

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

**Gustavo Gomes Martins**

**ATIVIDADE DA QUITOTRIOSIDASE EM PACIENTES COM**  
**PARACOCCIDIOIDOMICOSE CRÔNICA**

**BELO HORIZONTE – MG**

**2013**

**Gustavo Gomes Martins**

ATIVIDADE DA QUITOTRIOSIDASE EM PACIENTES COM  
PARACOCCIDIOIDOMICOSE CRÔNICA

Dissertação 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 obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Ênio Roberto Pietra Pedroso  
Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Eugênia Ribeiro Valadares

BELO HORIZONTE - MG

2013

## Ficha catalográfica

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

Reitor: Prof. Clélio Campolina Diniz

Vice-Reitora: Prof<sup>a</sup>. 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<sup>a</sup>. Tereza Cristina de Abreu Ferrari

Coordenador do Departamento de Clínica Médica: Prof<sup>a</sup>. 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<sup>a</sup>. Denise Utsch Gonçalves

Prof<sup>a</sup> Mariângela Carneiro

Representante discente - Paula Souza Lage Carvalho

## Folha de aprovação

*Dedico este trabalho à minha filha, Cecília, que acaba de chegar,  
inspiração para o aprendizado e mudança da forma de ver as coisas.*

## **AGRADECIMENTOS**

Em especial, à minha querida companheira, Renata, obrigado pelos constantes estímulos e carinho.

Aos meus pais e irmã, pelo constante incentivo aos estudos e aos meus sonhos;

À professora Eugênia Valadares, por me apoiar e acreditar no futuro deste trabalho;

Ao professor Ênio Pietra, pelos ensinamentos, paciência e disposição para me orientar;

À colega e bióloga Talita Adelino, pelas inúmeras ajudas na dosagem da quitotriosidase;

À colega e farmacêutica Lílian dos Santos, pelas dicas e grande ajuda geral;

Aos voluntários que, cordialmente, contribuíram para o grupo controle do estudo.

## RESUMO

**Introdução:** A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença infecciosa sistêmica causada pelo *Paracoccidioides brasiliensis* e uma das mais importantes micoses sistêmicas endêmicas na América Latina. Os critérios de cura da paracoccidioidomicose ainda não estão bem definidos. A enzima quitotriosidase (QT) é naturalmente produzida nos macrófagos humanos e pertence à classe das quitinases. O aumento de sua atividade está relacionado com ativação dos macrófagos em doenças de caráter inflamatório. O *P. brasiliensis* possui quitina como componente da sua parede celular, sendo passível associar a elevação da atividade da QT com a atividade da PCM. **Objetivo:** Relacionar o aumento da atividade da QT com a PCM crônica não tratada, e avaliar sua utilidade como biomarcador desta micose. **Metodologia:** Foram selecionados dois grupos de pacientes: 1. Grupo PCM crônica sem tratamento: 14 pacientes; 2. Grupo Controle: 14 pessoas hígidas que doaram voluntariamente sangue para o estudo. A QT foi dosada em técnica de fluorescência. **Resultados:** A atividade da QT foi consideravelmente maior no primeiro grupo em comparação com o segundo ( $P < 0,0001$ ). As medianas (em nmol/mL/h) para o grupo PCM e o controle foram, respectivamente, 174 (SD  $\pm$  122) e 44 (SD  $\pm$  29). **Discussão:** A atividade da QT está elevada em infecções fúngicas sistêmicas, parasitárias e bacterianas, em doenças de depósito lisossomal, e em processos inflamatórios. A sua função no sistema imunológico humano parece estar relacionada à imunidade inata e sua regulação parece complexa, envolvendo linfócitos Th1 e Th2 e citocinas. A análise da variação sérica da QT pode constituir-se em meio de inferir a atividade de vários processos inflamatórios, inclusive, fúngicos, o que pode ajudar como biomarcador da PCM. **Conclusão:** A QT pode constituir-se em método simples para revelar a presença de resposta inflamatória associada à infecção por *P. brasiliensis*. São necessários mais ensaios laboratoriais-clínicos para relacionar o aumento da atividade da QT como marcador bioquímico na PCM.

## PALAVRAS-CHAVE

Quitotriosidase, Paracoccidioidomicose, Quitinase, Diagnóstico laboratorial, Biomarcador.



## ABSTRACT

**Introduction:** The paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic infectious disease caused by *Paracoccidioides brasiliensis* and one of the most important systemic mycosis endemic in Latin America. The criteria for cure of paracoccidioidomycosis are not well defined. The enzyme chitotriosidase (QT) is naturally produced in human macrophages and belongs to the class of chitinases. The increase in activity is related to activation of macrophages in diseases of inflammatory nature. The *P. brasiliensis* has chitin as a component of its cell wall, being susceptible associate elevation of QT with the activity of PCM. **Objective:** The aim of this study is to correlate the increased activity of QT with chronic active PCM, and evaluate its utility as a biomarker of this mycosis. **Methods:** We selected two groups of patients: 1. chronic untreated PCM group: 14 patients, 2. Control group: 14 healthy people who voluntarily donated blood for the study. The QT was measured in fluorescence assay. **Results:** The QT activity was considerably higher in the first compared to the second group ( $P < 0.001$ ). The medians (in nmol / ml / h) for the PCM group and control were respectively 174 ( $\pm$  SD 122) and 44 ( $SD \pm 29$ ). **Discussion:** The QT activity is elevated in systemic fungal infections, parasitic and bacterial diseases in lysosomal storage and inflammatory processes. Their role in the human immune system seems to be related to innate immunity and its regulation appears complex, involving Th1 and Th2 lymphocytes and cytokines. The variation of serum QT may be a way of inferring the activity of various inflammatory processes, including fungi, which can help as a biomarker of PCM. **Conclusion:** The QT can be in simple method to reveal the presence of inflammatory response associated with fungal infection. Further tests are necessary to relate clinical-laboratory increased activity of QT as a biochemical marker in PCM.

## KEYWORDS

Chitotriosidase, Paracoccidioidomycosis, Chitinase, Laboratorial Diagnosis, Biomaker.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

18 GH	Família enzimática Glicosil-hidrolase 18
19 GH	Família enzimática Glicosil-hidrolase 19
CLP	Proteína tipo quitinase ( <i>Chitinase-like protein</i> )
CN	Controle Negativo
COEP	Comitê de Ética e Pesquisa
CTR-DIP	Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias
CV	Coefficiente de Variação
EDTA	Ácido etil-diamino-tetra-acético
HC	Hospital das Clínicas
IL-10	Interleucina tipo 10
IL-12	Interleucina tipo 12
IL-18	Interleucina tipo 18
IL-1 $\beta$	Interleucina tipo 1 beta
IL-4	Interleucina tipo 4
IL-5	Interleucina tipo 5
IL-6	Interleucina tipo 6
INF- $\alpha$	Interferon tipo alfa
INF- $\beta$	Interferon tipo beta
LPS	Lipopolissacarídeo
NASH	Esteato-hepatite não alcoólica
PCM	Paracoccidiodomicose
PMN	Células Polimorfonucleares
QT	Quitotriosidase
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro
SD	Desvio padrão
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TLR-2	Receptor do tipo Toll ( <i>Toll-like receptor</i> ) 2
TLR-4	Receptor do tipo Toll ( <i>Toll-like receptor</i> ) 4
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral tipo alfa
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Distribuição da mortalidade por Paracoccidiodomicose no Brasil registrada em 2010, total de 70 casos..... 19
- Figura 2** – Quantidade de pessoas por faixas de atividade da quitotriosidase nos grupos Controle e PCM..... 40
- Figura 3** – Atividade da quitotriosidase nos grupos paracoccidiodomicose (PCM) e controle (CN) selecionados de casuística agrupada do Centro de Referência e Treinamento em Doenças Infecciosas e Parasitárias – Ambulatório de referência em Paracoccidiodomicose e Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais..... 41

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Atividade da enzima quitotriosidase (em nmol/ml/h) no soro de pessoas do grupo controle e dos pacientes do grupo paracoccidioidomicose selecionados de casuística agrupada do Centro de Referência e Treinamento em Doenças Infecciosas e Parasitárias – Ambulatório de referência em Paracoccidioidomicose do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais..... 39
- Tabela 2** – Descrição dos pacientes do grupo paracoccidioidomicose selecionados de casuística agrupada do Centro de Referência e Treinamento em Doenças Infecciosas e Parasitárias – Ambulatório de referência em Paracoccidioidomicose do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais..... 40
- Tabela 3** – Descrição dos voluntários do grupo controle, selecionados entre pessoas híidas que doaram sangue no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais em 2012..... 41
- Tabela 4** – Comparação entre as idades e sexo dos grupos paracoccidioidomicose (PCM), selecionados de casuística agrupada do Centro de referência e Treinamento em Doenças Infecciosas e Parasitárias – Ambulatório de referência em Paracoccidioidomicose do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais e do grupo controle (pessoas híidas)..... 42

## SUMÁRIO

<b>1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....</b>	<b>14</b>
<b>2. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
3.1 Paracoccidiodomicose.....	18
3.2 Quitotriosidase.....	29
<b>4. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>33</b>
<b>5. OBJETIVOS DO TRABALHO.....</b>	<b>34</b>
5.1 Objetivo principal.....	34
5.2 Objetivos secundários.....	34
<b>6. MATERIAL E MÉTODO.....</b>	<b>35</b>
6.1 Delineamento do estudo e metodologia.....	35
6.2 Amostras.....	35
6.2.1 Grupo Caso.....	35
6.2.2 Grupo Controle.....	36
6.3 Aspectos éticos.....	37
6.4 Atividade da quitotriosidase em soro humano.....	37
6.5 Análise estatística.....	38
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
<b>8. DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>50</b>
<b>10. CONCLUSÕES.....</b>	<b>51</b>
<b>11. LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....</b>	<b>52</b>
<b>12. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>53</b>
<b>13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>54</b>
<b>14. ANEXOS.....</b>	<b>64</b>
Anexo A Aprovação do projeto de pesquisa no COEP/UFMG.....	65

## 1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A enzima quitotriosidase (QT) é naturalmente produzida pelo organismo humano e sua atividade é útil no diagnóstico e monitoramento terapêutico da doença de Gaucher tipo I. É produzida por macrófagos ativados e sua atividade se eleva em muito na doença de Gaucher, atingindo até milhares de vezes acima do nível de pessoas saudáveis.

A atividade da QT está elevada em neonatos com sepse por *Candida spp.* e em algumas outras doenças fúngicas sistêmicas. Este fenômeno incitou avaliar a sua correlação com a infecção por outros fungos, como o *Paracoccidioides brasiliensis*. Foi realizado teste piloto e a atividade destas amostras “testes” mostraram-se significativamente elevadas (média de 224 nmol/mL/h e SD  $\pm$  95,6) em relação à média observada em literatura e na média do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo (EIM) do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG) realizada em plasma humano de pessoas híginas.

Para chegar à média interna do EIM foram selecionadas 136 amostras de sangue de pacientes aparentemente saudáveis (cujos hemogramas não apresentavam quaisquer anormalidades e não estavam relacionados com doença infecciosa), vindos da triagem hematológica do HC-UFMG. A média, não oficial e não publicada, da atividade enzimática da QT foi de 56,85 nmol/mL/h.

A realização de dosagem piloto justificou-se por não haver – em literatura científica, até o início deste trabalho – menção sobre a atividade da QT relacionada à PCM. A escolha por utilizar como micose sistêmica a PCM baseou-se na sua importância na saúde pública brasileira, por já haver um grupo considerável de pacientes com PCM acompanhados por longo período de tempo pelo Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias e na necessidade de encontrar biomarcador de fácil uso clínico para a PCM.

Com a hipótese confirmada, deu-se início aos estudos que ofereceram bases para originar este trabalho de dissertação.

## 2. INTRODUÇÃO

Adolfo Lutz, em 1908 no Brasil, descreveu em dois pacientes a presença de lesões mucocutâneas e as relacionou a um fungo ainda não identificado, denominando a nova doença de hifoblasticose pseudococcidióidica, para que fosse diferenciada da coccidioidomicose (LUTZ, 1908). Miguel Pereira e Gaspar Viana (1911) descreveram o primeiro caso de comprometimento pulmonar associado a essa nova micose. Em 1919, Haberfeld (1919) fez o diagnóstico do acometimento exclusivamente pulmonar por esse fungo, sem que o paciente apresentasse as lesões cutâneas e mucosas, sugerindo a hipótese da penetração do fungo por via inalatória, o que foi posteriormente sugerido por Almeida (1948) e Lacaz (1951) (ANGULO-ORTEGA, 1972; LACAZ *et al*, 1959; LACAZ, 1982a). Várias foram as contribuições de Splendore e Almeida que caracterizaram o fungo e determinaram alguns dos mecanismos de sua transmissão. Foram tão importantes que a doença ficou conhecida como doença de Lutz-Splendore-Almeida. Diversos outros termos foram usados para descrever a hifoblasticose pseudococcidióidica como blastomicose sul-americana, granulomatose paracoccidióidica, granuloma paracoccidióidico, granulomatose blastomicóide tropical, granuloma ganglionar maligno de origem blastomicótica, culminando por paracoccidioidomicose (PCM).

