

**FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**ESTUDO CLÍNICO E LABORATORIAL DE CONTROLE DE
CURA DE PACIENTES SUBMETIDOS A TRATAMENTO PARA
PARACOCCIDIOIDOMICOSE ATENDIDOS NO CENTRO DE
TREINAMENTO E REFERÊNCIA EM DOENÇAS INFECCIOSAS
E PARASITÁRIAS DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

LÍLIAN DA SILVA SANTOS

Belo Horizonte, Minas Gerais

Brasil

2013

**FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**ESTUDO CLÍNICO E LABORATORIAL DE CONTROLE DE
CURA DE PACIENTES SUBMETIDOS A TRATAMENTO PARA
PARACOCCIDIOIDOMICOSE ATENDIDOS NO CENTRO DE
TREINAMENTO E REFERÊNCIA EM DOENÇAS INFECCIOSAS
E PARASITÁRIAS DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

LILIAN DA SILVA SANTOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ênio Roberto Pietra Pedroso
Co-orientador: Prof. Dr. Alfredo Miranda de Góes

**Belo Horizonte
2013**

S237e Santos, LÍlian da Silva.
Estudo clínico e laboratorial de controle de cura de pacientes submetidos a tratamento para Paracoccidiodomicose atendidos no centro de treinamento e referência em doenças infecciosas e parasitárias do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais [manuscrito]. / Lílian da Silva Santos. - - Belo Horizonte: 2013. 156f.: il.
Orientador: Ênio Roberto Pietra Pedroso.
Co-Orientador: Alfredo Miranda de Goés.
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.
1. Paracoccidiodomicose/prevenção & controle. 2. Marcadores Biológicos. 3. Receptores do Fator de Necrose Tumoral. 4. Quimiocinas. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Pedroso, Ênio Roberto Pietra. II. Goés, Alfredo Miranda de. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título. NLM: WC 460

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Clélio Campolina Diniz

Vice-Reitora: Prof^ª. Rocksane de Carvalho Norton

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof. Ricardo Santiago Gomez

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Renato de Lima dos Santos

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Francisco José Penna

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

Subcoordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof^ª. Tereza Cristina de Abreu Ferrari

Coordenador do Departamento de Clínica Médica: Prof^ª. Anelise Impelziere Nogueira

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical: Prof. Vandack Alencar Nobre Júnior.

Subcoordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical: Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical:

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

Prof. Vandack Alencar Nobre Júnior

Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Prof^ª. Denise Utsch Gonçalves

Representante discente - Paula Souza Lage Carvalho

“Quem sabe que o tempo está fugindo descobre, subitamente, a beleza única do momento que nunca mais será...”

Rubem Alves

A meus pais, que representam tudo
na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois sentindo sua presença diariamente tenho a certeza de que podemos fazer a diferença neste planeta. Deus para mim é amor, serenidade, força, trabalho, dedicação, amizade, perdão, solidariedade... enfim, é vida que podemos compartilhar com todos ao nosso redor.

Ao Professor Ênio, que me acolheu sem hesitar, que me aceitou em seu grupo de trabalho e que propiciou momentos de aprendizado jamais imaginados por mim. A este ser humano que transborda sensibilidade, amor, dedicação, carinho, atenção, cuidado e a este profissional que agrega competência e conhecimento, dedico este trabalho.

Aos meus queridos companheiros do Ambulatório de Paracoccidiodomicose. Agradeço a TODOS os alunos de iniciação científica que nesses quatro anos me ajudaram a transformar um projeto teórico em resultados objetivos. As minhas segundas-feiras foram muito mais prazerosas com a presença de todos vocês. Para mim, era um estímulo saber que toda segunda-feira eu escutaria os comentários e as risadas do Samuel e as fantásticas ideias e conclusões do Weverton. Foi uma alegria conviver com o bom humor e inteligência da Val; com a delicadeza da Camila; com a dedicação da Carol, com a sensibilidade do Alexandre e com a atenção e curiosidade do Lucas e do Vítor. TODOS vocês são pessoas muito especiais para mim.

Ao Professor Alfredo Miranda de Góes pela calorosa acolhida que recebi em seu laboratório desde o primeiro dia. Tenho muito orgulho de fazer parte de uma equipe coordenada por uma pessoa extraordinária, sensível, delicada, carinhosa e muito competente.

A todos os queridos amigos do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular que com muito carinho guardo em meu coração. Para mim, é e sempre foi um prazer trabalhar entre pessoas tão alegres e amáveis. Além disso, os integrantes do LICM são um sucesso! Haja artigo publicado, e de altíssima qualidade!!!

À Betinha, que sempre demonstrou disponibilidade para ajudar no que fosse necessário, com paciência e muito carinho. Além do mais, os doces da Betinha são imbatíveis! Saudade dos brigadeiros...

A todos os pacientes atendidos no ambulatório de Paracoccidiodomicose que possibilitaram a realização deste trabalho. Este estudo foi pensado e desenvolvido para eles. Sinto-me muito privilegiada pelo dom da vida, por tudo que tenho e que sou. Sinto-me também na obrigação de tentar fazer algo, mesmo que seja mínimo para e por aqueles negligenciados e desfavorecidos. Espero ter contribuído de alguma forma.

À Pós-graduação em Infectologia e Medicina Tropical, representada pelo seu coordenador e por seus funcionários, que me apoiou durante todo o período da realização deste trabalho.

A todos os funcionários do Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias – Anexo Orestes Diniz.

À CAPES, de cuja agência sou bolsista, pelo auxílio financeiro concedido durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

À minha família pelo apoio incondicional.

Ao Pedro pela presença constante, pelo apoio em momentos difíceis, pelas sugestões em temas complexos, pela confiança, pela partilha, pelo carinho, pelo amor...

A todos, sem exceção, que de alguma forma me ajudaram nos últimos quatro anos para que este trabalho fosse realizado.

RESUMO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, que afeta predominantemente a América Latina, com elevada prevalência no Brasil. O momento ideal para interrupção do tratamento e o controle de cura da doença constituem questões ainda não bem estabelecidas e que muito influenciam no manejo de pacientes com PCM. O objetivo deste estudo foi avaliar pacientes tratados para PCM, e considerados clinicamente curados, para verificar o uso de marcadores sorológicos no controle de cura da doença. De Março de 2009 a Junho de 2012, foram avaliados 26 pacientes no Ambulatório de PCM do Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Durante o tratamento e após sua interrupção, semestralmente até completar 42 meses de acompanhamento, os pacientes foram submetidos à avaliação clínica e coleta de sangue. A análise sorológica foi realizada por meio da técnica de ELISA para a dosagem dos níveis de IgG anti-*P. brasiliensis* utilizando Mexo e rPb27 como antígenos, sTNF-RI, sTNF-RII, CXCL9, CCL3, CCL11 e CCL24. Os 26 pacientes foram classificados em nove grupos: 19 pacientes sob tratamento (dt); 22 pacientes no dia da interrupção do tratamento (t0); 22 pacientes seis meses após interrupção do tratamento (t6); 18 pacientes após 12 meses de interrupção (t12); 13 pacientes após 18 meses de interrupção (t18); nove pacientes após 24 meses de interrupção (t24); seis pacientes após 30 meses de interrupção (t30); cinco pacientes após 36 meses de interrupção (t36) e três pacientes após 42 meses de interrupção do tratamento (t42). Os marcadores sorológicos foram testados em 10 indivíduos saudáveis que constituíram o grupo controle negativo (NC). Os níveis séricos de IgG, sTNF-RI e sTNF-RII permaneceram elevados durante todo o período de acompanhamento, sendo possível distinguir em praticamente todos os momentos os pacientes tratados para PCM do grupo NC. Na análise de CCL3, 31,6% dos pacientes apresentaram concentrações séricas dessa quimiocina abaixo do valor do *cut-off* durante o tratamento e 45,5% no momento de sua interrupção, com uma tendência na queda de tais valores ao longo do tempo. 95% dos pacientes apresentaram concentrações de CCL11 abaixo do *cut-off* durante o tratamento, com elevação dos valores a partir de sua interrupção. 42% dos pacientes apresentaram concentrações de CCL24 abaixo do *cut-off*, sem grandes alterações ao longo do período avaliado. As concentrações de CXCL9 permaneceram baixas ao longo de todo o período de controle de cura, na maioria dos pacientes. Entretanto, durante o tratamento, as concentrações de CXCL9 detectadas também foram baixas, não havendo associação entre doença ativa e altas concentrações desta quimiocina. Estes resultados demonstram a insegurança no uso de tais marcadores para acompanhamento de pacientes em controle de cura, uma vez que seus níveis foram variáveis, não havendo associação direta com cura clínica.

Palavras-chave: paracoccidioidomicose; controle de cura; marcadores sorológicos; receptores solúveis de TNF- α ; quimiocinas.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, which affects predominantly Latin America, with high prevalence in Brazil. The right moment to interrupt the treatment and the control of cure are not well established questions that influence the management of patients. This study aimed to evaluate patients treated for PCM, and considered clinically cured, to verify the applicability of serological markers in the control of cure of the disease. From March 2009 to June 2012, 26 patients were evaluated at the Ambulatory of PCM of the Center of Reference and Training in Infectious and Parasitic Diseases of the General Hospital of the Federal University of Minas Gerais. Patients were clinically evaluated and blood samples were collected during the treatment and after its interruption, until 42 months of follow-up. The serological analysis was performed by ELISA, to measure the levels of IgG anti-*P. brasiliensis* using Mexo and rPb27 as antigens, sTNF-RI, sTNF-RII, CXCL9, CCL3, CCL11 and CCL24. The 26 patients were classified in nine groups: 19 patients during treatment (dt); 22 patients at the day of interruption of treatment (t0); 22 patients at six months after interruption of treatment (t6); 18 patients at 12 months after interruption (t12); 13 patients at 18 months after interruption (t18); nine patients at 24 months after interruption (t24); six patients at 30 months after interruption (t30); five patients at 36 months after interruption (t36) and three patients at 42 months after interruption of treatment (t42). The serological markers were tested in 10 healthy individuals that formed a negative control group (NC). The serological levels of IgG, sTNF-RI and sTNF-RII remained high during all the period of follow-up, what made possible the segregation of patients treated for PCM from the NC group in practically all the time of the study. In the analysis of CCL3, 31,6% of patients presented serological concentrations below the cut-off point during the treatment and 45,5% at the moment of its interruption, with a tendency of decreasing in the values along the time. 95% of patients presented concentrations of CCL11 below the cut-off point during the treatment, with an increase in these values from the moment of its interruption. 42% of patients presented concentrations of CCL24 below the cut-off point, without relevant changes over the time. The concentrations of CXCL9 remained low during the control of cure, for the majority of patients. Although, during the treatment, the concentrations of CXCL9 were also low, and there was not association between active disease and high concentrations of this chemokine. These results show the insecurity to use those markers in the follow-up of patients in control of cure, since, its levels were variable, and it was not found a clear association with clinical cure.

Key-words: paracoccidioidomycosis; control of cure; serological markers; soluble receptors of TNF- α ; chemokines.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS – Acquired Immune Deficiency Syndrome

AUC – Area Under the Curve

°C – Grau Celsius

cAMP – Adenosina Monofosfato Cíclico

CCL – Quimiocina com duas cisteínas consecutivas na extremidade N-terminal

Células NK – Células *Natural Killer*

CIE – Contraimunoeletroforese

COEP-UFMG – Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais

CTR-DIP – Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias

CXCL – Quimiocina em que um outro aminoácido se situa entre as duas cisteínas na extremidade N-terminal

ELISA – Ensaio imunoenzimático (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

GM-CSF – Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (*Granulocyte-macrophage colony stimulating factor*)

gp43 – Glicoproteína de 43 kDa

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana (*Human Immunodeficiency Virus*)

IB – Immunoblot

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

ID – Imunodifusão Dupla

IFI – Imunofluorescência Indireta

IFN γ – Interferon gama

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

kDa – Kilodalton

LICM – Laboratório de Imunologia Celular e Molecular

Mol L⁻¹ – Mol por litro

µg – Micrograma

µL – Microlitro

mL – Mililitro

mm – milímetro

N – Normal

NC – *Negative Control*

nm – Nanômetro

OD – *Optical Density*

Pb – *Paracoccidioides brasiliensis*

PBS – Solução salina tamponada (*Phosphate Buffered Saline*)

PCM – Paracoccidioidomicose

PCR – Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

pg/mL – Picograma por mililitro

pH – Potencial hidrogeniônico

RNA_m – RNA mensageiro

ROC – *Receiver Operator Characteristic*

rPb27 – Antígeno recombinante Pb27 (*recombinant Pb27 antigen*)

rPb40 – Antígeno recombinante Pb40 (*recombinant Pb40 antigen*)

rpm – Rotações por minuto

sTNF-R – Receptor solúvel de TNFα (*Soluble TNF-α receptor*)

TGFβ – Fator de crescimento tumoral beta (*Tumor Growth Factor beta*)

Th1 – Células T auxiliares do tipo 1 (*T helper cells type 1*)

Th2 – Células T auxiliares do tipo 2 (*T helper cells type 2*)

TNF α – Fator de necrose tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor alpha*)

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

YPD – Meio composto de extrato de levedura (*yeast extract*), peptona de carne e D-glicose, utilizado para o cultivo de células leveduriformes de *P. brasiliensis*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas miceliais (A) e leveduriformes (B) do fungo *P. brasiliensis*. Fonte: Shikanai-Yasuda *et al.*, 200619

Figura 2 - Distribuição geográfica dos casos de PCM nas Américas Central e do Sul. Fonte: Shikanai-Yasuda *et al.*, 200630

Figure 1 - Serum levels of total IgG measure by an in house ELISA using Mexo and rPb27 as antigens in the sera of 19 patients with PCM during the treatment (dt); in 22 patients at the time of interruption of treatment (t0); in 22 patients at six months (t6); in 18 patients at 12 months (t12); in 13 patients at 18 months (t18); in nine patients at 24 months (t24); in six patients at 30 months (t30); in five patients at 36 months (t36); in three patients at 42 months after interruption of treatment (t42) and in 10 healthy individuals (NC). Each dot represents the optical density of a single patient and the horizontal line the median of the group. The cut-off point is represented by the dotted line. Data marked by 'a' were significantly different ($p < 0.05$) from NC group81

Figure 2 - Serum concentrations of sTNF-RI and sTNF-RII measure by ELISA in the sera of 19 patients with PCM during the treatment (dt); in 22 patients at the time of interruption of treatment (t0); in 22 patients at six months (t6); in 18 patients at 12 months (t12); in 13 patients at 18 months (t18); in nine patients at 24 months (t24); in six patients at 30 months (t30); in five patients at 36 months (t36); in three patients at 42 months after interruption of treatment (t42) and in 10 healthy individuals (NC). Each dot represents the concentration of a single patient and the horizontal line the median of the group. The cut-off point is represented by the dotted line. Data marked by 'a' were significantly different ($p < 0.05$) from NC group; data marked by 'b' were significantly different ($p < 0.05$) from dt group83

Figure 3 - Serum concentrations of CXCL9, CCL3, CCL11 and CCL24 measure by ELISA in the sera of 19 patients with PCM during the treatment (dt); in 22 patients at the time of interruption of treatment (t0); in 22 patients at six months (t6); in 18 patients at 12 months (t12); in 13 patients at 18 months (t18); in nine patients at 24 months (t24);

in six patients at 30 months (t30); in five patients at 36 months (t36); in three patients at 42 months after interruption of treatment (t42) and in 10 healthy individuals (NC). Each dot represents the concentration of a single patient and the horizontal line the median of the group. The cut-off point is represented by the dotted line. Data marked by 'a' were significantly different ($p < 0.05$) from NC group; data marked by 'b' were significantly different ($p < 0.05$) from dt group85

LISTA DE TABELAS

Table 1 - Clinical form of patients treated for paracoccidioidomycosis and considered cured	79
Table 2 - Area under the ROC curve (AUC), <i>p</i> value and cut-off values of serological markers analyzed in patients treated for paracoccidioidomycosis and considered cured	81
Tabela 1 - Distribuição por faixa etária dos pacientes sob controle de cura para paracoccidioidomicose avaliados	97
Tabela 2 - Procedência dos pacientes sob controle de cura para paracoccidioidomicose avaliados	98
Tabela 3 - Ocupação dos pacientes sob controle de cura para paracoccidioidomicose avaliados	98
Tabela 4 - Localização das lesões de paracoccidioidomicose apresentadas pelos pacientes sob controle de cura quando a doença estava ativa	99

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	Histórico	17
2.2	Agente etiológico da PCM	18
2.2.1	Fatores de virulência do <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	24
2.2.2	Os antígenos Mexo e rPb27	27
2.2.2.1	O antígeno Mexo	27
2.2.2.2	O antígeno rPb27	28
2.3	Epidemiologia da PCM	29
2.4	Modo de infecção	33
2.5	Formas clínicas	33
2.6	Diagnóstico	35
2.7	Imunologia da PCM	40
2.7.1	Imunidade Inata	41
2.7.2	Imunidade Humoral	43
2.7.3	Imunidade Celular	43
2.7.4	As quimiocinas na PCM	46
2.7.5	Os receptores solúveis de TNF- α (sTNF-R) na PCM	51
2.8	Tratamento da PCM	54
2.9	Controle de cura e profilaxia da PCM	58
3	JUSTIFICATIVA	61
4	OBJETIVOS	62
4.1	Objetivo geral	62
4.2	Objetivos específicos	62

5	CASUÍSTIA E METODOLOGIA	63
5.1	População estudada	64
5.1.2	Critérios de inclusão	65
5.1.3	Critérios de exclusão	65
5.2	Avaliação sorológica dos pacientes	66
5.2.1	Obtenção e preparação das amostras de sangue	66
5.2.2	Preparação e obtenção dos antígenos Mexo e rPb27	66
5.2.3	Dosagem sérica dos marcadores sorológicos avaliados	67
5.2.3.1	Dosagem de IgG anti- <i>P. brasiliensis</i> nas amostras de soro utilizando Mexo e rPb27 como antígenos	68
5.2.3.2	Dosagem de sTNF-RI, sTNF-RII, CCL3, CXCL9, CCL11, CCL24 nas amostras de soro	69
5.3	Análise estatística dos dados	70
6	ARTIGO	72
7	RESULTADOS NÃO APRESENTADOS NO ARTIGO	97
7.1	Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes avaliados	97
7.2	Análise estatística associando dados epidemiológicos e sorológicos	99
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	102
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
10	APÊNDICES	130
11	ANEXOS	137

1 INTRODUÇÃO

Este trabalho será apresentado em concordância com as novas normas e proposições sobre escrita de teses do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. De acordo com a Resolução nº 01/2011, os tópicos ‘Revisão da literatura, Justificativa, Casuística e Metodologia e Objetivos’ serão descritos detalhadamente, com um formato de tese de doutoramento tradicional. Os tópicos ‘Resultados, Discussão e Conclusões’ serão descritos em formato de artigo, submetido a uma revista científica indexada, classificada como Qualis A1 ou A2. Os demais resultados que não forem relatados no artigo serão descritos no tópico ‘Resultados não apresentados no artigo’, sendo discutidos no tópico ‘Considerações finais’.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico

A paracoccidiodomicose (PCM) é também denominada doença de Lutz-Splendore-Almeida, Blastomicose Sul-Americana, Blastomicose Brasileira, Granulomatose Paracoccidióidica e Granulomatose Blastomicóide Tropical. Sua descrição ocorreu pela primeira vez em 1908, na cidade de São Paulo, quando o médico brasileiro Adolpho Lutz identificou um microrganismo desconhecido em pacientes que apresentavam lesões de mucosa oral com característica vegetante (Lutz, 1908). Em 1912, trabalhando no Brasil, o médico italiano Alfonso Splendore descreveu novos casos da doença em pacientes da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, e após

minucioso estudo morfológico do patógeno, sugeriu o nome *Zymonema braziliense* para o agente causador daquela doença (Splendore, 1912). Em 1930, em seus estudos, Floriano Paulo de Almeida conseguiu distinguir o agente causador da então doença desconhecida do *Coccidioides immitis*, através da diferenciação das dimensões dos dois patógenos, dos modos de reprodução e do cultivo. Foi então proposto por ele o nome *Paracoccidioides brasiliensis* para o agente etiológico da PCM (Almeida, 1930; 1946).

O termo PCM foi instituído e reconhecido oficialmente pela Organização Mundial da Saúde para denominação da doença em 1971, na ocasião da reunião de micologistas das Américas realizada em Medellín, Colômbia, sendo utilizado até os dias atuais para designação da doença (Marques, 1998; Valle *et al.*, 2001).

2.2 Agente etiológico da PCM

O agente etiológico da PCM é o *Paracoccidioides brasiliensis*, fungo termo-dimórfico classificado no filo Ascomycota, ordem Onygenale e família Onygenaceae (Almeida *et al.*, 2003). Sua classificação como fungo termo-dimórfico provém da capacidade que este patógeno possui de se apresentar sob duas formas distintas quando submetido à mudança de temperatura. A forma micelial, denominada de infectante, desenvolve-se na faixa de temperatura de 17-28°C como colônias lisas, posteriormente cobertas por micélios de cor branca a bronze, que produzem um aspecto de ‘pelos de ratos brancos’. Os filamentos de micélio possuem finas hifas septadas com esporos terminais ou intercalares (Fig 1) (Patino *et al.*, 1984; Brummer *et al.*, 1993; Garcia *et al.*, 1993; Marques, 1998).

A forma de levedura é a encontrada em tecidos e exsudatos de hospedeiros, e em meio de cultura na faixa de temperatura de 35-37°C. Nos hospedeiros, as leveduras podem permanecer restritas a um sítio específico ou disseminar-se para diferentes

órgãos, dependendo dentre outros fatores, da resposta do hospedeiro à infecção. As colônias cultivadas em meio de cultura podem apresentar aspecto céreo, rugoso ou cerebriforme, com coloração que varia de creme a bronze. As leveduras, que podem apresentar ou não gemulação randômica simples ou múltipla, são observadas ao microscópio como estruturas ovóides, com tamanho de 5 a 25 μ m, com parede aparentemente dupla, espessa e birrefringente e citoplasma contendo vacúolos de lipídeos (Fig. 1) (Patino *et al.*, 1984; Brummer *et al.*, 1993; Garcia *et al.*, 1993; Marques, 1998; Ramos-e-Silva, 2004; de Almeida, 2005).

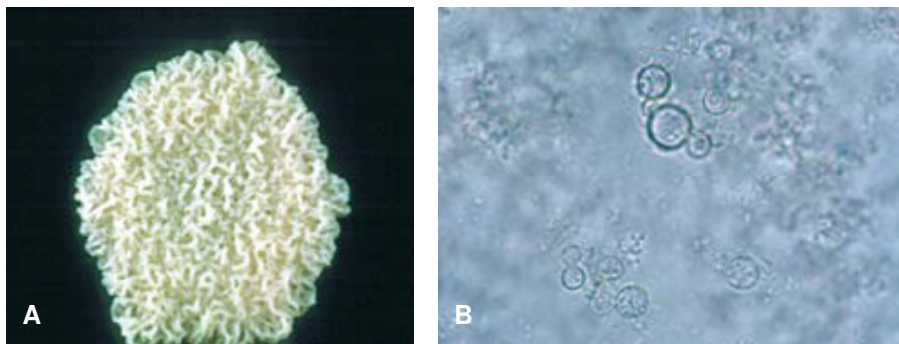


Figura 1 - Estruturas miceliais (A) e leveduriformes (B) do fungo *P. brasiliensis*. Fonte: Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006.

O *P. brasiliensis* apresenta parede celular composta por uma matriz de complexos proteína-polissacarídeo, caracteristicamente intercambiável, sofrendo mudanças de acordo com as condições ambientais em que se encontra. As formas de micélio e levedura possuem como polissacarídeo comum a quitina, entretanto, na forma micelial o carboidrato predominante é o β -1,3-glucana. Além disso, esta forma contém também em sua parede galactomananas. Já na forma de levedura, o carboidrato predominante é o α -1,3-glucana. Uma vez que tais carboidratos são fibrilares, a diferença na predominância destes no micélio e na levedura, associa-se à forma do

fungo (Kanetsuna *et al.*, 1972; San-Blas e San-Blas, 1977; Restrepo-Moreno, 1993). A diferença existente na estrutura da parede celular apresentada pelos micélios e pelas leveduras relaciona-se à atividade combinada de β -glucanases e dissulfeto redutases, que podem tornar mais frouxa a parede celular da forma de levedura formando ilhotas discretas de β -1,3-glucanas. Dessa maneira, a 37°C, ocorreria alta atividade das dissulfeto redutases e elevada síntese de quitina e de α -1,3-glucanas em relação às β -1,3-glucanas, resultando na formação de estruturas leveduriformes. A cerca de 22°C, a síntese de glucanases ocorreria em baixa velocidade e as enzimas dissulfeto redutase apresentariam baixa atividade, possibilitando a formação de longas fibrilas de β -1,3-glucanas, predominando assim a forma micelial (San-Blas, 1985).

A transformação de micélio para levedura envolve não apenas a modificação da composição e estrutura de carboidratos da parede celular. Essa transição é precedida por alterações como a super expressão de enzimas do metabolismo do enxofre que ocorre na forma de levedura, indicando que essa seja uma importante via no processo de diferenciação; a alta expressão do gene da enzima 4-hidroxifenil piruvatodesidrogenase (4-HPPD), a qual está relacionada ao catabolismo de aminoácidos aromáticos (a inibição dessa enzima por compostos específicos impede a diferenciação micélio-levedura *in vitro*) e o aumento nos níveis de cAMP, indicando que a mudança de forma envolve a ativação de vias de sinalização mediada por esse segundo mensageiro (San-Blas e Nino-Vega, 2008). Essa mudança de forma é reversível e não é vital para o ciclo de vida do fungo. Entretanto, a conversão para a forma de levedura parece ser requisito para a progressão da infecção (San-Blas e Nino-Vega, 2001; San-Blas e Nino-Vega, 2008).

Durante muitas décadas, o *P. brasiliensis* foi classificado como única entidade biológica com característica clonal, que apresentava exclusivamente reprodução

assexuada, apesar de evidências demonstrarem enorme variabilidade existente entre diferentes isolados do fungo. As diferenças nas características microscópicas dos distintos fenótipos do fungo, no seu comportamento e crescimento em meio de cultura, e na associação com formas clínicas da doença indicavam a existência de uma marcante diversidade genética (Macoris *et al.*, 2006). A existência de pelo menos três espécies filogenéticas distintas de *P. brasiliensis* foi demonstrada, sendo estas: S1 (38 isolados oriundos da Argentina, Brasil, Peru e Venezuela, e um isolado de pinguim australiano); PS2 (cinco isolados do Brasil e um da Venezuela) e PS3 (21 isolados da Colômbia). Evidências demonstram que os isolados S1 e PS2 parecem apresentar recombinação sexuada, enquanto PS3 apresenta reprodução clonal (Matute *et al.*, 2006). Nos últimos anos, um isolado do *P. brasiliensis* de origem brasileira, com predominância na região centro-oeste, especificamente nos estados de Goiás e Mato Grosso do Sul, denominado Pb01, vem sendo intensamente avaliado. Este isolado parece não apresentar similaridade com as espécies filogenéticas descritas anteriormente, sugerindo a proposição de que se trata de uma nova espécie dentro do gênero *Paracoccidioides*. Atualmente, sugere-se que as espécies com características do isolado Pb01 sejam classificadas como *Paracoccidioides lutzii*, em referência e homenagem a Adolpho Lutz (Teixeira *et al.*, 2009).

O exato habitat do *P. brasiliensis* e sua relação com o ambiente natural não são completamente conhecidos em decorrência da dificuldade de isolamento do fungo na natureza e em animais, e do longo e variado período de latência da doença. Presume-se que o fungo se comporte como saprobiótico na natureza, liberando esporos infectantes no solo, na água e em plantas à temperatura ambiente, multiplicando-se e propagando assim a espécie (Restrepo *et al.*, 1992; Barrozo *et al.*, 2009).

Uma possível hipótese para explicar a dificuldade no isolamento do fungo do solo e de animais potencialmente caracterizados como reservatórios da doença é o desconhecimento não apenas do habitat do *P. brasiliensis*, mas, sobretudo de como o fungo se comporta e sobrevive na natureza. De acordo com Conti Diaz (2007) o *P. brasiliensis* ocorreria normalmente na natureza em ambientes aquáticos e seria protegido e nutrido por animais deste meio como peixes e moluscos, não estando necessariamente se desenvolvendo e se propagando no solo durante todo o seu ciclo de vida. Para tornar-se infectante o fungo sairia desse microambiente e viveria em outros locais como no solo e em plantas durante um período de seu ciclo reprodutivo. Entretanto, essa teoria não foi totalmente explicada, permanecendo o comportamento e o exato habitat do *P. brasiliensis* ainda não completamente conhecidos e descritos.

O *P. brasiliensis* parece desenvolver-se com mais frequência em áreas de solo argilosos e com precipitação média anual de 1400mm (Bagagli *et al.*, 2008). Entretanto, Terçariole *et al.* (2007) verificaram que o fungo é capaz de se desenvolver tanto em solos argilosos como em arenosos desde que a taxa de umidade seja elevada. A maior incidência de PCM em áreas de solos argilosos pode estar associada não apenas ao tipo do solo, mas também ao fato deste ser mais utilizado na agricultura. O contato mais frequente de seres humanos com a terra durante a lida na lavoura propiciaria dessa forma maior probabilidade de infecção pelo *P. brasiliensis*. A escavação e revolvimento do solo parecem ser importantes para a produção de aerossóis do fungo e para propiciar a infecção. Em áreas indígenas da Amazônia onde o extrativismo é a atividade predominante, ainda não foram relatados casos de PCM. Entretanto, entre indígenas que praticam atividades agrícolas a doença já foi encontrada e é alta a reatividade à paracoccidioidina (Coimbra *et al.*, 1994). Na Argentina, onde não havia previamente relatos da infecção, foi detectada uma positividade de 11,4% no teste de

paracoccidioidina em trabalhadores envolvidos na construção de uma usina hidrelétrica (Mangiaterra *et al.*, 1999).

Características como altos índices pluviométricos, verões chuvosos, temperaturas anuais amenas, e solos menos ácidos também parecem estar associadas a áreas com maior prevalência da doença (Borelli, 1961; Chirife e Del Rio, 1965; Calle *et al.*, 2001; Bagagli *et al.*, 2003).

Raros e nem sempre reprodutíveis são os relatos de detecção e isolamento do fungo na natureza como os descritos em fezes de morcego (*Artibeus lituratus*), em pinguins (*Pygoscelis adeliae*), em tatus (*Dasypus novemcinctus*), em rações para cães e no solo (Shome, 1963; Grosse e Tamsitt, 1965; Naiff *et al.*, 1986; Ferreira *et al.*, 1990; Corredor *et al.*, 1999). Os relatos de isolamento do *P. brasiliensis* em tatus têm sido cada vez mais frequentes, o que parece decorrer da permissividade do sistema imune deste animal, e de sua baixa temperatura corpórea, que favoreceriam o desenvolvimento do fungo (Bagagli *et al.*, 1998; Silva-Vergara *et al.*, 2000; Hebel-Barbosa *et al.*, 2003; Richini-Pereira *et al.*, 2009). Esses achados reforçam a hipótese de que tatus possam ser um dos principais hospedeiros naturais do fungo (Richini-Pereira *et al.*, 2009). A detecção do fungo por meio de técnicas de biologia molecular em outros animais silvestres também tem sido descrita, sugerindo que a zoonose seja mais frequente do que até agora considerada (Richini-Pereira *et al.*, 2008).

Em animais domésticos, a ocorrência da doença ainda não está bem descrita, apesar de existirem relatos de positividade sorológica em formas assintomáticas da PCM. O primeiro relato de PCM doença ocorrida em cão foi descrito no Brasil em um animal adulto da raça *Doberman* que apresentava linfadenomegalia cervical. O diagnóstico foi confirmado por imunohistoquímica utilizando um anticorpo anti-gp43 e também por PCR (Ricci *et al.*, 2004). O segundo relato de caso natural de PCM em cão

foi descrito recentemente, com a confirmação do diagnóstico por meio de técnicas de imunohistoquímica e de histopatologia (De Farias *et al.*, 2011).

Dada a importância da doença do ponto de vista de saúde pública, mais estudos são necessários para elucidar questões ainda persistentes sobre o ciclo de vida do fungo na natureza, em animais e em seres humanos.

2.2.1 Fatores de virulência do *Paracoccidioides brasiliensis*

O *P. brasiliensis* possui alguns fatores de virulência que interferem diretamente em sua interação com o hospedeiro. Um fator que parece ter grande importância é a influência de hormônios femininos na adaptação e evolução do fungo. Experimentos *in vitro* demonstraram que o β -estradiol inibe ou retarda a transformação das estruturas miceliais em leveduriformes. Uma proteína de ligação ao estrógeno presente no citoplasma do *P. brasiliensis* possui alta afinidade pelo estradiol, ligando-se a ele e impedindo assim a adaptação do fungo nos tecidos do hospedeiro (Restrepo *et al.*, 1984). Sugere-se que essa proteína possa proteger as mulheres, tornando-as mais resistentes à PCM doença, justificando a menor proporção de mulheres adultas em idade reprodutiva doentes (Borges-Walmsley *et al.*, 2002), o que não ocorre com a faixa etária antes da menarca.

Em experimentos verificou-se que a melanização de células do *P. brasiliensis*, que ocorre naturalmente pela produção de melanina pelo fungo, parece contribuir para sua virulência uma vez que a suscetibilidade das células fúngicas melanizadas aos mecanismos de defesa do hospedeiro e às drogas antifúngicas é reduzida (Taborda *et al.*, 2008). As células do *P. brasiliensis*, quando melanizadas, são menos suscetíveis à fagocitose. A adição de anticorpos anti-melanina ao meio onde se encontra o fungo normaliza a fagocitose feita por macrófagos. As células fúngicas melanizadas parecem

ser também menos susceptíveis à fagocitose mediada pelo complemento e aos efeitos fungicidas de produtos derivados de oxigênio e nitrogênio. Além disso, verificou-se a ocorrência de menor sensibilidade das células melanizadas à anfotericina B e derivados azólicos (Silva *et al.*, 2006).

O polissacarídeo α -1,3-glucana predominante na forma de levedura do fungo é indicado como outro fator de virulência do *P. brasiliensis*. O cultivo por tempo prolongado de isolados virulentos do fungo parece reduzir a concentração de α -1,3-glucana na parede das células fúngicas, diminuindo a espessura da parede celular, e reduzindo a virulência das células. Sugere-se que o α -1,3-glucana proteja o fungo do ataque da resposta imune do hospedeiro, formando um invólucro protetor, que não é atingido pelos fagócitos, porque estes não possuem α -glucanases. Já o polissacarídeo β -1,3-glucana, é potente indutor da resposta inflamatória, e torna o reconhecimento do fungo pelo sistema imune do hospedeiro mais fácil. Este polissacarídeo favorece o estabelecimento da resposta inflamatória contra o fungo, com o objetivo de sua eliminação do organismo (Hogan *et al.*, 1996; Borges-Walmsley *et al.*, 2002).

A glicoproteína de 43kDa (gp43) parece ser um dos mais importantes fatores de virulência do *P. brasiliensis*. A aderência de células fúngicas às células epiteliais do hospedeiro é substancialmente reduzida na presença de soro anti-gp43, indicando que a gp43 age como uma adesina. A gp43 liga-se à laminina da membrana basal da matriz extracelular de tecidos de mamíferos e, uma vez que a levedura está coberta pela laminina ela aumenta a habilidade de invadir e destruir o tecido infectado. A gp43, portanto, agiria na superfície de células de leveduras como um receptor para laminina (Hanna *et al.*, 2000; Mendes-Giannini *et al.*, 2000). Além disso, o *P. brasiliensis* produz uma serino-tiol protease extracelular que pode clivar a laminina e outros componentes da matriz extracelular, entretanto, a gp43 é resistente à clivagem por esta protease

(Puccia *et al.*, 1998). Outros componentes da matriz extracelular, como a fibronectinase colágeno, têm se mostrado alvos para adesão do *P. brasiliensis* (Mendes-Giannini *et al.*, 2000; Borges-Walmsley *et al.*, 2002).

