

Ana Cláudia Lyon de Moura

**ESTUDO CLÍNICO E IMUNOLÓGICO DE CONTROLE DE
CURA DE PARACOCCIDIOIDOMICOSE CRÔNICA**

Belo Horizonte

Universidade Federal de Minas Gerais

2008

Ana Cláudia Lyon de Moura

**ESTUDO CLÍNICO E IMUNOLÓGICO DE CONTROLE DE
CURA DE PARACOCCIDIOIDOMICOSE CRÔNICA**

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

Orientador: Prof. Dr. Enio Roberto Pietra Pedroso

Co-orientador: Prof. Dr. Antônio Lúcio Teixeira Jr.

Belo Horizonte

Universidade Federal de Minas Gerais

2008

Moura, Ana Cláudia Lyon de.
M929e Estudo clínico e imunológico de controle de cura de
paracoccidiodomicose crônica [manuscrito]. / Ana Cláudia Lyon de
Moura. - - Belo Horizonte: 2008.
186f.: il.
Orientador: Enio Roberto Pietra Pedroso.
Co-orientador: Antonio Lúcio Teixeira Jr.
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Medicina.

1. Paracoccidiodomicose. 2. Paracoccidiodomicose/imunologia.
3. Paracoccidiodomicose/terapia. 4. Paracoccidídeos. 5.
Quimiocinas. 6. Estudos Prospectivos. 7. Dissertações acadêmicas.
I. Pedroso, Enio Roberto Pietra. II. Antonio Lúcio Teixeira Jr. III.
Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV.
Título

NLM : WC 460

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR

Ronaldo Tadêu Pena

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Jaime Arturo Ramirez

FACULDADE DE MEDICINA

DIRETOR

Prof. Francisco José Penna

COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Carlos Faria Santos Amaral

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

Prof. Dirceu Bartolomeu Greco

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:

INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha (Coordenador)

Prof. Antônio Lúcio Teixeira Júnior (Sub-coordenador)

Prof. Antônio Luiz de Pinho Ribeiro

Prof. Carlos Mauricio de Figueiredo Antunes

Prof. José Roberto Lambertucci

Fátima Lúcia Guedes Silva (Representante Discente)

FOLHA DE APROVAÇÃO

ATA

A Angelina e Marcos, meus pais queridos,
e à tia Sandra, minha madrinha querida

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me acolher nos momentos de dificuldade, por me mostrar o caminho quando todos os obstáculos pareciam intransponíveis e por me dar tantas oportunidades de ser uma pessoa melhor a cada dia.

Ao professor Manoel Otávio, coordenador da Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, que admiro muito por sua dedicação à Pós-Graduação, pela oportunidade e por todos os ensinamentos na disciplina Prática Docente, os quais foram muito importantes na minha formação.

Ao professor Ênio, médico exemplar que eu admiro imensuravelmente pela sensibilidade e conhecimento, pelas orientações neste trabalho e, especialmente, pelos ensinamentos de Medicina e vida, que me acompanharão para sempre.

Ao professor Antônio Lúcio, que admiro muito pela capacidade de se “desdobrar” magistralmente entre a medicina, a docência e a pesquisa (entre outros), por ter acreditado no meu trabalho e por toda a ajuda na execução do mesmo. Não tenho palavras para expressar minha gratidão.

Ao professor Mauro, cuja inteligência e “espírito científico” eu admiro muito, desde quando ingressei no Mestrado, pela oportunidade e pelas sugestões, sempre oportunas.

Aos professores Antônio Luiz Pinho Ribeiro e Carlos Maurício de Figueiredo Antunes, que compuseram a banca examinadora da seleção quando eu me candidatei ao Doutorado, em dezembro de 2004, agradeço imensamente por terem acreditado no meu potencial e terem me concedido a oportunidade de desenvolver este trabalho.

Aos professores Alfredo Miranda de Góes, José Carlos Serufo e aos alunos da disciplina Seminários em Doenças Infecciosas e Parasitárias – Alexandre, Bráulio e Carolina – pelas sugestões e observações feitas no Exame de Qualificação, as quais contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

À tia Sandra, de quem eu tenho o maior orgulho de ser sobrinha e afilhada e cujo exemplo eu procurarei seguir sempre e onde quer que eu esteja, pelo grande incentivo e por tudo o que me ensinou e continua ensinando todos os dias, na Medicina e na vida. Em especial, por uma frase da qual me lembro sempre que a sobrecarga de tarefas quase me faz desistir: “Ana, o dia tem 24 horas!”

