



**PERFIL DE CARBOIDRATOS DA PAREDE CELULAR DE ESPÉCIES DE
ASPERGILLUS E EFEITO ANTIFÚNGICO DE FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL DE
ITRACONAZOL NO TRATAMENTO DE CERATITE EXPERIMENTAL**

ANDRÉ FERRAZ GOIANA LEAL

**RECIFE
2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

**PERFIL DE CARBOIDRATOS DA PAREDE CELULAR DE ESPÉCIES DE
ASPERGILLUS E EFEITO ANTIFÚNGICO DE FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL DE
ITRACONAZOL NO TRATAMENTO DE CERATITE EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Micologia Aplicada

Orientando: André Ferraz Goiana Leal

Orientadora: Rejane Pereira Neves

Co-orientadores: Nereide Stela dos Santos
Magalhães

**RECIFE
2012**

Leal, André Ferraz Goiana

Perfil de carboidratos da parede celular de espécies de *Aspergillus* e efeito antifúngico de formulação lipossomal de itraconazol no tratamento de ceratite experimental/ André Ferraz Goiana Leal– Recife: O Autor, 2012.

82 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Rejane Pereira Neves

Coorientadora: Nereide Stela dos Santos Magalhães

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Biologia de Fungos, 2012.

Inclui bibliografia e anexos

- 1. *Aspergillus* 2. Carboidratos 3. Ceratite I. Neves, Rejane Pereira (orientadora) II. Magalhães, Nereide Stela dos Santos (coorientadora) III. Título**

579.5657

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2012- 170

**PERFIL DE CARBOIDRATOS DA PAREDE CELULAR DE ESPÉCIES DE
ASPERGILLUS E EFEITO ANTIFÚNGICO DE FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL DE
ITRACONAZOL NO TRATAMENTO DE CERATITE EXPERIMENTAL**

ANDRÉ FERRAZ GOIANA LEAL

Data da defesa: 29/02/2012

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Dra Rejane Pereira Neves (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. José Júlio Costa Sidrim – Examinador Externo
Universidade Federal do Ceará

Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho – Examinador Externo
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Francisco Jaime Bezerra Junior – Examinador Externo
Universidade Estadual da Paraíba

Dr. Delson Laranjeira – Examinador Externo
Universidade Federal Rural de Pernambuco

“A experiência é uma lanterna dependurada nas costas
que apenas ilumina o caminho já percorrido”

Confúcio

Agradecimentos

À Fundação e Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e a coordenação do programa de Pós-graduação de Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco.

À minha orientadora Prof^a Rejane Pereira Neves pelos seus ensinamentos, dedicação e amizade. Muito obrigado.

À minha co-orientadora Prof. Nereide Stella Santos Magalhães por ter me ajudado a desenvolver a pesquisa.

Aos professores Almir Gonçalves Wanderley, Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão, Oliane Maria Correia Magalhães, Armando Lacerda Marsden, Cristina Maria de Souza-Motta, Maria José dos Santos Fernandes pelo apoio nas pesquisas e por terem contribuído para a melhoria dos meus conhecimentos.

A todos os amigos do Laboratório de Micologia Médica e do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), especialmente a Melyna Chaves Leite, Carol Sanuze Quirino, Nadja Elizabeth Lopez, Arthur Clarck, Isabella Macário e Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo.

Aos professores do Curso de Pós-graduação em Biologia de Fungos, pelos seus ensinamentos de micologia que contribuíram para minha formação profissional.

RESUMO GERAL

Aspergillus é um fungo ubíquo que pode causar uma variedade de síndromes clínicas, especialmente em pacientes imunossuprimidos. Esta pesquisa teve como objetivos caracterizar o perfil de carboidratos da parede celular de espécies de *Aspergillus*, avaliar a susceptibilidade antifúngica *in vitro* ao itraconazol e o efeito antifúngico de formulação lipossomal de itraconazol no tratamento de ceratite experimental por *A. flavus*. As lectinas usadas no ensaio foram *wheat germ agglutinin* (WGA), *Ulex europeus agglutinin I* (UEA I), *peanut agglutinin* (PNA) e concanavalina A (Con A) todas conjugadas a peroxidase. A metodologia utilizada na susceptibilidade antifúngica *in vitro* seguiu as condições descritas no protocolo M38-A2 do Clinical and Laboratory Standard Institute. Os lipossomas foram obtidos pelo método de hidratação do filme lipídico seguido de sonicação. Fêmeas adultas de ratos Wistar (pesando 200-220g) foram imunossuprimidas com apenas uma aplicação intraperitoneal de 150mg/kg de ciclofosfamida três dias antes da infecção com *A. flavus* na concentração de 10^7 esporos/mL. Após 48h da infecção, os animais foram tratados com a formulação lipossomal. Para efeito de comparação um grupo de animais (n=6) foi tratado com o fármaco não encapsulado. Ao fim do experimento os animais foram avaliados quanto a: manifestações clínicas, unidade formadora de colônias (UFC/g) e exame direto/histopatológico. Nossos resultados mostraram que houve expressão de N-acetil-D-glicosamina na superfície da parede celular das espécies de *Aspergillus* analisadas em espécimes histopatológicas (cérebro e pulmão) e crescidos em meio de cultura batata dextrose ágar (BDA). Todas as amostras sensíveis ao itraconazol expressaram de moderada a alta concentração de N-acetil-D-glicosamina na parede celular. No estudo *in vivo* o grupo de animais tratados com o fármaco livre, um apresentou opacificação total da córnea, três apresentaram edema de córnea em dois quadrantes e dois apresentaram um pequeno edema. No grupo de animais tratados com a formulação lipossomal dois animais apresentaram edema de córnea moderada, um apresentou um pequeno edema e três animais não apresentaram qualquer lesão. No grupo de animais tratados com o fármaco livre foi possível quantificar de 2 a 13 UFC/g e visualizar estruturas fúngicas ao exame direto/histopatológico em todas as amostras de globo ocular. No grupo tratado com a formulação lipossomal metade das amostras avaliadas (três animais) não foi visualizado nenhum crescimento fúngico (cultura) e nem filamentos micelianos ao exame direto/histopatológico. Os resultados obtidos neste estudo indicam a formulação lipossomal do itraconazol apresenta uma atividade antifúngica significativamente maior do que o fármaco livre no tratamento de ceratite fúngica experimental por *A. flavus* em ratos Wistar.

Palavras-chave: Itraconazol lipossomal, ceratite, *Aspergillus flavus*, carboidratos da parede celular.

ABSTRACT

Aspergillus are ubiquitous fungi which can cause a variety of clinical syndromes, especially in immunosuppressed patients. Thus, the aim of this study was to characterize the profile of carbohydrates on the cell wall of *Aspergillus* species, evaluate the *in vitro* antifungal susceptibility to itraconazole and antifungal effect of the liposomal formulation of itraconazole in the treatment of experimental keratitis by *A. flavus*. The lectins used in the assay were wheat germ agglutinin (WGA), *Ulex europeus* agglutinin I (UEA I), peanut agglutinin (PNA) and concanavalina A (Con A), all conjugated with horseradish peroxidase. The methodology used in *in vitro* antifungal susceptibility followed the conditions described in the protocol M38-A2 of the Clinical and Laboratory Standard Institute. The liposomes were prepared by the lipid film hydration method followed by sonication. Adult female Wistar rats (weighing 200-220g) were immunosuppressed with an intraperitoneal injection of 150mg/Kg cyclophosphamide three days prior to infection with *A. flavus* at a concentration of 10^7 spores/mL. After 48 hours of infection, animals were treated with the liposomal formulation. For comparison a group of animals (n=6) was treated with the unencapsulated drug. At the end of the experiment the animals were evaluated for: clinical manifestations, colony forming unit (CFU/g) and direct examination/histopathological. Our results showed that expression of N-acetyl-D-glucosamine on the cell walls surface of *Aspergillus* species analyzed in histological specimens (brain and lung) and grown in culture medium potato dextrose agar (PDA). All samples sensitive itraconazole expressed moderate to high concentration of N-acetyl-D-glucosamine on the cell wall. *In vivo* study the group of animals treated with free drug, showed a complete opacification of the cornea, three had corneal edema in two quadrants and two had a little edema. In animals treated with liposomal formulation two animals showed moderate corneal edema, one had a little edema and three animals showed no lesion. In animals treated with free drug could be quantified 2-13 CFU/g and visualizing structures fungal in direct examination/histopathology in all the samples of the eyeball. In the group treated with the liposomal formulation than half of the samples (three animals) was not viewed any fungal growth (culture) and mycelial filaments by the direct examination/histology. The results of this study indicate that the liposomal formulation of the itraconazole has an antifungal activity significantly greater than the free drug in the treatment of experimental *A. flavus* keratitis Wistar rats.

Keywords: liposomal itraconazole, keratitis, *Aspergillus flavus*, cell wall carbohydrates.

Lista de figuras

Capítulo 2

Pág.

Figura 1 - Estruturas morfológicas intactas de *Aspergillus* sp (A-B). Efeito da ação do itraconazol sobre as estruturas do fungo (C-D). Sp= esporóforo, V= vesícula, St= esterigma e S= esporo..... 19

Figura 2 - Mecanismo de ação dos tirazólicos: atuam sobre enzimas do citocromo P450 dos fungos bloqueando a demetilação do lanosterol e a síntese de ergosterol, alterando a permeabilidade da membrana e a viabilidade da célula fúngica..... 20

Figura 3 - Mecanismo de ação dos fármacos antimicrobianos em nanopartículas sobre os microrganismos: (a) fusão da nanopartícula com a parede e/ou membrana celular microbiana e liberação do fármaco dentro da parede ou membrana, (b) as nanopartículas se ligam a parede celular e liberam o fármaco continuamente, o qual irá se difundir para o interior dos microrganismos..... 27

Figura 4 - Ilustração esquemática de quatro tipos de nanopartículas utilizadas como carreadoras de antimicrobianos: (a) Lipossoma, (b) nanopartícula polimérica, (c) nanopartículas lipídicas sólidas, e (d) dendrímeros. Círculos pretos representam fármacos hidrofóbicos; quadrados pretos representam fármacos hidrofílicos; e triângulos pretos representam hidrofóbicos ou hidrofílicos..... 27

Capítulo 3

Figura 1 - Marcação da lectina *Wheat germ agglutinin* (WGA) nas *Aspergillus* spp em espécimes histopatológicas de cérebro (a-c) e pulmão (d-j) obtidas durante a necrópsia: *Aspergillus flavus* 6029 (a-c), *Aspergillus flavus* 5987 (d), *Aspergillus niger* 5924 (e-g), *Aspergillus sydowii* 6038 (h) e *Aspergillus tamaritii* 6030 (i-j). O teste controle (l-m) foi realizado na ausência de marcação da lectina. C= Conídios. Ch= Cabeça conidial. M= Micelium. Lt= Tecido pulmonar..... 44

Capítulo 4

Figura 1. Padrão de marcação com lectinas em esporos: intenso (a), moderado (b), fraco (c) e ausente (d).....	55
Figura 2. Padrão de marcação com lectinas em filamento miceliano: intenso (a), moderado (b), fraco (c) e ausente (d).....	56

Capítulo 5

Figura 1. Classificação clínica da ceratite fúngica experimental em ratos Wistar [(a)= sem lesão, (c)=fraca, (e)= moderada e (g)= forte] e o resultado do exame direto [(b)=não observados filamentos micelianos e (d,f,h)= presença de filamentos micelianos hialinos].....	67
--	----

Lista de tabelas

Capítulo 2	Pág.
Tabela 1 - Propriedades físico-químicas do itraconazol.....	24
Capítulo 3	
Tabela 1 - Pacientes diagnosticados post-mortem com aspergilose.....	42
Tabela 2 - Padrão de marcação das lectinas sobre a superfície da parede celular das espécies de <i>Aspergillus</i> em espécimes histopatológicas de cérebro e pulmão obtidos durante a necrópsia de pacientes diagnosticados postmortem com aspergilose invasiva.....	43
Capítulo 4	
Tabela 1 - Padrão de marcação com lectinas e susceptibilidade antifúngica <i>in vitro</i> com isolados clínicos de <i>Aspergillus</i>	54
Capítulo 5	
Tabela 1 - Resultado da avaliação clínica e micológica da atividade antifúngica da formulação lipossomal do itraconazol no tratamento de ceratite experimental por <i>Aspergillus flavus</i>	66

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
2.1. Biologia e taxonomia de <i>Aspergillus</i>	15
2.2. Aspergilose.....	16
2.3. Terapia com itraconazol.....	18
2.4. Fármacos nanoencapsulados.....	25
2.5. Lectinas.....	27
2.6. Interação lectina-fungo.....	29
2.7. Aspergilose experimental.....	32
2.7.1 Pulmonar e sistêmica.....	32
2.7.2 Ocular e cutânea.....	35
3.PERFIL DE CARBOIDRATOS DA SUPERFÍCIE DA PAREDE CELULAR DE ESPÉCIES DE <i>ASPERGILLUS</i> EM TECIDOS DE CÉREBRO E PULMÃO USANDO HISTOQUÍMICA COM LECTINAS.....	36
Resumo.....	37
Introdução.....	38
Material e métodos.....	38
Resultados.....	39
Discussão.....	40
4.VARIABILIDADE DE EXPRESSÃO DE QUITINA E OUTROS CARBOIDRATOS DA SUPERFÍCIE DA PAREDE CELULAR DE CONÍDIOS/HIFA DE ESPÉCIES DE <i>ASPERGILLUS</i> USANDO LECTINAS E SUSCEPTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> A ANFOTERICINA B, VORICONAZOL E ITRACONAZOL.....	45
Resumo.....	46
Introdução.....	47
Material e métodos.....	48
Resultados.....	50
Discussão.....	50

5.ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL DO ITRACONAZOL NO TRATAMENTO DE CERATITE EXPERIMENTAL POR <i>ASPERGILLUS FLAVUS</i>	57
Resumo.....	58
Introdução.....	59
Material e métodos.....	59
Resultados.....	62
Discussão.....	63
6. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO

A incidência de micoses oportunistas tem aumentado devido à crescente população de pacientes imunossuprimidos como transplantados, diagnosticados com neoplasias, hemopatias, diabetes, síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), pacientes idosos e outros. Apesar da existência de algumas opções para um tratamento eficaz, as infecções fúngicas invasivas são associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade (Lacaz *et al.*, 2002; Nucci *et al.*, 2010).

As características epidemiológicas das micoses oportunistas variam de acordo com a localização geográfica e o período do ano no qual a infecção é observada. O conhecimento epidemiológico das micoses em certas regiões é de importância tanto local como global uma vez que a migração das pessoas para diferentes partes do mundo está cada vez mais comum (Lima *et al.*, 2005, Nucci *et al.*, 2010, Keay *et al.*, 2011).

Aspergillus é um fungo ubíquo que pode causar uma variedade de síndromes clínicas, especialmente em pacientes imunossuprimidos. Este fungo tem emergido como um agente de graves infecções sistêmicas e oculares, e, portanto, ganhou importância considerável na saúde pública (Lacaz, 2002; Macêdo *et al.*, 2009; Nucci *et al.*, 2010). Vários fatores estão envolvidos na patogenicidade e na virulência desse microrganismo: a produção de micotoxinas, enzimas e outros metabólitos *in vivo* que podem causar lesões teciduais, a presença de melanina que protege o fungo de produtos oxidantes presentes nos tecidos e a capacidade de aderência e invasão do patógeno aos tecidos vivos (Lacaz *et al.*, 2002; Kaur *et al.*, 2008; Lima-Neto *et al.*, 2009).

A interação entre um fungo e o hospedeiro ocorre primeiramente ao nível dos glicoconjugados da superfície da parede celular. Assim, a caracterização dos carboidratos da superfície celular pode conduzir a uma melhor compreensão da adesão fúngica à célula do hospedeiro e aos mecanismos pelos quais o fungo evita e reage à ação do sistema imunológico e dos diferentes agentes antifúngicos (Bose *et al.*, 2003; Lima-Neto *et al.*, 2009).

Os fármacos antifúngicos atualmente disponíveis atuam sobre alvos moleculares distintos como: inibição da síntese de DNA, mitose (através da ruptura do fuso mitótico), síntese do ergosterol no retículo endoplasmático, síntese da parede celular e ligação ao ergosterol na membrana plasmática fúngica (alterando a permeabilidade celular). Diante da semelhança entre a célula fúngica e a célula humana, os antifúngicos utilizados no tratamento de infecções micóticas podem ser tóxicos para as células do hospedeiro (Maertens; Boogaerts, 2000; Walsh *et al.*, 2008). Uma alternativa que vem sendo utilizada para minimizar os efeitos colaterais dos antifúngicos é o desenvolvimento de formulações nanoencapsuladas (Zhang *et al.*, 2010).

A utilização de formulações antifúngicas nanoencapsuladas em lipossomas tem mostrado bastante eficiência no tratamento de infecções fúngicas experimentais e de pacientes. O desenvolvimento desse tipo de formulação é de extrema importância, pois, o uso controlado desses medicamentos pode diminuir as reações adversas no paciente, bem como pode minimizar o surgimento de cepas resistentes. Isso seria alcançado pelo melhor aproveitamento do fármaco tanto nos casos de infecções localizadas como principalmente nas disseminadas (Wagner *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010). Nos casos das doenças micóticas, em que existem poucos agentes antifúngicos disponíveis para o uso clínico, esse controle se faz necessário. Os relatos de resistência aos antifúngicos vêm aumentando gradativamente a cada ano especialmente para os agentes de micoses oportunistas, como espécies de *Aspergillus* (Chandrasekar, 2005; Posteraro *et al.*, 2006; Quiao *et al.*, 2008).

Diante do exposto, esta pesquisa teve como objetivos caracterizar o perfil de carboidratos da parede celular de espécies de *Aspergillus*, avaliar a susceptibilidade antifúngica *in vitro* ao itraconazol e a eficiência da formulação lipossomal do itraconazol no tratamento de ceratite experimental por *Aspergillus flavus*.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Biologia e taxonomia de *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* compreende uma grande quantidade de espécies cosmopolitas capazes de colonizar, degradar (ação enzimática) ou formar biofilmes em diversos tipos de substratos. Como a maioria dos fungos, estes se dispersam através de seus propágulos por ação dos ventos, chuvas e animais. Sua posição taxonômica é definida como pertencente ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Plectomycetes, Ordem Eurotiales, Família Trichocomaceae, Gênero *Aspergillus* (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Microscopicamente as espécies de *Aspergillus* caracterizam-se por apresentar conidióforos simples, com parede celular lisa, verrucosa ou espinesciente, hialinos ou pigmentados, originados na célula-pé da porção basal. O conidióforo, em seu ápice, dilata-se em uma vesícula de forma variada (globosa, subglobosa e clavada), hialina ou pigmentada, das quais originam as fiálides. Estas fiálides podem ser classificadas como estreitamente unisseriadas, bisseriadas e unisseriadas na mesma vesícula (com predominância das primeiras) e estritamente bisseriadas (Raper; Fennell, 1977; De Hoog *et al.*, 2000).

A cor e a forma das cabeças conidiais verificadas com o auxílio do microscópio estereoscópico no anverso (superfície) da colônia constituem elementos importantes na separação dos diferentes grupos do gênero *Aspergillus*. Na taxonomia clássica, as espécies de *Aspergillus* são identificadas pelo conjunto de características macroscópicas, devendo-se utilizar meios de cultura como o ágar-Czapek para o estudo da colônia, e microscópicas através da análise das estruturas fúngicas entre lâmina e lamínula. Meios especiais e presença ou ausência de luz natural são muitas vezes necessários para a obtenção de teleomorfos caracterizados pela presença de cleistotécio, ascos e ascosporos. Nestes casos, o fungo é classificado como teleomorfo e pertencente a um dos oito gêneros *Emericella*, *Eurotium*, *Chaetosartorya*, *Neosartorya*, *Petromyces*, *Hemicarpenales*, *Sclerocleista* ou *Fennellia* (Raper e Fennell, 1977; De Hoog *et al.*, 2000).

Diante da grande importância econômica desse grupo de fungos, muitos pesquisadores de toda parte do mundo vem investigando e discutindo sobre os métodos mais eficientes para o reconhecimento e identificação das espécies de *Aspergillus* e seu teleomorfo. Além da análise macro e micromorfológica outros parâmetros vêm sendo utilizados nos estudos taxonômicos como a caracterização fisiológica (taxa de crescimento e produção de metabólitos secundários em meio de cultura) e molecular (análise do DNA) (Geiser *et al.*, 2007; Bennett, 2010).

Atualmente são conhecidas mais de 300 espécies de *Aspergillus*, contudo aproximadamente 20 são consideradas patogênicas ao homem. Aspergilose pulmonar é a forma clínica mais comum e está associada à alta mortalidade em pacientes imunossuprimidos. Graças ao pequeno tamanho dos

seus conídios, estes podem ficar suspensos no ar durante longos períodos e assim serem inalados pelos hospedeiros (De Hoog *et al.*, 2000).

Em 1979, Staib e colaboradores verificaram que plantas ornamentais, muitas vezes presentes em quartos de pacientes hospitalizados, podem veicular esporos de *A. fumigatus* e *A. niger*. Essas duas espécies são as que mais se destacam nos casos de aspergilose pulmonar. Porém, observa-se um aumento progressivo da doença causada por outras espécies, como *A. flavus* e *A. terreus*, sendo este último bastante relatado como resistente a anfotericina B (Nucci e Marr, 2005).

Outra característica, de importância médica, do gênero *Asperillus* é a capacidade de algumas espécies de produzirem micotoxinas (exs: aflatoxinas e ocratoxinas) em substratos como alimentos e bebidas. (Leal *et al.*, 2010). Paterson *et al.* (1997) detectaram aflatoxina produzida por *A. flavus* em amostras de água coletada de uma cisterna. Leal *et al.* (2010) isolaram da água de bebedouros duas espécies conhecidas por produzirem micotoxinas *A. flavus* e *A. niger*. A exposição às altas concentrações desta toxina produz graves danos ao fígado, tais como necrose, cirrose hepática, carcinoma ou edema (Lacaz *et al.*, 2002, Kaur *et al.*, 2008). Sabe-se também que essas toxinas podem ser liberadas pelos fungos durante o parasitismo piorando ainda mais os danos causados em seu hospedeiro (Kaur *et al.*, 2008).

2.2 Aspergilose

A aspergilose é uma micose causada por qualquer uma das diferentes espécies de *Aspergillus*, que acomete o homem e outros animais. A doença varia de acordo com a extensão das lesões, o tempo de evolução clínica, o tipo de órgãos afetados e o grau de resistência orgânica do hospedeiro (Lacaz *et al.*, 2002).

Essa micose de caráter oportunista assume particular importância clínica em imunossuprimidos onde a incidência das infecções fúngicas decorre de fatores intrínsecos ao hospedeiro como pneumopatias, cardiopatias, neoplasias, insuficiência renal crônica, transplantes, hemopatias e a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), e extrínsecos como uso de procedimentos invasivos, medicamentos imunossupressores assim como internamento prolongado em unidades de terapia intensiva onde a microbiota nosocomial é rica em propágulos de fungos (Weig; Reichard; Grob, 2001; García *et al.*, 2005).

A manifestação clínica mais freqüente é a aspergilose pulmonar, com o crescimento do micélio, denominados de aspergiloma ou “fungus ball”, geralmente assintomático exceto pela hemoptise (expectoração com sangue) ocasional; ou causando pneumonia disseminada crônica com expectoração, tosse e falta de ar (Lacaz *et al.*, 2002; Lopes *et al.*, 2004; Walsh *et al.*, 2008).

Sluyter publicou em 1847 o primeiro caso de aspergilose pulmonar fatal. Na necrópsia, foram observadas massas fúngicas em uma cavidade pulmonar e o fungo isolado foi identificado

como *Aspergillus*. Nas décadas seguintes uma série de casos de aspergilose pulmonar foi publicada (Pesle e Monod, 1954). Virchow, em 1856, descreveu em detalhes quatro casos em que os pacientes apresentavam diarreia, pneumonia, enfisema, carcinoma gástrico e concluiu que a infecção por *Aspergillus* foi secundária.

Além da aspergilose pulmonar, outras formas clínicas vêm se tornando cada vez mais comum como a aspergilose cutânea (cistos), e a ocular (Lacaz *et al.*, 2002, Walsh *et al.*, 2008).