As estruturas leveduriformes e miceliais necessitam de quantidade significativa de oxigênio para seu crescimento. Entretanto, as células jovens de leveduras podem se adaptar gradualmente à redução de oxigênio e entrar em estágio de repouso. As células em repouso podem se reativar metabolicamente quando submetidas às condições adequadas de oxigenação. Esta capacidade de adaptação do fungo poderia explicar o prolongado período de latência da PCM (Restrepo *et al.*, 1981).

A capacidade de sobreviver e se replicar a 37° C é um fator de virulência para fungos patogênicos. A termo-tolerância está associada à síntese de proteínas de choque térmico, já descritas no *P. brasiliensis*. A produção destas proteínas parece exercer importante papel não só na termo-adaptação, mas também na transição da forma de micélio para levedura (Goldani *et al.*, 1994).

A infecção por *P. brasiliensis* induz a síntese de leucotrienos, importantes mediadores da reação inflamatória aguda, que afetam a recuperação fúngica, o influxo celular e a síntese de citocinas em camundongos susceptíveis. A inibição dos leucotrienos *in vitro* demonstra que a ativação da imunidade inata pode resultar no aumento da ingestão e sobrevivência das leveduras, levando ao desenvolvimento de doença mais grave, uma vez que, inibidores de leucotrienos reduzem significativamente a recuperação de leveduras de *P. brasiliensis* de macrófagos (Calich *et al.*, 2008).

2.2.2 Os antígenos Mexo e rPb27

2.2.2.1 O antígeno Mexo

O antígeno Mexo, formado por uma proteína de 28kDa composta por frações antigênicas extracelulares e membranares do fungo *P. brasiliensis*, apresenta excelentes resultados para a aplicação no diagnóstico sorológico da PCM. Reis *et al.* (2005) aplicaram o antígeno Mexo na dosagem sérica de anticorpos IgG por meio da técnica de ELISA, em pacientes com PCM não tratados e em diferentes momentos do tratamento. Pacientes não tratados apresentaram valores mais elevados dos níveis de IgG, quando comparados com os pacientes sob tratamento, e com o grupo controle negativo. Foram verificadas 96,6% de especificidade desse antígeno, com relação aos soros controle negativo e 81,2% de especificidade nos soros de indivíduos com outras infecções. Esse resultado demonstrou a possibilidade da utilização do antígeno Mexo no imunodiagnóstico da PCM.

Santos *et al.* (2012) utilizaram o antígeno Mexo na técnica de ELISA, para a dosagem de anticorpos IgG nos soros de 54 pacientes com PCM durante e após tratamento. Observou-se a segurança na utilização do antígeno Mexo para o diagnóstico da PCM, uma vez que foi possível distinguir quase 100% dos pacientes com PCM do grupo controle negativo. Apenas um paciente com PCM não foi reativo frente ao antígeno Mexo.

O antígeno Mexo vem sendo aplicado em dosagens séricas rotineiras realizadas no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular localizado no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gérias (UFMG), no sangue de pacientes previamente diagnosticados com PCM por biópsia. Os resultados da sorologia

com a dosagem de IgG e das biópsias previamente realizadas têm sido concordantes, demonstrando a segurança na utilização de tal antígeno no imunodiagnóstico da PCM.

2.2.2.2 O antígeno rPb27

A proteína recombinante Pb27 (rPb27) tem demonstrado grande potencial como marcador para imunodiagnóstico e como indutor de resposta imune protetora na PCM.

McEwen *et al.* (1996) descreveram a clonagem e o sequenciamento de uma região genômica do *P. brasiliensis* que codificava para uma proteína antigênica de aproximadamente 27 kDa. Tal proteína, denominada Pb27, foi a segunda proteína recombinante do *P. brasiliensis* a ter seu gene clonado. A primeira foi a gp43, um antígeno imunodominante que teve sua sequência nucleotídica clonada e caracterizada (Cisalpino *et al.*, 1996).

Ortiz *et al.* (1998) utilizaram a rPb27 na técnica de ELISA para detecção de anticorpos em soros de pacientes com PCM. A proteína rPb27 identificou a presença de anticorpos em 73,4% dos soros analisados. Posteriormente, Díez *et al.* (2003) utilizaram uma combinação de rPb27 com outra proteína recombinante de *P. brasiliensis* com 87 kDa aplicada na técnica de ELISA, e observaram, elevadas sensibilidade e especificidade na detecção de pacientes com PCM. Em ensaios de dotblot utilizando rPb27 como antígeno, soros de pacientes com PCM agrupados ou isolados apresentaram elevada reatividade frente a esta proteína, demonstrando mais uma vez o grande valor da rPb27 no diagnóstico da PCM (Correa *et al.*, 2007).

Díez *et al.* (1999) utilizaram a técnica de PCR para testar a amplificação da sequência nucleotídica de rPb27 em solos artificialmente contaminados com o fungo *P. brasiliensis* e em tecidos de tatus capturados em uma área endêmica da Colômbia. Neste

estudo, foi demonstrado que a sequência do gene codificador da Pb27 poderia ser utilizada como marcador da presença do fungo em diferentes amostras.

Reis *et al.* (2008) avaliaram a imunidade protetora induzida pela rPb27 e demonstraram que a imunização de camundongos com essa proteína após infecção com *P. brasiliensis* promovia uma doença pulmonar controlada associada a baixos níveis de mortalidade e à presença de granulomas compactos. Esse resultado indicou a rPb27 como alternativa para composição de uma vacina contra o *P. brasiliensis*, mesmo sendo esta terapêutica; isto é, utilizada em associação com antifúngicos objetivando a diminuição do tempo de tratamento e as recidivas da doença. Nesse estudo verificou-se também que anticorpos específicos detectados nos animais imunizados com a rPb27 foram capazes de localizar a proteína na superfície e no citosol de células leveduriformes do fungo.

Em um estudo recente, Fernandes *et al.* (2011) utilizaram uma combinação de rPb27 e rPb40 como antígenos na técnica de ELISA, para diagnóstico e acompanhamento sorológico de pacientes com PCM. Os resultados obtidos com as duas proteínas combinadas apresentaram elevadas sensibilidade e especificidade, demonstrando que essa combinação antigênica poderia ser uma alternativa confiável e reprodutiva para o diagnóstico sorológico da doença e o acompanhamento de pacientes em tratamento da PCM.

2.3 Epidemiologia da PCM

A PCM apresenta distribuição geográfica restrita à América Latina, com relatos da doença ocorrendo desde o sul do México até o norte da Argentina, faixa na qual a doença se distribui de forma heterogênea. Até o momento, não há relatos da ocorrência de PCM autóctone em Belize, Nicarágua, Chile, Guiana Francesa, Guiana e Suriname

(Bagagli *et al.*, 2008; Wanke e Aidê, 2009). Raros foram os casos relatados no México e na América Central. Casos esporádicos foram descritos nos Estados Unidos, em alguns países Europeus e no Japão, sendo todos os relatos de indivíduos que retornavam de áreas endêmicas (Valle *et al.*, 1992; Rivitti e Aoki, 1999; Ramos-e-Silva e Saraiva, 2008; Marques, 2012). Os países mais afetados pela doença são Brasil, Colômbia e Venezuela. O Brasil apresenta 80% dos casos de PCM, observando-se a proximidade geográfica de regiões com elevado e reduzido número de casos da doença.

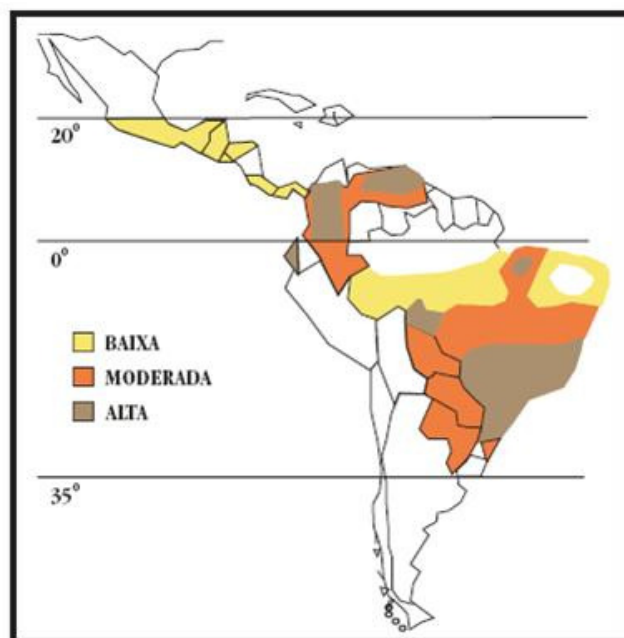


Figura 2 - Distribuição geográfica dos casos de PCM nas Américas Central e do Sul. Fonte: Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006.

A não obrigatoriedade de notificação e o longo período de latência e incubação da PCM (o que possibilita que o diagnóstico da doença nem sempre seja feito na região onde a infecção ocorreu) fazem com que sua verdadeira incidência e prevalência permaneçam não totalmente conhecidas. Alguns estudos de reatividade à

paracoccidioidina indicam que pelo menos 11% da população de áreas endêmicas tenham contato com o fungo (Brummer *et al.*, 1993; Coimbra *et al.*, 1994; Restrepo *et al.*, 2001; Maluf *et al.*, 2003). Esta reatividade pode alcançar 60%, resultando em estimativa de 10% da população brasileira infectada (Martinez, 2010). A taxa de mortalidade por PCM no Brasil por 1.000.000 de habitantes foi de 1,45 entre 1980-1995, e de 0,9-1,0 entre 1996-2006. De acordo com a taxa de mortalidade encontrada no Brasil, estima-se um número anual de casos novos de 3.360 (Martinez, 2010). As regiões do Brasil mais acometidas pela doença são a centro-oeste, sudeste e sul, havendo também relatos da doença no Pará, Rondônia e Maranhão (Brummer *et al.*, 1993; Matos *et al.*, 2012). Minas Gerais destaca-se como área endêmica de elevada incidência, precedida pelos estados de São Paulo e Rio de Janeiro (Fava e Netto, 1998).

No Brasil, a PCM é considerada a principal causa de morte por micoses sistêmicas em pacientes não imunossuprimidos, e em geral é classificada como a décima causa de morte entre as doenças infecciosas e parasitárias. Nos anos de 2005-2006 no Brasil, foram relatadas 148 mortes por PCM. Entre indivíduos com AIDS, a PCM está classificada como a quinta causa de morte, resultando em 1,4% das mortes por micoses sistêmicas no país entre os anos de 1996-2006 (Prado *et al.*, 2009; Marques, 2012).

Após mais de 100 anos da descoberta da doença ainda há muito a ser feito para a prevenção, o diagnóstico e o tratamento da PCM em termos de saúde pública. Com exceção de alguns estados brasileiros que mantêm centros de referência da doença, não há um programa direcionado para essa micose, mesmo sendo esta uma patologia que acarreta grande impacto na saúde pública no Brasil (Martinez, 2010).

A PCM infecção é adquirida nas duas primeiras décadas de vida, com pico de incidência entre 10 e 20 anos de idade (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). Já a PCM doença

ocorre mais comumente em indivíduos na faixa dos 30 a 50 anos de idade, com predominância no sexo masculino (Brummer *et al.*, 1993; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). A proporção do acometimento da PCM doença é de 10 a 15 homens para cada mulher. Entretanto na PCM infecção a distribuição nos dois sexos é muito semelhante, com pequeno predomínio da infecção em adultos jovens masculinos. Essa alta proporção de homens com PCM doença em relação às mulheres acometidas em idade adulta pode ser explicada pelo fator protetor do estrógeno. A proteína de ligação ao estrógeno presente no citoplasma do *P. brasiliensis* pode se ligar ao β -estradiol, impedir o desenvolvimento das formas miceliais do fungo, e conseqüentemente a progressão da infecção nas mulheres (Restrepo *et al.*, 1984; Brummer *et al.*, 1993; Camargo e Franco, 2000). Loth *et al.* (2011) encontraram proporção de acometidos pela doença de 2,4 homens para cada mulher sugerindo que as mulheres estão ficando mais expostas e mais suscetíveis ao fungo. O uso de tabaco, álcool, outras drogas e o envolvimento de mulheres em trabalhos antes exclusivamente destinados aos homens podem ser fatores que contribuem para a redução na diferença entre homens e mulheres acometidos.

Atividades laborais como práticas agrícolas, jardinagem, construção civil e terraplenagem estão associadas à PCM infecção e doença. Observa-se predomínio do acometimento de trabalhadores rurais, especialmente entre os lavradores. Entretanto, há relatos de casos de pessoas com PCM que nunca saíram da área urbana (Brummer *et al.*, 1993, Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

Algumas mudanças nas características demográficas da população infectada e na distribuição geográfica da PCM têm sido observadas nas últimas décadas. Observa-se alteração na incidência da doença, que em parte pode ser explicada pela crescente urbanização e pelo melhor e mais acessível diagnóstico (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

2.4 Modo de infecção

A principal forma de infecção pelo *P. brasiliensis* se dá através da inalação de esporos do fungo, entretanto, é possível que ocorra também inoculação direta de esporos na pele ou nas mucosas (Ramos-e-Silva, 2004). A transmissão da doença de pessoa a pessoa não foi descrita até o momento, provavelmente devido ao fato de o fungo não estar na sua forma infectante no organismo do hospedeiro (De Almeida, 2005).

A via inalatória é na maioria dos casos a porta de entrada do fungo no organismo, sendo os principais sítios de localização primária a orofaringe, a laringe e os pulmões. Outros sítios de infecção primária podem também ocorrer raramente, como na pele e nas mucosas (Franco *et al.*, 1987; Borges-Walmsley *et al.*, 2002).

As formas miceliais do fungo, uma vez estabelecidas no hospedeiro, transformam-se em leveduras que se multiplicam por brotamentos. Estas formas podem ser eliminadas por meio de resposta do sistema imune do hospedeiro ou podem disseminar-se para outros órgãos e tecidos, pela via linfática ou sanguínea. Vários fatores relacionados ao hospedeiro como a nutrição, a genética e a competência do sistema imune estão envolvidos na progressão da infecção (Ramos-e-Silva e Saraiva, 2008). A infecção é muitas vezes subclínica em indivíduos imunocompetentes, entretanto, quando há desequilíbrio na relação parasita-hospedeiro, focos quiescentes do fungo podem ser reativados e a infecção pode progredir para PCM doença.

2.5 Formas clínicas

A PCM pode manifestar-se de diferentes formas, sendo classificada como infecção e doença (Franco *et al.*, 1987).

A PCM-infecção ocorre mais frequentemente em indivíduos saudáveis que habitam ou habitaram áreas endêmicas da doença e foram infectados pelo *P. brasiliensis*

(Pereira, 1988). Esta fase é caracterizada por infecção subclínica, sem sintomatologia aparente e presença de reatividade imunológica específica para o fungo. Indivíduos que apresentam o fungo em lesões residuais inativas sem manifestações clínicas são incluídos nesse grupo (Brumer *et al.*, 1993).

A PCM-doença é caracterizada pelo aparecimento de sinais e sintomas, podendo evoluir diretamente do complexo primário da infecção, da reativação de um foco quiescente ou de re-infecção (Brummer *et al.*, 1993). A PCM-doença pode apresentar-se de duas formas:

1. Forma aguda/subaguda (tipo juvenil): Representa 3 a 5% dos casos da doença, sendo predominante em crianças e adolescentes, acometendo eventualmente adultos jovens com até 35 anos de idade. A sua distribuição é equiparada em crianças de ambos os sexos (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). Apresenta-se como forma grave e de prognóstico reservado da PCM. (Terra *et al.*, 1991). Caracteriza-se por rápido curso, com semanas ou meses de evolução e pelo predominante envolvimento do sistema reticuloendotelial (Brummer *et al.*, 1993). Os pacientes em geral apresentam depressão do sistema imune celular e aumento na produção de anticorpos específicos. As manifestações clínicas mais frequentes, por ordem decrescente, são linfadenomegalia, manifestações digestivas, hepatoesplenomegalia, envolvimento ósteo-articular e lesões cutâneas (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). Os pulmões e as mucosas raramente são acometidos nessa forma da doença. Exames histopatológicos demonstram a presença de processo inflamatório inespecífico com formação de granulomas pouco organizados contendo muitos fungos (Franco *et al.*, 1987; Restrepo-Moreno, 1993; Ferreira, 2009).

2. Forma crônica (tipo adulto): Representa cerca de 90% dos casos, acometendo principalmente adultos entre 30 e 60 anos de idade, predominantemente homens (Brummer *et al.*, 1993; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). A sua progressão clínica é lenta,

silenciosa e o seu diagnóstico é realizado, com frequência muito tempo após o início de sua sintomatologia. Denomina-se forma crônica unifocal quando o acometimento é restrito a um órgão. Os pulmões são, isoladamente, os órgãos mais comumente afetados, seguidos pelo sistema mucocutâneo. É possível, entretanto raro, o acometimento isolado de qualquer outro órgão. Denomina-se forma crônica multifocal quando mais de um órgão simultaneamente é afetado. Os locais mais frequentemente afetados de forma simultânea são os pulmões, as mucosas e a pele (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006; Ramos-e-Silva e Saraiva, 2008), sendo também acometidos linfonodos, sistema nervoso central, intestinos, ossos, adrenais e órgãos genitais.

Em muitos casos, o processo inflamatório granulomatoso crônico ocorrido durante a doença ativa provoca a formação de áreas fibrosadas (Brummer *et al.*, 1993; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). Estas áreas de sequela podem apresentar-se comprometidas ou com perdas funcionais dependendo da gravidade e extensão da lesão inicial.

As recidivas da PCM podem ocorrer, muitas vezes afetando locais diferentes das lesões iniciais. A virulência do fungo e a resposta imune do hospedeiro podem interferir na intensidade, extensão e disseminação das lesões e na ocorrência de recidiva da doença.

2.6 Diagnóstico

O padrão ouro para o diagnóstico da PCM é a identificação do agente da doença por meio de exame microscópico direto em espécimes clínicos ou em cultura. A dificuldade na identificação das estruturas leveduriformes do fungo em exame direto pela necessidade de pessoal treinado e experiente, e o longo tempo para o crescimento das colônias do fungo sob cultivo, que pode atingir duas a três semanas, muitas vezes

atrasam o seu diagnóstico e o início do tratamento. Além disso, a taxa de isolamento do fungo em cultura a partir de espécimes clínicos pode variar de 86 a 100%. Esses fatores limitam a aplicação de técnicas de cultivo no diagnóstico de rotina da PCM (Almeida *et al.*, 2003; Telles e Martins, 2011). A inoculação de espécimes clínicos infectados em animais suscetíveis à PCM também pode ser realizada, porém, esta prática é exclusiva de laboratórios de pesquisa para recuperação da virulência do fungo (Brummer *et al.*, 1993).

Técnicas histopatológicas baseadas na marcação de estruturas morfológicas do fungo apresentam grande valor no diagnóstico da PCM. Em algumas situações o diagnóstico por histopatologia pode não ser a melhor opção, como no caso em que as estruturas marcadas em uma amostra não apresentam as características mais predominantes do fungo, e o examinador não tem muita experiência. Nessa situação, outros fungos como *Histoplasma spp.*, *Blastomyces dermatitidis* ou *Coccidioides immitis* podem ser confundidos com o *P. brasiliensis* (Bialek *et al.*, 2000; Telles e Martins, 2011). Na prática clínica, biopsias de lesões de pacientes analisadas por técnicas de histopatologia como as de Gomori-Grocott ou de ácido de Schiff são muitas vezes determinantes para o diagnóstico da PCM. De forma geral, nas técnicas histopatológicas são observadas a formação de granuloma com células gigantes multinucleadas e a presença de infiltrado polimorfonuclear contendo linfócitos, plasmócitos, eosinófilos e neutrófilos. Células leveduriformes em brotamento são visualizadas, cercadas por células ‘filhas’, formando uma estrutura típica do *P. brasiliensis* conhecida como ‘roda de leme’ (Ramos-e-Silva e Saraiva, 2008; Ameen *et al.*, 2010).

As técnicas sorológicas utilizadas no diagnóstico da PCM são alternativa muitas vezes mais rápida e simples, comparadas aos exames parasitológicos. A detecção de

anticorpos específicos anti-*P. brasiliensis* permite, além do diagnóstico da doença, o acompanhamento de pacientes durante o tratamento, e após a sua interrupção (Marques, 2003; Ferreira, 2009). Os testes sorológicos mais usados para o diagnóstico da PCM são: imunodifusão dupla (ID), contraímuno eletroforese (CIE), imunofluorescência indireta (IFI), ensaio imunoenzimático (ELISA) e imunoblot (IB).

A ID é o teste indicado pelo Consenso em PCM para diagnóstico e monitoramento de pacientes com a doença devido a sua simplicidade na execução, baixo custo e elevada especificidade (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006; Camargo, 2008). Entretanto, sua sensibilidade mais reduzida em comparação a outras técnicas, a impossibilidade de automação e a necessidade de elevados níveis de anticorpos para que seja detectada reatividade na técnica, fazem com que a ID seja pouco utilizada atualmente. No sistema público de saúde do estado de Minas Gerais praticamente não é possível a realização desse teste para diagnóstico de PCM.

A CIE é técnica de rápida execução, que apresenta bons resultados, com sensibilidade entre 77 e 100% e especificidade acima de 95%, o que possibilita sua aplicação segura no diagnóstico da PCM (Marques, 2003; Ramos-e-Silva e Saraiva, 2008). A CIE poderia ser o primeiro teste de triagem em soros de indivíduos com suspeita de PCM devido à rapidez com a qual os resultados podem ser obtidos. Entretanto, o tempo para realização do teste não difere muito em relação à ID, além disso, alguns de seus reagentes suplementados nem sempre estão disponíveis em laboratórios de áreas endêmicas (Camargo, 2008).

O IB apresenta elevadas sensibilidade e especificidade, entretanto sua aplicação na rotina diagnóstica é restrita devido à maior complexidade e alto custo na realização da técnica. Além da gp43, que é o antígeno imunodominante do *P. brasiliensis*, as frações de 70, 52, 43 e 20-21kDa apresentam alta reatividade com anticorpos IgG na

técnica de IB (Camargo *et al.*, 1989). A aplicação de IB na captura de antígenos em fluidos corporais foi sugerida como metodologia promissora para diagnóstico, avaliação de eficácia de tratamento e detecção de recidivas (Marques, 2003).

A IFI é considerada técnica útil para diagnóstico e acompanhamento de pacientes com PCM. Apesar de não ser muito utilizada, pode apresentar especificidade de 90% e sensibilidade de 65%. Observa-se congruência na relação entre os resultados obtidos por IFI e a gravidade da PCM (Biagione *et al.*, 1984; Del Negro *et al.*, 1991).

A técnica de ELISA vem sendo amplamente utilizada para o diagnóstico da PCM e de outras micoses. Apesar de ser menos específica que a ID, devido às reações cruzadas que apresenta, possui sensibilidade próxima de 100%, especificidade em torno de 88%, rapidez, além de ser utilizada para avaliar grande número de amostras simultaneamente (Telles e Martins, 2011). Várias modificações têm sido feitas nessa técnica com o intuito de evitar reações cruzadas, e de aumentar a sua especificidade e sensibilidade. Um exemplo é a técnica de “ELISA-abs”, na qual é feita absorção prévia da amostra teste com filtrado antigênico de *H. capsulatum*, que demonstrou especificidade entre 97 e 100% (Camargo e Franco, 2000). Recentemente, as frações antigênicas rPb27 e rPb40 utilizadas em combinação na técnica de ELISA apresentaram excelentes resultados com elevadas sensibilidade e especificidade, demonstrando confiabilidade e reprodutibilidade para aplicação no diagnóstico da PCM (Fernandes *et al.*, 2011).

A produção de anticorpos específicos na PCM é de forma geral eficiente, a não ser que haja imunossupressão. Nas formas agudas e disseminadas, os títulos de IgG anti-*P. brasiliensis* são mais elevados do que nos casos crônicos com doença localizada. Nestas formas, o resultado sorológico pode eventualmente ser falso-negativo (Brummer *et al.*, 1993; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). Além disso, uma vez que os antígenos mais

utilizados nas técnicas sorológicas são produzidos a partir de espécies do fungo pertencentes ao grupo genético S1, caso as amostras avaliadas sejam provenientes de áreas onde a prevalência do fungo seja de outro grupo genético, poderá não haver reatividade (Telles e Martins, 2011).

As diferenças na virulência das cepas do fungo, as técnicas empregadas para seu cultivo e o modo de obtenção dos seus antígenos, podem interferir diretamente nos resultados dos testes sorológicos encontrados em diferentes regiões (Telles e Martins, 2011). A glicoproteína de 43kDa é o principal antígeno utilizado em testes sorológicos para detecção de anticorpos uma vez que esta fração antigênica é reconhecida pela grande maioria dos soros de pacientes infectados (Ramos-e-Silva e Saraiva, 2008). Apesar da especificidade de gp43 garantir quase 100% do reconhecimento dos casos de PCM, podem ocorrer reações cruzadas com soros de indivíduos com outras doenças como histoplasmose, lobomicose e aspergilose (Marques, 2003). Nas últimas décadas, a busca por novos antígenos aplicáveis no diagnóstico da PCM tem produzido muitos avanços com a identificação de frações antigênicas como gp70, gp75, hsp60, hsp87 e rPb27, que garantem alta especificidade nas técnicas sorológicas (Telles e Martins, 2011; Caldini *et al.*, 2012). O desenvolvimento de técnicas que usam antígenos padronizados e específicos tem proporcionado resultados que alcançam 85 a 100% de sensibilidade e especificidade, garantindo mais segurança ao diagnóstico da PCM (Ferreira, 2009).

Deve ser ressaltado em relação ao diagnóstico sorológico da PCM, que resultados sorológicos das mesmas amostras podem variar quando diferentes técnicas são aplicadas, usando antígenos distintos. Isso demonstra a necessidade da busca pela padronização das técnicas sorológicas para aplicação na rotina laboratorial, considerando as diferenças nos perfis do *P. brasiliensis* procedentes de distintas regiões.

A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) constitui outra alternativa para o diagnóstico da PCM, ainda restrita a centros de pesquisa. A PCR é uma técnica rápida que apresenta altas sensibilidade e especificidade, e pode ser útil também no monitoramento de pacientes durante e após tratamento. A sua principal vantagem é a amplificação de quantidades mínimas de material genético do fungo em diferentes espécimes clínicos, sendo eficiente mesmo quando testes sorológicos e microscópicos são negativos. Entretanto, há dificuldade no desenvolvimento de *primers* específicos para o fungo, tornando ainda inviável a sua utilização na rotina laboratorial (Gomes *et al.*, 2000; Ameen *et al.*, 2010; Teles e Martins, 2011). A PCR pode apresentar resultados falso-positivos devido à contaminação e resultados falso-negativos, em consequência de má conservação da amostra e degradação do material genético do fungo.

A técnica de intradermorreação não tem valor para o diagnóstico de PCM ativa, entretanto, é muito aplicada em inquéritos epidemiológicos para identificação de indivíduos que já tiveram contato com o fungo. A intradermorreação pode utilizar diferentes tipos de antígenos, denominados paracoccidioidinas. A conversão de um paciente com doença grave, antes não reativo ao teste, e que se torna reativo durante o tratamento, é sinal de melhora da imunidade celular, o que sugere bom prognóstico (Brummer *et al.*, 1993).

2.7 Imunologia da PCM

A resposta imunológica à infecção pelo *P. brasiliensis* é complexa e envolve mecanismos das imunidades inata e específica. As respostas imunológicas humoral e celular estão presentes na defesa do hospedeiro contra o fungo, entretanto, a resposta

celular parece ser fundamental para o estabelecimento da defesa e da resistência do hospedeiro.

2.7.1 Imunidade Inata

Diversos mecanismos da imunidade inata como a ativação de fagócitos e de células *Natural Killer* (NK) estão presentes na defesa do hospedeiro contra o fungo. As células NK, os neutrófilos, os monócitos e os macrófagos desempenham importante papel na resistência do hospedeiro ao *P. brasiliensis* (Fortes *et al.*, 2011).

As células NK parecem apresentar uma função complexa na defesa contra o *P. brasiliensis*, variável de acordo com o hospedeiro ou com o local onde as células são obtidas. Estas células apresentam atividade citotóxica contra o fungo, o que pode impedir o desenvolvimento das leveduras. Entretanto, apesar de as células NK serem encontradas em grande número no sangue periférico de pacientes com PCM, apresentam baixa atividade citotóxica. As células NK são ativadas nas primeiras semanas de infecção pelo *P. brasiliensis*, e posteriormente sua atividade citotóxica torna-se reduzida, simultaneamente com a ocorrência de depressão da imunidade celular (Jimenez e Murphy, 1984; Peraçoli *et al.*, 1995; Calich *et al.*, 2008). Conseqüentemente, sua participação na resistência do hospedeiro à infecção é limitada e inadequada.

As células polimorfonucleares estão presentes em grande número em tecidos infectados pelo *P. brasiliensis*, e apresentam importante papel na atividade fungicida contra este patógeno. Essas células são essenciais nos estágios iniciais da infecção paracoccidioidomicótica, e propiciam resistência ao hospedeiro, contribuindo para o estabelecimento de resposta imune efetiva contra o *P. brasiliensis* (Fortes *et al.*, 2011). A atividade fungicida dos polimorfonucleares demonstra-se aumentada pela secreção de IFN- γ , GM-CSF ou IL-1 β , mas não por TNF- α e IL-8 (Soares *et al.*, 2001; Calich *et al.*,

2008). As células polimorfonucleares produzem prostagladina E2 e leucotrienos, o que contribui para o processo inflamatório, e minimizam o dano celular causado pelos monócitos (Fortes *et al.*, 2011).

Os macrófagos representam importante mecanismo de defesa contra o *P. brasiliensis*, devido à sua capacidade de fagocitar e inibir a replicação das células fúngicas. Os macrófagos alveolares parecem ser importantes para a contenção inicial do *P. brasiliensis*, uma vez que a principal porta de entrada do fungo no hospedeiro é a via inalatória (Calich *et al.*, 2008). A ação fungicida dos monócitos é ativada pelo IFN- γ , que por sua vez estimula os macrófagos a produzirem TNF- α que poderá se envolver, através de via autócrina, na fase final do processo de ativação (Calvi *et al.*, 2003). O IFN- γ ativa também os macrófagos a produzirem óxido nítrico, que inibe a transformação do *P. brasiliensis* de micélio para levedura (Gonzalez *et al.*, 2000).

O *P. brasiliensis* é capaz de ativar a via alternativa do complemento, além disso, as moléculas de C3b aderentes às estruturas leveduriformes, podem contribuir para a fagocitose fúngica por macrófagos (Calich *et al.*, 1979). Toledo *et al.* (2010) utilizaram dois isolados de *P. brasiliensis*, um com baixa e outro com elevada virulência, para investigar o comportamento do fungo frente à ativação do complemento. Pela primeira vez, foi demonstrado que as leveduras do *P. brasiliensis* ativam o sistema do complemento pela via da lecitina com uma correlação inversa entre a habilidade de ativar o complemento e a virulência do isolado. Esse comportamento poderia exercer influência na imunidade inata e na gravidade da doença desenvolvida pelo hospedeiro infectado.

2.7.2 Imunidade Humoral

A resposta imune humoral desenvolvida na PCM não é considerada o principal mecanismo de defesa do hospedeiro contra o fungo. Entretanto, a atividade opsonizadora dos anticorpos associada ao sistema complemento representa um importante fator para a eliminação do *P. brasiliensis*.

De forma geral, nas formas agudas ou disseminadas da PCM, são detectados altos níveis de anticorpos IgG, IgA e IgE, associados à secreção de citocinas como IL-4, IL-5 e TGF- β , que suprimem a formação de granulomas (Mamoni *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2004). Nas formas crônicas localizadas, os níveis de anticorpos são mais baixos, e há predominância na produção de citocinas do perfil Th1 como IL-2, IFN- γ e IL-12. Isso sugere a existência de relação direta entre gravidade da doença e elevados níveis de anticorpos (Calich *et al.*, 1998).

De forma geral, em pacientes com PCM submetidos a tratamento, é observado decaimento nos níveis de anticorpos IgG associado à melhora da sintomatologia da doença. As recidivas da PCM podem também se associar à elevação dos níveis de anticorpos. Entretanto, níveis significantes de anticorpos anti-*P. brasiliensis* podem persistir por anos após o término do tratamento da PCM, evidenciando que estes anticorpos não desempenham papel protetor eficaz contra a doença (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2012). Além disso, a ausência de detecção de anticorpos IgG em indivíduos tratados para PCM não indica necessariamente cura da doença (Ferreira da Cruz *et al.*, 1990).

2.7.3 Imunidade Celular

A resposta imune celular na PCM constitui o principal mecanismo de defesa do hospedeiro para a eliminação do *P. brasiliensis*. Os linfócitos T, um dos principais

elementos da resposta imune celular, podem se diferenciar em linfócitos T citotóxicos e auxiliares. Estas células, apesar de fenotipicamente serem indistinguíveis, possuem diferenças na resposta imunológica e no perfil de citocinas produzido. Os linfócitos T do perfil Th1 estão associados com a produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-12, e com o estímulo da resposta imune celular. Os linfócitos T do perfil Th2 estão associados com a produção de citocinas como TGF- β , IL-4, IL-5, IL-6, e estímulo da resposta imune humoral (Arruda *et al.*, 2004; Sadahiro *et al.*, 2007).

A possível relação entre depressão da imunidade celular e desequilíbrio de linfócitos T CD4/CD8 apresenta associação com piora clínica da PCM. Nas formas agudas da doença, observa-se nítida redução na proporção de células T CD4/CD8. Nas formas crônicas da PCM, essa redução não se apresenta evidente (Brummer *et al.*, 1993). Em camundongos resistentes e suscetíveis, as células T CD8 desempenham papel importante na eliminação do *P. brasiliensis* e controle da disseminação da PCM (Borges-Walmsley *et al.*, 2002).

As células T regulatórias CD4⁺ CD25⁺ também desempenham importante papel no controle da resposta imune celular. A ausência dessas células está associada com a exacerbação da resposta inflamatória, e sua excessiva ativação, pode aumentar a suscetibilidade às infecções. Pacientes com PCM crônica apresentam altos níveis de células T CD4⁺ CD25⁺ no sangue periférico e nas áreas de lesões provocadas diretamente pelo fungo, sugerindo que essas células possam controlar a resposta imune sistêmica e localizada (Ferreira *et al.*, 2010).

Na PCM, os linfócitos T CD4 sintetizam citocinas como IFN- γ , TNF- α , e IL-12 que parecem proteger e ajudar a impedir a disseminação do *P. brasiliensis*. De forma geral, postula-se que as formas mais brandas da doença estariam associadas ao equilíbrio entre os perfis Th1 e Th2, o que propiciaria maior controle na disseminação

do *P. brasiliensis*, resultando em manifestações mais leves. Os pacientes infectados que não desenvolvem a doença, apresentam mais predominantemente o perfil Th1 de resposta imune celular, que propicia a supressão da replicação do *P. brasiliensis* e o equilíbrio entre parasita e hospedeiro. O IFN- γ , que é o elemento fundamental do perfil Th1, exerce relevante papel na defesa do hospedeiro, uma vez que é capaz de ativar macrófagos que eliminam o *P. brasiliensis*. Além disso, o IFN- γ estimula o recrutamento de células polimorfonucleares para o local da invasão fúngica e a produção de TNF- α por macrófagos. O efeito sinérgico de IFN- γ e TNF- α parece ser essencial para a resistência do hospedeiro na instauração de atividade fungicida efetiva. A depleção de TNF- α leva à redução nos mecanismos de defesa do hospedeiro, com diminuição da reação granulomatosa, essencial para conter a multiplicação do fungo (Souto *et al.*, 2000).

As formas mais graves da PCM estão associadas ao perfil de resposta imunológica celular Th2, no qual o hospedeiro não consegue delimitar a infecção por meio da resposta imune desenvolvida. A expressão de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β nos linfonodos de pacientes com a forma aguda da PCM está associada com mecanismo de evasão do fungo e contribuição para sua disseminação. Sugere-se que caso haja indução precoce de IL-10 e TGF- β na infecção pelo *P. brasiliensis*, o resultado será a supressão da resposta de macrófagos, permitindo a instalação e reprodução do fungo, com sua posterior disseminação para vários órgãos (Benard, 2008). Observa-se em pacientes com PCM não submetidos a tratamento, alta produção de IL-4; enquanto nos tratados, elevada produção de IFN- γ (Bozzi *et al.*, 2004).