Prado *et al* (2009) considera que no Brasil a PCM constitui-se na maior causa de morte por micose sistêmica em pessoas imunocomprometidas, e a quinta causa de mortes secundárias à síndrome de imunodeficiência adquirida e, no geral, é responsável pelo décimo lugar entre as causas de morte por doenças infecciosas e parasitárias. Foi responsável por 148 mortes entre 2005 e 2006. Possui, portanto, grande impacto na saúde pública (COUTINHO *et al*, 2002; WANKE *et al*, 1994).



É doença dinâmica e polimórfica, pode recidivar e, nesta eventualidade, apresentar manifestações clínicas diversas das descritas em episódios prévios. As variações observadas na intensidade, extensão, disseminação e características das lesões dependem basicamente de alterações da virulência do fungo e de flutuações da resposta imunológica do hospedeiro. Esses fatores favorecem o comportamento variável da doença, o que torna complexo o estabelecimento de sua classificação (FRANCO, 1987; PADILHA-GONÇALVES, 1996).

Muitas questões estão a serem respondidas em quase todos os aspectos da PCM, especialmente, em relação à sua epidemiologia e riscos de infecção; estabelecimento de diagnóstico mais fácil, prático e menos intervencionista; terapêutica por tempo menor do que usualmente é necessário; e controle de cura.

O estabelecimento diagnóstico constitui desafio para a abordagem mais ágil e estabelecimento de terapêutica precoce. Este trabalho procura estabelecer nova estratégia propedêutica no sentido de obter marcador indireto, sem a necessidade de excisão de tecido, para a sugestão diagnóstica da PCM.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Paracoccidioidomicose

##### O Agente Etiológico

O *Paracoccidioides brasiliensis*, fungo assexuado, dimórfico e termodinâmico que à temperatura ambiente (entre 4 e 28°C) apresenta-se sob a forma micelial, e à 37°C desenvolve-se como leveduras (LACAZ, 1991). Nos tecidos humanos, o fungo tem forma esférica, medindo 2 a 30 micrometros ou mais de diâmetro, com parede duplamente refringente. Sua esporulação múltipla resulta no típico aspecto de “roda de leme”, considerado patognomônico da doença. O *habitat* natural do *P. brasiliensis* ainda não é bem definido, mas sabe-se que é um fungo saprobiótico relacionado com o solo (MARQUES, 2003) e a maioria dos casos de PCM acomete trabalhadores agrícolas ou jardineiros (mesmo tendo outras atividades há anos). A infecção primária se dá por inalação dos propágulos do fungo (MARQUES, 2012) – os conídios – e estes, depois de inalados, originam as formas de leveduras que parasitam os tecidos humanos (SHIKANAI-YASUDA *et al*, 2006).

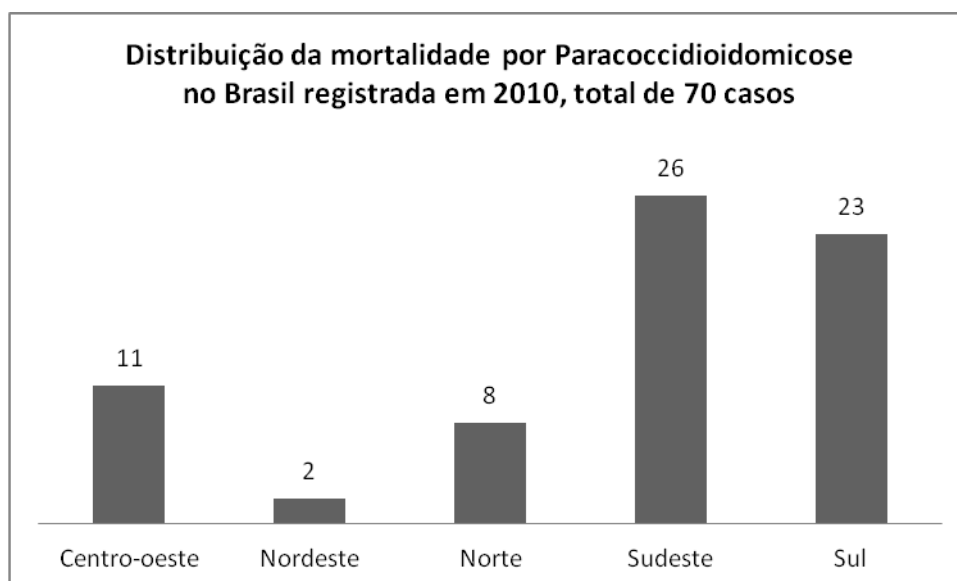
As características do fungo sugerem que o micélio constitua-se em sua forma de vida saprofítica, e parece ser em solo e detritos vegetais que ele produz esporos infectantes (ANGULO-ORTEGA, 1972; LACAZ, 1982a).

O homem era reconhecido como o único hospedeiro do *Paracoccidioides brasiliensis*, entretanto, recentemente foi encontrado tatus (*Dasypus novemcitus*) naturalmente infectados em regiões endêmicas para a PCM. A relevância deste achado na epidemiologia da PCM ainda não está completamente elucidada.

## Epidemiologia

É doença própria da América Latina, do México até a Argentina, entretanto, não é encontrada em todos os países abrangidos nesta faixa (BRUMMER, CASTANEDA e RESTREPO, 1993), sendo prevalente na Argentina, Brasil, Colômbia e Venezuela (MARQUES, 2012). Nos países onde a PCM é endêmica, os casos têm distribuição territorial heterogênea, mas tendem a prevalecer em regiões próximas às florestas úmidas, com poucos casos a beira-mar e em áreas desérticas (BRUMMER, CASTANEDA e RESTREPO, 1993). As regiões com alta incidência da PCM são de temperaturas médias (17 a 24°C), índice pluviométrico entre 900 a 1810 mm/ano, presença de florestas, cursos d'água, invernos curtos e verões chuvosos (RESTREPO, 1985). No Brasil, a maior incidência ocorre nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (PALMEIRO, CHERUBINI e YURGEL, 2005), o estado do Paraná também figura com significativo número de casos. A figura 1 representa a distribuição da mortalidade por PCM no Brasil, em 2010, num total de 70 casos registrados pela Vigilância Sanitária nacional naquele ano.

**Figura 1**



Fonte: Ministério da Saúde/SVS/DASIS – Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM)

A PCM pode acometer indivíduos de todas as faixas etárias, mas as formas progressivas da doença ocorrem mais frequentemente em adultos entre 30 e 60 anos de idade. As pessoas que exercem atividades agrícolas constituem a maioria dos pacientes com a micose ativa, mas a infecção, que era praticamente rural, vem se expandindo para zonas urbanas, acometendo outras profissões, mesmo em indivíduos que nunca saíram dos grandes centros, o que acarreta grande impacto social e econômico (LACAZ, 1991; SHIKANAI-YASUDA *et al*, 2006; WANKE e AIDÊ, 2009). Em áreas endêmicas, a proporção de homens para mulheres com PCM pode chegar a 13:1.

### **Fisiopatologia e Patologia**

A PCM é adquirida em pessoas saudáveis por intermédio da inalação de esporos do *P. brasiliensis*, usualmente durante a infância ou juventude (BRADFORD, 1976; SUNI, PICKER e MAINO, 1998). A transmissão da PCM inter-humana ou de surtos epidêmicos não é conhecida, sendo rara a ocorrência familiar (BOPP, 1955; FAVA-NETO *et al*, 1965; LIMA, 1952).

Os esporos ou partículas infectantes têm tamanho diminuto e atingem facilmente os alvéolos pulmonares em 12 horas, onde ocorre sua transformação em leveduras e passam a multiplicar por brotamento múltiplo (LACAZ, 1982b, 1991). O fungo determina o aparecimento de um processo de alveolite com abundantes neutrófilos, que, posteriormente, são substituídos por células mononucleares e macrófagos, seguida de reação ganglionar regional, formando assim, o complexo primário. Há a formação do granuloma epitelióide, que é a forma mais típica de reação inflamatória tecidual à presença do *P. brasiliensis* (CALICH e KASINHO, 1998; LACAZ, 1982b, 1991). O granuloma que se forma em torno das leveduras, é constituído por células gigantes e células epitelióides, e em sua área central pode-se

observar a presença de supuração e necrose de coagulação (FRANCO, GOES e KOURY, 1997; SINU, PACKER e MAINO, 1998; SOUTO *et al*, 2000; TOBORDA *et al*, 1998; TORRES, 2001). O complexo primário na maioria dos casos regride espontaneamente, embora possa haver fungemia em algum momento da evolução, com estabelecimento de focos metastáticos em qualquer órgão (LONDERO, 1986). O pulmão é o órgão mais frequentemente acometido, à semelhança do complexo primário da tuberculose. Em pacientes procedentes de zona endêmica, infectados com o *P. brasiliensis*, sem PCM doença, o complexo primário não se calcifica ou é raro (ANGULO-ORTEGA, 1972; SEVERO, 1979).

As vias de disseminação do fungo são a linfática, a hematogênica e a canalicular. Praticamente todos os órgãos podem ser acometidos (SINU, PACKER e MAINO, 1998; SOUTO *et al*, 2000; TOBORDA *et al*, 1998; TORRES, 2001), sendo frequente o comprometimento cutâneo-mucoso, linfático, adrenal, e ainda do sistema nervoso central, baço, fígado, ossos e articulações, o que coloca a PCM como uma infecção de caráter sistêmico. Desenvolvida a hipersensibilidade e a imunidade celular, os focos primários sofrem necrose, em geral sem calcificação, que podem conter fungos viáveis, quiescentes. A ocorrência de infecção primária em pacientes imunodeficientes associa-se especialmente com evolução das lesões primárias de forma progressiva e capaz de determinar lesões graves, de curso agudo, seja com lesões pulmonares infiltrativas agudas, ou extra-pulmonares decorrentes de disseminação hematogênica primária, com apresentações polimórficas, variáveis com a idade do paciente (LONDERO, 1986).

O desenvolvimento da doença PCM, representada por lesões que produzem sinais e sintomas, surge notadamente a partir da terceira, especialmente, quinta e sexta décadas de vida, com o máximo de prevalência de acometimento pulmonar na quinta década de vida (LEME, 1989).

A imunidade inata atua contra o fungo, primariamente, nos focos de infecção nos pulmões, com secreção de substâncias antimicrobianas, e pela fagocitose pelos macrófagos alveolares, e a modulação do processo inflamatório por intermédio da secreção de citocinas (GALICH *et al*, 2008).

As cicatrizes decorrentes destas lesões iniciais podem se tornar estéreis, com destruição dos fungos, mas em muitos casos ocorre persistência destes microorganismos, com formação de um foco latente ou quiescente (BRADFORD, 1976; SINU, PACKER e MAINO, 1998). Excepcionalmente pode haver progressão das lesões primárias com desenvolvimento de sinais e sintomas que irão caracterizar a forma aguda ou subaguda da PCM (SINU, PACKER e MAINO, 1998; SOUTO *et al*, 2000; TOBORDA *et al*, 1998; TORRES, 2001), principalmente vista em pacientes com deficiência imunitária (FRANCO, GOES e KOURY, 1997; SOUTO *et al*, 2000). Na maioria dos casos, entretanto, observa-se um período de latência prolongado, após a involução das lesões primárias, que poderá durar anos, e a doença só poderá aparecer, agora na sua forma crônica, por reativação de focos quiescentes, onde permaneceram fungos viáveis, com propagação para outros órgãos. Os fatores envolvidos na reativação do foco residual ou quiescente ainda não foram plenamente estabelecidos.

Alguns fatores como idade, sexo ou genéticos (ANGULO-ORTEGA, 1972; LACAZ, 1982a) podem estar relacionados ao processo de reativação. É relatada maior prevalência no sexo masculino, sendo sugerida uma proteção das mulheres à doença relacionada ao estrógeno, que inibe a transformação do micélio em levedura (SINU, PACKER e MAINO, 1998; SOUTO *et al*, 2000; TOBORDA *et al*, 1998). Este fato é, entretanto, questionado desde que um fator ocupacional de exposição ao fungo possa ser responsável por esta diferença do acometimento entre os sexos (DEL NEGRO, 1982; GONTIJO *et al*, 2003; RESTREPO *et al*, 1976). É importante notar, entretanto, que na primeira década de vida, quando não há maturidade sexual, tanto a infecção quanto a doença ocorrem em ambos os sexos, e não se

observa diferença significativa entre sexos nesta faixa etária quanto à reação à paracoccidiodina (DEL NEGRO, 1982).

