em estudos retrospectivos de diagnósticos a fim de padronizar um método de extração de DNA que seja adequado em técnicas moleculares. Este estudo descreve dados clínico-patológicos de 70 casos de PCM bucal confirmados por histopatologia. Desses 70 casos, 29 amostras de tecidos parafinizados foram submetidas à extração de DNA e utilizadas em dois protocolos diferentes de PCR para a detecção do DNA do fungo *P. brasiliensis*. Peças de CEC bucal parafinizadas foram utilizadas como reação controle. Os dados clínicos mostram que a maioria dos pacientes eram homens, trabalhadores rurais, fumantes, etilistas, apresentam múltiplas lesões e o processo alveolar e a gengiva são os sítios mais afetados e o CEC foi o diagnóstico diferencial mais freqüente. Nas 29 amostras de tecidos parafinizados, o fungo *P. brasiliensis* foi detectado em 17 (58,6%) amostras pelo protocolo de Koishi (2006) e 2 (6,9%) pelo protocolo de Theodoro *et al.* (2005). As 12 amostras negativas pelo protocolo de Koishi (2006), foram submetidas a um processo de purificações em agarose e posteriormente submetidas aos protocolos de Koishi (2006) e Theodoro *et al.* (2005), onde duas e cinco amostras foram positivas, respectivamente. Como resultado total a PCR detectou 24 (85,75%) DNA de *P. brasiliensis* em 29 amostras de tecidos parafinizados. Em conclusão, este estudo mostrou que o CEC é a patologia bucal que mais se assemelha a lesão bucal de PCM e pode levar ao erro de diagnóstico. e o protocolo de Koishi, 2006 mostrou-se mais sensível na detecção de *P. brasiliensis* e pode ser usado em tecidos parafinizados.

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose. Paracoccidioidomicose oral. *Paracoccidioides brasiliensis*. Carcinoma espinho celular. Tecido embebido em parafina. PCR.

SILVA, Débora FVR. **Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* por PCR in oral paracoccidioidomycosis lesions biopsy.** 2008 87f. Dissertation (Master Degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a fungal disease and considered as a public health problem in Brazil. In the oral cavity the alveolar process and gingiva are the most commonly affected sites. The oral lesions typically show an erythematous finely granular hyperplasia, speckled with pinpoint hemorrhages, and a mulberry-like surface called “moriforme” stomatitis. The clinical polymorphism of oral PCM makes diagnosis difficult especially compared with squamous cell carcinoma (SCC). Oral PCM lesions are diagnosed by histopathology, however, the fungi can not be found or confused with other dimorphic fungi, and small specimens may lead to erroneous diagnosis. Molecular methods are promising and the polymerase chain reaction (PCR) has been found to be a sensitive, specific, and rapid method for detection of variety of microorganisms, and it could be a useful diagnostic tool of PCM. In addition, molecular methods have used in retrospective studies with archival paraffin-embedded tissues. This study describes the clinicopathological data of 70 histologically confirmed oral PCM cases two different assays to detection of *P. brasiliensis* DNA in 29 paraffin-embedded tissue. Samples of paraffin-embedded SCC were used as control reaction. The clinical records showed that most patients were male, rural workers; tobacco smokers, alcoholics, presented multiple lesions, and the alveolar process and gingiva were the most commonly affected sites and SCC was the most frequent differential diagnosis. Of the 29 samples paraffin-embedded tissues, the fungal *P. brasiliensis* DNA was detected in 17 (58,6 %) samples by Koishi (2006) protocol and 2 (6,9 %) by Theodoro *et al.* (2005) protocol. The 12 negatives samples by Koishi (2006) protocol were subjected to an agarose purification procedure and later submitted to Koishi (2006) and Theodoro *et al.* (2005) protocols, two and five samples were positive, respectively. In the total, PCR detected 24 (82,75 %) DNA of the *P. brasiliensis* in 29 samples paraffin-embedded tissues. In conclusion, this study showed that the SCC was the oral pathology that more resembles the PCM oral lesion and may lead to erroneous diagnosis and Koishi (2006) protocol was more sensitive in identifying *P. brasiliensis* and can be used in paraffin-embedded tissues samples.

Keywords: Paracoccidioidomycose. Oral paracoccidioidomycose. *Paracoccidioides brasiliensis*. Squamous cell carcinoma. Paraffin-embedded tissue. PCR

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** – Detecção do fungo *P. brasiliensis* pelo protocolo de Koishi (2006)..... 29
- FIGURA 2** – Detecção do fungo *P. brasiliensis* pelo protocolo de Theodoro *et al.* (2005).. 30
- FIGURA 3** – Detecção do fungo *P. brasiliensis* pelo protocolo de Koishi (2006) em amostras de peças em parafina de carcinoma espino celular 30

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Sequências nucleotídicas e combinações dos oligos nucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR para diagnóstico molecular da PCM	22
TABELA 2 – Dados epidemiológicos de 70 pacientes com PCM bucal	25
TABELA 3 – Número de lesões intra bucais em pacientes com PCM	26
TABELA 4 – Localizações das lesões intra bucais em pacientes com PCM.....	26
TABELA 5 – Diagnóstico diferencial de pacientes com lesão de PCM bucal.....	27
TABELA 6 – Resultado da PCR das 29 amostras parafinizadas de PCM bucal.....	28
TABELA 7 – Resultado da PCR após a purificação do DNA, com o protocolo de Koishi, 2006	28
TABELA 8 – Resultado total da PCR das 29 amostras parafinizadas de PCM bucal	28

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

c.e.c.	Carcinoma espino celular
° C	Centígrados Célcius
DNA	Ácido desoxiribonucléico
dNTPs	Deoxinucleosídeos trifosfatados
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
g	Gravidade
HCl	Ácido clorídrico
L	Litro
M	Molaridade
MgCl₂	Cloreto de magnésio
min	Minutos
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
pb	Pares de bases
<i>P. brasiliensis</i>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PCM	Paracoccidioidomicose
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pg	Picograma
rpm	Rotações por minuto
TE	Tris-EDTA
UEL	Universidade Estadual de Londrina
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 JUSTIFICATIVA	17
3 OBJETIVOS	18
3.1 OBJETIVO GERAL.....	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4 MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 ÉTICA	19
4.2 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS	19
4.3 BIÓPSIAS.....	19
4.4 MICRORGANISMO	20
4.5 REMOÇÃO DA PARAFINA	20
4.6 EXTRAÇÃO DE DNA	20
4.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	21
4.7.1 Método de Koishi, 2006	21
4.7.2 Método de Theodoro <i>et al.</i> , 2005	22
4.8 TRATAMENTO PARA ELIMINAR INIBIDORES DE PCR	23
4.9 CONTROLES	23
4.10 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	23
5 RESULTADOS	24
5.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	24
5.2 DADOS CLÍNICOS.....	26
5.3 DETECÇÃO DE <i>P. BRASILIENSIS</i> POR PCR.....	27
5.4 DETECÇÃO DE <i>P. BRASILIENSIS</i> POR PCR APÓS ELIMINAÇÃO DE INIBIDORES	28
5.5 DETECÇÃO TOTAL DE DNA DE <i>P. BRASILIENSIS</i> POR PCR.....	28
6 DISCUSSÃO	31
7 CONCLUSÃO	36

REFERÊNCIAS	37
ANEXOS	42
Anexo 1 – Oral paracoccidioidomycosis: Differential diagnosis and epidemiological data of 70 patients from Brazil	43
Anexo 2 – Detecção molecular de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> por PCR em biópsias de lesão bucal de paracoccidioidomicose.....	60

1 INTRODUÇÃO

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. Ela é uma das mais importantes micoses sistêmicas na América Latina (Almeida *et al.*, 2003). A PCM é endêmica no Brasil, principalmente nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul e Paraná (Brummer *et al.*, 1993; Bisinelli *et al.*, 2001; Paniago *et al.*, 2003; Verli *et al.*, 2005). Geralmente é aceito que o fungo *P. brasiliensis* cresça como um micélio em solo húmido, rico em material orgânico sem drásticas variações de temperatura (aproximadamente 20°C) e coberto por vegetação. Provavelmente o conídio produzido pelo micélio atue como um propágulo infeccioso e quando inalado para os pulmões sofre uma transformação para a forma de levedura, causando uma infecção primária, podendo ainda ocorrer disseminação para outros sítios por vasos sanguíneos e linfáticos (Almeida *et al.*, 2003).

Há duas diferentes formas de PCM, a aguda e a crônica. A forma aguda representa somente 3 a 5% de todos os casos, afetando principalmente crianças e adolescentes de ambos os gêneros. Caracteriza-se por um curso mais rápido e severo da doença e lesões pulmonares raramente estão presentes. A forma crônica ocorre em mais que 90% dos pacientes, sendo a maioria do gênero masculino (Almeida *et al.*, 2003). Esta preferência possivelmente seja resultado da ação protetora do estrógeno em mulheres. Este hormônio feminino inibe a transição da forma micelial para a forma de levedura (Restrepo *et al.*, 1984; Salazar *et al.*, 1988).

A infecção primária na forma crônica geralmente ocorre nos pulmões, evolui lentamente e pode levar meses ou anos para que se torne estabelecida (Almeida *et al.*, 2003). A forma crônica é classificada como unifocal quando o pulmão é o único órgão afetado e multifocal quando ocorre disseminação da doença via vasos sanguíneos e linfáticos, formando lesões secundárias em outros tecidos, como em mucosa oral, pele, linfonodos e glândulas adrenais (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

Em muitos casos, a primeira e principal manifestação é a lesão bucal. Geralmente, as lesões orais são múltiplas, envolvendo o lábio, gengiva, mucosa bucal, palato, língua e assoalho de boca (Almeida *et al.*, 2003). O processo alveolar e a gengiva são os sítios mais frequentemente envolvidos (Bicalho *et al.*, 2001).

Etilismo e tabagismo são hábitos que estão frequentemente associados com PCM (Blotta *et al.*, 1999). A associação entre PCM e etilismo pode ser explicada pela redução

da função mucociliar, da produção de surfactantes, alteração na imunidade e a má nutrição observada nestes pacientes. Estudos têm mostrado que pacientes com PCM geralmente são tabagistas e que o consumo de 20 ou mais cigarros/dia está associado com uma maior probabilidade de tornar-se doente em média oito anos antes que os não fumantes (Santos *et al.*, 2003). Pacientes etilistas e tabagistas geralmente apresentam alterações na imunidade e má nutrição, com perfil similar a pacientes que desenvolvem carcinoma espino celular (CEC) (Menezes-Garcia *et al.*, 2002).

A lesão bucal tipicamente se manifesta como uma hiperplasia granular eritematosa, com vários pontos hemorrágicos e uma superfície com aspecto de amora chamada de estomatite “moriforme” (Almeida *et al.*, 2003). Porém, microulcerações ou profundas ulcerações podem aparecer eventualmente (Almeida *et al.*, 1991; Sposto *et al.*, 1993).

Nem sempre a lesão bucal de PCM apresenta uma característica típica e esse polimorfismo clínico é responsável pela dificuldade diagnóstica com outras lesões orais como: tuberculose, histoplasmose, sarcoidose e doenças neoplásicas (Blotta *et al.*, 1999; Bicalho *et al.*, 2001) especialmente com CEC (Menezes-Garcia *et al.*, 2002).

Lesões de PCM oral geralmente são diagnosticadas por histopatologia (Almeida *et al.*, 2003). Microscopicamente, observa-se uma inflamação crônica granulomatosa rica em células gigantes, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e *P. brasiliensis* intra celular, o qual pode não ser encontrado ou confundido com outros fungos dimórficos (Brummer *et al.*, 1993). A parte epitelial da lesão oral de PCM apresenta exocitoses, microabcessos e hiperplasia pseudoepiteliomatosa que se assemelha ao CEC e que pode contribuir para o erro de diagnóstico (Menezes-Gracia *et al.*, 2002).

A PCM geralmente é frequentemente diagnosticadas por cultura, histopatologia ou sorologia. Em laboratório, a cultura do fungo é regularmente feita em incubação artificial à uma temperatura ambiente de aproximadamente 25°C, porém o crescimento é lento podendo levar de 20 a 30 dias. Em cortes histopatológicos as células fúngicas são geralmente coradas com hematoxilina e eosina, metanina de prata e Periodic Acid Schiff (PAS). Apesar dos bons resultados, em alguns casos o agente etiológico pode não ser encontrado ou ainda confundido com outros fungos dimórficos como *Histoplasma spp* ou *Coccidioides immiti*. O diagnóstico da PCM muitas vezes é dado pelos testes sorológicos que se baseiam na detecção de anticorpos contra antígenos do fungo, principalmente a gp43, e têm uma importância muito grande nos casos em que *P. brasiliensis* não é observado nos exames de cultura e histopatológicos. O principal teste sorológico para o diagnóstico da PCM é a

reação de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) para a detecção de anticorpos anti-*gp43* (Brummer *et al.*, 1993), onde a *gp43* é uma glicoproteína de 43,000 de peso molecular, sendo a principal componente antigênico do *P. brasiliensis* (Puccia *et al.*, 1986). Em um trabalho realizado por Albuquerque *et al.*, 2005, tentaram obter uma específica reação de ELISA para diagnóstico de PCM, usando um purificado do antígeno *gp43*, tratada com metaperiodato de sódio, na tentativa de eliminar as reações cruzadas com outros fungos (*H. capsulatum* ou *C. albicans*). Apesar de o teste ELISA apresentar alta sensibilidade, a especificidade máxima foi de 84%. Entretanto, mesmo após o tratamento da *gp43*, foi ineficiente em eliminar as reações cruzadas de outros fungos. Além disso, o exame sorológico pode ser influenciado 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, o qual pode carregar diferentes epítomos antigênicos.

As técnicas moleculares são promissoras e podem facilitar um diagnóstico mais conclusivo, com uma alta especificidade e sensibilidade para *P. brasiliensis* e outros fungos, em particular através da utilização de PCR (Reação em cadeia da polimerase) realizada com oligonucleotídeos iniciadores específicos (Goldani *et al.*, 1998).

Em 1998, foi realizado o primeiro trabalho sobre uma reação de PCR para detectar *P. brasiliensis*. Os autores utilizaram oligonucleotídeos iniciadores baseados em uma sequência de DNA específica de *P. brasiliensis* previamente descrita por Goldani *et al.*, 1995 e fizeram a comparação entre a sensibilidade da PCR e da cultura celular. O estudo mostrou que 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 (Goldani *et al.*, 1998).