2.7.4 As quimiocinas na PCM

As quimiocinas constituem grande família de citocinas composta por proteínas que apresentam estruturas homólogas e peso molecular entre 8 a 12 kDa. Essas são responsáveis pela movimentação (quimiotaxia) dos leucócitos, incluindo o seu recrutamento e migração para os sítios de inflamação teciduais, a partir da corrente sanguínea. Células como as endoteliais, as parenquimais e as do músculo liso são também influenciadas pela ação das quimiocinas (Mantovani, 1999; Locati *et al.*, 2002). Além da ação quimiotática, outras funções biológicas são atribuídas às quimiocinas, como a indução da adesão celular, a fagocitose, a diferenciação e ativação de células T, a apoptose e a angiogênese. As quimiocinas são produzidas em vários tecidos, por diferentes tipos de células, dependendo de sua função (Zlotnik e Yoshie, 2000; Ono *et al.*, 2003; Colobran *et al.*, 2007a; Guerreiro *et al.*, 2011; Blanchet *et al.*, 2012).

As quimiocinas são agrupadas em quatro subfamílias, de acordo com o número de resíduos conservados de cisteína (C) na extremidade N-terminal da molécula, e com o espaçamento entre eles: CC, CXC, XC e CX3C (Ono *et al.*, 2003; Colobran *et al.*, 2007a; Guerreiro *et al.*, 2011). As principais quimiocinas são constituídas pelas subfamílias CC, que possuem dois resíduos de cisteína adjacentes, e a CXC, em que os resíduos de cisteína são separados por um aminoácido (X). A subfamília CC interage com diferentes tipos celulares incluindo monócitos, linfócitos T, basófilos, eosinófilos e células dendríticas. As quimiocinas CXC atuam principalmente sobre os neutrófilos, as XC apresentam ação quimiotática para linfócitos T e células NK e as CX3C atraem especialmente linfócitos T, células NK e neutrófilos (Zlotnik e Yoshie, 2000; Karpus e Fife, 2001). As quimiocinas podem também ser classificadas sob aspecto funcional como homeostáticas ou inflamatórias. As homeostáticas se expressam nos tecidos e controlam a migração dos leucócitos e dos seus precursores. Por outro lado, as

quimiocinas inflamatórias são indutíveis e recrutam leucócitos efetores em situações de lesão tecidual, inflamação ou infecção. Muitas apresentam seletividade para a célula alvo, atuando tanto em células da imunidade inata como da imunidade adaptativa (Guerreiro *et al.*, 2011). Algumas quimiocinas apresentam ambas as funções, sendo classificadas como quimiocinas com ação mista (Blanchet *et al.*, 2012).

As quimiocinas atuam através de receptores trans-membrana na superfície de células circulantes pelos quais apresentam alta afinidade. Os receptores de quimiocinas são expressos principalmente em leucócitos e classificam-se em CCR, CXCR, XCR e CX3CR, conforme a natureza da quimiocina ligante. Cerca de 50 quimiocinas diferentes já foram identificadas interagindo com 19 receptores distintos, portanto, grande parte dos receptores é capaz de reconhecer mais de uma quimiocina (Zlotnik e Yoshie, 2000; Guerreiro *et al.*, 2011).

Várias são as funções atribuídas às quimiocinas, seja em mecanismos de homeostasia ou patogênese. A quimiocina CCL3 está relacionada com o recrutamento de monócitos e linfócitos T, entretanto, sua ação em mecanismos patológicos não é completamente esclarecida. Concentrações elevadas são detectadas em diversas doenças como: artrite reumatóide, pneumonite de hipersensibilidade, sarcoidose e fibrose pulmonar idiopática (Standiford *et al.*, 1993; Denis, 1995; Charo e Ransohoff, 2006). A associação de CCL3 com esclerose múltipla e suscetibilidade na infecção pelo HIV também têm sido relatadas (Colobran *et al.*, 2007b).

As concentrações plasmáticas elevadas de CCL3 estão associadas com gravidade na evolução da esquistossomose mansoni crônica. Em camundongos deficientes de CCL3 infectados com *Schistosoma mansoni* observa-se formação de granulomas menores quando comparado a animais normais. A CCL3 parece estar associada ao

acúmulo de macrófagos e eosinófilos na fase inicial da formação de granulomas esquistossomóticos (Falcão *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2005).

CXCL9 atua sobre os linfócitos Th1 e Th2 de forma a proporcionar efeito quimiotático e de bloqueio de sua migração, respectivamente. CCL11 e CCL24 são potentes quimiotáticos para eosinófilos, mastócitos e linfócitos Th2, com papel fundamental em processos alérgicos uma vez que induzem a liberação de histamina e leucotrienos (Colobran *et al.*, 2007a).

Alessandri *et al.* (2006) dosaram as concentrações das quimiocinas CXCL8, CXCL9 e CCL11 e do receptor solúvel de TNF- α do tipo RI (sTNF-RI) no soro de pacientes com tuberculose ativa durante diferentes momentos do tratamento. Verificou-se que as concentrações do receptor solúvel de sTNF-RI e das quimiocinas retornaram aos valores basais após quatro a seis meses de tratamento, com exceção de CCL11, que permaneceu com concentrações elevadas durante todo o tratamento.

Silveira-Lemos *et al.* (2010) verificaram que em pacientes com esquistossomose mansoni aguda com concentrações plasmáticas reduzidas de CCL24, ocorrem simultaneamente concentrações elevadas de CCL3. Este estudo sugeriu que a CCL24 pode influenciar a cinética de quimiocinas e de seus receptores durante a esquistossomose aguda. A CCL24 atrairia eosinófilos para o local da inflamação, participando da formação inicial do granuloma, e contribuiria para o estabelecimento do padrão de resposta imunológica Th2.

Portadores de esquistossomose mansoni hepatoesplênica e mielorradicular apresentam concentrações séricas elevadas das quimiocinas CCL11 e CCL24, quando comparados com pessoas saudáveis. A elevação das concentrações séricas de CCL11 e CCL24 associadas à concentrações líquóricas elevadas de IL-13 e baixas de CCL2 e

CXCL10 demonstraram ser confiáveis em afirmar o diagnóstico de neuroesquistossomose (Pereira, 2006).

Na PCM, a dosagem de quimiocinas ainda é restrita, e poucos são os trabalhos que utilizaram esses marcadores inflamatórios.

Souto *et al.* (2003) demonstraram em estudo experimental com camundongos infectados com *P. brasiliensis* que o IFN- γ modula e induz a secreção das quimiocinas CCL2, CCL3, CCL5, CXCL9 e CXCL10 nos pulmões destes animais. Como consequência da ação do IFN- γ ocorre ativação de macrófagos e formação de granulomas, que protegem o hospedeiro contra a disseminação do fungo. Verificou-se que a quimiocina CCL3 estimula a migração precoce de neutrófilos aos pulmões dos camundongos infectados, até os níveis de IFN- γ atingirem concentrações adequadas; após o alcance das concentrações ideais dessa citocina, forma-se um infiltrado mononuclear.

Nagib *et al.* (2010) avaliaram os efeitos do laser HeNe e a expressão de citocinas e quimiocinas em lesões cutâneas de PCM em camundongos Balb/c. Verificou-se que CCL3 e CXCL10 apresentaram decréscimo em suas concentrações quando as lesões foram tratadas com o laser. Para CCL5 não houve mudança nas concentrações dessa quimiocina antes e após o tratamento. De acordo com o estudo, o uso do laser HeNe poderia ser uma estratégia no tratamento de lesões de PCM, que contribuiria para melhora dos pacientes afetados. A redução nas concentrações de CCL3 e CXCL10 poderia ser utilizada como marcador que indicaria a recuperação dos pacientes.

Raros são os relatos da utilização de quimiocinas para monitoramento de pacientes durante e após o fim do tratamento para PCM. Assim como demonstrado para outras doenças, algumas quimiocinas poderiam ser úteis para verificar a atividade da PCM.

Mamoni *et al.* (2005) compararam a expressão de genes de citocinas e quimiocinas em células mononucleares de indivíduos infectados com *P. brasiliensis*, seja com a forma aguda ou crônica da PCM. Verificou-se que os indivíduos que apresentavam apenas a infecção pelo fungo sem manifestação da doença, expressavam precocemente altos níveis de RNAm de IFN- γ , TNF- α , CXCL9 e CXCL10, quando comparados com aqueles com a forma aguda. Os pacientes com a forma crônica da PCM apresentaram níveis similares de CXCL10 e IFN- γ , e mais elevados de CXCL9, quando comparados com os indivíduos apenas infectados. A expressão de RNAm de IL4, IL-10, IL-5 e TGF- β era mais elevada em pacientes com a forma aguda ou crônica da doença, quando comparada com aqueles apenas infectados. Esses resultados demonstraram que os padrões distintos de expressão de citocinas e quimiocinas podem estar diretamente relacionados com a forma da doença desenvolvida pelos pacientes.

Concentrações séricas elevadas de CXCL9 e CXCL10 foram detectadas em pacientes com PCM aguda ou crônica, em comparação com indivíduos saudáveis. Não houve diferença, entretanto, entre os níveis de CCL2 de pacientes com PCM comparados com indivíduos saudáveis (Corvino *et al.*, 2007).

Moura *et al.* (2009) avaliaram pacientes com PCM crônica antes e durante o tratamento específico, e verificaram que as concentrações de CXCL9 decresciam progressivamente ao longo dos 36 meses de tratamento. As quimiocinas CCL2 e CCL3 foram detectadas com concentrações séricas elevadas após 12 meses de tratamento, e diminuíram seus valores após esse período. Já CCL24 apresentou concentrações elevadas após 36 meses de tratamento, e CCL11 não demonstrou diferença em suas concentrações quando comparadas com dosagens em indivíduos saudáveis. Neste estudo, verificou-se que CXCL9, sTNF-RI e sTNF-RII poderiam ser utilizados como marcadores sorológicos para avaliação da atividade da PCM, uma vez que suas

concentrações mais elevadas foram detectadas em pacientes com a doença ativa, estando o decréscimo de tais concentrações diretamente associado com a melhora clínica dos pacientes.

Diante da literatura revisada, verifica-se que ainda são necessários mais estudos que abordem o papel das quimiocinas na PCM, a sua influência no desenvolvimento das distintas formas clínicas, e a possível aplicação desses marcadores inflamatórios para monitoramento de pacientes em diferentes fases da doença, inclusive para controle de cura após tratamento.

2.7.5 Os receptores solúveis de TNF- α (sTNF-R) na PCM

O fator de necrose tumoral α (TNF- α) é uma citocina produzida principalmente por monócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B e fibroblastos, que está envolvida em diversos processos inflamatórios, inclusive na defesa de hospedeiros contra agentes infecciosos. O TNF- α pode ser produzido também por adipócitos, queratinócitos, células mamárias, células epiteliais do cólon, osteoblastos, mastócitos e várias outras células (Aggarwal, 2003; Blüml *et al.*, 2012).

Os níveis de TNF- α são controlados por receptores solúveis específicos denominados sTNF-RI (p55 ou TNFRSF1A) e sTNF-RII (p75 ou TNFRSF1B). O primeiro receptor é expresso por praticamente todos os tipos de células nucleadas, enquanto o segundo, o é principalmente por monócitos, macrófagos, linfócitos T, linfócitos B e células NK (Aggarwal, 2003; Hehlhans e Pfeffer, 2005; Blüml *et al.*, 2012). A ocupação dos sTNF-RI pode induzir a proliferação, diferenciação, sobrevivência ou apoptose de diferentes células (Brietzke *et al.*, 2008). O TNF- α tem como principal mediador de suas ações o sTNF-RI, e o sTNF-RII atua principalmente

como modulador e potencializador da ligação do TNF- α com o sTNF-RI (Aderka, 1996).

A interação entre o TNF- α e seus receptores é complexa. Estes receptores solúveis de TNF- α atuam como: antagonistas do TNF- α , proteínas transportadoras de TNF- α , estabilizadores de liberação lenta de TNF- α , e inibidores dos efeitos de altas concentrações do TNF- α (Aderka, 1996).

O sTNF-RI parece ter papel crucial na resposta imune para vários agentes infecciosos. Um exemplo dessa ação protetora é a participação do sTNF-RI na formação de granulomas. Verifica-se também este papel em camundongos para conter a dispersão de micobactérias (Flynn *et al.*, 1995; Jacobs *et al.*, 2000); para proteger contra infecção por *Leishmania major* e por alguns vírus (Nashleanas *et al.*, 1998; Blüml *et al.*, 2012).

O sTNF-RII não desempenha papel protetor tão eficiente contra agentes infecciosos. Entretanto, sugere-se que esteja envolvido na proteção de camundongos contra infecção pulmonar bacteriana, e na co-estimulação específica de linfócitos T, especialmente T CD8⁺ em infecções viróticas e bacterianas (Blüml *et al.*, 2012).

As concentrações elevadas dos sTNF-R têm sido observadas em diversas doenças em fase ativa, como artrite reumatóide, tuberculose, hanseníase, malária, febre tifóide e endocardite bacteriana aguda (Kern *et al.*, 1992; 1993; Keuter *et al.*, 1994; Alsalameh *et al.*, 1999; Munk *et al.*, 1999; Alessandri *et al.*, 2006).

Verificou-se na leishmaniose visceral humana não tratada concentrações séricas elevadas de sTNF-RI e sTNF-RII em comparação com indivíduos saudáveis. Ao longo do tratamento e da remissão da doença as concentrações de sTNF-RI e sTNF-RII diminuíram significativamente, enquanto nos casos de doença refratária tais valores permaneceram elevados. Observou-se também que o retorno da doença ativa coincidiu com a elevação das suas concentrações séricas (Zijlstra *et al.*, 1995).

Em pacientes com tuberculose pulmonar não tratados também foram detectadas elevadas concentrações séricas de sTNF-RI e sTNF-RII. Verificou-se, após seis meses de tratamento, redução das suas concentrações para valores próximos dos basais (Alessandri *et al.*, 2006).

Na PCM, as concentrações séricas dos sTNF-RI e sTNF-RII já foram detectadas significativamente elevadas em pacientes com a sua forma ativa, quando comparadas às de indivíduos saudáveis. O sTNF-RII apresenta concentrações mais elevadas em pacientes com PCM aguda, e estas diminuem progressivamente ao longo de dois anos de tratamento. Nos pacientes com PCM crônica, as concentrações de sTNF-RII permanecem constantes ao longo do tratamento. Nestes pacientes, as concentrações de sTNF-RI foram mais elevadas, havendo decréscimo gradual de seus valores ao longo do tratamento. Os pacientes com PCM aguda, apresentaram elevação das concentrações de sTNF-RI ao longo dos dois anos de tratamento (Corvino *et al.*, 2007).

Moura *et al.* (2009) detectaram elevadas concentrações séricas de sTNF-RI e sTNF-RII em pacientes com PCM crônica não tratados. Ao longo de 36 meses de tratamento verificou-se redução expressiva nos seus valores, principalmente de sTNF-RI. Observou-se associação entre a cura clínica dos pacientes, evidenciada pela ausência de sinais e sintomas da PCM, e redução nas concentrações séricas de sTNF-RI e sTNF-RII. Este resultado demonstrou a aplicabilidade desses marcadores sorológicos como possíveis parâmetros laboratoriais para monitoramento de doença ativa em pacientes com PCM.

2.8 Tratamento da PCM

O tratamento da PCM pode ser realizado com diferentes tipos de medicamentos, uma vez que o fungo *P. brasiliensis*, ao contrário de outros fungos patogênicos, é sensível à grande parte das medicações antifúngicas, apresentando inclusive sensibilidade aos sulfamídicos (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). De forma geral, o tratamento da PCM é de longa duração e está diretamente relacionado à gravidade das manifestações clínicas da doença. O longo tempo de tratamento é aplicado não apenas para permitir que as manifestações clínicas sejam controladas, como também para evitar recaída da doença. Outras medidas além da terapia antifúngica devem ser adotadas no acompanhamento dos pacientes, como avaliação nutricional, tratamento odontológico, tratamento de sequelas e prevenção e tratamento de co-morbidades (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006; Ramos-e-Silva e Saraiva, 2008).

Diferentes centros de referência e serviços de atendimento a pacientes com PCM seguem protocolos de tratamento distintos, apesar da existência do Consenso em PCM que indica os esquemas terapêuticos de escolha para o tratamento da doença. Essa dificuldade na padronização do tratamento da PCM está relacionada a diversos fatores como problemas de adesão dos pacientes ao tratamento, disponibilidade da medicação escolhida no sistema público de saúde e às condições sociais e econômicas dos pacientes (Marques, 2003).

As drogas clássicas utilizadas no tratamento da PCM são as sulfonamidas, a anfotericina B e os derivados azólicos.

Até 1940, a PCM era considerada uma doença incurável, quando a sulfamidopiridina foi introduzida em seu tratamento, com bons resultados (Ribeiro, 1940). Outros derivados de sulfonamidas como a sulfadiazina e a combinação sulfametoxazol-trimetoprim também foram muito empregados no tratamento da PCM,

sendo esta associação a mais usada atualmente (Brummer *et al.*, 1993). A combinação oral de sulfametoxazol-trimetoprim (800/160mg a cada 8 ou 12 horas) é um dos esquemas terapêuticos mais utilizados no tratamento da PCM devido à sua disponibilidade gratuita pelo sistema público de saúde em praticamente todo território brasileiro, a seu custo de tratamento relativamente baixo, e à sua toxicidade geralmente inexpressiva. Sua aplicação é mais indicada em casos em que a doença é benigna ou localizada, apesar de ser utilizada também em casos mais graves. Essa combinação medicamentosa é a mais usada para o tratamento de crianças devido à apresentação de formulação oral em xarope que facilita a utilização do medicamento. Além disso, é muito aplicada como tratamento de manutenção após utilização de outras medicações de ataque na primeira fase da doença. Entretanto, o tratamento com essa combinação pode ser menos eficaz devido à necessidade de prolongado tempo de uso da medicação, que pode variar de 1 a 5 anos, o que leva em alguns casos, ao abandono do tratamento pelo paciente. Isso pode gerar taxas de recidivas da doença de até 25%, acompanhadas de resistência do fungo ao tratamento. De fato, as recidivas da doença podem chegar a 30% em pacientes após 10 anos de interrupção do tratamento com a combinação sulfametoxazol-trimetoprim (Del Negro, 1974; Restrepo e Arango, 1980; Boreli, 1987; Brummer *et al.*, 1993; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

A anfotericina B é um antibiótico poliênico de ação fungistática e fungicida, isolado do *Streptomyces spp.* Age ligando-se à molécula do ergosterol da membrana citoplasmática dos fungos formando o complexo esterol-polieno, que altera a permeabilidade da membrana plasmática fúngica. Essa ação provoca aumento do influxo de prótons, e efluxo de potássio, alteração consequente da permeabilidade da membrana ao potássio, fosfatos e glicose, o que promove inibição da síntese intracelular de macromoléculas. A anfotericina B foi a segunda droga introduzida no tratamento da

PCM, em 1958 (Lacaz e Sampaio, 1958) e desde então amostras de *P. brasiliensis* permanecem sensíveis à sua ação. Atualmente, é a droga de escolha em casos de PCM grave e disseminada, infecção refratária e infecção associada à imunossupressão, em que há necessidade de internação do paciente (De Campos *et al.*, 1984; Ameen *et al.*, 2010). De forma geral, deve ser utilizada como terapia intravenosa inicial até a remissão da sintomatologia da doença, sendo a seguir introduzida outra medicação oral para manutenção do tratamento, geralmente uma sulfonamida. A anfotericina B apresenta muitos efeitos colaterais, podendo levar à toxicidade sistêmica, devendo por isso, ser utilizada com cautela (Ferreira, 2009). Os seus efeitos colaterais são significativos, causados pela liberação de prostaglandina E2, inclusive com riscos de serem irreversíveis. Caracterizam-se principalmente por insuficiência renal aguda, hipertensão arterial sistêmica, alterações eletrocardiográficas; além de vários efeitos agudos transitórios como hipopotassemia, calafrios, taquicardia e taquipneia. A dose diária varia de acordo com a tolerância do paciente, podendo chegar até 1,0 mg/kg/dia ou em dias alternados (Ramos-e-Silva e Saraiva, 2008). A duração do tratamento depende do quadro clínico do paciente e de sua resposta à medicação. Casos de recidiva da doença, mesmo com terapia de manutenção com sulfonamidas podem ocorrer em até 30% dos pacientes (Brummer *et al.*, 1993). A incorporação da anfotericina B aos lipossomas, que são vesículas de fosfolípidios, aumenta em 15 vezes a sua ligação ao ergosterol, o que permite redução de sua dose, sem perda de sua eficácia e consequente diminuição de efeitos colaterais, permitindo segurança terapêutica em muitas circunstâncias clínicas. É reservada para a intolerância ao uso de anfotericina B.

A introdução dos derivados azólicos no tratamento da PCM, nos anos 1970, melhorou o prognóstico dos pacientes e facilitou seu manejo (Brummer *et al.*, 1993; Ferreira, 2009). Os derivados azólicos podem ser facilmente administrados, apresentam

excelente atividade contra o fungo, são geralmente bem tolerados pelos pacientes e provocam poucos efeitos colaterais. O cetoconazol foi o primeiro derivado azólico aplicado no tratamento da PCM, sendo ainda utilizado nos dias atuais. O tratamento com cetoconazol (200 a 400 mg/dia) é uma opção de menor custo comparada a outros antifúngicos, e que apresenta alta eficácia com mais de 90% dos pacientes respondendo positivamente à terapia. Além disso, em pacientes avaliados após três anos de interrupção do tratamento com cetoconazol, foi verificada taxa de recidiva da doença inferior a 11%. Entretanto, por causar hepatotoxicidade e por apresentar interações com muitos tipos de drogas, seu uso não é tão disseminado. O itraconazol (100 a 200 mg/dia) é a opção terapêutica que permite o controle das formas leves e moderadas da PCM em menor período de tempo, e com menores taxas de recidiva, variando de 3 a 5%. Apesar de ser considerado a melhor opção para o tratamento da PCM, em termos de eficácia e tempo de tratamento, o itraconazol não é o medicamento mais utilizado na rotina ambulatorial uma vez que não está disponível de forma contínua no sistema público de saúde em muitas cidades brasileiras. O fluconazol (200 a 400 mg/dia) é menos ativo contra o *P. brasiliensis*, mas apresenta excelente penetração no sistema nervoso, sendo útil no tratamento de neuroparacoccidioidomicose (Brummer *et al.*, 1993; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006; Ferreira, 2009).

Outros medicamentos têm sido testados para uso no tratamento da PCM. O voriconazol é um derivado triazólico de segunda geração que apresenta eficácia e tolerância comparável ao itraconazol, e pode ser utilizado por via oral ou intravenosa, inclusive na neuroparacoccidioidomicose. A terbinafina demonstrou atividade semelhante a do itraconazol em estudos *in vitro*, mas ainda há poucos relatos de seu uso. Algumas outras drogas como as caspofunginas, o posaconazol e o saperconazol têm sido testadas para o tratamento da PCM, mas ainda não há evidências para utilização

segura e eficaz destes medicamentos na rotina ambulatorial (Ferreira, 2009; Ameen *et al.*, 2010).

A busca por drogas mais efetivas e com menos efeitos colaterais para o tratamento da PCM é contínua, visto que os medicamentos mais utilizados ainda apresentam problemas como necessidade de prolongado tempo de utilização, efeitos adversos, alto custo e resistência do *P. brasiliensis*.

2.9 Controle de cura e profilaxia da PCM

Durante o tratamento para PCM, os pacientes devem ser avaliados mensalmente nos três primeiros meses. Com a evolução positiva do paciente as avaliações passam a ser trimestrais até o fim do tratamento. Exames radiológicos e sorológicos devem ser solicitados a cada seis meses, ou em menos tempo caso a resposta clínica do paciente não seja satisfatória. Após o fim do tratamento, os pacientes devem ser acompanhados a cada seis meses ao longo do primeiro ano. A partir deste período, permanecendo o paciente com os critérios de cura, este deverá receber alta (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

De acordo com o Consenso em PCM, os critérios aplicados para o controle de cura da doença devem ser clínicos, radiológicos e imunológicos (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

Os critérios clínicos baseiam-se na regressão dos sinais e sintomas da PCM, incluindo a cicatrização das lesões tegumentares, involução das linfadenopatias e recuperação do peso corporal. Sintomatologia residual decorrente de sequelas da PCM, sejam respiratórias, laríngeas, gastrintestinais, adrenais ou neurológicas, não representam necessariamente atividade da doença.

Os critérios radiológicos baseiam-se na estabilização do padrão das imagens cicatriciais radiológicas pulmonares em duas telerradiografias registradas com intervalo de três meses.

Os critérios sorológicos baseiam-se na negatificação dos títulos de imunodifusão dupla ou estabilização do título em valores baixos, menores ou iguais a 1:2, observadas em duas amostras de soro coletadas com intervalo de seis meses, após o período de tratamento recomendado.

A palavra “cura” ainda não é a mais apropriada para ser referir aos pacientes tratados para PCM. Pela dificuldade de erradicação do fungo, os pacientes têm o risco potencial de apresentar recidiva tardia a qualquer momento; assim, o termo mais adequado é “cura clínica” ou “cura aparente”. Caso ocorram alterações clínicas, radiológicas ou sorológicas após a interrupção do tratamento que evidenciem a recidiva da doença, o tratamento deverá ser prontamente reintroduzido (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

O momento ideal para interrupção do tratamento da PCM apresenta-se ainda como uma questão não totalmente resolvida. Apesar da indicação de esquemas terapêuticos do Consenso em PCM, na rotina ambulatorial muitas vezes, tempos de tratamento diferentes daqueles aconselhados são utilizados para garantir maior segurança aos pacientes. De fato, a avaliação de todos os critérios de cura, especificamente os sorológicos não é aplicada a grande parte dos pacientes atendidos, principalmente na rede pública de saúde de alguns estados. A dificuldade em algumas regiões brasileiras para realização de testes sorológicos no Sistema Único de Saúde para verificação de títulos de anticorpos anti-*P. brasiliensis* faz com que na maioria das vezes, os pacientes sejam considerados curados apenas baseado em critérios clínicos. Além disso, a discrepância encontrada em alguns casos entre níveis de anticorpos anti-

P. brasiliensis e a condição clínica torna inviável a avaliação sorológica para monitoramento de pacientes. Estes fatos evidenciam a necessidade da aplicação de novos parâmetros para critério de cura, especificamente laboratoriais para monitoramento de pacientes durante e após o tratamento. Uma vez que a imunidade celular é reconhecida como o principal mecanismo de defesa na PCM, uma possibilidade para avaliação sorológica de pacientes que poderia melhor se correlacionar com o quadro clínico, seria o monitoramento da resposta imune celular (Camargo, 2008).

Considerando-se que ainda não foi completamente descrito o *habitat* natural do *P. brasiliensis*, e que o solo seja o principal foco de infecção, a profilaxia da PCM continua sendo tema nebuloso. Diversos estudos experimentais apresentam como objetivo o desenvolvimento de vacinas para PCM que possam ser utilizadas nas populações alvo do fungo. Vários antígenos têm sido testados experimentalmente e demonstram aplicabilidade na profilaxia da PCM, uma vez que tornam a resposta imune mais efetiva (Taborda *et al.*, 1998; Pinto *et al.*, 2000; Diniz *et al.*, 2004; Reis *et al.*, 2008; do Nascimento Martins *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2012; Travassos e Taborda, 2012). Entretanto, até o momento não existe uma vacina para PCM que seja aplicada na profilaxia de seres humanos.

3 JUSTIFICATIVA

A PCM é considerada a décima causa de morte por doenças infecciosas e parasitárias no Brasil, acomete em sua maioria indivíduos em idade produtiva, e gera ônus de alcance ainda não estabelecido, mas certamente de impacto psicossocial importante. A doença apresenta grande variação clínica em suas manifestações, com formas graves e incapacitantes, e algumas vezes fatais. Paralelo a isso, deve-se considerar também o longo período de tratamento necessário para a obtenção de cura clínica dos pacientes e a ausência de critérios de cura bem estabelecidos. Em grande porcentagem de pacientes tratados e considerados curados, observa-se a recidiva da doença em até 10 anos após o tratamento específico. Dessa forma, o momento ideal para a interrupção do tratamento é muitas vezes de difícil decisão, uma vez que os critérios de cura não são absolutamente confiáveis. Diante disto, a proposta desse estudo foi avaliar pacientes durante o tratamento para PCM e após o seu término por 42 meses, para verificar a ocorrência de recidiva e a associação entre a recorrência da doença e elevação dos níveis dos marcadores imunológicos IgG total, sTNF-RI, sTNF-RII, CCL3, CXCL9, CCL11 e CCL24. Os resultados deste trabalho seguem o objetivo de auxiliar para a melhor compreensão e controle da PCM, e contribuir para reduzir o seu impacto biopsicossocial.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil clínico e imunológico de pacientes com PCM durante o tratamento e por até 42 meses após a sua interrupção, por meio da dosagem dos valores séricos dos marcadores sorológicos IgG anti-*P. brasiliensis*, receptores solúveis de TNF- α e quimiocinas, para verificar a aplicabilidade de tais parâmetros no controle de cura dos pacientes.

4.2 Objetivos específicos

Dosar os níveis do anticorpo IgG anti-*P. brasiliensis* com utilização de dois antígenos distintos (Mexo e rPb27), de sTNF-RI, sTNF-RII, CCL3, CXCL9, CCL11 e CCL24, no soro de pacientes em um único momento durante o tratamento específico para PCM;

Dosar semestralmente, por até 42 meses, os níveis dos marcadores sorológicos citados anteriormente, no soro de pacientes submetidos ao tratamento específico para PCM e considerados clinicamente curados;

Verificar o perfil dos marcadores sorológicos analisados nos soros dos pacientes, associar à condição clínica destes no início do tratamento e após seu término, e verificar a possível relação entre os níveis séricos dos marcadores e o retorno da atividade da doença.

5 CASUÍSTICA E METODOLOGIA

O desenho deste estudo foi baseado na descrição e acompanhamento de uma série de casos de pacientes com PCM atendidos no Ambulatório de Paracoccidioidomicose do Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias (CTR-DIP), Anexo Orestes Diniz, do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG.

Avaliações clínica e imunológica foram realizadas em 26 pacientes em um único momento durante o tratamento da PCM (com tempos de tratamento variando entre 1 mês a dois anos), e após o término deste por 42 meses, no período de março de 2009 a setembro de 2012.

Todos os participantes do estudo receberam orientações explicando os objetivos do trabalho, sua importância, seus riscos e benefícios. Os pacientes foram esclarecidos sobre a participação voluntária e o direito de desistir do estudo a qualquer momento. Todos os participantes do estudo assinaram, após esclarecimento, um termo de consentimento que autorizava sua inserção no trabalho (APÊNDICE A).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG com o parecer nº ETIC0089.0.410.4100-09 (ANEXO A). O Ambulatório de PCM está localizado no centro de referência para doenças infecciosas e parasitárias do Estado de Minas Gerais, recebendo e acompanhando pacientes desde 1979 sob autorização dos comitês de ética em pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura de Belo Horizonte e da UFMG. O estudo presente constitui parte do programa de acompanhamento de pacientes com PCM desenvolvido no ambulatório, com exames realizados rotineiramente e já aprovados por outros estudos (ANEXO B).

5.1 População estudada

Todos os pacientes do estudo foram tratados durante 36 meses com sulfametoxazol-trimetoprim isolado ou associado à anfotericina B, itraconazol ou cetoconazol. Dos 26 pacientes analisados, 19 constituíram o grupo dt, nos quais foram realizadas avaliação clínica e sorológica entre o primeiro mês e o segundo ano de tratamento. Dos 19 pacientes, nove estavam no primeiro mês de tratamento; quatro estavam entre o quarto e o 12º mês de tratamento; e seis estavam entre 13º e 24º mês de tratamento. Durante todo o período de 36 meses de tratamento os pacientes foram acompanhados, e novas avaliações clínicas e sorológicas foram realizadas, pelo menos três vezes por ano (Moura *et al.*, 2009). Para este trabalho, apenas uma avaliação clínica e sorológica de cada paciente durante o tratamento foi considerada.

A partir do término do tratamento as avaliações clínicas e sorológicas foram semestrais. Dos 26 pacientes, 22 foram submetidos às avaliações no dia estabelecido para o término do tratamento (t0); 22 pacientes após seis meses do término do tratamento (t6); 18 pacientes após 12 meses (t12); 13 pacientes após 18 meses (t18); nove pacientes após 24 meses (t24); seis pacientes após 30 meses (t30); cinco pacientes após 36 meses (t36); e três pacientes após 42 meses do término do tratamento (t42). Em cada avaliação clínica, os pacientes foram submetidos à anamnese detalhada e exame clínico geral, conforme o protocolo padronizado para o atendimento no ambulatório de paracoccidiodomicose do CTR-DIP-UFMG (APÊNDICE B).

Na data das avaliações clínicas, uma amostra de sangue foi coletada de cada paciente para posterior avaliação sorológica dos marcadores imunológicos IgG anti-*P. brasiliensis*, sTNF-RI, sTNF-RII, CCL3, CXCL9, CCL11 e CCL24. As dosagens dos marcadores imunológicos foram feitas por meio da técnica de ELISA, no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular (LICM) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da

UFMG, coordenado pelo Professor Alfredo Miranda de Góes. Amostras de sangue de 10 indivíduos saudáveis oriundos do ICB-UFMG foram coletadas para formação do grupo controle negativo para a realização da técnica de ELISA e obtenção do valor do *cut-off*.

5.1.2 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo todos os pacientes atendidos no ambulatório de PCM do CTR-DIP-UFMG, de março de 2009 a junho de 2012, que estavam sob tratamento específico e que completariam 36 meses de tratamento neste período, sem outras doenças concomitantes, e que concordaram em participar deste trabalho.

A amostra analisada neste estudo foi de conveniência, isto é, não foi realizado cálculo amostral para determinação do número de pacientes, uma vez que a PCM não é doença de notificação compulsória. A prevalência da PCM não é completamente conhecida; portanto, foram avaliados os pacientes atendidos no ambulatório de PCM, para onde são referenciados todos os pacientes do estado de Minas Gerais que procuram atendimento no Sistema Único de Saúde; que foram diagnosticados como portadores de PCM; que preenchiam os critérios para o estudo e que aceitaram dele participar.

5.1.3 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os pacientes que se recusaram dele participar, os que o abandonaram ao longo dos meses de tratamento, e aqueles com outras doenças como toxoplasmose, criptococose, mononucleose infecciosa, imunodeficiência adquirida, tuberculose, sarcoidose ou linfoma, ou outras nosologias determinadas por estudo anatomopatológico de material de biopsia pela evidência de alterações clínicas.

5.2 Avaliação sorológica dos pacientes

5.2.1 Obtenção e preparação das amostras de sangue

O sangue dos pacientes analisados foi coletado em tubos a vácuo sem anticoagulante. As amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 rpm, por 10 minutos. As amostras de soro foram transferidas para microtubos Eppendorf de 1,5 mL, identificadas com as iniciais dos pacientes e as datas das coletas, e armazenadas a -20°C até a realização dos experimentos.

5.2.2 Preparação e obtenção dos antígenos Mexo e rPb27

Os antígenos utilizados nesse estudo foram preparados e obtidos previamente por outros estudantes do LICM.

O antígeno Mexo foi obtido da cepa Pb18, originária de uma amostra virulenta coletada de um paciente (Diniz *et al.*, 1999). As células leveduriformes do fungo *P. brasiliensis* foram cultivadas no meio ágar YPD (0,5% de extrato de levedura, 0,5% de peptona, 1,5% de D-glicose e 1,5% de ágar, pH 7,0) (Sigma, USA) a 35°C e coletadas no sétimo dia de cultivo. As células leveduriformes foram removidas do meio de cultura e submetidas à agitação com vórtex em solução salina tamponada - PBS (*Phosphate Buffered Saline*) 0,05 mol L⁻¹, pH 7,4, por 30 s. A solução resultante foi centrifugada a 10000 rpm por 10 min a 4°C, e posteriormente o sobrenadante foi recolhido. A concentração de proteína no sobrenadante foi quantificada por meio do método de Bradford (Bradford, 1976), sendo essa preparação utilizada como o antígeno Mexo.