Em 1967, Cahill e colaboradores relataram um dos primeiros casos de aspergilose cutânea primária disseminada. O paciente do sexo masculino, com 42 anos, egípcio vinha sendo tratado erroneamente para hanseníase wircroviana por um período de dez anos. Após um exame microbiológico foi verificado que as lesões eram causadas pelo *A. niger*. Com a confirmação do diagnóstico o paciente foi curado com a administração de nistatina. Os autores enfatizam a necessidade de considerar as infecções micóticas cutâneas no diagnóstico diferencial de hanseníase.

Vários trabalhos destacam que os principais fatores predisponentes para o desenvolvimento de aspergilose cutânea primária ou secundária são: pacientes portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), queimaduras, neonatos, pacientes com câncer e transplantados (Burik *et al.*, 1998; Klein; Blackwood, 2006; Nakashima *et al.*, 2010; Tunçcan *et al.*, 2011). Nos casos de infecção cutânea primária, muitos podem estar relacionados a lesões mínimas ou inaparente na pele, causadas por fitas adesivas de curativos, catéteres intravenosos, próteses e outros. Embora tais infecções sejam mais raras em pacientes saudáveis, estes também podem desenvolver aspergilose cutânea através de ferimentos cirúrgicos, por inoculação traumática ou pela exposição à alta concentração de esporos como ocorre em alguns trabalhadores rurais (Burik *et al.*, 1998; Nakashima *et al.*, 2010).

As infecções oculares por *Aspergillus* sp. vem se tornando cada vez mais comum, acometendo pacientes imunossuprimidos e imunocompetentes (Lacaz *et al.*, 2002, Walsh *et al.*, 2008). O primeiro relato de caso de ceratite fúngica por *Aspergillus* sp. ocorreu em 1879 na Alemanha (Shukla *et al.*, 2008). Segundo Shukla *et al.* (2008) até 1951, existiam apenas 63 casos descritos na literatura.

Balakrishnan (1961) publicou um caso de ceratite por *A. fumigatus* em um agricultor que pode ter adquirido a infecção fúngica após um trauma ocular causado por grãos de areia. Estudos epidemiológicos mostraram que trabalhadores rurais estão sujeitos a esse tipo de infecção e que a ocorrência de ceratite fúngica nesse grupo de pessoas aumenta significativamente em períodos de colheita (Bharathi *et al.*, 2003; Godoy *et al.*, 2004).

Após a sua instalação no tecido ocular, as espécies de *Aspergillus* podem infectar diferentes partes do olho causando esclerite, conjutivite, ceratite, canaliculite, endoftalmite e infecção orbital (Willermain *et al.*, 2008). Em algumas circunstâncias, como imunossupressão, esses fungos também

podem lesionar a órbita através da disseminação de uma infecção dos seios nasais (infecção sino-orbital) (Willermain *et al.*, 2008; Lambertucci *et al.*, 2009). Nesses casos, a falta de diagnóstico precoce e tratamento com antifúngicos, essa infecção pode causar a perda do globo ocular do paciente e disseminar-se para outras partes do corpo como o cérebro levando-o a óbito (Willermain *et al.*, 2008; Lambertucci *et al.*, 2009).

Aspergilose disseminada tem mal prognóstico e há poucos relatos sobre o envolvimento extra-pulmonar. Entretanto, esta forma apresenta diferentes manifestações clínicas de acordo com os órgãos e sistemas envolvidos entre estes; coração, rins, sistema nervoso central, trato gastrintestinal, baço, fígado, e pâncreas (Hori *et al.*, 2002; Verghese *et al.*, 2004; Macêdo *et al.*, 2009).

Em imunocompetentes, aspergilose desenvolve-se lentamente e raramente se torna severa. Todavia, em imunossuprimidos progride rapidamente e usualmente se torna fatal, sendo o diagnóstico e tratamento precoces, essenciais para sobrevida do paciente (Ayman *et al.*, 2002; Walsh *et al.*, 2008).

O padrão ouro para o diagnóstico de aspergilose é a demonstração de invasão tecidual pelo microorganismo ao exame direto ou em estudo histopatológico (Hope *et al.*, 2005; Freitas *et al.*, 2009). Entretanto, dependendo da condição clínica da doença, os estudos histopatológicos pode requerer um procedimento invasivo de difícil execução nos pacientes, principalmente nos imunossuprimidos. Além disso, técnicas moleculares não-invasivas para a detecção de antígenos de *Aspergillus* sp. (galactomanana) no sangue ou no lavado brônquico não estão bem definidas e apresentam aplicação prática limitada (Hope *et al.*, 2005; Freitas *et al.*, 2009). Alguns autores demonstraram inclusive que lesões da aspergilose pulmonar invasiva na tomografia computadorizada de tórax precedem a detecção sérica do antígeno galactomanana pela biologia molecular (Weisser *et al.*, 2005).

2.3 Terapia com itraconazol

Ao longo da última década, houve uma expansão na pesquisa dos fármacos antifúngicos, no desenvolvimento de novos compostos e estratégias terapêuticas para o tratamento de infecções por *Aspergillus* spp (Patterson, 2005). Com base em vários estudos, os seguintes antifúngicos têm apresentado atividade *in vitro*, *in vivo* e clínico contra espécies de *Aspergillus*: anfotericina B (AMB) e suas formulações lipídicas (AMB complexo lipídico – ABLC, AMB lipossomal – L-AMB e AMB dispersão coloidal – ABCD), itraconazol, voriconazol, posaconazol e caspofungina (Walsh *et al.*, 2008).

O itraconazol, um triazólico desenvolvido na década de 1980, apresenta-se como primeiro azol com atividade antifúngica contra várias espécies de dermatófitos, leveduras, fungos dimórficos

e fungos filamentosos como espécies de *Aspergillus* (Figura 1) (Van Cutsem *et al.*, 1984; Van Cutsem *et al.*, 1987). Os compostos azólicos atuam sobre enzimas do citocromo P450 dos fungos bloqueando a demetilação do lanosterol e a síntese de ergosterol, alterando a permeabilidade da membrana celular e a viabilidade da célula fúngica (Figura 2) (Cowen e Steinbach, 2008). Muitos estudos têm demonstrado a eficácia do itraconazol no tratamento dos diferentes quadros clínicos de aspergilose bem como no uso profilático da infecção fúngica invasiva em pacientes imunodeprimidos (Tricot *et al.*, 1987; Boogaerts *et al.*, 2001; Glasmacher *et al.*, 2006; Ito *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009). Os dados referentes às propriedades físico-químicas do itraconazol podem ser vistos na Tabela 1.

Tricot *et al.* (1987) confirmaram que o itraconazol é mais eficiente do que cetoconazol na prevenção de infecções fúngicas oportunistas em pacientes com granulocitopenia e leucêmicos. A incidência de infecções fúngicas fatais por *Aspergillus* nesse grupo de pacientes foi significativamente maior entre os pacientes tratados com cetoconazol. Outro estudo realizado com esses antifúngicos em um setor pediátrico de hematologia e oncologia da Bélgica obteve resultados semelhantes (Ninane, *et al.*, 1989).

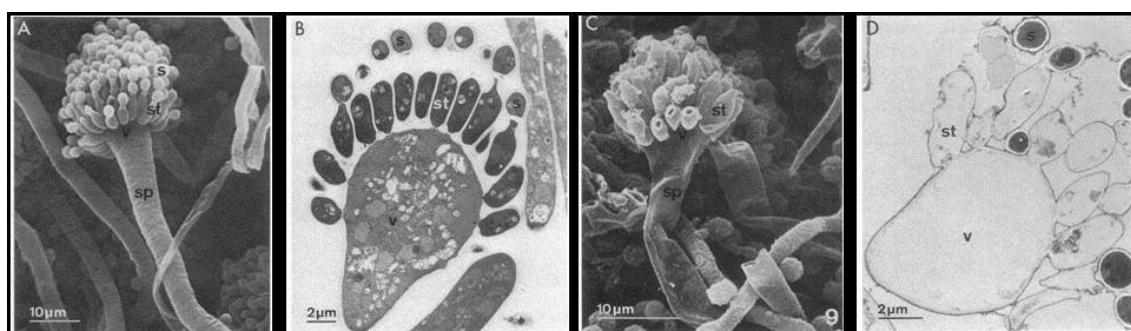


Figura 1. Estruturas morfológicas intactas de *Aspergillus* sp (A-B). Efeito da ação do itraconazol sobre as estruturas do fungo (C-D). Sp= esporóforo, V= vesícula, St= esterigma e S= esporo (Van Cutsem *et al.*, 1984).

Beule *et al.* (1988) avaliaram o efeito do itraconazol (50-400 mg/dia por 11-780 dias) em 137 pacientes diagnosticados com aspergilose. Os resultados mostraram que 60% dos pacientes com aspergilose invasiva e 66% com aspergilose pulmonar crônica necrozante foram curados. Nos casos de aspergiloma, 62% apresentaram melhora clínica, constatada pelas imagens radiológica. Todos os casos de aspergilose cutânea foram curados após 158 dias de tratamento. Dois a cada três casos de acometimento ósseo, comprovado por biópsia, responderam a terapia com este antifúngico.

Denning *et al.* (1989) concluíram que o itraconazol (400 mg/dia) é bastante eficiente no tratamento da aspergilose. Dos 15 casos avaliados, 11 responderam ao tratamento. A cura dos pacientes foi observada em quatro dos cinco casos de aspergilose pulmonar invasiva, dois de dois

casos de infecção óssea, um de dois casos de infecção pleural, um de um caso de infecção do pericárdio e um caso de onicomicose.

Dupont (1990) obteve bons resultados terapêutico ao prescrever itraconazol (200-400 mg/dia) para o tratamento de diferentes quadros clínicos de aspergilose. Ao total foram 49 pacientes, sendo 14 com aspergiloma, 14 com aspergilose pulmonar necrosante e 21 com aspergilose invasiva. O itraconazol foi administrado após a falta de resposta terapêutica com anfotericina B e flucitosina. Dos 14 pacientes com aspergiloma, dois foram curados e oito apresentaram melhora clínica. Nos casos de aspergilose pulmonar necrosante, sete foram curados, seis os sintomas melhoraram significativamente e no tratamento da aspergilose invasiva 15 foram curados. Com base nesses resultados, Dupont conclui que o itraconazol pode ser uma alternativa no tratamento de aspergilose invasiva, aspergilose pulmonar necrosante e aspergiloma.

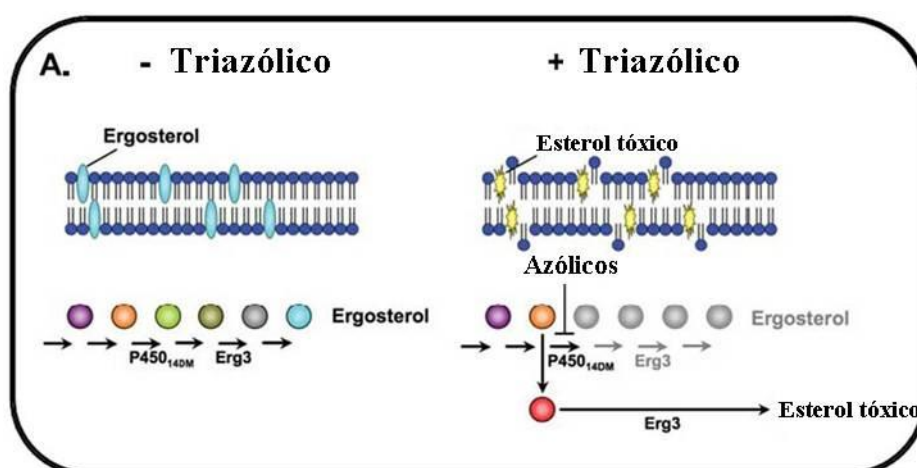


Figura 2. Mecanismo de ação dos tirazólicos: atuam sobre enzimas do citocromo P450 dos fungos bloqueando a demetilação do lanosterol e a síntese de ergosterol, alterando a permeabilidade da membrana e a viabilidade da célula fúngica (adaptado de Cowen e Steinbach, 2008).

Denning *et al.* (1990) obtiveram ótimos resultados com a administração oral de itraconazol para o tratamento da aspergilose. Dos 15 pacientes diagnosticados (10 imunossuprimidos e cinco imunocompetentes) 12 responderam ao tratamento sendo oito imunossuprimidos. Segundo os autores esses resultados se comparam a administração parenteral do itraconazol.

Segundo Van't Wout *et al.* (1991) a terapia com itraconazol é mais eficiente contra as infecções fúngicas oportunistas por espécies de *Aspergillus* do que por *Candida*. Nos casos de candidíase o antifúngico mais adequado seria anfotericina B. Os resultados mostraram que 63% dos pacientes tratados com itraconazol (200 mg/duas vezes ao dia) apresentaram resposta clínica favorável.

Hostetler *et al.* (1992) verificaram que o itraconazol apresentou uma excelente atividade antifúngica em pacientes portadores do HIV que desenvolveram aspergilose. A taxa de resposta

terapêutica dos pacientes com HIV foi de 86%, enquanto a dos pacientes não portadores do vírus foi de 80%. Os autores concluem que o itraconazol é uma alternativa terapêutica para infecções por espécies de *Aspergillus*.

Pannelier *et al.* (1992) avaliaram a eficácia do itraconazol no tratamento de 22 pacientes diagnosticados com aspergilose sistêmica. Seis pacientes imunossuprimidos foram tratados com doses de 400 mg/dia enquanto os imunocompetentes com 200 mg/dia. Os resultados globais foram positivos em 19 casos (86%), sendo oito (36%) pacientes curados, nove (40%) com melhora significativa e dois (9%) moderada.

Denning *et al.* (1994) constataram que a taxa de sucesso da terapia com itraconazol varia amplamente de acordo com a localização da infecção fúngica e da doença de base do paciente. A variação foi de 14% para aqueles com doenças pulmonares e brônquicas, 50% para doença sinusal, 63% para doenças do sistema nervoso central e 44% para outros sítios corpóreos. Os autores concluem que as taxas de resposta terapêutica do itraconazol são comparáveis aos da anfotericina B.

Annaloro *et al.* (1995) verificaram nos seus estudos com pacientes neutropênicos, que a administração de altas doses de itraconazol (400 mg/dia) e fluconazol (300 mg/dia) eram equivalentes na prevenção de micoses oportunistas por leveduras e fungos filamentosos. Dos 30 pacientes tratados com fluconazol (50 mg/dia), um caso de aspergilose foi confirmado e outros dois apresentaram fortes suspeitas clínicas.

Stevens e Lee (1997) analisaram 125 casos de aspergilose tratados com itraconazol e observaram que em 34 pacientes (27%) a resposta terapêutica foi completa, 45 (36%) melhoraram significativamente, 20 (16%) permaneceram sem alterações clínicas e 26 (21%) agravaram o quadro clínico. Foi verificado que o grupo de pacientes tratados por menos de duas semanas com o antifúngico teve o pior resultado. Segundo os autores essa análise suporta conclusões anteriores que as taxas de resposta ao itraconazol são semelhantes aos relatados para anfotericina B.

Morgenstem *et al.* (1999) compararam a eficácia profilática de itraconazol e fluconazol para infecções fúngicas oportunistas em pacientes com doenças hematológicas submetidos a quimioterapia ou transplantes de medula óssea. Para a prevenção da aspergilose nesse grupo de pacientes, observaram que administração de itraconazol (5 mg/kg/dia) foi mais eficiente que fluconazol (100 mg/kg/dia). Por outro lado Huijgens *et al.* (1999) não observaram diferenças significativas no uso desses antifúngicos no tratamento profilático de aspergilose em pacientes neutropênicos e transplantados.

Com o intuito de compreender melhor a importância preventiva do itraconazol nas infecções por espécies de *Aspergillus*, Kibler (1999) comparou a atividade desse antifúngico com fluconazol (100 mg/dia) e anfotericina B (2 mg/dia). Os resultados mostraram que o número de pacientes que desenvolveram aspergilose invasiva foi menor no grupo tratado com itraconazol (5 mg/dia).

Outro estudo comparativo realizado por Harousseau *et al.* (2000) também confirma que o itraconazol apresenta melhor atividade profilática do que anfotericina B. O tratamento preventivo dos pacientes foi iniciado simultaneamente com a quimioterapia e foi mantido até o fim do período neutropênico. Dos 281 pacientes tratados com itraconazol (2,5 mg/dia), cinco (1,8%) foram diagnosticados com aspergilose invasiva e dos 281 tratados com anfotericina B (500 mg/dia), nove (3,3%) foram confirmados com aspergilose. O número de óbitos também foi maior para o grupo tratado com anfotericina B (quatro mortes) do que com itraconazol (uma morte).

Boogaerts *et al.* (2001) confirmaram a melhor eficácia da administração oral do itraconazol (100 mg/dia) na profilaxia de infecções fúngicas em pacientes neutropênicos do que ação combinada de anfotericina B (500 mg/dia) e nistatina. Dos pacientes tratados com itraconazol, 65% não desenvolveram nenhum tipo de micose oportunista enquanto que no grupo do polieno foi de 53%.

Caillot (2003) avaliou a eficácia terapêutica da administração intravenosa de itraconazol (200 mg duas vezes ao dia durante dois dias e depois uma dose por dia durante 12 dias) seguida pela administração oral (200 mg duas vezes ao dia por 12 semanas). O estudo foi realizado com 31 pacientes imunossuprimidos com aspergilose pulmonar invasiva, sendo 21 destes previamente tratados com anfotericina B sem apresentar melhora clínica. Com base nos resultados, que mostraram 52% de sucesso terapêutico, o autor conclui que administração intravenosa de itraconazol seguida pela formulação oral é eficaz nos casos de aspergilose pulmonar invasiva refratário a anfotericina B.

Winston *et al.* (2003) verificaram que a maioria dos fungos patogênicos oportunistas apresentavam mais resistência ao fluconazol do que itraconazol. Os resultados mostraram que 9% dos pacientes tratados com itraconazol (200 mg/dia) e 25% com fluconazol (400 mg/dia) desenvolveram micoses invasivas. Entretanto, a taxa de mortalidade foi semelhante entre os dois grupos com 45% para itraconazol e 42% para fluconazol. Os autores concluem que o itraconazol é mais eficiente que o fluconazol, principalmente, nos casos de profilaxia de longa duração.

Gupta *et al.* (2005) diagnosticaram 43 casos de aspergiloma e 45 de aspergilose pulmonar crônica em pacientes com cavidades residuais de tuberculose e trataram com itraconazol (200 mg/dia). Após três meses de tratamento, metade dos pacientes com aspergiloma e 85% com aspergilose pulmonar crônica foram curados. As espécies mais frequentemente isoladas pelos autores foram *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger*.

Kalavathy *et al.* (2005) compararam a eficácia do itraconazol (0,1%) e natamicina (5%), aplicados topicamente, para o tratamento de ceratite por fungo filamentoso (*Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. e *Curvularia* spp.). Os autores não verificaram diferença significativa entre as duas formulações no tratamento de pacientes acometidos por *Aspergillus* spp. e *Curvularia* spp.

Glasmacher *et al.* (2006) não observaram diferenças significativas entre o uso de itraconazol ou fluconazol na prevenção de infecções invasivas por espécies de *Aspergillus* em pacientes com doenças hematológicas. Dos 248 pacientes tratados com o itraconazol, dois (0,8%) desenvolveram aspergilose invasiva enquanto no grupo do fluconazol (246 pacientes) três (1,2%) casos foram confirmados.

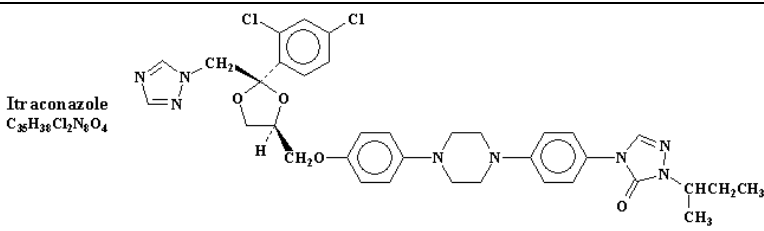
Para o sucesso do tratamento da aspergilose invasiva é primordial a inversão da imunossupressão como a redução da dose de corticosteróides ou a melhora do quadro de neutropenia. A duração da terapia com antifúngicos para a aspergilose pulmonar invasiva, ainda não está bem definida. Em geral, é recomendado que o tratamento de aspergilose pulmonar invasiva seja no mínimo de 6-12 semanas. Em pacientes imunodeprimidos, a terapia deve ser continuada durante todo período de imunossupressão e até que as lesões tenham regredido (Sipsas; Kontoyiannis, 2006).

Segundo Greene *et al.* (2007) e Cornely *et al.* (2007), a terapia com antifúngicos em pacientes com fortes suspeitas de aspergilose invasiva deve ser realizado o mais breve possível enquanto é confirmado o diagnóstico.

De acordo com Walsh *et al.* (2008) sem tratamento adequado, a aspergilose invasiva quase sempre progride para uma infecção fatal. Em pacientes neutropênicos, esta micose oportunista pode ser caracterizada pela presença de hemorragia e/ou uma necrose progressiva dos pulmões. Devido ao seu alto poder de disseminação, o fungo pode atingir outras estruturas intratorácicas como os grandes vasos e o coração.

A monitorização regular da terapêutica de aspergilose invasiva inclui uma série de avaliações clínicas de todos os sintomas e sinais, bem como, o das imagens radiográficas. A frequência com que devem ser realizadas essas avaliações não pode ser universalmente definida, sendo necessário individualizar com base na rapidez da evolução do quadro clínico e da acuidade de cada paciente (WALSH *et al.*, 2008).

Tabela 1. Propriedades físico-químicas do itraconazol.

Nome químico	2-butan-2-yl-4-[4-[4-[4-[(2''R'',4''S'')-2-(2,4-dichlorophenyl)-2- (1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4- yl]methoxy]phenyl]piperazin-1-yl]phenyl]-1,2,4-triazol-3-one	
Fórmula Estrutural	 Itraconazole C₃₅H₃₈Cl₂N₈O₄	
Fórmula molecular	C ₃₅ H ₃₈ Cl ₂ N ₈ O ₄	
Armazenagem	Protegido da luz e umidade (15-25°C). Nestas condições, o prazo de validade é de 24 meses a partir da data de fabricação.	
Solubilidade: composto lipofílico, praticamente insolúvel em água e em soluções ácidas diluídas	Solvente	Solubilidade (mg/mL)
	Água (pH= 7)	0,001
	Etanol	0,30
	Metanol	0, 71
	Acetona	2,0
	Polietilenoglicol 400	2,7
	Dimetilsufóxido	16,0
	Tetrahidrofurano	27,3
	Diclorometano	239
	Cloroformio	363
pKa	3.7	
Coeficiente de partição (n-octanol/tampão aquoso pH= 8,1)	5.66	
PM	705, 65 g/mol	
PF	166°C	
Biodisponibilidade	Vasta distribuição pelos tecidos (pulmões, rim, fígado, ossos, estômago, baço e músculos).	
Atividade antifúngica	<i>In vitro</i> (0,0313 a 16µg/mL) <i>In vivo</i>	
Formas farmacêuticas	Cápsulas, injetáveis e creme.	
Vias de administração	Oral, intravenosa e tópica	
Métodos de dosagem:	UV λ= 263 nm HPLC HPLC/MS (massa) HPLC FASE REVERSA C18 FASE REVERSA	
Toxicidade	Encontra-se, na literatura, alguns efeitos relacionados ao uso de itraconazol a nível sistêmico. Hepatotoxicidade; Desconforto intestinal (diarréias e vômitos); Hipertrigliceridemia, hipopotassemia (casos mais raros).	

2.4 Fármacos nanoencapsulados

Ao longo das últimas décadas, as aplicações da nanotecnologia nas ciências médicas têm sido extensivamente exploradas, especialmente no desenvolvimento de fármacos nanoencapsulados (Zhang *et al.*, 2008). Este tipo de formulação oferece inúmeras vantagens quando comparados a outros de dose convencional, ou seja, o medicamento livre não encapsulado. Inúmeros trabalhos evidenciaram que as principais vantagens da utilização dessa tecnologia são: 1) maior eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada do fármaco, a partir da degradação da matriz; 2) diminuição significativa da toxicidade e maior tempo de permanência na circulação; 3) administração segura (sem reações inflamatórias locais) e conveniente (menor número de doses); 4) possibilidade de oferecer mais de um agente terapêutico simultaneamente (terapia de combinação) (Peer *et al.*, 2007; Davis *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008). Além disso, as nanopartículas podem penetrar na célula hospedeira, através da endocitose, e liberar o agente antimicrobiano diretamente nos parasitas intracelulares (Wagner *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008).

