


## ESTUDO IN VITRO E IN VIVO DE FORMULAÇÃO ANTIFÚNGICA COMPLEXO ANFOTERICINA B-7-DEHIDROCOLESTEROL: TOXICIDADE E AÇÃO NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE EXPERIMENTAL

 <https://doi.org/10.56238/arev7n2-054>

Data de submissão: 06/01/2025

Data de publicação: 06/02/2025

**Berenice Tomoko Tatibana**

Doutor em Microbiologia

Universidade Estadual de Londrina, Instituto Federal do Paraná, Londrina, PR, Brasil.

E-mail: [berenice.tatibana@ifpr.edu.br](mailto:berenice.tatibana@ifpr.edu.br)

**Paula Leonello Álvares e Silva**

Doutor em Patologia Experimental

Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

**Bianca Dorana de Oliveira Souza**

Doutoranda em Patologia Experimental

Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

**Flávio Hiroshi Itano**

Doutorando em Patologia Experimental

Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

**Sofia Yukie Fujita**

Graduanda

Faculdade de Odontologia, FOA/UNESP, Araçatuba, SP, Brasil.

**Jun Uno**

Doutor em Farmácia

Universidade de Chiba, Chiba, Japão.

**Mario Augusto Ono**

Doutor em Microbiologia e Imunologia

UNIFESP, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

**Eiko Nakagawa Itano**

Doutor em Microbiologia e Imunologia

UNIFESP, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

E-mail: [itano@uel.br](mailto:itano@uel.br); [eikoitano@gmail.com](mailto:eikoitano@gmail.com)

### RESUMO

A paracoccidiodomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis* que, quando não diagnosticada e tratada precocemente, pode evoluir para formas disseminadas graves e letais. A anfotericina B desoxicolato (AMB-D) é a principal opção para o tratamento intravenoso dos casos graves da doença; no entanto, seu uso é limitado devido à alta nefrotoxicidade. Este estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade *in vitro* e *in vivo* do complexo AMB-7DC—uma formulação hidrossolúvel e termoestável resultante da ligação da AMB-D ao radical

7-dehidrocolesterol. Essa modificação reduz sua reatividade com o colesterol, o que pode minimizar os efeitos colaterais. Além disso, foi avaliada a ação fungicida *in vivo* contra *P. brasiliensis*. A toxicidade *in vitro* foi analisada pelo teste de hemólise em eritrócitos de carneiro, enquanto a toxicidade *in vivo* foi determinada pela dose máxima tolerada em camundongos BALBc. A eficácia antifúngica foi avaliada por meio da quantificação da carga fúngica (CFU) em camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis* ( $1,2 \times 10^6$  células/mL) e tratados ou não com os antifúngicos. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina (CEEAA nº 38/05, processo nº 23944/05). Os resultados indicaram que o AMB-7DC apresentou menor toxicidade em comparação à AMB-D, tanto nos ensaios *in vitro* quanto *in vivo*. Em relação à carga fúngica, observou-se uma redução nos grupos tratados em comparação ao grupo controle infectado ( $p < 0,05$ ), todavia sem diferença significativa entre os grupos AMB-D *versus* AMB-7DC ( $p > 0,05$ ). Com base nesses achados preliminares, conclui-se que o AMB-7DC mantém sua atividade antifúngica contra *P. brasiliensis*, apresentando menor toxicidade em comparação à AMB-D. Assim, o complexo AMB-7DC demonstra potencial para o tratamento da PCM, sendo necessários estudos adicionais para uma avaliação mais aprofundada.

**Palavras-chave:** Anfotericina B. Complexo anfotericina B-7-dehidrocolesterol. Paracoccidioidomicose.

## 1 INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM), descrita pela primeira vez no Brasil por Adolpho Lutz em 1908, é a micose sistêmica mais prevalente na América Latina, sendo frequentemente diagnosticada no Brasil, Venezuela, Colômbia, Equador e Argentina (BRUMMER et al., 1993). Os agentes etiológicos da doença são *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii* (BRUMMER et al., 1993; TEIXEIRA et al., 2013).