A meus pais, Marcos e Angelina, e a meus irmãos, Silvia e Luís, as pessoas que mais amo, por todo o carinho, pelo grande incentivo e por terem acreditado em mim, em tudo o que fiz, a minha vida toda.

À Joana, pela amizade, pela cumplicidade e por todas as lições de serenidade e sabedoria, que tanto me ajudaram em momentos importantes (em que foi preciso controlar o “ímpeto da juventude”) e das quais jamais esquecerei.

Ao Bruno e ao Alessandro, meus amigos de coração, que mesmo geograficamente distantes, estão sempre do meu lado.

Aos meus amigos Daniel e Rogério, que acompanham minha trajetória de pós-graduanda desde o Mestrado, por transformarem minha euforia, ansiedade e desânimo, que periodicamente permearam todos esses anos de trabalho, em ótimos momentos de alegria.

À Tina, por me acolher com tanto carinho em sua casa e em seu coração, por estar sempre pronta a ajudar e ter uma palavra amiga a dizer quando mais se precisa.

Ao Ary, possuidor de um notável espírito científico, por todo o incentivo até hoje e por ter me apresentado com sua orientação no Mestrado, com inúmeras lições de ciência e vida.

À Janetti, modelo de dedicação como professora e pesquisadora, por ter despertado em mim o “espírito da ciência” e por todas as lições (não só de ciência) que jamais esqueci.

Ao Webster, um grande amigo, sempre gentil e solícito, pelo apoio e pela confiança.

Ao Stanley, Maria Clara, João Paulo, Diogo, Carol, Fernanda e todos os outros colegas de ambulatório, pela ajuda prática e, sobretudo, pela aprazível convivência.

À Rosângela e Eni – do CTR-DIP – e Raquel, Clésia e Leidiane – do Hospital Eduardo de Menezes, pelo auxílio na coleta do material para os experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Imunofarmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, em especial a Adriana, Bernardo e Viviane, pelo apoio na parte experimental deste trabalho.

Ao Moisés, Rozana e Cida Grossi, amigos e colegas de trabalho, pela amizade e pelo incentivo.

À Luciana, Nina e todos os colegas do Hospital Eduardo de Menezes, pela convivência agradável, pela confiança e pela amizade.

A todos os meus amigos que, longe ou perto, nunca deixaram de acreditar em mim.

A FAPEMIG (de cuja agência sou bolsista), CNPq e CAPES, pelo apoio financeiro durante a realização do trabalho.

“Estes casos parecem menos raros do que se pode acreditar à primeira vista e creio que, prestando-se atenção, há de se descobrir mais casos entre nós.”

Adolpho Lutz, 1908

“As mudanças ambientais resultantes do ‘progresso’ da humanidade, como a destruição de áreas de florestas nativas e o correspondente desequilíbrio dos micronichos de fungos, resultará na exposição de um grande número de indivíduos a esses patógenos considerados raros até então.”