Alguns tipos de nanopartículas, incluindo lipossomas, nanopartículas poliméricas, e nanopartículas lipídicas sólidas têm sido amplamente investigados como agentes carreadores de compostos antimicrobianos (Schiffelers; Storm; Bakker-Woudenberg, 2001; Kaur; Nahar; Jain, 2008; Zhang *et al.*, 2010).

Lipossomas são vesículas microscópicas compostas de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, separadas por um meio aquoso (Zhang; Granick, 2006). Sua estrutura foi descrita pela primeira vez em 1965 por Bangham e colaboradores. A proposta de utilizá-lo no encapsulamento de fármacos para controlar a liberação medicamentosa surgiu na década de 1970 (New; Chance; Heath, 1981).

Atualmente, os lipossomas são os mais utilizados nos sistemas de liberação de fármacos antimicrobianos. Uma das características distintivas dos lipossomas é a sua estrutura de bicamada lipídica, que se assemelha as membranas celulares e pode fundir-se facilmente com a membrana celular dos agentes infecciosos (bactérias e fungos) e liberar o medicamento no meio intracelular (Zhang *et al.*, 2010).

Formulações lipossomais de anfotericina B vêm sendo amplamente utilizada na clínica médica para o tratamento de micoses por espécies de *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, e outros fungos de alta e baixa patogenicidade (Kelsey *et al.*, 1999; Walsh *et al.*, 2001; Walsh *et al.*, 2008).

Em 1994, Adler-Moore e colaboradores observaram alta especificidade da AmBisome[®] para os sítios de infecções fúngicas. Utilizando formulações lipídicas marcadas com fluoresceína foi possível verificar, através de testes de infecção experimental em camundongos, que os lipossomas fluorescentes estavam localizados nos focos de infecções fúngicas.

Consequentemente outros trabalhos realizados com modelos experimentais *in vivo* constataram melhor eficácia no tratamento de micoses sistêmicas com antifúngicos na formulação lipossomal (Martin *et al.*, 2003; Gavaldà *et al.*, 2005; Takemoto *et al.*, 2006).

Nanopartículas, formadas por biopolímeros biodegradáveis, têm sido amplamente utilizadas nos sistemas de liberação controlada de fármacos (Zhang *et al.*, 2010). Langer e Folkman (1976) foram os primeiros a desenvolverem e utilizarem esses polímeros na entrega de macromoléculas.

Segundo Umamaheshwari e Jain (2003) as nanopartículas poliméricas possuem várias características importantes para a entrega de agentes antimicrobianos. Em primeiro lugar está a estabilidade estrutural das nanopartículas poliméricas. Em segundo, as propriedades das partículas como tamanho, potencial zeta e perfis de liberação do fármaco podem ser precisamente ajustados, selecionando diferentes tamanhos de polímeros, surfactantes e solventes orgânicos durante a síntese. Em terceiro lugar, a superfície de nanopartículas poliméricas normalmente contém grupos funcionais que podem ser modificados quimicamente para a conjugação de moléculas carreadoras para sítios alvos específicos.

Espuelas *et al.* (2003) e Espada *et al.* (2008) observaram menor eficácia no tratamento de candidíase sistêmica, em camundongos, com anfotericina B encapsulado em nanopartículas poliméricas. Entretanto, os autores concluem que esse problema pode ser contornado pela possibilidade de aumentar as doses do antifúngico com menor nefrotoxicidade.

Outro sistema particulado que vem sendo avaliado na liberação controlada de antifúngicos é a nanopartícula lipídica sólida, sistema formado principalmente de lipídios que estão em fase sólida à temperatura ambiente e surfactantes para emulsificação (Eldem; Speiser; Hincal, 1991). Formulações de nanopartículas lipídicas sólidas são ideais para o desenvolvimento de pomadas para aplicações tópicas. Esta característica permite que tais formulações possam ser usadas com sucesso no tratamento de infecções micóticas superficiais (Souto; Muller, 2005; Bhalekar *et al.*, 2007; Sanna *et al.*, 2007).

Sanna e colaboradores (2007) demonstraram, através de estudos *ex vivo* e *in vivo*, que a encapsulação de econazol com nanopartícula lipídica sólida promoveu uma rápida penetração do antifúngico no estrato córneo e melhorou a difusão do fármaco nas camadas mais profundas da pele.

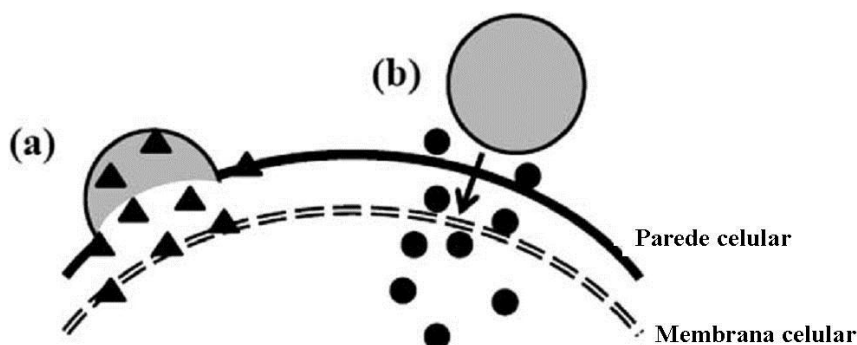


Figura 3. Mecanismo de ação dos fármacos antimicrobianos em nanopartículas sobre os microrganismos: (a) fusão da nanopartícula com a parede e/ou membrana celular microbiana e liberação do fármaco dentro da parede ou membrana, (b) as nanopartículas se ligam a parede celular e liberam o fármaco continuamente, o qual irá se difundir para o interior dos microrganismos (adaptado de Zhang *et al.*, 2010).

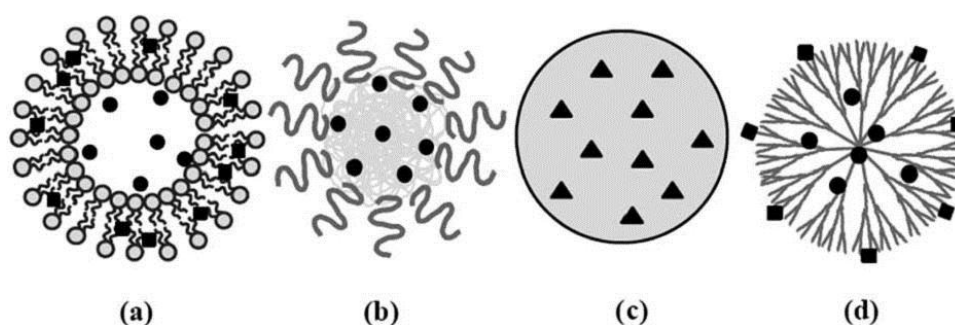


Figura 4. Ilustração esquemática de quatro tipos de nanopartículas utilizadas como carreadoras de antimicrobianos: (a) Lipossoma, (b) nanopartícula polimérica, (c) nanopartículas lipídicas sólidas, e (d) dendrímeros. Círculos pretos representam fármacos hidrofóbicos; quadrados pretos representam fármacos hidrofílicos; e triângulos pretos representam hidrofóbicos ou hidrofílicos (adaptado de Zhang *et al.*, 2010).

2.5 Lectinas

Em 1888, o médico Hermann Stillmark, da Universidade de Dorpat na Estônia, apresentou em sua tese a descrição das propriedades aglutinantes do rícino, isolado de sementes de mamona. A palavra aglutinina era bastante utilizada, desde 1860, para descrever moléculas e extratos que tinham a propriedade de aglutinar eritrócitos e outros tipos de células (Bies *et al.*, 2004).

Em 1950, a palavra lectina (do latim *legere* “selecionar”) foi empregada para descrever substâncias de origem vegetal que tinham a capacidade de reconhecer e diferenciar os tipos sanguíneos com base na variação da expressão dos açúcares (Boyd; Shapleigh, 1954).

Lectinas são definidas como proteínas ou glicoproteínas que se ligam especificamente e reversivelmente a mono e oligossacarídeos livres ou na forma de glicoconjugados (glicoproteínas e

glicolípido). Dessa forma, combinam-se com moléculas e estruturas biológicas que contêm esses açúcares sem alterar a estrutura covalente das ligações glicosídicas nos sítios de ligação (Chen *et al.*, 2005; Chumkhunthod *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2006).

De acordo com Sharon e Lis (2004) os carboidratos interagem com as lectinas através de pontes de hidrogênio formadas pela disponibilidade de um grande número de hidroxilas nos açúcares, que atuam como doadores ou receptores de hidrogênio e participam da interação lectina-carboidrato, interações hidrofóbicas (Drickamer, 1995; Loris *et al.*, 2000).

Essas proteínas também são encontradas em animais, fungos, bactérias e vírus (Griffin, 1993; Peumans; Van Damme, 1995), entretanto essas substâncias estão presentes em maior quantidade nas plantas principalmente em grãos de leguminosas e gramíneas (Ng *et al.*, 2002; Sharon e Lis, 2004; Alencar *et al.*, 2005). Estudos apontam que as lectinas têm função importante na defesa das plantas contra agentes invasores como bactérias e fungos (Peumans; Van Damme, 1995; Ye; Ng, 2001).

As lectinas podem ser agrupadas de acordo com a especificidade de ligação com o carboidrato e com as características estruturais. Baseando-se na afinidade por açúcares, essas proteínas podem ligar-se a D-manose/D-glicose, D-manose, N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina, D-galactose, L-fucose e ácido siálico (Peumans e Van Damme, 1995; Ngai; Ng, 2004; Wong; Ng, 2005; Wong *et al.*, 2006).

De acordo com suas características estruturais, as lectinas podem ser divididas em três grandes grupos, as merolectinas, hololectinas e quimerolectinas. Merolectinas são proteínas que consistem exclusivamente de único domínio de ligação a carboidrato. Devido ao caráter monovalente, as merolectinas são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células (Peumans e Van Damme, 1995). Hololectinas são compostas por dois ou mais sítios de ligação, podendo ser idênticos ou semelhantes. Por serem di ou multivalente, podem aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados, comportando-se como aglutininas e compreendem a maioria das lectinas de plantas, pois se comportam como aglutininas. Quimerolectinas são compostas de um ou mais domínios de ligação a carboidratos e um domínio não relacionado com ligação a açúcares. Dependendo do número de sítios de ligação a carboidratos, as quimerolectinas comportam-se como merolectinas ou hololectinas (Peumans e Van Damme, 1995).

Vários estudos vêm mostrando a participação das lectinas em diversas atividades biológicas como antitumoral (Ngai; Ng, 2004), imunomodulatória (Rubinstein *et al.*, 2004), estimulação de macrófagos, acumulação de leucócitos (Rodriguez *et al.*, 1992), indução da produção de interferon δ por linfócitos humanos (Barral-Netto *et al.*, 1992), liberação de histamina (Gomes *et al.*, 1994), efeitos edematogênicos e migração celular (Bento *et al.*, 1993), antifúngica (Ciopraga *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2001; Damico *et al.*, 2003; Trindade *et al.*, 2006), antibacteriana (Ayoubia *et al.*, 1994),

anti-HIV (Wong; Ng, 2003; Barrientos; Gronenborn, 2005; Wong; Ng, 2005), antiinseto (Peumans; Van Damme, 1995), armazenamento e transporte de carboidratos e proteínas, armazenamento de nitrogênio, defesa da planta (Peumans; Van Damme, 1995; Nomura *et al.*, 1998), entre outras.

Devido à estabilidade química e sensibilidade no reconhecimento de porções de carboidratos específicos, as lectinas têm sido isoladas de diferentes fontes e utilizadas como citotoxinas, agentes mitogênicos e aglutinantes celulares, na determinação de grupos sanguíneos, na inibição do crescimento de células tumorais, marcadores de células transformadas, bem como em diversos estágios da interação parasito-hospedeiro nas doenças infecciosas (Lovatt *et al.*, 2000; Morgan; Watkins, 2000; Jack *et al.*, 2001; Sames *et al.*, 2001).

Para a análise da marcação, as lectinas podem ser conjugadas com isotiocianato de fluoresceína ou tetrametilrodamina e examinadas através da microscopia de fluorescência com a utilização de filtros apropriados (Remani *et al.*, 1994); podem ainda ser ligadas a enzimas como a “horseradish” peroxidase e analisados por microscopia óptica (Zanbenedetti *et al.*, 1998), ou serem biotiniladas e reconhecidas por anticorpos (Honjo *et al.*, 2000). Além disso, através da microscopia eletrônica, protocolos utilizando lectinas conjugadas a partículas de ouro coloidal ou prata, podem ser usados como marcadores ultraestruturais prioritários para alguns tipos de células e tecidos (Roth *et al.*, 1998).

2.6 Interação lectina-fungo

A capacidade das lectinas de reconhecer glicoconjugados tornou possível empregar essas proteínas em estudos microbiológicos, especialmente na caracterização das glicoproteínas da superfície celular (Sharon, 2007). Vários pesquisadores têm concluído que as lectinas são úteis para estabelecer o perfil de carboidratos da parede celular dos fungos e auxiliar na classificação taxonômica (García, *et al.*, 2002; Munõz, *et al.*, 2003; Pinto *et al.*, 2008).

A interação entre lectina e carboidratos da parede celular de fungo tem sido demonstrada em várias espécies de importância médica como *A. fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *F. solani*, *Paracoccidioides brasiliensis*. Estes estudos mostraram que a maioria dos fungos avaliados exibia N-acetil-D-glicosamina e glicose/manose sobre a parede celular (Robin *et al.*, 1986; Cailliez, *et al.*, 1990; Slifkin; Doyler, 1994; Calderon, *et al.*, 1997; Masuoka, 2004).

A parede celular é um dos principais componentes estruturais da célula fúngica. A maior parte das funções biológicas relacionadas à patogenicidade e virulência reside nesta estrutura, uma vez que medeia a interação fungo-hospedeiro (Martinez *et al.*, 1998; López-Ribot, *et al.*, 1999; Gozalbo *et al.*, 2004).

López-Ribot *et al.* (2004) afirmaram que a parede celular é uma estrutura complexa, dinâmica e com várias camadas, localizada externamente a membrana plasmática, e responsável

pela manutenção da forma somática do fungo. Participa da interação inicial entre o microrganismo e o ambiente, atua como barreira permeável, possuindo funções nutricionais e protegendo o protoplasma contra injúrias físicas ou osmóticas.

De acordo com Kitajima *et al.* (2000) e Shibata e Okawa (2006) os componentes de sua constituição compreendem 80 a 90% de polissacarídeos, sendo o restante constituído de proteínas e lipídeos. Em algumas espécies são encontradas quantidades apreciáveis de pigmentos (melanina), polifosfatos e íons inorgânicos. Fisicamente, a parede celular é formada por microfibrilas entrelaçadas, embebida numa matriz amorfa. Quitina é o principal componente microfibrilante da maioria dos fungos filamentosos, enquanto que nas leveduras a parede celular contém principalmente glucanas. Proteínas e vários polissacarídeos (glucanas, mananas, galactanas e heteropolissacarídeos) são as principais substâncias cimentantes. Os monossacarídeos mais frequentemente encontrados na parede celular dos fungos são: D-glicose, N-acetil-D-glicosamina, D-manose, D-galactose, D-galactosamina, L-fucose, D-glicosamina, xilose e ácido D-glicurônico. Desses, glicose, N-acetil-D-glicosamina e manose são encontrados na maioria dos fungos. Ocasionalmente ramnose, ribose e arabinose podem ser observadas.

Todos os carboidratos representados essencialmente pelos polissacarídeos podem apresentar-se como homo ou heteropolímeros e encontram-se associados à polipeptídeos, constituindo as glicoproteínas da parede celular, que desempenham funções enzimáticas, estruturais, homeostáticas, metabólicas e patogênicas, pois estimulam a ação antigênica no hospedeiro (De Groot *et al.*, 2005; Latgé, 2007).

A interação entre fungo e hospedeiro ocorre primeiramente ao nível da parede celular (Calderone, 1993). Assim, a caracterização dos carboidratos da superfície celular pode conduzir a uma melhor compreensão da adesão fúngica à célula do hospedeiro e mecanismos pelo qual o fungo evita a ação do sistema imunológico, auxiliando no desenvolvimento de testes diagnósticos baseados na identificação desses carboidratos (Bose *et al.*, 2003).

Com relação a capacidade de adesão fúngica à célula hospedeira, Lima-Neto *et al.* (2009) verificaram *in vitro* que isolados de *Candida albicans* e *C. parapsilosis* com alta expressão de α -L-fucose na superfície da parede celular apresentavam maior capacidade de aderência às células epiteliais da mucosa bucal humana. Além disso, seus resultados indicaram a presença de outros carboidratos como α -D-glucose/ α -D-manose, N-acetil-D-glicosamina/ácido-N-acetilneuramínico e D-galactose/N-acetil-D-galactosamina na superfície da parede celular.

Com o intuito de melhorar o estudo/avaliação da caracterização dos carboidratos presentes na superfície da parede celular de fungos filamentosos, através de ensaios de marcação com lectinas, Leal *et al.* (2011a) desenvolveram um protocolo simples. O método consiste na utilização de uma fita adesiva para fixar as estruturas fúngicas (esporos/micélio) crescidas em meios de

cultura. Nesse estudo foram caracterizados 90 isolados de fungos filamentosos queratinofílicos, dentre estes duas espécies de *Aspergillus* (*A. tamarisii* e *A. terreus*), isolados de áreas de lazer da cidade do Recife-PE.

A atividade antifúngica de lectinas foi constatada para diferentes espécies de leveduras e fungos filamentosos (Viard *et al.*, 1993; Ye *et al.*, 2001; Freire *et al.*, 2002; Damico *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2005; Trindade *et al.*, 2006; Chumkhunthod *et al.*, 2006).

Segundo Griffin (1993) a ligação da lectina com a superfície da célula fúngica pode causar inibição da germinação de esporos como também no crescimento da hifa. O exato mecanismo de ação ainda não foi elucidado, mas parece haver alteração na síntese de componentes da parede celular fúngica devido à deficiência da deposição de quitina na superfície da célula. Lectinas que se ligam à quitina demonstram importante efeito antifúngico, entretanto, a ocorrência ou não dessa alteração é dependente da combinação do fungo com a lectina (Griffin, 1993; Peumans; Van Damme, 1995).

Lectinas purificadas de sementes de *Capsicum annum* e *Pisum sativum*, específicas para D-manose/D-glicose e D-manose respectivamente, apresentaram forte atividade antifúngica frente aos isolados *A. flavus* (Sitohy *et al.*, 2007; Kuku *et al.*, 2009). Entretanto essas mesmas lectinas quando testadas com culturas de *A. niger* a inibição da germinação dos esporos e do desenvolvimento miceliano foi insignificante (Kuku *et al.*, 2009). Estes trabalhos confirmam que a atividade antifúngica pode variar para as diferentes espécies fúngicas pertencentes ou não ao mesmo gênero.

Existem também relatos de que as lectinas podem apresentar efeito ativador da cinética do crescimento do fungo em cultivo (Viard *et al.*, 1993; Pérez-Santiago *et al.*, 2000; Hernández *et al.*, 2003). Viard *et al.* (1993) observaram efeito estimulatório da lectina Kb-CWL I com especificidade de ligação a galactose, sobre *Candida albicans* e *C. tropicalis*, havendo aceleração para formação do tubo germinativo e formação de micélio.

O conhecimento do perfil sacarídico da superfície fúngica permite uma melhor compreensão da interação fungo-hospedeiro, fungo-ambiente (Bose, *et al.*, 2003) e ainda a possível seleção de lectinas específicas para, tratamentos terapêuticos, como tem sido proposto para infecções bacterianas por Umamaheshwari *et al.* (2003). Desde que ocorra alta expressão de um determinado carboidrato como, por exemplo, *N*-acetil-D-glicosamina sobre a superfície celular do fungo, lectinas específicas para marcar esse açúcar, como WGA, poderia ser à base de um tratamento terapêutico, ou como veículo para o direcionamento do fármaco em casos de infecções invasivas e disseminadas (Vardar-Ünlü, *et al.*, 1998; Trindade, *et al.* 2006).

2.7 Aspergilose experimental

2.7.1 Pulmonar e sistêmica

Após observarem infecções fúngicas secundárias por *A. flavus*, nos pulmões de pacientes submetidos à necropsia, Sidransky e Friedman (1959) realizaram o primeiro estudo de aspergilose pulmonar experimental em camundongos. Os pesquisadores avaliaram o efeito da administração de cortisona e antibióticos para o desenvolvimento da aspergilose pulmonar em camundongos. Os animais tratados e não-tratados foram acondicionados em uma câmara e expostos aos propágulos fúngicos de *A. flavus*. Os resultados mostraram que o grupo tratado com cortisona e antibióticos desenvolveram a aspergilose pulmonar invasiva causando alta taxa de mortalidade nos animais. Ao exame histopatológico foi evidenciada a presença de vários filamentos fúngicos no tecido pulmonar. Os autores concluem que o tratamento prolongado com esses compostos torna os pacientes mais susceptíveis ao desenvolvimento de aspergilose invasiva.

Baseando-se no modelo experimental de Sidransky e Friedman (1959), Ford e Friedman (1967) analisaram a capacidade de virulência de 14 espécies de *Aspergillus* em camundongos imunocompetentes. Os pesquisadores testaram três rotas de infecção: infecção intravenosa, intraperitoneal e inalação por vias aéreas. Os resultados mostraram que apenas a infecção intravenosa foi capaz de causar morte nos animais. Dentre as espécies avaliadas, as pertencentes ao grupo *flavus* apresentaram maior grau de virulência.

Em 1975, Turner e colaboradores verificaram que as lesões pulmonares e a presença de filamentos micelianos em ratos albinos Wistar, infectados por *A. fumigatus*, regrediram após a suspensão do tratamento de imunossupressão com cortisona. Isso ocorreu mesmo com a infecção continuada dos animais com o fungo. Sabe-se que no tecido pulmonar os macrófagos alveolares e os neutrófilos têm a capacidade de fagocitar e destruir os conídios inalados, prevenindo assim, a germinação da hifa (Romani, 2004; Shoham, Levitz, 2005). Segundo os autores, a suspensão do agente imunossupressor permitiu que essas células de defesa recuperassem o número normal na circulação sanguínea bem como a capacidade de fagocitar e digerir os esporos e hifas.

Vários modelos de infecção para o desenvolvimento da aspergilose experimental têm sido testados como: a inoculação de conídios por via intravenosa, intratraqueal e na forma de aerosol (Spreadbury *et al.*, 1989). Com o objetivo de mimetizar o que ocorre na natureza, Eisenstein e colaboradores (1990) desenvolveram um modelo de infecção por via intranasal. Segundo os autores, a infecção por via intravenosa não corresponde ao que ocorre naturalmente; o método por via intratraqueal é laborioso e invasivo; e a infecção na forma de aerosol, não permite saber com certeza quanto de carga fúngica foi inoculado. Entretanto, após realizar e analisar vários modelos experimentais de aspergilose em camundongos, Shibuya *et al.* (1999) concluíram que o modelo de infecção por via intravenosa tem demonstrado ser bastante eficiente para avaliar a eficácia dos

agentes antifúngicos. Este tipo de modelo frequentemente induz diferentes quadros clínicos de aspergilose sistêmica, pois diferentes tipos de órgãos como pulmão, cérebro e rins são infectados pelo fungo.

Miyazaki *et al.* (1993) avaliaram a eficácia do itraconazol para o tratamento de aspergilose pulmonar em um modelo experimental. Ratos Sprague-Dawley machos (130-150g) foram imunossuprimidos com administração subcutânea de acetato de cortisona (90 mg/Kg) três vezes por semana e alimentados com ração pobre em proteínas. As injeções e a dieta foram realizadas uma semana antes da infecção, com *A. fumigatus* (8×10^3), e continuou por mais uma semana pós-infecção. De acordo com os resultados a administração intravenosa de 10 mg/Kg de itraconazol foi tão eficiente quanto à administração de 1 mg/Kg de anfotericina B. Esse resultado havia sido observado por Graybill e Ahrens (1985) em camundongos.