A inflamação paracoccidiodica pode assumir três padrões anátomo-patológicos gerais: 1) granuloma epitelióide, 2) forma necrosante-exsudativa e 3) forma mista. O granuloma epitelióide é subclassificado em granuloma compacto - bem definido, de padrão tuberculóide, formado por células epitelióides e gigantes multinucleadas, muitas contendo o fungo degenerado, em quiescência ou em reprodução ativa; e em granuloma frouxo, nos quais a reação epitelióide é mal definida e são observadas células gigantes multinucleadas em número variável com inflamação predominantemente exsudativa, edema e congestão, o que confere o aspecto frouxo à lesão. A forma necrosante-exsudativa caracteriza-se por necrose, que pode ser isquêmica (por falta de aporte sanguíneo), caseosa (semelhante à observada nas lesões da tuberculose), gomóide (liquefativa, com fungos numerosos) ou supurativa (liquefativa, em padrão semelhante a abscesso, com numerosos neutrófilos e fungos). A forma mista (granulomatosa-necrosante) caracteriza-se pela combinação dos elementos descritos, com padrão granulomatoso na periferia da lesão e necrose central (FRANCO *et al*, 1987).

### **Classificação Clínico-Patológica**

A classificação mais utilizada atualmente, estabelecida de acordo com a comissão reunida em Botucatu (1983) e Medellín (1986) é a seguinte (ANGULO-ORTEGA, 1972; FRANCO *et al*, 1987; CALICH e KASHINHO, 1998; DEL NEGRO *et al*, 2000; DINIZ *et al*, 2001; MONTENEGRO, 1986; SHIKANAI-YASUDA *et al*, 2006):

1) PCM-infecção: período em que a doença encontra-se silenciosa, sem sinais ou sintomas aparentes. Apesar disso, o hospedeiro pode desenvolver resposta imunológica específica contra o fungo e assim, a intradermorreação com paracoccidiodina pode ser

positiva. Nessa fase, podem ocorrer: regressão do foco infeccioso, com destruição do fungo e formação de cicatrizes estéreis; regressão, com manutenção de fungos viáveis e formação de foco quiescente; ou progressão, levando ao aparecimento de sinais e sintomas;

2) PCM-doença: caracterizada pelo aparecimento de manifestações clínicas, através da evolução direta do complexo primário (lesão de inoculação e lesões linfáticas associadas), da reativação de um foco quiescente do complexo primário (re-infecção endógena) ou de re-infecção exógena após uma infecção prévia. Uma vez estabelecida, a doença pode evoluir de dois modos:

2.1) Forma aguda ou sub-aguda (tipo juvenil): a partir de uma lesão primária geralmente não detectada, ocorre progressão rápida por disseminação linfática e hematogênica ao sistema mononuclear fagocitário (baço, fígado, linfonodos e medula óssea), com disfunção dos órgãos acometidos, que pode ser moderada ou intensa. É mais comum em jovens. Envolve cerca 5% dos casos de PCM e acomete principalmente crianças e adolescentes de ambos os sexos. Possui evolução rápida. A sua principal sintomatologia é constituída por linfadenomegalia, manifestações digestivas, hepatoesplenomegalia, envolvimento ósteo-articular e lesões cutâneas. Na maioria dos casos, a resposta imunológica humoral tende a ser mantida com altos títulos de anticorpos, enquanto a resposta celular mostra-se intensamente deprimida. Ao exame histopatológico, observam-se granulomas frouxos com grande número de células leveduriformes multiplicando-se ativamente;

2.2) Forma crônica (tipo adulto): a partir do complexo primário ou de um foco quiescente, a doença progride lentamente para acometimento leve, moderado ou grave (eventualmente fatal). É mais comum em adultos masculinos. A resposta imunológica humoral específica é variável, de acordo com a gravidade clínica. Em relação à forma aguda, verifica-se à histopatologia mais granulomas epitelióides compactos com



menor número de células fúngicas. Representa mais de 90% dos casos de PCM, e acomete adultos entre 30 a 60 anos, principalmente homens. A sua evolução é lenta e silenciosa. Pode ser do tipo:

2.2.1) Unifocal: quando é acometido um único órgão ou sistema. Essa forma é habitualmente verificada nos pulmões, mas, eventualmente, verifica-se envolvimento mucocutâneo isolado (forma unifocal tegumentar);

2.2.2) Multifocal: quando ocorre disseminação broncogênica (a partir de foco pulmonar primário), linfática ou hematogênica. Nesse caso, a infecção torna-se disseminada, atingindo especialmente o sistema nervoso central, a pele, a mucosa oral, os intestinos, os ossos, as adrenais e os órgãos genitais;

3) Formas residuais ou sequelas: apesar de não haver mais células viáveis do parasita, a fibrose resultante do processo inflamatório pode provocar várias disfunções, na dependência do órgão afetado, podendo promover insuficiências pulmonar (doença pulmonar obstrutiva crônica, disfonia, cicatrizes laríngeas), adrenal, renal, e colestase.

### **Manifestações Clínicas**

Todo o período de estabelecimento primário do *P. brasiliensis* é assintomático, embora haja desenvolvimento de resposta imunitária humoral e celular (BRADFORD, 1976). É importante destacar que o homem é um hospedeiro resistente ao *P. brasiliensis*, uma vez que o número de pacientes expostos ao fungo é bem maior que o número de pacientes que desenvolve a doença.

O aparecimento da primeira sintomatologia pode ser muito lenta (média de 15,3 anos). Há relatos de pessoas residentes em países sem PCM que viajaram para áreas endêmicas e apresentaram a doença muitos anos depois (BRUMMER, CASTANEDA e RESTREPO,

1993). A recente ocorrência da doença em países antes sem relatos pode estar associada às viagens internacionais e imigração de pessoas de áreas endêmicas. Esse fato significa grande risco à saúde pública para esses locais, pois a doença pode não ser diagnosticada – seja por sua evolução silenciosa, pela falta de experiência do corpo clínico ou mesmo confusão da forma pulmonar com doenças como tuberculose ou sarcoidose (BUITRAGO *et al*, 2011; KAMEI *et al*, 2003) e inexistência de método acurado para estabelecer seu diagnóstico indireto.

As manifestações clínicas mais frequentes em adultos são representadas por lesões orofaríngeas, pulmonares e linfonodais. A sintomatologia respiratória é frequentemente inespecífica e bem tolerada. A sintomatologia respiratória usualmente se instala insidiosamente, caracterizada por tosse seca, discreta, irritativa (FURTADO, 1952; GONÇALVES *et al*, 1980; LOUZADA, 1952; MACHADO FILHO, 1954), ou mais raramente com expectoração mucosa. Podem estar presentes dispnéia, dor torácica e inapetência (MACHADO FILHO, 1954; MACHADO FILHO e MIRANDA, 1960; SEVERO, 1979).

A doença geralmente causa lesões na pele. A face é comumente afetada, com lesões ao redor da boca e nariz (MARQUES, 2012). As mucosas oral, faríngea e laríngea são afetadas em mais de 70% de pacientes adultos, com a observação de ulcerações superficiais de aparência granular ou pontilhados hemorrágicos. Observa-se a presença de nódulos linfáticos, superficiais ou profundos, especialmente, em pacientes com menos de 30 anos de idade. Os nódulos são inicialmente firmes, hipertróficos e dolorosos. Os pacientes geralmente apresentam febre e fraqueza.

A sintomatologia geral principal é representada pela adinamia e odinofagia. É rara a descrição de temperatura corpórea acima de 37,4°C. Pode haver emagrecimento (15 kg em média), e linfadenomegalia. A evolução da sintomatologia é imprevisível, em média entre

dois e três meses e até em anos (BALDO, 1953; LOUZADA 1954; RIZZON, 1980; ROLON, 1976). As manifestações clínicas internas principais dependem do acometimento pulmonar, podendo produzir tosse seca ou produtiva e dispneia. Nos jovens também é comum o envolvimento hepático e esplênico na forma aguda/subaguda da PCM (FRANCO *et al*, 1987; MARQUES, 2012). As glândulas adrenais sofrem infecção subclínica em vários pacientes, podendo evoluir como síndrome de Addison (GONTIJO *et al*, 2003; DEL NEGRO, 1982; GONZALEZ *et al*, 2000). Os ossos também podem estar comprometidos em 6 a 20% dos pacientes, com lesões frequentes no tórax, região escapular e braços (MARQUES, 2012).

Apesar de ser considerado um fungo patogênico, o *P. brasilienses* adquire às vezes caráter oportunista (GOLDANI e SUGAR, 1995), o que constitui assunto de grande relevância dado o crescente número de pacientes com imunodeficiência. Paracoccidiodomicose multissistêmica grave tem sido descrita associada à leucemia, linfoma, terapêutica imunossupressora, transplantes e à síndrome de imunodeficiência adquirida (GOLDANI e SUGAR, 1995). Apresenta-se, nestas circunstâncias, de forma aguda ou subaguda, febril e sistêmica, com granulomas frouxos e ricos em fungo demonstráveis na histopatologia. A associação da PCM pulmonar e tuberculose, fato observado em diversas séries, sempre foi motivo de dificuldade no diagnóstico e às vezes de insucesso terapêutico. As descrições da literatura incluem parcela significativa de trabalhos que incluem pacientes com a concomitância das duas doenças, ou presentes em sua história pregressa (AZEVEDO, 1980; MARTINS, 1984; LEME, 1989; TRAD, 2006). Outras descrições excluem pacientes que apresentam associação com tuberculose (FERREIRA, 1966; GONÇALVES e BARDY, 1946). A associação entre PCM e tuberculose variou entre alguns trabalhos de 3,8 e 15% em algumas séries apresentadas na literatura (TRAD, 2006; LEME, 1989). As alterações radiográficas observadas nas duas doenças por vezes se superpõem, havendo autores que

sugerem em alguns casos ser possível orientar o diagnóstico para uma ou outra doença em função das alterações apresentadas.

### **Manifestações Laboratoriais**

O diagnóstico de certeza da PCM é obtido pela visualização do fungo em algum material biológico, por meio de exame direto, cultura ou exame anatomopatológico de peça cirúrgica (BRADFORD, 1976).

Na PCM pulmonar exclusiva, o escarro é considerado o material mais útil para o exame micológico direto (LONDERO, 1986), embora a sua confiabilidade tenha sido inicialmente questionada em pacientes que apresentavam lesões orofaríngeas e nenhuma anormalidade nas telerradiografias de tórax (GONÇALVES e BARDY, 1946; LEME, 1989). O lavado ou aspirado brônquico e, mais raramente, o aspirado pulmonar transcutâneo ou fragmento de tecido obtido por biópsia são submetidos a exame (LONDERO, 1986). A biópsia pulmonar a céu aberto chegou a ser recomendada nos casos em que não é possível estabelecer diagnóstico por outros procedimentos (RODRIGUEZ, 1961). O material obtido por aspiração transcutânea pulmonar é submetido a exame microscópico em potassa a 10% e ao cultivo em meios de rotina. A biópsia pulmonar obtida com agulha lancetante ou a céu aberto deve ser preservada em frasco esterilizado, sobre gaze umedecida em água destilada esterilizada, e parte do material enviada para exame histopatológico e micológico. Os cortes histológicos devem ser corados à hematoxilina e eosina e por uma técnica de impregnação de prata (LONDERO, 1986). Nos pacientes com PCM pulmonar e acometimento cutâneo-mucoso, o isolamento do fungo em geral é feito a partir das lesões cutâneo-mucosas, de mais fácil acesso.

O diagnóstico é também realizado com as técnicas micológicas que demonstram o *P. brasiliensis* após cultivo.

O diagnóstico presuntivo pode ser baseado em provas sorológicas, como evidência indireta da presença do fungo no paciente, quando não é possível o seu isolamento. Os exames sorológicos através da pesquisa de anticorpos específicos anti-*P. brasiliensis* ainda tem valor limitado. Auxiliam no diagnóstico e servem para monitorar a resposta terapêutica e recuperação clínica. O mais utilizado dos testes sorológicos é a técnica de imunodifusão para identificação da glicoproteína 43 (gp43), antígeno específico do *P. brasiliensis* (MARQUES, 2003, 2012).

O estabelecimento de diagnóstico fácil, objetivo, prático, não intervencionista, confiável, continua a representar grande desafio na PCM.

### **3.2 Quitotriosidase**

#### **Conceito**

A quitotriosidase (QT) é uma enzima humana pertencente à família enzimática 18-glicosil-hidrolase (18GH), onde se encontram as enzimas do tipo quitinases, classificadas pela *Enzyme Commission* (EC) como número 3.2.1.14 (HENRISSAT, 1991).

As quitinases estão presentes em animais e plantas e podem estar envolvidas na degradação de compostos de quitina presentes em patógenos, porém ainda não há comprovação do seu mecanismo de ação claro e sua função específica no homem.

## **Classificação**

As quitinases são classificadas dentro das famílias 18GH e 19GH, baseado na sua familiaridade de sequência de aminoácidos e ligadas pela capacidade de hidrolisar a quitina e a quitodextrina, um oligossacarídeo (GUAN *et al*, 2009).

A QT tem várias regiões constantes com alta homologia àquelas presentes em quitinases de diferentes espécies, mostrando preservação da família 18GH ao longo do tempo (BOOT *et al*, 1995). O gene humano da QT está localizado no cromossomo 1q31-q32 e é homólogo a outras quitinases encontradas na natureza (HU *et al*, 1996; RENKEMA *et al*, 1998).