Mais recentemente a PCR foi utilizada para estudos sobre a ecologia de *P. brasiliensis*. Os autores definiram três pares de oligonucleotídeos iniciadores específicos para dois genes de *P. brasiliensis* que codificam as proteínas de 27 kDa e 43 kDa. Foram utilizados os oligonucleotídeos LO e UP para a detecção do gene *P27* por PCR, enquanto os oligonucleotídeos *gp43-1/gp43-2* e *gp2* e *gpM* foram utilizados numa reação de *nested-PCR* para a detecção do gene *gp43*. Os resultados obtidos mostraram que os oligonucleotídeos utilizados são específicos para *P. brasiliensis*, não havendo reação cruzada com outros fungos como *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Sporothrix schenckii* e *Aspergillus fumigatus*. Com os oligonucleotídeos LO/UP foi possível detectar o DNA do fungo nos linfonodos e fígados de tatus (*Dasyurus novemcinctus*) infectados naturalmente (Diez *et al.*, 1999).

Em um outro trabalho foi analisada a região 5.8S do DNA ribossomal de *P. brasiliensis*. Inicialmente a região genômica contendo o gene 5.8S e os segmentos ITS1 e ITS2 foi seqüenciada. Baseando-se nas seqüências obtidas foram produzidos os oligonucleotídeos Pb-ITS1s e Pb-ITS3a que correspondem às regiões ITS1 e ITS2, respectivamente. O produto da PCR com esses é de 418 pb e foi detectado em todas as 29 cepas de *P. brasiliensis* estudadas, e nenhuma reatividade cruzada foi observada com *A. fumigatus*, *B. dermatitidis*, *C. albicans*, *C. neoformans*, *H. capsulatum* e *Penicillium marneffei* (Imai *et al.*, 2000).

Recentemente, a reação de PCR foi utilizada para diagnóstico da PCM em amostras biológicas. 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. Neste estudo foram desenhados 5 oligonucleotídeos baseados na seqüência do gene da *gp43*, 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 1ª reação e os oligonucleotídeos PC2/PC6 na 2ª reação foram positivas com amostras de escarros obtidos de pacientes com PCM crônica (Gomes *et al.*, 2000). Em outro estudo, uma *nested* PCR foi desenvolvida para a detecção do DNA de *P. brasiliensis* em extrato homogeneizado de pulmão de camundongos experimentalmente infectados, utilizando a seqüência do gene *gp43* como alvo (Bialek *et al.*, 2000). Posteriormente, 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* (Vidal *et al.*, 2005). E, também, para a detecção de DNA de *P. brasiliensis* em 33 amostras de soro de pacientes com PCM não tratados e com diferentes formas clínicas. Neste trabalho foi observada uma baixa positividade, das 33 amostras testadas apenas uma foi positiva na *nested* PCR (Charbel *et al.*, 2006). Utilizando uma outra metodologia, com oligonucleotídeos que codificam para o gene da *gp43* em amostras de soro de pacientes com PCM, uma baixa positividade foi também observada por outros autores (Itano *et al.*, 2002).

A reação de PCR, além de ser útil no diagnóstico de várias doenças, também pode ser usada para estudar a associação de agentes biológicos em uma mesma doença ou lesão e para estudos retrospectivos de uma grande variedade de tecidos de arquivos histopatológicos onde o diagnóstico já tenha sido estabelecido (Shibata *et al.*, 1988).

O arquivo mais comum de amostras de humanos é o tecido fixado em formalina e embebido em parafina. Existem apenas dois estudos sobre a detecção de *P. brasiliensis* em tecidos parafinizados. O primeiro estudo na utilização da PCR para a detecção de *P. brasiliensis* com tecidos de camundongos infectados e fixados em blocos de parafina foi realizado em 2001. Os autores desenvolveram duas *nested* PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores baseados no gene da *gp43* e para a região ITS1- 5,8S- ITS2 do DNA ribossomal do *P. brasiliensis*. Ambas as reações foram eficientes na detecção deste fungo em tecido fixados em blocos de parafina (Sano *et al.*, 2001). Mais recentemente, foi utilizada uma *primer-extension-preamplification* (PEP)-*nested* PCR, baseada nos oligonucleotídeos iniciadores para o gene da *gp43*, para detecção do DNA de *P. brasiliensis* em 107 biópsias de tecidos parafinizadas de pacientes com PCM (Ricci *et al.*, 2007).

Contudo, o DNA extraído de tecidos parafinizadas pode não ser adequado para técnicas moleculares, visto que se apresenta parcialmente degradado (Libório *et al.*, 2005). A principal razão pelas quais os tecidos colocados em blocos de parafina sofrem degradação é a insuficiente neutralização da formalina (Shibata *et al.*, 1988). O agente fixador e o tempo de fixação por períodos prolongados podem levar a uma redução na amplificação do DNA (Ben-Ezra *et al.*, 1991).

2 JUSTIFICATIVA

Embora o diagnóstico da PCM bucal seja geralmente realizado pela análise histológica das lesões, ele pode ser inconclusivo nos casos em que o agente etiológico não é encontrado e devido também à presença de formas semelhantes a outros fungos patogênicos, como o *H. capsulatum*. Além disso, em pequenas amostras da lesão, o erro de diagnóstico pode ocorrer devido à semelhança da lesão oral de PCM com outras lesões orais, principalmente a lesão de carcinoma espino celular.

Este estudo propõe fazer um levantamento dos dados epidemiológicos e clínicos de 70 pacientes com PCM bucal atendidos pelo Centro de Ciências da Saúde, Centro Odontológico Universitário e Pronto Socorro e avaliar a aplicação de dois protocolos de PCR para a detecção molecular do DNA de *P. brasiliensis* em biópsias de lesão bucal parafinizadas. Com isso, contribuindo para o diagnóstico da PCM e para estudos retrospectivos usando tecidos embebidos em parafina e mantidos em arquivos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Detectar o DNA do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* por PCR em biópsias de lesão bucal de paracoccidioidomicose.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar um levantamento de dados epidemiológicos e clínicos de pacientes com paracoccidioidomicose bucal atendidos pelo CCS-COU-PS (Centro de Ciências da Saúde, Centro Odontológico Universitário e Pronto Socorro);

- Avaliar a metodologia descrita por Koishi (2006) para a detecção de *P. brasiliensis* em lesões bucais embebidas em parafina;

- Avaliar a metodologia descrita por Theodoro *et al.* (2005) para a detecção de *P. brasiliensis* em lesões bucais embebidas em parafina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ÉTICA

Este projeto foi aprovado pela comissão de ética em seres humanos da Universidade Estadual de Londrina conforme o parecer nº 301/06.

4.2 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS

Foram analisados 70 prontuários de pacientes com lesão bucal, que foram atendidos entre os anos de 1991 a 2006 no Centro Odontológico da Universidade Estadual de Londrina, Estado do Paraná, Brasil. Todos os pacientes tinham diagnóstico de PCM confirmados por histopatologia. Foram coletados dados referentes à idade dos pacientes, gênero, ocupação, hábitos como tabagismo e etilismo e o diagnóstico diferencial.

4.3 BIÓPSIAS EM PARAFINA

Foram utilizadas 29 biópsias de lesões bucais de pacientes com diagnóstico de PCM e 09 biópsias de lesões bucais de pacientes com diagnóstico de carcinoma espinocelular. Todos os diagnósticos foram confirmados por histopatologia. Todas as amostras foram fixadas em 10% de formalina e embebidas em blocos de parafinas. As amostras foram obtidas do Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina.

4.4 MICRORGANISMO:

Formas leveduriformes de *Paracoccidioides brasiliensis* cepa LDR1 foram crescidas em meio ágar Sabouraud a 37°C com sub-cultivos a cada 15 dias. Para a extração de DNA foram utilizadas amostras fúngicas com sete dias de cultura (Ono *et al.*, 2003).

4.5 REMOÇÃO DA PARAFINA DAS PEÇAS DE PCM BUCAL

A parafina foi removida utilizando a metodologia descrita por Bialek *et al.*, 2003. Inicialmente, duas secções de 10 µm das peças em parafina foram colocadas em um tubo plástico de 1,5 ml. A seguir foi adicionado 1 ml de xilol. Após agitação por 5 minutos a 100 rpm, à temperatura ambiente, a amostra foi centrifugada a 10.000 g por 2 minutos. O tratamento com o xilol foi repetido duas vezes até a completa remoção da parafina das peças. O sobrenadante foi removido e a amostra foi lavada com 1 ml de etanol absoluto, centrifugada a 10.000 g por 3 minutos e congelada a -20°C até o uso.

4.6 EXTRAÇÃO DO DNA

As extrações do DNA foram feitas segundo o método de Hu *et al.*, 2003. Em aproximadamente 100 µg da cepa LDR1 de *P brasiliensis* mantida em cultura e nas amostras de tecido desparafinizados foi adicionado 100 µl de água ultra-pura estéril. Em seguida, foi adicionado o mesmo volume de tampão de extração de DNA (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 0,15M NaCl, 2% sódio dodecil sulfato, e proteinase K para uma concentração final de 0,5 mg/ml). A mistura foi incubada a 55°C durante aproximadamente 18 horas. Após este período 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 a temperatura ambiente, foi adicionado um volume igual de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e a mistura centrifugada a 12.000 x g por 5 min. O sobrenadante foi transferido para um novo

tubo, e o mesmo procedimento foi repetido. O DNA foi precipitado com 2,5 volumes de etanol 100 % a - 20°C e 0,1 volume de acetato de sódio a 3 M e em seguida centrifugado a 12.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi lavado adicionando etanol 70 % e centrifugado a 12.000 g por 10 minutos. Após a retirada do sobrenadante e secagem, a amostra de DNA foi dissolvida em 50 µl de água destilada e estocada a -20°C até o uso para PCR.

4.7 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE

As amostras de DNA proveniente de material clínico parafinizados, juntamente com os controles foram submetidas a dois diferentes protocolos de PCR: Koishi, 2006 e Theodoro *et al.*, 2005. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados, as seqüências e tamanho do produto de amplificação estão listados na tabela 1.

4.7.1 Método de Koishi, 2006

Koishi (2006) utilizou três oligonucleotídeos iniciadores em uma *semi Nested-PCR*. Os oligonucleotídeos externos ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990) foram usados na primeira reação e um oligonucleotídeo interno MJ03 que foi usado em conjunto com o oligonucleotídeo ITS1 na segunda reação. As reações foram feitas com um volume final de 25 µl de mistura de reagentes [tampão 1x (20 mM Tris-HCl, pH 8,4 e 50 mM KCL - Invitrogen), 2,5 mM MgCl₂ (Invitrogen), 0,25 dNTP (Invitrogen), 0,2 µM de cada oligonucleotídeo, 1 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 5 µl de DNA ressuspenso em 50 µl de água e água esterilizada para completar a reação]. As duas reações foram realizadas em um termociclador Máster Cycler (Eppendorf) nas seguintes condições: 95°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e extensão final em 72°C por 5 minutos. Para a 2ª reação foi utilizada 1 µl do produto da 1ª reação como molde.

4.7.2 Método de Theodoro *et al.*, 2005

Theodoro *et al.* (2005) utilizaram quatro oligonucleotídeos em uma *Nested-PCR*. Os oligonucleotídeos externos foram ITS4/ITS5 (White *et al.*, 1990) e os oligonucleotídeos internos foram Pb ITSE/ Pb ITSr. As reações foram feitas com um volume final de 25 µl de mistura de reagentes [tampão 1x (20 mM Tris-HCl, pH 8,4 e 50 mM KCL - Invitrogen), 0,2 mM de dNTPs (Invitrogen), 0,4µM de cada oligonucleotídeo, 1,25 unidade da Taq DNA polimerase (Invitrogen), 5 µl de DNA ressuspendidos em 50 µl de água e água esterilizada para completar a reação]. As reações foram realizadas em um termociclador Máster Cycler (Eppendorf) nas seguintes condições: 1ª reação para ITS4/ITS5, 94 °C por 5 minutos, seguido de 25 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 60 °C por 2 minutos, 72 °C por 2 minutos e extensão final em 72 °C por 2 minutos. Para a 2ª reação com Pb ITSE/Pb ITSr as condições foram similares, porém a temperatura de anelamento foi de 62 °C e foram utilizados 2 µl do produto da 1ª reação como molde.

Tabela 1 – Sequências nucleotídicas e combinações dos oligos nucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR para diagnóstico molecular da PCM

Primers	Seqüência	Pares	Amplificação	Referências
ITS1 ITS4	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	ITS1/ITS4	620	White (1990)
ITS1 MJ03	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' 5'-GTCTCAGACGTCAAAGCTCC-3'	ITS1/MJ03	212	Koishi(2006)
ITS4 ITS5	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' 5'-CCGAGTGCGGCCTCTGGGTCC-3'	ITS4/ITS5	634	White (1990)
PbITSE PbITSr	5'-GAGCTTTGACGTCTGAGACC-3' 5'-AAGGGTGTGATCGAGAGAG-3'	PbITSE/PbITSr	387	Theodoro (2005)

4.8 TRATAMENTO PARA ELIMINAR INIBIDORES DE PCR

A eliminação dos inibidores de PCR foi feita segundo o método descrito por Moreira, 1998 com modificações. O DNA das 12 amostras que tiveram seus resultados negativos pelo protocolo de Koishi (2006) foi misturado v/v em agarose de baixo ponto de fusão a 1,6%. A mistura foi transferida para um molde estéril antes da solidificação. Os blocos de agarose foram então dialisados contra 15 ml de tampão TE por 24h. A PCR foi feita com 5 µl da agarose contendo o DNA mantido a 60°C.

4.9 CONTROLES

Como controles negativos das reações foram utilizados água esterilizada e o DNA extraído das peças de CEC. Como controle positivo foi utilizado 5 ng DNA extraídos da cepa LDR1 de *P. brasiliensis*, quantificado por espectrofotometria.

4.10 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os produtos de amplificação das PCRs foram visualizados em gel de poliacrilamida a 8% e corados com nitrato de prata descrito por Herrinz *et al.*, 1982.

5 RESULTADOS

5.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

As idades dos pacientes com PCM oral variaram entre 20 e 87 anos com uma média de de 51 anos e o pico de incidência estava entre a quinta e sexta década. Sessenta e sete pacientes eram homens e três eram mulheres, com uma proporção homem:mulher de 22:1. A maioria dos pacientes (39 casos) era trabalhador rural, seguido por pedreiro (10 casos) e outros 21 casos estavam distribuídos em comerciantes (6), vendedores (4), aposentados (4), empresários (3), marceneiros (2), parteiro (1) e dona de casa (1). Entre os setenta pacientes 64 (91,43%) eram tabagistas. Pacientes etilistas crônicos que consumiam bebida alcólica diariamente estavam presentes em 35 (50%) casos e pacientes etilistas não crônicos eram 28 (40%) casos. Entretanto, ambos os hábitos estavam presente em 59 (84%) dos casos. (Tabela 2).