Com o intuito de compreender os efeitos fisiopatológicos e os mecanismos patogênicos da infecção por *Aspergillus* spp. em sua fase inicial, Nawada *et al.* (1996) desenvolveram um modelo experimental de aspergilose pulmonar com infecção não disseminada. Para atingir os objetivos, camundongos BALB/c foram infectados com esferas de agarose contendo conídio de *A. fumigatus*. Após duas semanas da inoculação, metade dos animais foram imunossuprimidos com aplicação de acetato de cortisona (125 mg/Kg). Durante um período de quatro semanas, os autores observaram que a taxa de mortalidade foi significativamente maior nos animais imunossuprimidos do que nos animais infectados sem o tratamento de imunossupressão. Ao exame histopatológico do pulmão dos camundongos não-imunossuprimidos, foi verificado um acúmulo de neutrófilos, linfócitos e macrófagos ao redor das esferas de agarose. As hifas do fungo estavam cercadas por células inflamatórias impedindo a invasão do tecido parenquimatoso. Em contraste, nos animais imunossuprimidos os filamentos de *A. fumigatus* se disseminaram invadindo o parênquima pulmonar.

Bowman *et al.* (2001) utilizando o modelo de infecção intravenosa, avaliaram a eficácia terapêutica da caspofungina frente à aspergilose disseminada em camundongos. Através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) e da contagem da unidade formadora de colônia (UFC), observaram que o tratamento com caspofungina reduziu significativamente a carga fúngica nos órgão infectados, principalmente nos rins. Os autores concluem que o ensaio com PCR pode ser útil para a avaliação da atividade antifúngica de aspergilose disseminada em modelos experimentais.

Para compreender como o modo de indução da neutropenia altera a patogênese de *A. fumigatus* em modelos experimentais, Stephens-Romero *et al.* (2005) avaliaram os efeitos dos anticorpos monoclonais anti-granulócitos (MBA RB6-8C5), ciclofosfamida e de ambos agentes quimioterápicos, em duas linhagens de camundongos (BALB/c e C57BL/6). Os autores constataram que a administração de cada agente imunossupressor (25µg de MBA RB6 e 150 mg de

ciclofosfamida), separadamente, resultou na necessidade de aplicação de uma carga mais elevada do inóculo (10^6 esporos/mL em BALB/c e 5×10^5 em C57BL/6) para atingir uma taxa de 100% de mortalidade, em cinco dias pós-infecção. Na administração das duas drogas a carga de inóculo diminuiu para 1×10^5 e 5×10^4 esporos/mL em BALB/c e C57BL/6 respectivamente. Os autores concluem que a relação de biomassa fúngica no tecido, inflamação e morte são bastante complexas e pode ser influenciada pelo tipo de imunossupressão, linhagem de camundongo e isolado fúngico.

Tansho *et al.* (2006) avaliaram a eficácia da administração intravenosa de itraconazol e anfotericina B em um modelo experimental de aspergilose pulmonar invasiva. Camundongos imunossuprimidos (150 mg/Kg de ciclofosfamida) foram expostos a uma suspensão de 2×10^6 esporos/mL de *A. fumigatus*. Doses de 10, 20 e 40 mg/Kg de itraconazol apresentaram a mesma eficácia terapêutica quando comparado a administração de 1 mg/Kg de anfotericina B. O estudo farmacocinético mostrou que a concentração do itraconazol no plasma e no tecido pulmonar estava em 10 µg/mL após 10 minutos de administração de 20 mg/Kg de itraconazol-intravenoso. Esta concentração foi diminuindo de 1 µg/mL a cada quatro horas, estando ainda numa concentração bem maior do que a concentração inibitória mínima (MIC) do itraconazol (0,16 µg/mL) testado contra o isolado de *A. fumigatus*.

A administração de antifúngicos na forma de aerosol tem se tornado cada vez mais importante na prevenção de micoses pulmonares invasivas. A principal vantagem da utilização é atingir uma elevada concentração do fármaco no tecido pulmonar, evitando assim, os efeitos tóxicos sistêmicos (Dummer *et al.*, 2004). Hoeben *et al.* (2006) avaliaram a eficácia *in vivo* da administração, na forma de aerosol, do itraconazol nanoencapsulado na prevenção da aspergilose pulmonar invasiva. O modelo experimental utilizado foi previamente descrito por Najvar *et al.* (2004). Os resultados mostraram que a formulação do itraconazol nanoencapsulado prolongou significativamente a sobrevivências dos animais, alcançando altas concentrações no tecido pulmonar e limitando a exposição sistêmica.

Alvarez *et al.* (2007) avaliaram a capacidade preventiva do itraconazol nanoencapsulado, administrado na forma de aerosol, frente à aspergilose pulmonar invasiva por *A. fumigatus*. Para atingir seu objetivo, os animais foram tratados com o antifúngico dois dias antes de serem infectados com o fungo. Os resultados mostraram que o grupo de animais tratados com a formulação encapsulada do antifúngico apresentou uma maior taxa de sobrevivência quando comparado com os camundongos que receberam oralmente itraconazol e o grupo controle. Na quantificação da carga fúngica no tecido, tanto a contagem de UFC bem como a utilização da PCR, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Os resultados desse estudo demonstraram que a administração na forma de aerosol do itraconazol nanoencapsulado foi eficaz na prevenção da aspergilose pulmonar em um modelo experimental.

Vallor *et al.* (2008) avaliaram e compararam três metodologias diferentes para a quantificação de carga fúngica no tecido pulmonar. Os métodos testados foram: contagem de UFC, imunoensaio enzimático para a detecção de galactomanana (GM-EIA) e quantificação por PCR (qPCR). Com base nos resultados, os autores sugerem que a quantificação de carga fúngica no tecido, deve ser realizada por duas ou mais metodologias, permitindo assim, uma melhor avaliação da eficácia de antifúngicos em modelos experimentais de aspergilose pulmonar.

2.7.2 Ocular e cutânea

Com a confirmação diagnóstica e o aumento progressivo de casos relatados de aspergilose ocular e cutânea, novos modelos experimentais foram sendo desenvolvidos para uma melhor avaliação da patogênese do fungo, bem como a susceptibilidade aos antifúngicos (Ramos *et al.*, 2008; Ben-Ami *et al.*, 2010).

O'Day (1990) desenvolveu um modelo experimental de ceratite fúngica por *Aspergillus* para avaliar a ação antifúngica do fluconazol administrado oralmente (30mg/Kg/dia). Após preparar uma suspensão de *A. fumigatus* (29,700 UFC/ml), 25µl foram inoculados dentro da córnea dos animais (coelhos pesando 1,5-2,5Kg) utilizando uma seringa. Para a realização desse procedimento, os animais foram anestesiados com cetamina e xilasina aplicados por via intramuscular. No grupo de animais não tratados com o antifúngico foram observadas lesões oculares severas e ao exame direto foram visualizados numerosos filamentos micelianos. No grupo que recebeu tratamento, uma melhora significativa das manifestações clínicas foi observada. O autor conclui que o azólico, fluconazol pode ser bastante eficiente para o tratamento de ceratite por espécies de *Aspergillus*.

Ben-Ami *et al.* (2010) desenvolveram um modelo reprodutível de aspergilose cutânea invasiva em camundongos. Para otimizar o protocolo de infecção, suspensões contendo esporos de *A. fumigatus* em diferentes concentrações (5×10^5 , 5×10^6 e 5×10^7 esporos/100µl de salina) foram testadas. Cada suspensão, contendo o fungo, foi injetada por via subcutânea em animais tratados previamente com ciclofosfamida (100mg/kg ou 150mg/Kg – aplicada quatro dias antes e um dia após a infecção). Os resultados mostraram que o tratamento de imunossupressão com ciclofosfamida (100mg/Kg) foi bastante eficaz para o desenvolvimento da infecção nos animais. Os efeitos tóxicos das aplicações de altas doses de ciclofosfamida aceleraram a perda de peso dos camundongos e provocaram mortalidade. Com relação ao inóculo, a suspensão contendo 5×10^6 esporos em 100µl de salina foi a ideal para execução do protocolo. Segundo os autores, o uso desses parâmetros permitiu que todos os animais desenvolvessem lesões na pele após 48h da inoculação do agente.

**3. PERFIL DE CARBOIDRATOS DA SUPERFÍCIE DA PAREDE CELULAR DE
ESPÉCIES DE *ASPERGILLUS* EM TECIDOS DE CÉREBRO E PULMÃO USANDO
HISTOQUÍMICA COM LECTINAS¹**

¹Trabalho publicado como Leal, A.F.G., Lopes, N.E.P., Clark, A.T.R., Pontes Filho, N.T., Beltrão, E.I.C., Neves, R.P. 2011. Perfil de carboidratos da superfície da parede celular de espécies de *Aspergillus* em tecidos de cérebro e pulmão usando histoquímica com lectinas. *Medical Mycology*.

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar, através da histoquímica com lectinas, a expressão de N-acetil-D-glicosamina, L-fucose, D-galactose e glicose/manose presentes na superfície da parede celular de espécies de *Aspergillus* em amostras histopatológicas de cérebro (n=1) e pulmão (n=6) obtidas de pacientes diagnosticados *post-mortem* com aspergilose invasiva. As lectinas usadas no ensaio foram concanavalina A (Con A), *wheat germ agglutinin* (WGA), *Ulex europeus* agglutinin I (UEA I) e *peanut agglutinin* (PNA), todas conjugadas a peroxidase. A marcação com lectina foi visualizada usando 3,3-diaminobendizina (DAB) e peróxido de hidrogênio. Observamos a expressão de N-acetil-D-glicosamina e metil- α -D-manose na superfície da parede celular de todas as espécies de *Aspergillus* avaliadas, enquanto a expressão de L-fucose e D-galactose demonstraram variações inter e intra-específicas. Os resultados obtidos neste estudo indicam que o uso das lectinas WGA e Con A permite a visualização de estruturas de *Aspergillus* como hifas, cabeças conidiais e conídios em amostras histopatológicas de tecidos cerebrais e do pulmão.

Palavras-chave: carboidratos da parede celular, *Aspergillus*, cérebro, pulmão, histoquímica com lectinas.

Introdução

Aspergillus é um fungo ubíquo que pode causar uma variedade de síndromes clínicas, especialmente em pacientes imunossuprimidos. Este fungo tem emergido como um agente de infecções sistêmicas fatais e, portanto, ganhou importância considerável na saúde pública (Macêdo *et al.*, 2009).

Vários trabalhos têm relatado que a interação entre um fungo e o hospedeiro ocorre primeiro no nível dos glicoconjugados da superfície da parede celular (Calderone, 1993, Lima-Neto *et al.*, 2009). Assim, a caracterização dos carboidratos da superfície celular pode conduzir a uma melhor compreensão da adesão fúngica a célula do hospedeiro e mecanismos pelo qual o fungo evita a ação do sistema imunológica, ajudando no desenvolvimento de testes diagnósticos baseados na identificação desses carboidratos (Bose *et al.*, 2003).

Cada carboidrato presente na célula é uma molécula potencial de reconhecimento das lectinas. A capacidade das lectinas de reconhecer glicoconjugados, presentes na superfície celular, tornou possível empregar essas proteínas em estudos microbiológicos, especialmente na caracterização dos carboidratos da parede celular fúngica (García *et al.*, 2002, Munõz *et al.*, 2003, Sharon, 2007).

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar, através da histoquímica com lectinas, a expressão de *N*-acetil-D-glicosamina, L-fucose, D-galactose e glicose/manose presentes na superfície da parede celular de espécies de *Aspergillus* em amostras histopatológicas de cérebro e pulmão obtidas de pacientes diagnosticados *post-mortem* com aspergilose invasiva.

Material e métodos

Amostras de tecidos

Espécimes histopatológicas (tecidos em blocos de parafina) de cérebro (n=1) e pulmão (n=6), obtidas durante a necrópsia de pacientes diagnosticados *post-mortem* com aspergilose invasiva, foram fornecidos pelo Serviço de Medicina Forense da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. As amostras de fungos isolados desses casos, de acordo com procedimentos

padronizados (Macêdo *et al.*, 2009), estão mantidas sob óleo mineral na Coleção de Cultura URM do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco (Tabela 1).

Histoquímica com lectinas

As lectinas concanavalina A (Con A), *wheat germ* agglutinin (WGA), *Ulex europeus* agglutinin I (UEA-I) e *peanut* agglutinin (PNA), todas conjugadas a peroxidase (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) foram usadas. Lâminas contendo as amostras de tecido (4µm) foram desparafinizadas em xilol e hidratadas com etanol (100-70%). As lâminas foram tratadas com uma solução de tripsina (0,1%) por 2 minutos a 37°C e com uma solução de metanol-H₂O₂ por 30 minutos a 25°C e em seguida incubadas com a lectina (50µg/mL). A solução tampão fosfato (10mM, pH 7,2, 150mM NaCl) foi usada para preparar todas as soluções e como solução de lavagem entre cada etapa. A marcação com lectina foi visualizada usando 3,3-diaminobendizina (DAB) e peróxido de hidrogênio em tampão fosfato salina (PBS) por até 8 min. Ensaios controle foram feitos por ligação da lectina na preparação do açúcar específico correspondente: N-acetil-D-glucosamina, α-L-fucose, D-galactose e metil-α-D-manoside para WGA, UEA I, PNA e Con A, respectivamente, a 300 mM de concentração.

O padrão de marcação foi avaliado por microscopia de luz e classificado qualitativamente como intenso (+++), moderado (++), fraco (+) ou negativo (-), conforme Leal *et al.* (2011a).

Resultados

WGA marcou intensamente *Aspergillus flavus* 6029 e *Aspergillus niger* 5924 e marcou moderadamente os outros (Figura 1). UEA-I marcou fracamente *Aspergillus niger* 5924 e não apresentou nenhuma marcação nas outras amostras. A lectina PNA marcou moderadamente *Aspergillus flavus* 6029 e *Aspergillus niger* 5924, marcou fracamente *Aspergillus tamarii* e não exibiu nenhuma marcação nas outras amostras. Con A marcou moderadamente *Aspergillus niger* 5924 e *Aspergillus sydowii* 6038 e marcou fracamente os outros fungos (Tabela 2).

Nossos resultados mostraram que houve uma alta expressão de N-acetil-D-glicosamina na superfície da parede celular de *Aspergillus flavus* 6029 e *Aspergillus niger* 5924 e expressão

moderada na superfície de *Aspergillus flavus* 5985, *Aspergillus flavus* 5987, *Aspergillus sydowii* 6038, *Aspergillus tamaraii* 5954 e *Aspergillus tamaraii* 6030. L-fucose foi expressa fracamente em *Aspergillus niger* 5924. D-galactose foi expressa moderadamente na superfície da parede celular de *Aspergillus flavus* 6029 e *Aspergillus niger* 5924 e fracamente em *Aspergillus tamaraii* 6030. Metil- α -D-manose foi expresso moderadamente na superfície da parede celular de *Aspergillus niger* 5924 e *Aspergillus sydowii* 6038 e fracamente em *Aspergillus flavus* 5985, *Aspergillus flavus* 5987, *Aspergillus flavus* 6029, *Aspergillus tamaraii* 5954 e *Aspergillus tamaraii* 6030.

Discussão

Tendo em vista a importância médica de *Aspergillus* spp como causadores de infecção hospitalar e infecção de pacientes imunocomprometidos, é importante estudar a composição bioquímica de fungos, especialmente da parede celular. De acordo com Pinto *et al.* (2008), esta estrutura é composta de um único número de polissacarídeos interligados, incluindo quitina e uma variedade de glicanos. No entanto, a composição da parede celular pode variar substancialmente entre as espécies de fungos e cepas (Pinto *et al.*, 2008, Nenoff *et al.*, 2000, Alvino *et al.*, 2004).

Numerosos relatos sobre o perfil de carboidratos, através de ensaios de marcação com lectinas, da superfície da parede celular de fungos de importância médica tais como *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis* e outros, tem mostrado que a maioria desses fungos exibiu N-acetil-D-glicosamina e glicose/manose sobre a superfície celular, como demonstrada pela marcação com WGA e Con A, respectivamente (Cailliez *et al.*, 1990, Slifkin; Doyle, 1990, Doyler; Slifkin, 1994, Calderon *et al*, 1997, Masuoka, 2004).

Em um estudo usando técnicas de histoquímica com lectinas e um modelo *in vivo* de ceratomicose, Robin *et al.* (1986) descreveram o perfil de carboidratos da parede celular de *Aspergillus fumigatus* em tecido de córnea. As lectinas WGA, UEA-I e Con A marcaram intensamente o isolado de *Aspergillus fumigatus*. Este resultado está de acordo com nossos achados, embora tenha havido algumas variações, talvez devido à diferença das espécies avaliadas e o local da infecção. Como mencionado anteriormente, alguns estudos sugerem que a expressão de

carboidratos varia de acordo com as espécies de fungos e as condições de crescimento, incluindo o substrato em que o fungo é encontrado (Leal *et al.*, 2011a, Alvino *et al.*, 2004). Isto pode ser observado na comparação dos padrões de marcação da lectina na superfície da parede celular das amostras de *Aspergillus flavus* no tecido cerebral e pulmonar.

Vários estudos têm relatado em detalhes que as lectinas podem ser de valor como importante ferramenta no diagnóstico micológico (García *et al.*, 2002, Munõz *et al.*, 2003, Cailliez *et al.*, 1990, Slifkin; Doyle, 1990, Robin *et al.*, 1986). Elas têm sido usadas na tentativa de identificar e tipificar os agentes fúngicos *in vitro*, bem como em amostras de tecido e amostras histopatológicas fixadas obtidas de micoses experimentais (García *et al.*, 2002, Leal *et al.*, 2011a, Robin *et al.*, 1986). Mas um ponto importante que deve ser considerado por pesquisadores que realizam qualquer estudo sobre diagnóstico micológico é a experiência profissional em reconhecer as diferentes formas de estruturas fúngicas em parasitismo como hifas, pseudohifas, células de leveduras, cabeça conidial, esférulas e outras (Lacaz *et al.*, 2002).

Assim, os resultados obtidos neste estudo indicam que o uso das lectinas WGA e Con A permite a visualização de estruturas de *Aspergillus* como hifas, cabeça conidial e conídios em espécimes histopatológicas de cérebro e pulmão obtidas durante a necrópsia de pacientes diagnosticados *post-mortem* com aspergilose. Estudos futuros estão sendo planejados, incluindo a expansão do número de lectinas a serem utilizadas e a autenticação molecular através da análise das regiões de DNA das espécies de *Aspergillus* avaliadas que estão mantidas na Coleção de Cultura Micoteca URM do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Declaração de interesse: Nenhum.

Tabela 1. Pacientes diagnosticados post-mortem com aspergilose.

Número do paciente	Sexo (M, F)	Idade (anos)	Doença de base	Ocupação	Sítio corpóreo	Fungos/Micoteca URM
1	F	55	Neoplasia cerebral	Lavadeira	Cérebro	<i>Aspergillus flavus</i> 6029
2	M	83	Sífilis	Aposentado	Pulmão	<i>Aspergillus flavus</i> 5987
3	F	66	Diabetes Hipertensão	Aposentada	Pulmão	<i>Aspergillus flavus</i> 5985
4	M	75	Diabetes	Aposentado	Pulmão	<i>Aspergillus niger</i> 5924
5	F	67	Diabetes AVC	Aposentada	Pulmão	<i>Aspergillus sydowii</i> 6038
6	M	56	Tuberculose	Pintor	Pulmão	<i>Aspergillus tamarii</i> 5954
7	F	90	AVC Tuberculose	Aposentada	Pulmão	<i>Aspergillus tamarii</i> 6030

M= masculino, F= feminino e AVC= acidente vascular cerebral.

Tabela 2. Padrão de marcação das lectinas sobre a superfície da parede celular das espécies de *Aspergillus* em espécimes histopatológicas de cérebro e pulmão obtidos durante a necrópsia de pacientes diagnosticados post-mortem com aspergilose invasiva.

Espécies/Micoteca URM	Tecido	Padrão de marcação das lectinas			
		WGA	UEA-I	PNA	Con A
<i>Aspergillus flavus</i> 6029	Cérebro	+++	-	++	+
<i>Aspergillus flavus</i> 5987	Pulmão	++	-	-	+
<i>Aspergillus flavus</i> 5985	Pulmão	++	-	-	+
<i>Aspergillus niger</i> 5924	Pulmão	+++	+	++	++
<i>Aspergillus sydowii</i> 6038	Pulmão	++	-	-	++
<i>Aspergillus tamaritii</i> 5954	Pulmão	++	-	-	+
<i>Aspergillus tamaritii</i> 6030	Pulmão	++	-	+	+

Intenso (+++), moderado (++), fraco (+) ou ausente (-).

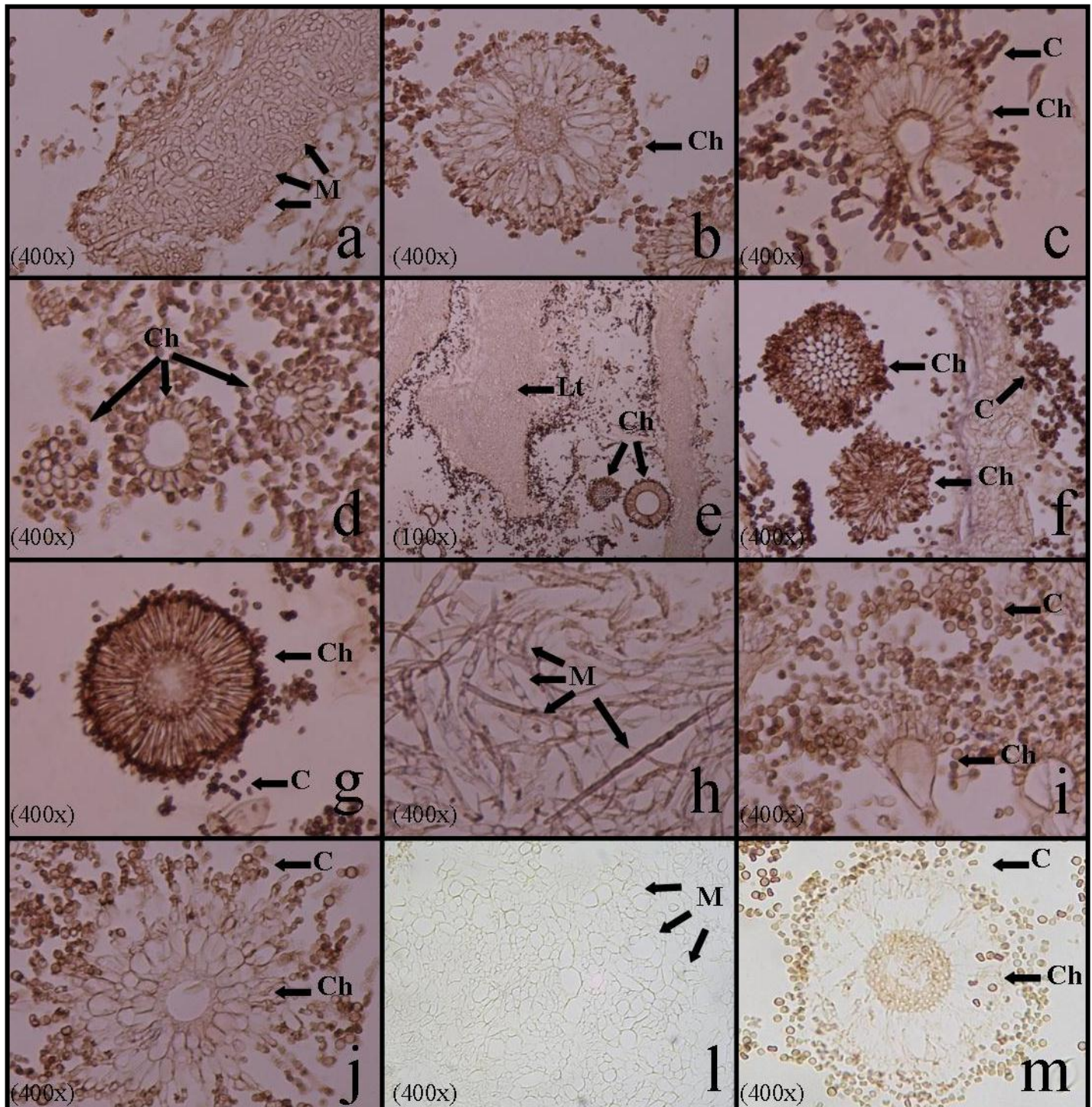


Figura 1. Marcação da lectina Wheat germ agglutinin (WGA) nas *Aspergillus* spp em espécimes histopatológicas de cérebro (a-c) e pulmão (d-j) obtidas durante a necrópsia: *Aspergillus flavus* 6029 (a-c), *Aspergillus flavus* 5987 (d), *Aspergillus niger* 5924 (e-g), *Aspergillus sydowii* 6038 (h) e *Aspergillus tamarii* 6030 (i-j). O teste controle (l-m) foi realizado na ausência de marcação da lectina. C= Conídios. Ch= Cabeça conidial. M= Micelium. Lt= Tecido pulmonar.