Charlotte Campbell, 1971

RESUMO

A paracoccidiodomicose (PCM), causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), é a micose sistêmica mais prevalente na América Latina, sendo encontrada principalmente no Brasil. Um dos principais problemas na abordagem dos pacientes com PCM é determinar o momento correto da interrupção de seu tratamento. O objetivo deste trabalho é investigar o perfil clínico e imunológico de pacientes com PCM crônica, buscando estabelecer parâmetros para seu controle de cura. Foram acompanhados ambulatorialmente 75 pacientes adultos com PCM que procuraram o Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, entre março de 2001 e dezembro de 2006, em avaliações semestrais. Os critérios para inatividade ou cura clínica foram: completa remissão dos sinais ou sintomas da PCM ativa e regressão ou estabilização das alterações observadas nos exames de imagem com intervalo de três meses. Foram realizadas dosagens de marcadores inflamatórios (anticorpos IgG anti-Pb, sTNF-R1, sTNF-R2, CXCL9, CCL2, CCL3, CCL11 e CCL24) no soro por teste ELISA em 26 desses pacientes, na primeira consulta e após seis, 12 e 36 meses de tratamento. Para comparação, as dosagens dos mesmos marcadores foram feitas num grupo controle constituído por 37 voluntários sadios pareados com os pacientes por idade. Inatividade clínica foi alcançada por 53 (71%) pacientes; em 27 (51%) casos, a cura clínica foi observada nos primeiros seis meses. Regressão logística binária identificou “esquema terapêutico” e “acometimento de mucosas” como os mais significativos preditores de mau prognóstico em PCM crônica; tratamentos com azólicos isoladamente ou combinados a sulfas associaram-se a menor percentual de cura clínica. A dosagem dos níveis séricos de anticorpos IgG anti-Pb e de sTNF-R2 apresentou maiores valores de sensibilidade e especificidade, nos respectivos

pontos de corte, definidos pelo método da curva ROC, para discriminar os controles sadios dos pacientes com PCM crônica. O nível de sTNF-R1, entretanto, parece um marcador mais fidedigno de atividade da doença do que sTNF-R2. Os pacientes com PCM crônica (tipo adulto) não tratados apresentaram ativação preferencial de resposta imunológica tipo Th1, porém, ao longo do tratamento, verifica-se mudança do padrão de resposta para Th2, o que pode estar associado à imunorregulação. Ao final dos 36 meses de acompanhamento, os níveis de IgG anti-Pb, sTNF-R1, CCL2 e CCL24 estavam significativamente elevados no grupo de pacientes em relação ao grupo controle. A análise conjunta do estado clínico dos pacientes com os níveis séricos de marcadores inespecíficos, sobretudo sTNF-R1 e sTNF-R2, e com os anticorpos específicos anti-Pb poderia aumentar significativamente a acurácia da determinação do momento adequado para se interromper a terapia antifúngica dos pacientes com PCM. Outros estudos são necessários para confirmar se algum desses marcadores inflamatórios poderá ser usado como um parâmetro que reflète de modo confiável a atividade da doença nos pacientes com PCM e, talvez, contribuir para diminuir suas recidivas.

Palavras-chave: paracoccidiodomicose; controle de cura; marcadores inflamatórios; quimiocinas.

SUMMARY

Paracoccidioidomycosis (PCM), caused by dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), is the most common systemic mycosis in Latin America. A major problem in managing PCM is to determine the right time to discontinue therapy. The aim of the present work was to investigate the clinical and immunological profile of patients with adult type of PCM, in order to find out parameters that better correlate with disease activity. A cohort of 75 adult patients admitted to the Infectious Diseases Ambulatory of the General Hospital of the Federal University of Minas Gerais, Brazil, from March 2001 to December 2006, was evaluated at each six months. Clinical remission was defined as the absence of PCM symptoms and scarring of all lesions, associated to normalization or stabilization of laboratorial and radiological changes. Serum levels of inflammation markers (anti-Pb IgG antibodies, sTNF-R1, sTNF-R2, CXCL9, CCL2, CCL3, CCL11 and CCL24) were measured by ELISA assays in 26 patients from the group, at baseline and after 6, 12 and 36 months of treatment. For comparison, 37 age-matched healthy volunteers were recruited. Clinical remission was achieved by 53 (71%) patients; in 27 (51%) cases, it was noticed during the first six months of therapy. Binary logistic regression identified “therapeutic regimen” and “presence of mucosal lesions” as the most significant predictors of bad outcome in adult type PCM; treatments with azole drugs alone or combined with sulfonamides were associated with a lower percentual of clinical remission. Determination of serum levels of anti-Pb IgG antibodies and sTNF-R2 presented higher sensitivity and specificity, in comparison to other markers, at their respective cut-off values, defined by ROC curve method, to discriminate healthy controls from adult type PCM patients.