Tabela 2 – Dados Epidemiológicos de 70 pacientes com PCM bucal, atendidos no Centro Odontológico da UEL entre os anos de 1991 e 2006

Idade	n	%
21 – 30	02	2,86
31- 40	13	18,57
41 – 50	21	30,00
51 – 60	19	27,14
≥ 61	15	21,43
Gênero		
Masculino	67	95,71
Feminino	03	4,29
Ocupação		
Trabalhador rural	39	55,71
Pedreiro	10	14,29
Outros	21	30,00
Tabagismo		
Tabagista	64	91,43
Não Tabagista	06	8,57
Etilismo		
Crônico	35	50,00
Não crônico	28	40,00
Não etilista	07	10,00
Tabagismo e etilismo		
Tabagista e etilista	59	84,29

5.2 DADOS CLÍNICOS

Com relação à frequência das lesões bucais no momento do diagnóstico, foi observado que 35 (50%) dos pacientes apresentavam três lesões ou mais, enquanto 14 (20%) tinham duas lesões e 21 (30%) pacientes tinham apenas uma lesão (Tabela 3).

Tabela 3 – Número de lesões intra bucal em pacientes com PCM

Nº lesões/paciente	N	%
1	21	30
2	14	20
≥ 3	35	50

Em relação à localização das 181 lesões bucais encontradas em setenta pacientes, o processo alveolar e a gengiva foram os sítios mais frequentemente envolvidos com 47 (25,9%), seguidos dos lábios 33 (18,2%), palato 31 (17,13%), mucosa jugal 22 (12,5%) e o local com menor ocorrência foi na faringe 5 (2,7%) (Tabela 4).

Tabela 4 – Localizações das lesões intra bucais em pacientes com PCM

Sítios das lesões	n	%
Processo alveolar/gengiva	47	25,97
Lábios	33	18,23
Palato	31	17,13
Mucosa jugal	22	12,15
Vestíbulo bucal	15	8,29
Assoalho de boca	13	7,18
Língua	09	4,97
Comissura labial	06	3,31
Faringe	05	2,76

Entre os 70 casos de PCM diagnosticados por exame histopatológico, os dados coletados mostram que a PCM foi o diagnóstico clínico inicial em 29 (41,43%) pacientes. Enquanto em 33 (47,14%), o diagnóstico clínico inicial foi de PCM ou CEC. É importante ressaltar que em 3 (4,29%) casos o diagnóstico clínico inicial foi de CEC, e o diagnóstico final foi feito pelo exame histopatológico. Além disso, em quatro casos o diagnóstico diferencial com PCM bucal foi com leishimaniose (n=3) e histoplasmose (n=1). (Tabela 5).

Tabela 5 – Diagnóstico diferencial de pacientes com lesão de PCM bucal

Diagnóstico Diferencial	n	%
PCM/CEC	33	47,14
PCM	29	41,43
CEC	03	4,29
SDC	01	1,42
PCM/Outros	04	5,72

PCM – Pacientes com diagnóstico de PCM no exame clínico inicial; PCM/CEC – Pacientes com ambos PCM ou CEC no exame clínico inicial; CEC – pacientes com diagnóstico de CEC no exame inicial; SDC – sem diagnóstico clínico no exame clínico inicial; PCM/outros – pacientes com ambos PCM/ leishimaniose (n=3) ou PCM/histoplasmose (n=1) no exame inicial.

5.3 DETECÇÃO DE *P. BRASILIENSIS* POR PCR

Das 29 amostras de lesão bucal de PCM, 17 (58,6%) foram positivas e 12 (41,4%) foram negativas quando analisadas pelo protocolo de Koishi (2006). Por outro lado, 02 (6,9%) foram positivas e 27 (93,1%) foram negativas pelo protocolo de Theodoro *et al.* (2005). (Tabela 6) e (Figuras 1 e 2)

Tabela 6 – Resultado da PCR das 29 amostras parafinizadas de PCM bucal

Protocolos	Positivos	%	Negativos	%
Koishi (2006)	17	58,6%	12*	41,4%
Theodoro <i>et al.</i> (2005)	02	6,9%	27	93,1%

*Amostras negativas que foram purificadas posteriormente

5.4 DETECÇÃO DE *P. BRASILIENSIS* POR PCR APÓS ELIMINAÇÃO DE INIBIDORES

As 12 amostras negativas pelo protocolo de Koishi (2006) e que foram purificadas por diálise, foram novamente analisadas por PCR com os protocolos de Koishi (2006) e Theodoro *et al.* (2005). O resultado obtido foi que pelo protocolo de Koishi (2006), 02 (16,7%) amostras foram positivas e 10 (83,3%) continuaram negativas e pelo protocolo de Theodoro *et al.* (2005), 05 (41,6%) foram positivas e 07 (58,4%) continuaram negativas. (Tabela 7).

Tabela 7 – Resultado da PCR após a purificação do DNA, com o protocolo de Koishi, (2006)

Protocolos	Positivos	%	Negativos	%
Koishi (2006)	02	16,7%	10	83,3%
Theodoro <i>et al.</i> (2005)	05	41,6%	07	58,4%

5.5 DETECÇÃO TOTAL DE DNA DE *P. BRASILIENSIS* POR PCR

Das 29 amostras de lesão bucal de PCM parafinizada, 24 (82,75%) foram positivas e 5 (17,25%) permaneceram negativas.

Tabela 8 – Resultado total da PCR das 29 amostras parafinizadas de PCM bucal

Protocolos	Positivos	%
Koishi (2006) e Theodoro <i>et al.</i> (2005)	24	82,75

Na figura 1 está representada o produto de amplificação do DNA pelo protocolo de Koishi (2006) em amostras de peças em parafina de lesão bucal de PCM. As amostras A02, A03 e A05 representam as reações positivas para *P. brasiliensis* e as amostras A019, A023, A04 e A20 representam as reações negativas para o fungo. Após a purificação as amostras A04 e A20 foram positivas para *P. brasiliensis* pelo protocolo de Koishi (2006).

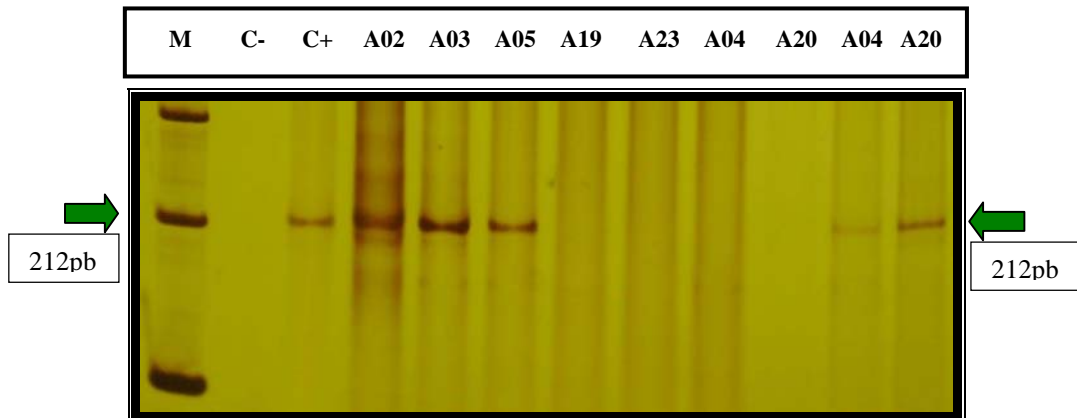


Figura 1 – Perfil eletroforético dos produtos da segunda reação de amplificação do DNA, de pacientes com diagnóstico clínico de PCM, pelo protocolo de Koishi (2006). Gel de poliacrilamida 8% corado por nitrato de prata. M (Ladder 100pb, Invitrogen). Amostras A02, A03 e A05 positivas para *P. brasiliensis*. Amostras A019, A023, A04 e A20 negativas. Amostras A04 e A20 positivas após a eliminação dos inibidores. C- controle negativo e C+ controle positivo LDR1.

A figura 2 representa o perfil eletroforético dos produtos de amplificação do DNA pelo protocolo de Theodoro *et al* (2005) das amostras das peças em parafina de lesão bucal de PCM. As amostras: A06 e A10 foram positivas para *P. brasiliensis*, porém foram negativas para o método de Koishi (2006). As amostras A01, A06, A09, A14 e A20 foram negativas para o fungo pelo método de Koishi (2006); porém a amostra A06 foi resultado positivo pelo método de Theodoro *et al.* (2005). Após a purificação pelo método de Theodoro *et al.* (2005) as amostras A01, A06, A09, A14 e A20 foram positivas para o fungo. Tendo a amostra A20 seu DNA amplificado pelos dois métodos.

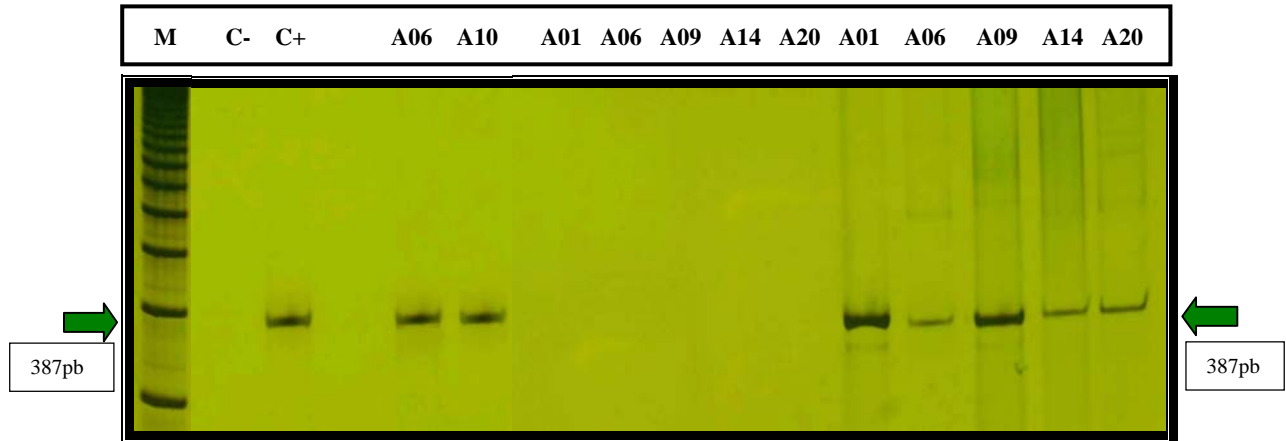


Figura 2 – Perfil eletroforético dos produtos da segunda reação de amplificação do DNA, de pacientes com diagnóstico clínico de PCM, pelo protocolo de Theodor *et al.* (2005). Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado por impregnação por nitrato de prata. M (Ladder 100pb, Invitrogen). Amostras: A06 e A10 positivas. Amostras: A01, A06, A09, A14 e A20 negativas pelo método de Koishi, 2006. Amostras: A01, A06, A09, A14 e A20 positivas a eliminação dos inibidores. C- controle negativo e C+ controle positivo.

Para avaliar a especificidade da reação de PCR pelo protocolo de Koishi (2006) peças de pacientes com diagnóstico de CEC foram submetidas ao mesmo protocolo e os resultados estão mostrados na figura 3.

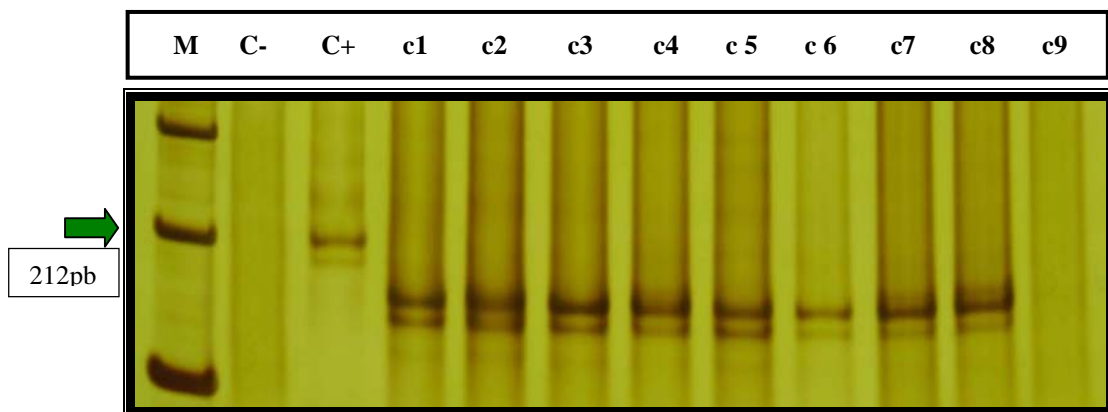


Figura 3 – Perfil eletroforético dos produtos da segunda reação de amplificação do DNA, de pacientes com diagnóstico clínico de CEC, pelo protocolo de Koishi (2006). Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado por impregnação por nitrato de prata. M (Ladder 100pb, Invitrogen). Amostras: c1 – c9 negativas. C- controle negativo e C+ controle positivo.

6 DISCUSSÃO

Pesquisas epidemiológicas utilizando exames sorológicos em humanos e em cachorros mostram que o Norte do Estado do Paraná, incluindo a cidade de Londrina, é uma área endêmica de PCM (Ono *et al.*, 2001; Botteon *et al.*, 2002; Fornajeiro *et al.*, 2005) No Centro Odontológico Universitário da Universidade Estadual de Londrina, setenta casos de PCM foram diagnosticados entre 1991 e 2006. A maioria dos pacientes eram homens adultos, com idade entre 21 e 87 anos com a média de idade de 51 anos, 39 (55.7%) eram trabalhadores rurais e a proporção homem:mulher foi de 22:1. Muitos estudos têm mostrado que a PCM é uma doença crônica que atinge principalmente os homens adultos e trabalhadores rurais (Verli *et al.*, 2005; Paniago *et al.*, 2003; Bicalho *et al.*, 2001; Bisinelli *et al.*, 2001; Blotta *et al.*, 1999; Sposto *et al.*, 1993). Esta preferência por gênero masculino possivelmente seja resultado da ação protetora do estrógeno. Este hormônio feminino inibe a transição do conídio ou do micélio para a forma de levedura (Salazar *et al.*, 1988; Restrepo *et al.*, 1984).