A PCM apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas. A forma crônica, a mais frequente, pode ser classificada em unifocal ou multifocal, dependendo do número de locais acometidos pelas lesões (SHIKANAI-YASSUDA et al., 2017). As lesões podem afetar os pulmões, linfonodos, mucosas, vias aéreas superiores, pele, glândulas adrenais, trato gastrointestinal, ossos, articulações, sistema nervoso central, olhos, trato urogenital, tireoide e outros órgãos (MENDES, 1994; SHIKANAI-YASSUDA et al., 2017). A gravidade da doença depende tanto da virulência do fungo quanto de fatores do hospedeiro (BURGER et al., 1996, CEZAR-dos-SANTOS et al., 2020; ASSOLINE et al., 2021, KAMINAMI et al., 2024).

Nos casos graves, a anfotericina B desoxicolato (AMB-D) é a principal opção terapêutica. No entanto, apesar de sua eficácia, seu uso é limitado pela alta nefrotoxicidade e pela necessidade de longos períodos de hospitalização para administração intravenosa (CAMPOS et al., 1984; BERNARD et al., 1995; NETO et al., 1998). Para aumentar a especificidade e reduzir a toxicidade da anfotericina B, diversas formulações lipídicas foram desenvolvidas e testadas, incluindo lipossomas (ex.: AmBisome), complexos lipídicos (ex.: ABLC) e emulsões. Embora essas formulações tenham permitido o uso de doses mais elevadas com menor toxicidade, ainda foram relatados efeitos colaterais, como ototoxicidade, febre, disfunção renal e reações anafiláticas, atribuídas aos componentes lipídicos. Além disso, falhas terapêuticas foram documentadas, como no tratamento da PCM juvenil com anfotericina B coloidal (LAING et al., 1994, DAS et al., 2014, MOEN et al., 2009).

Com o objetivo de minimizar a interação da anfotericina B com o colesterol das membranas celulares dos mamíferos e, conseqüentemente, reduzir seus efeitos colaterais, foi desenvolvido o complexo anfotericina B-7-dehidrocolesterol (AMB-7DC). Esse composto resulta da ligação da anfotericina B comercial (AMB-D) ao radical 7-dehidrocolesterol (patente nº 2915296; Nipro Co. Ltda, Japão). Testes *in vitro* demonstraram que o AMB-7DC apresenta menor toxicidade sem comprometer sua atividade antifúngica contra *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. brucei*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. guilliermondii* e *Cryptococcus neoformans* (UNO et al., 2001). Diferentemente da AMB convencional, esse complexo mostrou-se altamente hidrossolúvel e resistente à luz e a variações térmicas. Este estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade e a eficácia

do AMB-7DC na atividade antifúngica contra o fungo *P. brasiliensis* utilizando modelo de PCM experimental.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 DROGAS TESTADAS

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

### 2.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *IN VITRO*

A toxicidade *in vitro* foi avaliada seguindo o protocolo de LARABI et al. (2003), com algumas modificações. Eritrócitos de carneiro (ECs) foram suspensos em tampão salina fosfato (PBS, 5% v/v), lavados duas vezes no mesmo tampão e centrifugados a  $3.000 \times g$  por 10 minutos. A reação de hemólise foi realizada em tubos contendo 0,1 mL de AMB-D (Grupo AMB-D) ou AMB-7DC (Grupo AMB-7DC), além do grupo controle, contendo apenas a suspensão de ECs. As concentrações testadas variaram de 2 mg/mL a 0,0019 mg/mL, em diluição seriada 1:2, em uma suspensão de 0,9 mL de ECs a 2% (aproximadamente  $2 \times 10^8$  células/mL). Os resultados foram avaliados por espectrofotometria a 550 nm (Multiskan® EX, Thermo Scientific) após uma hora de incubação a 37°C em banho-maria.

### 2.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *IN VIVO*

Camundongos BALB/c machos (~30 g) foram injetados por via endovenosa com diferentes concentrações de AMB-D e AMB-7DC (dose única). A sobrevivência dos animais que receberam a dose máxima tolerada (DMT) foi monitorada por 7 dias.