A quitina possui estrutura de polímero com unidades repetidas de  $\beta$ -(1-4)-poli-N-acetil-D-glicosamina, sendo o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, atrás apenas da celulose (LEE *et al*, 2010). É o maior componente estrutural de exoesqueleto de crustáceos e insetos, parede celular de fungos e membrana de microfilárias em parasitas nematodos, mas não é encontrada em vertebrados (GUAN *et al*, 2009; LEE *et al*, 2010). As quitinases humanas somente são encontradas na família 18GH; e são reconhecidas como quitinases humanas a QT (ou quitinase 1), quitinase mamífera ácida (AMCase), YKL-39, YKL-40, oviductina, di-N-acetil-quitobiase e SI-CLP (GUAN *et al*, 2009). A quitina está envolvida em vias da resposta imunológica inata, pois dispara proteção contra infecção por organismos possuindo quitina em sua superfície (BURTON e ZACCONE, 2007).

## **Função**

As enzimas ditas quitinases verdadeiras (QT, AMCase e di-N-acetil-quitobiase) exercem atividade quitinolítica, enquanto que as chamadas “proteínas tipo quitinases” (CLP

em inglês, *chitinase-like proteins*) apenas catalisam o resíduo de ácido glutâmico da quitina, ligando-se à estrutura da quitina. As CLP também são conhecidas como quitolectinas (GUAN *et al*, 2009; LEE *et al*, 2010).

A QT, como a AMCase, contém um domínio ligante à quitina e outro domínio enzimático que catalisa a hidrólise de pontes glicosídicas do tipo  $\beta(1-4)$ , em carboidratos. Não foi identificada nenhuma substância endógena em mamíferos, como substrato para essas enzimas (LEE *et al*, 2010).

A fonte da QT são os macrófagos (HOLLAK *et al*, 1994). A QT, ao contrário da maioria das enzimas hidrolases lisossomais, não é uma enzima naturalmente estocada, pois os macrófagos são capazes de produzir grande quantidade de QT a partir de um estímulo específico (BOOT *et al*, 1995).

A QT humana existe sob duas isoformas: proteica inativa de 50kDa e enzimática ativa de 39kDa, esta última é expressa, estocada e ativada – por proteólise – nos lisossomas dos macrófagos. A isoforma predominantemente secretada é a de 50kDa (RENKEMA *et al*, 1997). É estimado que na população mundial em geral exista 6% de humanos com homozigose para a mutação que gera inatividade para a QT. A mutação que produz ausência de atividade para a QT é explicada pela inserção de pares de bases no gene responsável pela produção da enzima o que inibe a transformação da forma 50kDa para a ativa, de 39kDa (BOOT *et al*, 1998; VAN EIJK *et al*, 2005).

### **Marcador Laboratorial**

A atividade da QT está muito elevada em doenças de depósito lisossomal. Na doença de Gaucher tipo I, por exemplo, a atividade da QT pode ultrapassar facilmente em 1000 vezes

os valores fisiológicos normais (HOLLAK *et al*, 1994), característica esta que faz com seja utilizada como marcador bioquímico indireto no tratamento dessa doença.

Como a quitina, nos fungos, representa o maior componente de sua parede celular, uma quitinase pode ter efeito inibitório no crescimento ou até mesmo ser fungicida para estes microrganismos, visto que sem a proteção da parede celular as células fúngicas certamente sofreriam lise pela pressão osmótica. Barone, Sotgiu e Musumeci (2007) atribuem o aumento da atividade da QT como resposta ancestral da imunidade inata com função de hidrólise da quitina. Foi relatada a inibição do crescimento de hifas de fungos em presença de concentrações elevadas de QT (VAN EIJK *et al*, 2005). É proposto que indivíduos sem a expressão dessa enzima possam ser mais vulneráveis às infecções fúngicas (MASOUD *et al*, 2002). Há estreita relação entre atividade aumentada da QT em neonatos com infecção fúngica sistêmica, o que pode realçar a sua possível importância como biomarcador para evidenciar e monitorar a evolução desse tipo de doença (LABADARIDIS *et al*, 2005), como já utilizado na doença de Gaucher. Outro estudo, nessa mesma direção (LABADARIDIS *et al*, 1998) demonstrou que houve redução dos níveis de QT, em plasma e urina, com melhora simultânea da condição clínica de neonatos acometidos por candidíase sistêmica, acompanhados da normalização de parâmetros laboratoriais (contagem global de leucócitos e velocidade de hemossedimentação) desses pacientes.

Masoud *et al* (2002), em indivíduos que sofreram sepse por *Candida*, demonstraram que a prevalência de homozigose para a QT deficiente foi similar a da população normal.



#### **4. JUSTIFICATIVA**

A PCM é doença grave que desencadeia grande impacto em saúde pública e individual. Dentre as doenças infecciosas e parasitárias, é a décima mais letal, no Brasil, acometendo – principalmente – pessoas na idade produtiva. Grande parte dos pacientes com PCM enfrentam longa jornada desde o aparecimento da primeira sintomatologia até seu diagnóstico e tratamento. Existe pouca informação sobre a PCM, o seu diagnóstico clínico é semelhante à multiplicidade de outras doenças e depende da identificação do fungo, o que depende, em geral, de atividade avançada da doença e seus critérios de cura não são bem definidos. A técnica laboratorial confirmatória para diagnóstico da PCM é realizada por visualização direta do fungo e/ou biópsia, logo, é necessário buscar métodos confiáveis não invasivos para o diagnóstico e tratamento da doença.

A técnica de dosagem da atividade da QT é relativamente simples, de baixo custo operacional e que deve ser avaliada em relação aos fungos devido a sua relação com marcador de atividade de constituição da parede fúngica, e, portanto, de defesa de toda micose sistêmica.

A identificação precoce da atividade da PCM pode tornar o tratamento por tempo menor do que o usual, o que favorece a aderência e maior probabilidade de cura real.

Este estudo busca esclarecer o papel da QT na avaliação da atividade da PCM e como método de significação clínica para acusar a infecção.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo Principal**

Relacionar a atividade da enzima quitotriosidase sérica com a paracoccidioidomicose crônica não tratada.

### **5.2 Objetivos Secundários**

- Dosar a atividade da quitotriosidase em amostras (soro) de pacientes com PCM crônica diagnosticada, antes do tratamento;
- Dosar a atividade da quitotriosidase em amostras (soro) de pessoas híginas da comunidade (grupo controle negativo);
- Determinar se a elevação da atividade enzimática é significativa para fins diagnósticos da PCM.

## **6. MATERIAL E MÉTODO**

### **6.1 Delineamento do estudo e Metodologia**

Este é um estudo observacional, prospectivo, caso-controle, com casuística de 14 sujeitos em cada grupo. A metodologia utilizada consiste em selecionar amostras de soro disponíveis de pacientes com PCM crônica, antes do tratamento, convidar e selecionar pessoas híginas para obter amostras de sangue (soro) como referência de não doença e dosar a atividade da QT nessas amostras. Para o grupo de pessoas híginas, foi aplicado questionário para coleta de dados sobre existência de doenças cuja atividade da QT é sabidamente elevada, e então considerar ou não a mostra do voluntário para uso no trabalho.

### **6.2 Amostras**

#### **6.2.1 Grupo Caso**

Foram utilizadas 15 amostras de soro de pacientes diagnosticados com PCM e não tratados (aproveitadas de biorrepositório de pesquisa anterior aprovada pelo COEP-UFMG), atendidos e acompanhados pelo ambulatório do Centro de Tratamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias (CTR-DIP) de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Houve perda de uma amostra (contaminação microbiológica), tendo o estudo que seguir com as 14 restantes.

### **Critérios de inclusão**

Foram incluídas as amostras, no estudo, de pacientes:

- Com diagnóstico de PCM crônica;
- Sem terapêutica específica contra a PCM;
- Sem outra doença conhecida capaz de elevar a atividade da QT;

### **Critérios de exclusão**

Foram excluídas do estudo as amostras de pacientes que foram contaminadas por bactéria ou fungo.

## **6.2.2 Grupo Controle**

Foi constituído por pessoas voluntárias saudáveis e maiores de 18 anos, selecionados por convite para a pesquisa. Essas pessoas foram informadas de que se tratava a pesquisa, dos riscos sobre a punção venosa de sangue, da forma e meios para a coleta de sangue e assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) concordando com os termos informados pelos pesquisadores. Para as pessoas do grupo controle, foi aplicado questionário de presença ou antecedência de PCM e presença de doenças nas quais a atividade da QT é sabidamente elevada. Foram utilizadas 14 amostras de soro, dos 17 voluntários. Das três perdas, uma exclusão ocorreu pelo voluntário declarar apresentar *diabetes mellitus* do tipo 2 e nas outras duas devido ao valor da atividade da QT exceder 5% do Coeficiente de Variação em sua dosagem (ver tópico 5.5)

### **Critérios de inclusão**

Foram incluídas no estudo as pessoas com as características:

- Ser maior de idade;
- Não ter antecedência nem presença de PCM;
- Não estar doente de infecção bacteriana, fúngica ou viral, tuberculose, hanseníase, sarcoidose ou algum tipo de câncer;
- Concordância em participar do estudo, assinando o TCLE.

### **Critérios de exclusão**

Foram excluídos do Grupo Controle quando foi observada:

- Contaminação da amostra por bactéria ou fungo;
- Atividade elevada da QT e presença de doença (informada no TCLE) relacionada a essa elevação em literatura científica;
- Desistência em participar do estudo.

## **6.3 Aspectos éticos**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (COEP), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), de acordo com o Parecer nº 181.805.

## **6.4 Atividade da QT em soro humano**

O soro foi obtido por centrifugação (3000RPM/10 minutos) do sangue total coagulado, após punção venosa, e estocado a -20°C até o momento da dosagem. Esta foi realizada no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do HC-UFMG. A atividade da QT foi feita de

acordo com técnica descrita por Hollack *et al* (1994), modificada, onde 5 µl de soro foi incubado com 200 µl do substrato 4-metilumbiliferil-β-D-N-N'-N''-triacetilquitotriosídeo (4-MU-quitotriosídeo) a 0,022mM (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), em solução tampão citrato-fosfato 0,1-0,2M (Sigma-Adlrich Co., St. Louis, MO, USA), pH 5,2 por 15 minutos sob temperatura de 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 2 ml de solução tampão glicina 0,3M (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) em pH 10,6. A fração fluorescente clivada do substrato pela enzima foi medida por um espectrofluorímetro Hitachi F-2500 (Hitachi High-Technologies Co., Tóquio, Japão), comprimento de onda de excitação (EX) em 366 nm e de emissão (EM) em 446 nm. A fenda óptica (*slit*) foi de 5 nm para ambos EX e EM. O coeficiente de variação (CV) entre as duplicatas foi de, no máximo, 5% em todos os casos, mantendo boa reprodutibilidade (CANUDAS *et al*, 2001; COMABELLA *et al*, 2009).

A atividade da QT foi expressa em nanomol de substrato hidrolisado por hora por mL (nmol/h/mL).

## **6.5 Análise estatística**

O cálculo amostral foi realizado pelo programa G-Power 3.0, os dados não tiveram distribuição normal, então utilizou-se método de análise não paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney. Atribuindo o Erro do tipo  $\alpha$  em 0,05 e Poder do teste em 95%, obtivemos retorno do número de oito indivíduos para cada grupo, porém já possuíamos 15 amostras disponíveis para o grupo caso e pareamos a quantidade para o grupo controle. A análise estatística dos resultados foi realizada pelo programa GraphPad Prism 6, pelo teste de Mann-Whitney, considerando a significância clínica se o valor de  $P < 0,05$ .

## 7. RESULTADOS

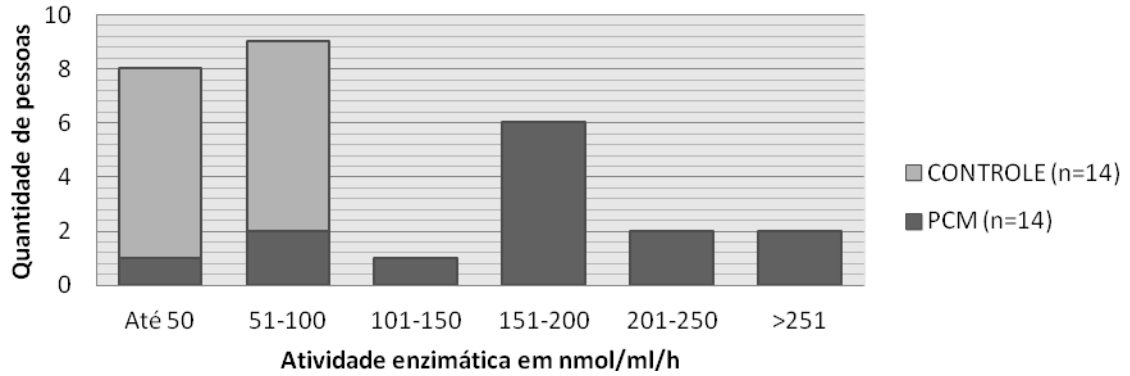
No grupo PCM, das 14 amostras foram obtidas mediana, média e desvio padrão de 174, 191 e 122 nmol/mL/h, respectivamente. No grupo controle (controle negativo), das 14 amostras incluídas foram obtidas mediana, média e desvio padrão de 44, 44 e 29 nmol/mL/h, respectivamente. A análise estatística demonstrou que a diferença entre os dois grupos foi bastante significativa, com valor de  $P < 0,0001$  (quando o necessário seria ser menor que 0,05). O resultado de todo o grupo controle ficou na faixa de até 100 nmol/mL/h, os resultados do grupo PCM – com exceção de três amostras – ficaram acima desse valor de atividade (Figura 2).