O etilismo e o tabagismo são frequentemente associados com a PCM (Blotta *et al.*, 1999; Somensi *et al.*, 1997). Neste estudo a maioria dos pacientes eram etilistas. Diversos estudos têm mostrado que muitos pacientes com PCM têm histórico de consumo de álcool e apresentam um risco aumentado de desenvolver a PCM (Paniago *et al.*, 2003; Menezes-Garcia *et al.*, 2002; Blotta *et al.*, 1999; Martinez and Moya, 1992). A associação entre PCM e etilismo pode ser explicada pela redução da função mucociliar e produção de surfactantes pelas células do epitélio pulmonar, e pela alteração na imunidade e má nutrição observada nestes pacientes. Em relação ao tabagismo, 64 (91,43%) dos pacientes analisados neste estudo eram fumantes. Outros estudos têm mostrado que pacientes com PCM geralmente são tabagistas e que o consumo de 20 ou mais cigarros/dia está associado com uma maior probabilidade de tornar-se doente, em média oito anos antes que os não fumantes. O cigarro apresenta substâncias irritantes e uma das conseqüências é a alteração na atividade dos macrófagos que podem conduzir ao desenvolvimento de uma inflamação brônquica crônica e destruição alveolar favorecendo a instalação de infecções respiratórias (Santos *et al.*, 2003). Pacientes etilistas e tabagistas geralmente apresentam alterações na imunidade e má nutrição, com perfil similar aos pacientes que desenvolvem CEC (Menezes-Garcia *et al.*, 2002).

A cavidade bucal é local de maior ocorrência de lesão na PCM crônica. Em trabalho realizado com 45 pacientes com PCM crônica, 26 (57,7%) apresentavam lesão oral e apenas 10 (22,2%) apresentavam lesões pulmonares (Somensi *et al.*, 1997). Tradicionalmente, pacientes desenvolvem múltiplas lesões bucais que são ulceradas, com pontos hemorrágicos e aparência de amora que primariamente afetam a gengiva e o rebordo alveolar, palato, lábios e mucosa bucal são frequentemente envolvidos (Bicalho *et al.*, 2001; Sposto *et al.*, 1993). Neste estudo 70 % dos pacientes tem múltiplas lesões bucais e os sítios mais frequentemente envolvidos foram a gengiva e o rebordo alveolar 47 (25,97 %), o lábio 33 (18,23 %), o palato 31 (16,93 %) e a mucosa jugal 22 (12,15%). O assoalho de boca 13 (7,18%) e a língua 9 (4,97%) foram afetados em menor proporção. Os resultados estão de acordo com obtidos em outros estudos (Verli *et al.*, 2005; Sposto *et al.*, 1994; Sposto *et al.*, 1993).

A lesão bucal de PCM sem tratamento expande, torna-se ulcerada e proliferativa ocupando extensas áreas da mucosa oral. Devido ao caráter crônico e progressivo as lesões orais podem se assemelhar com lesões neoplásicas, especialmente o CEC (Kaminagakura *et al.*, 2003; Menezes-Garcia *et al.*, 2002). Em geral, é considerado que qualquer ulceração crônica da mucosa bucal que não tende a cicatrizar em duas semanas é uma lesão maligna ou uma infecção específica (Menezes-Garcia *et al.*, 2002).

O diagnóstico diferencial de PCM oral inclui o CEC e outras doenças granulomatosas, como a histoplasmose e a leishmaniose (Menezes-Garcia *et al.*, 2002; Bisinelli *et al.*, 2001). Em nosso estudo, na primeira avaliação clínica o CEC e a PCM foram considerados como a causa das lesões observadas em 33 casos. E, em três pacientes o CEC foi o único diagnóstico clínico quando da primeira avaliação. Em todos estes casos, o diagnóstico final foi estabelecido com o exame histopatológico das lesões. Esses resultados mostram que lesão de PCM bucal assemelha-se com c.e.c. na maioria dos pacientes e em todos os casos o exame histopatológico é necessário para estabelecer o diagnóstico final (Kaminagakura *et al.*, 2003; Menezes-Garcia *et al.*, 2002). Considerando a importância do exame histopatológico para o diagnóstico da PCM, é importante salientar que a remoção de espécimes pequenos da lesão pode levar ao erro de diagnóstico (Menezes-Garcia *et al.*, 2002).

O material fixado em formalina e embebido em parafina constitui hoje a maior fonte de tecido humano mantidos em arquivos. Alguns estudos mostram que esse material pode ser fonte para análises retrospectivas usando ferramentas moleculares, o que vem permitindo identificarem falhas no diagnóstico histopatológico (Bialek *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 1996). Para a identificação de espécies de *Candida* em biópsias de lesão oral de candidíase hiperplásica crônica embebidas em parafina. Foram utilizadas 18 peças em

parafina com diagnóstico histopatológico de *Candida*, onde 12 (66,6%) amostras foram positivas para *Candida albicans* e em outras duas, espécies de *Candida glabrata*. Este resultado pode indicar o envolvimento das duas espécies na lesão (Williams *et al.*, 1996). Em outro estudo, a PCR foi utilizada para a identificação molecular de fungos em 40 amostras de tecidos em parafina de pacientes com diagnóstico histopatológico de aspergilose e zigomicose. Nas 17 amostras de pacientes com diagnóstico de aspergilose, DNA específico do fungo foi amplificado em 11 amostras. Enquanto nas 23 amostras de zigomicose 14 gêneros específicos e espécies foram identificados. Porém, em uma das amostras de pacientes com zigomicose foi amplificado DNA específico de *Aspergillus fumigatus*. Além disso, houve a detecção de uma infecção fúngica mista com *Absidia corymbifera* e *Aspergillus fumigatus* em uma amostra e em outras duas os fungos identificados foram *Rhizopus arrhizus* e *Aspergillus fumigatus* (Bialek *et al.*, 2005). Estes estudos mostram que o diagnóstico histopatológico pode falhar e que métodos moleculares podem auxiliar no diagnóstico.

Poucos estudos têm sido feito sobre a identificação molecular de *P. brasiliensis* em biópsias embebidas em blocos de parafina. Sano *et al.*, 2001 utilizaram tecidos de camundongos infectados com *P. brasiliensis* embebidos em blocos de parafina e padronizaram uma *nested*-PCR para a detecção molecular do fungo. Mais recentemente, a PEP-PCR foi utilizada para a detecção de *P. brasiliensis* em tecidos de arquivos de pacientes com PCM em blocos de parafina (Ricci *et al.*, 2007).

Neste estudo, das 29 amostras de tecidos em parafina de lesão bucal de PCM testadas por PCR 17 (58,6%) amostras foram positivas e 12 (41,4%) foram negativas pelo protocolo de Koishi, 2006. Por outro lado, com o protocolo de Theodoro *et al.*, 2005, 2 (6,9%) das amostras foram positivas e 27 (93,1%) foram negativas. Além disso, a metodologia apresentada por Koishi, 2006 apresentou uma positividade superior (58,6 %) comparada ao trabalho desenvolvido por Ricci *et al.*, 2007 com (29%), onde utilizaram uma PEP-PCR em tecidos de arquivos de pacientes com PCM em blocos de parafina. Resultados negativos com amostras de DNA extraídas de tecidos em parafina são frequentemente observados. Em um estudo para mostrar a especificidade da reação de PCR, o DNA foi extraído de 25 amostras de tecidos em parafina de cachorros que morreram de blastomicose e 33 amostras de tecidos de cachorros que morreram de linfossarcoma. O diagnóstico histopatológico foi confirmado em 13 amostras de blastomicose e nas 33 de linfossarcoma. A reação de PCR para *B. dermatitidis* amplificou apenas oito das 13 amostras e nenhum produto da PCR foi amplificado nas 12 amostras negativas histologicamente nem nas 33 amostras de linfossarcoma (Bialek *et al.*, 2003).

Provavelmente os resultados negativos obtidos ocorrem pela degradação ou ausência de DNA amplificável devido aos métodos de fixação e estocagem das peças em parafina, excesso de proteína e da presença de microrganismos contaminantes nas amostras (Ricci *et al.*, 2007; Bialek *et al.*, 2005; Libório *et al.*, 2005; Bialek *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 1996). O DNA extraído de tecidos parafinados por vezes não é adequado para técnicas moleculares, visto que se apresenta parcialmente degradado (Libório *et al.*, 2005). A razão porque os tecidos fixados em parafina sofrem degradação é a insuficiente neutralização da formalina, reagindo com o DNA e impedindo sua amplificação (Shibata *et al.*, 1988). Para ocorrer a reação, é necessário destruir as pontes de hidrogênio, por exemplo, por aquecimento. A impregnação com a parafina utiliza temperaturas elevadas e durante esse processo o DNA pode reagir com o formaldeído remanescente (Jackson *et al.*, 1994). O agente fixador e o tempo de fixação por períodos prolongados podem levar a uma redução de DNA (Ben-Ezra *et al.*, 1991) e a utilização do formaldeído na prática histológica se dá pelo seu baixo custo, estabilidade, compatível em quase todos os tecidos e não coagulativo (Jackson *et al.*, 1994).

A lenta degradação que o DNA das peças em parafinas sofre com o tempo, gerando fragmentos de DNA de pequeno tamanho. Os segmentos de DNA pequeno ainda podem ser úteis como substratos para a PCR e requerem o uso de oligonucleotídeos que gerem produtos de menor número de pares de bases (Libório *et al.*, 2005; Siwoski *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 1996, Ben-Ezra *et al.*, 1991). Em nosso trabalho não encontramos correlação com o tempo de estocagem das peças e amplificação do DNA e ambos os protocolos utilizados geram produtos de pequena amplificação (600-200pb).

A diferença entre a positividade obtida com a metodologia de Koishi, 2006 e a obtida com a metodologia de Theodoro *et al.*, 2005 pode estar relacionada ao número de ciclos utilizado pela PCR. A reação de Koishi, 2006 tem 35 ciclos, enquanto, a reação de Theodoro *et al.*, 2005 tem 25 ciclos. Geralmente os protocolos de PCR apresentam de 35 a 39 ciclos para as amostras de tecidos em parafina (Ricci *et al.*, 2007; Libório *et al.*, 2005; Bialek *et al.*, 2005). Além disso, a diferença entre a positividade obtida com a metodologia de Koishi, 2006 e a obtida com a metodologia de Ricci *et al.*, 2007 pode estar relacionada aos oligonucleotídeos utilizados, onde a reação de Koishi, 2006 trabalhou com oligonucleotídeos que codificam para a região ITS1-5.8s-ITS2 do DNAr do fungo *P. brasiliensis* e Ricci *et al.*, 2007 utilizaram oligonucleotídeos que codificam para o gene da *gp43*. E segundo Sano *et al.*, 2001, oligonucleotídeos que detectam o gene que codifica a *gp43* apresentam menor sensibilidade na detecção, que oligonucleotídeos que codificam para a região ITS1-5.8s-ITS2 do DNAr do fungo.

Resultados negativos na amplificação de DNA também podem ser explicados pela contaminação por componentes orgânicos e inorgânicos (ex: polissacarídeos, uréia, ácido húmico ou hemoglobina) e que são contaminantes comuns em amostras de DNA e não podem ser completamente removidos pela extração com fenol. Eles podem interferir com a reação, levando a diferentes graus de atenuação até a completa inibição. Uma alternativa é submeter o DNA obtido a um processo de purificação em agarose. Durante o processo grandes moléculas DNA permanecem retidas na malha de agarose e pequenos fragmentos de DNA e os contaminantes são difundidos para fora do gel durante os passos de lavagem (Moreira, 1998). Neste estudo a purificação das 12 amostras negativas resultou em 2 (16,7%) amostras positivas e 10 (83,3%) negativas pelo protocolo de Koishi, 2006 e 5 (41,6%) amostras positivas e 7 (58,4%) negativas pelo protocolo de Theodoro *et al.*, 2005, sugerindo que o protocolo de Theodoro *et al.*, 2005 é mais sensível aos inibidores que o protocolo de Koishi, 2006.

Em nosso trabalho, das 29 amostras de lesão bucal de PCM em parafina, conseguimos uma amplificação de DNA do *P. brasiliensis* em 24 (82,75%) das amostras, mostrando a eficiência da reação de PCR em um retrospectivo estudo de diagnóstico molecular da PCM bucal.

7 CONCLUSÕES

Este estudo mostrou que a maioria dos pacientes com diagnóstico de PCM atendidos pelo Centro Odontológico Universitário da UEL, eram homens adultos, trabalhadores rurais, tabagistas, etilistas, apresentam múltiplas lesões e que o processo alveolar e a gengiva foram os sítios mais frequentemente afetados. Em relação ao diagnóstico diferencial foi observado que CEC era a patologia oral que mais clinicamente se assemelha á lesão de PCM oral e pode levar a um erro de diagnóstico. Embora a método de Koishi (2006) detectou DNA de *P. brasiliensis* em maior quantidade de amostras parafinadas, o protocolo de Theodoro *et al.* (2005) foi mais sensível para amostras purificadas.

REFERÊNCIAS

Albuquerque CF. Improvement of the specificity of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for diagnosis of paracoccidioidomycosis. **J Clin Microbiol** 2005; Apr:1944-1946.

Almeida OP, Jacks JJ, Scully C. Paracoccidioidomycosis of the mouth an emerging deep mycosis. **Crit Rev Oral Biol Med** 2003; 14: 268-274.

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.

Ben-Ezra J, Johnson DA, Rossi J, Cook N, Wu A. Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase chain reaction. **J Histo and Cyto** 1991; 39: 351-354.

Bialek R, Konrad F, Kern J, Cecenas L, Gonzales GM, Just-Nübling G, Willinger B, Presterl E, Lass-Flörl C, Rickerts V. PCR based identification and discrimination of agents of mucormycosis and aspergillosis in paraffin wax embedded tissue. **J Clin Pathol** 2005; 58: 1180-1184.

Bialek R, Cirera AC, Herrmann T, Aepinus C, Serán-Bochsler VI, Legendre AM. Nested PCR assays for detection of *Blastomyces dermatitidis* DNA in paraffin-embedded canine tissue. **J Clin Microbiol** 2003; 41: 205-208.

Bialek R, Ibricevic A, Aepinus C, Najvar LK, Fothergill AW, Knobloch J, Graybill JR. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a nested PCR assay. **J Clin Microbiol** 2000; 38: 2940-2942.

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: 683-687.

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

Blotta MH, Manoni RL, Oliveira SJ, Cogger SA, Papaiordanou PM, Goveia A, Camargo ZP. 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: 390-394.

Botteon FAG, Camargo ZP, Benardi G, Coelhos RF, Chamone DAF, and Itano EM. *Paracoccidioides brasiliensis*-reactive antibodies in Brazilian blood donors. **Med Mycol** 2002, 40: 387-391.

Charbel, CE, Levi JE, Martins JE. Evaluation of polymerase chain reaction for the detection of *Paracoccidioides brasiliensis* DNA on serum samples from patients with paracoccidioidomycosis. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2006; 101: 219-221.