**4. VARIABILIDADE DE EXPRESSÃO DE QUITINA E OUTROS CARBOIDRATOS DA
SUPERFÍCIE DA PAREDE CELULAR DE CONÍDIOS/HIFA DE ESPÉCIES DE
ASPERGILLUS USANDO LECTINAS E SUSCEPTIBILIDADE *IN VITRO* A
ANFOTERICINA B, VORICONAZOL E ITRACONAZOL**

Resumo

Este estudo avaliou a expressão de quitina (polímero linear do monossacarídeo N-acetil-D-glicosamina), L-fucose, D-galactose e glicose/manose presentes na parede celular de espécies de *Aspergillus* através do ensaio de marcação com lectinas e a susceptibilidade antifúngica *in vitro* à anfotericina B, voriconazol e itraconazol. As lectinas usadas no ensaio foram concanavalina A (Con A), *wheat germ agglutinin* (WGA), *Ulex europeus* agglutinin I (UEA I) e *peanut agglutinin* (PNA), todas conjugadas a peroxidase. A metodologia utilizada na susceptibilidade antifúngica seguiu as condições descritas nos protocolos M38-A2 do Clinical and Laboratory Standard Institute. Todas as culturas de *Aspergillus* apresentaram baixa concentração inibitória mínima (MIC) para anfotericina B e itraconazol. Entretanto, os isolados avaliados foram menos sensíveis ao voriconazol para o qual o MIC variou de 4 a 16 µg/mL. Os resultados obtidos neste estudo indicam que a expressão de N-acetil-D-glicosamina e glicose/manose, na superfície da parede celular das espécies de *Aspergillus* avaliadas, apresentam maior estabilidade de expressão tanto no crescimento fúngico *in vitro* quanto em parasitismo.

Palavras-chave: Carboidratos da parede celular, *Aspergillus*, susceptibilidade antifúngica, lectinas.

Introdução

A resistência ou susceptibilidade dos fungos aos agentes antifúngicos pode estar associada com a composição e estrutura da parede celular destes microrganismos (Bahman *et al.*, 2002, Stevens *et al.*, 2006, Mayers, 2009).

A parede celular é um dos principais componentes estruturais da célula fúngica onde ocorre a maior parte das funções biológicas relacionadas à patogenicidade, virulência e resistência aos fármacos, uma vez que medeia a interação fungo-hospedeiro e fungo-antifúngico (Masuoka *et al.*, 2004, Lima-Neto *et al.*, 2009, Mayers, 2009).

Aspergillus é um fungo ubíquo que pode causar uma variedade de síndromes clínicas. Este gênero tem emergido como agente de infecções sistêmicas e conquistado considerável importância para saúde pública (Macêdo *et al.*, 2009). Muitos trabalhos têm relatado tolerância/resistência, *in vitro* e *in vivo*, de espécies de *Aspergillus* a determinados agentes antifúngicos como o polieno anfotericina B e os azólicos voriconazol e itraconazol (Walsh *et al.*, 2008).

Assim, a caracterização dos carboidratos da superfície celular pode conduzir a uma melhor compreensão dos mecanismos pelo qual o fungo evita/reage à ação dos agentes antifúngicos bem como do sistema imunológica, ajudando no desenvolvimento de testes diagnósticos baseados na identificação desses carboidratos (Bose *et al.*, 2003).

Cada carboidrato presente na célula é uma molécula potencial de reconhecimento das lectinas. A capacidade das lectinas de reconhecer glicoconjugados, presentes na superfície celular, tornou possível empregar essas proteínas em estudos microbiológicos, especialmente na caracterização dos carboidratos da parede celular fúngica (García *et al.*, 2002, Munõz *et al.*, 2003, Sharon, 2007, Pinto *et al.*, 2008).

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão de quitina (polímero linear do monossacarídeo N-acetil-D-glicosamina), L-fucose, D-galactose e glicose/manose presentes na parede celular de espécies de *Aspergillus* através da marcação com lectinas e a susceptibilidade *in vitro* antifúngica a anfotericina B, voriconazol e itraconazol.

Material e métodos

Microrganismos

As espécies de *Aspergillus* avaliadas neste estudo totalizaram nove isolados, sendo três de *A. fumigatus* isoladas de amostras clínicas de pacientes diagnosticados com aspergilose invasiva e seis culturas fúngicas de *A. flavus* (3), *A. tamarii* (2) e *A. niger* (1) isoladas de material obtido em necrópsia (Leal *et al.*, 2011b). As amostras de fungos isolados desses casos estão mantidas sob óleo mineral na coleção de Cultura URM do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco (Tabela 1).

Ensaio de marcação com lectinas

As lectinas concanavalina A (Con A), *wheat germ agglutinin* (WGA), *Ulex europeus agglutinin* I (UEA-I) e *peanut agglutinin* (PNA), todas conjugadas a peroxidase (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) foram usadas de acordo com Leal *et al.* (2011a). As amostras fúngicas foram cultivadas em meio batata-dextrose ágar (BDA) (Difco) contido em placas de Petri por sete dias a 35°C. Uma fita adesiva posicionada com a parte colante para baixo foi levemente pressionada sobre a colônia do fungo. A fita foi subsequentemente removida e colocada longitudinalmente sobre lâminas de microscópio. A amostra de fungo na fita foi incubada com a lectina (50µg/mL) por 1h a 4°C. A marcação com lectina foi visualizada usando 3,3-diaminobendizina (DAB) e peróxido de hidrogênio em tampão fosfato salina (PBS) por até 8 min. Entre cada etapa foram realizadas lavagens com PBS (2 x 5 min). Ensaios controle foram feitos por inibição da lectina com seu açúcar específico correspondente: N-acetil-D-glicosamina, α -L-fucose, D-galactose e metil- α -D-manosideo para WGA, UEA I, PNA e Con A, respectivamente, a 300 mM de concentração. O controle da amostra de fungo na fita foi realizado na ausência da lectina. O padrão de marcação foi avaliado por microscopia de luz e classificado qualitativamente como intenso (+++), moderado (++) , fraco (+) ou negativo (-), conforme Leal *et al.* (2011a) adaptado de Ozer (2000).

Atividade antifúngica *in vitro*

A metodologia utilizada seguiu as condições descritas no protocolo M38-A2 do Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2008). O isolado ATCC 22019 de *C. parapsilosis* foi utilizado como controle.

Meio sintético: O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), sem bicarbonato de sódio, com glutamina e vermelho de fenol como indicador, tamponado com ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico (MOPS; 0,165 mol L⁻¹; Sigma-Aldrich, E.U.A.) e ajustado para pH 7,0 ± 0,1. Este meio foi esterilizado em filtro de membrana (Millipore®) de 0,22 µ e armazenado a 4°C.

Agentes antifúngicos: As concentrações variaram de 0,125 µg/mL a 64 µg/mL para anfotericina B (Diflucan®, Novartis, São Paulo, Brasil) e de 0,03 µg/mL a 16 µg/mL para itraconazol (Sigma, EUA) e voriconazol (Sporanox®, Janssen-Cilag, São Paulo, Brasil). Esses fármacos foram preparados em dimetilsulfóxido (DMSO; Gibco, Minas Gerais, Brasil).

Inóculo de fungos filamentosos: Isolados de *Aspergillus* foram repicados em batata-dextrose ágar (Difco) em tubo e incubados por sete dias a 35°C. Seqüencialmente, 1 mL de solução salina a 0,85% esterilizada foi adicionado às colônias fúngicas, e a suspensão foi homogenizada, delicadamente, com a ponta de uma pipeta de transferência. Posteriormente, a mistura resultante foi transferida para tubo de ensaio esterilizado, adicionado de 10 µL de Tween 20 para facilitar a dispersão dos esporos. Após cinco minutos de repouso, o sobrenadante foi transferido para outro tubo de ensaio esterilizado e agitado por 15 segundos em vórtex. A densidade da suspensão foi ajustada por espectrofotômetro a 530nm para obter uma transmitância de 80-82%. Em seguida, as suspensões foram diluídas (1:50) em RPMI 1640, obtendo-se uma concentração final de 0,4 x 10⁴ a 5 x 10⁴ UFC/mL.

Procedimentos: Em placas de microtitulação de fundo chato com 96 poços (TPP, Trasadingen, Suíça) foram dispostos 100 µL de cada uma das diluições das drogas a serem testadas nas colunas de 1 a 10. Em seguida, 100 µL de meio RPMI 1640 foram distribuídos nas colunas 11 e 12, as quais foram utilizadas como controle de crescimento e de esterilização, respectivamente. Posteriormente,

100 µL do inóculo padronizado foram adicionados aos poços das colunas 1 a 11, sendo as microplacas incubadas a 35°C por 48 horas.

Interpretação dos resultados: A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada através da observação visual do poço que mostrou redução de crescimento fúngico, considerando o crescimento total do poço controle.

Resultados

WGA marcou intensamente os esporos e hifas da maioria dos isolados fúngicos analisados. Na tabela 1 e figura 1 e 2 podem ser observados padrões de marcação das lectinas nos esporos e filamentos micelianos, respectivamente.

De acordo com os dados obtidos, dos nove isolados testados, sete apresentaram alta expressão de N-acetil-D-glicosamina, enquanto moderada expressão foi visualizada em duas amostras de *A. flavus*. A D-galactose foi expressa moderadamente em oito isolados e fracamente em apenas um isolado de *A. flavus*. L-fucose e glicose/manose apresentaram maiores variações intraespecíficas e interespecíficas sobre a parede celular. L-fucose não foi expressa ou não foi acessível na parede celular de um isolado de *A. flavus* e *A. niger*. A ausência de marcação da Con A em um isolado de *A. tamarii* pode ser explicada pela ausência ou não acessibilidade de glicose e/ou manose na superfície celular do isolado testado.

A atividade antifúngica *in vitro* dos fármacos avaliados frente às amostras de *Aspegillus* pode ser observada na tabela 1. Todas as culturas de *Aspergillus* apresentaram baixo MIC para anfotericina B e itraconazol. Entretanto, os isolados avaliados foram menos sensíveis ao voriconazol para o qual o MIC variou de 4 a 16 µg/mL.

Discussão

Diversos estudos mostram que a quantidade de quitina (polímero linear do monossacarídeo N-acetil-D-glicosamina) presente na parede celular dos fungos pode estar envolvida na resistência ou sensibilidade a drogas antifúngicas (Stevens *et al.*, 2006, Mayers, 2009).

Bahman *et al.* (2003) verificaram que a sensibilidade de leveduras a anfotericina B era inversamente proporcional à quantidade de quitina na parede celular. Quando a síntese de quitina era aumentada pela ação da enzima quitina sintetase a atividade da anfotericina B era potencializada nas amostras de *Kluyveromyces* e *Candida*. Por outro lado, quando a síntese de quitina era reduzida por um inibidor, as leveduras se tornavam resistentes ao agente antifúngico. Estes achados coincidem com nossos resultados, uma vez que a marcação com WGA pode confirmar que todas as amostras sensíveis a anfotericina B e ao itraconazol expressaram de moderada a alta concentração de *N*-acetil-D-glicosamina na parede celular.

Sabe-se que a anfotericina B pode matar a célula fúngica através da ligação com o ergosterol, presente na membrana celular, alterando sua permeabilidade e causando a perda de constituintes citoplasmáticos (Cowen; Steinbach, 2008). A sensibilidade do fungo a este polieno parece estar ligada a quantidade de ergosterol presente na membrana celular (Hakkou *et al.*, 1988, Anachi *et al.*, 1995). Outro mecanismo de ação é apresentado pelos compostos azólicos, que atuam sobre enzimas do citocromo P450 dos fungos bloqueando a demetilação do lanosterol e a síntese de ergosterol, alterando a permeabilidade da membrana e a viabilidade da célula fúngica (Cowen; Steinbach, 2008). Entretanto, alguns trabalhos têm relatado que a sensibilidade destes microrganismos não depende apenas da presença/síntese de ergosterol na superfície celular, demonstrando a necessidade de mais estudos bioquímicos de parede celular (Sarinová *et al.*, 2007).

Independente do mecanismo de ação, antes da interação com a membrana, o antifúngico precisa ultrapassar as camadas da parede celular, constituída de 80 a 90% de carboidratos, além de proteínas e lipídeos. Os monossacarídeos mais frequentemente encontrados na parede celular dos fungos são D-glicose, *N*-acetil-D-glicosamina, D-manose, D-galactose, D-galactosamina, L-fucose, D-glicosamina, xilose e ácido D-glicurônico (Shibata; Okawa, 2006).

Comparando a ação antifúngica entre os triazólicos, tem sido verificado que a maioria dos fungos filamentosos é mais sensível ao voriconazol do que ao itraconazol (Walsh *et al.*, 2008). Entretanto, embora os isolados de *Aspergillus* testados tenham sido sensíveis ao voriconazol, o

itraconazol foi o fármaco que melhor apresentou atividade antifúngica *in vitro*. Também em outros estudos foi verificado que isolados fúngicos, clínicos e ambiental, apresentaram maior sensibilidade ao itraconazol (Lass-Flörl *et al.*, 2001, Sun *et al.*, 2002, Meneau; Sanglard, 2005, Izquierdo *et al.*, 2009).

A interação entre fungo-paciente e fungo-fármaco ocorre inicialmente ao nível da parede celular. Assim, a caracterização dos carboidratos da superfície celular pode conduzir a uma melhor compreensão da adesão fúngica à célula hospedeira e mecanismos de evasão do fungo à ação do sistema imunológico e dos agentes antifúngicos (Bose *et al.*, 2003, Pinto *et al.*, 2008, Lima-Neto *et al.*, 2009, Mayers, 2009).

As seis amostras de fungos obtidas de pacientes diagnosticados post-mortem com aspergilose invasiva foram anteriormente avaliadas, através da histoquímicas com lectinas, quanto à expressão dos glicoconjugados presentes na superfície da parede celular em amostras histopatológicas de cérebro e pulmão (Leal *et al.*, 2011b). Verificamos que os isolados *A. flavus* 5985, *A. flavus* 5987, *A. tamarii* 5954 e *A. tamarii* 6030 não expressaram α -L-fucose na superfície da parede celular em amostras histopatológicas de pulmão. Outra variação foi observada com relação à expressão de D-galactose. Este açúcar não foi detectado nos isolados *A. flavus* 5985, *A. flavus* 5987 e *A. tamarii* 5954 em espécimes histopatológicos. Entretanto, a expressão de N-acetil-D-glicosamina e glicose/manose foram detectadas tanto *in vitro*, ou seja, o fungo crescido em meio de cultura (BDA), quanto nas amostras de tecido de cérebro e pulmão. A exceção foi o isolado *A. tamarii* 5954 que não expressou glicose/manose na condição *in vitro*.

As influências desses carboidratos da parede celular dos fungos na sensibilidade ou resistência desses microrganismos aos agentes antifúngicos bem como na interação fungo-hospedeiro precisam ser investigados. Contudo, os resultados obtidos em nossos estudos indicam que a expressão de N-acetil-D-glicosamina e glicose/manose na superfície da parede celular das espécies de *Aspergillus* avaliadas apresentaram maior estabilidade de expressão tanto no crescimento fúngico *in vitro* quanto em parasitismo.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Tabela 1. Padrão de marcação com lectinas e susceptibilidade antifúngica *in vitro* com isolados clínicos de *Aspergillus*.

Espécies/Micoteca URM	Amostra clínica de isolamento	MIC (µg/mL)			Padrão de marcação com lectinas			
		AMB	ITC	VOR	WGA	UEA-I	PNA	Con A
<i>A. flavus</i> 5985	Pulmão	0,5	0,031	16	++	+	+	+
<i>A. flavus</i> 5987	Pulmão	0,125	0,031	8	+++	+	++	++
<i>A. flavus</i> 6029	Cérebro	0,062	0,031	8	++	-	++	++
<i>A. fumigatus</i>	Pulmão	0,062	0,031	4	+++	++	++	+
<i>A. fumigatus</i>	Pulmão	0,125	0,031	8	+++	+	++	+
<i>A. fumigatus</i>	Esputo	1	0,031	8	+++	+	++	+
<i>A. niger</i> 5924	Pulmão	0,031	0,25	8	+++	-	++	++
<i>A. tamarii</i> 5954	Pulmão	0,125	0,031	16	+++	+	++	-
<i>A. tamarii</i> 6030	Pulmão	0,25	0,031	16	+++	++	++	+

Padrão de marcação: intenso (+++), moderado (++) , fraco (+) ou ausente (-). Subst. = Substrato. MIC= Concentração inibitória mínima. AMB = anfotericina B. ITC= itraconazol. VOR = voriconazol. WGA = *wheat germ agglutinin*. UEA-I = *Ulex europeus agglutinin* I. PNA = *peanut agglutinin*. Con A = concanavalina A.

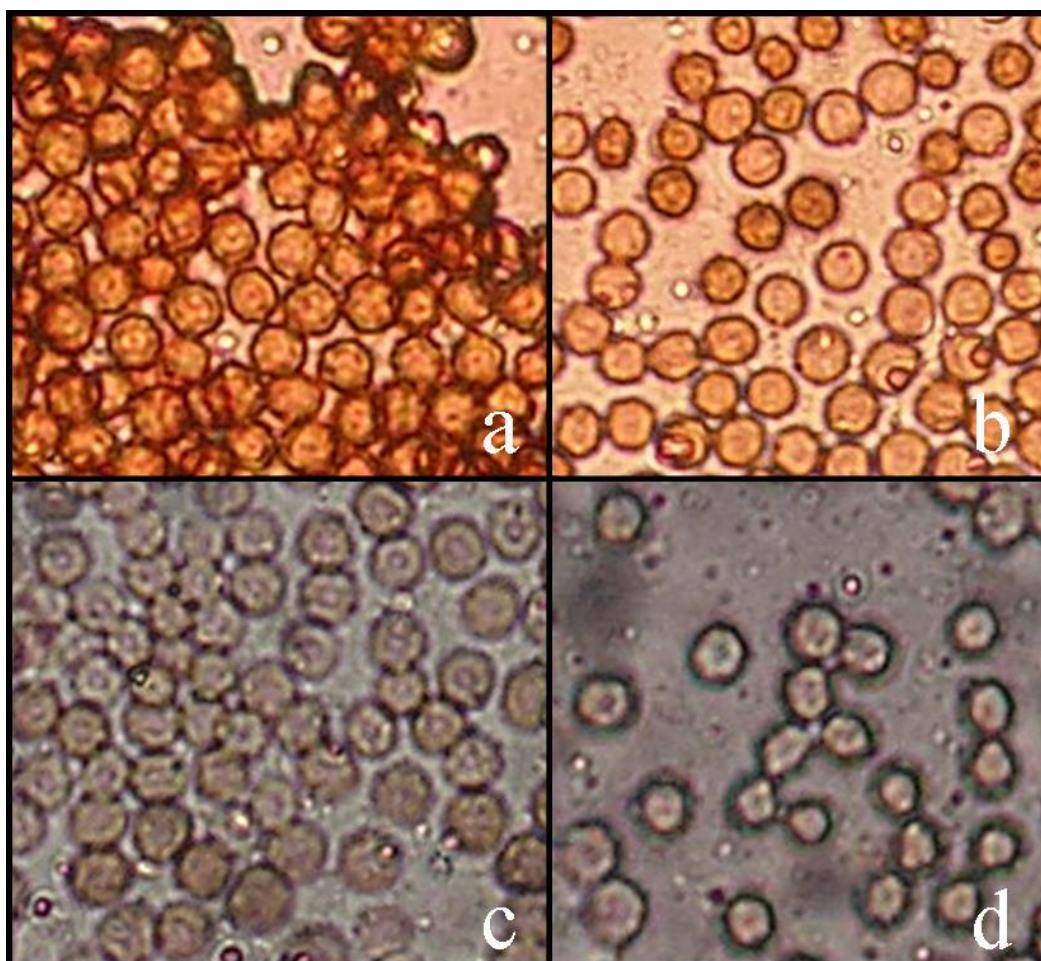


Figura 1. Padrão de marcação com lectinas em esporos: intenso (**a**), moderado (**b**), fraco (**c**) e ausente (**d**) (ampliação x400).

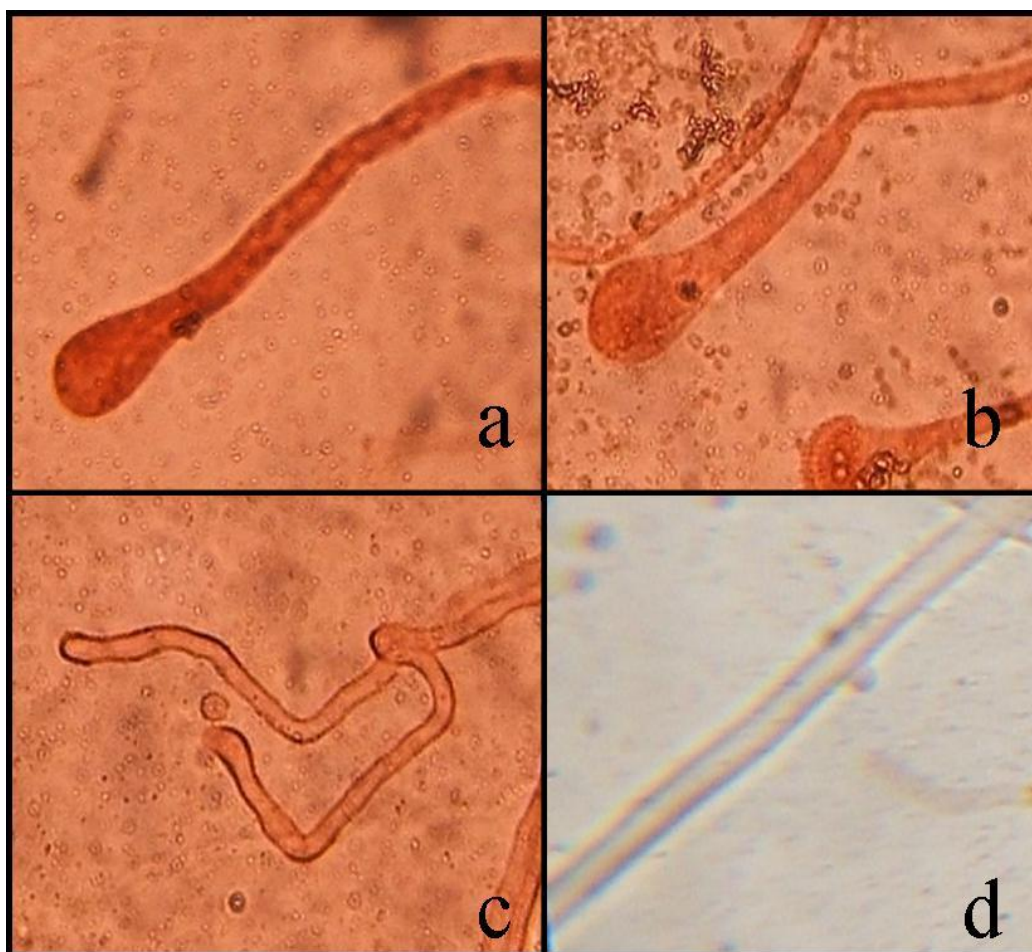


Figura 2. Padrão de marcação com lectinas em filamento miceliano: intenso (a), moderado (b), fraco (c) e ausente (d) (ampliação x400).

5. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL DO ITRACONAZOL NO TRATAMENTO DE CERATITE EXPERIMENTAL POR *ASPERGILLUS FLAVUS*

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da aplicação tópica da formulação lipossomal de itraconazol no tratamento de ceratite experimental por *Aspergillus flavus*. Os lipossomas foram obtidos pelo método de hidratação do filme lipídico seguido de sonicação. Fêmeas adultas de ratos Wistar (pesando 200-220g) foram imunossuprimidas com apenas uma aplicação de 150mg/kg de ciclofosfamida intraperitonealmente três dias antes da infecção com o fungo *A. flavus* URM 6029 (10^7 esporos/ml). Após 48h da infecção, os animais foram tratados com a formulação lipossomal. Para efeito de comparação um grupo de animais (n=6) foi tratado com o fármaco não encapsulado. Ao fim do experimento os animais foram avaliados quanto às manifestações clínicas, unidade formadora de colônias (UFC/g) e exame direto/histopatológico. Os resultados obtidos neste estudo indicam a formulação lipossomal do itraconazol apresenta uma atividade antifúngica significativamente maior do que o fármaco livre no tratamento de ceratite fúngica experimental por *A. flavus* em ratos Wistar.

Palavras-chave: Itraconazol lipossomal, atividade antifúngica, ceratite, *Aspergillus flavus*.

Introdução

A ceratite fúngica é um problema oftalmológico importante em várias partes do mundo. Muitos casos podem progredir para infecção fulminante e alguns pacientes perdem a visão a despeito do tratamento agressivo (terapia cirúrgica). A sua prevalência é maior nas regiões de clima quente e geralmente está associada com traumatismo, doença de córnea pré-existente, uso de esteróides e antibióticos ou de lentes de contato (Oliveira *et al.*, 2001; Srinivasan, 2004; Keay *et al.*, 2011).

Os principais agentes causadores das infecções oculares são os fungos filamentosos hialinos, destacando-se as espécies de *Fusarium* e *Aspergillus*. Dentre as espécies de *Aspergillus*, as mais comumente isoladas de amostras clínicas são: *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. tamarii*, *A. terreus* e *A. tubingensis*. A etiologia dos fungos envolvidos nos casos de ceratite pode variar de acordo com a localização geográfica e o período do ano no qual a infecção é observada (Lima *et al.*, 2005, Keay *et al.*, 2011).

Estudos recentes apontam o itraconazol como uma opção eficaz para o tratamento de ceratite fúngica, especialmente quando relacionados à *Aspergillus* spp. O itraconazol é um antifúngico altamente solúvel em lipídios, o que significa que pode atravessar facilmente o epitélio da córnea e assim erradicar efetivamente o fungo. No entanto, o itraconazol apresenta uma pobre biodisponibilidade ao nível de estroma. Apesar desta limitação, estudos têm sugerido que com o uso de um veículo apropriado, como o lipossoma, o fármaco poderia melhorar a sua distribuição no estroma e com isso oferecer um tratamento mais eficaz para infecções micóticas oculares (Kalavathy *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2010).

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da aplicação tópica da formulação lipossomal do itraconazol no tratamento de ceratite experimental por *A. flavus*.

Material e métodos

Formulação lipossomal do itraconazol

O itraconazol (Sigma, EUA) encapsulado em lipossomas (ITZ-Lipo) foi obtido pelo método de hidratação do filme lipídico (Andrade *et al.*, 2004). Inicialmente a fosfatidilcolina de soja (PC-7), colesterol (CHOL-2), estearilamina (SA-1) e itraconazol (ITZ; 1mg/ml) foram solubilizados em uma mistura de clorofórmio:metanol (3:1) sobre um agitador magnético. A concentração final dos lipídios foram de 42mM.

Os solventes foram removidos a vácuo durante 60 minutos ($37\pm 1^{\circ}\text{C}$, 80 rpm), resultando em uma formação do filme. Esses lipídios foram, então, hidratados com 10 ml de solução tampão fosfato pH 7,4, produzindo lipossomas multilamelares (MLV). A suspensão de lipossomas foi mantida sob um agitador magnético durante 5 minutos, sendo, em seguida, sonicada (Vibra Cell, BRANSON, EUA) a 200 W e 40 Hz por 300 segundos, para produzir lipossomas unilamelares pequenas (SUV).

Caracterização do itraconazol lipossomal

A análise físico-química foi realizada imediatamente após a preparação. Foram analisados os seguintes parâmetros: diâmetro da partícula (Beckman Coulter Delta™ Nano S Particle Analyzer), pH (Bioblock Scientific 99622, Prolabo), conteúdo de ITZ nos lipossomas e a taxa de encapsulação. Uma alíquota de amostras de lipossoma (25µl) foi diluída em 10ml de metanol e, em seguida, sonicada durante 5 minutos para determinar o conteúdo do ITZ por meio de espectrometria a 262 nm, utilizando uma curva padrão de ITZ com concentrações variando de 4 a 12 µg/ml. A eficiência do encapsulamento foi determinada pela técnica ultrafiltração/ultracentrifugação Ultrafree (Millipore, EUA). Após a centrifugação das amostras de ITZ-Lipo (Ultracentrifuge KT 20000, Kubota, Japão) a 8.776g por 1 hora a 4°C, a concentração de ITZ no precipitado foi também medida por meio de espectrometria UV a 262 nm e a taxa de encapsulação do ITZ foi calculado em relação ao seu conteúdo inicial na formulação lipossomal (Parikh *et al.*, 2011).

***Aspergillus flavus* URM 6029**

Foram testados nove isolados clínicos de *Aspergillus* spp estocados na Coleção de Cultura Micoteca URM do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

para sensibilidade *in vitro* ao itraconazol de acordo com o método do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI) Manual M38-A2, (NCCLS, 2008). (dados não apresentados). A concentração inibitória mínima para o itraconazol foi 0,031µg/ml. *Aspergillus flavus* URM 6029 foi obtido de uma paciente com neoplasia cerebral e usado devido a sua alta virulência e sensibilidade *in vitro* ao itraconazol.

Animais e protocolo de imunossupressão

Fêmeas adultas de ratos Wistar (pesando 200-220g) foram obtidas do biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (DFF) da UFPE. Os animais foram manuseados de acordo com procedimentos experimentais aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (protocolo nº 23076.008239/2009-96). O protocolo de imunossupressão foi adaptado de Wu *et al.* (2003). Foi administrada apenas uma aplicação de 150mg/kg de ciclofosfamida (Baxter Oncology GmbH) intraperitonealmente três dias antes da infecção com o fungo *A. flavus* URM 6029.

Modelo de infecção por *A. flavus*

Três dias após o início da imunossupressão, os animais (n=6) foram infectados através da inoculação intra-ocular de 0,1ml de *A. flavus* URM 6029 (10^7 esporos/ml). Este procedimento foi realizado com o uso de agulha de 13 x 4,5mm e seringa de 1 ml (seringa para insulina). Antes da inoculação do fungo, os animais foram anestesiados com uma aplicação intramuscular de quetamina (60mg/kg) e xilazina (6mg/kg). Os animais foram observados diariamente quanto aos sinais clínicos durante 9 dias.

Tratamento com a formulação lipossomal

Após 48h da infecção, os animais (n=6) foram tratados com a formulação lipossomal. Para efeito de comparação um grupo de animais foi tratado com o fármaco não encapsulado. Para isso o itraconazol foi dissolvido em uma solução de 100% Dimetilsufóxido (DMSO) na concentração de 1mg/ml. As formulações foram administradas topicamente (uma gota de 20µl). As doses foram aplicadas a cada três horas, entre 08:00 às 23:00 h, durante sete dias. Um grupo de animais (n=6)

não tratado recebeu apenas PBS. Doze horas após a aplicação da última dose os animais foram avaliados clinicamente e sacrificados através do deslocamento cervical.

Avaliação clínica

Para uma melhor avaliação da eficácia terapêutica das duas formulações (lipossomal/fármaco livre), as manifestações clínicas da ceratite fúngica foram classificadas da seguinte maneira: opacificação da córnea, 0 - sem lesão; 1 - fraca (pequeno edema de córnea); 2 - moderada (edema em dois quadrantes da córnea); 3 - forte (opacificação total da córnea). O critério de avaliação clínica foi adaptado de Yavas *et al.* (2008).

Contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs) e exame micológico direto/histopatológico

O globo ocular dos animais foram pesados e macerados em PBS (1:10). Após a diluição das amostras, 0,1 mL foram plaqueados na superfície do meio DAS, acrescido de cloranfenicol (50mg/ml) e incubados a 37°C por 24-72h. Os resultados das colônias foram expressos como UFC/g de tecido. Parte da amostra clínica dos animais foi utilizada para realizar o exame direto e o estudo histopatológico.

Análise estatística

A significância estatística quanto à manifestação clínica e das UFCs foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste-t Student. O nível de significância foi determinado em $p < 0,05$.

Resultados

Itraconazol lipossomal. A formulação lipossomal utilizada no tratamento dos animais apresentou as seguintes características: distribuição dos tamanhos das partículas foi de 276.5 nm com o coeficiente de polidispersão de 0.265, o conteúdo do ITZ em lipossomas foi de $90,5 \pm 0,5\%$, a taxa de encapsulação do ITZ foi de $87 \pm 0,2\%$ e $pH=7,6$.

Avaliação clínica. Antes de iniciar o tratamento (48h após a inoculação intra-ocular do *A. flavus*) metade dos animais de cada grupo apresentavam uma fraca opacificação da córnea enquanto

a outra metade não apresentava qualquer lesão. No último dia de avaliação todos os animais do grupo não tratado apresentaram uma opacificação total da córnea. No grupo de animais tratados com o fármaco livre, dos seis animais avaliados, um apresentou opacificação total da córnea, três apresentaram edema de córnea em dois quadrantes e dois apresentaram um pequeno edema. No grupo de animais tratados com a formulação lipossomal dois animais apresentaram edema de córnea moderada (opacificação em dois quadrantes da córnea), um apresentou um pequeno edema e três animais não apresentaram qualquer lesão. Os dados referentes à avaliação clínica dos animais podem ser visualizados na Tabela 1 e Figura 1.

UFCs. As unidades formadoras de colônias variaram de 32-45 UFC/g para o grupo de animais não tratados. No grupo de animais tratados com o fármaco livre foi possível quantificar (variou de 2-13 UFC/g) e identificar o fungo em todas as amostras clínicas avaliadas. No grupo tratado com a formulação lipossomal metade das amostras clínicas avaliadas (três animais) não foi identificado/quantificado nenhum crescimento fúngico enquanto o restante variou de 2-16 UFC/g. Os dados referentes à UFCs de cada grupo podem ser visualizados na Tabela 1.

Exame micológico direto/histopatológico. Houve uma correlação entre o exame micológico direto/histopatológico com os resultados obtidos na cultura e na avaliação clínicas da ceratite fúngica. Nos animais que apresentaram uma opacificação total da córnea foram visualizados numerosos filamentos micelianos hialinos (Figura 1).

Discussão

No tratamento de pacientes com ceratite fúngica, os oftalmologistas são confrontados com três dificuldades principais: a quantidade limitada de agentes antifúngicos disponíveis, a pobre penetração intra-ocular de muitos desses fármacos e a toxicidade destes compostos antifúngicos. Por muitos anos a anfotericina B vinha sendo utilizada como o principal antifúngico nos tratamentos de ceratite fúngica. No entanto, a sua toxicidade levou a sua lenta substituição pela natamicina como a medicação de primeira escolha para os casos de ceratite, especialmente por fungos filamentosos (Kalavathy *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2008).

Devido à alta massa molecular (665,75 Da) a natamicina apresenta uma baixa capacidade de penetração no epitélio da córnea. Essa pobre penetração ocular fez com que esse antifúngico fosse utilizado como monoterapia (aplicação tópica) apenas nos casos de ceratite fúngicas superficiais. Nos quadros clínicos mais severos de ceratite a terapia normalmente utilizada é a aplicação tópica da natamicina combinada com administração, por via oral, de um azólico (cetoconazol ou itraconazol) (Kalavathy *et al.*, 2005; Prajna *et al.*, 2010).

O itraconazol tem um amplo espectro de atividade antifúngica atuando efetivamente contra os fungos *A. flavus*, *A. niger*, *Fusarium oxysporum* e algumas espécies de *Candida* resistentes ao fluconazol. Sendo um composto lipofílico, o itraconazol facilmente atravessa o epitélio da córnea, mas sua penetração ao nível do estroma é bastante baixa. Contudo estudos têm mostrado que o uso de um veículo apropriado, como o lipossoma, pode melhorar significativamente a penetração do itraconazol na córnea (Kalavathy *et al.*, 2005; Morand *et al.*, 2007; Mishara *et al.*, 2011).

Pesquisas realizadas suportam a hipótese de que a melhor atividade antifúngica observada *in vivo* com o itraconazol lipossomal pode ter resultado do aumento das concentrações do fármaco nos sítios infectados pelo fungo (Ebrahim *et al.*, 2005, Habib *et al.*, 2010; Mishara *et al.*, 2011). Apesar da alta carga fúngica de *A. flavus* (10^7 esporos/ml) inoculada no globo ocular dos animais, metade destes não desenvolveram a ceratite quando tratados com a formulação lipossomal. Vale ressaltar que esse resultado foi obtido com o conteúdo de 90% do ITZ em lipossomas.

Assim, os resultados obtidos neste estudo indicam que a formulação lipossomal do itraconazol apresenta uma atividade antifúngica significativamente maior do que o fármaco livre no tratamento de ceratite fúngica experimental por *A. flavus* em ratos Wistar. Estudos futuros estão sendo planejados, incluindo a expansão do número de antifúngicos (anfotericina B, natamicina, cetoconazol) a serem utilizados, para efeito de comparação, e uma caracterização mais detalhada da nossa formulação lipossomal do itraconazol.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Declaração de interesse: Nenhum.

Tabela 1. Avaliação clínica e unidades formadoras de colônia da atividade antifúngica da formulação lipossomal do itraconazol no tratamento de ceratite experimental por *Aspergillus flavus*.

Grupo controle vs Grupo teste		
Rato/número	Lesão ocular	UFC/g
Controle		
1	3	39
2	3	35
3	3	41
4	3	37
5	3	45
6	3	32
ITZ		
1	2	7
2	1	2
3	1	2
4	2	9
5	3	13
6	2	10
ITZ-LIPO		
1	0	0
2	1	2
3	0	0
4	2	11
5	2	16
6	0	0

ITZ= itraconazol. ITZ-LIPO= formulação lipossomal do itraconazol. UFC= unidade formadora de colônia. Classificação clínica das lesões oculares: opacificação da córnea, (0)= sem lesão, (1)= fraca, (2)= moderada e (3)= forte.

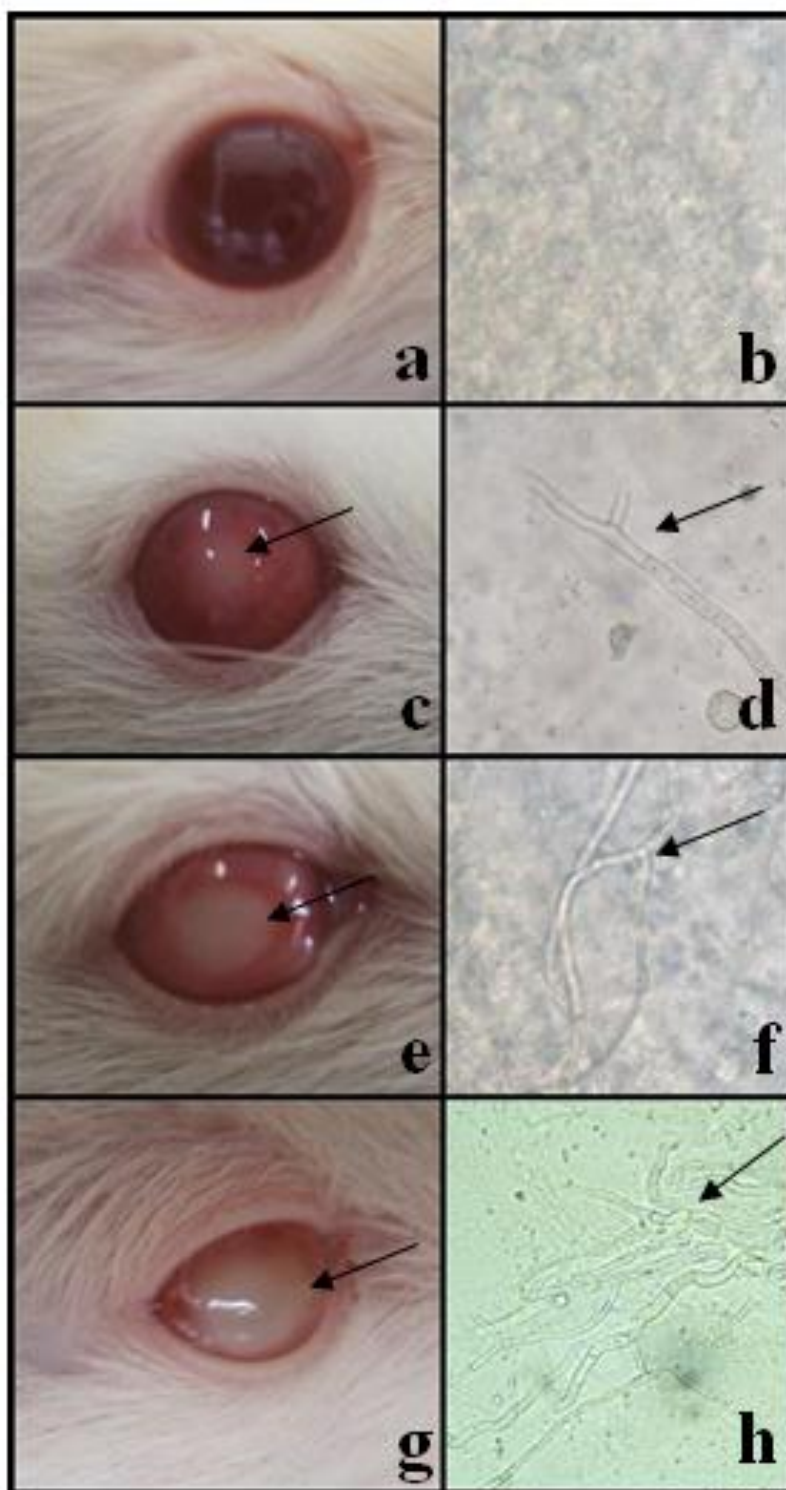


Figura 1. Classificação clínica da ceratite fúngica experimental em ratos Wistar: opacificação da córnea [(a)= sem lesão, (c)=fraca, (e)= moderada e (g)= forte] e o resultado do exame direto [(b)=não observados filamentos micelianos e (d,f,h)= presença de filamentos micelianos hialinos].

6. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Todas as espécies de *Aspergillus* avaliadas, através da histoquímica com lectinas em espécimes histopatológicas de cérebro e pulmão, expressam N-acetil-D-glicosamina e glicose/manose na superfície da parede celular, enquanto a expressão de L-fucose e D-galactose demonstram variações inter e intra-específicas.

O uso das lectinas WGA e Con A permite a visualização das estruturas de *Aspergillus* como hifas, cabeça conidial e conídios em espécimes histopatológicas de cérebro e pulmão obtidas durante a necrópsia de pacientes diagnosticados post-mortem com aspergilose.

A expressão de N-acetil-D-glicosamina e glicose/manose na superfície da parede celular das espécies de *Aspergillus* avaliadas apresentam maior estabilidade de expressão tanto no crescimento fúngico *in vitro* quanto em parasitismo.

A formulação lipossomal do itraconazol apresenta atividade antifúngica significativamente maior do que o fármaco livre no tratamento de ceratite fúngica experimental por *A. flavus* em ratos Wistar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler-Moore, J. 1994. AmBisome targeting to fungal infections. *Bone Marrow Transplant* 14: 3-7.
- Alencar, V.B.M.; Alencar, N.M.N.; Assreuy, A.M.S.; Mota, M.L.; Brito, G.A.; Aragão, K.S.; Bittencourt, F.S.; Pinto, V.P.; Debray, H.; Ribeiro, R.A.; Cavada, B.S. 2005. Pro-inflammatory effect of *Arum maculatum* lectin and role of resident cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37: 1805-1814.
- Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W.; Blackwell, M. 1996. *Introductory Mycology*. New York, John Wiley.
- Alvarez, C.A.; Wiederhold, N.P.; McConville, J.T.; Peters, J.I.; Najvar, L.K.; Graybill, J.R.; Coalson, J.J.; Talbert, R.L.; Burgess, D.S.; Bocanegra, R. Johnston, K.P. Williams, R.O. 2007. Aerosolized nanostructured itraconazole as prophylaxis against invasive pulmonary aspergillosis. *Journal of Infection* 55: 68-74.
- Alvino, D.S., Rodrigues, M.L., Almeida, C.A. 2004. Differential expression of sialoglycocomjugates and sialidase activity in distinct morphological stages of *Fonsecaea pedrosoi*. *Archives of Microbiology* 181: 278-286.
- Anachi, R.B., Bansal, M., Easwaran, K.R.K., Namboodri, K., Gaber, B.P. 1995. Molecular modeling studies on amphotericin B and its complex with phospholipid. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* 12:957-970.
- Andrade, C.A., Correia, M.T., Coelho, L.C., Nascimento, S.C., Santos-Magalhães, N.S. 2004. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 278: 435-445.
- Annaloro, C.; Oriani, A.; Tagliaferri, E.; Bertolli, V.; Volpe, A.D.; Soligo, D.; Ibatci, A.; Pozzoli, E.; Delilieri, G.L. 1995. Efficacy of different prophylactic antifungal regimens in bone marrow transplantation. *Haematologica* 80: 512-517.
- Ayman, O.S.; Chandrasekar, P.H. 2002. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Chest* 121:1988-1999.
- Ayoub, A.; Causse, H.; Van Damme, E.J.M.; Peumans, W.J.; Bourne, Y.; Cambillau, C.; Rougé, P. 1994. Interactions of plant lectins with the components of the bacterial cell wall peptidoglycan. *Biochemical Systematics and Ecology* 22:153-159.
- Balakrishnan, E. 1961. Mycotic keratitis caused by *Aspergillus fumigatus*. *British Journal of Ophthalmology* 45:828.
- Bangham, A.D.; Standish, M.M.; Watkins, J.C. 1965. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology* 13: 238-252.
- Barral-Netto, M.; Santos, S.B.; Moreira, R.A.; Santos, C.F.; Moreira, R.A.; Oliveira, J.T.A.; Cavada, B.S. 1992. Human lymphocyte stimulation by lectins from Brazilian leguminous seeds. *Immunological Investigations* 21:297-303.
- Barrientos, L.G.; Gronenborn, A.M. 2005. The highly specific carbohydrate-binding protein cyanovirin-N: structure, anti-HIV/Ebola activity and possibilities for therapy. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 5:21-31.
- Ben-Ami, R.; Lewis, R.E.; Leventakos, K.; Latgé, J.P.; Kontoyiannis, D.P. 2010. Cutaneous model of invasive aspergillosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54:1848-1854.
- Bennett, J.W. 2010. *An Overview of the Genus Aspergillus*. In: *Aspergillus Molecular Biology and Genomics*.
- Bento, C.A.M.; Cavada, B.S.; Oliveira, J.T.A.; Moreira, R.A.; Barja-Fidalgo, C. 1993. Rat paw edema and leucocyte immigration induced by plant lectins. *Agents and Action* 38:48-54.
- Beule, K.; De Doncker, P.; Cauwenbergh, G.; Koster, M.; Legendre, R.; Blatchford, N.; Daunas, J.; Chwetzoff, E. 1988. The treatment of aspergillosis and aspergilloma with itraconazole: clinical results of an open international study (1982-1987). *Mycoses* 31:476-485.
- Bhalekar, M.R.; Pokharkar, V.; Madgulkar, A.; Patil, N.; Patil, N. 2007. Preparation and evaluation of miconazole nitrate-loaded solid lipid nanoparticles for topical delivery. *American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech* 10:289-296.