**Tabela 1:** Atividade da enzima quitotriosidase (em nmol/mL/h) no soro de pessoas do grupo controle e dos pacientes do grupo paracoccidioidomicose selecionados de casuística agrupada do Centro de Referência e Treinamento em Doenças Infecciosas e Parasitárias – Ambulatório de referência em Paracoccidioidomicose do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Grupo Controle		Grupo Paracoccidioidomicose	
Amostras	Atividade	Amostras	Atividade
1	15,7	1	191,8
2	28,0	2	108,2
3	81,0	3	512,8
4	80,6	4	163,4
5	51,6	5	229,2
6	61,1	6	154,9
7	6,2	7	184,4
8	94,7	8	93,9
9	16,9	9	78,4
10	25,9	10	158,0
11	61,5	11	214,5
12	35,4	12	365,0
13	10,5	13	34,2
14	52,3	14	185,1
<b>Média:</b>	44,4	<b>Média:</b>	191,0

**Figura 2**

**Quantidade de pessoas por faixas de atividade da quitotriosidase nos grupos Controle e PCM**



**Tabela 2:** Descrição dos pacientes do grupo paracoccidioidomicose selecionados de casuística agrupada do Centro de Referência e Treinamento em Doenças Infecciosas e Parasitárias – Ambulatório de referência em Paracoccidioidomicose do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Profissão	Naturalidade	Forma da doença	Tempo de evolução (em meses)
1	57	M	Pedreiro	Tabuleiro-CE	Mucosa	5
2	50	M	Padeiro	Santa Rita do Suaçuí-MG	Mucosa	8
3	65	M	Lavrador	Santana dos Montes-MG	Mucosa, laríngea	4
4	26	M	Lavrador	Santa Luzia-MA	Linfonodal, cutânea, pulmonar	8
5	76	M	Lavrador	Icaraí-MG	Laríngea	12
6	55	M	---	Guacuí-ES	Linfonodal, cutânea	---
7	48	M	Porteiro	Conceição do Mato Dentro-MG	Linfonodal, cutânea, mucosa	3
8	56	M	Pedreiro	Bananal-MG	Cerebral, pulmonar, mucosa	15
9	56	M	Carregador	Santo Antônio do Gramma-MG	Mucosa	3
10	59	M	Pedreiro	Mantena-MG	Cutânea, mucosa	6
11	57	M	Lavrador	Dom Silvério-MG	Mucosa	6
12	67	M	Lavrador	Nova Venécia-ES	Linfonodal	4
13	27	F	Dona de casa	Belo Horizonte-MG	Linfonodal	12
14	43	M	Lavrador	Rio Espera-MG	Mucosa	4

F = feminino, M = masculino, (--) = não disponível



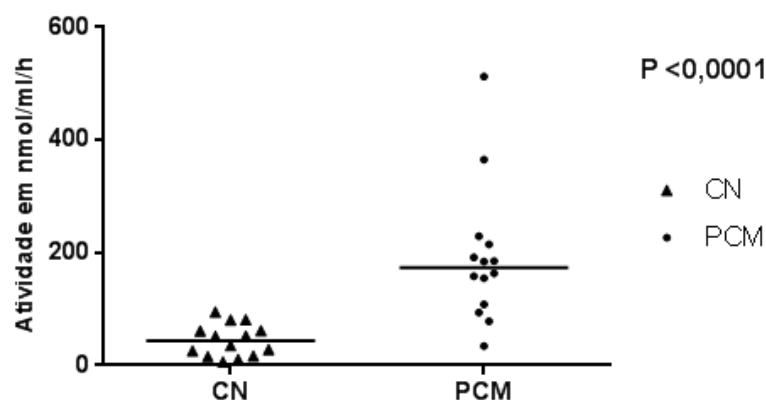
**Tabela 3:** Descrição dos voluntários do grupo controle, selecionados entre pessoas hígdas que doaram sangue no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais em 2012.

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Profissão	Naturalidade
1	26	F	Biólogo	Entre Rios de Minas-MG
2	29	F	Biomédico	Itaúna-MG
3	54	M	Técnico de laboratório	Belo Horizonte-MG
4	26	F	Farmacêutico	Pitangui-MG
5	46	M	Farmacêutico	Alvarenga-MG
6	46	F	Técnico de laboratório	Belo Horizonte-MG
7	43	F	Técnico de laboratório	Belo Horizonte-MG
8	56	M	Agente administrativo	Ponte Nova-MG
9	41	M	Técnico de laboratório	Belo Horizonte-MG
10	32	F	Técnico de laboratório	Mateus Leme-MG
11	53	F	Farmacêutico	Brumadinho-MG
12	41	M	Secretário	Belo Horizonte-MG
13	42	M	Assistente administrativo	Belo Horizonte-MG
14	57	F	Técnico de laboratório	Conselheiro Pena-MG

F = feminino, M = masculino

A atividade de QT em três amostras do grupo PCM tiveram valores na faixa do grupo controle, sendo que uma delas com valor abaixo da mediana do grupo controle. No outro extremo, duas amostras do grupo PCM ficaram distantes acima da mediana desse grupo, com valores de 365 e 513 nmol/mL/h. O grupo PCM demonstrou grande dispersão de resultados, razão pela qual se utilizou a mediana e não a média para análise dos resultados, representados no gráfico da Figura 3.

**Figura 3:** Atividade da quitotriosidase nos grupos paracoccidioidomicose (PCM) e controle negativo (CN) selecionados de casuística agrupada do Centro de Referência e Treinamento em Doenças Infecciosas e Parasitárias – Ambulatório de referência em Paracoccidioidomicose e Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.



**Tabela 4:** Comparação entre as idades e sexo dos grupos paracoccidioidomicose (PCM), selecionados de casuística agrupada do Centro de referência e Treinamento em Doenças Infecciosas e Parasitárias – Ambulatório de referência em Paracoccidioidomicose do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais e do grupo controle (pessoas hígdas).

	<b>Grupo PCM</b>	<b>Grupo Controle</b>
<b>Idade média (em anos)</b>	53	42
<b>Homens</b>	13	6
<b>Mulheres</b>	1	8

## 8. DISCUSSÃO

A atividade da QT é bastante intensa em processos patológicos de depósito lisossomais, como nas doenças de Gaucher e Niemann-Pick (GUO *et al*, 1995; HOLLAK *et al*, 1994), mas também na inflamação crônica (aterosclerose, sarcoidose, esteatose hepática) e em processos neurodegenerativos como na doença de Alzheimer. Pacientes com sarcoidose crônica apresentam atividade da QT mais elevada do que as pessoas sem sarcoidose. As pessoas com sarcoidose em fase ativa também apresentam atividade da QT superior à de pacientes com sarcoidose inativa (GROSSO *et al*, 2004). BARGAGLI *et al*, 2007 relataram na sarcoidose que a atividade da QT está cerca de 10 vezes mais elevada nos pacientes com a doença ativa do que no grupo controle sem a doença. Esse mesmo estudo demonstrou atividade da QT aumentada em pacientes com tuberculose pulmonar, porém menos significativo do que na sarcoidose. CAKIR *et al*, 2012 também revelaram na sarcoidose pulmonar aumento significativo da atividade de QT. A atividade da QT está (LYER *et al*, 2009) também elevada na hanseníase, sendo observado no soro de pacientes com as formas multi e paucibacilares e em grupo saudável (controle) valores de  $207,3 \pm 371,5$ ;  $27,9 \pm 26,1$  e  $18 \pm 12,7$  nmol/mL/h, respectivamente. Identificou-se, nesse estudo, produção de QT dentro de macrófagos, por intermédio de coloração histológica específica. O *Mycobacterium leprae* não contém quitina em suas estruturas de membrana e parede celular. A atividade de QT também está aumentada em pacientes com malária aguda (BARONE *et al*, 2003). Várias outras doenças apresentam elevação da atividade da QT, como:  $\beta$ -talassemia (BARONE *et al*, 1999); doença de Alzheimer (Di ROSA, *et al* 2006); esteatohepatite não alcoólica (MALAGUARNERA *et al*, 2006); e infarto do miocárdio extenso. Estes dados sugerem que a QT pode constituir-se em potencial biomarcador de ativação de macrófagos e da associação

com inflamação arterial (SONMEZ *et al*, 2010; SOTGIU *et al*, 2005). Na esteatohepatite não alcoólica a alta atividade da QT ocorre somente nas células de Küpffer (macrófagos do fígado), em que se observa depósito de lipídios – à semelhança da doença de Gaucher. Observa-se também na esteatohepatite não alcoólica correlação da expressão de TNF- $\alpha$  na indução da QT. Na hanseníase, entretanto, não se observa correlação entre a QT e as citocinas IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (LYER *et al*, 2009), o que revela maior complexidade da interação desta enzima no processo inflamatório. A atividade da QT está também elevada – cerca de 55 vezes – em extratos de placas ateroscleróticas, sugerindo ativação de macrófagos nestes tecidos (BOOT *et al*, 1999); e em recém-diagnosticados com *diabete mellitus* tipo 2, não tratados e não complicados, sugerindo que a QT também pode ser considerada como biomarcador para disfunção endotelial com o risco de aterosclerose (SONMEZ *et al*, 2010). Pacientes com esclerose múltipla possuem também atividade plasmática de QT significativamente elevada em relação ao grupo controle sadio (COMABELLA *et al*, 2009) sendo sua atividade usada como marcador da evolução de processo inflamatório associado (VERBEEK *et al*, 2010).

A provável função da QT (e quitinases em geral) em microrganismos portadores de quitina em sua parede é a de favorecer sua exposição ao meio ambiente e também a estimulação de resposta inflamatória protetora no hospedeiro, como efeito imunológico inato, por intermédio de linfócitos Th1. Van Eijk *et al* (2005) demonstraram atividade fungistática *in vitro* da QT recombinante em modelos de ratos neutropênicos com aspergilose sistêmica e candidíase sistêmica e ainda mostraram que o uso desta enzima recombinante aumentou a sobrevivência destes animais. O aumento da atividade da QT também foi detectado em neonatos com infecções por bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, indicando que a variação desta atividade não seja específica para infecções fúngicas, mas reflexo de ativação de macrófagos (LABADARIDIS *et al*, 2005). Vários relatos descrevem que as citocinas pró-

inflamatórias GM-CSF e TNF- $\alpha$ , além de lipopolisacarídeos (LPS), estimulam a síntese de QT em macrófagos e também promovem a liberação da enzima pelos polimorfonucleares (Di ROSA *et al*, 2005; VAN EIJK *et al*, 2005; MALAGUARNERA *et al*, 2005). Essa correlação sugere que possa ser benéfico o uso terapêutico de fator estimulador de crescimento de colônias de macrófagos (GM-CSF) em pacientes com micoses sistêmicas (VAN EIJK *et al*, 2005). A possibilidade do uso da QT recombinante para tratar micoses sistêmicas parece constituir-se em nova estratégia possível, haja vista a aparente tolerância de altíssimos níveis da enzima (milhares de vezes acima do nível basal) em pacientes com a doença de Gaucher do tipo I descontrolada (VAN EIJK *et al*, 2005). A atividade plasmática de QT está aumentada durante o tratamento com IFN- $\beta$ , em pacientes portadores de esclerose múltipla, talvez pelo fato de o IFN aumentar a atividade dos macrófagos (COMABELLA *et al*, 2009).

O declínio na atividade da QT em pacientes com doença de Gaucher, após terapia de reposição enzimática, mostrou constituir-se em parâmetro importante para mensurar resposta clínica ao tratamento (HOLLAK *et al*, 1994). Possui boa estabilidade térmica e versatilidade em meios de coleta, sem diferença significativa em valores de atividade quando dosada em plasma ou soro (GUO *et al*, 1995; VERBEEK, LEFEBER e JONGEN, 2010).

A QT também está envolvida na fase inicial da resposta celular, associada ao aumento da expressão do gene CHIT1 (via RNAm) após tratamento com IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e LPS (MALAGARNERA *et al*, 2005). A atividade antifúngica de polimorfonucleares de murinos e humanos é aumentada pelo uso de IFN- $\gamma$ , GM-CSF ou IL-1 $\beta$ , mas não por TNF- $\alpha$  ou IL-8. A capacidade de eliminar *P. brasiliensis* observada em macrófagos humanos usando-se TNF- $\alpha$  é maior do que com IFN- $\gamma$  (KURITA *et al*, 2000; SOARES *et al*, 2001).