Diez S, Garcia EA, Pino PA, Botero S, Corredor GG, Peralta IA, Castano JH, Restrepo a, Mcewen JG. PCR with *Paracoccidioides brasiliensis* specific primers: potential use in ecological studies. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 1999; 41: 351-358.

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

Goldani IZ, Sugar AM. Short report: Use of the polymerase chain reaction to detect *Paracoccidioides brasiliensis* in murine paracoccidioidomycosis. **Am J Trop Med Hyg** 1998; 58: 152-153.

Goldani IZ, Maia AI, Sugar AM. Cloning and nucleotide sequence of a specific DNA fragment from *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Clin Microbiol.**1995; 1652-1654.

Gomes GM, Cisalpino PS, Taborda CP, Camargo ZP. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. **J Clin Microbiol** 2000; 3478-3480.

Herrinz AJ, Inglis NF, Ojhe CK, Snodgrass DR, Neziez JD. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. **J Clin Microbiol** 1982; 16: 473-477.

Hu S, Chung WH, Hung SI, Ho HC, Wang ZW, Chen CH, Lu SC, KUO TT, Hong HS. Detection of *Sporothrix schenckii* in clinical samples by a Nested PCr assay. **J Clin Microbiol** 2003; 41: 1414-1418.

Imai T.; Sano A.; Mikami Y.; Watanabe K.; Aoki FH.; Branchini ML; 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** 2000; 38: 323-326, 2000.

Itano EN, Uno J, Sano A, Yarita K, Kamei K, Miyaji M, Nishimura k, Mikami Y. Detection of the gp43 gene and (1-3)- β -D-glucan of *Paracoccidioides brasiliensis* in the blood of experimentally infected mice. **J. Med. Mycol** 2002; 43: 29-35.

Jackson DP, Hayden JD, Quirke P. Extraction of nucleic acid from fresh and archival material. **PCR a practical approach**. Nova York. Oxford University 1994; 30-50.

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

Koishi AC, Venancio EJ. Padronização de uma reação de semi Nested PCR para a detecção molecular do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. **Monografia de conclusão de curso** 2006.

Libório TN, Etges A, Neves AC, Mesquita RA, Nunes FD. Evaluation of the genomic DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded oral samples archived for the past 40-years. **J Bras Patol Med Lab** 2005; 41: 405-410.

Martinez R, Moya MJ. The relationship between paracoccidioidomycosis and alcoholism. **Rev Saúde Públ** 1992; 26:12-6.

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: 609-613.

Moreira D. Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. **Nucl Acid Res** 1998; 26: 3309-3310.

Ono MA, Kishima MO, Itano EM, Bracarense AP, and Camargo ZP. Experimental paracoccidioidomycosis in dog. **Med Mycol** 2003, 41:265-268.

Ono MA, Bracarense 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, Wanke B. **Rev Soc Brás Med Trop** 2003; 36: 455-459.

Puccia R, Schenkman S, Gorin PAJ. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: Identification of a specific antigen. **Infect and Immun** 1986; 53: 199-206.

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. **Infec and Immu** 1984; 46: 346-353.

Ricci G, Silva ID, Sano A, Borra RC, Franco M. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* by PCR in biopsies from patients with paracoccidioidomycosis: correlation with the histopathological pattern. **Pathol** 2007; 99: 41-45

Salazar ME, Restrepo A, Stevens DA. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infec and Immu** 1988; 56: 711-713.

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. **Nip Ishin Gak Zas** 2001; 42: 23-27.

Santos WA, Silva BM, Passos ED, Zandonade E, Falqueto A. Associação entre tabagismo e paracoccidioidomycose: um estudo de casos-controle no estado do Espírito Santo, Brasil. **Cad Saúde Pública** 2003; 19: 245-253.

Shibata D, Martin WJ, Arnheim. Analysis of DNA sequences in forty-year-old paraffin-embedded thin tissue sections: A bridge between molecular biology and classical histology. **Cancer Res.**1988; 48: 4564-4566.

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

Siwoski A, Ishkanian A, Garnis C, Zhang L, Rosin M, Lam WL. An efficient method for the assessment of DNA quality of archival microdissected specimens. **Modern Pathol** 2002; 15: 889-892.

Somens CC, Somensi DC, Itano EN, Quesada RMB, Camargo ZP, and Intuye MMZ, Oliveira OLP. A paracoccidioidomycose na região norte do Paraná: **Dados Clín-Laborat.** NewsLab1997, ed 20: 100-105.

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: 461-465.

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: 85-87.

Theodoro RC, Candeias JM, Araujo JPIr, Bosco SM, Macoris SA, Padula IO, Frabco M, Bagagli E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. **Med Mycol** 2005; 43: 725-729.

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 Bras Med Trop** 2005; 38: 234-237.

Vidal MSM, Benard G, Brito T, Dantas KC, Pereira CN, Franca FO, Silva AM, Martins EJ. Atypical serological response marked by a lack of detectable anti-gp43 antibodies in a patient with disseminated paracoccidioidomycosis. **J Clin Microbiol** 2005; 43: 3014-3016.

White TJ; Bruns TSL; Taylor J. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, Nova York: Academic Press, Inc 1990.

Williams DW, Wilson MJ, Lewis MAO, Potts AJC. Identification of *Candida* species in formalin fixed, paraffin wax embedded oral mucosa by sequencing of ribosomal DNA. **J Clin Pathol** 1996; 49:23-28.

ANEXOS

ANEXO 1

Oral paracoccidioidomycosis: Differential diagnosis and epidemiological data from 70 brazilian patients

ANEXO 1 –**Oral paracoccidioidomycosis: Differential diagnosis and epidemiological data from 70
brazilian patients**

Débora Fonseca Vituri¹, Andrea Cristine Koishi¹, Antônio Carrilho Neto², Fábio Augusto Ito³, Emerson José Venancio¹.

¹Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, Londrina, Paraná, 86051990, Brasil;

²Departamento de Medicina Oral e Odontologia Infantil, Centro Odontológico Universitário;

³Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina.

Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a fungal disease with oral manifestations and it is considered a public health problem in Brazil. In the oral cavity the alveolar process and gingiva are the most commonly affected sites. The oral lesions typically show an erythematous finely granular hyperplasia, speckled with pinpoint hemorrhages, and a mulberry-like surface called “moriforme” stomatitis. The clinical polymorphism of oral PCM makes diagnosis difficult especially compared with squamous cell carcinoma. This study describes the clinico-pathological data of 70 cases with histologically confirmed oral paracoccidioidomycosis. The clinical records show that most patients are male, rural workers; tobacco smokers, alcoholics, presented multiple lesions and the alveolar process and gingiva were the most commonly affected sites. Differential diagnosis was observed that the

squamous cell carcinoma (SCC) is an oral pathology that more resembles the PCM oral lesion and may lead to erroneous diagnosis.

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

Introduction

Paracoccidioidomycosis (PCM) is caused by *Paracoccidioides brasiliensis* and is one of the most important systemic deep mycosis 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 propagule and when inhaled the dimorphic transformation into yeast occurs in tissues of the human host, with a primary infection of the lungs and dissemination via lymphatic and blood vessels (Almeida *et al*, 2003).

There are two different forms of PCM, the acute (juvenile) and chronic (adult). The acute form represents only 3 to 5% of all cases, affecting mainly children and adolescents of both genders, displays a more rapid course severely and lung lesions are rarely present. The chronic form occurs in more than 90% of patients and most are adult males. The 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 dissemination occurs of the

disease via lymphatic and blood vessels, forming secondary lesions in other tissues, such as the oral mucosa, skin, lymphnodes 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 most frequently involved sites and it is well-established that most patients with oral PCM are adult males (Bicalho *et al*, 2001). This preference for gender it is possibly resulted from the protective role of estrogen, this female hormone inhibits the transition of conidia-mycelial propagules to the yeast form, a critical step in the pathogenesis of the disease (Restrepo *et al*, 1984; Salazar *et al*, 1988).

The oral lesions typically show an erythematous finely granular hyperplasia, speckled with pinpoint hemorrhages, and a mulberry-like surface called “moriforme” stomatitis (Almeida *et al*, 2003). Microulcerations or deep ulcers also may appear eventually (Almeida *et al* 1991; Sposto *et al*, 1993).

The clinical polymorphism of oral PCM is responsible for difficult diagnosis with many oral lesions such as tuberculosis, histoplasmosis, sarcoidosis and neoplastic disease (Blotta *et al*, 1999; Bicalho *et al*, 2001) especially with SCC (Menezes-Garcia *et al* 2002).

PCM lesions are diagnosed by histopathology (Almeida *et al*, 2003). Microscopically, there are granulomatous chronic inflammations rich in giants cells, lymphocytes, neutrophils, eosiniphils, plasma cells, and intra-extracellular fungi cells, corresponding to *P. brasiliensis*, which can not be found or are confused with other dimorphic fungi (Brummer *et al*, 1993). The epithelium displayexocystosis, microabscesses, and pseudoepitheliomatous hyperplasia that SCC so closely that it is possible to mistake one for the other (Menezes-Gracia *et al* 2002).

This paper describes the epidemiological data, occupation, use of the tobacco and alcoholic drink and the clinical differential diagnosis of the patients with oral PCM.

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 the PCM oral were analyzed. All patients had diagnosis of PCM confirmed histologically. Data referring to the patient's age, gender, occupation, smoking and drinking habits, oral lesion frequency, localization and differential diagnosis.

Results

A great majority of the patients with PCM oral lesions are adults. At the time of diagnosis, the age of the patients ranged from 20 to 87 years with a mean age of 51 years and the peak incidence was between the fifth and sixth decades. Sixty-seven patients were male and three female, with the male:female ratio 22:1. Most of the patients, 39 cases, were rural workers followed by bricklayers with 10 cases and another 21 cases were distributed in merchants (6), salesmen (4), pensioners (4), businessmen (3), wood-workers (2), midwife (1) and housewife (1). Among seventy patients 64 (91,43%) were tobacco smokers. Chronic patients that consumed alcoholic drink daily were present in 35 (50%) cases and no chronic patients were 28 (40%) cases. However, both the habits were present in 59 (84%) (Table 1).

According to the frequency of the oral lesions in every patient at the moment of diagnosis, 35 (50%) were found with three lesions or more, two lesions in 14 (20%) and one lesion 21 (30%) (Table 2).

Regarding the localization of 181 oral lesions found in seven patients, the alveolar process and gingival were the most frequently involved sites with (25,9%), followed by the lips (18,2%), buccal mucosa (12,5%) and (2,7%) in the pharynges (Table 3).

Collected data show that PCM was initial clinical diagnosis in 29 (41,43 %) patients and SCC appear in differential diagnosis with oral PCM lesion in 33 (47,14 %) patients and in 3 (4,29 %) cases SCC was the clinical diagnosis at the initial clinical examination. The other results are that in one case there was no differential diagnosis and in four cases the differential diagnosis with oral PCM was made with leishmaniasis (n=3) and histoplasmosis (n=1) (Table 4).

Discussion

PCM is caused by the *P. brasiliensis* fungus. Epidemiological surveys in humans and dogs show that the North of Parana State is an endemic area of PCM (Ono *et al.*, 2001; Botteon *et al.*, 2002; Fornajeiro *et al.*, 2005). At the Londrina Dental School seventy cases of PCM were diagnosed between 1991 and 2006. Most of the patients were adults males, aged between 20 and 87 years with a mean age of 51 years, 55.7% were rural worker and the male:female ratio was 22:1. Many studies have shown that PCM is a chronic disease that afflicts mainly adult male and rural workers (Sposto *et al.*, 1993; Paniago *et al.*, 2003; 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 probably inhibited by estrogen (Restrepo *et al.*, 1984; Salazar *et al.*, 1988).

Alcoholism and tobacco smoking are frequently associated with PCM (Somensi *et al.*, 1997; Blotta *et al.*, 1999). In this study, the majority of patients were alcoholics. Several studies have shown that many patients with PCM have a history of alcohol consumption and show an increase in relative risk for PCM development (Martinez and Moya, 1992; 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 our study 91,43% of patients were tobacco smokers. Other studies have shown that patients with PCM generally are tobacco smokers and that a consumption of 20 or more cigarettes/day is associated with a high probably to become ill on average eight years before others. The tobacco is a fume irritant substance and one of the consequences is the alteration in the macrophage activity that may carry the development of bronchic chronic 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, with similar profile to patients that develop SCC (Menezes-Garcia *et al.*, 2002).

Oral cavity is site most often involved by the chronic PCM lesion. In a study, forty five patients with chronic PCM, 26 (57,7%) had oral lesion and in a smaller proportion 10 (22,2%) had pulmonary lesion (Somensi *et al.*, 1997). Traditionally, patients develop multiple oral lesions that are mulberry-like in appearance, ulcerated, with pinpoint hemorrhages that primarily affect the gingiva and alveolar process (Sposto *et al.* 1993; Bicalho *et al.*, 2001), palate, lips and buccal mucosa are also frequently involved. In this study 70 % of patients had multiple oral lesions, the gingiva and alveolar process (25,97 %), lip (18,23 %), palate (16,93 %) and jugal mucosa (12,15%). The tongue (4,97%) and floor of mouth (7,18%) were affected in a smaller proportion. The results agree with those reported by others (Sposto *et al.*, 1993; Sposto *et al.*, 1994; Verli *et al.*, 2005).

Isolated lesions of oral PCM without treatment spread and become ulcerative and proliferative, covering large areas of the affected oral mucosa. Because of the chronic character and the progressive extension of the ulcerated oral lesion, they may resemble neoplastic disease especially the SCC (Menezes-Garcia *et al.*, 2002; Kaminagakura *et al.*, 2003). As a rule, it was considered that any chronic ulceration of the oral mucosa that does not tend to heal after 2 weeks is a malignant neoplasm or a specific infection unless a biopsy demonstrates a different diagnosis (Menezes-Garcia *et al.*, 2002).

The differential diagnostic of oral PCM included SCC and other granulomatous diseases (Menezes-Garcia *et al.*, 2002). In our study SCC were included as differential diagnosis with oral PCM in 33 cases. Furthermore, in three patients with isolated lesions SCC was the only clinical diagnose. These results show oral PCM resembles SCC in most patients and in all cases a biopsy is necessary to establish the final diagnosis (Menezes-Garcia *et al.*,

2002; Kaminagakura *et al.*, 2003). Note that small specimens may lead to erroneous diagnosis (Menezes-Garcia *et al.*, 2002).

This study showed that most of the patients were rural workers, tobacco smokers, alcoholics, presented multiples lesions and that the alveolar process and gingiva were the most commonly affected sites. Regarding the differential diagnostic it was observed that SCC was the oral pathology that more resembles oral PCM lesions and may lead to erroneous diagnosis.