O antígeno rPb27 foi obtido como descrito a seguir. A sequência de Pb27 recombinante já havia sido previamente clonada pelo nosso grupo de pesquisa no vetor pGEX 4T-2 (Gibco BRL) (GST), como descrito por Reis *et al.* (2008). Para facilitar o

procedimento, a sequência de rPb27 foi transferida, de acordo com instruções do fabricante, para o vetor de expressão pET-DEST 42 (Invitrogen, Carlsbad, USA), o qual permitiu a expressão da proteína recombinante com uma porção terminal de histidina. A proteína rPb27 foi expressa em *Escherichia coli* que produz uma proteína recombinante com uma porção terminal de histidina. A purificação da proteína recombinante foi realizada em uma coluna de níquel de 5 mL His Trap HP (GE Life Sciences, Buckinghamshire, Inglaterra).

5.2.3 Dosagem sérica dos marcadores sorológicos avaliados

A técnica de ELISA para a dosagem de IgG anti-*P. brasiliensis* utilizando Mexo e rPb27 como antígenos, sTNF-RI, sTNF-RII, CCL3, CXCL9, CCL11 e CCL24 foi padronizada antes das avaliações definitivas das amostras dos pacientes. Como a dosagem de IgG foi realizada utilizando-se uma técnica *in house*, as concentrações dos reagentes utilizados, do conjugado IgG, e a diluição dos soros amostra e controle negativo, foram testadas para obtenção dos valores ideais para a realização da técnica. Para as dosagens dos demais marcadores sorológicos foram testadas apenas as diluições dos soros amostra e controle negativo. Para tais marcadores, a técnica de ELISA foi realizada de acordo com as especificações do fabricante dos kits utilizados, que já determinava as concentrações dos reagentes, dos anticorpos de captura e dos anticorpos de detecção de cada marcador avaliado. Para todas as dosagens, as amostras de soro dos pacientes e do controle negativo foram testadas em duplicata.

5.2.3.1 Dosagem de IgG anti-*P. brasiliensis* nas amostras de soro utilizando Mexo e rPb27 como antígenos

A dosagem de IgG anti-*P. brasiliensis* nos soros dos pacientes analisados e do grupo controle foi realizada por meio da técnica de ELISA em placas de poliestireno de 96 poços com fundo chato (Nunc-ImmunoPlate PolySorp Surface, USA). As placas foram sensibilizadas com 100 µL/poço de solução antigênica com a concentração de 1 µg de antígeno (Mexo ou rPb27) por 100 µL de solução tampão carbonato-bicarbonato, pH 9,6 e incubadas a 4°C por 12 horas. Após o período de incubação, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS 0,05 mol L⁻¹ com 0,5% de Tween-20 (solução de lavagem). Para evitar reações inespecíficas, as placas foram bloqueadas com 200 µL/poço de solução de PBS-caseína 1,26% e incubadas a 37°C, por 1 hora. Após esta etapa, elas foram lavadas cinco vezes com a solução de lavagem.

A seguir, as placas foram incubadas por 1 hora a 37°C com 100 µL/poço das amostras de soros dos pacientes e do grupo controle negativo diluídas a 1:400 em PBS-caseína 0,25%, em duplicata. Após a incubação, as placas foram lavadas como anteriormente e novamente incubadas por 1 hora a 37°C com 100 µL/poço do conjugado anti-IgG humano específico para cadeia gama, marcado com peroxidase (Dako, USA), diluído a 1:10.000 em PBS-caseína 0,25%.

Após esta incubação, as placas foram lavadas dez vezes com solução de lavagem. A seguir o substrato 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMBPlus, Bio-tecnologia, Brasil) foi adicionado às placas que foram incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 50 µL/poço de H₂SO₄ 2 mol L⁻¹. A leitura da reação foi realizada em um leitor de ELISA (Anthos 2010, Cambridge, England) com filtro a 450 nm. As amostras contendo valores de absorbância iguais ou superiores ao ponto de corte estabelecido pela curva ROC (*Receiver Operator*

Characteristic) foram consideradas reativas, e as que apresentaram valores de absorvância abaixo do ponto de corte foram consideradas não reativas.

5.2.3.2 Dosagem de sTNF-RI, sTNF-RII, CCL3, CXCL9, CCL11 e CCL24 nas amostras de soro

As concentrações dos receptores solúveis de TNF- α e das quimiocinas foram dosadas por meio da técnica de ELISA com kits específicos para cada marcador sorológico (Duoset, R&D Systems, Minneapolis, USA). A técnica de ELISA foi realizada de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante dos kits.

As placas de 96 poços (Nunc-ImmunoPlate PolySorp Surface, USA) foram sensibilizadas com os anticorpos de captura de cada marcador na concentração indicada pelo fabricante. Foram adicionados em cada poço 100 μ L da solução de PBS 0,15 mol L⁻¹ acrescida do volume específico dos respectivos anticorpos de captura. As placas foram incubadas por doze horas à temperatura ambiente, e a seguir foram lavadas três vezes com solução de PBS 0,15 mol L⁻¹ contendo 0,05% de Tween-20 (solução de lavagem). As ligações não específicas foram evitadas com a incubação das placas com 300 μ L/poço de reagente diluente (PBS 0,15 mol L⁻¹ contendo 1% de albumina de soro bovino) por 2 horas à temperatura ambiente. A seguir, as placas foram lavadas por três vezes com a solução de lavagem, e 100 μ L das amostras de soro dos pacientes e do grupo controle negativo diluídas a 1:10 em duplicata foram acrescentados a cada poço. Para cada marcador sorológico foi também feita a dosagem em duplicata do padrão fornecido pelo fabricante, para construção da respectiva curva padrão com sete pontos de diluição e posterior obtenção dos valores em pg/mL. Após a incubação das amostras e do padrão por 2 horas à temperatura ambiente, as placas foram lavadas por três vezes com solução de lavagem. As placas foram então incubadas durante 2 horas à

temperatura ambiente com 100 μL /poço do respectivo anticorpo de detecção de cada marcador sorológico diluído no reagente diluente. Novamente as placas foram lavadas por três vezes, e incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente com 100 μL /poço de estreptavidina conjugada a peroxidase diluída no reagente diluente a 1:200, evitando contato direto com a luz. Após essa etapa, as placas foram lavadas por três vezes, e incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente com 100 μL /poço de 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMBPlus, Bio-tecnologia, Brasil). A reação foi interrompida com o acréscimo de 50 μL /poço de H_2SO_4 2 mol L^{-1} . A leitura da densidade ótica da reação foi feita em um leitor de ELISA (Anthos 2010, Cambridge, England) com filtros a 540 nm e 450 nm. A densidade ótica final foi obtida com a subtração da leitura da reação a 450 nm de 540 nm. As concentrações das amostras em pg/mL foram obtidas por meio da construção de uma curva padrão para cada placa feita, com a análise por regressão linear no programa Prism 4.0 (GraphPad, CA, USA) e obtenção da curva padrão $y = ax + b$. As amostras contendo valores de concentrações iguais ou superiores ao ponto de corte estabelecido pela curva ROC foram consideradas reativas, e as que apresentaram valores de concentração abaixo do ponto de corte foram consideradas não reativas. Os limites de detecção de cada kit foram: 5,3 pg/mL para sTNF-RI; 4,0 pg/mL para sTNF-RII; 2,0 pg/mL para CCL3; 8,0 pg/mL para CXCL9; 3,3 pg/mL para CCL11 e 1,0 pg/mL para CCL24.

5.3 Análise estatística dos dados

Para análise dos dados sorológicos obtidos com a técnica de ELISA, utilizou-se o programa Prism 4.0 (GraphPad Prism, CA,USA). A normalidade de distribuição dos dados sorológicos foi testada, e posteriormente foram construídos gráficos de dispersão, com as medianas representadas por linhas. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para

análise não-paramétrica dos dados e para comparação de dados não-pareados de dois grupos. As diferenças entre todos os grupos foram avaliadas com o teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn de comparação múltipla. Para verificar a existência de correlação estatística entre os diferentes períodos de tempo avaliados e níveis séricos dos marcadores sorológicos testados, utilizou-se o teste de Spearman, com intervalo de 95% de confiança.

Análise de regressão para avaliar dados longitudinais com medidas repetidas utilizando o modelo GEE (Generalized Estimation Equation) com o software R2.15 foi realizada para verificar a correlação entre os parâmetros sorológicos e epidemiológicos avaliados.

Curvas ROC foram construídas para definição dos valores de corte das concentrações séricas dos marcadores sorológicos utilizando o programa MedCalc Statistical (Broekstraat, Mariakerke, Belgium). O valor do ponto de corte escolhido para cada marcador sorológico apresentava máximas sensibilidade e especificidade.

Para todas as análises, o nível de significância estatística foi estabelecido em $p < 0,05$.

6 ARTIGO

Immunological and clinical follow-up to assess treatment response in paracoccidioidomycosis patients at the hospital of the Federal University of Minas Gerais, Brazil.

Lílian da Silva Santos¹, Weverton César Siqueira¹, Samuel Gonçalves da Cruz², Camila Cristiane Silva Camelo², Valdirene Silva Siqueira², Carolina Venâncio Barbosa², Alexandre VA Ambrósio², Ana Carla de Carvalho Dantônio², Alfredo Miranda de Goes³, Ênio Roberto Pietra Pedroso^{1,2}

¹Health Sciences Pos-Graduate Program: Infectology and Tropical Medicine, Faculty of Medicine of the Federal University of Minas Gerais, Ave. Alfredo Balena, 190, 5º floor, Belo Horizonte, Minas Gerais, Postal Code 30130-100, Brazil; ²Faculty of Medicine of the Federal University of Minas Gerais, Ave. Alfredo Balena, 190, Belo Horizonte, Minas Gerais, Postal Code 30130-100, Brazil; ³Department of Biochemistry and Immunology of the Institute of Biological Sciences of the Federal University of Minas Gerais, Ave. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Postal Code 31270-901, Brazil

Corresponding author: Lílian da Silva Santos

Corresponding author's e-mail: lilianufop@yahoo.com.br

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis with high prevalence in Brazil. This study aimed to evaluate patients treated for PCM, to verify the use of serological markers in the control of cure of this disease. 26 patients had blood samples collected during the treatment and after its interruption, until 42 months of follow-up. Serological markers were measured by ELISA. The concentrations of IgG, sTNF-RI and sTNF-RII remained high during all the period analyzed. CCL3 was detected with high concentrations during the treatment, and decreased along the time, without reaching basal values for all patients. 95% of patients presented concentrations of CCL11 below the cut-off point during the treatment, with increase from the moment of its interruption. Concentrations of CCL24 did not change along the time. The concentrations of CXCL9 remained low during and after the treatment for almost all patients. The results suggest that IgG, sTNF-RI, sTNF-RII, CCL11 and CCL24 were not indicated for monitoring patients in the control of cure of PCM, since its levels remained high for years. Although CCL3 and CXCL9 had presented low concentrations associated to clinical cure, the unstable values found show the insecurity to use those markers in the control of cure of PCM.

KEYWORDS

Paracoccidioidomycosis, control of cure, serological markers, IgG levels, soluble receptors of TNF- α , chemokines

Financial Support: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - (CAPES/Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG/Brazil) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil).

1 INTRODUCTION

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic disease caused by a complex group of fungi within the *Paracoccidioides* genus, formed by four distinct phylogenetic lineages known as PS2, PS3, S1, and Pb01 [1,2]. The infection is acquired by inhalation of the mycelial form of the fungus, which once in the alveoli transform into the yeast infective form [3]. PCM is the most prevalent mycosis in Latin America countries with 80% of cases occurring in Brazil followed by Venezuela, Colombia, Ecuador and Argentina [4]. Men from 30 to 50 years old, living and working in rural areas are the most affected group. The number of patients clinically diagnosed with PCM may represent only a small portion of infected individuals [5]. In endemic areas, up to 50% of inhabitants have been exposed to the fungus, but only a minority develops the disease [4]. In Brazil, the mortality rate of PCM for 1.000.000 of inhabitants was 1.45 between 1980-1995, and 0.9-1.0 between 1996-2006. According to this mortality rate, the number of annual new cases in Brazil is about 3360 [6].

PCM presents two forms of disease: the acute or juvenile and the chronic or adult forms. The first one affects children and adolescents of both genders, and represents 5-15% of all cases. This form is characterized by an aggressive evolution, frequently with skin lesions, digestive symptoms and lymphadenopathy. The chronic form is more common in male adults, and has a slowly progression with pulmonary symptoms present in more than 90% of patients [4, 7, 8, 9].

The evolution of PCM is associated to many factors as host immune response and fungus virulence. The cellular immune response is known as essential for host defense against the fungus [10]. Mild and chronic forms of PCM are related to the production of low levels of antibodies whereas patients with severe and acute PCM

present high levels of antibodies [11]. It is suggested that the Th1 pattern of immunological response is associated with asymptomatic and mild forms of PCM, and the Th2 pattern would be related to severe disease [12, 13, 14, 15, 16, 17, 18]. Patients with acute disease generally have high levels of type 2 cytokines such as IL-4, IL-5, IL-10 and TGF- β [19]. Patients with chronic disease seem to have an intermediate pattern of immune response with Th1 (IFN- γ , IL-2, IL-12) and Th2 cytokines [10]. Some factors may influence the development of a Th1 or a Th2 pattern of immune response as host and pathogen genetic background, fungal load and virulence, but there is not a consensus about this subject in PCM [20, 21].

Different drugs are used to treat patients with PCM, as sulfonamides (sulfamethoxazole-trimethoprim), amphotericin B and imidazole derivatives (ketoconazole, itraconazole, fluconazole). The drug selection is generally based on disease severity, but the treatment cost is a relevant factor in the drug choice [8].

The determination of the exact time to discontinue the therapy of patients with PCM remains an important issue. The serological cure criteria applied in patients treated for PCM are not reliable in some cases. Many patients considered clinically cured, present high levels of antibodies even after years of interruption of treatment. Actually, there is not a reliable laboratorial parameter that is associated with disease activity in patients with PCM that allows the conclusion that they are cured.

Disease activity of many disorders as arthritis, tuberculosis, leprosy, malaria, typhoid fever and endocarditis has been associated with high serum concentrations of soluble TNF- α receptors (sTNF-R) [22, 23, 24, 25, 26, 27]. Some chemokines also present an association between their high concentrations and active disease [27, 28, 29, 30].

With PCM, the relation between high concentrations of sTNF-R and chemokines and active disease has been proposed by different authors [29, 30, 31, 32].

The sTNF-RI, sTNF-RII and the chemokine CXCL9 demonstrated value in monitoring patients during treatment. These serological markers presented decreased concentrations simultaneously to clinical remission of symptoms of PCM, demonstrating their potential application as serological markers of control of cure [30].

This study aimed to measure the levels of IgG anti-*P.brasiliensis* and the concentrations of the soluble TNF- α receptors (sTNF-RI and sTNF-RII) and chemokines CCL3, CXCL9, CCL11 and CCL24 in the sera of patients treated for PCM to verify the applicability of these serological markers in the control of cure of patients.

2 METHODS

2.1 Patients and control sera

Sera were collected from patients with acute and chronic PCM at the Center of Reference and Training in Infectious and Parasitic Diseases (CTR-DIP) of the General Hospital of the Federal University of Minas Gerais (UFMG), Brazil. Determination of serological markers was performed in 19 patients during treatment (dt) (one month to two years of treatment); in 22 patients at the day of interruption of treatment (t0); in 22 patients at six months after interruption of treatment (t6); in 18 patients at 12 months (t12); in 13 patients at 18 months (t18); in nine patients at 24 months (t24); in six patients at 30 months (t30), in five patients at 36 months (t36) and in three patients at 42 months after interruption of treatment (t42). Sera were frozen and aliquoted at -20°C until use. The diagnosis of PCM was made by biopsy in all patients and in some cases conventional serological tests were used combined with biopsy.

Patients were treated with ketoconazole (3), itraconazole (1), sulfamethoxazole-trimethoprim (21) or sulfamethoxazole-trimethoprim associated with amphotericin B (1) during hospitalization. The patients analyzed were not treated with immunosuppressive drugs.

The group analyzed was formed by 23 patients with chronic PCM (4 women and 19 men) and three patients with acute PCM (two women and one man), with $49,5 \pm 16,5$ (mean \pm standard deviation) years old. Ten health volunteers formed a negative control (NC) group. This study was approved by the ethics committee of the UFMG and informed consent was obtained from each patient before blood collection. Patients with other concomitant diseases as toxoplasmosis, histoplasmosis, cryptococcosis, infectious mononucleosis, acquired immune deficiency syndrome (AIDS), tuberculosis, sarcoidosis and lymphoma were excluded from the study.

2.2 Measurement of serological markers

*2.2.1 ELISA for measure levels of total IgG anti-*P. brasiliensis**

The ELISA for measure levels of total IgG anti-*P. brasiliensis* was performed in flat-bottomed polystyrene plates (Nunc-ImmunoPlate PolySorp Surface, USA) using Mexo and recombinant Pb27 (rPb27) as antigens. Briefly, plates were coated overnight at 4°C with 100 μL of a 1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ solution of Mexo or rPb27 in a 0.5 mol L⁻¹ carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6. The plates were washed five times with washing solution [0.05 mol L⁻¹ PBS with 0.5% Tween 20 (PBS-Tween)] and blocked with 200 μL of blocking solution [1.5 mol L⁻¹ PBS with 1.6% casein (PBS-casein)] for 1 h at 37°C. After incubation, the plates were washed five times with PBS-Tween and filled with 100 μL of either patient sera or negative control sera (in duplicate) diluted 1:400 in 1.5 mol L⁻¹ PBS with 0.25% casein. The plates were re-incubated for 1 h at 37°C and

then washed 10 times. After washing, 100 μL of a peroxidase conjugate anti-human IgG specific to the gamma chain (DAKO, USA) diluted 1:10.000 in 0.15 mol L^{-1} PBS was added to the wells. The plates were incubated for 1 h at 37°C and then washed 10 times. The reaction was developed with 100 μL of TMB Plus (Bio-tecnologia, Brazil) for 10 min at room temperature. Colour development was stopped with 50 μL of 2 mol L^{-1} H_2SO_4 . The optical density (OD) at 450 nm was determined using an ELISA reader (Anthos 2010, Cambridge, England). Cut-off values were determined by the construction of the Receiver Operator Characteristic (ROC) curve with ten sera samples from NC group.

2.2.2 ELISA for measure concentrations of soluble TNF- α receptors and chemokines

Concentrations of sTNF-RI, sTNF-RII, CCL2, CCL3, CXCL9, CCL11 and CCL24 were measured with a capture ELISA technique using kits DuoSet® ELISA Development System (R&D Systems, USA). The technique was performed according to the manufacturer protocol. The concentrations of the serological markers were determined based on a standard curve for each set of samples analyzed. Cut-off values were determined by the construction of the ROC curve with ten sera samples from NC group

2.3 Statistical analysis

All data were plotted in dispersion graphs in which lines represent median. Serological results of PCM patients versus NC group were analyzed by Mann-Whitney test. All groups were compared and analyzed by the Kruskal-Wallis non-parametric test and Dunn's post-test. Spearman test was performed to assess correlation between the studied parameters. All calculations were performed using GraphPad Prism version 4.00

for Windows software (GraphPad Prism, CA, USA). ROC curves were constructed using the MedCalc Statistical program (Broekstraat, Mariakerke, Belgium) to define the cut-off points of the serological markers analyzed. The chosen cut-off value for each marker was the one that maximized the sum of sensitivity and specificity. Data were considered significant when $p < 0.05$.

3 RESULTS

The 23 patients analyzed with chronic PCM presented predominantly mucosal, laryngeal, skin and lung manifestations when the disease was active. The three patients with acute disease presented lymphadenomegaly as the major manifestation (Table 1). According to the clinical analysis performed every six months, none of the patients presented relapse of PCM during all the period of 42 months of follow-up after the interruption of treatment. It is important to mention that even patients that were excluded from the study were evaluated in aleatory moments and they were clinically cured.

Table 1 - Clinical forms of patients treated for paracoccidioidomycosis and considered clinically cured.

Clinical Form	Distribution of lesions	N (%)
Acute	Lymph nodes	3 (11,54)
Chronic Unifocal Tegumentary	Lymph nodes	2 (7,69)
	Oral mucous	4 (15,38)
	Larynx	4 (15,38)
	Skin	1 (3,85)
	Lungs	1 (3,85)
Chronic Unifocal Pulmonary	Lungs	1 (3,85)
Chronic Multifocal	Skin and oral mucous	4 (15,38)
	Skin and lungs	1 (3,85)
	Skin, brain and lungs	1 (3,85)
	Skin, oral mucous e lymph nodes	1 (3,85)
	Oral mucous and lungs	3 (11,53)
	Lungs and brain	1 (3,85)
Total		26 (100)

The values of ROC curve statistics are listed in Table 2. The p value <0.0001 and the high values of area under the curve (AUC) for total IgG using Mexo and rPb27 as antigen demonstrate that this serological marker segregated the majority of patients treated for PCM from the NC group. During the treatment for PCM, the majority of patients presented high levels of total IgG using Mexo as antigen, as it was expected. Only two patients were not reactive to Mexo when the disease was active, these patients presented levels of total IgG below the cut-off point during the treatment and after its interruption over the period analyzed, and they were never reactive to the antigen. The other patients presented high levels of IgG even after 42 months of interruption of treatment without a progressive decrease in these values over the period after interruption of treatment. It was possible to verify a decrease in the levels of IgG for some patients, but generally they remained with similar values over the period analyzed. The measure of total IgG using rPb27 as antigen presented similar results. Probably, more patients presented less reactivity with this antigen due to the high specificity of rPb27, which was not recognized by some patients. The serological levels of total IgG with both antigens were similar for all patients at the different periods analyzed. The analysis of total IgG using both antigens demonstrated statistical difference between dt, t0, t6, t12, t18, t30 groups and NC group. There was not statistical difference among the groups of patients treated for PCM (Fig. 1). It was not found statistical correlation between IgG levels using Mexo or rPb27 as antigens and the period of time analyzed.

Table 2 - Area under the ROC curve (AUC), *p* value and cut-off values of serological markers analyzed in patients treated for paracoccidioidomycosis and considered cured.

Serum marker	AUC	<i>p</i> value	Cut-off (pg/mL)
Total IgG Mexo	0.950	<0.0001*	0.126 [#]
Total IgG rPb27	0.938	<0.0001*	0.136 [#]
sTNF-RI	0,995	<0.0001*	1192.308
sTNF-RII	1.000	<0.0001*	3661.428
CXCL9	0.487	0.8614	250.00
CCL3	0.640	0.1434	650.00
CCL11	0.561	0.5280	290.00
CCL24	0.775	0.0040*	2452.72

*Statistical significance $p < 0.05$

[#]Optical density

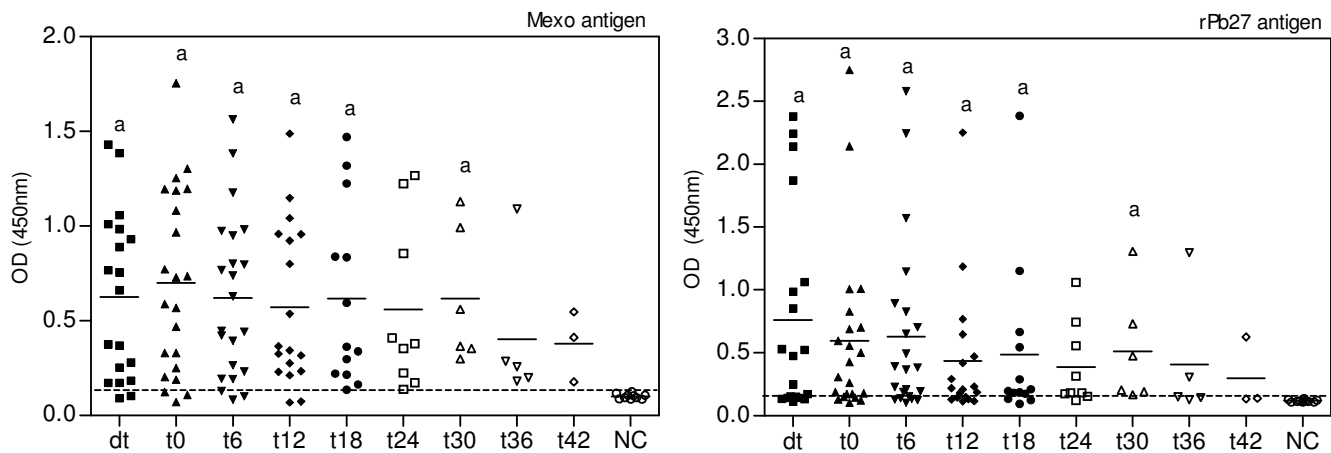


Figure 1 - Serum levels of total IgG measure by an in house ELISA using Mexo and rPb27 as antigens in the sera of 19 patients with PCM during the treatment (dt); in 22 patients at the time of interruption of treatment (t0); in 22 patients at six months (t6); in 18 patients at 12 months (t12); in 13 patients at 18 months (t18); in nine patients at 24 months (t24); in six patients at 30 months (t30); in five patients at 36 months (t36); in three patients at 42 months after interruption of treatment (t42) and in 10 healthy individuals (NC). Each dot represents the optical density of a single patient and the horizontal line the median of the group. The cut-off point is represented by the dotted line. Data marked by 'a' were significantly different ($p < 0.05$) from NC group.

The high values of AUC and the p value <0.0001 presented by sTNF-RI, showed that this marker discriminated practically all patients treated for PCM from NC group (Table 2). The sera concentrations of sTNF-RI were high in all patients with PCM analyzed, with the exception of only one patient that presented the concentration of this marker during the treatment below the cut-off point. This patient presented an increase in the concentration of sTNF-RI up to the moment of interruption of treatment, which was maintained over the period analyzed. It was observed that patients during the treatment presented concentrations of sTNF-RI slightly elevated when compared to the other periods. Statistical difference was observed between dt, t0, t6, t12, t18, t24, t36 and NC group. Among the groups of patients with PCM, only the groups dt and t6 presented statistical difference (Fig. 2). It was not found statistical correlation between the concentrations of sTNF-RI and the period of time analyzed.

sTNF-RII presented the best results of ROC curve analysis, with maximum of AUC, what allowed this serological marker to segregate all patients treated for PCM from NC group (Table 2). Patients during the treatment presented higher concentrations when compared to the other groups. It was observed statistical difference between dt, t0, t6, t12, t24, t36 and NC group. Among the groups of patients with PCM it was verified statistical difference between t0, t6, t12, t18 and dt group (Fig. 2). It was found negative correlation between the concentrations of sTNF-RII and the period of time analyzed.

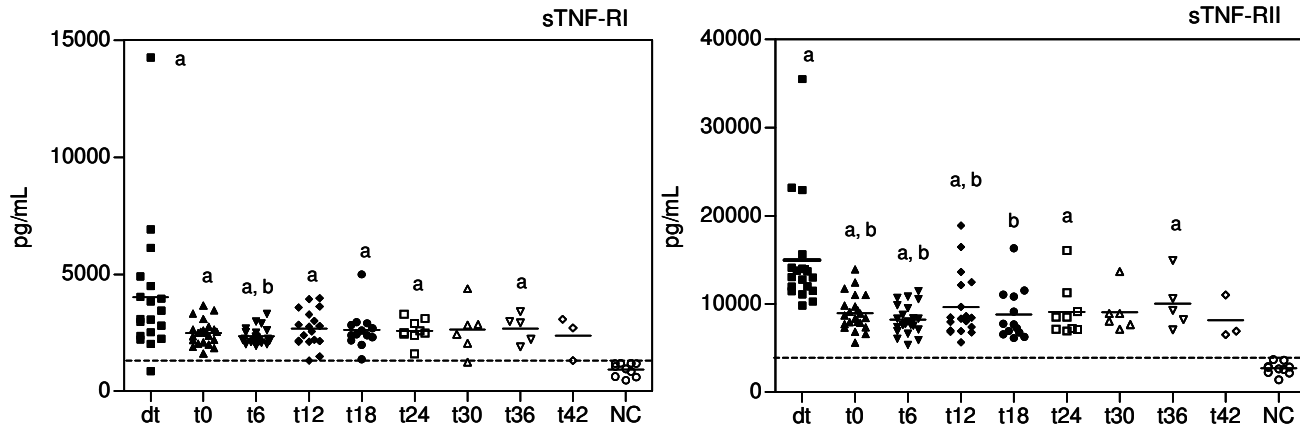


Figure 2 - Serum concentrations of sTNF-RI and sTNF-RII measure by ELISA in the sera of 19 patients with PCM during the treatment (dt); in 22 patients at the time of interruption of treatment (t0); in 22 patients at six months (t6); in 18 patients at 12 months (t12); in 13 patients at 18 months (t18); in nine patients at 24 months (t24); in six patients at 30 months (t30); in five patients at 36 months (t36); in three patients at 42 months after interruption of treatment (t42) and in 10 healthy individuals (NC). Each dot represents the concentration of a single patient and the horizontal line the median of the group. The cut-off point is represented by the dotted line. Data marked by 'a' were significantly different ($p < 0.05$) from NC group; data marked by 'b' were significantly different ($p < 0.05$) from dt group.

The majority of patients presented concentrations of CXCL9 below the cut-off point during the treatment and at all periods after its interruption. Generally, patients remained with similar concentrations of CXCL9 over the period analyzed, without increase or decrease in the values over the time. Only one patient presented increased concentrations of CXCL9 at the day of interruption of treatment, and at 12 and 18 months after its interruption. It was observed statistical difference between dt and NC group. Among the patients with PCM it was found statistical difference between t0, t12, t24, t30 and dt groups (Fig. 3). It was found positive correlation between the concentrations of CXCL9 and the period of time analyzed.

In the analysis of CCL3, it was verified that the majority of patients presented concentrations of this marker above the cut-off point during the treatment and at the

moment of its interruption. These concentrations presented a tendency to decrease over the time analyzed, with only two patients (2/9) presenting detectable concentrations of CCL3 at 24 months after interruption of treatment; two (2/6) patients at 30 months after interruption of treatment and one (1/5) patient at 36 months after interruption of treatment. It was not found statistical difference between the patients with PCM (Fig. 3). Negative correlation was found between the concentrations of CCL3 and the period of time analyzed.

The analysis of CCL11 demonstrated that practically all patients presented concentrations below the cut-off point during the treatment. Only one patient presented the concentration of CCL11 above the cut-off point during the treatment, however, after the interruption of treatment, the concentrations presented by this patient decreased and remained below the cut-off point. From the moment of interruption of treatment, the concentrations of CCL11 were constant over the period of time. Patients that presented increase in these values up to the interruption of treatment maintained high concentrations during all the time. On the other hand, some patients remained with concentrations of CCL11 below the cut-off point during all the time. It was observed statistical difference between t0, t12 and dt groups (Fig. 3). It was not found statistical correlation between the concentrations of CCL11 and the period of time analyzed.

Although CCL24 presented $p=0,004$, it was not possible to discriminate the majority of patients treated for PCM from the NC group (Table 2). It was not found a pattern of increase or decrease of concentrations during and after treatment. Generally, patients remained with constant concentrations of CCL24 during all the period. It was not found any difference between the groups (Fig 3). There was not statistical correlation between the concentrations of CCL24 and the period of time analyzed.

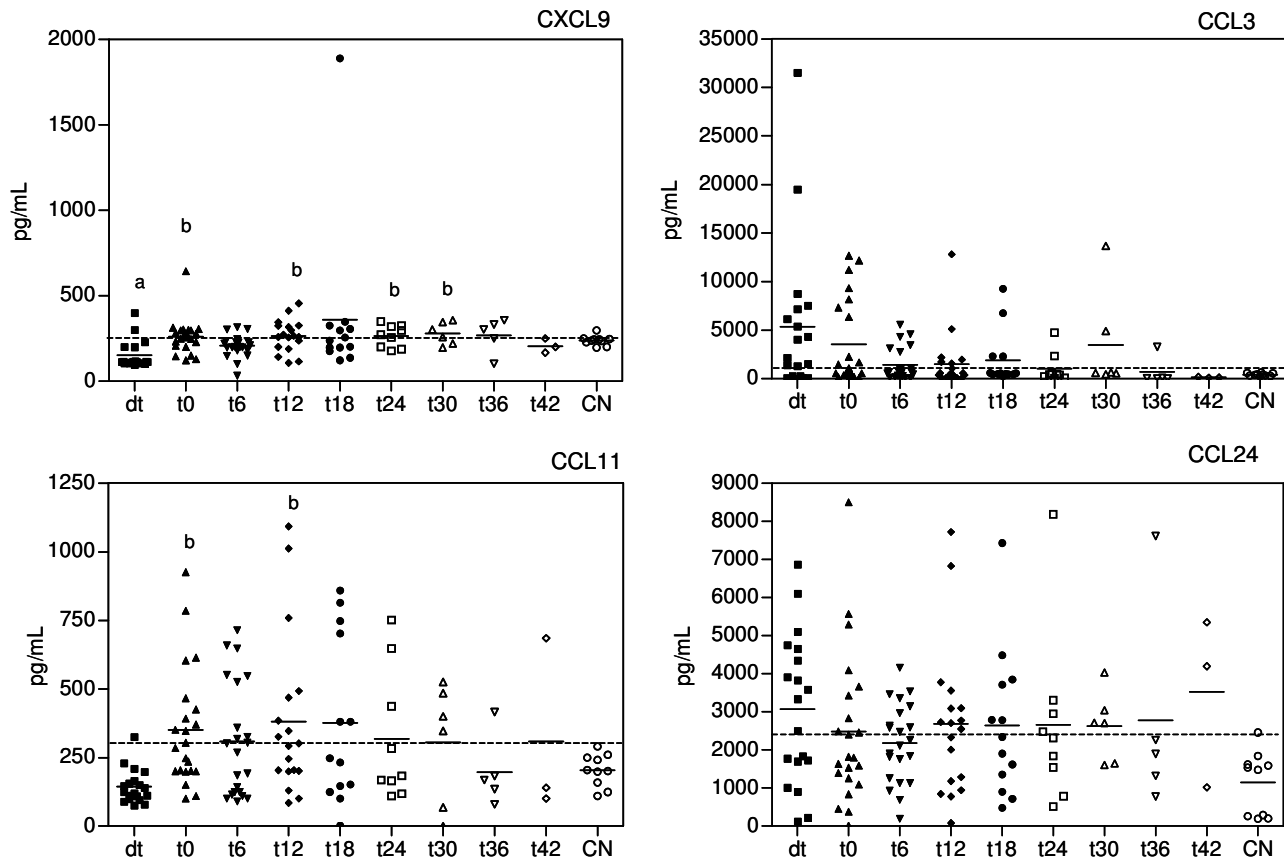


Figure 3 - Serum concentrations of CXCL9, CCL3, CCL11 and CCL24 measure by ELISA in the sera of 19 patients with PCM during the treatment (dt); in 22 patients at the time of interruption of treatment (t0); in 22 patients at six months (t6); in 18 patients at 12 months (t12); in 13 patients at 18 months (t18); in nine patients at 24 months (t24); in six patients at 30 months (t30); in five patients at 36 months (t36); in three patients at 42 months after interruption of treatment (t42) and in 10 healthy individuals (NC). Each dot represents the concentration of a single patient and the horizontal line the median of the group. The cut-off point is represented by the dotted line. Data marked by 'a' were significantly different ($p < 0.05$) from NC group; data marked by 'b' were significantly different ($p < 0.05$) from dt group.

4 DISCUSSION

The serological levels of IgG remained high in the majority of patients over the period of time independently of the antigen used. It was possible to distinguish patients with PCM from NC group, even at 42 months after interruption of treatment. It is worth to mention that all the patients analyzed were considered cured based on clinical criteria of the Guidelines on PCM [8]. It is proposed by the Guidelines on PCM a serological criterion based on negative conversion or stabilization of serological titers using double immunodifusion, in two sera samples every six months after the recommended period of treatment. Our results indicate that very few patients would be considered cured based on the serological criteria of the Guidelines on PCM, despite all of them present clinical cure. A similar result was also verified in other study made by our group with different patients before, during and after treatment. High levels of IgG using Mexo and rPb27 as antigens were also detected even three years after treatment, without a clear association between progression of treatment and decrease in IgG levels [33]. Since the levels of IgG may persist high for long periods, even when the disease is inactive, these studies show that this marker may not be safe for monitoring patients after treatment for PCM.