A QT como pertencente à classe enzimática das quitinases poderia ser considerada fator de proteção contra patógenos contendo quitina em sua estrutura. A sua influência no sistema imunológico depende de como a quitina se apresenta. Pode induzir resposta alérgica

de linfócitos Th2 (produção de asma brônquica, por exemplo, se inalados) quando está em fragmentos de tecidos de crustáceos; entretanto, na forma purificada e – principalmente – em pequenas partículas (1 a 10  $\mu\text{m}$ ), possui ação contrária, inibindo a resposta imunológica alérgica do tipo 2, pois estimula a produção de citocinas como IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  e, conseqüentemente, inibe a produção das citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 pelos linfócitos Th2 (LEE, 2009; MUZZARELLI, 2010; SHIBATA, METZGER e MYRVIK, 1997). A purificação da quitina proveniente de estruturas dos crustáceos remove proteínas, lipídios e outros contaminantes como o alérgeno tropomiosina, o que a torna pura, e pode inibir a resposta imunológica alérgica do tipo 2 e estimular a resposta inata em macrófagos. Os relatos de indução de resposta alérgica (asma brônquica) após pessoas serem expostas ao contato com crustáceos refere-se à quitina impura. Por isto não é razoável haver resposta de linfócitos Th2 à quitina pura (MUZZARELLI, 2010). A estimulação dos macrófagos pela quitina (ou seus derivados) é específica e complexa.

A quitina pode interagir com diferentes receptores de superfície celular como os receptores de manose, Toll-Like 2 (TLR-2) e de lectina tipo C dectina-1 (LEE, 2009). A ativação inicial de macrófagos via receptores TLR-4, na infecção por *P. brasiliensis*, não é suficiente para controlar a infecção paracoccidiodomicótica, parecendo que elevados níveis de IL-12 favorecem o aumento de leveduras viáveis. Observa-se que em modelos deficientes do receptor TLR-4 há maior resistência ao *P. brasiliensis* em relação a modelos com receptor normal; e que em casos de PCM grave associa-se com o aumento dos níveis de IL-12 e INF- $\gamma$  pulmonar, sugerindo que a produção destes mediadores pró-inflamatórios não promovem proteção imunológica. Observa-se também que a produção de óxido nítrico, pelos macrófagos, parece ser fator protetor contra infecção pelo *P. brasiliensis*, visto que em camundongos deficientes para produção de óxido nítrico a PCM é mais grave (CALICH *et al*, 2008).

Na infecção por *P. brasiliensis*, a primeira linha de defesa imunológica humana é a imunidade inata e – caso esta fase da resposta imunológica não seja suficiente para inibir a infecção primária – entra em cena a imunidade celular adaptativa. Nesta etapa, o fungo pode estimular duas vias (Th1 ou Th2) com citocinas de funções antagônicas: na via celular Th1, há liberação de IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , as quais irão estimular a inflamação e destruição direta do patógeno invasor, gerando doença subclínica; já na via Th2, há predomínio da produção de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-10, direcionando para a produção de imunoglobulinas específicas (IgE e IgG), gerando doença clínica (BENARD, 2008). A resistência à PCM está associada à resposta imunológica celular (com a ativação de células fagocitárias), enquanto que a suscetibilidade está associada à falha da resposta imunológica celular e predomínio da ativação das células B (imunidade humoral, com produção de imunoglobulinas específicas), sendo que a polarização para a via Th2 é frequentemente vista (BENARD, 2008; CALICH *et al*, 2008).

A citocina INF- $\gamma$  é vista como importante fator na resistência humana para a PCM, visto que macrófagos tratados com IFN- $\gamma$ , a 300U/mL por 3 dias, inibiram significativamente a replicação do *P. brasiliensis* intracelular – em condições normais, o fungo consegue se replicar no interior dos macrófagos (MOSCARDI-BACCHI, BRUMMER e STEVENS, 1990). As citocinas IL-4 e IL-10 não controlam a infecção, enquanto IL-12 e IFN- $\gamma$  são protetoras. Pode-se dizer que quanto mais reativa for a imunidade inata, mais grave será a PCM inicial, com IL-4 evitando infecção intensa em camundongos e IL-12 aumentando a lesão pulmonar (CALICH *et al*, 2008).

A QT pode constituir-se também em componente da gama de mecanismos de defesas da imunidade inata, papel essencial na dependência também de macrófagos.

A dosagem da QT no plasma em EDTA e heparina não apresenta diferenças significativas, mas os resultados usando plasma em heparina foram mais próximos aos

encontrados em soro (GUO *et al*, 1995). A QT apresenta boa estabilidade enzimática, já tendo sido dosada sua atividade em plasma armazenado sob temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  por oito anos, e soro sob  $-20^{\circ}\text{C}$  por 20 anos, com condizentes valores enzimáticos registrados à época da sua coleta. As amostras de plasma e soro foram também submetidas a 10 ciclos de descongelamento ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) sem interferir sobre sua atividade enzimática (GUO *et al*, 1995). A sua atividade em amostra seca (plasma em papel filtro), estocada sob temperatura ambiente (cerca de  $25^{\circ}\text{C}$ ) por três semanas, revelou perda de 15% da sua atividade. A diferença da atividade da QT entre os sexos não é significativa (GUO *et al*, 1995).

A QT parece, pois, estar envolvida em vários passos da atividade inflamatória e pode ser considerada como potencial evidência de atividade de fatores de proteção de metabolismo.

Todos esses fenômenos ajudam a considerar a possibilidade imensa de perspectivas em relação à QT em relação às infecções fúngicas, especialmente, na PCM, seja como reveladora de resposta inflamatória, modulação da resposta imunológica, identificação de variações clínicas e até termos de alternativa terapêutica. Constitui, portanto, uma nova via de investigação ampla na PCM, de fácil medição e que deve ser explorada adequadamente.

É necessário considerar ainda que no grupo controle deste estudo, uma amostra obteve atividade abaixo de  $10\text{ nmol/mL/h}$ , isto é, com  $6,2\text{ nmol/mL/h}$ . É sabido que o substrato 4-MU-quitotriosideo também pode ser hidrolisado pela lisozima (YANG, KURAMITSU e HAMAGUCHI, 1981), porém, de forma diferente como ocorre com a QT (HOLLAK *et al*, 1994). No trabalho de Hollak *et al* (1994) foi observado, em dois pacientes com doença de Gaucher, atividade enzimática da QT quase ausente ( $2$  e  $3\text{ nmol/mL/h}$ ), porém houve imunoprecipitação com anticorpos anti-lisozima, demonstrando que esta atividade residual (aparentemente da QT) foi devido inteiramente à ação da lisozima. O mesmo ocorreu em outros três membros do grupo controle ( $4$ ,  $4$  e  $6\text{ nmol/mL/h}$ ), reforçando a ideia acima (HOLLAK *et al*, 1994). Há cerca de 6% de indivíduos deficientes da QT, na população em



geral (BOOT *et al*, 1998). A prevalência de homozigose entre pacientes que sobreviveram a sepse por *Candida* foi similar à encontrada na população normal. Considera-se que pessoas homozigotas para uma mutação podem ser mais vulneráveis às infecções fúngicas sistêmicas (MASOUD *et al*, 2002). É sugerido, entretanto, que a deficiência da atividade da QT possa ser compensada por outra enzima humana hidrolítica, como a lisozima (VANDEVENNE *et al*, 2011). A atividade da QT não é afetada apenas por genes homozigotos deficientes, mas alguns polimorfismos alteram o gene CHIT1 (MIM 600031) que codifica esta enzima, reduzindo a sua atividade enzimática (BUSSINK *et al*, 2009; LEE *et al*, 2007). Isso talvez explique a baixa atividade de uma amostra do grupo PCM, de apenas 34,2 nmol/mL/h.

## 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O potencial como biomarcador da QT para a PCM pode ser considerado – talvez num escore com outros exames – assim como já é utilizado na doença de Gaucher e sob avaliação na sarcoidose (BARGAGLI, MAGGIORELLI e ROTTOLI, 2008). Existem evidências adicionais de que a QT seja parte importante de algum mecanismo envolvido no processo inflamatório humano. Pode ser sinalizadora do processo inflamatório e/ou infeccioso, assim como ocorre com a Proteína C Reativa, componente da imunidade inata (WINN JR *et al*, 2006).

Outras áreas de desenvolvimento de conhecimento podem estar sendo abertas como a relação da QT com a exposição da parede fúngica e a facilitação de reconhecimento laboratorial, portanto definição mais específica de exames usando técnicas complementares; entendimento de ação fisiopatológica em PCM; uso como terapêutica adjunta; marcador de atividade da infecção.

É necessário considerar que o intercâmbio que ocorre no conhecimento é fator estimulador em relação ao aproveitamento de áreas de desenvolvimento em uma área aparentemente não relacionada com outra. Observa-se aqui a possibilidade de aplicar um conhecimento já estabelecido em genética e que se expressa em várias outras áreas do conhecimento em medicina e que inclui a infectologia, a terapêutica.

## **10. CONCLUSÕES**

A atividade da QT constitui um possível parâmetro de avaliação laboratorial para o diagnóstico da PCM, pois é técnica relativamente simples, de baixo custo operacional e não invasiva, além da enzima ser bem estável. São necessários mais estudos para determinar sua resposta nas fases da doença (aguda, crônica e recuperação) antes e após o tratamento e a influência de outras entidades nosológicas associadas como, por exemplo, tuberculose, outros fungos, neoplasias, doenças degenerativas, obesidade e sobrepeso, aterosclerose.

## **11. LIMITAÇÕES DO ESTUDO**

Apesar de se tratar de estudo observacional transversal, analisando apenas a atividade da QT no momento de doença (PCM) crônica, não foi possível “nivelar” as amostras dos pacientes com PCM em suas fases e formas da doença. Alguns pacientes apresentavam PCM por mais tempo que outros, também houve diferentes apresentações da doença e não se sabe se isto influencia na atividade da QT.

O estudo não se estendeu a menores de 18 anos de idade (principalmente crianças), o que reduz o espectro de conhecimento do comportamento da QT.

Outro aspecto importante não realizado foi a genotipagem para as amostras nas quais a atividade da QT foi considerada muito baixa para avaliar a possibilidade de deficiência desta enzima. Porém, o estudo molecular não foi um objetivo no nosso estudo.

## 12. PERSPECTIVAS

A relação de aumento significativo entre a atividade da QT e presença da PCM foi observado em pacientes com doença crônica e antes da terapêutica específica, o próximo passo será estudar o comportamento desta enzima após algum tempo de tratamento medicamentoso, para saber se há queda da atividade enzimática. Outra iniciativa importante será dosar a atividade da QT em paciente com PCM aguda, antes e após o tratamento, e acompanhá-lo para analisar a dinâmica enzimática. Como a QT parece ser do ramo da imunidade inata, pode ser que sua atividade esteja mais pronunciada na fase aguda da doença.

Para esclarecer o papel da QT na imunidade humana, será preciso comparar seu efeito com outras variáveis biomarcadoras de inflamação, como dosagem da Proteína C Reativa e contagem (total e diferencial) dos leucócitos, assim como as principais interleucinas do ramo inato e celular da imunidade.

A atividade da QT também precisa ser relacionada com a gravidade da PCM – inclusive realizar a genotipagem da QT para os casos de atividade enzimática muito baixa.

A dosagem da QT juntamente com outras quitinases como a AMCase (quitinase mamífera ácida) e as CLP (*chitinase-like proteins*, YKL-39 e YKL-40, por exemplo) pode ajudar a apresentar melhor dimensão das quitinases nos processos inflamatórios e infecciosos, como ocorre na PCM.

### 13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA F. **Micoses pulmonares**. Resen Clin Client, 17:457-462, 1948.

ANGULO-ORTEGA A. **Calcifications in paracoccidioidomycosis: are they the morphological manifestation of subclinical infections?** In: Pan American Symposium on Paracoccidioidomycosis, 1. Medellin, 1971. P.A.H.O., Scient. Publ, 254:129-133, 1972.

BARGAGLI, E; MARGGIORELLI, C; ROTTOLI, P. **Human chitotriosidase: a pontencial new marker of sarcoidosis severity**. Respiration 76(2):234-238, 2008.

BARGAGLI, E; MARGOLICCI, M; NIKIFORAKIS, N; LUDDI, A; PERRONE, A; GROSSO, S; ROTTOLI, P. **Chitotriosidase activity in the serum of patients with sarcoidosis and pulmonary tuberculosis**. Respiration 74(5):548-552, 2007.

BARONE, R; Di GREGORIO, F; ROMEO, MA; SCHILIRÒ, G; PAVONE, L. **Plasma chitotriosidase acitivity in patients with  $\beta$ -thalassemia**. Blood Cells Mol. Dis 25:1-8, 1999.

BARONE, R; SIMPORÉ, J; MALAGUARNERA, L; PIGNATELLI, S; MUSUMECCI, S. **Plasma chitotriosidase activity in acute *Plasmodium falciparum* malaria**. Clin. Chim. Acta 331(1-2):79-85, 2003.

BARONE, Rita; SOTGIU, Stefano; MUSUMECCI, Salvatore. **Plasma Chitotriosidase in Health and Pathology**. Clin. Lab. 53:XXX-XXX, 2007.