Referências:

Almeida OP, Jacks JJ, Scully C (2003). Paracoccidioidomycosis of the mouth an emerging deep mycosis. *Crit Rev Oral Biol Med.* **14**: 268-274

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

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

Bisinelli JC, Telles FQ, Sobrinho JA, Rapoport A (2001). Stomatological manifestation of paracoccidioidomycosis. *Rev Bras Otorrinol* **67**: 683-687.

Blotta MH, Manoni RL, Oliveira SJ, Cogger SA, Papaiordanou PM, Goveia A, Camargo ZP (1999). 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.

Botteon FAG, Camargo ZP, Benardi G, Coelhos RF, Chamone DAF, and Itano EM (2002). *Paracoccidioides brasiliensis*-reactive antibodies in Brazilian blood donors. *Med Mycol* **40**: 387-391.

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

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

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

Martinez R, Moya MJ (1992). The relationship between paracoccidioidomycosis and alcoholism. *Rev Sau Púb* **26**:12-6.

Menezes-Garcia A, Taylor AM, Luz RM, Rivera MR (2002). Paracoccidioidomycosis: report of 2 cases mimicking squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Pathol Oral Radiol Endod.* **94**: 609-613.

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

Paniago AM, Aguiar JI, Aguiar ES, Cunha RV, Pereira GR, Londero AT, Wanke B (2003). *Rev Soc Bras Med Trop* **36**: 455-459.

Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover P, Feldman D, Stevens DA (1984). Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect and Immun* **46**: 346-353.

Salazar ME, Restrepo A, Stevens DA (1988). Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect and Immun* **56**: 711-713.

Santos WA, Silva BM, Passos ED, Zandonade E, Falqueto A (2003). Associação entre tabagismo e paracoccidioidomicose: um estudo de casos-controle no estado do Espírito santo, Brasil. *Cad. Saú Públ* **19**: 245-253.

Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho FQ, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. Guidelines in paracoccidioidomycosis (2006). *Ver Soc Bra Med Trop* **39**: 297-310.

Somensi CC, Somensi DC, Itano EN, Quesada RMB, Camargo ZP, and Intuye MMZ, Oliveira OLP (1997). A paracoccidioidomicose na região norte do Paraná: Dados clínicos-laboratoriais. *NewsLab*, ed **20**: 100-105.

Sposto MR, Scully C, Almeida OP, Bozzo L (1993). Oral paracoccidioidomycosis: a study of 36 south american patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* **75**: 461-465.

Sposto MR, Mendes-Giannini MJ, Moraes RA, Branco FC, Scully C (1994). Paracoccidioidomycosis manifesting as oral lesions:clinical, cytological and serological investigation. *J Oral Pathol Med.* **23**: 85-87.

Verli FD, Marinho SA, Souza SC, Figueiredo MA, Yurgel LS (2005). 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.

Table 1. Demographics of patients enrolled in this study

Years	n	%
21 – 30	02	2,86
31- 40	13	18,57
41 – 50	21	30,00
51 – 60	19	27,14
≥ 61	15	21,43
Gender		
Male	67	95,71
Female	03	4,29
Occupation		
Rural workers	39	55,71
Bricklayers	10	14,29
Others	21	30,00
Tobacco smokers		
Yes	64	91,43
No	06	8,57
Alcohol consumption		
Chronic	35	50,00
Not chronic	28	40,00
Not alcoholics	07	10,00
Tobacco smokers and Alcohol consumption		
Tobacco smokers and Alcohol consumption	59	84,29

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

Number of lesions/patient	N	%
1	21	30
2	14	20
≥ 3	35	50

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

Intra oral lesion sites	n	%
Process alveolar/gingiva	47	25,97
Lips	33	18,23
Jugal mucosa	22	12,15
Palate	31	17,13
Vestibule buccal	15	8,29
Floor of mouth	13	7,18
Tongue	09	4,97
Labiorum commissure	06	3,31
Pharynge	05	2,76

Table 4. Differential diagnosis of patients enrolled in this study

Differential diagnosis	n	%
PCM/SCC	33	47,14
PCM	29	41,43
SCC	03	4,29
WCD	01	1,42
PCM/Others*	04	5,72

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.

ANEXO 2
**Detecção molecular de *Paracoccidioides brasiliensis* por PCR em biópsias de
lesão bucal de paracoccidioidomicose**

ANEXO 2 –**Detecção molecular de *Paracoccidioides brasiliensis* por PCR em biópsias de lesão bucal de paracoccidioidomicose**

Débora F Vituri¹, Andrea Cristine Koishi¹, Antônio Carrilho Neto², Fábio Augusto Ito³, Emerson José Venancio¹.

¹Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, Londrina, Paraná, 86051990, Brasil;

²Departamento de Medicina Oral e Odontologia Infantil, Centro Odontológico Universitário;

³Departamento de Patologia oral, Hospital Universitário.

Resumo

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença fúngica. A cavidade bucal é o local de maior ocorrência das lesões de PCM e o processo alveolar e a gengiva são os sítios mais afetados. A PCM bucal geralmente é diagnosticada por histopatologia, entretanto em cortes histológicos o fungo pode não ser encontrado ou ainda pode ser confundido com outros fungos dimórficos. As técnicas moleculares são promissoras, facilitando um diagnóstico mais conclusivo, com alta especificidade e sensibilidade para *P. brasiliensis*, em particular através da utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR). Para investigar a presença de *Paracoccidioides brasiliensis* em lesão bucal foram utilizadas duas metodologias de PCR desenvolvidas por Koishi (2006) e Theodoro *et al.* (2005) para investigar a presença do DNA do fungo *P. brasiliensis* em 29 amostras de tecidos de lesão bucal de indivíduos com PCM embebidos em parafina. Os resultados obtidos mostram que foi possível amplificar o DNA do fungo *P. brasiliensis* em 17 (58,6%) das amostras pelo método de Koishi (2006) e 2 (6,9%) pelo método de Theodoro *et al.* (2005). As 12 amostras negativas pela metodologia de Koishi, 2006 foram submetidas a uma etapa adicional de purificação para a eliminação de possíveis inibidores da reação. Após a purificação duas amostras foram positivas pelo método de Koishi (2006) e cinco positivas com o método de Theodoro *et al.* (2005). Este trabalho mostra que as metodologias desenvolvidas detectaram o DNA do fungo *P. brasiliensis* em 24 (82,75%) das 29 amostras em tecidos parafinizados e o protocolo de Koishi, 2006 mostrou-se mais sensível em identificar *P. brasiliensis* e pode ser usado em tecidos parafinizados

Palavras-chaves: paracoccidioidomicose; *Paracoccidioides brasiliensis*; tecido embebido em parafina; PCR

Introdução

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, sendo uma das mais importantes micoses sistêmicas da América Latina (Almeida *et al.*, 2003).

Há duas principais formas clínicas da paracoccidioidomicose. A forma aguda tem um curso rápido e é responsável por 3 a 5% dos casos da doença, predominando em crianças e adolescentes de ambos os gêneros. A forma crônica apresenta uma progressão mais lenta, atinge aproximadamente 90% dos pacientes e predomina mais no gênero masculino. Na forma crônica, geralmente a infecção primária ocorre nos pulmões podendo levar anos até que seja diagnosticada (Almeida *et al.*, 2003), ou pode se disseminar por via linfática ou sangüínea para outros órgãos, formando uma lesão secundária em tecidos mucosos, pele, linfonodos e glândulas adrenais (Shikanai-Yasuda, 2006).

Em muitos casos, a lesão bucal é a primeira e a principal manifestação clínica. Geralmente, as lesões são múltiplas, envolvendo lábios, gengiva, mucos jugal, palato, língua e assoalho de boca (Almeida *et al.*, 2003) e o processo alveolar e a gengiva são os sítios envolvidos mais frequentemente (Bicalho *et al.*, 2001).

A PCM é frequentemente diagnosticadas por cultura, histopatologia ou sorologia. Em laboratório, a cultura do fungo é regularmente feita em incubação artificial à uma temperatura ambiente de aproximadamente 25°C, porém o crescimento é lento podendo levar de 20 a 30 dias. Em cortes histopatológicos as células fúngicas são geralmente coradas com hematoxilina e eosina, metanina de prata e Periodic Acid Schiff (PAS). Apesar dos bons resultados, em alguns casos o agente etiológico pode não ser encontrado ou ainda confundido com outros fungos dimórficos como *Histoplasma spp* ou *Coccidioides immiti*. O diagnóstico da PCM muitas vezes é dado pelos testes sorológicos que se baseiam na detecção de anticorpos contra antígenos do fungo, principalmente a gp43, e têm uma importância muito grande nos casos em que *P. brasiliensis* não é observado nos exames de cultura e histopatológicos. O principal teste

sorológico para o diagnóstico da PCM é a reação de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) para a detecção de anticorpos anti-*gp43* (Brummer *et al.*, 1993), onde a *gp43* é uma glicoproteína de 43,000 de peso molecular, sendo a principal componente antigênico do *P. brasiliensis* (Puccia *et al.*, 1986). Em um trabalho realizado por Albuquerque *et al.*, 2005, tentaram obter uma específica reação de ELISA para diagnóstico de PCM, usando um purificado do antígeno *gp43*, tratada com metaperiodato de sódio, na tentativa de eliminar as reações cruzadas com outros fungos (*H. capsulatum* ou *C. albicans*). Apesar de o teste ELISA apresentar alta sensibilidade, a especificidade máxima foi de 84%. Entretanto, mesmo após o tratamento da *gp43*, foi ineficiente em eliminar as reações cruzadas de outros fungos. Além disso, o exame sorológico pode ser influenciado 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, o qual pode carregar diferentes epítomos antigênicos.

Lesões de PCM bucal geralmente são diagnosticadas por histopatologia (Almeida *et al.*, 2003), onde microscopicamente, observa-se uma inflamação crônica granulomatosa rica em células gigantes, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e *P. brasiliensis* intra celular, o qual pode não ser encontrado ou confundido com outros fungos dimórficos (Brummer *et al.*, 1993).

As técnicas moleculares são promissoras para o diagnóstico da PCM devido a sua alta especificidade e sensibilidade para *P. brasiliensis*, em particular através da utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR) (Goldani *et al.*, 1998) e o maior problema deste método é a presença de inibidores da reação nas amostras que podem levar a resultados falso negativos (Moreira D., 1998).

Em 1998 foi realizado o primeiro trabalho sobre uma reação de PCR para detectar *P. brasiliensis* (Goldani *et al.*, 1998). Os autores utilizaram oligos iniciadores baseados na seqüência de DNA específica de *P. brasiliensis* previamente identificada (Goldani *et al.*, 1995). No trabalho foi feita a comparação entre a sensibilidade da PCR e da cultura celular. 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 (Goldani *et al.*, 1998). Posteriormente a PCR foi utilizada para a detecção do fungo *P. brasiliensis* em escarro de pacientes com PCM crônica (Gomes *et al.*, 2000). E mais recentemente uma *nested* PCR foi desenvolvida 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 (Bialek *et al.*, 2000). A mesma reação foi utilizada para a detecção de DNA de *P. brasiliensis* no tecido de um paciente com PCM disseminada (Vidal *et al.*, 2005) e para a detecção de *P. brasiliensis* em 33 amostras de soro de pacientes com PCM não tratados e com diferentes formas clínicas, onde apenas 1 amostra das 33 amostras testadas foi positiva na *nested* PCR (Charbel *et al.*, 2006). A baixa detecção do fungo por PCR em amostras de soro foi também observada por outros autores (Itano *et al.*, 2002).

A reação de PCR além de ser útil no diagnóstico de várias doenças, pode também ser usada para estudos retrospectivos de uma grande variedade de tecidos de arquivos patológicos onde o diagnóstico histopatológico já tinha sido estabelecido (Shibata *et al.*, 1988).

O arquivo mais comum de amostras de humanos é o tecido fixado em formalina e embebido em parafina. O primeiro estudo sobre a utilização da PCR para a detecção de *P. brasiliensis* em tecidos de camundongos infectados e fixados em blocos de parafina foi baseada em duas reações de *nested* PCR, uma utilizando oligonucleotídeos iniciadores baseados no gene *gp43* e para a região ITS1- 5,8S- ITS2 do DNA ribossomal de *P. brasiliensis*. Ambas as reações foram eficientes na detecção deste fungo em tecido fixados em blocos de parafina (Sano *et al.*, 2001). Recentemente, foi utilizada uma *primer-extension-preamplification* (PEP)-*nested* PCR, baseada nos oligonucleotídeos iniciadores para o gene

gp43, para detecção do DNA de *P. brasiliensis* em 107 biópsias de tecidos em parafina de pacientes com PCM (Ricci *et al.*, 2007).

Neste trabalho foram utilizadas as metodologias de PCR desenvolvidas por Koishi (2006) e Theodoro *et al.* (2005) para investigar a presença do fungo *P. brasiliensis* em 29 amostras de tecidos de lesão bucal de indivíduos com PCM embebidos em parafina.

Materiais e Métodos

Biópsias em parafina

Foram utilizadas 29 biópsias de lesões bucais de pacientes com diagnóstico de PCM e 09 biópsias de lesões bucais de pacientes com diagnóstico de carcinoma espino celular. Todos os diagnósticos foram confirmados por histopatologia. Todas as amostras foram fixadas em 10% de formalina e embebidas em blocos de parafinas. As amostras foram obtidas do Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina.

Microrganismo

Formas leveduriformes de *Paracoccidioides brasiliensis* cepa LDR1 foram crescidas em meio ágar Sabouraud a 37°C com sub-cultivos a cada 15 dias. Para a extração de DNA foram utilizadas amostras fúngicas com sete dias de cultura (Ono *et al.*, 2003).

Remoção da Parafina

A parafina foi removida utilizando a metodologia descrita por Bialek *et al.*, 2003. Inicialmente, duas secções de 10 µm das peças em parafina foram colocadas em um tubo plástico de 1,5 ml. A seguir foi adicionado 1 ml de xilol. Após agitação por 5 minutos a 100 rpm, à temperatura ambiente, a amostra foi centrifugada a 10.000 g por 2 minutos. O tratamento com o xilol foi repetido duas vezes até a completa remoção da parafina das peças.

O sobrenadante foi removido e a amostra foi lavada com 1 ml de etanol absoluto, centrifugada a 10.000 g por 3 minutos e congelada a -20°C até o uso.