Generally, antibody serological titers are elevated in patients with acute or severe chronic PCM, while patients with unifocal chronic PCM may present low antibody titers [3, 8, 34]. Unlike other reports, in this work, patients with unifocal and mild disease presented similar levels of IgG when compared to patients with multifocal and severe PCM. Two patients with multifocal disease presented levels of IgG below the cut-off point even when PCM was active. The three patients with acute PCM presented reactivity with the antigens used, but the levels of IgG were lower when compared to patients with chronic PCM. This difference found between our work and

other studies could be explained by many factors as the genetic, geographical and immunological profile of the population analyzed, the genetic of the fungus and the serological technique applying the different antigens Mexo and rPb27. This result shows that the clinical manifestations of PCM have an important and not well known relationship to the immunological response.

The sera concentrations of sTNF-RI and sTNF-RII remained high even at 42 months after interruption of treatment in the patients analyzed. It was verified a decrease in the values of both chemokines after the interruption of treatment, compared to the period during treatment. However, it was possible to segregate the majority of patients with PCM from the NC group during all the period of the study. Only one patient with unifocal chronic PCM presented concentrations of sTNF-RI below the cut-off point during the treatment. Our results are discordant from those of Corvino *et al.* [29] who detected higher serological concentrations of sTNF-RII in patients with acute PCM, with a marked and progressive decrease over two years of treatment. Patients with chronic PCM presented higher concentrations of sTNF-RI, with a gradual decrease over the period of treatment. It was suggested that sTNF-RII was closely related to the clinical course of PCM, and could be used as a severity marker. Concentrations of sTNF-RI were not strongly affected by the treatment and any association to the clinical course of PCM was found. Although, similar to our findings, Corvino *et al.* [29] demonstrated that in patients with chronic PCM the serological concentrations of sTNF-RII remained constant over the period of treatment, and patients with acute PCM presented increase in serological concentrations of sTNF-RI over the period of treatment. Moura *et al.* [30] detected high concentrations of sTNF-RI and sTNF-RII in patients with active chronic PCM before and during treatment. It was observed that the decrease of the serological concentrations of sTNF-RI and sTNF-RII over the period of

treatment was associated with the extinction of symptoms of PCM. They suggested a relation between high serological concentrations of sTNF-RI and sTNF-RII and active PCM, with the use of these markers to monitoring patients during treatment. However, according to the conclusion of Moura *et al.* [30], the patients analyzed in our study should present clinical manifestations of PCM, since all of them presented high concentrations of sTNF-RI and sTNF-RII even after 42 months of interruption of treatment. These two serological markers are related to inflammatory response, especially during active disease. One explanation for the high concentrations of sTNF-RI and sTNF-RII detected in our patients could be a residual or persistent activation of the immunological system by *P. brasiliensis* that could be in a latent form. In this way, even after years of interruption of treatment, and without clinical manifestations, patients would still present detectable concentrations of sTNF-RI and sTNF-RII. This result shows that these markers are not safe to be applied in monitoring patients after interruption of treatment.

The majority of patients presented low concentrations of CXCL9 during the 42 months of follow-up. Generally, the patients presented similar concentrations of CXCL9 over the time, without significant increase or decrease. Only one patient presented an increase in the concentrations, reaching the maximum at 18 months after interruption of treatment. Moura *et al.* [30] analyzed patients with chronic PCM before and during treatment, and it was verified that the concentrations of CXCL9 decreased over the period of 36 months of treatment. It was proposed that high concentrations of this chemokine would be associated with active PCM, since the absence of symptoms was directly related to low concentrations of CXCL9. The high concentrations of this chemokine during the active disease could be explained by the need to attack the fungus, since CXCL9 is related to Th1 immune response. CXCL9 can attract Th1 cells

and block Th2 cells and this function is necessary in patients with active disease, when *P. brasiliensis* must be destroyed [35]. Corvino *et al.* [29] also verified high concentrations of CXCL9 in patients with PCM without treatment, and an association between active disease and higher concentrations of CXCL9 was found. Souto *et al.* [36] demonstrated that IFN- γ modulates the production of chemokines in the lungs of mice infected with *P. brasiliensis*, and induces the expression of Th1 chemokines. In our study all patients after treatment were considered clinically cured, so it was expected that they would present low concentrations of CXCL9. The high concentration found in only one patient after the interruption of treatment could not be explained, since he did not present any clinical manifestation of PCM during the increase of CXCL9 concentration. The low concentrations of CXCL9 during the treatment, when patients presented active disease, were not expected. In the study of Moura *et al.* [30] six from 26 patients did not presented detectable CXCL9 before treatment. In our study, it was also expected that more patients would present high concentrations of CXCL9 during treatment. One possibility for the low concentrations found in the patients during treatment could be an inefficient production of CXCL9 by these patients. Since other inflammatory markers as sTNF-RI and sTNF-RII, related to Th1 response, and CCL11 and CCL3 related to Th2 response were detected at high concentrations in the same patients, the absence of a protective and established immunological response could not be the explanation for the low values of CXCL9 during treatment. It could be an isolate fact related to CXCL9, although it is not possible to better explain it. Other influence for the low values of CXCL9 could be the variable time of treatment (from months to years) of the patients.

In our study, the concentrations of CCL3 during the treatment did not present relevant difference compared to the other periods analyzed. However, the

concentrations of CCL3 appear to decrease after the interruption of treatment, what makes sense. This chemokine acts in the recruitment of monocytes and T cells, consequently, it is expected that in patients considered cured the concentrations of CCL3 should be low, since the presence of protective cells attacking the fungus is no longer necessary. Moura *et al.* [30] verified increased concentrations of CCL3 over the period of 12 months of treatment in patients with chronic PCM. This result was explained as a transitory elevation of Th2 pattern of immune response during the treatment of patients when the fungal burden was controlled and it was not necessary a strong Th1 response. Although it was found a negative correlation between the concentrations of CCL3 and the period after interruption of treatment, this chemokine could not be used safely to monitoring patients in control of cure since these concentrations did not reach basal values for all patients.

During the treatment, the majority of patients presented concentrations of CCL11 below the cut-off point. After the treatment, many patients presented high concentrations of this chemokine, without statistical difference between the groups analyzed. These high concentrations of CCL11 could not be explained, since this chemokine is related to attraction to protective cells in the establishment of immune response, and the patients analyzed did not present any symptom of PCM. Maybe the high concentrations found could be a residual immune response initiated during the treatment that persisted longer. A similar result was found for CCL24, although, for this chemokine the concentrations were higher during the treatment. It was related by Moura *et al.* [30] that CCL24 would have their concentrations increased at 36 months of treatment, probably to balance the strong Th1 response established during the active disease. These results show the impossibility to use these markers in the control of cure of PCM.

5 CONCLUSIONS

It was verified that none of the serological markers tested presented concentrations at basal line for all patients. The high levels detected for total IgG indicate that the serological criteria based on negative conversion or stabilization of this antibody should not be applied for all patients. The same situation was found for sTNF-RI and sTNF-RII, what shows that the clinical criterion for interruption of treatment may not be reliable. One explanation for the high values of the majority of markers analyzed maybe a persistent inflammation presented by the patients, even if they do not have symptoms of PCM. Although CXCL9 presented an association between low concentrations and absence of symptoms of PCM after the interruption of treatment, due to its low values detected during treatment, it was not possible to indicate this marker for monitoring patients in control of cure.

ACKNOWLEDGMENTS

This study received financial support from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) and Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (Fapemig, Brazil).

REFERENCES

- [1] CARVALHO, KC; GANIKO, L; BATISTA, WL; MORAIS, FV; MARQUES, ER; GOLDMAN, GH; FRANCO, MF; PUCCIA, R. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* and gp43 expression in isolates bearing known PbGP43 genotype. **Microbes Infect**, v.7, p. 55-65. 2005.
- [2] MATUTE, DR; MCEWEN, JG; PUCCIA, R; MONTES, BA; SAN-BLAS, G; BAGAGLI, E; RAUSCHER, JT; RESTREPO, A, MORAIS, F; NIÑO-VEGA, G; TAYLOR, JW. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol Biol Evol**, v. 23, p. 65-73. 2006.
- [3] BRUMMER, E; CASTANEDA, E; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin Microb Rev**, v. 6, p. 89-117. 1993.
- [4] AMEEN, M; TALHARI, C; TALHARI, S. Advances in paracoccidioidomycosis. **Clin Exp Dermatol**, v. 35, p. 576-580. 2010.
- [5] ALMEIDA, OP; JACKS, J JR; SCULLY, C. Paracoccidioidomycosis of the mouth: an emerging deep mycosis. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 14, p. 377-383. 2003.
- [6] MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycosis: the dimension of the problem of a neglected disease. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, n. 4, p. 480. 2010.
- [7] NOGUEIRA, MGS; ANDRADE, GMQ; TONELLI, E. Clinical evolution of paracoccidioidomycosis in 38 children and teenagers. **Mycopathologia**, v. 161, p. 73-81. 2006.
- [8] SHIKANAI-YASUDA, MA; TELLES FILHO, FQ; MENDES, RP; COLOMBO, AL; MORETI, ML. Guidelines in paracoccidioidomycosis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39, p. 297-310. 2006.

- [9] WANKE, B; AIDÊ, MA. Chapter 6 - Paracoccidioidomycosis. **J Bras Pneumol**, v. 35, p. 1245-1249. 2009.
- [10] SADAHIRO, A; DIOGO, CL; OSHIRO, TM; SHIKANAI-YASUDA, MA. Kinetics of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and IL-4 production by mononuclear cells stimulated with gp43 peptides, in patients cured of paracoccidioidomycosis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 40, n. 2, p.156-62. 2007.
- [11] MAMONI, RL; BLOTTA, MHSL. Flow-cytometric analysis of cytokine production in human paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, v. 35, p. 207-216. 2006.
- [12] CALICH, VL; KASHINO, SS. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Braz J Med Biol Res**, v. 31, p. 615-623. 1998.
- [13] CANO, LE; KASHINO, SS; ARRUDA, C; ANDRE, D; XIDIEH, CF, SINGER-VERMES, LM; VAZ, CA; BURGER, E; CALICH, VL. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect Immunol**, v. 66, p. 800-806. 1998.
- [14] SOUTO, JT; FIGUEIREDO, F; FURLANETTO, A; PFEFFER, K; ROSSI, MA; SILVA, JS. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **Am J Pathol**, v. 156, p. 1811-1820. 2000.
- [15] BENARD, G; ROMANO, CC; CACERE, CR; JUVENALE, M; MENDES-GIANNINI, MJ; DUARTE, AJ. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, v. 13, p. 248-252. 2001.
- [16] PERAÇOLI, MTS; KUROKAWA, CS; CALVI, AS; MENDES, RP; PEREIRA, PCM; MARQUES, AS; SOARES, AMVC. Production of pro- and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis. **Microbes Infect**, v. 5, p. 413-418. 2003.

- [17] PINA, A; VALENTE-FERREIRA, RC; MOLINARI-MADLUM, EEW; VAZ, CAC; KELLER, AC; CALICH, VLG. Absence of Interleukin-4 determines less severe pulmonary paracoccidioidomycosis associated with impaired Th2 response. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 2369-2378. 2004.
- [18] LIVONESI, MC; SOUTO, JT; CAMPANELLI, AP; MAFFEI, CM; MARTINEZ, R; ROSSI, MA; DA SILVA, JS. Deficiency of IL-12p40 subunit determines severe paracoccidioidomycosis in mice. **Med Mycol**, v. 46, p. 637-646. 2008.
- [19] OLIVEIRA, SJ; MAMONI, RL; MUSATTI, CC; PAPAORDANOU, PMO; BLOTTA, MHSL. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. **Microbes Infect**, v. 4, p. 139-144. 2002.
- [20] RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Sabouraudia**, v. 23, p. 323-334. 1985.
- [21] FERREIRA, KS; LOPES, JD; ALMEIDA, SR. Regulation of T helper cell differentiation in vivo by GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* provided by different antigen-presenting cells. **Scand J Immunol**, v. 58, p. 290-297. 2003.
- [22] KERN, P; HEMMER, CJ; GALLATI, H; NEIFER, S; KREMSNER, P; DIETRICH, M; PORZSOLT, F. Soluble tumor necrosis factor receptors correlate with parasitemia and disease severity in human malaria. **J Infect Dis**, v. 166, p. 930-934. 1992.
- [23] KERN, WV; ENGEL, A; SCHIEFFER, S; PRÜMMER, O; KERN, P. Circulating tumor necrosis factor alpha (TNF), soluble TNF receptors, and interleukin-6 in human subacute bacterial endocarditis. **Infect Immun**, v. 61, p. 5413-5416. 1993.
- [24] KEUTER, M; DHARMANA, E; GASEM, MH; VAN DER VEN-JONGEKRIJG, J; DJOKOMOELJANTO, R; DOLMANS, WM; DEMACKER, P; SAUERWEIN,

R; GALLATI, H; VAN DER MEER, JW. Patterns of proinflammatory cytokines and inhibitors during typhoid fever. **J Infect Dis**, v. 169, p. 1306-1311. 1994.

[25] ALSALAMEH, S; WINTER, K; AL-WARD, R; WENDLER, J; KALDEN, JR; KINNE, RW. Distribution of TNF-alpha, TNF-R55 and TNF-R75 in the rheumatoid synovial membrane: TNF receptors are localized preferentially in the lining layer; TNF-alpha is distributed mainly in the vicinity of TNF receptors in the deeper layers. **Scand J Immunol**, v. 49, p. 278. 1999.

[26] MUNK, ME; ANDING, P; SCHETTINI, APM; CUNHA, MG; KAUFMANN, SH. Soluble tumor necrosis factor alpha receptors in sera from leprosy patients. **Infect Immun**, v. 67, p. 423-425. 1999.

[27] ALESSANDRI, AL; SOUZA, AL; OLIVEIRA, SC; MACEDO, GC; TEIXEIRA, MM; TEIXEIRA, AL. Concentrations of CXCL8, CXCL9 and sTNFR1 in plasma of patients with pulmonary tuberculosis undergoing treatment. **Inflamm Res**, v. 55, p. 528-33. 2006.

[28] FALCÃO, PL; CORRÊA-OLIVEIRA, R; FRAGA, LA; TALVANI, A; PROUDFOOT, AE; WELLS, TN; WILLIAMS, TJ; JOSE, PJ; TEIXEIRA, MM. Plasma concentrations and role of macrophage inflammatory protein-1a during chronic *Schistosoma mansoni* infection in humans. **J Infect Dis**, v. 186, p. 1696-1700. 2002.

[29] CORVINO, CL; MAMONI, RL; FAGUNDES, GZZ; BLOTTA, MHSL. Serum interleukin-18 and soluble tumour necrosis factor receptor 2 are associated with disease severity in patients with paracoccidioidomycosis. **Clin and Exper Immunol**, v. 147, p. 483-490. 2007.

[30] MOURA, ACL; TEIXEIRA, MM; ARAÚJO, AS; PEREIRA, MCN; PEDROSO, ERP; TEIXEIRA, AL. Serum levels of sTNF-R1, sTNF-R2 and CXCL9 correlate with disease activity in adult type paracoccidioidomycosis. **Acta Tropica**, v. 109, p. 213-218. 2009.

- [31] MAMONI, RL; BLOTTA, MH. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. **Cytokine**, v. 32, n. 1, p. 20-9. 2005.
- [32] NAGIB, PR; GAMEIRO, J; DA COSTA, TA; DI GANGI, R; RIBEIRO, JDA S; PAULINO, LC; VERINAUD, L. Effect of HeNe laser irradiation on extracellular matrix deposition and expression of cytokines and chemokines in paracoccidioidomycotic lesions. **Photochem Photobiol**, v. 86, n. 4, p. 920-4. 2010.
- [33] SANTOS, LS; FERNANDES, VC; CRUZ, SG; SIQUEIRA, WC; GÓES, AM; PEDROSO, ERP. Profile of total IgG, IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 levels in sera of patients with paracoccidioidomycosis: treatment follow-up using Mexo and rPb27 as antigens in an ELISA. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 107, n. 1, p. 1-10. 2012.
- [34] MAMONI, RL; NOUÉR, SA; OLIVEIRA, SJ; MUSATTI, CC; ROSSI, CL; CAMARGO ZP, BLOTTA, MH. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. **Med Mycol**, v. 40, p. 153-159. 2002.
- [35] COLOBRAN, R; PUJOL-BORRELL, R; ARMENGOL, MP; JUAN, M. The chemokine network. I. How the genomic organization of chemokines contains clues for deciphering their functional complexity. **Clin Exp Immunol**, v. 148, p. 208-217. 2007.
- [36] SOUTO, JT; ALIBERTI, JC; CAMPANELLI, AP; LIVONESI, MC; MAFFEI, CML; FERREIRA, BR; TRAVASSOS, LR; MARTINEZ, R; ROSSI, MA; SILVA, JS. Chemokine production and leukocyte recruitment in the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice is modulated by interferon- γ . **Am J Pathol**, v. 163, p. 583-590. 2003.

7 RESULTADOS NÃO APRESENTADOS NO ARTIGO

7.1 Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes avaliados

Entre março de 2009 e setembro de 2012 foram avaliados, no Ambulatório de PCM do CTR-DIP-UFMG, 26 pacientes que se adequavam aos critérios para inserção no estudo. A idade dos pacientes avaliados no momento da suspensão do tratamento variava de 20 a 78 anos, com média \pm desvio padrão de $49,5 \pm 16,5$ anos. A distribuição dos pacientes por faixa etária está representada na Tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição por faixa etária dos pacientes sob controle de cura para paracoccidiodomicose avaliados.

Faixa etária	N (%)
De 20 a 29 anos	4 (15,39)
De 30 a 39 anos	2 (7,69)
De 40 a 49 anos	7 (26,92)
De 50 a 59 anos	7 (26,92)
De 60 a 69 anos	3 (11,54)
Acima de 70 anos	3 (11,54)
Total	26 (100)

Dos 26 pacientes avaliados oito nasceram em áreas rurais do estado de Minas Gerais, marcadamente na região do Vale do Rio Doce; 16 em áreas urbanas de Minas Gerais, localizadas principalmente nas regiões metropolitana, central e sul do estado; e dois em áreas urbanas de outros estados, sendo um na Bahia e um no Rio de Janeiro (Tabela 2). Os pacientes procedentes de áreas rurais continuam, até os dias atuais, residindo nestas áreas, assim como os oriundos de áreas urbanas que nelas

permaneceram. Os pacientes nascidos em outros estados residem há pelo menos 15 anos no estado de Minas Gerais.

Tabela 2 - Procedência dos pacientes sob controle de cura para paracoccidiodomicose avaliados.

Procedência	N (%)
Minas Gerais - área rural	8 (30,77)
Minas Gerais - área urbana	16 (61,54)
Outros estados	2 (7,69)
Total	26 (100)

Dentre os 26 pacientes avaliados oito eram trabalhadores agrícolas, que lidavam principalmente com lavouras de café, milho e feijão; um era trabalhador da construção civil, exercendo atividade de pedreiro; três eram trabalhadores de serviços domésticos; dois eram estudantes e 12 apresentavam outras ocupações como; eletricista, porteiro, balconista, mecânico, sucateiro, costureira, motorista, metalúrgico e lanterneiro, durante a doença ativa e o período do estudo (Tabela 3).

Tabela 3 - Ocupação dos pacientes sob controle de cura para paracoccidiodomicose avaliados.

Ocupação	N (%)
Trabalhador agrícola	8 (30,77)
Trabalhador da construção civil	1 (3,85)
Trabalhador de serviços domésticos	3 (11,54)
Estudante	2 (7,69)
Outra	12 (46,15)
Total	26 (100)

A Tabela 4 apresenta os locais das lesões de PCM desenvolvidas pelos pacientes avaliados quando a doença estava ativa. As lesões crônicas unifocais foram mais prevalentes na pele, linfonodos, laringe e mucosa oral, respectivamente. As lesões crônicas multifocais foram mais prevalentes na pele, cérebro e pulmões; pele, mucosa oral e linfonodos; pulmões e cérebro; pele e pulmões; mucosa oral e pulmões; e pele e mucosa oral respectivamente. Os pacientes com a forma aguda da doença apresentaram lesões estritamente linfonodais (Tabela 4).

Tabela 4 - Localização das lesões de paracoccidiodomicose apresentadas pelos pacientes sob controle de cura quando a doença estava ativa.

Local das Lesões	N (%)
Laringe	4 (15,38)
Linfonodos	5 (19,23)
Mucosa oral	4 (15,38)
Mucosa oral e pulmões	3 (11,53)
Pele	1 (3,85)
Pele e mucosa oral	4 (15,38)
Pele e pulmões	1 (3,85)
Pele, cérebro e pulmões	1 (3,85)
Pele, mucosa oral e linfonodos	1 (3,85)
Pulmões	1 (3,85)
Pulmões e cérebro	1 (3,85)
Total	26 (100)

7.2 Análise estatística associando dados epidemiológicos e sorológicos

Como citado no tópico “Análise estatística”, neste estudo foi realizada uma análise de regressão para avaliar dados longitudinais com medidas repetidas. Os valores séricos obtidos nas dosagens de IgG utilizando Mexo ou rPb27 como antígenos, sTNF-RI, sTNF-RII, CCL3, CCL11 e CCL24 foram correlacionados com seis parâmetros:

tempo de avaliação após o tratamento; gênero; tipo de tratamento; forma clínica; idade e área de procedência dos pacientes.

Na análise de IgG utilizando rPb27 como antígeno, foi verificada correlação estatística entre seus níveis séricos, o tipo de tratamento e a área de procedência dos pacientes. Observou-se que os pacientes tratados com sulfametoxazol-trimetoprim e os procedentes de áreas urbanas apresentavam valores séricos mais elevados de IgG utilizando rPb27 como antígeno, quando comparados com os demais. Para IgG utilizando Mexo como antígeno foi encontrada correlação entre seus valores séricos e o tempo de avaliação após tratamento, o tipo de tratamento, a idade e a área de procedência dos pacientes. Verificou-se para este marcador que com o passar dos meses, seus níveis séricos diminuía; que o paciente tratado com sulfametoxazol-trimetoprim associado com anfotericina B apresentava valor mais elevado de IgG quando comparado com os demais; e que os pacientes mais velhos apresentavam níveis ligeiramente mais elevados de IgG, assim como os pacientes procedentes de áreas urbanas.

Para sTNF-RI foi identificada correlação entre seus valores séricos; o tempo de avaliação após tratamento e o tipo de tratamento dos pacientes. Foi verificado que os valores séricos desse marcador diminuía com o passar dos meses de avaliação, e que o paciente tratado com sulfametoxazol-trimetoprim associado com anfotericina B apresentava nível sérico de sTNF-RI elevado quando comparado com os demais. A análise de sTNF-RII revelou correlação entre seus valores séricos e o tempo de avaliação após tratamento, o tipo de tratamento e a forma clínica dos pacientes. Observou-se que com o passar dos meses os valores séricos desse marcador diminuía; que o paciente tratado com sulfametoxazol-trimetoprim associado com anfotericina B

apresentava valor sérico mais elevado de sTNF-RII quando comparado com os demais, assim como os pacientes com a forma unifocal da PCM.

A análise de CXCL9 revelou correlação entre seus valores séricos, o tempo de avaliação após tratamento e o gênero dos pacientes. Foi observado que os valores séricos de CXCL9 se elevavam com o passar dos meses de avaliação, e que os pacientes do sexo masculino apresentavam níveis séricos dessa quimiocina ligeiramente mais altos.

CCL3 apresentou correlação entre suas concentrações séricas e o tempo de avaliação após tratamento. Verificou-se que com o passar dos meses os pacientes apresentaram concentrações séricas dessa quimiocina mais baixas.

Na análise de CCL11 observou-se correlação entre seus valores séricos e o tempo de avaliação após tratamento, o gênero, o tipo de tratamento e a área de procedência dos pacientes. Verificou-se que com o passar dos meses de avaliação os pacientes apresentavam concentrações séricas de CCL11 ligeiramente mais elevadas; que os pacientes do sexo masculino assim como os tratados com itraconazol apresentavam concentrações séricas mais baixas; e que os pacientes procedentes de áreas urbanas apresentavam valores séricos mais elevados dessa quimiocina.

Para CCL24 foi verificada correlação entre seus valores séricos e o tempo de avaliação após tratamento, o tipo de tratamento, a idade e a área de procedência. Verificou-se que com o passar dos meses do estudo os valores séricos de CCL24 decresceram ligeiramente; que o paciente tratado com sulfametoxazol-trimetoprim associado com anfotericina B, assim como os mais velhos e os procedentes de áreas urbanas apresentavam valores mais elevados dessa quimiocina. Os resultados dos dados avaliados encontram-se no APÊNDICE C.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, observou-se que 20 dos 26 pacientes encontravam-se na faixa etária entre 40 a 78 anos de idade. A prevalência de 76,9% de pacientes acima dos 40 anos pode ser justificada pela forma clínica predominante apresentada pelos pacientes analisados. Considerando que apenas três pacientes apresentavam a forma aguda da PCM, e estes tinham entre 20 e 29 anos, esperava-se que a faixa etária predominante dos pacientes estivesse acima dos 35 anos de idade. Na literatura, a forma crônica da PCM é descrita como prevalente em adultos acima de 35 anos de idade, o que corresponde ao perfil da maioria dos pacientes do nosso estudo (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006; Ameen *et al.*, 2010; Ferreira, 2009).

A procedência dos pacientes avaliados é um dado que merece destaque, considerando que a PCM é uma doença associada a trabalhadores rurais e à atividades com revolvimento de terra (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006; Ameen *et al.*, 2010). Verificou-se que dos 26 pacientes, apenas oito nasceram em áreas rurais, e os outros 18 nasceram em áreas urbanas. Os oito pacientes nascidos em áreas rurais, permanecem até os dias atuais morando em tais áreas ou em outras regiões rurais de Minas Gerais. Estes exerceram e exercem até hoje atividades agrícolas, especialmente, as relacionadas ao cultivo de lavouras de café, milho e feijão. Para esses pacientes o contato constante com a terra poderia ser a fonte de infecção pelo fungo *P. brasiliensis*. Os pacientes que nasceram em áreas urbanas relataram que ao longo da vida tiveram contato esporádico com atividades relacionadas ao revolvimento de terra, como acampamentos, poda de árvores, cultivo de horta, pomar e pescaria. Entretanto, nenhum desses pacientes foi exclusivamente trabalhador rural ou morou em áreas rurais. Dentre os pacientes nascidos em áreas urbanas, apenas um desempenha atividade laboral diretamente

associada ao revolvimento de terra, sendo ele trabalhador de construção civil que atua diretamente na formação de alicerces de casas e edifícios. Os demais pacientes desse grupo desempenham atividades predominantemente urbanas. Curiosamente, uma paciente nascida em área urbana, relatou uma única visita em um hotel fazenda, como contato com área rural e atividade associada ao revolvimento de terra. Blotta *et al.* (1999) sugeriram que é possível que pacientes sejam infectados pelo fungo *P. brasiliensis* em áreas urbanas exercendo atividades em contato com solo e madeira. Diante dos dados epidemiológicos obtidos dos pacientes avaliados, que indicam raros contatos com possíveis fontes de infecção do *P. brasiliensis*, não é possível explicar de maneira clara em que momento e local a maior parte dos pacientes nascidos em áreas urbanas poderia ter sido infectada.

De forma geral, existe um equilíbrio nas manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes atendidos no Ambulatório de PCM do CTR-DIP-UFMG. Observa-se uma discreta predominância da forma multifocal da PCM, sem grande diferença em relação à forma unifocal. Em nosso estudo, entretanto, verificou-se uma predominância da forma unifocal da doença, especialmente com lesões isoladas na laringe, linfonodos e mucosa oral. Os pacientes com a forma multifocal apresentaram predominantemente lesões simultâneas na mucosa oral e pulmões e mucosa oral e pele. A diferença na predominância do acometimento unifocal ou multifocal observada entre os pacientes em geral atendidos no ambulatório e os avaliados no estudo, provavelmente está relacionada com os critérios de seleção dos pacientes para inserção no trabalho.

Neste estudo, verificou-se que nenhum dos pacientes avaliados apresentou qualquer sintomatologia que indicasse o retorno da PCM. Durante os 42 meses de acompanhamento após interrupção do tratamento, todos os pacientes apresentaram-se 'cl clinicamente curados'. Este achado é de grande importância, uma vez que o

acompanhamento durante um período tão longo de controle de cura não é usual em pacientes tratados para PCM. Apesar das perdas de pacientes ao longo dos 42 meses de seguimento do estudo, verificou-se que o tratamento empregado no Ambulatório de PCM do CTR-DIP-UFMG, apresenta até o momento, para os 26 pacientes, 100% de eficácia. Isso pôde ser verificado uma vez que todos os pacientes, inclusive os que foram excluídos do estudo por não comparecerem nas datas marcadas, foram submetidos à avaliações clínicas realizadas no Ambulatório de PCM em momentos aleatórios. Em razão disso, confirma-se que nenhum deles apresentou recidiva da doença até o momento, estando todos em bom estado geral de saúde, sem qualquer sinal ou sintoma da PCM. É de grande importância salientar que o protocolo de tratamento dos pacientes do Ambulatório de PCM do CTR-DIP-UFMG aplicado há cerca de 15 anos, difere do que é indicado pelo Consenso em PCM. As principais razões para a utilização de um protocolo próprio para tratamento dos pacientes estão relacionadas à maior segurança garantida pelo prolongado tempo de tratamento dos pacientes (36 meses), que difere do que é preconizado no Consenso (máximo de 24 meses); e à indisponibilidade frequente no sistema público de saúde do medicamento (Itraconazol) indicado pelo Consenso em PCM.

Ressalta-se que muitos dos pacientes não participaram das coletas de sangue para as quatro últimas dosagens, pois não compareceram nas datas agendadas. Como se tratava de um estudo sorológico semestral, não foi possível realizar dosagens em datas anteriores ou posteriores às determinadas. Apesar de ter ocorrido uma grande perda no número de pacientes ao longo dos 42 meses de acompanhamento, os resultados sorológicos, mesmo que com número reduzido de pacientes nos últimos meses de avaliação, são de grande relevância uma vez que poucos estudos têm acompanhado pacientes durante um período de tempo tão prolongado. Essa evasão dos pacientes nos

últimos meses de acompanhamento do controle de cura é absolutamente compreensível. Todos os pacientes permanecem sob vigilância durante o tratamento, com visitas semestrais por três anos seguidos. Após o término do tratamento, verifica-se progressivamente a evasão dos pacientes, que não mais sentem necessidade de comparecer semestralmente, ou mesmo anualmente por mais três anos para o acompanhamento do controle de cura da doença.

Os elevados valores séricos de IgG, sTNF-RI e sTNF-RII detectados nos pacientes mesmo após três anos em controle de cura discordam de estudos anteriores que indicam o decaimento progressivo dos valores de tais marcadores associados com cura clínica. Esses resultados demonstram a necessidade de investimento em outras possibilidades para monitoramento de pacientes em controle de cura da PCM, uma vez que apenas o parâmetro sorológico com a dosagem de IgG parece não poder ser aplicado em grande parte dos pacientes tratados para PCM. Um estudo paralelo realizado com outro grupo de pacientes do Ambulatório de PCM do CTR-DIP-UFMG resultou em uma publicação na revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, em fevereiro de 2012. Neste trabalho, foram dosados os valores de IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 no soro de pacientes durante e após o tratamento para PCM, por meio da técnica de ELISA, utilizando-se Mexo e rPb27 como antígenos. Verificou-se a aplicabilidade da dosagem de IgG total utilizando o antígeno Mexo na técnica de ELISA para diferenciar praticamente todos os pacientes com PCM dos indivíduos saudáveis. A dosagem de IgG total utilizando o antígeno rPb27 também apresentou excelente resultado, entretanto, alguns pacientes não foram reativos frente a esse antígeno. As dosagens de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 não demonstraram aplicabilidade para diferenciar pacientes com PCM de indivíduos saudáveis, e nem qualquer associação com o período de tratamento. Observou-se que não há uma clara relação

entre tempo de tratamento para PCM e queda progressiva dos níveis de IgG, como também foi verificado no presente estudo. Esses resultados demonstraram mais uma vez a aplicabilidade dos antígenos Mexo e rPb27 para diferenciar pacientes com PCM, sejam tratados ou não, de indivíduos saudáveis (ANEXO C).

A quimiocina CXCL9 demonstrou inicialmente ser a mais indicada para monitoramento de pacientes em controle de cura. As baixas concentrações detectadas nos pacientes após a interrupção do tratamento, em concordância com a ausência de sintomatologia da PCM, demonstravam a aplicabilidade de CXCL9 como um parâmetro sorológico confiável. Entretanto, os baixos valores detectados durante o tratamento em muitos pacientes, sugerem que esta quimiocina deve ser testada em um grupo maior e mais variável de pacientes durante o tratamento.

As correlações encontradas entre os valores séricos dos marcadores avaliados e os demais parâmetros clínicos e epidemiológicos não acrescentaram grande impacto aos resultados. Observou-se, por exemplo, que para os marcadores IgG utilizando Mexo ou rPb27 como antígenos, sTNF-RI, sTNF-RII, CCL11 e CCL24 houve diferença significativa entre seus valores séricos e o tipo de tratamento. Entretanto, essa análise pode ser considerada um pouco distorcida já que a maioria dos pacientes foi tratada com sulfametoxazol-trimetoprim (21/26). Para IgG utilizando Mexo como antígeno, sTNF-RI, sTNF-RII e CCL24 foram verificados valores séricos mais elevados do paciente tratado com sulfametoxazol-trimetoprim associado a anfotericina B, quando comparado com os outros tipos de tratamento. Entretanto, um único paciente foi tratado com essa combinação medicamentosa, não podendo então ser considerado o resultado como algo generalizado. O mesmo ocorre quando são analisados o gênero, forma clínica e procedência dos pacientes, já que a maioria dos avaliados é homem (20/26); a forma clínica predominante é a crônica (23/26) e a maior parte dos pacientes é procedente de

áreas urbanas (18/26). Dessa forma, mesmo havendo diferença estatística entre alguns parâmetros e os valores séricos dos marcadores analisados, em virtude do número reduzido de pacientes nos grupos que apresentaram tal diferença, considera-se que os resultados foram pouco significativos diante da amostra analisada.

Os resultados deste estudo demonstram a lacuna ainda existente no controle de cura de pacientes tratados para PCM. Os marcadores analisados não apresentaram segurança para serem aplicados no monitoramento de pacientes em controle de cura, inclusive IgG, o único marcador sorológico sugerido pelo Consenso em PCM para diagnóstico e acompanhamento de pacientes após tratamento. Uma vez que para quase todos os pacientes tratados para PCM não há monitoramento laboratorial para confirmar a cura clínica do pacientes, persiste ainda a busca de parâmetros que possam ser aplicáveis na rotina ambulatorial de diferentes regiões do Brasil, com segurança e reprodutibilidade.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADERKA, D. The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 7, p. 231-240. 1996.
- AGGARWAL, BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. **Nat Rev Immunol**, v. 3, p. 745. 2003.
- ALESSANDRI, AL; SOUZA, AL; OLIVEIRA, SC; MACEDO, GC; TEIXEIRA, MM; TEIXEIRA, AL. Concentrations of CXCL8, CXCL9 and sTNFR1 in plasma of patients with pulmonary tuberculosis undergoing treatment. **Inflamm Res**, v. 55, p. 528-533. 2006.
- ALMEIDA, F. *Blastomyces e Paracoccidioides*. **An Fac Med São Paulo**, v. 22, p. 61-71. 1946.
- ALMEIDA, F. Estudos comparativos do granuloma coccidioidico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasito brasileiro. **An Fac Med São Paulo**, v. 5, p. 125-141. 1930.
- ALMEIDA, OP; JACKS, J JR; SCULLY, C. Paracoccidioidomycosis of the mouth: an emerging deep mycosis. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.14, n. 5, p.377-383. 2003.
- ALSALAMEH, S; WINTER, K; AL-WARD, R; WENDLER, J; KALDEN, JR; KINNE, RW. Distribution of TNF-alpha, TNF-R55 and TNF-R75 in the rheumatoid synovial membrane: TNF receptors are localized preferentially in the lining layer; TNF-alpha is distributed mainly in the vicinity of TNF receptors in the deeper layers. **Scand J Immunol**, v. 49, p. 278. 1999.
- AMEEN, M; TALHARI, C; TALHARI, S. Advances in paracoccidioidomycosis. **Clin Exp Dermatol**, v. 35, p. 576-580. 2010.