- Bahmed, K., Bonaly, R., Wathier, M., Pucci, B., Coulon, J. 2002. Change of cell wall chitin content in amphotericin B resistant *Kluyveromyces* strains. *FEMS Microbiology Letters* 216:99-103.
- Bahmed, K., Bonaly, R., Coulon, J. 2003. Relation between cell wall chitin content and susceptibility to amphotericin B in *Kluyveromyces*, *Candida* and *Schizosaccharomyces* species. *Research in Microbiology* 154:215-222.
- Bharathi, M.J.; Ramakrishnan, R., Vasu, S., Meenakshi, R., Palaniappan, R. 2003. Epidemiological characteristics and laboratory diagnosis of fungal keratitis. A three-year study. *Indian Journal of Ophthalmology* 51:315-321.
- Bies, C.; Lehr, C.M.; Woodley, J.F. 2004. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. *Advance drug Delivery Reviews* 56:425-435.
- Boogaerts, M.; Maertens, J.; Van Hoof, A.; De Bock, R.; Fillet, G.; Peetermans, M.; Selleslag, D.; Vandercam, B.; Vandewoude, K.; Zachée, P.; De Beule, K. 2001. Itraconazole versus amphotericin B plus nystatin in the prophylaxis of fungal infections in neutropenic cancer patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48:97-103.
- Bose, I.A.J.; Reese, J.J.; Ory, G.J.; Janbon, G.; Doering, T.L. 2003. A yeast under cover: The capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell* 2:655-663.
- Bowman, J.C.; Abruzzo, G.K.; Anderson, J.W.; Flattery, A.M.; Gill, C.J.; Pikounis, V.B.; Schmatz, D.M.; Liberator, P.A.; Douglas, C.M. 2001. Quantitative PCR assay to measure *Aspergillus fumigatus* burden in a murine model of disseminated aspergillosis: demonstration of efficacy of caspofungin acetate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45:3474-3481.
- Boyd, W.C.; Shapleigh, E. 1954. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). *Science* 119 :419.
- Burik, J.A.H.V.; Colven, R.; Spach, D.H. 1998. Cutaneous *Aspergillosis*. *Journal of Clinical Microbiology* 36:3115-3121.
- Cahill, K.M.; Mofty, E.L.; Kawaguch, T.P. 1967. Primary cutaneous aspergillosis. *Archives of Dermatology* 96:545-547.
- Cailliez, J.C.; Boudrissa, A.; Mackenzie, D.W.R.; Poulain, D. 1990. Evaluation of a gold-silver staining method for detection and identification of *Candida* species by light microscopy. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 9:886-891.
- Caillot, D. 2003. Intravenous itraconazole followed by oral itraconazole for the treatment of amphotericin-B-refractory invasive pulmonary aspergillosis. *Acta Haematologica* 109:111-118.
- Calderon, A.M.; Buck, G.; Doyle, R.J. 1997. Lectin-microorganism complexes. *Clinical Biochemistry* 12:87-98.
- Calderone, R.A. 1993. Recognition between *Candida albicans* and host cells. *Trends in Microbiology* 1:55-58.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved standard – second edition M38-A2*, Wayne, PA, USA.
- Chandrasekar, P.H. 2005. Antifungal resistance in *Aspergillus*. *Medical Mycology* 43:295-298.
- Chen, Z.; Sun, X.; Tang, K. 2005. Cloning and expression of a novel cDNA encoding a mannose-binding lectin from *Dendrobium officinale*. *Toxicon* 45:535-540.
- Chumkhunthod, P.; Rodtong, S.; Lambert, S.J.; Fordham-Skelton, A.P.; Rizkallah, P.J.; Wilkinson, M.C.; Reynolds, C.D. 2006. Purification and characterization of an N-acetyl-D-galactosamine-specific lectin from the edible mushroom *Schizophyllum commune*. *Biochimica et Biophysica Acta (General Subjects)* 1760:326-332.
- Ciopruga, J.; Gozia, O.; Tudor, R.; Brezuica, L.; Doyle, R.J. 1999. *Fusarium* sp. growth inhibition by wheat germ agglutinin. *Biochimica et Biophysica Acta (General Subjects)* 1428:424-432.
- Cornley, O.A.; Maertens, J.; Winston, D.J.; Perfect, J.; Ullmann, A.J.; Walsh, T.J.; Helfgott, D.; Holowiecki, J.; Stockelberg, D.; Goh, Y.T.; Petrini, M.; Hardalo, C.; Suresh, R.; Gonzalez, D.A. 2007. Posaconazole vs. Fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia. *The New England Journal of Medicine* 356:348-59.

- Cowen, L.E.; Steinbach, W.J. 2008. Stress, Drugs and Evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. *Eukaryotic Cell* 7:747-764.
- Damico, D.C.S.; Freire, M.G.M.; Gomes, V.M.; Toyama, M.H.; Marangoni, S.; Novello, J.C.; Macedo, M.L.R. 2003. Isolation and characterization of a lectin from *Annona muricata* seeds. *Journal of Protein Chemistry* 22:655-661.
- Davis, M.E.; Chen, Z.G.; Shin, D.M. 2008. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* 7:771-782.
- De Groot, P.W.J.; Ram, A.F.; Klis, F.M. 2005. Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal Genetics and Biology* 42:657-675.
- Denning, D.W.; Lee, J.Y.; Hostetler, J.S.; Pappas, P.; Kauffman, C.A.; Dewsnap, D.H.; Galgiani, J.N.; Graybill, J.R.; Sugar, A.M.; Catanzaro, A. 1994. NIAID Mycoses Study Group multicenter trial of oral itraconazole therapy for invasive aspergillosis. *The American Journal of Medicine* 97:135-144.
- Denning, D.W.; Tucker, R.M.; Hanson, L.H.; Stevens, D.A. 1990. Itraconazole in opportunistic mycoses: cryptococcosis and aspergillosis. *Journal of the American Academy of Dermatology* 23:602-607.
- Denning, D.W.; Tucker, R.M.; Hanson, L.H.; Stevens, D.A. 1989. Treatment of invasive Aspergillosis with itraconazole. *The American Journal of Medicine* 86:791-800.
- De Hoog, G.S.; Guarro, J.; Gene, J.; Figueras, M.J. 2000. *Atlas of Clinical Fungi*, Utrecht/Reus, Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili.
- Doyler, R.J. 1994. *Lectin-Microorganism Interactions*, CRC.
- Drickamer, K. 1995. Multiplicity of lectin-carbohydrate interactions. *Natural Structural Biology* 2:437-439.
- Dummer, J.S., Lazariashvili, N., Barnes, J., Ninan, M.; Milstone, A.P. 2004. A survey of anti-fungal management in lung transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 23:1376-1381.
- Dupont, B. 1990. Itraconazole therapy in aspergillosis: study in 49 patients. *Journal of the American Academy of Dermatology* 23:607-614.
- Ebrahim, S., Peyman, G.A., Lee, P.J. 2005. Applications of liposomes in ophthalmology. *Survey of Ophthalmology* 50:167-182.
- Eldem, T.; Speiser, P.; Hincal, A. 1991. Optimization of spray-dried and congealed lipid micropellets and characterization of their surface morphology by scanning electron microscopy. *Pharmaceutical Research* 8:47-54.
- Espada, R.; Valdespina, S.; Dea, M.A.; Molero, G.; Ballesteros, M.P.; Bolás, F.; Torrado, J.J. 2008. *In vitro* distribution and therapeutic efficacy of a novel amphotericin B poly-aggregated formulation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61:1125-1131.
- Espuelas, M.S.; Legrand, P.; Campanero, M.A.; Appel, M.; Chéron, M.; Gamazo, C.; Barratt, G.; Irache, J.M. 2003. Polymeric Carriers for amphotericin B: *in vitro* activity, toxicity and therapeutic efficacy against systemic candidiasis in neutropenic mice. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52:419-427.
- Ford, S.; Friedman, L. 1967. Experimental study of the pathogenicity of aspergilli for mice. *Journal of Bacteriology* 94:928-933.
- Freire, M.G.M.; Gomes, V.M.; Corsini, R.E.; Machado, O.L.T.; Simone, S.G.; Novello, J.C.; Marangoni, S.; Macedo, M.L.R. 2002. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. *Plant Physiology and Biochemistry* 40:61-68.
- Freitas, D.B.A.; Piovesan, A.C.; Szarf, G.; Jasinowodolinski, D.; Meirelles, G.S.P. 2009. Outbreak of invasive pulmonary aspergillosis among patients hospitalized in a bone marrow transplant ward: tomographic findings. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 35:931-936.
- García, M.L.; Herreras, J.M.; Dios, E.; Arqueso, P.; Almaraz, A. 2002. Evaluation of lectin staining in the diagnosis of fungal keratitis in an experimental rabbit model. *Molecular Vision* 8:10-16.

- García, C.G.; García-Fernández, M.A.; Cebada, F.S. 2005. *Aspergillus* endocarditis. *Echocardiography* 22:623-624.
- Gavaldà, J.; Martín, M.T.; López, P.; Gomis, X.; Ramírez, J.L.; Rodríguez, D.; Len, O.; Puigfel, Y.; Ruíz, I.; Pahissa, A. 2005. Efficacy of nebulized liposomal amphotericin B in treatment of experimental pulmonary aspergillosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49:3028-3030.
- Geiser, D.M.; Klich, M.A.; Frisvad, J.C.; Peterson, S.W.; Varga, J. Samson, R.A. 2007. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 59:1-10.
- Glasmacher, A.; Cornely, O.; Ullmann, A.J.; Wedding, U.; Bodenstein, H.; Wandt, H.; Boewer, C.; Pasold, R.; Wolf, H.H.; Hänel, M.; Dolken, G.; Junghanss, C.; Andreesen, R.; Bertz, H. 2006. An open-label randomized trial comparing itraconazole oral solution with fluconazole oral solution for primary prophylaxis of fungal infections in patients with haematological malignancy and profound neutropenia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57:317-325.
- Godoy, P.; Cano, J.; Gené, J.; Guarro, J.; Höfling-Lima, A.L.; Colombo, A.L. 2004. Genotyping of 44 isolates of *Fusarium solani*, the main agent of fungal keratitis in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 4494-4497.
- Gomes, J.C.; Cavada, B.S.; Moreira, R.A.; Oliveira, J.T. 1994. Histamine release induced by glucose (mannose) specific lectins isolated from Brazilian plants. Comparison with concanavalin A. *Inflammation Research* 41:132-135.
- Graybill, J.R.; Ahrens, J. 1985. Itraconazole treatment of murine aspergillosis. *Medical Mycology* 23:219-223.
- Greene, R.E., Schlamm, H.T., Oestmann, J.W. 2007. Imaging findings in acute invasive pulmonary aspergillosis: clinical significance of the halo sing. *Clinical Infectious Diseases* 7:54-61.
- Griffin, D.H. 1993. *Fungal Physiology*. New York, Wiley-Liss.
- Gupta, P.R.; Vyas, A.; Meena, R.C.; Khangarot, S.; Kanoongo, D.; Jain, S. 2005. Role of itraconazole in the management of aspergillosis in treated patients of pulmonary tuberculosis. *Lung India* 22:81-85.
- Habib, F.S., Fouad, E.A., Rhaman, M.S.A., Fathalla, D. 2010. Liposome as an ocular delivery system of fluconazole: *in vitro* studies. *Acta Ophthalmologica* 88:901-904.
- Hakkou, A., Coulon, J., Mpona-Minga, M., Bonaly, R. 1988. Variation des stérols chez *Kluyveromyces lactis* et chez un mutant résistant par culture en présence de doses sublétales d'amphotéricine B. *Canadian Journal of Microbiology* 34 :787-792.
- Harousseau, J.L.; Dekker, A.W.; Stamatoullas-Bastard, A.; Fassas, A.; Linkesch, W.; Gouveia, J.; De Bock, R.; Rovira, M.; Seifert, W.F.; Joosen, H.; Peeters, M.; De Beule, K. 2000. Itraconazole oral solution for primary prophylaxis of fungal infections in patients with hematological malignancy and profound neutropenia: a randomized, Double-blind, Double-placebo, multicenter Trial comparing itraconazole and amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44:1887-1893.
- Hernández, E.S.; Santiago, A.P.; Campos, E.P.; Alva, F.C. 2003. Efecto de la concanavalina A en el cultivo del fitopatógeno *Ustilago maydis*. *Interciencia* 28:276-280.
- Hoeben, B.J.; Burgess, D.S.; McConville, J.T.; Najvar, L.K.; Talbert, R.L.; Peters, J.I.; Wiederhold, N.P.; Frei, B.L.; Graybill, J.R.; Bocanegra, R.; Overhoff, K.A.; Sinswat, P.; Johnston, K.P.; Williams, R.O. 2006. *In vivo* efficacy of aerosolized nanostructured itraconazole formulations for prevention of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50:1552-1554.
- Honjo, Y.; Inohara, H.; Akahani, S.; Yoshii, T.; Takenaka, Y.; Yoshida, J.; Hattori, K.; Tomiyama, Y.; Raz, A.; Kubo, T. 2000. Expression of cytoplasmic galectin-3 as a prognostic marker in tongue carcinoma. *Clinical Cancer Research* 6:4635-4640.
- Hope, W.W.; Walsh, T.J.; Denning, D.W. 2005. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *The Lancet Infectious Diseases* 5:609-622.
- Hori, M; Kami, Y.; Kishi, U.; Machida, U.; Matsumura, T.; Kashima, T. 2002. Clinical significance of extra-pulmonary involvement of invasive aspergillosis: a retrospective autopsy-based study of 107 patients. *Journal of Hospital Infection* 50:175-182.

- Hostetler, J.S.; Denning, D.W.; Stevens, D.A. 1992. US experience with itraconazole in *Aspergillus*, *Cryptococcus* and *Histoplasma* infections in the immunocompromised host. *Chemotherapy* 1:12-22.
- Ito, Y.; Ohyashiki, K.; Yoshida, I.; Takeuchi, M.; Aoyama, Y.; Mugitani, A.; Matsuura, Y.; Wakita, H.; Matsuda, M.; Sakamoto, E.; Kiguchi, T.; Urabe, A.; Tamura, K.; Kanamaru, A.; Masaoka, T. 2007. The prophylactic effect of itraconazole capsules and fluconazole capsules for systemic fungal infections in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes: a Japanese multicenter randomized, controlled study. *International Journal of Hematology* 85:121-127.
- Izquierdo, A.A., Castelli, M.V., Guesta, I., Monzon, A., Cuenca-Estrella, M., Tudela, J.L.R. 2009. Activity of Posaconazole and other antifungal agents against Mucorales strains identified by sequencing of internal transcribed spacers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53:1686-1689.
- Jack, D.L.; Jarvis, G.A.; Booth, C.L.; Turner, C.L.; Klein, M.W. 2001. Mannose-binding lectin accelerates complement activation and increases serum killing of *Neisseria meningitidis* serogroup C. *The Journal of Infectious Diseases* 184:836-845.
- Kalavathy, C.M.; Parmar, M.S.P.; Kalliamurthy, M.S.J.; Philip, V.R.; Ramalingam, M.D.; Jesudasan, C.A.; Thomas, P.A. 2005. Comparison of topical itraconazole 1% with topical natamycin 5% for the treatment of filamentous fungal keratitis. *Cornea* 24:449-452.
- Kaur, C.D.; Nahar, M.; Jain, N.K. 2008. Lymphatic targeting of zidovudine using surface-engineered liposomes. *Journal of Drug Targeting* 16:798-805.
- Kaur, I.P.; Rana, C.; Singh, H. 2008. Development of effective ocular preparations of antifungal agents. *Journal of Ocular Pharmacol and Therapeutics* 24:481-439.
- Keay, L.J., Gower, E.W., Iovieno, A., Oechsler, R.A.; Alfonso, E.C.; Matoba, A.; Colby, K.; Tuli, S.S.; Hammersmith, K.; Cavanagh, D.; Lee, S.M.; Irvine, J.; Stulting, R.D.; Mauger, T.F.; Schein, O.D. 2011. Clinical and Microbiological characteristics of fungal keratitis in the United States, 2001-2007: A Multicenter Study. *The American Academy of Ophthalmology* 118:920-926.
- Kelsey, S.M.; Goldman, J.M.; McCann, S.; Newland, A.C.; Scarffe, J.H.; Oppenheim, B.A.; Mufti, G.J. 1999. Liposomal amphotericin (AmBisome) in the prophylaxis of fungal infections in neutropenic patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Bone Marrow Transplant* 23:163-168.
- Kibbler, C.C. 1999. Antifungal prophylaxis with itraconazole oral solution in neutropenic patients. *Mycoses* 2:121-124.
- Kitajima, Y. 2000. Structural and biochemical characteristics of pathogenic fungus: cell walls, lipids and dimorphism and action modes of antifungal agents. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 41:211-217.
- Klein, K.C.; Blackwood, A.R. 2006. Topical voriconazole solution for cutaneous aspergillosis in a pediatric patient after bone marrow transplant. *Pediatrics* 118:506-508.
- Kuku, A.; Odekanyin, O.; Adeniran, K.; Adewusi, M.; Olonade, T. 2009. Purification of a mannose/glucose-specific lectin with antifungal activity from pepper seeds (*Capsicum annum*). *African Journal of Biochemistry Research* 3:272-278.
- Lacaz, C.S., Porto, E. 2002. *Tratado de micologia médica*. 9th edn, São Paulo, Editora Sarvier.
- Lambertucci, J.R.; Fonseca, P.; Linares, D.B. 2009. Invasive aspergillosis of the orbit and cavernous sinus in a patient with Aids. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 42:734-735.
- Langer, R., Folkman, J. 1976. Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. *Nature* 263:797-800.
- Lass-Flörl, C., Nagl, M., Speth, C., Ulmer, H., Dierich, M.P., Würzner, R. 2001. Studies of *in vitro* activities of voriconazole and itraconazole against *Aspergillus* hyphae using viability staining. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45:124-128.
- Latgé, J.P. 2007. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology* 66:279-290.

- Leal, A.F.G., Lima-Neto, R.G., Macêdo, D.P., Beltrão, E.I.C.; Neves, R.P. 2011a. Carbohydrate profiling of fungal cell wall surface glycoconjugate of *Trichophyton tonsurans* and other keratinophilic filamentous fungi using lectins. *Mycoses* 54:789-794.
- Leal, A.F.G.; Lopes, N.E.P.; Clark, A.T.R.; Pontes-Filho, N.T.; Beltrão, E.I.C.; Neves, R.P. 2011b. Carbohydrate profiling of fungal cell wall surface glycoconjugates of *Aspergillus* species in brain and lung tissues using lectin histochemistry. *Medical Mycology* 1-4
- Leal, A.F.G.; Macêdo, D.P.C.; Souza-Motta, C.M.; Fernandes, M.J.S.; Magalhães, O.M.C; Neves, R.P. 2010. Ocorrência de fungos filamentosos de importância médica em água de bebedouros. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 69:576-579.
- Lima, A.L.H., Forseto, A., Duprat, J.P.; Andrade, A.; Souza, L.B.; Godoy, P.; Freitas, D. 2005. Estudo laboratorial das micoses oculares e fatores associados às ceratites. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 68: 21-27.
- Lima-Neto, R.G.; Beltrão, E.I.C.; Oliveira, P.C.; Neves, R.P. 2009. Adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to epithelial cells correlates with fungal cell surface carbohydrates. *Mycoses* 54:23-29.
- Lopes, A.J.; Jansen, U.; Capone, D.; Jansen, J.M. 2004. Aspergiloses pulmonares. *Pulmão* 13:257-267.
- Lopez-Ribot, J.L.; Casanova, M.; Murgui, A.; Martínez, J.P. 2004. Antibody response to *Candida albicans* cell wall antigens. *FEMS Immunology Medical Microbiology* 41:187-196.
- Loris, R.; Greve, H.; Dao-Thi, M.H.; Messens, J.; Imberty, A.; Wyns, L. 2000. Structural basis of carbohydrate recognition by lectin II from *Ulex europaeus*, a protein with a promiscuous carbohydrate-binding site. *Journal of Molecular Biology* 16:23-26.
- Lovatt, M.; Yang, T.H.; Stauss, H.J.; Fisher, A.G.; Merckenschlager, M. 2000. Different doses of agonistic ligand drive the maturation of functional CD4 and CD8 T cells from immature precursors. *European Journal of Immunology* 30:371-381.
- Macêdo, D.P.C., Silva-Junior, H.M., Souza-Motta, C.M., Milan, E.P.; Neves, R.P. 2009. Invasive aspergillosis associated with systemic lupus erythematosus and cardiac postoperative complication. *Brazilian Journal of Microbiology* 40:180-183.
- Maertens, G.Y.; Rosenberg, A.S. 2000. Fungal cell wall inhibitors: emphasis on clinical aspects. *Current Pharmaceutical Design* 6:225-239.
- Martín, M.T.M.; Gavalda, J.; López, P.; Gomis, X.; Ramírez, J.L.; Rodríguez, D.; Len, O.; Jordano, Q.; Ruiz, I.; Rosal, M.; Almirante, B.; Pahissa, A. 2003. Efficacy of high doses of liposomal amphotericin B in the treatment of experimental aspergillosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52:1032-1034.
- Martínez, J.P.; Gil, M.L.; López-Ribot, J.L.; Chaffin, W.L. 1998. Serologic response to cell wall mannoproteins and proteins of *Candida albicans*. *Clinical Microbiology Reviews* 11:121-141.
- Masuoka, J. 2004. Surface glycans of *Candida albicans* and other pathogenic fungi: physiological roles, clinical uses and experimental challenges. *Clinical Microbiology Reviews* 17:281-310.
- Mayers, D.L. 2009. *Antimicrobial Drug Resistance*. 1 edn. New York: Humana Press.
- Meneau, I., SANGLARD, D. 2005. Azole and fungicide resistance in clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates. *Medical Mycology* 43:307-311.
- Mishara, G.P., Bagui, M., Tamboli, V., Mitra, A.K. 2011. Recent Applications of Liposomes in Ophthalmic Drug Delivery. *Journal of Drug Delivery* 1-14.
- Miyazaki, H.M.; Khono, S.; Miyazaki, Y.; Mitsutake, K.; Tomono, K.; Kaku, M.; Koga, H.; Hara, K. 1993. Efficacy of intravenous itraconazole against experimental pulmonary aspergillosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37:2762-2765.
- Morand, K., Bartoletti, A.C., Bochot, A., Barratt, G.; Brandely, M.L.; Chast, F. 2007. Liposomal amphotericin B eye drops to treat fungal keratitis: Physico-chemical and formulation stability. *International Journal of Pharmaceutics* 344:150-153.
- Morgan, W.T.; Watkins, W.M. 2000. Unraveling the biochemical basis of blood group ABO and Lewis antigenic specificity. *Glycoconjugate Journal* 17:501-530.