### 2.4 MODELO EXPERIMENTAL DE PARACOCCIDIOIDOMICOSE (PCM)

Camundongos BALB/c foram inoculados com 100 µL de uma suspensão contendo *P. brasiliensis* (isolado Pb18) na concentração de  $1,2 \times 10^6$  células/mL. Os animais foram divididos em cinco grupos (n = 5 por grupo):

- C- (Controle negativo): não infectados e não tratados.
- C+ (Controle positivo): infectados e não tratados.
- AMB-D: infectados e tratados com AMB-D (1 mg/kg de peso corporal/dia).
- AMB-7DC: infectados e tratados com AMB-7DC (1 mg/kg de peso corporal/dia).

Os tratamentos foram iniciados 72 horas após a infecção, administrados em dose única diária, em dias alternados, totalizando nove doses. Após a última dose, aguardou-se 48 horas para a eutanásia dos animais.

O pulmão foi removido, pesado e processado para quantificação da carga fúngica (CFU), conduzida em meio ágar BHI suplementado com 4% de soro de cavalo e 5% de filtrado de *P. brasiliensis*, conforme descrito por Singer-Vermes et al. (1992). A avaliação do CFU foi realizada após 14 dias de incubação.

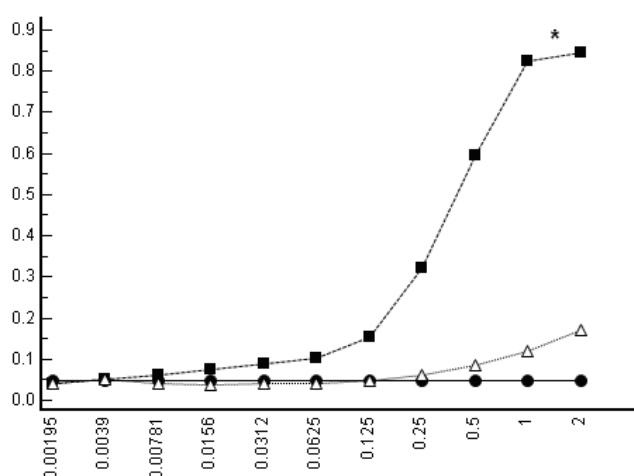
Todos os procedimentos envolvendo animais foram conduzidos de acordo com as diretrizes do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina (CEEAA nº 38/05, processo nº 23944/05). Os resultados foram expressos como o número de CFUs viáveis de *P. brasiliensis* por mg de tecido.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *IN VITRO*

A toxicidade *in vitro* foi determinada por meio da hemólise dos eritrócitos (ECs). Para a análise, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis no software SPSS, versão 15.0. Observou-se diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre o grupo AMB ( $0,287 \pm 0,316$ ) e o grupo AMB-7DC ( $0,067 \pm 0,043$ ), sendo o grupo AMB o mais hemolítico (Figura 1).

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



### 3.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *IN VIVO*

Os resultados apresentados na Tabela 1 indicam que o complexo AMB-7DC apresenta menor toxicidade aguda em relação ao AMB-D. A dose máxima tolerada (DMT) para AMB-D foi de 4,0 mg/kg, enquanto para AMB-7DC foi de 25 mg/kg de peso corporal.

TABELA 1. Toxicidade aguda do complexo AMB-D e AMB-7DC em camundongos BALB/c

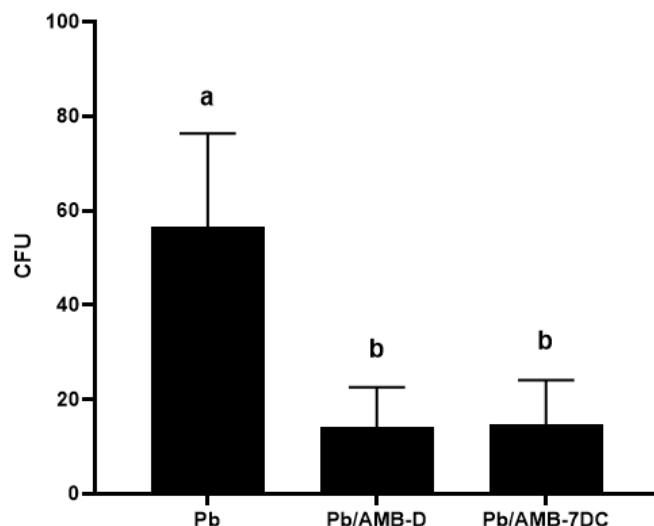
TABELA 1. Toxicidade aguda do complexo AMB-D e AMB-7DC em camundongos BALB/c										
Droga	Dose (mg)	Nº animais	Distribuição de morte							Porcentagem sobrevivência (%)
			Hora 1	Dias 1 2		Dias 3 7				
AMB-D	2.0	5	0	0	0	0	0		100	
	4.0*	5	0	0	0	0	0		100	
	8.0	5	1	3	-	-	-		20	
AMB-7DC	8.0	5	0	0	0	0	0		100	
	25*	5	0	0	0	0	0		100	
	50	5	1	2	0	0	0		40	