ANSARI, AW; HEIKEN, H; MEYER-OLSON, D; SCHMIDT, RE. CCL2: a potential prognostic marker and target of anti-inflammatory strategy in HIV/AIDS pathogenesis. **Eur J Immunol**, v. 41, n.12, p. 3412-3418. 2011.

ARRUDA, C; VALENTE-FERREIRA, RC; PINA, A; KASHINO, SS; FAZIOLI, RA; VAZ, CA; FRANCO, MF; KELLER, AC; CALICH, VL. Dual role of interleukin-4 (IL-4) in pulmonary paracoccidioidomycosis: endogenous IL-4 can induce protection or exacerbation of disease depending on the host genetic pattern. **Infect Immun**, v. 72, n. 7, p. 3932-3940. 2004.

BAGAGLI, E; FRANCO, M; BOSCO, SM; HEBELER-BARBOSA F, TRINCA LA, MONTENEGRO MR. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. **Med Mycol**, v. 41, n. 3, p. 217-223. 2003.

BAGAGLI, E; SANO, A; COELHO, KI; ALQUATI, S; MIYAJI, M; DE CAMARGO, ZP; GOMES, GM; FRANCO, M; MONTENEGRO, MR. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 58, n. 4, p.505-512. 1998.

BAGAGLI, E; THEODORO, RC; BOSCO, SM; MCEWEN, JG. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia**, n. 165, v. 4-5, p.197-207. 2008.

BARROZO, LV; MENDES, RP; MARQUES, SA; BENARD, G; SILVA, ME; BAGAGLI, E. Climate and acute/subacute paracoccidioidomycosis in a hyper-endemic area in Brazil. **Int J Epidemiol**, v. 38, p.1642-1649. 2009.

BENARD, G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 165, p. 209-221. 2008.

BIAGIONI, LM J; SOUZA, MJ; CHAMMA, LG; MENDES, RP; MARQUES, SA; MOTA, NGS; FRANCO, M. Serology of paracoccidioidomycosis. II. Correlation

between class-specific antibodies and clinical forms of the disease. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 78, p. 617-621. 1984.

BIALEK, R; IBRICEVIC, A; AEPINUS, C; NAJVAR, LK; FOTHERGILL, AW; KNOBLOCH, J; GRAYBILL, JR. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a nested PCR assay. **J Clin Microbiol**, v. 38, p. 2940-2942. 2000.

BLANCHET, X; LANGER, M; WEBER, C; KOENEN, RR; VON HUNDELSHAUSEN, P. Touch of Chemokines. **Front Immunol**, v. 3, p. 1-18. 2012.

BLOTTA, MHSJ; MAMONI, RL; OLIVEIRA, SJ; NOUER, SA; PAPAORDANOU, PMO; GOVEIA, A; ZOILO CAMARGO, ZP. Endemic regions of Paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the Southeast region. **Am J Trop Med Hyg**, v. 61, n. 3, p. 390-394. 1999.

BLÜML, S; SCHEINECKER, C; SMOLEN, JS; REDLICH, K. Targeting TNF receptors in rheumatoid arthritis. **Inter Immunol**, v. 24, n. 5, p. 275-281. 2012.

BOPP, C; BERNARDI, CD. Geopatologia da blastomicose sul-americana no Rio Grande do Sul. **O Hospital**, v. 71, p. 113-130. 1967.

BORELLI, D. Hipótesis sobre la ecología de *Paracoccidioides*. **Dermatol Venez**, v.3, p. 130-132. 1961.

BORELLI, D. Terapia de la paracoccidioidomycosis. Valor actual de los antiguos tratamientos. **Rev Argent Micol**, (supl), p. 13-20. 1987.

BORGES-WALMSLEY, MI; CHEN, D; SHU, X; Walmsley, AR. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends Microbiol**, v. 10, n. 2, p. 80-87. 2002.

BOZZI, A; REIS, BS; PRADO, FL; PEDROSO, EP; LEITE, MF; GOES, AM. Modulation of CD28 and CD86 expression in patients with paracoccidioidomycosis in different periods of treatment. **Scand J Immunol**, v. 60, n. 5, p. 500-505. 2004.

BRAUN, MC; LAHEY, E; KELSALL, BL. Selective suppression of IL-12 production by chemoattractants. **J Immunol**, v. 164, p. 3009-3017. 2000.

BRADFORD, RM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein by the principle of protein-dye binding. **Ann Biochem**, v. 72, p. 248. 1976.

BRIETZKE, E; KAPCZINSKI, F. TNF-alpha as a molecular target in bipolar disorder. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 1, n. 32, p. 1355-1361. 2008.

BRUMMER, E; CASTANEDA, E; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin Microb Rev**, v. 6, p. 89-117. 1993.

CALDINI, CP; XANDER, P; KIOSHIMA, ES; BACHI, AL; DE CAMARGO, ZP; MARIANO, M; LOPES, JD. Synthetic Peptides Mimic gp75 from *Paracoccidioides brasiliensis* in the Diagnosis of Paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 174, n. 1, p. 1-10. 2012.

CALICH, VLG; COSTA, TA; FELONATO, M; ARRUDA, C; BERNARDINO, S; LOURES, FV; RIBEIRO, LRR; VALENTE-FERREIRA, RC; PINA, A. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Mycopathologia**, v. 165, p. 223-236. 2008.

CALICH, VLG; KIPNIS, TL; MARIANO, M; FAVA-NETTO, C; DIAS DA SILVA, W. The activation of the complement system by *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro. Its opsonic effect and possible significance for an in vivo model of infection. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 12, p. 20-30. 1979.

CALICH, VLG; VAZ, CAC; BURGER, E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Res Immunol**, v. 149, p. 407-417. 1998.

CALLE, D; ROSERO, DS; OROZCO, LC; CAMARGO, D; CASTAÑEDA, E; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis in Colombia: an ecological study. **Epidemiol Infect**, v. 126, p. 309-315. 2001.

CALVI, SA; SOARES, AM; PERAÇOLI, MT; FRANCO, M; RUIZ, RL JR, MARCONDES-MACHADO, J; FECCHIO, D; MATTOS, MC; MENDES, RP. Study of bronchoalveolar lavage fluid in paracoccidioidomycosis: cytopathology and alveolar macrophage function in response to gamma interferon; comparison with blood monocytes. **Microbes Infect**, v. 5, n. 15, p.1373-1379. 2003.

CAMARGO, ZP. Serology of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 165, p. 289-302. 2008.

CAMARGO, ZP; FRANCO, MF. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Rev Iberoam Micol**, v. 17, n. 2, p. 41-48. 2000.

CAMARGO, ZP; UNTERKIRCHER, CS; TRAVASSOS, ZP. Identification of antigenic polypeptides of *Paracoccidioides brasiliensis* by immunoblotting. **J Med Vet Mycol**, v. 27, p. 407-412. 1989.

CHARO, IF; RANSOHOFF, RM. Mechanisms of disease: the many roles of chemokines and chemokines receptors in inflammation. **N Engl J Med**, v. 354, p. 610-621. 2006.

CHIRIFE, AV; DEL RIO, CA. Geopatología de la blastomicosis sudamericana. **Prensa Med Argent**, v. 52, p. 54-59. 1965

CISALPINO, PS; PUCCIA, R; YAMAUCHI, LM; CANO, MI; DA SILVEIRA, JF; TRAVASSOS, LR. Cloning, characterization, and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Biol Chem**, v. 271, p. 4553-4560. 1996.

COIMBRA Jr, CEA; WANKE, B; SANTOS, RV; DO VALLE, AC; COSTA, RL; ZANCOPE-OLIVEIRA, RM. Paracoccidioidin and histoplasmin sensitivity in the Tupí-Mondé Amerindian populations from Brazilian Amazonia. **Ann Trop Med Parasitol**, v.88, p. 197-207. 1994.

COLOBRAN, R; PUJOL-BORRELL, R; ARMENGOL, MP; JUAN, M. The chemokine network. I. How the genomic organization of chemokines contains clues for deciphering their functional complexity. **Clin and Exper Immunol**, v. 148, p. 208-217. 2007a.

COLOBRAN, R; PUJOL-BORRELL, R; ARMENGOL, MP; JUAN, M. The chemokine network. II. On how polymorphisms and alternative splicing increase the number of molecular species and configure intricate patterns of disease susceptibility. **Clin Exp Immunol**, v. 150, p. 1-12. 2007b.

CONTI DÍAZ, IA. Point of view on the unknown ecological niche of *Paracoccidioides brasiliensis*. Our hypothesis of 1989: Present status and perspectives. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 49, n. 2, p.131-134. 2007.

CORREA, MM; BEDOYA, AM; GUERRERO, MP; MENDEZ, J; RESTREPO, A; MCEWEN, JG. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by a dot blot assay using a recombinant *Paracoccidioides brasiliensis* p27 protein. **Mycoses**, v. 50, p. 41-47. 2007.

CORREDOR, GG; CASTAÑO, JH; PERALTA, LA; DÍEZ, S; ARANGO, M; MCEWEN, J; RESTREPO, A. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasyus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. **Rev Iberoam Micol**, v.16, p. 216-220. 1999.

CORVINO, CL; MAMONI, RL; FAGUNDES, GZZ; BLOTTA, MHSL. Serum interleukin-18 and soluble tumour necrosis factor receptor 2 are associated with disease severity in patients with paracoccidioidomycosis. **Clin and Exper Immunol**, v. 147, p. 483-490. 2007.

DE ALMEIDA, SM. Central nervous system paracoccidioidomycosis: an overview. **Braz J Infect Dis**, v. 9, n. 2, p.126-133. 2005.

DE CAMPOS, EP; SARTORI, JC; HETCH, ML; DE FRANCO, MF. Clinical and serologic features of 47 patients with paracoccidioidomycosis treated by amphotericin B. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 26, p. 212-217. 1984.

DE FARIAS, MR; CONDAS, LA; RIBEIRO, MG; BOSCO SDE, M; MURO, MD; WERNER, J; THEODORO, RC; BAGAGLI, E; MARQUES, SA; FRANCO, M. Paracoccidioidomycosis in a dog: case report of generalized lymphadenomegaly. **Mycopathologia**, v. 172, n. 2, p.147-152. 2011.

DE PAOLO, RW; LATHAN, R; KARPUS, WJ. CCR5 regulates high dose oral tolerance by modulating CC chemokine ligand 2 levels in the GALT. **J Immunol**, v. 173, p. 314-320. 2004.

DEL NEGRO, G. Tratamiento de paracoccidioido micose. **Rev Assoc Med Bras**, v. 20, p. 231-234. 1974.

DEL NEGRO, GMB; GARCIA, NM; RODRIGUES, EG; CANO, MIN; AGUIAR, MSMV; LIRIO, VS; LACAZ, CA. The sensitivity, specificity and efficiency values of some serological tests used in the diagnosis of paracoccidioidomycosis. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 33, p. 277-280. 1991.

DENIS, M. Proinflammatory cytokines in hypersensitivity pneumonitis. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 151, p. 164-169. 1995.

DIEZ, S; GARCIA, EA; PINO, PA; BOTERO, S; CORREDOR, GG; PERALTA, LA; CASTANO, JH; RESTREPO, A; MCEWEN, JG. PCR with *Paracoccidioides brasiliensis* specific primers: potential use in ecological studies. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 41, p. 351-358. 1999.

DIEZ, S; GOMEZ, BL; MCEWEN, JG; RESTREPO, A; HAY, RJ; HAMILTON, AJ. Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant 27- kilodalton and purified 87-kilodalton antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **J Clin Microbiol**, v. 41, p. 1536-42. 2003.

DINIZ, SN; CISALPINO, PS; KOURY, MC; ANDRADE, GM; NOGUEIRA, MG; GOES, AM. In vitro human immune reactivity of fast protein liquid chromatography fractionated *Paracoccidioides brasiliensis* soluble antigens. **Microbes Infect**, v. 1, p. 353. 1999.

DINIZ, SN; REIS, BS; ZOUAIN, CS; LEITE, MF; GOES, AM. Protective immunity induced in mice by F0 and FII antigens purified from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Vaccine**, v. 22, p. 485-492. 2004.

DO NASCIMENTO MARTINS, EM; REIS, BS; DE RESENDE, MA; DE ANDRADE, AS; GOES, AM. Mice immunization with radioattenuated yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*: influence of the number of immunizations. **Mycopathologia**, v. 168, n. 2, p. 51-58. 2009.

FALCÃO, PL; CORRÊA-OLIVEIRA, R; FRAGA, LA; TALVANI, A; PROUDFOOT, AE; WELLS, TN; WILLIAMS, TJ; JOSE, PJ; TEIXEIRA, MM. Plasma concentrations and role of macrophage inflammatory protein-1a during chronic *Schistosoma mansoni* infection in humans. **J Infect Dis**, v. 186, p. 1696-1700. 2002.

FAVA, SC; FAVA NETTO, C. Epidemiologic surveys of histoplasmin and paracoccidioidin sensitivity in Brazil. **Rev Inst Med Trop**, v. 40, p. 155-164. 1998.

FERNANDES, VC; COITINHO, JB; VELOSO, JM; ARAÚJO, AS; PEDROSO, EP; GÓES, AM. Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant rPb27 and rPb40 antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **J Immunol Methods**, v. 31, p. 78-84. 2011.

FERNANDES, VC; MARTINS, EM; BOELONI, JN; SERAKIDES, R; GOES, AM. Protective effect of rPb40 as an adjuvant for chemotherapy in experimental *Paracoccidioidomycosis*. **Mycopathologia**, v.174. n.2, p. 93-105. 2012.

FERREIRA, MS. *Paracoccidioidomycosis*. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 10, p.161-165. 2009.

FERREIRA, MC; DE OLIVEIRA, RT; DA SILVA, RM; BLOTTA, MH; MAMONI, RL. Involvement of regulatory T cells in the immunosuppression characteristic of patients with paracoccidioidomycosis. **Infect Immun**, v. 78, p. 4392-401. 2010.

FERREIRA-DA-CRUZ, MF; FRANCESCONI-DO-VALE, AC; ESPINERA, MC; WANKE, B; GALVÃO-CASTRO, B. Study of antibodies in paracoccidioidomycosis: follow-up of patients during and after treatment. **J Med Vet Mycol**, v. 28, p. 151-157. 1990.

FERREIRA, MS; FREITAS, LS; LACAZ, CS; DEL NEGRO, GM; AIELO, NT; GARCIA, MN; ASSIS, CM; SALEBIAN, A ; HEINS-VACCARI, E. M. Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from dog food probably contaminated with soil in Uberlandia, Brazil. **J Med Vet Mycol**, v. 38, p. 253-256.1990.

FLORES-VILLANUEVA, PO; RUIZ-MORALES, JA; SONG, CH; FLORES, LM; JO, EK; MONTAÑO, M; BARNES, PF; SELMAN, M; GRANADOS, J. A functional promoter polymorphism in monocyte chemoattractant protein-1 is associated with increased susceptibility to pulmonary tuberculosis. **J Exp Med**, v. 202, n. 12, p. 1649-1658. 2005.

FLYNN, JL; GOLDSTEIN, MM; CHAN, J; TRIEBOLD, KJ; PFEFFER, K; LOWENSTEIN, CJ; SCHREIBER, R; MAK, TW; BLOOM, BR. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. **Immunity**, v. 2, p. 561. 1995.

FORTES, MRP; KUROKAWA, CS; MARQUES, SA; MIOT, HA; MARQUES, MEA. Immunology of paracoccidioidomycosis. **An Bras Dermatol**, v. 86, n. 3, p.516-525. 2011.

FRANCO, MF; MONTENEGRO, MR; MENDES, RP; MARQUES, SA; DILLON, N L; MOTA, NG. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Rev Soc Bras Med trop**, v. 20, n. 2, p. 129-132. 1987.

GARCIA, NM; DEL NEGRO, GM; HEINS-VACCARI, EM; DE MELO, NT; DE ASSIS, CM; LACAZ, CDA S. *Paracoccidioides brasiliensis*, nova amostra isolada das fezes de um pingüim (*Pygoscelis adeliae*). **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 35, n. 3, p. 227-235. 1993.

GOLDANI, LZ; PICARD, M; SUGAR, AM. Synthesis of heat-shock proteins in mycelia and yeast forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Med Microbiol**, v. 40, n. 2, p. 124-128. 1994.

GOMES, GM; CISALPINO, PS; TABORDA, CP; DE CAMARGO, ZP. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. **J Clin Microbiol**, v. 38, p. 3478-80. 2000.

GONZALEZ, A; DE GREGORI, W; VELEZ, D; RESTREPO, A; CANO, LE. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of interferon-gamma activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infect Immun**, v. 68, p. 2546-2552. 2000.

GROSE, E; TAMSITT, JR. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia. **Sabouraudia**, v. 4, p.124-125. 1965.

GU, L; TSENG, S; HORNER, RM; TAM, C; LODA, M; ROLLINS, BJ. Control of Th2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. **Nature**, v. 404, p. 407-411. 2000.

GUERREIRO, R; SANTOS-COSTA, Q; AZEVEDO-PEREIRA, JM. The chemokines and their receptors: characteristics and physiological functions. **Acta Med Port**, v. 4, p. 967-976. 2011.

HANNA, SA; MONTEIRO DA SILVA, JL; GIANNINI, MJ. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. **Microbes Infect**, v. 2, p. 877-884. 2000.

HEBELER-BARBOSA, F; MONTENEGRO, MR; BAGAGLI, E. Virulence profiles of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos (*Dasypus novemcinctus*). **Med Mycol**, v. 41, n. 2, p.89-96. 2003.

HEHLGANS, T; PFEFFER, K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. **Immunol**, v. 115, p.1. 2005.

HOGAN, LH; KLEIN, BS; LEVITZ, SM. Virulence factors of medically important fungi. **Clin Microb Rev**, v. 9, n. 4, p. 469-488. 1996.

JACOBS, M; BROWN, N; ALLIE, N; CHETTY, K; RYFFEL, B. Tumor necrosis factor receptor 2 plays a minor role for mycobacterial immunity. **Pathobiology**, v. 68, p. 68. 2000.

JIMENEZ, BE; MURPHY, JW. In vitro effects of natural killer cells against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infect Immun**, v. 46, p. 552-558. 1984.

KANETSUNA, F; CARBONELL, LM; AZUMA, I; YAMAMURA, Y. Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Bacteriol**, v. 110, p. 208-218. 1972.

KARPUS, WJ; FIFE, BT. Keystone Symposia: chemokines and chemokine receptors. 16-21st February 2001, Taos, NM, USA. **Exper Opin Biol Ther**, v. 1, n. 3, p. 549-553. 2001.

KARPUS, WJ; KENNEDY, KJ; KUNKEL, SL; LUKACS, NW. Monocyte chemotactic protein 1 regulates oral tolerance induction by inhibition of T helper cell 1-related cytokines. **J Exp Med**, v. 187, p. 733-741. 1998.

KERN, WV; ENGEL, A; SCHIEFFER, S; PRÜMMER, O; KERN, P. Circulating tumor necrosis factor alpha (TNF), soluble TNF receptors, and interleukin-6 in human subacute bacterial endocarditis. **Infect Immun**, v. 61, p. 5413-5416. 1993.

KERN, P; HEMMER, CJ; GALLATI, H; NEIFER, S; KREMSNER, P; DIETRICH, M, PORZSOLT, F. Soluble tumor necrosis factor receptors correlate with parasitemia and disease severity in human malaria. **J Infect Dis**, v. 166, p. 930-934. 1992.

KEUTER, M; DHARMANA, E; GASEM, MH; VAN DER VEN-JONGEKRIJG, J; DJOKOMOELJANTO, R; DOLMANS, WM; DEMACKER, P; SAUERWEIN, R; GALLATI, H; VAN DER MEER, JW. Patterns of proinflammatory cytokines and inhibitors during typhoid fever. **J Infect Dis**, v. 169, p. 1306-1311. 1994.

LACAZ, CS; SAMPAIO, SAP. Tratamento de blastomicose sulamericana com anfotericina B. Resultados preliminares. **Rev Paulista Med**, v. 52, p. 443-450. 1958.

LOCATI, M; OTERO, K; SCHIOPPA, T; SIGNORELLI, P; PERRIER, P; BAVIERA, S; SOZZANI, S; MANTOVANI, A. The chemokine system: tuning and shaping by regulation of receptor expression and coupling in polarized responses. **Allergy**, v. 57, n. 11, p. 972-982. 2002.

LOTH, EA; CASTRO, SV; SILVA, JR; GANDRA, RF. Occurrence of 102 cases of paracoccidioidomycosis in 18 months in the Itaipu Lake region, western Paraná. **Rev Soci Bras Med Trop**, v. 44, n. 5, p. 636-637. 2011.

LUTZ, A. Uma mycose pseudococcidica localisada na bocca e observada no Brazil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas. **Braz Med**, n. 13, 15, p. 121-124, 141-144. 1908.

MACORIS, SA; SUGIZAKI, MF; PERAÇOLI, MT; BOSCO, SM; HEBELER-BARBOSA, F; SIMÕES, LB; THEODORO, RC; TRINCA, LA; BAGAGLI, E. Virulence attenuation and phenotypic variation of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos and patients. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.101, n.3, p.331-334. 2006

MALUF, MLF; PEREIRA, SRC; TAKAHACHI, G; SVIDZINSKI, TI. Prevalência de paracoccidioidomicose-infecção determinada através de teste sorológico em doadores

de sangue na região Noroeste do Paraná, Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 36, n. 1, p. 11-16. 2003.

MAMONI, RL; BLOTTA, MH. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. **Cytokine**, v. 32, n. 1, p. 20-29. 2005.

MAMONI, RL; NOUÉR, SA; OLIVEIRA, SJ; MUSATTI, CC; ROSSI, CL; CAMARGO, ZP; BLOTTA, MH Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. **Med Mycol**, v. 40, p. 153-159. 2002.

MANGIATERRA, ML; GIUSIANO, GE; ALONSO, JM; GORODNER, JO. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in a subtropical region with important environmental changes. **Bull Soc Pathol Exot**, v. 92, n. 3, p. 173-176. 1999.

MANTOVANI, A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. **Immunol Today**, v. 20, n. 6, p. 254-257. 1999.

MARQUES, SA. Paracoccidioidomycose. **An Bras Dermatol**, v. 73, n. 5, p.455-469. 1998.

MARQUES, SA. Paracoccidioidomycosis: Epidemiological, Clinical and Treatment update. **An Bras Dermatol**, v. 78, n. 2, p. 135-150. 2003.

MARQUES, SA. Paracoccidioidomycosis. **Clinics in Dermatology**, v. 30, p. 610-615. 2012.

MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycosis: the dimension of the problem of a neglected disease. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, n. 4, p. 480. 2010.

MATOS, WB; SANTOS, GMC; SILVA, VEB; GONÇALVES, EGR; SILVA, AR. Paracoccidioidomycosis in the state of Maranhão, Brazil: geographical and clinical aspects. **Rev Soc Bras Med Trop**, 45, n. 3, p. 385-389. 2012.

MATUTE, DR; McEWEN, JG; PUCCIA, R; MONTES, BA; SAN-BLAS, G; BAGAGLI, E; RAUSCHER, JT; RESTREPO, A; MORAIS, F; NIÑO-VEGA, G; TAYLOR, JW. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol Biol Evol**, v. 23, n. 1, p. 65-73. 2006.

MCEWEN, JG; ORTIZ, BL; GARCIA, AM; FLOREZ, AM; BOTERO, S; RESTREPO, A. Molecular cloning, nucleotide sequencing, and characterization of a 27-kDa antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genet Biol**, v. 20, p. 125-31. 1996.

MENDES-GIANNINI, MJ; TAYLOR, ML; BOUCHARA, JB; BURGER, E; CALICH, VL; ESCALANTE, ED; HANNA, SA; LENZI, HL; MACHADO, MP; MIYAJI, M; MONTEIRO DA SILVA, JL; MOTA, EM; RESTREPO, A; RESTREPO, S; TRONCHIN, G; VINCENZI, LR; XIDIEH, CF; ZENTENO, E. Pathogenesis II. Fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. **Med Mycol**, v. 1, p. 113-123. 2000.

MOURA, ACL; Teixeira, MM; Araújo, AS; Pereira, MCN; Pedrosa, ERP; Teixeira, AL. Serum levels of sTNF-R1, sTNF-R2 and CXCL9 correlate with disease activity in adult type paracoccidioidomycosis. **Acta Tropica**, v. 109, p. 213-218. 2009.

MUNK, ME; ANDING, P; SCHETTINI, APM; CUNHA, MG; KAUFMANN, SH. Soluble tumor necrosis factor alpha receptors in sera from leprosy patients. **Infect Immun**, v. 67, p. 423-425. 1999.

NAGIB, PR; GAMEIRO, J; DA COSTA, TA; DI GANGI, R; RIBEIRO, JDA S; PAULINO, LC; VERINAUD, L. Effect of HeNe laser irradiation on extracellular matrix deposition and expression of cytokines and chemokines in paracoccidioidomycotic lesions. **Photochem Photobiol**, v. 86, n. 4, p. 920-924. 2010.

NAIFF, RD; FERREIRA, LC; BARRETT, TV; NAIFF, MF; ARIAS, JR. Enzootic paracoccidioidomycosis in armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in the State of Pará. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 28, n. 1, p.19-27. 1986.

NASHLEANAS, M; KANALY, S; SCOTT, P. Control of *Leishmania major* infection in mice lacking TNF receptors. **J Immunol**, v. 160, p. 5506. 1998.

OLIVEIRA, SJ; MAMONI, RL; MUSATTI, CC; PAPAORDANOU, PM; BLOTTA, MH. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. **Microbes Infect**, v. 4, p.139-144. 2004.

ONO, SJ; NAKAMURA, T; MIYAZAKI, D; OHBAYASHI, M; DAWSON, M; TODA, M. Chemokines: roles in leukocyte development, trafficking, and effector function. **J Allergy Clin Immunol**, v. 111, p. 1185-1199. 2003.

ORTIZ, BL; DIEZ, S; URAN, ME; RIVAS, JM; ROMERO, M; CAICEDO, V; RESTREPO, A; MCEWEN, JG. Use of the 27-kilodalton recombinant protein from *Paracoccidioides brasiliensis* in serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 5, p. 826-30. 1998.

PATIÑO, MM; BURGOS, LC; RESTREPO, A. Effect of temperature on the mycelium to yeast transformation of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Sabouraudia**, v. 22, n. 6, p. 509-11. 1984.

PERAÇOLI, MT; FORTES, MR; DA SILVA, MF; MONTENEGRO, MR. Natural killer cell activity in experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 37, p. 129-136. 1995.

PEREIRA, AJCS; BARBOSA, W. Inquerito intradérmico para paracoccidioidomicose em Goiânia. **Rev Pat Trop**, v. 17, p.157-186. 1988.

PEREIRA, SRS. Contribuição das quimiocinas no diagnóstico da mielorradiculopatia esquistossomótica. Belo Horizonte: Faculdade de Medicina, UFMG, 2006. Dissertação de mestrado em Ciências da Saúde, Infectologia e Medicina Tropical.

PINTO, AR; PUCCIA, R; DINIZ, SN; FRANCO, MF; TRAVASSOS, LR. DNA-based vaccination against murine paracoccidioidomycosis using the gp43 gene from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Vaccine**, v.18, p. 3050-3058. 2000.

PRADO, M; SILVA, MB; LAURENTI, R; TRVASSOS, LR; TABORDA, CP. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 513-521. 2009.

PUCCIA, R; CARMONA, AK; GESZTESI, JL; JULIANO, L; TRAVASSOS, LR. Exocellular proteolytic activity of *Paracoccidioides brasiliensis*: cleavage of components associated with the basement membrane. **Med Mycol**, v. 36, p. 345-348. 1998.

RAMOS-E-SILVA M. Facial and oral aspects of some venereal and tropical diseases. **Acta Dermatovenereol Croat**, v. 12, n. 3, p.173-180. 2004

RAMOS-E-SILVA, M; SARAIVA, LES. Paracoccidioidomycosis. **Dermatol Clin**, v. 26, p. 257-269. 2008.

REIS, BS; FERNANDES, VC; MARTINS, EMN; SERAKIDES, R; GÓES, AM. Protective immunity induced by rPb27 of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Vaccine**, v. 26, p. 5461-5469. 2008.

RESTREPO, A; ARANGO, MD. In vitro susceptibility testing of *Paracoccidioides brasiliensis* to sulfonamides. **J Clin Microbiol**, v. 18, p. 190-194. 1980.

RESTREPO, A; JIMENEZ, B; DE BEDOUT, C. Survival of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells under microaerophilic conditions. **Sabouraudia**, v. 19, p. 301-305. 1981.

RESTREPO, A; McEWEN, JG; CASTANEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med Mycol**, v. 39, p. 233-241. 2001.

RESTREPO, A; SALAZAR, ME; CANO, LE; STOVER EP; FELDMAN D; STEVENS DA. Estrogens inhibit mycelium-to yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infect Immun**, v. 46, p. 346-353. 1984.

RESTREPO, S; TOBON, A; TRUJILLO, J; RESTREPO, A. Development of pulmonary fibrosis in mice during infection with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **J Med Vet Mycol**, v. 30, p.173-848. 1992.

RESTREPO-MORENO, A. Paracoccidioidomycosis. In: **Fungal Infections and Immune Responses**, p. 251-276. 1993.

RIBEIRO, OD. Nova terapeutica para blastomicose. **Publ Med**, v. 12, p. 36-54. 1940.

RICCI, G; MOTA, FT; WAKAMATSU, A; SERAFIM, RC; BORRA, RC; FRANCO, M. Canine paracoccidioidomycosis. **Med Mycol**, v. 42, p. 4, p. 379-383. 2004.

RICHINI-PEREIRA, VB; BOSCO SDE, M; GRIESE, J; THEODORO, RC; MACORIS, SA; DA SILVA, RJ; BARROZO, L; TAVARES, PM; ZANCOPE-OLIVEIRA, RM; BAGAGLI, E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. **Med Mycol**, v. 46, n. 1, p. 35-40. 2008.

RICHINI-PEREIRA, VB; BOSCO, SM; THEODORO, RC; BARROZO, L; PEDRINI, SC; ROSA, PS; BAGAGLI, E. Importance of xenarthrans in the eco-epidemiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **BMC Res Notes**, v. 17; n. 2, p. 228. 2009.

RIVITTI, EA; AOKI, V. Deep fungal infections in tropical countries. **Clin Dermatol**, v. 17, p.171-190. 1999.

SADAHIRO, A; DIOGO, CL; OSHIRO, TM; SHIKANAI-YASUDA, MA. Kinetics of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and IL-4 production by mononuclear cells stimulated with gp43 peptides, in patients cured of paracoccidioidomycosis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 40, n. 2, p.156-162. 2007.

SADEK, MI; SADA, E; TOOSI, Z; SCHWANDER, SK; RICH, EA. Chemokines induced by infection of mononuclear phagocytes with mycobacteria and present in lung alveoli during active pulmonary tuberculosis. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 19, p. 513-521. 1998.

SAN-BLAS, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall glucans, pathogenicity, and dimorphism. **Curr Top Med Mycol**, v.1, p. 235-257. 1985.

SAN-BLAS, G; NIÑO-VEGA G. *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 183-195. 2008.

SAN-BLAS, G; NINO-VEGA, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. In: Cihlar RL, Calderone RA, editors. *Fungal pathogenesis: principles and clinical applications 2001*, New York: Marcel Dekker.

SAN-BLAS, G; SAN-BLAS, F. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. **Mycopathologia**, v. 62, p. 77-86. 1977.

SANTOS, LS; FERNANDES, VC; CRUZ, SG; SIQUEIRA, WC; GÓES, AM; PEDROSO, ERP. Profile of total IgG, IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 levels in sera of patients with paracoccidioidomycosis: treatment follow-up using Mexo and rPb27 as antigens in an ELISA. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 1, p. 1-10. 2012.

SHIKANAI-YASUDA, MA; TELLES FILHO, FQ; MENDES, RP; COLOMBO, AL; MORETI, ML. Guidelines in paracoccidioidomycosis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39, p. 297-310. 2006.

SHOME, SK; BATISTA, AC. Occurrence of *Paracoccidioides brasiliensis* in the soil of Recife, Brazil. **Rev Fac Med Univ Fed Ceara**, v.3, p. 90-94. 1963.

SILVA, MB; MARQUES, AF; NOSANCHUK, JD; CASADEVALL, A; TRAVASSOS, LR; TABORDA, CP. Melanin in the dimorphic fungal pathogen

Paracoccidioides brasiliensis: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. **Microbes Infect**, v. 8, n. 1, p. 197-205. 2006.

SILVA-VERGARA, ML; MARTINEZ, R; CAMARGO, ZP; MALTA, MH; MAFFEI, CM; CHADU, JB. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. **Med Mycol**, v. 38, n. 3, p.193-199. 2000.

SILVEIRA-LEMONS, D; TEIXEIRA-CARVALHO, A; MARTINS-FILHO, OA; SOUZA-SOARES, AL; CASTRO-SILVA, P; COSTA-SILVA, MF; GUIMARÃES, PHG; FERRAZ, HBF; OLIVEIRA-FRAGA, LA; TEIXEIRA, MM; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Seric chemokines and chemokine receptors in eosinophils during acute human schistosomiasis mansoni **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, p. 380-386. 2010.

SILVESTRE, MT; FERREIRA, MS; BORGES, AS; ROCHA, A; DE SOUZA, GM; NISHIOKA, SA. Monoarthritis of the knee as an isolated manifestation of paracoccidioidomycosis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 30, n. 5, p.393-395. 1997.

SOARES, AM; CALVI, AS; PERAÇOLI, MT; FERNANDEZ, AC; DIAS, LA; DOS ANJOS, AR. Modulatory effect of prostaglandins on human monocyte activation for killing of high- and low virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Immunology**, v. 102, p. 480-485. 2001.

SOUTO, JT; ALIBERTI, JC; CAMPANELLI, AP; LIVONESI, MC; MAFFEI, CM; FERREIRA, BR; TRAVASSOS, LR; MARTINEZ, R; ROSSI, MA; SILVA, JS. Chemokine production and leukocyte recruitment in the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice is modulated by interferon- γ . **Am J Pathol**, v. 163, p. 583-590. 2003.

SOUTO, JT; FIGUEIREDO, F; FURLANETTO, A; PFEFFER, K; ROSSI, MA; SILVA, JS. Interferongamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **Am J Pathol**, v. 156, p.1811-1820. 2000.

SOUZA, AL; ROFFÊ, E; PINHO, V; SOUZA, DG; SILVA, AF; RUSSO, RC; GUABIRABA, R; PEREIRA, CA; CARVALHO, FM; BARSANTE, MM; CORREA-OLIVEIRA, R; FRAGA, LA; NEGRÃO-CORREA, D; TEIXEIRA, MM. Potential role of chemokine macrophage inflammatory protein-1a in human and experimental schistosomiasis. **Infect Immun**, v. 73, p. 2515-2523. 2005.

SPLENDRE, A. Un'afezione micotica con localizzazione nella mucosa della bocca, osservada in Brasile, determinata da funghi appartenentia alla tribù degli exoascei (*Zymonema brasiliense* n.s.p.). In: **Volume in onore del Prof. Angelo Celli nel 25° anno di insegnamento**. Roma: G. Bertero, 1912. p. 421-458 *apud* LACAZ, CS; PORTO, CS; MARTINS, CS *et al.* **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. 9.ed. São Paulo: Sarvier, cap. 27. p.639-729. 2002.

STANDIFORD, TJ; ROLFE, MW; KUNKEL, SL; LYNCH, JP 3RD; BURDICK, MD; GILBERT, AR; ORRINGER, MB; WHYTE, RI; STRIETER, RM. Macrophage inflammatory protein-1 alpha expression in interstitial lung disease. **J Immunol**, v. 151, p. 2852-2863. 1993.

TABORDA, CP; JULIANO, MA; PUCCIA, R; FRANCO, MV; TRAVASSOS, LR. Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in Balb/c mice. **Infect Immun**, v. 6, p.786-793. 1998.