Extração do DNA

As extrações do DNA foram feitas segundo o método de Hu *et al.*, 2003. Em aproximadamente 100 μ g da cepa LDR1 de *P brasiliensis* mantida em cultura e nas amostras de tecido desparafinizados foi adicionado 100 μ l de água ultra-pura estéril. Em seguida, foi adicionado o mesmo volume de tampão de extração de DNA (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 0,15M NaCl, 2% sódio dodecil sulfato, e proteinase K para uma concentração final de 0,5 mg/ml). A mistura foi incubada a 55°C durante aproximadamente 18 horas. Após este período 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 a temperatura ambiente, foi adicionado um volume igual de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e a mistura centrifugada a 12.000 x g por 5 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, e o mesmo procedimento foi repetido. O DNA foi precipitado com 2,5 volumes de etanol 100 % a - 20°C e 0,1 volume de acetato de sódio a 3 M e em seguida centrifugado a 12.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi lavado adicionando etanol 70 % e centrifugado a 12.000 g por 10 minutos. Após a retirada do sobrenadante e secagem, a amostra de DNA foi dissolvida em 50 μ l de água destilada e estocada a -20°C até o uso para PCR.

Reação em cadeia pela polimerase

As amostras de DNA proveniente de material clínico parafinizados, juntamente com os controles foram submetidas a dois diferentes protocolos de PCR: Koishi, 2006 e Theodoro *et al.*, 2005. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados, as seqüências e tamanho do produto de amplificação estão listados na tabela 1.

Método de Koishi, 2006.

Koishi (2006) utilizou três oligonucleotídeos iniciadores em uma *semi Nested-PCR*. Os oligonucleotídeos externos ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990) foram usados na primeira reação e um oligonucleotídeo interno MJ03 que foi usado em conjunto com o oligonucleotídeo ITS1 na segunda reação. As reações foram feitas com um volume final de 25 µl de mistura de reagentes [tampão 1x (20 mM Tris-HCl, pH 8,4 e 50 mM KCL - Invitrogen), 2,5 mM MgCl₂ (Invitrogen), 0,25 dNTP (Invitrogen), 0,2 µM de cada oligonucleotídeo, 1 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 5 µl de DNA ressuspenso em 50 µl de água e água esterilizada para completar a reação]. As duas reações foram realizadas em um termociclador Máster Cycler (Eppendorf) nas seguintes condições: 95°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e extensão final em 72°C por 5 minutos. Para a 2ª reação foi utilizada 1 µl do produto da 1ª reação como molde.

Método de Theodoro *et al.*, 2005.

Theodoro *et al.* (2005) utilizaram quatro oligonucleotídeos em uma *Nested-PCR*. Os oligonucleotídeos externos foram ITS4/ITS5 (White *et al.*, 1990) e os oligonucleotídeos internos foram Pb ITSE/ Pb ITSR. As reações foram feitas com um volume final de 25 µl de

mistura de reagentes [tampão 1x (20 mM Tris-HCl, pH 8,4 e 50 mM KCL - Invitrogen), 0,2 mM de dNTPs (Invitrogen), 0,4 μ M de cada oligonucleotídeo, 1,25 unidade da Taq DNA polimerase (Invitrogen), 5 μ l de DNA ressuspensos em 50 μ l de água e água esterilizada para completar a reação]. As reações foram realizadas em um termociclador Máster Cycler (Eppendorf) nas seguintes condições: 1ª reação para ITS4/ITS5, 94 °C por 5 minutos, seguido de 25 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 60 °C por 2 minutos, 72 °C por 2 minutos e extensão final em 72 °C por 2 minutos. Para a 2ª reação com Pb ITSE/Pb ITSR as condições foram similares, porém a temperatura de anelamento foi de 62 °C e foram utilizados 2 μ l do produto da 1ª reação como molde.

Tratamento para eliminar inibidores de PCR

A eliminação dos inibidores de PCR foi feita segundo o método descrito por Moreira, 1998 com modificações. O DNA das 12 amostras que tiveram seus resultados negativos pelo protocolo de Koishi (2006) foi misturado v/v em agarose de baixo ponto de fusão a 1,6%. A mistura foi transferida para um molde estéril antes da solidificação. Os blocos de agarose foram então dialisados contra 15 ml de tampão TE por 24h. A PCR foi feita com 5 μ l da agarose contendo o DNA mantido a 60°C.

4.9 Controles

Como controles negativos das reações foram utilizados água esterilizada e o DNA extraído das peças de c.e.c.. Como controle positivo foi utilizado 5 ng DNA extraídos da cepa LDR1 de *P. brasiliensis*, quantificado por espectrofotometria.

4.10 Análise dos resultados

Os produtos de amplificação das PCRs foram visualizados em gel de poliacrilamida a 8% e corados com nitrato de prata descrito por Herrinz *et al.*, 1982.

Resultados

Inicialmente, das 29 lesão oral de PCM, 17 (58,6%) foram positivas e 12 (41,4%) foram negativas quando analisadas pelo protocolo de Koishi (2006). Por outro lado 02 (6,9%) foram positivas e 27 (93,1%) foram negativas pelo protocolo de Theodoro *et al.* (2005). (Tabela 2) e (Figuras 1 e 2)

As 12 amostras negativas pelo protocolo de Koishi (2006) que foram purificadas por diálise, foram novamente analisadas por PCR com os dois protocolos. Os resultados demonstraram pelo protocolo de Koishi (2006), 02 (16,7%) amostras positivas e 10 (83,3%) continuaram negativas e pelo protocolo de Theodoro *et al.* (2005), 05 (41,6%) foram positivas e 07 (58,4%) continuaram negativas. (Tabela 3)

Na figura 1 está representada a detecção do fungo *P. brasiliensis* pelo protocolo de Koishi (2006) em amostras de peças em parafina de lesão oral de PCM. As amostras A02, A03 e A05 representam as reações positivas para *P. brasiliensis* e as amostras A019, A023, A04 e A20 representam as reações negativas para o fungo. Após a purificação as amostras A04 e A20 foram positivas para *P. brasiliensis* pelo protocolo de Koish (2006).

A figura 2 representa a detecção do fungo *P. brasiliensis* pelo protocolo de Theodoro *et al.* (2005) das amostras das peças em parafina de lesão oral de PCM. As amostras: A06 e A10 foram positivas para *P. brasiliensis*, porém foram negativas para o método de Koishi (2006). As amostras A01, A06, A09, A14 e A20 foram negativas para o fungo pelo método de Koishi (2006); porém a amostra A06 foi positiva pelo método de Theodoro *et al.* (2005). Após a purificação pelo método de Theodoro *et al.* (2005) as amostras A01, A06, A09, A14 e A20 foram positivas para o fungo. Tendo a amostra A20 seu DNA amplificado

O resultado da reação controle da PCR utilizando o protocolo de Koishi (2006) com as peças de c.e.c. para avaliar a especificidade da reação está mostrada na figura 3.

Como resultado total das reações de PCRs nas 29 amostras de lesão bucal de PCM parafinizada, 24 (82,75%) foram positivas e (5/17,25%) permaneceram negativas.

(Tabela 4)

Discussão

O material fixado em formalina e embebido em parafina constitui hoje a maior fonte de tecido humano mantidos em arquivos. Alguns estudos mostram que esse material pode ser fonte para análises retrospectivas usando ferramentas moleculares, o que vem permitindo identificar falhas no diagnóstico histopatológico (Bialek *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 1996). Para a identificação de espécies de *Candida* em biópsias de lesão oral de candidíase hiperplásica crônica embebidas em parafina. Foram utilizadas 18 peças em parafina com diagnóstico histopatológico de *Candida*, onde 12 (66,6%) amostras foram positivas para *Candida albicans* e em outras duas, espécies de *Candida glabrata*. Este resultado pode indicar o envolvimento das duas espécies na lesão (Williams *et al.*, 1996). Em outro estudo, a PCR foi utilizada para a identificação molecular de fungos em 40 amostras de tecidos em parafina de pacientes com diagnóstico histopatológico de aspergilose e zigomicose. Nas 17 amostras de pacientes com diagnóstico de aspergilose, DNA específico do fungo foi amplificado em 11 amostras. Enquanto nas 23 amostras de zigomicose 14 gêneros específicos e espécies foram identificados. Porém, em uma das amostras de pacientes com zigomicose foi amplificado DNA específico de *Aspergillus fumigatus*. Além disso, houve a detecção de uma infecção fúngica mista com *Absidia corymbifera* e *Aspergillus fumigatus* em uma amostra e em outras duas os fungos identificados foram *Rhizopus arrhizus* e *Aspergillus fumigatus* (Bialek *et al.*, 2005). Estes estudos mostram que o diagnóstico histopatológico pode falhar e que métodos moleculares podem auxiliar no diagnóstico.

Poucos estudos têm sido feito sobre a identificação molecular de *P. brasiliensis* em biópsias embebidas em blocos de parafina. Sano *et al.*, 2001 utilizaram tecidos de camundongos infectados com *P. brasiliensis* embebidos em blocos de parafina e padronizaram uma *nested*-PCR para a detecção molecular do fungo. Mais recentemente, a

PEP-PCR foi utilizada para a detecção de *P. brasiliensis* em tecidos de arquivos de pacientes com PCM em blocos de parafina (Ricci *et al.*, 2007).

Neste estudo, das 29 amostras de tecidos em parafina de lesão bucal de PCM testadas por PCR 17 (58,6%) amostras foram positivas e 12 (41,4%) foram negativas pelo protocolo de Koishi (2006). Por outro lado, com o protocolo de Theodoro *et al.* (2005), 2 (6,9%) das amostras foram positivas e 27 (93,1%) foram negativas. Além disso, a metodologia apresentada por Koishi (2006) apresentou uma positividade superior (58,6 %) comparada ao trabalho desenvolvido por Ricci *et al.*, 2007 com (29%), onde utilizaram uma PEP-PCR em tecidos de arquivos de pacientes com PCM em blocos de parafina. Resultados negativos com amostras de DNA extraídas de tecidos em parafina são frequentemente observados. Em um estudo para mostrar a especificidade da reação de PCR, o DNA foi extraído de 25 amostras de tecidos em parafina de cachorros que morreram de blastomicose e 33 amostras de tecidos de cachorros que morreram de linfossarcoma. O diagnóstico histopatológico foi confirmado em 13 amostras de blastomicose e nas 33 de linfossarcoma. A reação de PCR para *B. dermatitidis* amplificou apenas oito das 13 amostras e nenhum produto da PCR foi amplificado nas 12 amostras negativas histologicamente nem nas 33 amostras de linfossarcoma (Bialek *et al.*, 2003).

Provavelmente os resultados negativos obtidos ocorrem pela degradação ou ausência de DNA amplificável devido aos métodos de fixação e estocagem das peças em parafina, excesso de proteína e da presença de microrganismos contaminantes nas amostras (Ricci *et al.*, 2007; Bialek *et al.*, 2005; Libório *et al.*, 2005; Bialek *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 1996). O DNA extraído de tecidos parafinados por vezes não é adequado para técnicas moleculares, visto que se apresenta parcialmente degradado (Libório *et al.*, 2005). A razão porque os tecidos fixados em parafina sofrem degradação é a insuficiente neutralização da formalina, reagindo com o DNA e impedindo sua amplificação (Shibata *et al.*, 1988). Para ocorrer a

reação, é necessário destruir as pontes de hidrogênio, por exemplo, por aquecimento. A impregnação com a parafina utiliza temperaturas elevadas e durante esse processo o DNA pode reagir com o formaldeído remanescente (Jackson *et al.*, 1994). O agente fixador e o tempo de fixação por períodos prolongados podem levar a uma redução de DNA (Ben-Ezra *et al.*, 1991) e a utilização do formaldeído na prática histológica se dá pelo seu baixo custo, estabilidade, compatível em quase todos os tecidos e não coagulativo (Jackson *et al.*, 1994).

A lenta degradação que o DNA das peças em parafinas sofre com o tempo, gerando fragmentos de DNA de pequeno tamanho. Os segmentos de DNA pequeno ainda podem ser úteis como substratos para a PCR e requerem o uso de oligonucleotídeos que gerem produtos de menor número de pares de bases (Libório *et al.*, 2005; Siwoski *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 1996, Ben-Ezra *et al.*, 1991). Em nosso trabalho não encontramos correlação com o tempo de estocagem das peças e amplificação do DNA e ambos os protocolos utilizados geram produtos de pequena amplificação (600-200pb).

A diferença entre a positividade obtida com a metodologia de Koishi (2006) e a obtida com a metodologia de Theodoro *et al.* (2005) pode estar relacionada ao número de ciclos utilizado pela PCR. A reação de Koishi (2006) tem 35 ciclos, enquanto, a reação de Theodoro *et al.* (2005) tem 25 ciclos. Geralmente os protocolos de PCR apresentam de 35 a 39 ciclos para as amostras de tecidos em parafina (Ricci *et al.*, 2007; Libório *et al.*, 2005; Bialek *et al.*, 2005). Além disso, a diferença entre a positividade obtida com a metodologia de Koishi, 2006 e a obtida com a metodologia de Ricci *et al.*, 2007 pode estar relacionada aos oligonucleotídeos utilizados, onde a reação de Koishi (2006) trabalhou com oligonucleotídeos que codificam para a região ITS1-5.8s-ITS2 do DNAr do fungo *P. brasiliensis* e Ricci *et al.*, 2007 utilizou oligonucleotídeos que codificam para o gene da *gp43*. E segundo Sano *et al.*, 2001, oligonucleotídeos que detectam o gene que codifica a

gp43 apresentam menor sensibilidade na detecção, que oligonucleotídeos que codificam para a região ITS1-5.8s-ITS2 do DNA r do fungo (Sano *et al.*, 2001).

Resultados negativos na amplificação de DNA também podem ser explicados pela contaminação por componentes orgânicos e inorgânicos (ex: polissacarídeos, uréia, ácido húmico ou hemoglobina) e que são contaminantes comuns em amostras de DNA e não podem ser completamente removidos pela extração com fenol. Eles podem interferir com a reação, levando a diferentes graus de atenuação até a completa inibição. Uma alternativa é submeter o DNA obtido a um processo de purificação em agarose. Durante o processo grandes moléculas de DNA permanecem retidas na malha de agarose e pequenos fragmentos de DNA e os contaminantes são difundidos para fora do gel durante os passos de lavagem (Moreira, 1998). Neste estudo a purificação das 12 amostras negativas resultou em 2 (16,7%) amostras positivas e 10 (83,3%) negativas pelo protocolo de Koishi (2006) e 5 (41,6%) amostras positivas e 7 (58,4%) negativas pelo protocolo de Theodoro *et al.* (2005), sugerindo que o protocolo de Theodoro *et al.* (2005) é mais sensível aos inibidores que o protocolo de Koishi, 2006.

Em nosso trabalho, das 29 amostras de lesão bucal de PCM em parafina, conseguimos uma amplificação de DNA do *P. brasiliensis* em 24 (82,75%) das amostras, mostrando a eficiência da reação de PCR em um retrospectivo estudo de diagnóstico molecular da PCM bucal.