\* DMT, dose maximal tolerada. AMB-D=Fungizone, complexoAMD-7DC Anfotericina B-7-dehidrocolesterol

### 3.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS DROGAS AMB-D E AMB-7DC NA PCM EXPERIMENTAL

Para avaliar o efeito das drogas na PCM, utilizou-se como parâmetro o número de unidades formadoras de colônia (CFU) no pulmão de camundongos infectados e tratados com AMB-D ou AMB-7DC, além de um grupo controle inoculado com PBS estéril. As frações pulmonares (0,2 g de tecido/ml) de todos os grupos foram homogeneizadas, semeadas em meio de cultura ágar BHI e incubadas a 37°C por 14 dias. As CFUs foram contadas e os resultados expressos como CFUs por mg de tecido. No grupo controle, não houve crescimento fúngico. Nos grupos tratados, apenas duas placas apresentaram crescimento zero (uma no grupo AMB-7DC1 e outra no grupo AMB-7DC). Nos demais grupos, foram encontrados fungos viáveis, indicando que não houve erradicação completa do fungo. A análise estatística utilizando o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, seguido de ANOVA unidirecional e teste de comparações múltiplas de Tukey, revelou diferença significativa entre o grupo infectado e os grupos tratados ( $p < 0,05$ ), mas não houve diferença significativa entre os grupos tratados ( $p > 0,05$ ) (Figura 2).

**Figura 2** - Unidade formadora de colônia de *P. brasiliensis* (CFU) nos pulmões de grupos de camundongos infectados com *P. brasiliensis* (Pb), infectados com *P. brasiliensis* e tratados com AMB-D (Pb/AMB-D) e infectados com *P. brasiliensis* e tratados com AMB-7DC (Pb/AMB-7DC). Os resultados são expressos como o número de CFUs viáveis de *P. brasiliensis* por mg de tecido após 14 dias de incubação em meio ágar BHI.



#### 4 DISCUSSÃO

Os fungos, por serem organismos eucarióticos como os seres humanos, apresentam semelhanças fisiológicas e bioquímicas que impõem limitações à terapia medicamentosa. A anfotericina B (AMB), o primeiro antifúngico comercialmente significativo, está disponível há mais de 60 anos e possui o mais amplo espectro de ação entre os antifúngicos, sendo especialmente indicada para infecções fúngicas invasivas. Sua atividade abrange fungos como *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Sporothrix schenckii*, *Candida* spp., *Aspergillus fumigatus*, além de protozoários como *Leishmania donovani* e *Leishmania brasiliensis* (GALLIS et al., 1990; GALLIS et al., 1995; DUPONT, 2002).

Entretanto, a AMB apresenta toxicidade significativa, exigindo cuidados rigorosos na aplicação clínica (DUPONT, 2002; CHAPMAN et al., 2008, LOUÇÃO et al., 2018). Mas com o aumento dos casos de pacientes imunocomprometidos e da carga crescente de infecções fúngicas sistêmicas, a AMB convencional tem sido amplamente utilizada devido ao seu amplo espectro de ação. Para reduzir seus efeitos colaterais, diversos novos agentes antifúngicos derivados da AMB foram desenvolvidos nos últimos anos (PATRICK & SHALAL 2009).

Sabe-se que as formulações lipídicas da AMB mantiveram ou melhoraram significativamente o índice terapêutico (GALLIS, 1996; DUPONT, 2002; DILLON, 1986, PATRICK & SHALAL 2009). No entanto, seu uso clínico ainda é limitado devido ao alto custo, restringindo o acesso para pacientes que dependem do sistema público de saúde. Além disso, há relatos de anafilaxia após a administração de AmBisome em pacientes sem histórico de alergia à AMB-D (LAING et al., 1994).