BENARD, Gil. **An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis**. Mycopathologia 165:209-221, 2008.

BOOT, Rolf G; ACHTERBERG, Tanja AE; VAN AKEN, Benien E; RENKEMA, G Herma; JACOBS, Michael JHM; AERTS, Johannes MFG; De VRIES, Carlie JM. **Strong induction of members of the chitinase family of proteins in atherosclerosis: chitotriosidase and human cartilage gp-39 expressed in lesion macrophages**. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 19:687-694, 1999.

BOOT, Rolf G; RENKEMA, G Herma; STRIJLAND, Anneke; VAN ZONNEVELD, Anton Jan; AERTS, Johannes MFG. **Cloning of a cDNA encoding chitotriosidase, a human**

**chitinase produced by macrophages.** The Journal of Biological Chemistry Vol. 270, No. 44(3):26252-26256, 1995.

BOOT, Rolf G; RENKEMA, G Herna; VERHOEK, Marri; STRIJLAND, Anneke; BLIEK, Jet; MEULEMEESTER, Maurice AMO; MANNENS, Marcel MAM; AERTS, Johannes MFG. **The human chitotriosidase gene: nature of inherited enzyme deficiency.** The Journal of Biological Chemistry 273:25680-25685, 1998.

BOPP C. **Algumas considerações sobre a micose de Lutz no Rio Grande do Sul.** An Fac Med P Alegre: 97-106, 1955.

BRADFORD M. **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding.** *Anal. Biochem.* 72:248-254, 1976.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária, DATASUS. Disponível em <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/sim/obt10descr.htm>

BRUMMER, Elmer; CASTANEDA, Elizabeth; RESTREPO, Angela. **Paracoccidioidomycosis: an Update.** *Clinical Microbiology Reviews* 6(2):89-117, 1993.

BUITRAGO, MJ; BERNAL-MARTINES, L; CASTELLI, MV; et al. **Histoplasmosis and paracoccidioidomycosis in a non-endemic area: a review and diagnosis.** *J Travel Med* 18:26-33, 2011.

BURTON, OT; ZACCONE, P. **The potencial role of chitin in allergic reactions.** *Trends Immunol.* 28:419-422, 2007.

BUSSINK, AP; VERHOEK, M; VREEDE, J; GHUJARALLI-VAN DER VLUGT, K; DONKER-KOOPMAN, WE; SPRENGER, RR; HOLLAK, CE; AERTS, JM; BOOT, RG. **Common G102S polymorphism in chitotriosidase differentially affects activity towards 4-methylumbelliferyl substrates.** *FEBS J.* 276(19):5678-5688, 2009.

CAKIR, Gulhan; SEYFETTIN, Gumus; UCAR, Ergun; KAYA, Hatice; TOZKOPARAN, Ergun; AKGUL, Emin Ozgur; KARAMAN, Bulent; DENIZ, Omer; KURT, Ismail; OZKAN, Metin; BILGIC, Hayati. **Serum chitotriosidase activity in pulmonary tuberculosis: reponse to treatment and correlations with clinical parameters.** *Ann. Lab. Med.* 32(3):184-189, 2012.

CALICH VLG & KASHINHO SS. **Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection.** Braz. J Med. Biol. Res., 31:615-623, 1998

CALICH, Vera Lúcia Garcia; COSTA, Tânia Alves da; FELONATO, Maíra; ARRUDA, Celina; BERNARDINO, Simone; LOURES, Flávio Vieira; RIBEIRO, Laura Raquel Rios; VALENTE-FERREIRA, Rita de Cássia; PINA, Adriana. **Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection.** Mycopathologia 165:223-236, 2008.

CANUDAS, J; CENARRO, A; CIVEIRA, F; GARCÍA-OTÍN, AL; ARÍSTEGUI, R; DÍAZ, C; MASRAMON, X; SOL, JM; HERNÁNDEZ, G; POCOVI, M. **Chitotriosidase genotype and serum activity in subjects with combined hyperlipidemia: effect of the lipid-lowering agents, atorvastatin and bezafibrate.** Metabolism 50: 447-450, 2001.

COMABELLA, M; DOMÍNGUEZ, C; RIO, J; MARTÍN-GALLÁN, P; VILCHES, A; VILARRASA, A; ESPEJO, C; MONTALBAN; X. **Plasma chitotriosidase activity in multiple sclerosis.** Clinical Immunology 131:216-222, 2009.

COUTINHO ZF, SILVA D, LAZÉRA M, PETRI V, OLIVEIRA RM, SABROZA PC, WANKE B. **Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995).** Cadernos de Saúde Pública 18: 1441-1454, 2002.

DEL NEGRO G – **Outras lesões. Formas de ocorrência raras e associações com outros processos.** In: Del Negro G, Lacaz CS, Fiorillo AM. Paracoccidioidomicose Blastomicose Sul Americana. São Paulo, Sarvier, 1982. Cap 23, 229-243.

DEL NEGRO GMB, PEREIRA CN, ANDRADE HF, PALACIOS SA, VIDAL MMS, CHARBEL CE e BENARD G. **Evaluation of tests for antibody response in the follow-up of patients with acute and cronic forms of paracoccidioidomycosis.** J.I Med. Microbiol., 49:37-46, 2000.

Di ROSA, Michelino; DELL'OMBRA, Nicola; ZAMBITO, Anna Maria; MALAGUARNERA, Mariano; NICOLETTI, Ferdinando; MALAGUARNERA, Lucia. **Chitotriosidase and inflammatory mediator levels in Alzheimer's disease and cerebrovascular dementia.** European Journal of Neuroscience 23(10):2648-2656, 2006.

Di ROSA, Michelino; MUSUMECI, Maria; SCUTO, Anna; MUSUMECI, Salvatore; MALAGUARNERA, Lucia. **Effect of interferon- $\gamma$ , interleukin-10, lipopolysaccharide and tumor necrosis factor- $\alpha$  on chitotriosidase synthesis in human macrophages.** Clinical Chemistry and Laboratorie Medicine 43:499-502, 2005.



DINIZ SN, CISALPINO PS, FREIRE ATF, SILVA-TEIXEIRA DN, CONTIGLI C, RODRIGUES V & GOES AM. **In vitro granuloma formation, NO production and cytokines profile from human mononuclear cells induced by fractionated antigens of *Paracoccidioides brasiliensis***. Hum. Immunol., 62:799-808, 2001.

FAVA-NETTO C; CASTRO RM; GONÇALVES AP; DILLON NL. **Ocorrência familiar de blastomicose sul-americana: a propósito de 14 casos**. Rev Inst Med trop São Paulo, 7(6):332-336, 1965.

FRANCO MF, MONTENEGRO MR, MENDES RP, MARQUES SA, DILLON NL, MOTA NGS. **Paracoccidioidomycosis: a recent proposed classification of clinical forms**. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 20:129, 1987.

FRANCO MVG, GOES AM & KOURY MC. **Model of in vitro granulomatous hypersensitivity in human paracoccidioidomycosis**. Mycopathologia, 137:129-136, 1997.

GOLDANI LZ, SUGAR AM. **Paracoccidioidomycosis and AIDS: na overview**. Clinical Infectious Diseases, 21:1275-1281, 1995.

GONTIJO CCV, PRADO RS, NEIVA CLS, FREITAS RMC, PRADO FLS, PEREIRA ARA, PAULA IB, PEDROSO ERP. **A paracoccidioidomicose em pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da UFMG (HC-UFMG)**. Rev Med Minas Gerais, 2003, 13 (4):231-3.

GONZALEZ A, DE GREGORI W, VELEZ D, RESTREPO A & CANO LE. **Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages**. Infect. and Immun., 68:2546-2552, 2000.

GROSSO, S; MARGOLICCI, MA; BARGAGLI, E; BUCCOLIERO, QR; PERRONE, A; GALIMBERTI, D; MORGESE, G; BALESTRI, P; ROTTOLI, P. **Serum levels of chitotriosidase as a marker of disease activity and clinical storage in sarcoidosis**. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 64(1):57-62, 2004.

GUAN, Shou-Ping; MOK, Yu-Keung; KOO, Khai-Nee; CHU, Kai-Ling; WONG, WS Fred. **Chitinases: Biomarkers for Human Diseases**. Protein & Peptide Letters 16:490-498, 2009.

GUO, Yufeng; HE, Wang; BOER, AM; WEVERS, RA; BRUIJN, AM; GROENER, JEM; HOLLAK, CEM; AERTS, JMFG; GALJAARD, H; VAN DIGGELEN, OP. **Elevated plasma chitotriosidase activity in various lysosomal storage disorders**. J. Inher. Dis. 18:717-722, 1995.

HABERFELD W. **Nova contribuição no estudo da blastomicose interna.** Rev Med, 3(13-14), 1919.

HENRISSAT, Bernard. **A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities.** Biochem. J. 289:309-316, 1991.

HOLLAK, Carla EM; VAN WEELY, Sonja; VAN OERS Marinu HJ; AERTS, Johannes MFG. **Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease.** J Clin Invest 93:1288-1292, 1994.

HU, B; TRINH, K; FIGUEIRA, WF; PRICE, PA. **Isolation and sequence of a novel human chondrocyte protein related to mammalian members of the chitinase protein family.** J. Biol. Chem. 271: 19415-19420, 1996.

KAMEI, K; SANO, A; KIKUCHI K; et al. **The trend of imported mycosis in Japan.** J Infect Chemother 9:16-20, 2003.

KURTIA, N; OARADA, M; MIYAJI, M; ITO, E. **Effect of cytokines on antifungal activity of human polymorphonuclear leukocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*.** Med. Mycol. 38(2):177-182, 2000.

LABADARIDIS I.; DIMITRIOU, E; THEODORAKIS, M; KAFALIDIS, G; VELEGRAKI, A; MICHELAKAKIS, H. **Chitotriosidase in neonates with fungal and bacterial Infections.** Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 90:531-532, 2005.

LABADARIDIS, J; DIMITRIOU, E; COSTALOS, C; AERTS, J; VAN WEELY, S; DONKER-KOOPMAN, WE; MICHELAKAKIS, H. **Serial chitotriosidase activity estimations in neonatal systemic candidiasis.** Acta Paediatr. 87:605-606, 1998.

LACAZ CS. **Evolução dos conhecimentos sobre a paracoccidioidomicose. Um pouco de sua história.** In: Del Negro G, Lacaz CS, Fiorillo AM. Paracoccidioidomicose Blastomicose Sul Americana. São Paulo, Sarvier, 1982a. Cap 1, 1-9.

LACAZ CS. **Paracoccidioidis brasiliensis. Morfologia, ciclo evolutivo, manutenção em vida saprofítica, biologia, virulência, posição sistemática.** In: Del Negro G, Lacaz CS, Fiorillo A.M., Paracoccidioidomicose Blastomicose Sul Americana. São Paulo, Sarvier, 1982b. Cap 2, 11-21.

LACAZ, Carlos S. **Historical evolution of the knowledge on paracoccidioidomycosis and its etiologic agent, Paracoccidioides brasiliensis.** In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, editors. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton: CRC Press; 1994. p. 1-11.

LACAZ CS, PASSOS FILHO MCR, FAVA NETTO C, MACARRON B. **Contribuição para o estudo da « blastomicose-infecção ». Inquérito com a paracoccidina. Estudo sorológico e clínico-radiológico dos paracoccidino-positivos.** Rev Inst Med trop São Paulo, 1(4):245-259, 1959.

LACAZ CS. **Paracoccidioidomicose.** In: Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. Micologia Médica, 8ª ed., São Paulo, Sarvier, 1991, Cap 13, 248-297.

LEE, Chun Geun. **Chitin, chitinase and chitinase-like proteins in allergic inflammation and tissue remodeling.** Yonsei Med. J. 50(1):22-30, 2009.

LEE, Chun Geun; SILVA, Carla da; CRUZ, Charles S. Dela; AHANGARI, Farida; MA, Bing; KANG, Min-Jong; HE, Chuan-Hua; TAKYAR, Seyedtaghi; ELIAS, Jack A. **Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling and injury.** Annu. Rev. Physiol. 73:25.1-25.23, 2010.

LEE, P; WAALLEN, J; CRAIN, K; SMARGON, A; BEUTLER, E. **Human chitotriosidase polymorphisms G354R and A442V associated with reduced enzyme activity.** Blood Cells Mol. Dis. 39: 353-360, 2007.

LIMA, Francisco Xavier Pinto. **Contribuição ao estudo clínico e terapêutico da blastomicose sul-americana visceral.** São Paulo, 1952. (Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).

LUTZ A. **Uma mycose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas.** Brasil Médico, 22 (13,15):121-124; 141-144, 1908.

LYER, Anand; VAN EIJK, Marco; SILVA, Eliane; HATTA, Mochammad; FABER, William; AERTS, Johannes MFG; DAS, Pranab Kumar. **Increased chitotriosidase activity in serum of leprosy patients: association with bacillary leprosy.** Clinical Immunology 131:501-509, 2009.