- Morgenstem, G.R.; Prentice, A.G.; Prentice, H.G.; Ropner, J.E.; Schey, S.A.; Warnock, D.W. 1999. A randomized controlled Trial of itraconazole versus fluconazole for the prevention of fungal infections in patients with haematological malignancies. U.K. Multicentre Antifungal Prophylaxis Study Group. *British Journal of Haematology* 105:901-911.
- Munõz, A.; Alonso, B.; Alvarez, O.; Llovo, J. 2003. Lectin typing of five medically important *Candida* species. *Mycoses* 46:85-89.
- Najvar, L.K.; Cacciapouti, A.; Hernandez, S.; Halpern, J.; Bocanegra, R.; Gurnani, M.; Menzel, F.; Lobenberg, D.; Graybill, J.R. 2004. Activity of posaconazole combined with amphotericin B against *Aspergillus flavus* infection in mice: comparative studies in two laboratories. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48:758-764.
- Nakashima, K.; Yamada, N.; Yoshida, Y.; Yamamoto, O. 2010. Primary Cutaneous Aspergillosis. *Acta Dermato Venereologica* 90:519-520.
- Nawada, R.; Amitani, R.; Tanaka, E.; Niimi, A.; Suzuki, K.; Murayama, T.; Kuze, F. 1996. Murine modelo of invasive pulmonary aspergillosis following an earlier stage, noninvasive *Aspergillus* infection. *Journal of Clinical Microbiology* 34:1433-1439.
- Nenoff, P., Katrin, S., Flemming, C., Hustin, U.F. 2000. Differentiation of *Candida* strains by lectin-mediated agglutination kinetics. *Mycoses* 43:100-107.
- New, R.R.; Chance, M.L.; Heath, S. 1981. Antileishmanial activity of amphotericin and other antifungal agents entrapped in Liposomes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 8:371-381.
- Ng, T.B.; Yu, Y.L.; Chu, K.T. 2002. Isolation of a novel legumin-like lectin with potent hemagglutinating activity from seeds of the Chinese chestnut *Castanea mollissima*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 133:453-460.
- Ngai, P.H.K.; Ng, T.B. 2004. A mushroom (*Ganoderma capense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes, and antiproliferative activity toward tumor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 314:988-993.
- Ninane, J.; Sluysmans, T.; Vermeylen, C.; De Beule, K.; Woestenborghs, R.; Cauwenbergh, G.; Cornu, G. 1989. Itraconazole versus ketoconazole for the prophylaxis of fungal infection in neutropenic children: results of two consecutive nonrandomized studies. *Pediatric Hematology and Oncology* 6:349-353.
- Nomura, K.; Ashida, H.; Uemura, N.; Kushibe, S.; Ozaki, T.; Yoshida, M. 1998. Purification and characterization of a mannose/glucose-specific lectin from *Castanea crenata*. *Phytochemistry* 49:667-673.
- Nucci, M.; Marr, K.A. 2005. Emerging fungal diseases. *Clinical Infectious Diseases* 41:521-526.
- Nucci, M., Telles, F.Q., Tobón, A.M., Restrepo, A.; Colombo, A.L. 2010. Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America. *Clinical Infectious Diseases* 51:1-11.
- O'Day, D.M. 1990. Orally administered antifungal therapy for experimental keratomycosis. *Transactions of the American Ophthalmological Society* 88:685-725.
- Oliveira, P.R., Resende, S.M., Oliveira, F.C., Oliveira, A.C. 2001. Ceratite fúngica. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 64: 75-9.
- Ozer, E. 2000. Effects of prenatal exposure on neuronal migration, neurogenesis and brain myelination in the mice brain. *Clinical Neuropathology* 19:21-25.
- Pannellier, C.; Vignet, A.; Chwetzoff, E. 1992. Itraconazole in systemic aspergillosis: experience in 22 cases. *Chemotherapy* 1:54-54.
- Parikh, S.K.; Patel, A.D.; Dave, J.B.; Patel, C.N.; Sen, D.J. 2011. Development and validation of UV spectrophotometric method for estimation of itraconazole bulk drug and pharmaceutical formulation. *International Journal of Drug Development & Research* 3:324-328.
- Paterson, R.R.M.; Kelly, J.; Gallagher, M. 1997. Natural occurrence of aflatoxins and *Aspergillus flavus* (Link) in water. *Letters in Applied Microbiology* 25:435-436.
- Patterson, T.F. 2005. Advances and challenges in management of invasive mycoses. *The Lancet* 366:1013-1025.
- Peer, D.; Karp, J.M.; Hong, S.; Farokhzad, O.C.; Margalit, R.; Langer, R. 2007. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology* 2:751-760.

- Pérez-Santiago, A.; Saavedra, E.; Pérez, E.C.; Córdoba, F. 2000. Effect of plant lectins on *Ustilago maydis* *in vitro*. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57:1986-1989.
- Peumans, W.J.; Van Damme, E.J.M. 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology* 109:347-352.
- Pesle, G.D.; Monod, O. 1954. Bronchiectasis due to aspergilloma. *Disease Chest* 25:172-183.
- Pinto, M.R.; Barreto-Bergter, E.; Taborda, C.P. 2008. Glycoconjugates and polysaccharides of fungal cell wall and activation of immune system. *Brazilian Journal of Microbiology* 39:195-208.
- Posteraro, B.; Tumbarello, M.; La Sorda, M.; Spanu, T.; Trecarichi, E.M.; Bernardis, F.; Scoppettuolo, G.; Sanguinetti, M.; Fadda, G. 2006. Azole resistance of *Candida glabrata* in a case of recurrent fungemia. *Journal of Clinical Microbiology* 44:3046-3047.
- Prajna, N.V., Mascarenhas, J., Krishnan, T., Reddy, P.R.; Prajna, L.; Srinivasan, M.; Vaitilingam, C.M.; Hong, K.C.; Lee, S.M.; McLeod, S.D.; Zegans, M.E.; Porco, T.C.; Lietman, T.M.; Acharya, N.R. 2010. Comparison of Natamycin and Voriconazole for the Treatment of Fungal Keratitis. *Archives of Ophthalmology* 128:672-678.
- Qiao, J.; Liu, W.; LI, R. 2008. Antifungal Resistance Mechanisms of *Aspergillus*. *Japanese Journal of Medical Mycology* 49:157-163.
- Ramos, M.M.; Claros, J.A.; Vale-Oviedo, A.; Siso-Villaruel, E.; Padilla, R.; Santiago, A.; Simón, J.A. 2008. Effect of the vehicle on the topical itraconazole efficacy for treating corneal ulcers caused by *Aspergillus fumigatus*. *Clinical and Experimental Ophthalmology* 36:335-338.
- Raper, K.B.; Fenel, D.I. 1977. *The genus Aspergillus*. Malabar Florida: Robert e Krieger.
- Remani, P.; Pillai, K. R.; Haseenabeevi, V. M. 1994. Lectin cytochemistry in the exfoliative cytology of uterine cervix. *Neoplasma* 41:39-42.
- Robin, J.B.; Arffa, R.C.; Avni, I.; Rao, N.A. 1986. A Rapid visualization of three common fungi using fluorescein-conjugated lectins. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 27:500-505.
- Rodriguez, D.; Cavada, B.S.; Oliveira, J.T.A.; Moreira, R.A.; Russo, M. 1992. Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/mannose-binding lectins. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 25:823-826.
- Romani, L. 2004. Immunity to fungal infections. *Nature Reviews Immunology* 4:1-13.
- Roth, J.; Lucocq, J.M.; Taatjes, D.J. 1998. Light and electron microscopical detection of sugar residues in tissue sections by gold labeled lectins and glycoproteins. I. Methodological aspects. *Acta Histochemica* 36:81.
- Rubinstein, N.; Ilarregui, J.M.; Toscano, M.A.; Rabinovich, G.A. 2004. The role of galectins in the initiation, amplification and resolution of the inflammatory response. *Tissue Antigens* 64:1-2.
- Sames, K.H.; Schumacher, U.; Halata, Z.; Van Damme, E.J.; Peumans, W.J.; Asmus, B.; Moll, R.; Moll, I. 2001. Lectin and proteoglycan histochemistry of Merkel cell carcinomas. *Experimental Dermatology* 10:100-109.
- Sanna, V.; Gavini, E.; Cossu, M.; Rassu, G.; Giunchedi, P. 2007. Solid lipid nanoparticles (SLN) as carriers for the topical delivery of econazole nitrate: in-vitro characterization, ex-vivo and in-vivo studies. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 59:1057-1064.
- Sarinová, M., Straková, V., Balková, K., Gbelská, Y. 2007. Decreased susceptibility to antifungals in respiratory-deficient *Kluyveromyces lactis* mutants. *Folia Microbiologica* 52:484-490.
- Schiffelers, R.; Storm, G.; Bakker-Woudenberg, I. 2001. Liposome-encapsulated aminoglycosides in pre-clinical and clinical studies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48:333-344.
- Sharon, N.; Lis, H. 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 14:53-64.
- Sharon, N. 2007. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *The Journal of Biological Chemistry* 282:2753-2764.
- Shibata, N.; Okawa, Y. 2006. Structure of Fungal Cell Wall Polysaccharides. *Japanese Journal of Medical Mycology* 47:179-184.
- Shibuya, K.; Takaoka, M.; Uchida, K.; Wakayama, M.; Yamaguchi, H.; Takahashi, K.; Paris, S.; Latge, J.P.; Naoe, S. 1999. Histopathology of experimental invasive pulmonary aspergillosis in

- rats: pathological comparison of pulmonary lesions induced by specific virulent factor deficient mutants. *Microbial Pathogenesis* 27:123-131.
- Shoham, S.; Levitz, S.M. 2005. The immune response to fungal infections. *British Journal of Haematology* 129:569-582.
- Shukla, P.K.; Kumar, M.; Keshava, B.S. 2008. Mycotic keratitis: an overview of diagnosis and therapy. *Mycoses* 51:183-199.
- Sidransky, H.; Friedman, A.M.L. 1959. The effect of cortisone and antibiotic agents on experimental pulmonary aspergillosis. *American Journal of Pathology* 35:169-183.
- Sipsas, N.V.; Kontoyiannis, D.P. 2006. Clinical issues regarding relapsing aspergillosis and the efficacy of secondary antifungal prophylaxis in patients with hematological malignancies. *Clinical Infectious Diseases* 42:1584-1591.
- Sitohy, M.; Doheim, M.; BADR, H. 2007. Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from egyptian *Pisum sativum* seeds. *Food Chemistry* 104:971-979.
- Slifkin, M.; Doyler, R.J. 1990. Lectins and their application to clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* 3:197-218.
- Sluyter, T. 1847. De vegetalibus organism animalis parasitis ac de novo Epiphyto in pitgreasi versicolore obvio. *Diss Inaug Beroloni* 14.
- Souto, E.B.; Muller, R.H. 2005. SLN and NLC for topical delivery of ketoconazole. *Journal of Microencapsulation* 22:501-510.
- Spreadbury, C.L.; Krausz, S.; Pervez, S.; Cohen, J. 1989. Invasive aspergillosis: clinical and pathological features of a new animal model. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 27:5-15.
- Srinivasan, M. 2004. Fungal Keratitis. *Current Opinion in Ophthalmology* 15:321-327.
- Staib, F. Zur Bekämpfung von *Aspergillus fumigatus*. 1979. Infektion während des Klinikanfenthalts. *off. Gesundh-Wesen* 41:777-781.
- Stephens-Romero, S.D.; Mednick, A.J.; Feldmesser, M. 2005. The pathogenesis of fatal outcome in murine pulmonary aspergillosis depends on the neutrophil depletion strategy. *Infection and Immunity* 73:114-125.
- Stevens, D.A.; Lee, J.Y. 1997. Analysis of compassionate use itraconazole therapy for invasive aspergillosis by the NIAID mycoses study group criteria. *Archives of Internal Medicine* 8:157-162.
- Stevens, D.A., Ichinomiya, M., Koshi, Y., Horiuchi, H. 2006. Escape of *Candida* from caspofungin inhibition at concentrations above the MIC (paradoxical effect) accomplished by increased cell wall chitin; evidence for β -1,6-glucan synthesis inhibition by caspofungina. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50:3160-3161.
- Sun, Q.N., Fothergill, A.W., McCarthy, D.I., Rinaldi, M.G., Graybill, J.R. 2002 *In vitro* activities of posaconazole, itraconazole, voriconazole, amphotericin B and fluconazole against 37 clinical isolates of zygomycetes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46:1581-1582.
- Takemoto, K.; Yamamoto, Y.; Ueda, Y.; Sumita, Y.; Yoshida, K.; Niki, Y. 2006. Comparative study on the efficacy of Ambisome and Fungizone in a mouse model of pulmonary aspergillosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57:724-731.
- Tang, J., Wei, H., Liu, H., Ji, H.; Dong, D.; Zhu, D.; Wu, L. 2010. Pharmacokinetics and biodistribution of itraconazole in rats and mice following intravenous administration in a novel liposome formulation. *Drug Delivery* 17:223-230.
- Tansho, S.; A.B.E., S.; Ishbashi, H.; Torii, S.; Torii, S.; Otani, H.; Ono, Y.; Yamaguchi, H. 2006. Efficacy of intravenous itraconazole against invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic mice. *Journal of Infection and Chemotherapy* 12:355-362.
- Tricot, G.; Joosten, E.; Boogaerts, M.A.; Pitte, J.V.; Cauwenbergh, G. 1987. Ketoconazole vs. Itraconazole for antifungal prophylaxis in patients with severe granulocytopenia: preliminary results of two non-randomized studies. *Reviews of Infectious Diseases* 9:94-99.
- Trindade, M.B.; Lopes, J.L.S.; Soares-Costa, A.; Monteiro-Moreira, A.C.; Moreira, R.A.; Oliva, M.L.; Beltramini, L.M. 2006. Structural characterization of novel chitin-binding lectins from the

- genus *Artocarpus* and their antifungal activity. *Biochimica et Biophysica Acta (Proteins & Protomics)* 1764:146-152.
- Turner, K.J.; Hackshaw, R.; Papadimitriou, J.; Perrott, J. 1975. The pathogenesis of experimental pulmonary aspergillosis in normal and cortisone-treated rats. *The Journal of Pathology* 118:65-73.
- Tunçcan, O.G. ; Aki, S.Z. ; Akyurek N.; Sucak, G.; Senol, E. 2011. Isolated cutaneous aspergillosis in an acute lymphoblastic leukemia patient after allogeneic stem cell transplantation. *Journal of Infection in Developing Countries* 5:406-409.
- Umamaheshwari, R.B., Jain, N.K. 2003. Resceptor mediated targeting of lectin conjugated gliadin nanoparticles in the treatment of *Helicobacter pylori*. *Journal of Drug Targeting* 11:415-424.
- Vallor, A.C.; Kirkpatrick, W.; Najvar, L.K.; Bocanegra, R.; Kinney, M.C.; Fothergill, A.W.; Herrera, M.L.; Wickes, B.L.; Graybill, J.R.; Patterson, T. 2008. Assessment of *Aspergillus fumigatus* burden in pulmonary tissue of guinea pigs by quantitative PCR, galactomannan enzyme immunoassay, and quantitative culture. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52:2593-2598.
- Van Cutsem, J.; Van Gerven, F.; Van De Ven, M.A.; Borgers, M.; Janssen, P.A. 1984. Itraconazole, a new trazole that is orally active in aspergillosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 26:527-534.
- Van Cutsem, J.; Van Gerven, F.; Janssen, P.A. 1987. Activity of orally, topically, and parenterally administered itraconazole in the treatment of superficial and deep mycoses: animal models. *Reviews of Infectious Diseases* 9:15-32.
- Van' T Wout, J.W.; Novakova, I.; Verhagen, C.A.H.; Fibbe, W.E.; De Pauw, B.E.; Van der Meer, J.W. 1991. The efficacy of itraconazole against systemic fungal infections in neutropenic patients: a randomized comparative study with amphotericin B. *The Journal of Infection* 22:45-52.
- Vardar-Ünlü, G.; McSharry, C.; Julia-Douglas, L. 1998. Fucosespecific adhesins on germ tubes of *Candida albicans*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 20:55-67.
- Verghese, S.; Maria, C.F.; Mullaseri, A.S.; Asha, M.; Padmaja, P.; Padhye, A.A. 2004. *Aspergillus* endocarditis presenting as femoral artery embolism. *Mycoses* 47:252-256.
- Viard, B.; Streiblova, E.; Bonaly, R. 1993. Alternate interactions of the o-galactose-specific yeast lectin Kb-CWL I with sensitive yeast strains. *FEMS Microbiology Letters* 107:17-24.
- Virchow, R. 1856. Beitrage Fur Leure Von Den Bein Menchen Vostrommenden Pflanzlicken Parasiten. *Virchow Arch. (Path. Anat.)* 9:557.
- Wagner, V.; Dullaart, A.; Bock, A.K.; Zweck, A. 2006. The emerging nanomedicine landscape. *Nature Biotechnology* 24:1211-1217.
- Walsh, T.J.; Anaissie, E.J.; Denning, D.W.; Herbrecht, R.; Kontoyiannis, D.P.; Marr, K.A.; Morrison, V.A.; Segal, B.H.; Steinbach, W.J.; Stevens, D.A.; Van Burik, J.A.; Wingard, J.R.; Patterson, T.F. 2008. Treatment of Aspergillosis: Clinical Practice Guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *IDSA Guidelines of Aspergilosis* 46:327-360.
- Walsh, T.J.; Goodman, J.L.; Pappas, P.; Bekersky, I.; Buell, D.N.; Roden, M.; Barrett, J.; Anaissie, E.J. 2001. Safety, tolerance, and pharmacokinetics of high-dose liposomal amphotericin B (AmBisome) in patients infected with *Aspergillus* species and other filamentous fungi: maximum tolerated dose study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45:3487–3596.
- Wang, J.; Zhan, P.; Zhou, R.; Xu, J. ; Shao, X.; Yang, Y.; Ouyang, J. 2010. Prophylaxis with itraconazole is more effective than prophylaxis with fluconazole in neutropenic patients with hematological malignancies: a meta-analysis of randomized-controlled trials. *Medical Oncology* 27:1082-1088.
- Weig, M.; Reichard, U.; Grob, U. 2001. *Aspergillus fumigatus*-virulence and opportunism. *Mycoses* 44:351-355.
- Weisser, M.; Rausch, C.; Droll, A.; Simcock, M.; Sendi, P.; Steffen, I.; Buitrago, C.; Sonnet, S.; Gratwohl, A.; Passweg, J.; Fluckiger, U. 2005. Galactomannan does not preced major signs on a pulmonary computerized tomographic scan suggestive of invasive aspergillosis in patients with hematological malignancies. *Clinical Infectious Diseases* 41:1143-1149.

- Willermain, F.; Bradstreet, S.; Kampouridis, S., Libert, J.; Koch, P.; Dediste, A.; Saussez, S.; Caspers, L. 2008. Different presentations of ophthalmic aspergillosis. *European Journal of Ophthalmology* 18:827-830.
- Winston, D.J.; Maziarz, R.T.; Chandrasekar, P.H.; Lazarus, H.M.; Goldman, M.; Blumer, J.L.; Leitz, G.J.; Territo, M.C. 2003. Intravenous and oral itraconazole versus intravenous and oral fluconazole for long-term antifungal prophylaxis in allogeneic hematopoietic stem-cell transplant recipients. A multicenter, randomized trial. *Annals of Internal Medicine* 6:705-713.
- Wong, J.H.; Ng, T.B. 2003. Purification of a trypsin-stable lectin with antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 301:545-550.
- Wong, J.H.; Ng, T.B. 2005. Isolation and characterization of a glucose/mannose/rhamnose specific lectin from the knife bean *Canavalia gladiata*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 439:91-98.
- Wong, J.H.; Wong, C.C.T.; Ng, T.B. 2006. Purification and characterization of a galactose-specific lectin with mitogenic activity from pinto beans. *Biochimica et Biophysica Acta (General Subjects)* 1760:808-813.
- Wu, T.G., Wilhelmus, K.R., Mitchell, B.M. 2003. Experimental keratomycosis in a mouse model. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44:210-216.
- Yan, Q.; Jiang, Z.; Yang, S.; Deng, W. ; Han, L. 2005. A novel homodimeric lectin from *Astragalus monogolicus* with antifungal activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 442:72-81.
- Yavas, G.F., Ozturk, F., Kusbeci, T., Cetinkaya, Z.; Ermis, S.S.; Kiraz, N.; Inan, U.U. 2008. Antifungal efficacy of voriconazole, itraconazole and amphotericin B in experimental *Fusarium solani* keratitis. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 246:275-279.
- Ye, X.; Ng, T.B. 2001. Isolation of lectin and albumin from *Pisum sativum* var. macrocarpon ser. cv. Sugar snap. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 33:95-102.
- Ye, X.; Ng, T.B.; Tsang, P.W.K.; Wang, J. 2001. Isolation of a homodimeric lectin with antifungal and antiviral activities from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Protein Chemistry* 20:367-375.
- Zambenedetti, P.; Giordano, R.; Zatta, P. 1998. Histochemical localization of glycoconjugates on microglial cells in Alzheimers's Disease brain samples by using *Abrus precatorius*, *Maackia amurensis*, *Momordica charantia* and *Sambucus nigra* lectins. *Experimental Neurology* 153 :167-187.
- Zhang, L.; Pornpattananankul, D.; Hu, C.M.; Huang, C.M. 2010. Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. *Current Medicinal Chemistry* 17 :585-594.
- Zhang, L.; Granick, S. 2006. How to stabilize phospholipid liposomes (using nanoparticles). *Nano Letters* 6:694-698.
- Zhang, L.; Gu, F.X.; Chan, J.M.; Wang, A.Z.; Langer, R.S.; Farokhzad, O.C. 2008. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 83:761-769.

ANEXOS

Short Communication

Carbohydrate profiling of fungal cell wall surface glycoconjugates of *Aspergillus* species in brain and lung tissues using lectin histochemistry

ANDRÉ F. G. LEAL*, NADJA E. P. LOPES*, ARTHUR T. R. CLARK‡, NICODEMOS T. DE PONTES FILHO§, EDUARDO I. C. BELTRÃO†‡ & REJANE P. NEVES*

*Departamento de Micologia, †Departamento de Bioquímica, ‡Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), and §Departamento de Patologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

The aim of this study was to evaluate, through lectin histochemistry, the expression of *N*-acetyl-D-glucosamine, L-fucose, D-galactose and glucose/mannose on the cell wall surfaces of *Aspergillus* species in histopathological specimens of brain ($n = 1$) and lung ($n = 6$) tissues obtained during autopsy of patients diagnosed postmortem as having had invasive aspergillosis. Concanavalin A (Con A), wheat germ agglutinin (WGA), *Ulex europaeus* agglutinin I (UEA-I) and peanut agglutinin (PNA), all conjugated with horseradish peroxidase, were employed. Lectin-binding was visualized using 3,3'-diaminobenzidine (DAB) and hydrogen peroxide in phosphate buffer solution (PBS). We observed expression of *N*-acetyl-D-glucosamine and methyl- α -D-mannoside on the cell wall surfaces of all evaluated *Aspergillus* species, while the expression of L-fucose and D-galactose demonstrated inter and intra-specific variations. The results obtained from this study indicate that the use of WGA and Con A lectins permits visualization of *Aspergillus* structures such as hyphae, conidial heads and conidia in histopathological specimens of brain and lung tissues.

Keywords cell wall carbohydrates, *Aspergillus*, brain, lung, lectin histochemistry

Introduction

Aspergillus spp. are ubiquitous fungi which can cause a variety of clinical syndromes, especially in immunosuppressed patients. Members of this genus have emerged as agents of fatal systemic infections and have therefore gained considerable public health importance [1].

Several works have reported that the interaction between a fungus and host first occurs at the level of the cell wall surface glycoconjugates [2,3]. Thus, characterization of these exterior carbohydrate residues can lead to a better understanding of fungal adhesion and the mechanisms by which fungi avoid the host's immune system. Such

information would be of help in developing diagnostic tests based on identification of carbohydrate components [4].

Every cell carbohydrate is a potential lectin-recognition molecule. The ability to recognize the saccharide moieties of glycoconjugates enables lectins to be used in microbiologic studies such as the characterization of fungal cell wall surface glycoconjugates [5–7].

Thus, the aim of this study was to evaluate, through lectin histochemistry, the expression of *N*-acetyl-D-glucosamine, L-fucose, D-galactose and glucose/mannose on the cell wall surface of *Aspergillus* species in histopathological specimens of brain and lung tissue obtained during autopsies of patients diagnosed postmortem as having had invasive aspergillosis.

Material and methods*Tissue samples*

Histopathological specimens (paraffin tissue blocks) of brain ($n = 1$) and lung ($n = 6$) tissue, obtained during

Received 4 May 2011; Received in final revised form 26 September 2011; Accepted 11 October 2011

Correspondence: Rejane P. Neves, Departamento de Micologia/CCB/UFPE, Rua Prof. Nelson Chaves, s/n, Cidade Universitária, Recife-PE, Brazil 50670-420. Tel/Fax: +5581 2126 8481; E-mail: rejadel@yahoo.com.br

© 2011 ISHAM

DOI: 10.3109/13693786.2011.631946

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas**

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Ofício nº 202/09

Recife, 27 de outubro de 2009.

Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Para: **Profa.: Rejane Pereira Neves**
Departamento: Micologia / UFPE
Processo nº 23076.008239/2009-96

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado: **"ASPERGILOSE EXPERIMENTAL, EFEITO ANTIFÚNGICO DO ITRACONAZOL IN VITRO E TRATAMENTO POR LIBERAÇÃO CONTROLADA"**

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,


Profa. Maria Teresa Jansen
Presidente da CEEA

Observação: Aluno de pós-graduação: André Ferraz Goiana Leal; Origem dos animais: Biotério do Centro de Pesquisa, Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia ; Animais: Ratos, linhagem: Wistar; Sexo: Machos e Fêmeas; Idade: 2 a 5 meses ; N° de Animais previsto no projeto: 36 animais .