Diante desse cenário, uma nova formulação, a AMB-7DC, surge como uma alternativa promissora para estudo, visando estabelecer uma dosagem segura e eficaz para o tratamento de diferentes patologias. Além disso, busca-se avaliar sua adequação para pacientes imunocomprometidos, que representam a principal indicação da AMB-D.

Neste estudo, conforme esperado, a AMB-7DC apresentou menor toxicidade em comparação à AMB-D, tanto em testes *in vitro* quanto *in vivo*. Esses resultados tornam-se ainda mais relevantes ao considerar que a AMB-7DC é hidrossolúvel e termicamente mais estável do que a AMB convencional (UNO et al., 2001). Essa característica permite seu aquecimento, reduzindo os cuidados necessários para transporte e armazenamento. A menor toxicidade da AMB-7DC pode possibilitar o uso de doses mais elevadas em estudos *in vivo*, prolongando a circulação da droga, favorecendo maior acúmulo nos tecidos afetados e estendendo o tempo de tratamento, o que demanda investigações adicionais.

A AMB-7DC demonstrou atividade antifúngica contra *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. brucei*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. guilliermondii* e *Cryptococcus neoformans* (UNO et al., 2001). No presente trabalho, evidenciamos que sua atividade antifúngica também se mantém contra *P. brasiliensis*, conforme demonstrado pela análise da contagem de unidades formadoras de colônia (CFU) nos pulmões de camundongos infectados.

Nas condições deste estudo, não foi possível erradicar *P. brasiliensis* (Pb18), uma cepa altamente virulenta (BURGER et al., 1996) nas condições do experimento. Dessa forma, investigações com períodos de tratamento mais prolongados seriam pertinentes. Vale destacar que, mesmo na PCM humana, a AMB é utilizada como terapia de ataque nos casos graves, sem o objetivo inicial de erradicação do fungo, mas sim para promover a recuperação da imunidade celular, permitindo posteriormente a transição para um tratamento de manutenção prolongado com outra medicação (MACKINNON, 1958; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

## 5 CONCLUSÃO

Com base nesses achados preliminares, concluímos que a AMB-7DC mantém sua atividade antifúngica contra *P. brasiliensis* e apresenta menor toxicidade em comparação à AMB-D, com vantagem de ser mais termoestável. Assim, esse complexo demonstra potencial para o tratamento da PCM, sendo necessários estudos adicionais para uma avaliação mais aprofundada.



## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da UEL e à Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- ASSOLINI, J. P. et al. Distinct pattern of *Paracoccidioides lutzii*, *P. restrepiensis* and *P. americana* antigens recognized by IgE in human paracoccidioidomycosis. *Current Microbiology*, v. 78, n. 7, p. 2608-2614, jul. 2021.
- BERNARD, G.; NEUGS, C. P.; GRYSCHKE, R. C. B.; DUARTE, J. S. Severe juvenile type paracoccidioidomycosis in an adult. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, v. 33, n. 1, p. 67-71, 1995.
- BENARD, G. et al. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. *Journal of Infectious Diseases*, v. 175, p. 1263-1267, 1997.
- BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 6, p. 89-117, 1993.
- CAMPOS, E. P. et al. Clinical and serologic features of 47 patients with paracoccidioidomycosis treated by amphotericin B. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 26, n. 4, p. 212-217, 1984.
- CEZAR-DOS-SANTOS, F. et al. Unraveling the susceptibility of paracoccidioidomycosis: insights towards the pathogen-immune interplay and immunogenetics. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 86, p. 104586, 2020.
- CHAPMAN, S. W.; SULLIVAN, D. C.; CLEARY, J. D. In search of the holy grail of antifungal therapy. *Transactions of the American Clinical Climatological Association*, v. 119, p. 197-216, 2008.
- CHU, P.; SADULLAH, S. The current role of amphotericin B lipid complex in managing systemic fungal infections. *Current Medical Research and Opinion*, v. 25, n. 12, p. 3011-3020, dez. 2009. DOI: 10.1185/03007990903379077.
- DAS, P. C. et al. Reversible ototoxicity: a rare adverse reaction of liposomal amphotericin-B used for the treatment of antimony-resistant visceral leishmaniasis in an elderly male. *Clinical Medicine Insights: Case Reports*, v. 7, p. 63-66, 2014. DOI: 10.4137/CCRep.15111.
- DILLON, N. L. et al. Delayed results of treatment of paracoccidioidomycosis with amphotericin B plus sulfamides versus amphotericin B alone. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 28, n. 4, p. 263-266, 1986.
- DUPONT, B. Overview of lipid formulations of amphotericin B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 49, supl. S1, p. 31-36, 2002.
- FREITAS-DA-SILVA, G.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Antigenemia in paracoccidioidomycosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 30, n. 2, p. 381-385, 1992.
- GALLIS, H. A. Amphotericin B: a commentary on its role as an antifungal agent and as a comparative agent in clinical trials. *Clinical Infectious Diseases*, v. 22, supl. 2, p. S145-S147, 1996.