Conclusão

Embora a método de Koishi (2006) detectou DNA de *P. brasiliensis* em maior quantidade de amostras parafinadas, o protocolo de Theodoro *et al.* (2005) foi mais sensível para amostras purificadas, apresentando um resultado total de 24 (82,75%) de positividade das 29 amostras de lesão bucal de PCM em parafina.

Referências

- Albuquerque CF (2005). Improvement of the specificity of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* Apr:1944-1946.
- Almeida OP, Jacks JJ, Scully C (2003). Paracoccidioidomycosis of the mouth an emerging deep mycosis. *Crit Rev Oral Biol Med* **14**: 268-274.
- Bialek R, Konrad F, Kern J, Cecenas L, Gonzales GM, Just-Nübling G, Willinger B, Presterl E, Lass-Flörl C, Rickerts V (2005). PCR based identification and discrimination of agents of mucormycosis and aspergillosis in paraffin wax embedded tissue. *J Clin Pathol.* **58**: 1180-1184.
- Bialek R, Cirera AC, Herrmann T, Aepinus C, Serán-Bochsler VI, Legendre AM (2003). Nested PCR assays for detection of *Blastomyces dermatitidis* DNA in paraffin-embedded canine tissue. *J Clin Microbiol* **41**: 205-208.
- Bialek R, Ibricevic A, Aepinus C, Najvar LK, Fothergill AW, Knobloch J, Graybill JR (2002). Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a nested PCR assay. *J Clin Microbiol* **38**: 2940-2942..
- Ben-Ezra J, Johnson DA, Rossi J, Cook N, Wu A (1991). Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase chain reaction. *J Histochem and Cytochem.* **39**: 351-354.
- Bicalho RN, Santo MF, Aguiar MC, Santos VR (2001). Oral paracoccidioidomycosis: a retrospective study of 62 Brazilian patients. *Oral Diseases* **7**: 56-60.
- Brummer E, Castaneda E, Restrepo A (1993). Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* **6**: 89-117.
- Charbel, CE, Levi JE, Martins JE (2006). 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.
- Diez S, Garcia EA, Pino PA, Botero S, Corredor GG, Peralta IA, Castano JH, Restrepo a, Mcewen JG (1999). PCR with *Paracoccidioides brasiliensis* specific primers: potential use in ecological studies. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **41**: 351-358.
- Itano EN, Uno J, Sano A, Yarita K, Kamei K, Miyaji M, Nishimura k, Mikami Y (2002). Detection of the gp43 gene and (1→3) - β- D-glucan of *Paracoccidioides brasiliensis* in the blood of experimentally infected mice. *J. Med. Mycol.* **43**: 29-35.
- Goldani IZ, Sugar AM (1998). Short report: Use of the polymerase chain reaction to detect *Paracoccidioides brasiliensis* in murine paracoccidioidomycosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **58**: 152-153.

Goldani IZ, Maia AI, Sugar AM (1995). Cloning and nucleotide sequence of a specific DNA fragment from *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol* **33**: 1652-1654.

Gomes GM, Cisalpino PS, Taborda CP, Camargo ZP (2000). PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol*. **38**: 3478-3480.

Herrinz AJ, Inglis NF, Ojhe CK, Snodgrass DR, Neziez JD (1982). Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol* **16**: 473-477.

Hu S, Chung WH, Hung SI, Ho HC, Wang ZW, Chen CH, Lu SC, KUO TT, Hong HS (2003). Detection of *Sporothrix schenckii* in clinical samples by a *Nested* PCr assay. *Jl Clin Microbiol*. **41**: 1414-1418.

Imai T.; Sano A.; Mikami Y.; Watanabe K.; Aoki FH.; Branchini ML; Negroni R; Nishimura K; Miyaji M (2000). 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.

Jackson DP, Hayden JD, Quirke P (1994). Extraction of nucleic acid from fresh and archival material. *PCR a practical approach*. Nova York. Oxford University : 30-50.

Koishi AC, Venancio EJ (2006). Padronização de uma reação de semi Nested PCR para a detecção molecular do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. *Monografia de conclusão de curso*.

Libório TN, Etges A, Neves AC, Mesquita RA, Nunes FD (2005). Evaluation of the genomic DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded oral samples archived for the past 40-years. *J Bras Patol Med Lab*. **41**: 405-410.

Mesquita AR, Anzai EK, Oliveira RN, Nunes FD (2001). Evaluation of three methods of DNA extraction from paraffin-embedded material for the amplification of genomic DNA by means of the PCR technique. *Pesq Odontol Bras*. **15**: 314-319.

Moreira D (1998). Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. *Nucleic Acids Res*. **26**: 3309-3310.

Ono MA, kishima MO, Itano EM, Bracarense AP, and Camargo ZP (2003). Experimental paracoccidioidomycosis in dog. *Med Mycol* **41**:265-268.

Puccia R, Schenkman S, Gorin PAJ (1986). Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: Identification of a specific antigen. *Infect and Immun* **53**: 199-206.

Ricci G, Silva ID, Sano A, Borra RC, Franco M (2007). Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* by PCR in biopsies from patients with paracoccidioidomycosis: correlation with the histopathological pattern. *Pathol* **99**: 41-45.

Sano A, Yokoyama K, Tamura M, Mikami y, Takahashi I, Fukushima K, Miyaji M, Nishimura k (2001). Detection of gp43 and ITS1-5.8S-ITS2 ribosomal RNA genes of *Paracoccidioides brasiliensis* in paraffin-embedded tissue. *Nip Ishink Gak Zas* **42**: 23-27.

Shibata D, martin WJ, Arnheim (1988). Analysis of DNA sequences in forty-year-old paraffin-embedded thin tissue sections: A bridge between molecular biology and classical histology. *Canc Res.* **48**: 4564-4566.

Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho FQ, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. Guidelines in paracoccidioidomycosis (2006). *Rev Soc Brasil Med Tropical* **39**: 297-310.

Siwoski A, Ishkanian A, Garnis C, Zhang L, Rosin M, Lam WL (2002). An efficient method for the assessment of DNA quality of archival microdissected specimens. *Mod pathol* **15**: 889-892.

Theodoro RC, Candeias JM, Araujo JPJr, Bosco SM, Macoris SA, Padula IO, Frabco M, Bagagli E (2005). Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. *Med Mycol* **43**: 725-729.

Vidal MSM, Benard G, Brito T, dantas KC, Pereira CN, Franca FO, Silva AM, Martins EJ (2005). Atypical serological response marked by a lack of detectable anti-gp43 antibodies in a patient with disseminated paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* **43**: 3014-3016.

White TJ; Bruns TSL; Taylor J (1990). PCR protocols: a guide to methods and applications, Nova York: Academic Press, Inc.

Williams DW, Wilson MJ, Lewis MAO, Potts AJC (1996). Identification of *Candida* species in formalin fixed, paraffin wax embedded oral mucosa by sequencing of ribosomal DNA. *J Clin Pathol* **49**:23-28.

*Tabelas***Tabela 1. Sequências nucleotídicas e combinações dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR para diagnóstico molecular da PCM.**

Primers	Sequência	Pares	Amplificação	Referências
ITS1 ITS4	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	ITS1/ITS4	620	White (1990)
ITS1 MJ03	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' 5'-GTCTCAGACGTCAAAGCTCC-3'	ITS1/MJ03	212	Koishi(2006)
ITS4 ITS5	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' 5'-CCGAGTGCGGCCTCTGGGTCC-3'	ITS4/ITS5	634	White (1990)
PbITSE PbITSR	5'-GAGCTTTGACGTCTGAGACC-3' 5'-AAGGGTGTCGATCGAGAGAG-3'	PbITSE/PbITSR	387	Theodoro (2005)

Resultados**Tabela 2. Resultado da PCR das 29 amostras parafinizadas de PCM bucal.**

Protocolos	Positivos	%	Negativos	%
Koishi (2006)	17	58,6%	12*	41,4%
Theodoro <i>et al.</i> (2005)	02	6,9%	27	93,1%

*Amostras negativas que foram purificadas posteriormente

Tabela 3. Resultado da PCR após a purificação do DNA, com o protocolo de Koishi, 2006

Protocolos	Positivos	%	Negativos	%
Koishi (2006)	02	16,7%	10	83,3%
Theodoro <i>et al.</i> (2006)	05	41,6%	07	58,4%

Tabela 4. Resultado total das PCRs das 29 amostras parafinizadas de PCM bucal

Protocolos	Positivos	%
Koishi (2006) e Theodoro <i>et al.</i> (2005)	24	82,75

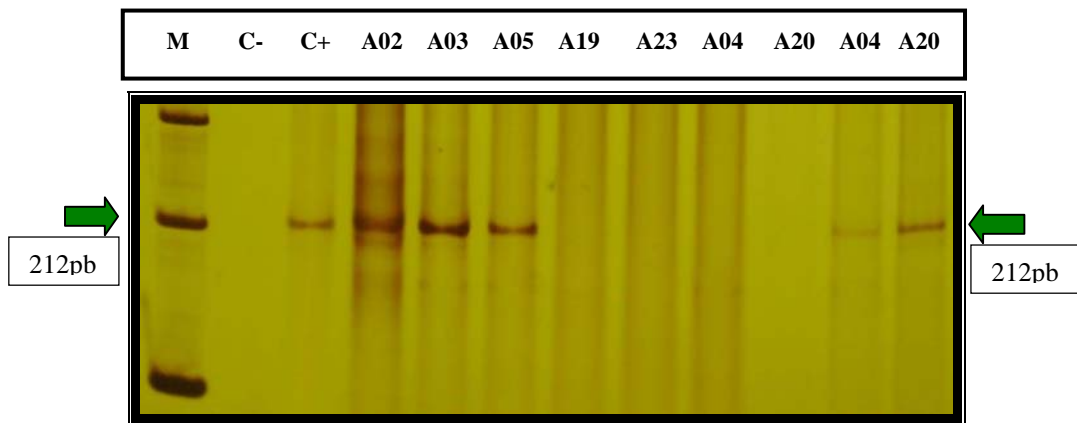


Figura 1. **Perfil eletroforético dos produtos da segunda reação de amplificação do DNA, de pacientes com diagnóstico clínico de PCM, pelo protocolo de Koishi (2006).** Gel de poliacrilamida 8% corado por nitrato de prata. M (Ladder 100pb, Invitrogen). Amostras A02, A03 e A05 positivas para *P. brasiliensis*. Amostras A019, A023, A04 e A20 negativas. Amostras A04 e A20 positivas após a eliminação dos inibidores. C- controle negativo e C+ controle positivo LDR1.

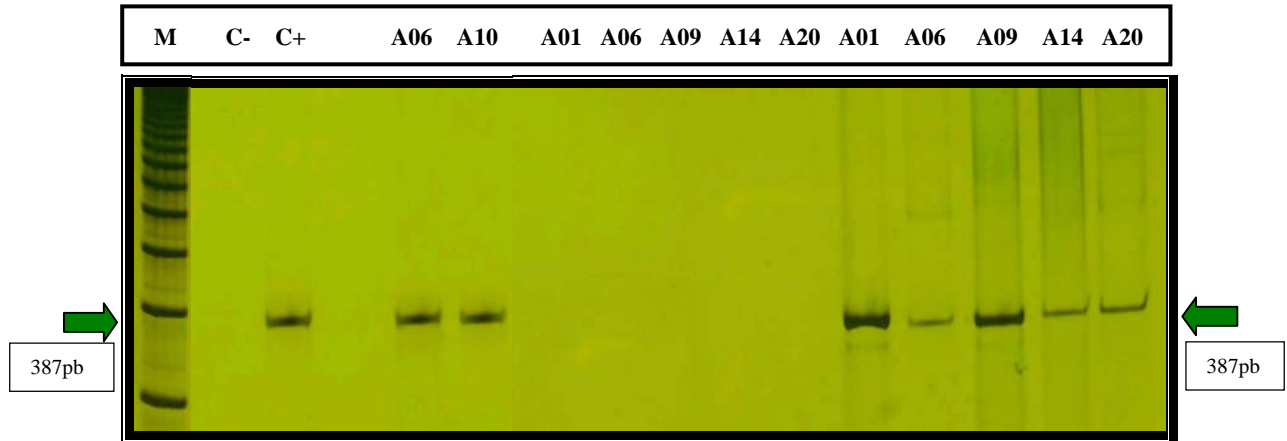


Figura 2. Perfil eletroforético dos produtos da segunda reação de amplificação do DNA, de pacientes com diagnóstico clínico de PCM, pelo protocolo de Theodor *et al.* (2005). Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado por impregnação por nitrato de prata. M (Ladder 100pb, Invitrogen). Amostras: A06 e A10 positivas. Amostras: A01, A06, A09, A14 e A20 negativas pelo método de Koishi, 2006. Amostras: A01, A06, A09, A14 e A20 positivas a eliminação dos inibidores. C- controle negativo e C+ controle positivo.

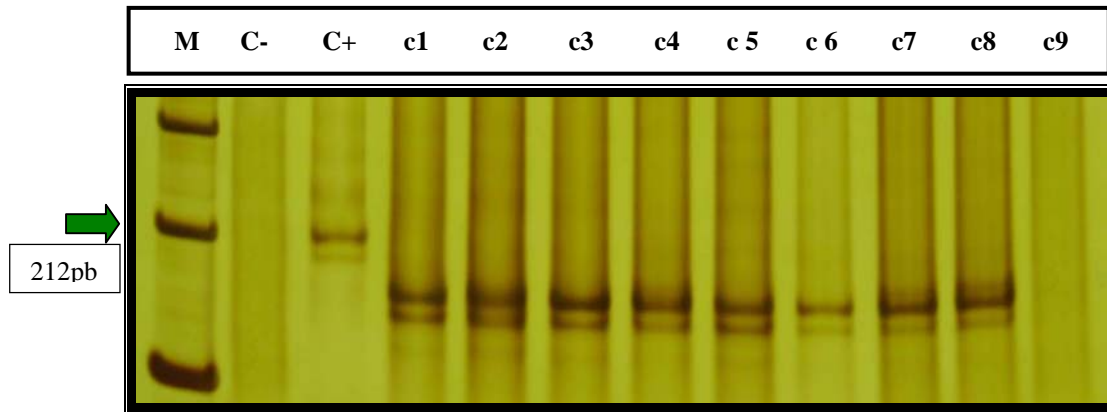


Figura 3. Perfil eletroforético dos produtos da segunda reação de amplificação do DNA, de pacientes com diagnóstico clínico de c.e.c, pelo protocolo de Koishi (2006). Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado por impregnação por nitrato de prata. M (Ladder 100pb, Invitrogen). Amostras: c1 – c9 negativas. C- controle negativo e C+ controle positivo.