TABORDA, CP; SILVA, MB; NOSANCHUK, JD; TRAVASSOS, LR. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. **Mycopathologia**, v.165, n. 4-5, p. 331-339. 2008.

TEIXEIRA, MM; THEODORO, RC; DE CARVALHO, MJ; FERNANDES, L; PAES, HC; HAHN, RC; MENDOZA, L; BAGAGLI, E; SAN-BLAS, G; FELIPE, MS. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Mol Phylogenet Evol**, v. 52, n. 2, p.273-283. 2009.

TELES, FRR; MARTINS, ML. Laboratorial diagnosis of paracoccidioidomycosis and new insights for the future of fungal diagnosis. **Talanta**, v. 85, p. 2254-2264. 2011.

TERÇARIOLI, G; BAGAGLI, E; REIS, GM; THEODORO, RC; BOSCO, SMG; MACORIS, SAG; RICHINI-PEREIRA, VB. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. **BMC Microbiol**, v. 22, n. 7, p. 92-99. 2007.

TERRA, GMF; RIOS-GONCALVEZ, AJ; LONDERO, AT; BRAGA, MP; OURIVURI, AL; MESQUITA, CC; MARINHO, JCA; ERVILHA, LM; VIEIRA, ARM; DEKER-MADER, S; DUARTE, DMA. Paracoccidioidomicose em crianças. **Arq Bras Med**, v. 65, p. 8-15. 1991.

TOLEDO, RG; DA SILVA, WD; CALICH, VL; KIPNIS, TL. Mannose-binding lectin complement pathway plays a key role in complement activation by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mol Immunol**, v. 48, n. 1-3, p. 26-36. 2010.

TRAVASSOS, LR; TABORDA, CP. New advances in the development of a vaccine against paracoccidioidomycosis. **Frontiers in Microbiol**, v. 3, p. 1-6. 2012.

VALLE, ACF; COSTA, RLB. Paracoccidioidomicose. In: BATISTA, RS; IGREJA, RP; GOMES, AD; HUGGINS, DW. Medicina Tropical: abordagem atual das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: **Cultura Médica**, p. 943-958. 2001.

VALLE, AC; GUIMARÃES, RR; LOPES, DJ; CAPONE, D. Thoracic radiologic aspects in paracoccidioidomycosis. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 34, p. 107-115. 1992.

WANKE, B; AIDÊ, MA. Paracoccidioidomycosis. **J Bras Pneumol**, v. 35, p. 1245-1249. 2009.

ZIJLSTRA, EE; VAN DER POLL, T; MEVISSSEN, M. Soluble receptors for tumor necrosis factor as markers of disease activity in visceral leishmaniasis. **J Infect Dis**, v. 171, p. 498-501. 1995.

ZLOTNIK, A; YOSHIE, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. **Immunity**, v.2, p.121-127, 2000.

10 APÊNDICES

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO DE PESQUISA: “Estudo clínico e laboratorial de controle de cura de pacientes submetidos a tratamento para paracoccidiodomicose atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais”

PESQUISADORES: Lílian da Silva Santos
Prof. Enio Roberto Pietra Pedroso

Você está sendo convidado a participar desta pesquisa científica como voluntário (você pode escolher se quer participar ou não). Para isso, deverá ler este documento todo e perguntar a um dos pesquisadores tudo o que não entendeu antes de aceitar participar da pesquisa. Esta pesquisa irá estudar a paracoccidiodomicose, a micose profunda mais comum no Brasil, que pode se manifestar em diversos órgãos, principalmente pulmões, gânglios, pele, supra-renais, ou vários destes ao mesmo tempo, podendo ser muito grave e até fatal. O objetivo da pesquisa é entender melhor essa doença, e ajudar na prevenção, no tratamento e no controle da doença no futuro.

Todos os pacientes que concordarem em participar da pesquisa terão atendimento médico regular no Ambulatório do Anexo Orestes Diniz do Hospital das Clínicas da UFMG (CTR-DIP). Os pacientes deverão realizar periodicamente exames de sangue e qualquer outro exame que o médico julgar necessário para o acompanhamento do paciente e melhora de seu estado de saúde. Mesmo após sua recuperação e interrupção do tratamento, você deverá continuar comparecendo às consultas nos dias marcados pelo médico, para avaliação de seu estado de saúde. Caso você tenha algum sintoma antes do dia agendado para seu retorno, você deve comparecer ao Ambulatório Orestes Diniz numa segunda-feira à tarde ou, caso não seja possível esperar entre em contato pelos telefones abaixo.

O seu nome e todos os seus dados pessoais não serão informados a outras pessoas. Sua ficha médica e seus exames serão conhecidos somente pela equipe médica que atende você. Se você não quiser participar desta pesquisa, você receberá o mesmo tratamento e os mesmos cuidados que os pacientes participantes da pesquisa recebem.

Se você concordar em participar, você estará ajudando diversos pesquisadores a entender a paracoccidiodomicose e como se pode melhorar seu tratamento e a cura dos doentes. Assim, poderá ajudar muitas pessoas que hoje estão com essa doença, como você, ou que podem vir a ficar doentes no futuro.

Você não terá nenhuma despesa e nem receberá pagamento nenhum para participar da pesquisa; a qualquer momento, você poderá desistir de fazer parte dela, sem prejuízo no seu tratamento.

“Depois de ter lido este documento todo e ter resolvido minhas dúvidas com um dos pesquisadores, eu declaro que concordo com seus termos e aceito participar desta pesquisa.”

Belo Horizonte, de de .

Nome do paciente

Assinatura do paciente

Nome do pesquisador responsável

Assinatura do pesquisador responsável

APÊNDICE C

Análise de regressão para dados longitudinais com medidas repetidas

```

library(gee)
library(epicalc)
library(geepack)
library(lattice)
dados=read.table("C:\\Users\\Phoebe\\Documents\\UFMG\\Medicina\\Lilian
Santos\\dados.csv",sep=";",h=TRUE)
dados=subset(dados, tempo<=5)
> names(dados)
[1] "id"      "iggpb27"  "iggmexo"  "stnfri"
[5] "stnfrii" "cxcl9"    "ccl3"     "ccl11"
[9] "ccl24"    "tempo"    "genero"   "tratamento"
[13] "forma.pcm"  "forma.clinica" "local"    "idade"
[17] "area"

cov=dados[,10:17]
cov=subset(cov,tempo==0)
## Excluindo forma.pcm por a matriz ser singular
#1
# iggpb27
fit.iggpb27=geeglm(iggpb27~tempo+genero+tratamento+forma.clinica+idade+area,id=id,data=
dados, corstr="exchangeable")
summary(fit.iggpb27)
Coefficients:

```

	Estimate	Std.err	Wald	Pr(> W)
(Intercept)	-0.63000	0.21534	8.56	0.0034 **
tempo	-0.00344	0.00375	0.84	0.3590
generoM	0.16956	0.16029	1.12	0.2901
tratamentoItra	-0.17676	0.25450	0.48	0.4873
tratamentoSMZ+TMP	0.42541	0.13107	10.53	0.0012 **
tratamentoSMZ+TRP. AB	0.21612	0.14086	2.35	0.1250
forma.clinicaMULT	0.00319	0.31040	0.00	0.9918
forma.clinicaUNI	0.12344	0.32542	0.14	0.7044
idade	0.00866	0.00687	1.59	0.2079
areaurbana	0.42664	0.14909	8.19	0.0042 **

```

#2
# iggmexo
fit.iggmexo=geeglm(iggmexo~tempo+genero+tratamento+forma.clinica+idade+area,id=id,data
=dados, corstr="exchangeable")
summary(fit.iggmexo)

```

Coefficients:

	Estimate	Std.err	Wald	Pr(> W)
(Intercept)	0.13073	0.15210	0.74	0.3900
tempo	-0.00729	0.00279	6.84	0.0089 **
generoM	-0.04463	0.09262	0.23	0.6299
tratamentoItra	-0.73700	0.16794	19.26	1.1e-05 ***
tratamentoSMZ+TMP	-0.27715	0.11069	6.27	0.0123 *
tratamentoSMZ+TRP. AB	0.26914	0.13605	3.91	0.0479 *
forma.clinicaMULT	-0.22180	0.10990	4.07	0.0436 *
forma.clinicaUNI	-0.09118	0.12682	0.52	0.4722
idade	0.01556	0.00355	19.15	1.2e-05 ***
areaurbana	0.23993	0.09143	6.89	0.0087 **

#3

stnfri

```
fit.stnfri=geeglm(stnfri~tempo+genero+tratamento+forma.clinica+idade+area,id=id,data=dados,
corstr="exchangeable")
```

```
summary(fit.stnfri)
```

Coefficients:

	Estimate	Std.err	Wald	Pr(> W)
(Intercept)	3684.54	696.75	27.96	1.2e-07 ***
tempo	-28.14	11.25	6.25	0.0124 *
generoM	4.83	244.32	0.00	0.9842
tratamentoItra	-237.91	431.97	0.30	0.5818
tratamentoSMZ+TMP	259.18	259.30	1.00	0.3175
tratamentoSMZ+TRP. AB	1429.54	480.18	8.86	0.0029 **
forma.clinicaMULT	338.45	458.10	0.55	0.4600
forma.clinicaUNI	684.16	696.50	0.96	0.3260
idade	-21.74	14.07	2.39	0.1222
areaurbana	-448.61	334.30	1.80	0.1796

#4

stnfrii

```
fit.stnfrii=geeglm(stnfrii~tempo+genero+tratamento+forma.clinica+idade+area,id=id,data=dados,
corstr="exchangeable")
```

```
summary(fit.stnfrii)
```

Coefficients:

	Estimate	Std.err	Wald	Pr(> W)
(Intercept)	10472.2	2200.1	22.66	1.9e-06 ***

tempo	-132.6	26.6	24.80	6.4e-07 ***
generoM	-639.9	767.1	0.70	0.4042
tratamentoItra	1451.5	1263.0	1.32	0.2505
tratamentoSMZ+TMP	2070.4	649.2	10.17	0.0014 **
tratamentoSMZ+TRP. AB	7717.1	1301.7	35.15	3.1e-09 ***
forma.clinicaMULT	3639.6	1247.3	8.51	0.0035 **
forma.clinicaUNI	4301.1	1676.1	6.59	0.0103 *
idade	-63.7	38.2	2.77	0.0958 .
areaurbana	-1955.7	1005.2	3.79	0.0517 .

#5

cxc19

```
fit.cxc19=geeglm(cxc19~tempo+genero+tratamento+forma.clinica+idade+area,id=id,data=dados
, corstr="exchangeable")
summary(fit.cxc19)
```

Coefficients:

	Estimate	Std.err	Wald	Pr(> W)
(Intercept)	145.793	59.212	6.06	0.0138 *
tempo	2.388	0.896	7.10	0.0077 **
generoM	97.218	43.229	5.06	0.0245 *
tratamentoItra	134.936	103.334	1.71	0.1916
tratamentoSMZ+TMP	28.030	37.533	0.56	0.4552
tratamentoSMZ+TRP. AB	-115.453	75.358	2.35	0.1255
forma.clinicaMULT	-11.181	38.004	0.09	0.7686
forma.clinicaUNI	-116.870	64.541	3.28	0.0702 .
idade	1.138	1.309	0.76	0.3848
areaurbana	-31.786	42.449	0.56	0.4540

#6

ccl3

```
fit.ccl3=geeglm(ccl3 ~ tempo+genero+tratamento+forma.clinica+idade+area,id=id, data=dados,
corstr="exchangeable")
summary(fit.ccl3)
```

Coefficients:

	Estimate	Std.err	Wald	Pr(> W)
(Intercept)	-189.5	1388.7	0.02	0.8915
tempo	-92.5	30.5	9.22	0.0024 **
generoM	1087.1	1038.2	1.10	0.2951
tratamentoItra	-2018.1	1829.8	1.22	0.2701
tratamentoSMZ+TMP	1042.4	942.2	1.22	0.2686

tratamentoSMZ+TRP. AB	3384.0	2305.4	2.15	0.1421
forma.clinicaMULT	3569.8	1885.7	3.58	0.0583 .
forma.clinicaUNI	3358.7	1941.5	2.99	0.0836 .
idade	-32.4	58.8	0.30	0.5818
areaurbana	662.0	1160.6	0.33	0.5684

#7

ccl11

```
fit.ccl11=geeglm(ccl11~tempo+genero+tratamento+forma.clinica+idade+area,id=id,data=dados
, corstr="exchangeable")
```

summary(fit.ccl11)

Coefficients:

	Estimate	Std.err	Wald	Pr(> W)
(Intercept)	166.49	96.26	2.99	0.0837 .
tempo	3.51	1.37	6.53	0.0106 *
generoM	-189.46	71.35	7.05	0.0079 **
tratamentoItra	-506.09	100.39	25.41	4.6e-07 ***
tratamentoSMZ+TMP	-82.22	52.86	2.42	0.1198
tratamentoSMZ+TRP. AB	-139.79	70.86	3.89	0.0485 *
forma.clinicaMULT	-4.37	97.98	0.00	0.9644
forma.clinicaUNI	79.99	106.25	0.57	0.4516
idade	3.89	2.57	2.29	0.1302
areaurbana	176.49	57.19	9.52	0.0020 **

#8

ccl24

```
fit.ccl24=geeglm(ccl24~tempo+genero+tratamento+forma.clinica+idade+area,id=id,data=dados
, corstr="exchangeable")
```

summary(fit.ccl24)

Coefficients:

	Estimate	Std.err	Wald	Pr(> W)
(Intercept)	-137.7	635.1	0.05	0.82836
tempo	-25.1	11.0	5.16	0.02306 *
generoM	132.5	332.7	0.16	0.69049
tratamentoItra	-948.2	856.3	1.23	0.26814
tratamentoSMZ+TMP	-826.2	548.0	2.27	0.13165
tratamentoSMZ+TRP. AB	3391.7	923.8	13.48	0.00024 ***
forma.clinicaMULT	926.3	623.1	2.21	0.13711
forma.clinicaUNI	339.0	739.1	0.21	0.64648
idade	42.8	19.1	5.01	0.02522 *

areaurbana 1044.0 409.6 6.50 0.01080 *

```
> round(cor(dados[,2:9],use="pairwise.complete.obs",method="spearman"),2)
      iggpb27 iggmexo stnfri stnfrii cxcl9  ccl3 ccl11 ccl24
iggpb27  1.00  0.35 -0.20 -0.16 -0.15  0.02  0.39  0.39
iggmexo  0.35  1.00  0.11  0.07  0.10  0.17  0.18  0.31
stnfri   -0.20  0.11  1.00  0.54  0.04  0.21 -0.27 -0.08
stnfrii  -0.16  0.07  0.54  1.00 -0.20  0.34 -0.41  0.06
cxcl9    -0.15  0.10  0.04 -0.20  1.00  0.07  0.15 -0.12
ccl3     0.02  0.17  0.21  0.34  0.07  1.00 -0.01  0.10
ccl11    0.39  0.18 -0.27 -0.41  0.15 -0.01  1.00  0.24
ccl24    0.39  0.31 -0.08  0.06 -0.12  0.10  0.24  1.00
```

11 ANEXOS

ANEXO A - Documento de aprovação do presente estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais - COEP/UFMG



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

Parecer nº. ETIC 0089.0.410.4100-09

**Interessado(a): Prof. Ênio Roberto Pietra Pedroso
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina - UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 03 de março de 2010, o projeto de pesquisa intitulado **"Estudo clínico-laboratorial e imunológico para avaliação de recidiva de paracoccidioidomicoses em pacientes submetidos a tratamento específico atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


**Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG**

ANEXO B - Documento de aprovação de estudo anterior pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais - COEP/UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº ETIC 547/07

Interessado: Prof. Ênio Roberto Pietra Pedroso
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP, aprovou, no dia 14 de fevereiro de 2008, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **“Estudo Clínico-laboratorial e imunológico de controle de cura de portadores de paracoccidiodomicose atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais”** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Prof. Maria Teresa Marques Amaral,
Coordenadora do COEP/UFMG

2ª via

ANEXO C - Artigo publicado na Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz em fevereiro de 2012

Profile of total IgG, IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 levels in sera of patients with paracoccidioidomycosis: treatment follow-up using Mexo and rPb27 as antigens in an ELISA

Lilian da Silva Santos^{1/+}, Viviane Cristina Fernandes³, Samuel Gonçalves da Cruz², Weverton César Siqueira², Alfredo Miranda Goes³, Ênio Roberto Pietra Pedroso^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Infectologia e Medicina Tropical ²Faculdade de Medicina ³Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

The levels of total of IgG, IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 were evaluated in 54 patients with chronic paracoccidioidomycosis (PCM) before, during and after treatment using an enzyme-linked immunosorbent assay with Mexo and recombinant Pb27 (rPb27) as the antigens. Mexo was effective in distinguishing PCM patients from individuals in the negative control group (NC) based on total IgG and rPb27 performed worse than Mexo when these two groups were compared. IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 could not be used to clearly distinguish PCM patients from those in the NC group using either antigen. There was no clear relationship between antibody levels and the period of treatment. The majority of patients presented with decreased antibody levels during treatment, with no statistically significant differences among the different periods of treatment. Only IgG4 presented a negative correlation between its levels and clinical improvement during treatment. In total, 65% of untreated PCM patients showed reactivity against IgG4 when the Mexo antigen was used and this reactivity decreased over the course of treatment. There was a tendency towards decreasing antibody levels during treatment, but these antibody levels did not necessarily clear after the treatment was stopped. Mexo was useful for PCM diagnosis using total IgG; however, more studies are necessary before this antigen can be used in measuring the levels of total IgG and its subclasses for monitoring patients during treatment.

Key words: treatment follow-up - ELISA - Mexo antigen - rPb27 antigen - paracoccidioidomycosis - IgG subclasses

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic disease caused by the thermomorphous fungus *Paracoccidioides brasiliensis* (Marques 1998). This deep mycosis is endemic in many Latin American countries, with the majority of cases occurring in Brazil, followed by Venezuela, Colombia, Ecuador and Argentina (Shikanai-Yasuda 2006, Ameen et al. 2010). The most affected age group is between 30-50 years old, 90% of whom are men who live in rural areas and work in agriculture. Recently, endemic foci of PCM infection were found in urban areas, which can be related to population migration from rural to urban areas (Blotta et al. 1999). Epidemiological studies have demonstrated that the number of patients clinically diagnosed with PCM may represent only a small proportion of infected individuals (Almeida et al. 2003). In endemic areas, up to 50% of inhabitants have been exposed to the fungus, but only a minority develop the disease (Ameen et al. 2010).

PCM is characterised as an infection when patients are positively diagnosed using serological, microbiological or molecular techniques, even in the absence of signs

or symptoms of the disease because many patients can be asymptomatic at the time of first evaluation. The evolution of PCM infection can resolve spontaneously, progress to disease or remain latent, depending on the immune response of the host (Rivitti & Aoki 1999). PCM disease may manifest with several symptoms ranging from local and benign to disseminated, severe and progressive, leading to fatal outcomes in the absence of treatment. The clinical manifestations of PCM disease may vary depending on several factors, such as the virulence of the fungus, the host's established immune response, the affected areas and other intrinsic factors of the host (Bernard 2008, Mendes-Giannini et al. 2008). There are two clinical forms of PCM disease: the acute, or juvenile form, and the adult, or chronic form (Franco et al. 1987, Ramos-e-Silva et al. 2008). The acute form affects children and adolescents of both genders and represents 5-15% of all cases. This clinical form is characterised by a rapid and aggressive progression, mainly affecting the reticuloendothelial system. Frequent manifestations include skin lesions, digestive symptoms and lymphadenopathy (Nogueira et al. 2006). The chronic form occurs in more than 90% of patients, most of them adult males between 30-50 years old. This form progresses slowly, with pulmonary symptoms present in 90% of the affected adults (Shikanai-Yasuda et al. 2006, Wanke & Aidê 2009).

PCM is associated with a decrease in the cellular immune response and an increase in the humoral immune response. Patients with severe forms of PCM have strong

Financial support: CAPES, FAPEMIG, CNPq
+ Corresponding author: lilianufop@yahoo.com.br
Received 16 December 2010
Accepted 25 November 2011

polyclonal B cell activation, hypergammaglobulinaemia and high levels of specific antibodies, which are generally correlated with disease severity (Del Negro et al. 2000, Juvenale et al. 2001, Shikanai-Yasuda et al. 2006).

The assessment of the humoral immune response is an important tool for the diagnosis and follow-up care of PCM patients. Different serological techniques are used to measure the levels of IgG, such as double immunodiffusion (DI), counterimmuno-electrophoresis (CIE), immunofluorescence (IFI), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblotting. These techniques may use various antigenic preparations to assess antibodies against *P. brasiliensis*. Some of these techniques use crude antigenic preparations, while others use specific antigenic preparations, such as the 19 kDa, 31 kDa, 43 kDa and 70 kDa glycoproteins and recombinant Pb27 (rPb27) (Ortiz et al. 1998, Baida et al. 1999, Diez et al. 2003, Albuquerque et al. 2005, Correa et al. 2007, Reis et al. 2008, Fernandes et al. 2011, Silveira-Gomes et al. 2011). However, there is no consensus on the best techniques for the diagnosis and follow-up care of PCM patients (Campos et al. 1990, Alves 1996, Martins et al. 1997, Del Negro et al. 2000, Camargo 2008).

Different techniques have been employed to measure the levels of IgG and its subclasses IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4. Some groups have attempted to associate classes of immunoglobulins with clinical forms of PCM or clinical improvement during treatment (Mota & Franco 1979, Barbosa et al. 1981, Biagioni et al. 1984, Baida et al. 1999, Del Negro et al. 2000, Juvenale et al. 2001). However, the relationship between the levels of immunoglobulin subclasses and clinical improvement remains controversial.

Different classes of drugs can be used for the treatment of PCM, including sulphonamides (sulphamethoxazole-trimethoprim), amphotericin B, imidazole derivatives (ketoconazole, itraconazole and fluconazole) and triazole derivatives (voriconazole). Drug selection is based on disease severity, but the treatment cost can be an important factor in drug choice (Shikanai-Yasuda et al. 2006).

This study aimed to measure the serum levels of total IgG, IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 in both untreated PCM patients and patients after different treatment durations via an ELISA with two different antigenic preparations (Mexo and rPb27) to verify the suitability of these antigens for use in the diagnosis and follow-up care of PCM patients.

SUBJECTS, MATERIALS AND METHODS

Patients and control sera - Sera were collected from 54 patients with chronic PCM before, during and after treatment at the Training Center and Parasitic Infectious Diseases Reference, Hospital and Clinics (HC) of Federal University of Minas Gerais (UFMG), Brazil. A total of 92 serum samples were assessed and, of these, 38 were obtained from the same patients at different time points during and after treatment. Sera were aliquoted and stored at -20°C until use. The diagnosis of PCM was determined by biopsy in all patients and, in some cases, conventional serological tests were used in combination with the biopsy results. Patients were treated with ketoconazole, itraconazole, sulphamethoxazole-trimeth-

oprim or amphotericin B during hospitalisation. The patients in this study were not treated with immunosuppressive drugs. The first analysis evaluated one serum sample from each PCM patient before or at the beginning of treatment to compare the levels of total IgG and its subclasses with those found in healthy individuals (NC group) to show the suitability of Mexo and rPb27 as antigens for use in PCM diagnosis. This assay was performed on the 54 initial serum samples from the PCM patients and 10 serum samples from the NC group. Next, a second analysis was performed to assess the levels of total IgG and its subclasses during PCM treatment. To accomplish this analysis, a total of 92 serum samples were obtained (many patients provided more than one serum sample during treatment) and the results of these samples were compared with those from the NC group. Serum samples were classified according to the duration of time over which the patients were treated, the time elapsed since the end of treatment as follows: not treated (NT) (14), treated for one month (T1M) (8), treated for two-nine months (T2-9M) (19), treated for one year (T1Y) (13), treated for two years (T2Y) (11), treated for three-four years (T3-4Y) (16), six-nine months from the end of treatment (AT6-9M) (3), one year from the end of treatment (AT1Y) (2), two years from the end of treatment (AT2Y) (2) and three years from the end of treatment (ATY3) (1). Additionally, one group contained patients who had relapsed (Rel) (3). In both experiments, sera from 10 NC from the Institute of Biological Sciences (UFMG) were assessed to determine cut-off values of the ELISA. Patients with concomitant diseases, such as toxoplasmosis, histoplasmosis, cryptococcosis, infectious mononucleosis, acquired immune deficiency syndrome, tuberculosis, sarcoidosis or lymphoma, were excluded from the study. This study was approved by the Ethical Committee of the HC of School of Medicine of UFMG and informed consent was obtained from each patient before blood collection.

Antigens - The secreted and surface antigen Mexo was obtained from Pb18, a human source of a virulent strain of *P. brasiliensis* (Reis et al. 2005). Yeast cells were cultured in YPD agar medium (0.5% yeast extract, 0.5% peptone, 1.5% D-glucose and 1.5% agar, pH 7.0) (Sigma, USA) at 35°C and harvested on the seventh day of culture. Yeast cells were removed from the culture medium and subjected to agitation by a vortex in 0.05 mol L⁻¹ phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4, for 30 s. The solution was centrifuged (14,000 g) for 10 min at 4°C. The amount of protein in the supernatant was quantified using the Bradford method (Bradford 1976) and this preparation was used as the Mexo antigen.

The rPb27 antigen was obtained as follows. The sequence of the recombinant rPb27 had already been cloned by our group into the expression vector pGEX 4T-2 (Gibco BRL) (GST), as described by Reis et al. (2008). To facilitate the purification procedure, the rPb27 sequence was transferred, according to the manufacturer's instructions, into the expression vector pET-DEST 42 (Invitrogen, Carlsbad, USA), which allowed for the expression of the recombinant protein with a

C-terminal his-tag. The protein rPb27 was expressed in *Escherichia coli* which according to the manufacturer's instructions produces a recombinant protein with a C-terminal his-tag. Purification of the recombinant protein was performed using a HiTrap™ Chelating HP (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden).

ELISA of total IgG, IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 levels using the Mexo and rPb27 antigens - The ELISAs of anti-*P. brasiliensis* total IgG, IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 levels were performed in flat-bottomed polystyrene plates (Nunc-ImmunoPlate PolySorp Surface, USA) using the Mexo and rPb27 antigens. Briefly, plates were coated overnight at 4°C with 100 µL of a 1 µg/100 µL solution of Mexo or rPb27 in a 0.5 mol L⁻¹ carbonate buffer, pH 9.6. The plates were washed five times with washing buffer [0.05 mol L⁻¹ PBS with 0.05% Tween 20 (PBS-Tween)] and blocked with 200 µL of blocking solution [1.5 mol L⁻¹ PBS with 1.6% casein (PBS-casein)] for 1 h at 37°C. After incubation, the plates were washed five times with PBS-Tween and filled with 100 µL of either patient sera or negative control sera (in duplicate) diluted 1:400 in 1.5 mol L⁻¹ PBS with 0.25% casein. The plates were re-incubated for 1 h at 37°C and then washed 10 times. After washing, 100 µL of a rabbit anti-human total IgG peroxidase-conjugated antibody specific to the gamma chain (DAKO, USA) diluted 1:10.000 in 0.15 mol L⁻¹ PBS was added to the wells. This antibody reacts specifically with the gamma chain, detecting only IgG antibodies. The plates were incubated for 1 h at 37°C and then washed 10 times. The reaction was developed with 100 µL of TMB Plus (Bio-tecnologia, Brazil) for 10 min at room temperature. Colour development was stopped with 50 µL of 2 mol L⁻¹ H₂SO₄. The optical density (OD) at 450 nm was determined using an ELISA reader (Anthos 2010, Cambridge, England). Similar protocols were performed for the IgG subclasses, but because these monoclonal antibodies were not conjugated, a goat anti-mouse peroxidase-conjugated antibody was added as an additional step. The monoclonal anti-human IgG1 antibody (Fc-specific, Sigma, USA) was used at a 1:12.000 dilution and a goat anti-mouse IgG2b peroxidase-conjugated antibody (γ2b-chain specific, SouthernBiotech, USA) was added at a 1:6.000 dilution. The monoclonal anti-human IgG2, IgG3 and IgG4 antibodies (Sigma, USA) were used at a 1:10.000 dilution and a goat anti-mouse IgG1 peroxidase-conjugated antibody (γ1-chain-specific, SouthernBiotech) was added at a 1:6.000 dilution. Cut-off values for the detection of IgG and its subclasses were determined using the mean plus three standard deviations of serum levels from 10 NC.

Statistical analysis - Serological results of the PCM patients vs. the negative control group (NC) were analysed using the Mann-Whitney test. The groups of patients treated for different durations of time, NT and the NC groups were compared and analysed using the Kruskal-Wallis non-parametric test. The comparison between all groups was calculated using Dunn's test. The Spearman rank correlation coefficient was used in correlation studies. All data were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

In this study, the sera from 54 patients with chronic PCM were assessed before, during and after treatment. A total of 92 serum samples were analysed using an in-house ELISA with two different antigenic preparations (Mexo and rPb27) to determine total IgG, IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 levels. First, one serum sample from each patient (before treatment or at the beginning of treatment) was analysed and compared with NC group. Significant differences were found between serum samples from the PCM group (54 patients with PCM) and the NC group (sera from 10 NC) using Mexo as the antigen for total IgG and its subclasses. The in-house ELISA using Mexo as the antigen showed higher antibody reactivity for total IgG in all PCM sera analysed. IgG2, IgG1, IgG4 and IgG3 showed decreasing antibody reactivity, respectively. Only one PCM patient had an OD value below the cut-off point when total IgG was measured. In contrast, for IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4, many PCM patients had OD values below the cut-off point (Fig. 1). When the rPb27 antigen was used, statistically significant differences were found between the PCM patients and the NC group with respect to total IgG, IgG1, IgG2 and IgG4. Using rPb27, total IgG also showed higher antibody reactivity, which was similar to the results observed for the Mexo antigen. However, of the IgG subclasses, IgG1 had the highest antibody reactivity, followed by IgG4, IgG2 and IgG3, respectively. Using rPb27, 10 patients had OD values below the cut-off point for total IgG. For IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4, the majority of patients did not have OD values above the cut-off point (Fig. 2).

When the 92 serum samples from the different treatment conditions of the 54 PCM patients were analysed, according to the duration of treatment or time since the end of treatment, statistically significant differences were observed among the different groups of patients for total IgG, IgG1 and IgG2 using Mexo and rPb27. IgG4 showed statistically significant differences only with the Mexo antigen. No significant differences were observed for IgG3 using either the Mexo antigen ($p = 0.3548$) or the rPb27 antigen ($p = 0.2711$). The analysis of total IgG levels using the Mexo antigen showed statistically significant differences ($p < 0.05$) when the NT, TIM, T2-9M, T1Y and Rel groups were compared with the NC group (Fig. 3). When the rPb27 antigen was used, statistically significant differences were observed when the NT, T2-9M, T1Y and Rel groups were compared with the NC group (Fig. 4). Statistically significant differences were observed for IgG1 using the Mexo antigen when the NT, TIM, T2-9M, T1Y and Rel groups were compared with the NC group (Fig. 3). When rPb27 was used, a statistically significant difference was only observed between the Rel group and the NC group (Fig. 4). IgG2 analysis using the Mexo antigen showed statistically significant differences when among T2-9M and Rel groups were compared with the NC group (Fig. 3). Using the rPb27 antigen, only the T2-9M group was significantly different from the NC group (Fig. 4). IgG4 analysis using Mexo as the antigen showed a statistically significant difference when the NT and T2-9M groups were compared to the NC group. Only this analysis showed a negative correla-

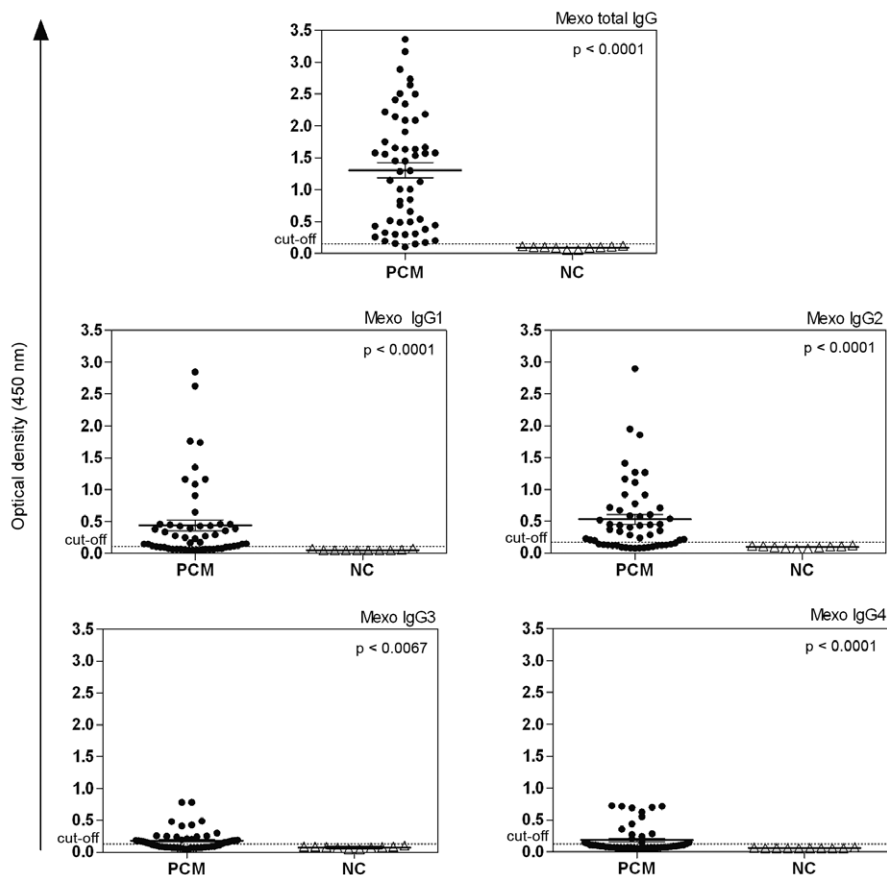


Fig. 1: total IgG, IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 serum levels measured by an in house enzyme-linked immunosorbent assay technique using Mexo antigen in the sera of 54 patients with chronic paracoccidioidomycosis (PCM) and 10 subjects from negative control group (NC). Each dot represents the optical density of a single patient and the horizontal lines represent the median value of the group. The cut-off point is represented by the dotted line. The statistical significant level is indicated for each group (p value).

tion between the treatment period and OD of the IgG4 serum. Among sera from NT patients, 65% showed reactivity with IgG4 and this reactivity clearly decreased as the treatment progressed (Fig. 3). When rPb27 was used, no statistically significant differences were found ($p = 0.3014$) (Fig. 4). It is worth mentioning that all groups were compared with each other, but statistically significant differences were only found between the NC group and the NT group or between the NC group and other groups with different periods of treatment as explained above. No significant difference was observed among the different treated groups.

Patients were also analysed according to their anti-fungal therapy and their clinical disease states. Of 54 patients, only four did not undergo treatment during this study. The remaining 50 patients were divided as follows: 38 were treated with sulphamethoxazole-trimethoprim, seven with itraconazole and five with ketoconazole. The analysis of patients treated with sulphamethoxazole-trimethoprim did not reveal any association between IgG levels and the duration of treatment. Some patients with more than one year of treatment had IgG values similar to patients at the beginning of treatment. For the other subclasses of IgG assayed using Mexo and rPb27, patients had values

similar to the cut-off point. All patients treated with ketoconazole had three years of treatment and two of them had high levels of total IgG, measured using Mexo in one case and rPb27 in the other. Patients treated with itraconazole had between one month and nine months of treatment and of seven patients, five had high levels of total IgG using Mexo and rPb27, regardless of the duration of treatment. No patients were treated exclusively with amphotericin B. This drug was prescribed to a few patients during hospitalisation and it was always combined with itraconazole, ketoconazole or sulphamethoxazole-trimethoprim. For this reason, it was not possible to verify the effect of amphotericin B on antibody levels. Supplementary data gives the medians and standard deviations of the levels of total IgG and its subclasses in untreated patients and those treated with sulphamethoxazole-trimethoprim, ketoconazole or itraconazole. Supplementary data shows the similarities in the levels of IgG and its subclasses between the different treatment groups.