GALLIS, H. A.; DREW, R. H.; PICKARD, W. W. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Reviews of Infectious Diseases*, v. 12, p. 308-329, 1990.

GOLDANI, L. Z.; SUGAR, A. M. Paracoccidioidomycosis and AIDS: an overview. *Clinical Infectious Diseases*, v. 21, p. 1275-1281, 1995.

GOMEZ, B. L. et al. Use of monoclonal antibody in diagnosis of paracoccidioidomycosis: new strategies for detection of circulating antigens. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 35, p. 3278-3283, 1997.

JANOFF, A. S. et al. Unusual lipid structures selectively reduce the toxicity of amphotericin B. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 85, n. 16, p. 6122-6126, 1988.

KAMINAMI, J. High molecular weight antigenic components of *Paracoccidioides brasiliensis*: partial characterization and implications for Th1 response. In: *DEVELOPING HEALTH: The Intersection of Science and Practice*, p. 1-15, 2024. DOI: 10.56238/sevened2024.039-009.

LAING, R. B. S. et al. Anaphylactic reactions to liposomal amphotericin. *Lancet*, v. 344, p. 682, 1994.

LACAZ, C. S.; SAMPAIO, S. A. P. Tratamento da blastomicose sul-americana com anfotericina B: resultados preliminares. *Revista Paulista de Medicina*, v. 52, p. 443-450, 1958.

LOUÇÃO, A. S. et al. Reações adversas a anfotericina B em adultos - Mineração de dados. *Revista Brasileira de Farmácia Hospitalar e Serviços de Saúde*, v. 9, n. 1, e091.006, 2018.

MACKINNON, J. E. Amphotericin B en la blastomicosis sudamericana experimental. *Anales de la Facultad de Medicina de Montevideo*, v. 43, p. 201-206, 1958.

MOEN, M. D.; LYSENG-WILLIAMSON, K. A.; SCOTT, L. J. Liposomal amphotericin B. *Drugs*, v. 69, p. 361-392, 2009. DOI: 10.2165/00003495-200969030-00010.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. 2. ed. Wayne, 2002. (Document M 27 A2, vol. 22, no. 15).

NETO, A. F. O.; PAIS, L. P. F.; ALVES, S. T. Utilização da anfotericina B no tratamento da paracoccidioidomicose. *Revista Unificada Alfenas*, v. 4, p. 71-74, 1998.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 50, p. 715-740, 2017.

SINGER-VERMES, L. M.; CIAVAGLIA, M. C.; KASHINO, S. S.; BURGUER, E.; CALICH, V. L. G. The source of the growth-promoting factor(s) affects the plating efficiency of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, v. 30, p. 261-264, 1992.

TEIXEIRA, M. M.; THEODORO, R. C.; DE CARVALHO, M. J. A.; FERNANDES, L.; PAES, H. C.; HAHN, R. C. et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 52, n. 2, p. 273-283, 2009.

UNO, J.; YARITA, K.; KAMEI, K.; MIKAMI, Y.; TERADA, Y. Study of antimycotic action and a side effect of an amphotericin B-7-dehydrocholesterol complex. In: 12th MYCOSES FORUM "Early Presumptive Therapy", 2001, Tokyo, Japan. Abstract p. 45.