MALAGUARNERA, Lucia; Di ROSA, Michelino; ZAMBITO, Anna Maria; DELL'OMBRI, Nicola; NICOLETTI, Ferdinando; MALAGUARNERA, Mariano. **Chitotriosidase gene expression in Kupffer cells from patients with non-alcoholic fatty liver disease.** Gut 55:1313-1320, 2006.

MALAGUARNERA, Lucia; MUSUMECI, Maria; Di ROSA, Michelino; SCUTO, Anna; MUSUMECI, Salvatore. **Interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide promote chitotriosidase gene expression in human macrophages.** J. Clin. Lab. Anal. 19:128-132, 2005.

MARQUES, Silvio Alencar. **Paracoccidioidomicose: Atualização Epidemiológica, Clínica e Terapêutica.** An Bras Dermatol 78(2):135-150, 2003.

MARQUES, Sílvio Alencar. **Paracoccidioidomycosis.** Clinics in Dermatology 30:610-615, 2012.

MASOUD, M; RUDENSKY, B; ELSTEIN, D; ZIMRAN, A. **Chitotriosidase Deficiency in Survivors of Candida Sepsis.** Blood Cells, Molecules and Diseases 29(1) July/Aug: 116–118, 2002.

MOSCARDI-BACCHI, M; BRUMMER, E; STEVENS, DA. **Enhancement of Paracoccidioides brasiliensis multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated monocytes or macrophages.** Abstr. F-100, p. 425. Abstr. 90<sup>th</sup> Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. 1990. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1990.

MUZZARELLI, Riccardo AA. **Chitins and chitosans as immunoadjuvants and non-allergenic drug carriers.** Marine Drugs 8:292-312, 2010.

PADILHA-GONÇALVES, A. **Paracoccidioidomicose: quadro clínico como expressão da imunopatologia.** An Bras Dermatol 71:437-440, 1996.

PALMEIRO, Mariana; CHERUBINI, Karen; YURGEL, Liliane S. **Paracoccidioidomicose – Revisão da Literatura.** Scientia Medica 15(4):274-278, 2005.

PEREIRA M, VIANA G. **A propósito de um caso de blastomycoses (Pyohemia blastomycotica)** Arch Bras Med, 1(1), 1911.

PRADO, Marli; SILVA, Marcelo Barbosa da; LAURENTI, Ruy; TRAVASSOS, Luiz R; TABORDA, Carlos P. **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 104(3):513-521, 2009.

RENKEMA, G. Herma; BOOT, Rolf G; AU, F. L; DONKER-KOOPMAN, Wilma E; STRIJLAND, A; MUIJSERS, Anton O; HREBICEK, M; AERTS, Johannes M. **Chitotriosidase, a chitinase, and the 39-kDa human cartilage glycoprotein, a chitin-**

**binding lectin, are homologues of family 18 glycosyl hydrolases secreted by human macrophages.** Eur. J. Biochem. 251: 504–509, 1998.

RENKEMA, G. Herna; BOOT, Rolf G; STRIJLAND, Anneke; DONKER-KOOPMAN, Wilma E; VAN DEN BERG, Marlene; MUIJSERS, Anton O; AERTS, Johannes MFG. **Synthesis, sorting and processing into distinct isoforms of human macrophage chitotriosidase.** European Journal of Biochemistry 244(2):279-285, 1997.

RESTREPO, Angela. **The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved.** J. Med. Vet. Mycol. 23:323-334, 1985.

RESTREPO A, ROBLEDO M, GIRALDO R, HERNANDEZ H, SIERRA F, GUTIERREZ F, LONDOÑO F, LOPEZ R, CALLE G. **The gamut of paracoccidioidomycosis.** AJM, 61:33-42, 1976.

SHIBATA, Y; METZGER, WJ; MYRVIK, QN. **Chitin particle-induced cell-mediated immunity is inhibited by soluble mannan: mannose receptor-mediated phagocytosis initiates IL-12 production.** J. Immunol. 159:2462-2467, 1997.

SHIKANAI-YASUDA, Maria Aparecida; FILHO, Flávio de Queiroz Telles; MENDES, Rinaldo Pôncio; COLOMBO, Arnaldo Lopes; MORETTI, Maria Luiza; Grupo de Consultores do Consenso em Paracoccidioidomycose. **Consenso em Paracoccidioidomycose.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 39(3):297-310, 2006.

SOARES, AM; CALVI, SA; 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 102(4):480-485, 2001.

SONMEZ, Alper; HAYMANA, Cem; TAPAN, Serkan; SAFER, Umut; CELEBI, Gurkan; OZTURK, Ozlem; GENÇ, Halil; DOGRU, Teoman; TASCI, Ilker; ERDEM, Gokhan; TASKIPINAR, Adbullah; AYDOGDU, Aydogan; YILMAZ, Mahmut I; KURT, Ismail; KUTLU, Mustafa. **Chitotriosidase activity predicts endothelial dysfunction in type-2 diabetes mellitus.** Endocr. 37:455-459, 2010.

SOTGIU, S; BARONE, R; ZANDA, B; ARRU, G; FOIS, ML; ARRU, A; ROSATI, G; MARCHETTI, B; MUSUMECI, S. **Chitotriosidase in patients with acute ischemic stroke.** Eur. Neurol. 54(3):149-153, 2005.

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

SUNI MA, PICKER LJ & MAINO VC. **Detection of antigen-specific T cell cytokine expression in whole blood by flow cytometry.** *Journal of Immunol. Methodol.*, 212:89-98, 1998.

TABORDA CP, JULIANO MA, PUCCIA R, FRANCO M & 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.*, 66:786-793, 1998.

TORRES KCL. **Estudo dos eventos iniciais correlacionados com o desenvolvimento das células T CD4+ humanas no subtipo Th1/Th2.** Dissertação de mestrado em Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG, 2001.

VAN EIJK, Marco; VAN ROOMEN, Cindy PAA; RENKEMA, G Herma; BUSSINK, Anton P; ANDREWS, Laura; BLOMMAART, Edward FC; SUGAR, Alan; VERHOEVEN, Arthur J; BOOT, Rolf G; AERTS, Johannes MFG. **Characterization of human phagocyte-derived chitotriosidase, a component of innate immunity.** *International Immunology*, Vol. 17, No. 11: 1505–1512, 2005.

VANDEVENNE, Marylène; CAMPISI, Vicent; FREICHEL, Astrid; GILLARD, Carole; GASPARD, Gilles; FRÈRE, Jean-Marie; GALLEN, Moreno; FILÉE, Patrice. **Comparative functional analysis of the human macrophage chitotriosidase.** *Protein Science* 20(8):1451-1463, 2011.

VERBEEK, MM; LEFEBER, DJ; JONGEN, PJH. **Chitotriosidase activity in controls and multiple sclerosis.** *Acta Neurol Scand* (5):356-357, 2010. Epub.

VERBEEK, MM; NOTTING, EA; FAAS, B; CLAESSENS-LINSKENS, R; JONGEN, PJ. **Increased cerebrospinal fluid chitotriosidase index in patients with multiple sclerosis.** *Acta Neurol. Scand* 121(5):309-314, 2010.

WANKE, Bodo *et al.* **Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection.** *In:* Franco CS, Retrepo MA, Del Negro G. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, 1994, 109-120.

WANKE, Bodo; AIDÊ, Miguel Abidon. **Chapter 6 - Paracoccidioidomycosis.** *J Bras Pneumol* 35:1245-1249, 2009.

WINN JR, Washington C [et al]. *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology* 6<sup>th</sup> ed. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 2006. p. 7-8.

YANG, Youngsok; KURAMITSU, Seiki; HAMAGUCHI, Kozo. **Hydrolysis of 4-Methylumbelliferyl *N*-Acetyl-Chitooligosaccharides catalyzed by human lysozyme.** J. Biochem. 89(5):1357-1366, 1981.

## **14. ANEXOS**

Anexo A  
Parecer de aprovação pelo COEP/UFMG



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Atividade da Quitotriosidase como Marcador Bioquímico para a Paracoccidiodomicose

**Pesquisador:** Enio Roberto Pietra Pedroso

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 03853412.4.0000.5149

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina da UFMG

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 181.805

**Data da Relatoria:** 08/01/2013

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de um estudo observacional, prospectivo, caso-controle, com uma casuística de 15 sujeitos em cada grupo, os quais serão submetidos à avaliação em seus soros da atividade da enzima quitotriosidase. No documento em word anexado após a diligência, os pesquisadores afirmam que não irão incluir pacientes menores de 18 anos de idade. O grupo caso já tem suas amostras colhidas por ocasião de suas assistências para o diagnóstico e são pacientes com paracoccidiodomicose (PCM) não tratada e o grupo controle será submetido à coleta. No projeto original, não foi descrita a forma de recrutamento do grupo controle. Nos pareceres em anexo é dito que os 15 sujeitos do grupo controle serão funcionários e outros envolvidos na pesquisa. E no documento anexado após diligência, afirma-se que este convite aos voluntários será feito pessoalmente e como não foi acrescentado outra informação, então mantém-se o recrutamento de funcionários. Há cronograma com data de início na nova versão do projeto em 01/12/2012 para coleta de amostras; e nesta nova versão do projeto não haverá retenção de amostras para criação de soroteca para futuras análises; a análise estatística foi descrita e o custo do projeto é de cento e vinte reais, com financiamento próprio. O projeto é para dissertação de mestrado.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

- Determinar a atividade da enzima quitotriosidase em soro de pacientes diagnosticados com paracoccidiodomicose não tratados.

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad Sl 2005

**Bairro:** Unidade Administrativa II

**CEP:** 31.270-901

**UF:** MG

**Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** 3134-0945

**Fax:** 3134-0945

**E-mail:** coep@prpq.ufmg.br, coep@reitoria.ufmg.br

**Objetivos Secundários:**

- Relacionar a atividade da quitotriosidase em soro de pacientes com PCM diagnosticada, antes do tratamento, com a atividade da infecção fúngica; - Dosar a atividade da quitotriosidase em amostras (soro) disponíveis de pacientes com diagnóstico confirmado de PCM, antes do tratamento, para comparação (em estudos posteriores) com a sua atividade em outro momento da infecção fúngica; - Dosar a atividade da quitotriosidase em pacientes sadios de nossa comunidade (grupo controle); - Determinar se a elevação da atividade enzimática é clinicamente significativa para fins diagnósticos da PCM.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Segundo os pesquisadores "O projeto em questão não apresenta riscos para pacientes, uma vez que as amostras a serem estudadas já foram coletadas e encontram-se disponíveis em soroteca. Para os doadores voluntários, nenhum procedimento além da coleta de sangue será realizada". Na nova versão do projeto, é relatado o risco da punção venosa.

O benefício é a contribuição científica e clínica para diagnóstico e tratamento da PCM e outras infecções fúngicas sistêmicas.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A atividade da enzima quitotriosidase apresenta níveis elevados no quadro de candidíase sistêmica em neonatos, explicável pela presença de quitina na parede fúngica. Neste presente projeto, há a hipótese de uso da dosagem da atividade da quitotriosidase como auxiliar no diagnóstico laboratorial de paracoccidiodomicose (PCM). Conforme os resultados, sua dosagem poderá ser útil no diagnóstico laboratorial da PCM e no monitoramento do tratamento.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Além do projeto de pesquisa em sua nova versão, foram anexados a autorização do Laboratório de Imunologia celular e molecular do ICB para uso das amostras de sangue (datada de 07/02/2011), anuência da Unidade Funcional de Patologia e Medicina Laboratorial (onde serão feitos os exames com os insumos fornecidos pelos pesquisadores, sem custo para a unidade), parecer consubstanciado do Programa de Pósgraduação em Medicina Tropical com sugestões, mas aprovado em 09/02/2012, aprovação pela câmara departamental de Clínica Médica em abril de 2012, folha de rosto preenchida e assinada devidamente (em maio de 2012) e declaração de registro no DEPE em julho de 2012. Há o TCLE para voluntário, em linguagem adequada e, na segunda versão, com os esclarecimentos sobre os riscos da punção venosa. Foi retirado o local para assinatura de testemunha no TCLE. Há um questionário que será aplicado aos sujeitos do grupo controle. Após a segunda diligência, os pesquisadores afirmam que serão utilizadas "amostras armazenadas do projeto de pesquisa da doutoranda Lillian da Silva Santos, do grupo caso, aprovado pelo Parecer ETIC\_0089.0.410.4100-09" em 03 de março de 2010.

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901

UF: MG Município: BELO HORIZONTE

Telefone: 3134-0945

Fax: 3134-0945

E-mail: coep@prpq.ufmg.br; coep@reitoria.ufmg.br

**Recomendações:**

-

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Foram atendidas as recomendações/esclarecimentos das diligências anteriores. O projeto está adequado.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Aprovado conforme parecer.

BELO HORIZONTE, 28 de Dezembro de 2012

---

**Assinador por:**

**Maria Teresa Marques Amaral  
(Coordenador)**

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad S/J 2005

**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** 3134-0945 **Fax:** 3134-0945

**E-mail:** coep@prpq.ufmg.br; coep@reitoria.ufmg.br