We also tested for an association between clinical status and antibody level, but no correlation was found. Of 54 patients, 23 presented with localised lesions and were classified as having unifocal disease, and 31 patients who presented with lesions in more than one area of the body were

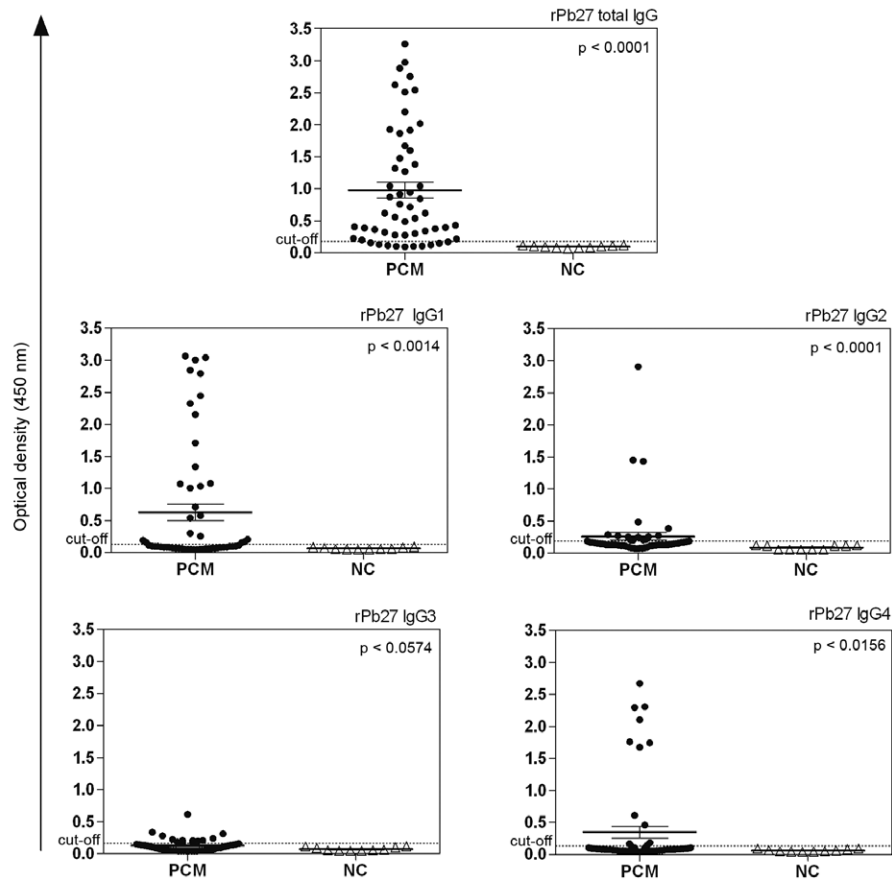


Fig. 2: total IgG, IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 serum levels measured by an in house enzyme-linked immunosorbent assay technique using recombinant Pb27 (rPb27) antigen preparation in the sera of 54 patients with chronic paracoccidioidomycosis (PCM) and 10 subjects from negative control group (NC). Each dot represents the optical density of a single patient and the horizontal lines represent the median value of the group. The cut-off point is represented by the dotted line. The statistical significant level is indicated for each group (p value).

classified as having multifocal disease. Similar levels of IgG and its subclasses were detected in patients with unifocal and multifocal diseases, with no statistically significant differences for almost all antibodies. Only the analysis of IgG2 using rPb27 as the antigen yielded a statistically significant difference between the unifocal and multifocal groups. However, this difference was related to only two patients from the unifocal group that presented with high levels of IgG2, and there is no clear explanation for this result. Supplementary data shows the medians and standard deviations of the levels of total IgG and its subclasses in patients in relation to their clinical disease status.

DISCUSSION

In this study, 92 serum samples from PCM patients at different points in treatment or after treatment were analysed. All of the patients selected had chronic PCM, varying from unifocal to multifocal disease. The first aim of our study was to assess the utility of Mexo and rPb27 as antigens using an ELISA. This evaluation showed statistically significant differences between PCM serum samples and the NC group for total IgG and all of its subclasses when Mexo was used as the antigen. Using Mexo, total IgG showed the highest level of reactivity

followed by IgG2, IgG1, IgG4 and IgG3, respectively. The Mexo antigen has already been shown to have high sensitivity and specificity for the detection of antibodies against *P. brasiliensis*. Reis et al. (2005) analysed the serological responses of 140 PCM patients to the Mexo antigen using immunoblotting, ELISA and IFI techniques. They observed a homogenous IgG response against the Mexo antigen with high sensitivity and specificity. In our study, we confirmed the value of Mexo as an antigen to discriminate between infected and non-infected serum samples using total IgG analysis. Only one patient with PCM had OD values below the cut-off point when total IgG was assessed, which shows the suitability of this antigen for use in PCM diagnosis. Previous studies have shown that some patients with PCM may not be reactive to the gp43 antigen, the most-studied antigenic fraction of *P. brasiliensis* (Del Negro et al. 1991, Neves et al. 2003, Vidal et al. 2005). Many factors may be involved in this absence of a serological response to antigens in some patients, such as the prozone effect, immunosuppression or immune complex formation. However, it is not clear why the patient in our study had undetectable levels of IgG because he did not present with immunosuppression, prozone effect or immune complex formation. One

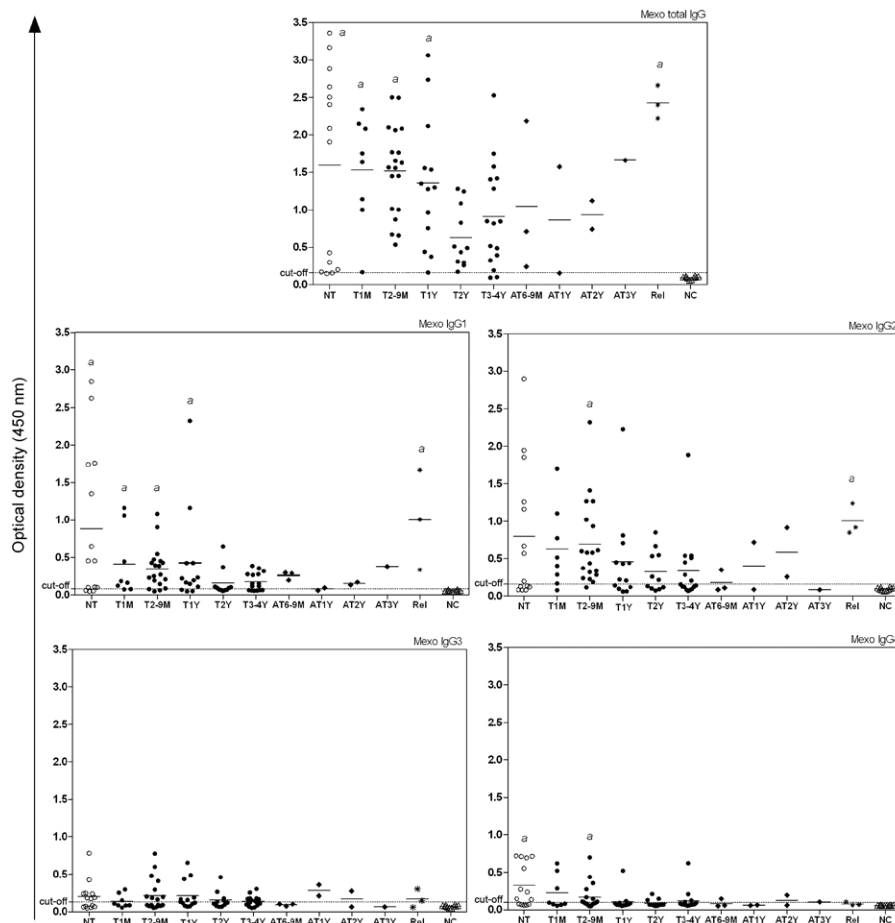


Fig. 3: total IgG, IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 serum levels measured by an in house enzyme-linked immunosorbent assay technique using Mexo antigen preparation in 92 sera samples of patients with chronic paracoccidioidomycosis (PCM) before treatment (NT), during treatment [treated for one month (T1M), treated for two-nine months (T2-9M), treated for one year (T1Y), treated for two years (T2Y), treated for three-four years (T3-4Y)], after treatment [one year from the end of treatment (AT1Y), two years from the end of treatment (AT2Y), three years from the end of treatment (AT3Y), relapsed (Rel)] and 10 subjects from negative control group (NC). Each dot represents the optical density of a single patient and the horizontal lines represent the median value of the group. The cut-off point is represented by the dotted line. Data marked by an 'a' were significantly different ($p < 0.05$) from NC group.

possible explanation for his low levels of IgG is that this patient presented with the unifocal form (he only had a mild oral mucosal lesion) and patients with mild forms of PCM may have a lower humoral immune response. However, many other patients with unifocal PCM had high OD values compared to multifocal PCM patients.

When rPb27 was used as the antigen, total IgG showed the highest levels of reactivity, followed by IgG1, IgG4, IgG2 and IgG3, respectively. Only the analysis of IgG3 showed no statistically significant difference between the PCM patients and the NC group. For total IgG analysis, 10 serum samples of PCM patients were observed with OD values below the cut-off point, a worse performance compared with that of the Mexo antigen. The analysis of the IgG subclasses did not allow us to distinguish PCM patients from the NC group. This result is understandable because unlike Mexo, rPb27 is a much more specific molecule, which limits the epitopes recognised by IgG. Reis et al. (2008) immunised mice

with the antigenic rPb27 fraction and measured their humoral immunological response. These mice produced high levels of IgG2b, moderate levels of IgG1 and low levels of IgG2a. The authors also observed high levels of transforming growth factor beta and interferon (IFN)- γ and a low production of IL-10. These results suggested that rPb27 promoted protection against infection with *P. brasiliensis* yeast cells. It was proposed that this antigenic fraction could be used in the future as a prophylactic vaccine for PCM. The protein rPb27, first characterised by McEwen et al. (1996), has been used as an antigen for PCM antibody detection in several studies (Ortiz et al. 1996, 1998, Díez et al. 2003). Ortiz et al. (1996) used rPb27 as an antigen in immunoblotting to analyse 44 PCM patients with acute and chronic disease. The rPb27 antigen was recognised by antibodies from 40 PCM patients and no cross reactivity was observed with other mycoses. In a later study by this same group, rPb27 was used in an ELISA to detect antibodies in PCM pa-

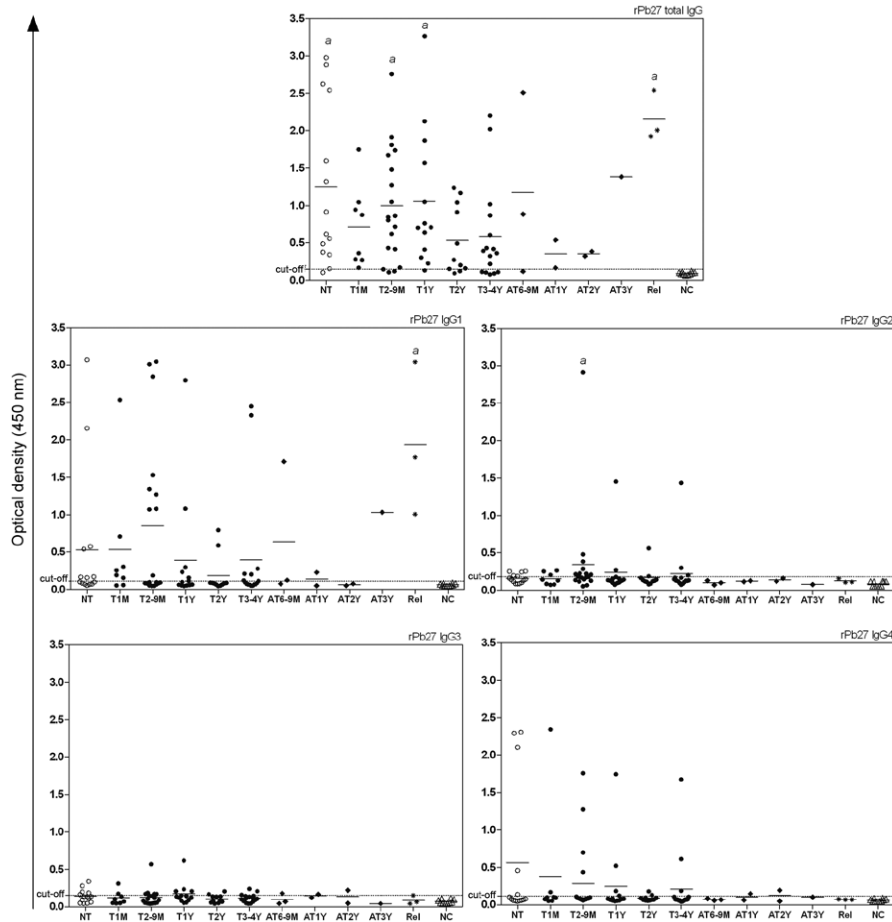


Fig. 4: total IgG, IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 serum levels measured by an in house enzyme-linked immunosorbent assay technique using Mexo antigen preparation in 92 sera samples of patients with chronic paracoccidioidomycosis (PCM) before treatment (NT), during treatment [treated for one month (T1M), treated for two-nine months (T2-9M), treated for one year (T1Y), treated for two years (T2Y), treated for three-four years (T3-4Y)], after treatment [one year from the end of treatment (AT1Y), two years from the end of treatment (AT2Y), three years from the end of treatment (ATY3), relapsed (Rel)] and 10 subjects from negative control group (NC). Each dot represents the optical density of a single patient and the horizontal lines represent the median value of the group. The cut-off point is represented by the dotted line. Data marked by an 'a' were significantly different ($p < 0.05$) from NC group.

tients with different forms of clinical disease. Although the test demonstrated significant sensitivity, with antibodies from the majority of PCM patients recognising the antigen used, cross reactivity with aspergillosis and histoplasmosis serum samples was observed (Ortiz et al. 1998). Some patients not producing detectable antibodies against the rPb27 antigen could be related to the specificity of this protein because it has a single dominant antigenic epitope. It would likely be necessary to use a cocktail of recombinant proteins to achieve higher sensitivity values. Recently, a study performed by our group (Fernandes et al. 2011) demonstrated that the combined use of rPb27 and rPb40 in an ELISA provided high sensitivity and specificity for PCM diagnosis, which confirmed that rPb27 was much more efficient as an antigen when paired with another recombinant protein than when isolated.

As shown in other studies, total IgG is generally detected at high levels in PCM patients, especially in the acute form or in severe disease, regardless of the antigen

used (Biagioni et al. 1984, Baida et al. 1999, Juvenale et al. 2001, Marquez et al. 2009). It is worth noting that all patients in this study had the chronic form of PCM and even with this form of PCM, they all presented with high levels of total IgG using Mexo or rPb27 as the antigen. However, when using IgG1 or IgG2, it was not possible to clearly distinguish PCM patients from the NC group using Mexo or rPb27 antigens because many PCM serum samples yielded OD values below the cut-off point. In using Mexo or rPb27 as an antigen, some studies found high levels of IgG2 in chronic PCM patients, whereas IgG1 was detected at medium levels in chronic patients. These results were confirmed in this work (Baida et al. 1999, Juvenale et al. 2001). Few serum samples of PCM patients had OD values above the cut-off value for IgG3 and IgG4 regardless of the antigen used. This result agrees with studies that observed low or absent IgG3 in PCM patients and detectable IgG4 mostly in acute PCM patients (Baida et al. 1999, Juvenale et al. 2001).

The second part of our study determined the levels of total IgG and its subclasses in chronic PCM patients before, during and after treatment. Some groups have attempted to determine a correlation between antibody levels and disease severity in PCM patients, especially in the follow-up period after treatment (Bueno et al. 1997, Martins et al. 1997, Reis et al. 2005, Anastácio et al. 2007, Bertini et al. 2007, Yoshida et al. 2009), but this association is still controversial. Restrepo et al. (1978) found decreased antibody levels after six months of treatment using DI and CF tests in only three of the 16 patients analysed. Although apparently cured, most patients showed persistent low antibody levels. Ferreira-da-Cruz et al. (1990) used DI to measure antibodies against *P. brasiliensis* in 66 patients with PCM before and after treatment. Clinical improvement was associated with decreased antibody levels in all patients during treatment. However, after two years of treatment, nine patients continued to show high antibody levels, which showed that the measurement of IgG levels using DI does not indicate active PCM. Reis et al. (2005) demonstrated that patients with PCM undergoing treatment for more than one year had a reduced antibody response against the Mexo antigen, suggesting that the presence of antibodies against Mexo could be an indicator of active disease. In our study, untreated PCM patients had the highest OD values for total IgG when using Mexo or rPb27 as the antigen. However, a clear decrease in antibody levels associated with clinical improvement during treatment was not observed. Indeed, PCM patients may need several years to clear antibody levels, as suggested by Lopes (1971) and Ferreira-da-Cruz et al. (1990). Del Negro et al. (2000) evaluated antibody responses during the follow-up care of patients with acute and chronic PCM using ELISA, CIE and CF (complement fixation) techniques. In that study, 43 patients were analysed before treatment and 27 of these patients were followed-up during their treatment for two years. Patients with chronic unifocal disease cleared their antibodies after one year of treatment when CF was used and after two years when ELISA was used, in contrast to the results of our study. It was suggested that patients with chronic unifocal disease needed a shorter course of therapy and patients with acute or multifocal disease needed more than two years of treatment to clear their antibodies. An increase in antibody levels was also associated with the relapse of PCM in five patients. Baida et al. (1999) assessed total IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 and IgA in the sera of patients with juvenile and adult PCM using the 43 kDa glycoprotein as the antigen in an ELISA. They found that juvenile PCM patients had higher total IgG levels when compared with the adult form. IgG1 levels were similar between the two groups. However, IgG4 levels were higher in the juvenile form, while IgG2 levels were higher in the adult form of PCM. In their study, IgG3 was either absent or detected at low levels in all patients, while IgA was detected mainly in the adult form of PCM. Our study also showed that for both antigens used, high total IgG levels in all patients were observed, independent of the treatment duration. Juvenale et al. (2001) found the same results in sera from acute and

chronic PCM patients before treatment using a crude antigen of *P. brasiliensis* in an ELISA. Similar to Baida et al. (1999) and Juvenale et al. (2001), in our study, IgG3 was detected in few patients and at low levels with both antigens, independent of the treatment duration and clinical disease state. When the Mexo antigen was used, IgG2 was detected at high levels, especially at the baseline of treatment, but showed no differences related to clinical manifestation. Baida et al. (1999) showed higher IgG2 levels in adult PCM patients as a driven response of IFN- γ . Patients with benign or chronic PCM tend to have a Th1 immune pattern. However, patients with juvenile PCM have high IgG4 levels, suggesting a Th2 immune pattern. Because our study examined only patients with the chronic form of PCM, low levels of IgG4 in all patients could be anticipated. It is worth mentioning that a negative correlation was found only for IgG4; a decrease in IgG4 levels was associated with clinical improvement during treatment. Antibody titres tend to decrease during therapy, but not all clinically cured patients show negative serology immediately after treatment is stopped. In our study, using Mexo or rPb27 as the antigen, high levels of total IgG and its subclasses were detected in some patients after three years of treatment. One explanation for this result could be the severity of PCM presented by these patients. Of 54 patients, 31 presented with multifocal disease, with severe lesions in different areas of the body, including the skin, oral mucosa and lungs, simultaneously. High antibody levels may persist in patients with more severe disease for a longer period of time. In our study, patients with unifocal disease had a tendency to produce lower levels of IgG and its subclasses, but no significant difference in antibody levels was found between patients with mild and severe PCM.

The correlation between high antibody levels and relapse is also controversial. There does not seem to be a direct association between increased antibody levels and relapse in all patients. However, in our study, the three Rel patients analysed presented high levels of total IgG using Mexo or rPb27 as the antigen. These three Rel patients were treated with sulphamethoxazole-trimethoprim and they presented with a more severe clinical disease state, which may explain the similar levels of total IgG and its subclasses. The failure in the treatment with sulphamethoxazole-trimethoprim in patients with relapse is not explained by the drug alone because the majority of patients in the study were treated with this drug and they achieved clinical cure within a few months of treatment, including those with more severe clinical disease. In fact, the patients with relapse presented with a more severe clinical disease and it is possible that the drug used was not the most appropriate in an initial phase of treatment. However, many other factors may be involved in the progression of PCM disease and it was not possible to discern why these patients relapsed because they received the same care as other patients. In our study, when Mexo was used as the antigen, the three Rel patients had OD values above the cut-off point for total IgG, IgG1 and IgG2. For IgG3, only one Rel patient had an OD value above the cut-off point. When rPb27 was used as the antigen, patients with relapses showed an

OD value above the cut-off point for total IgG and IgG1. This result shows the direct relationship between the measurement of antibody levels and the antigenic fractions used in the different serological tests. It is worth mentioning that the levels of total IgG were high in Rel patients using either Mexo or rPb27 as the antigen. This is an important finding because the majority of follow-ups of PCM patients are performed for total IgG detection and not for its subclasses (Del Negro et al. 2000, Fernandes et al. 2011). However, this result does not allow for a conclusion about the relationship between relapses and increases in the levels of antibodies because only three patients presented relapses and a statistical determination could not be performed with this small group.

Ultimately, no clear association between antibody levels and treatment follow-up was found in our study. Many patients had decreased antibody levels during therapy, but there was no significant difference between the different treatment groups. A significant difference was found only between patients at different times of treatment and the NC group for total IgG and its subclasses. Only IgG4 presented a negative correlation between its levels and clinical improvement during treatment. With this result, it can be inferred that antibody levels tend to decrease during treatment, but these levels do not clear in most patients after treatment is stopped. Because many patients in this study had the multifocal form of PCM, they will likely require a longer time to clear their antibody levels. These results also suggest an increase in total IgG levels in patients with relapses using either Mexo or rPb27 as the antigen. Finally, the Mexo antigen was useful in discriminating between PCM patients and the NC group, especially for total IgG, showing its suitability for use in PCM diagnosis. It is worth noting that serological follow-up of PCM patients during and after treatment is of great importance, but more studies are necessary to establish an ideal serological technique for this purpose.

REFERENCES

- Albuquerque CF, Marques da Silva SH, Camargo ZP 2005. Improvement of the specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* 43: 1944-1946.
- Almeida OP, Jacks J Jr, Scully C 2003. Paracoccidioidomycosis of the mouth: an emerging deep mycosis. *Crit Rev Oral Biol Med* 14: 377-383.
- Alves JR 1996. *Comparação entre três métodos sorológicos no seguimento de pacientes com paracoccidioidomycose*, MSc Thesis, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 73 pp.
- Ameen M, Talhari C, Talhari S 2010. Advances in paracoccidioidomycosis. *Clin Exp Dermatol* 35: 576-580.
- Anastácio VM, Passeto MPA, Góngora DVN, Soares MMCN, Almeida MTG 2007. Paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and laboratorial findings in São José do Rio Preto region. *Arq Cienc Saude* 14: 181-185.
- Baida H, Biselli PJC, Juvenale M, Del Negro GMB, Mendes-Giannini MJS, Duarte AJS, Benard G 1999. Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect* 1: 273-278.
- Barbosa SFC, Takeda AK, Chacha J, Cuce LC, Fava Netto C 1981. Anticorpos específicos das classes IgG, IgM e IgA para *Paracoccidioides brasiliensis* dosados através da reação de imunofluorescência indireta no soro de pacientes e sua correlação com o tempo de evolução e forma clínica da doença. *Rev Inst Adolfo Lutz* 41: 121-126.
- Benard G 2008. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. *Mycopathol* 165: 209-221.
- Bertini S, Colombo AL, Takahashi HK, Straus AH 2007. Expression of antibodies directed to *Paracoccidioides brasiliensis* glycosphingolipids during the course of paracoccidioidomycosis treatment. *Clin Vaccine Immunol* 14: 150-156.
- Biagioni LMJ, Souza MJ, Chamma LG, Mendes RP, Marques SA, Mota NGS, Franco M 1984. Serology of paracoccidioidomycosis. II. Correlation between class-specific antibodies and clinical forms of the disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 78: 617-621.
- Blotta MH, Mamoni RL, Oliveira SJ 1999. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the Southeast Region. *Am J Trop Med Hyg* 61: 390-394.
- Bradford RM 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein by the principle of protein-dye binding. *Ann Biochem* 72: 248.
- Bueno JP, Mendes-Giannini MJ, Del Negro GM, Assis CM, Takiguti CK, Shikanai-Yasuda MA 1997. IgG, IgM and IgA antibody response for the diagnosis and follow-up of paracoccidioidomycosis: comparison of counterimmunoelectrophoresis and complement fixation. *J Med Vet Mycol* 35: 213-217.
- Camargo ZP 2008. Serology of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 165: 289-302.
- Campos EP, Unterkircher C, Camargo ZP 1990. Serological evaluation in follow-up of the paracoccidioidomycosis patients. *Rev Microbiol* 21: 11-17.
- Correa MM, Bedoya AM, Guerrero MP, Méndez J, Restrepo A, McEwen JG 2007. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by a dot blot assay using a recombinant *Paracoccidioides brasiliensis* p27 protein. *Mycoses* 50: 41-47.
- Del Negro GM, Garcia NM, Rodríguez EG, Cano MI, de Aguiar MS, Lirio VS, Lacaz CS 1991. The sensitivity, specificity and efficiency values of some serological tests used in the diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 33: 277-280.
- Del Negro GM, Pereira CN, Andrade HF, Palacios SA, Vidal MM, Charbel CE, Benard G 2000. Evaluation of tests for antibody response in the follow-up of patients with acute and chronic forms of paracoccidioidomycosis. *J Med Microbiol* 49: 37-46.
- Díez S, Gómez BL, McEwen JG, Restrepo A, Hay RJ, Hamilton AJ 2003. Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant 27-kilodalton and purified 87-kilodalton antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* 41: 1536-1542.
- Fernandes VC, Coitinho JB, Veloso JM, Araújo SA, Pedrosa EP, Góes AM 2011. Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant rPb27 and rPb40 antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Immunol Methods* 31: 78-84.
- Ferreira-da-Cruz MF, Francesconi-do-Vale AC, Espinera MC, Wanke B, Galvão-Castro B 1990. Study of antibodies in paracoccidioidomycosis: follow-up of patients during and after treatment. *J Med Vet Mycol* 28: 151-157.
- Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon ML, Mota NGS 1987. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop* 20: 129-132.

- Juvenale M, Del Negro GM, Duarte AJS, Benard G 2001. Antibody isotypes to *Paracoccidioides brasiliensis* somatic antigen in sub-acute and chronic form of paracoccidioidomycosis. *J Med Microbiol* 50: 127-134.
- Lopes CF 1971. Evaluación de los resultados obtenidos en el tratamiento de la blastomicosis sudamericana con sulfamida de administración semanal. *Med Cutanea* 15: 357-366.
- Marques AS 1998. Paracoccidioidomycose. *An Bras Dermatol* 73: 455-469.
- Marquez ADES, Moreira AP, Leonello PC, Nakanishi FA, Itano EN 2009. Serum proteins and fractions, HDL-cholesterol and total IgG and IgE levels in cases of acute and chronic paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop* 42: 245-249.
- Martins R, Marques S, Alves M, Fecchio D, Franco MF 1997. Serological follow-up of patients with paracoccidioidomycosis treated with itraconazole using dot-blot, ELISA and Western blot. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 39: 187-195.
- McEwen JG, Ortiz BL, Garcia AM, Florez AM, Botero S, Restrepo A 1996. Molecular cloning, nucleotide sequencing and characterization of a 27-kDa antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol* 20: 125-131.
- Mendes-Giannini MJ, Monteiro da Silva JL, de Fátima da Silva J, Donofrio FC, Miranda ET, Andreotti PF 2008. Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: recent advances. *Mycopathologia* 165: 237-248.
- Mota FT, Franco M 1979. Observações sobre a pesquisa de anticorpos IgM anti-*Paracoccidioides brasiliensis* por imunofluorescência no soro de pacientes com paracoccidioidomycose. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 21: 82-89.
- Neves AR, Mamoni RL, Rossi CL, Camargo ZP, Blotta MSHL 2003. Negative immunodiffusion test results obtained with sera of paracoccidioidomycosis patients may be related to low-avidity immunoglobulin G2 antibodies directed against carbohydrate epitopes. *Clin Diagn Lab Immunol* 5: 802-807.
- Nogueira MGS, Andrade GMQ, Tonelli E 2006. Clinical evolution of paracoccidioidomycosis in 38 children and teenagers. *Mycopathologia* 161: 73-81.
- Ortiz BL, Díez S, Urán ME, Rivas JM, Romero M, Caicedo V, Restrepo A, McEwen JG 1998. Use of the 27-Kilodalton recombinant protein from *Paracoccidioides brasiliensis* in serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 5: 826-830.
- Ortiz BL, Garcia AM, Restrepo A, McEwen JG 1996. Immunological characterization of a recombinant 27-kilodalton antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Clin Diagn Lab Immunol* 3: 239-241.
- Ramos e Silva M, Saraiva LE 2008. Paracoccidioidomycosis. *Dermatol Clin* 26: 257-269.
- Reis BS, Bozzi A, Prado FLS, Pereira MCN, Ferreira FE, Godoy P, Moro L, Pedroso EP, Leite MF, Góes AM 2005. Membrane and extracellular antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* (Mexo): identification of a 28-kDa protein suitable for immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Immunol Methods* 307: 118-126.
- Reis BS, Fernandes VC, Martins EMN, Serakides R, Góes AM 2008. Protective immunity induced by rPb27 of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Vaccine* 26: 5461-5469.
- Restrepo A, Restrepo M, de Restrepo F, Aristizábal LH, Moncada LH, Vélez H 1978. Immune responses in paracoccidioidomycosis. A controlled study of 16 patients before and after treatment. *Sabouraudia* 16: 151-163.
- Rivitti EA, Aoki V 1999. Deep fungal infections in tropical countries. *Clin Dermatol* 17: 171-190.
- Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho FQ, Mendes RP 2006. Guidelines in paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 297-310.
- Silveira-Gomes F, Sarmento DN, Pinto TM, Pimentel RF, Nepomuceno LB, Espírito Santo EP, Mesquita-da-Costa M, Camargo ZP, Marques-da-Silva SH 2011. Development and evaluation of a latex agglutination test for the serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Clin Vaccine Immunol* 18: 604-608.
- Vidal MSM, Benard G, Brito T, Dantas KC, Pereira CN, França FOS, Silva AMG, Martins JEC 2005. Atypical serological response marked by a lack of detectable anti-gp43 antibodies in a patient with disseminated paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* 43: 3014-3016.
- Yoshida M, Sanchez MCA, Shikanai-Yasuda MA 2009. Increased immunoglobulin G anti-*Paracoccidioides brasiliensis* serum antibody avidity as a predictor of favorable post therapeutic evolution in paracoccidioidomycosis. *Clin Vaccine Immunol* 16: 1583-1586.
- Wanke B, Aidê MA 2009. Chapter 6 - Paracoccidioidomycosis. *J Bras Pneumol* 35: 1245-1249.

Levels of IgG and its subclasses measure in patients with paracoccidioidomycosis (PCM) compared according to their scheme of treatment

Condition of treatment	Mexo (mean ± SD)					rPb27 (mean ± SD)				
	Total IgG	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	Total IgG	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
SMZ-TMP	1.596 ± 1.280	0.308 ± 0.322	0.397 ± 0.477	0.175 ± 0.131	0.145 ± 0.168	0.821 ± 0.764	0.502 ± 0.823	0.291 ± 0.491	0.122 ± 0.094	0.311 ± 0.655
Ceto	0.919 ± 0.556	0.167 ± 0.152	0.217 ± 0.200	0.106 ± 0.044	0.115 ± 0.057	0.617 ± 0.512	0.293 ± 0.418	0.151 ± 0.089	0.102 ± 0.042	0.181 ± 0.241
Itra	0.919 ± 0.556	0.254 ± 0.152	0.725 ± 0.523	0.269 ± 0.294	0.180 ± 0.165	0.749 ± 0.520	0.328 ± 0.302	0.218 ± 0.092	0.110 ± 0.061	0.255 ± 0.450
NT	0.919 ± 0.556	0.881 ± 0.997	0.799 ± 0.898	0.205 ± 0.196	0.323 ± 0.284	1.250 ± 1.073	0.527 ± 0.915	0.158 ± 0.061	0.141 ± 0.087	0.564 ± 0.912

ceto: cetoconazole; itra: itraconazole; mean ± standard deviation (SD): median of levels of IgG and its subclasses plus its SD; NT: not treated patients; rPb27: recombinant Pb27; SMZ-TMP: sulphamethoxazole-trimethoprim.

Levels of IgG and its subclasses measured in patients with paracoccidioidomycosis (PCM) compared according to their clinical manifestations

Clinical form	Mexo (mean ± SD)					rPb27 (mean ± SD)				
	Total IgG	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	Total IgG	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Unifocal	1.254 ± 0.735	0.364 ± 0.576	0.537 ± 0.562	0.145 ± 0.118	0.206 ± 0.223	0.821 ± 0.734	0.525 ± 0.868	0.338 ± 0.609	0.146 ± 0.117	0.271 ± 0.613
Multifocal	1.154 ± 0.789	0.308 ± 0.449	0.361 ± 0.412	0.181 ± 0.142	0.127 ± 0.132	0.717 ± 0.659	0.398 ± 0.612	0.143 ± 0.094	0.100 ± 0.048	0.278 ± 0.558

mean ± standard deviation (SD): median of levels of IgG and its subclasses plus its SD; rPb27: recombinant Pb27.

ANEXO D - Cópia da declaração de aprovação da defesa de tese de doutorado



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO
Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos professores doutores Ênio Roberto Pietra Pedroso, Alfredo Miranda de Góes, Maria Aparecida de Resende Stoianoff, Raquel Virgínia Rocha Vilela, Antônio Rafael da Silva e Rachel Basques Caligorne, aprovou a defesa de tese intitulada: **“Estudo clínico e laboratorial de controle de cura de pacientes submetidos a tratamento para paracoccidioidomicose atendidos no Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais”** apresentada pela doutoranda **Lilian da Silva Santos** para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 03 de abril de 2013.

Ênio Pietra

Prof. Ênio Roberto Pietra Pedroso
Orientador

Alfredo Miranda de Góes

Prof. Alfredo Miranda de Góes
Coorientador

Maria Aparecida de Resende Stoianoff

Profa. Maria Aparecida de Resende Stoianoff

Raquel Virgínia Rocha Vilela

Profa. Raquel Virgínia Rocha Vilela

Antônio Rafael da Silva

Prof. Antônio Rafael da Silva

Rachel Basques Caligorne

Profa. Rachel Basques Caligorne

ANEXO E - Cópia da ata da defesa de tese de doutorado



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO
Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 34099640 FAX: (31) 34099641



ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO de LILIAN DA SILVA SANTOS, nº de registro 2009654298. No dia três de abril de dois mil e treze, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de tese indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar o trabalho final intitulado: “Estudo clínico e laboratorial de controle de cura de pacientes submetidos a tratamento para paracoccidiodomicose atendidos no Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais”, requisito final para a obtenção do grau de doutora em Ciências da Saúde, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Ênio Roberto Pietra Pedroso, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Ênio Roberto Pietra Pedroso - orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>
Prof. Alfredo Miranda de Góes - coorientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>
Profa. Maria Aparecida de Resende Stoianoff	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>
Profa. Raquel Virgínia Rocha Vilela	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Prof. Antônio Rafael da Silva	Instituição: UFMA	Indicação: <u>APROVADO</u>
Profa. Rachel Basques Caligiorne	Instituição: SCMBH	Indicação: <u>APROVADA</u>

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA.

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 03 de abril de 2013.

Prof. Ênio Roberto Pietra Pedroso Ênio Pietra

Prof. Alfredo Miranda de Góes Alfredo Miranda de Góes

Profa. Maria Aparecida de Resende Stoianoff Maria Aparecida de Resende Stoianoff

Profa. Raquel Virgínia Rocha Vilela Raquel Vilela

Prof. Antônio Rafael da Silva Antônio Rafael da Silva

Profa. Rachel Basques Caligiorne Rachel Basques Caligiorne

Prof. Vandack Alencar Nobre Júnior/Coordenador Vandack Alencar Nobre Júnior

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

Prof. Manoel Cláudio da Costa Rocha
Subcoordenador do Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde:
Infectologia e Medicina Tropical
Faculdade de Medicina - UFMG