Levels of sTNF-R1, however, seem to be a better marker of disease activity in comparison to sTNF-R2. Untreated adult type PCM patients present a preferential induction of Th1 immune response; however, during the treatment, a shift to Th2 response occurs, and this may be related to immune regulation. After 36 months of follow-up, concentration of anti-Pb IgG, sTNF-R1, CCL2 and CCL24 were significantly higher in PCM patients in comparison to controls. Simultaneous analysis of serum levels of non-specific inflammation markers, mainly sTNF-R1 and sTNF-R2, and specific anti-Pb antibodies in addition to clinical signs may improve the accuracy to determine the right time to discontinue antifungal therapy in PCM patients. Further studies are necessary to confirm if any of these inflammation markers may be used as a reliable parameter to assess disease activity in PCM patients and maybe help to reduce disease relapses.

Key words: paracoccidioidomycosis; cure control; inflammatory markers; chemokines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1 -	Curvas ROC para os marcadores séricos estudados nos pacientes com paracoccidiodomicose crônica (PCM) não tratados (t0) e nos controles sadios.....	99
Gráfico 2 -	Curvas ROC para anticorpos IgG anti- <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (Pb), sTNF-R1 e sTNF-R2 dosados no soro dos pacientes com paracoccidiodomicose crônica (PCM) não tratados (t0) e nos controles sadios.....	100
Gráfico 3 -	Concentração de anticorpos IgG anti- <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (Pb) no soro de controles sadios e pacientes com paracoccidiodomicose crônica (PCM).....	104
Gráfico 4 -	Concentração de sTNF-R1 no soro de controles sadios e pacientes com paracoccidiodomicose crônica (PCM).....	105
Gráfico 5 -	Concentração de sTNF-R2 no soro de controles sadios e pacientes com paracoccidiodomicose crônica (PCM).....	106
Gráfico 6 -	Concentração CXCL9 no soro de controles sadios e pacientes com paracoccidiodomicose crônica (PCM).....	107
Gráfico 7 -	Concentração de CCL2 no soro de controles sadios e pacientes com paracoccidiodomicose crônica (PCM).....	108
Gráfico 8 -	Concentração de CCL3 no soro de controles sadios e pacientes com paracoccidiodomicose crônica (PCM).....	109
Gráfico 9 -	Concentração de CCL24 no soro de controles sadios e pacientes com paracoccidiodomicose crônica (PCM).....	110
Gráfico 10 -	Concentração de CCL11 no soro de controles sadios e pacientes com paracoccidiodomicose crônica (PCM).....	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Distribuição por <u>faixa etária</u> , na primeira consulta, dos pacientes com PCM crônica atendidos no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006.....	78
Tabela 2 -	<u>Procedência</u> dos pacientes com PCM crônica atendidos no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006.....	78
Tabela 3 -	<u>Profissão</u> , na primeira consulta, dos pacientes com PCM crônica atendidos no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006.....	79
Tabela 4 -	Distribuição por <u>profissão e procedência</u> dos pacientes com PCM crônica atendidos no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006.....	80
Tabela 5 -	<u>Tempo de doença pré-tratamento</u> dos pacientes com PCM crônica atendidos no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006.....	81
Tabela 6 -	<u>Formas de apresentação</u> de PCM crônica dos pacientes atendidos no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006.....	81
Tabela 7 -	<u>Formas de apresentação</u> de PCM crônica, por <u>faixa etária</u> , na primeira consulta dos pacientes atendidos no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006.....	82
Tabela 8 -	<u>Achados clínicos na primeira consulta</u> dos pacientes com PCM crônica atendidos no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006.....	83
Tabela 9 -	<u>Localização das lesões</u> de PCM crônica dos pacientes atendidos no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006.....	84
Tabela 10 -	<u>Esquemas terapêuticos utilizados</u> pelos pacientes com PCM crônica atendidos no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006.....	85
Tabela 11 -	<u>Tempo decorrido desde o início do tratamento até a inatividade da doença</u> dos pacientes com PCM crônica atendidos no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006.....	86

Tabela 12 -	Distribuição, por <u>faixa etária</u> , dos pacientes com PCM crônica que apresentaram <u>inatividade da doença</u> no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006.....	87
Tabela 13 -	Distribuição, por <u>procedência</u> , dos pacientes com PCM crônica que apresentaram <u>inatividade da doença</u> no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006.....	87
Tabela 14 -	Distribuição, por <u>profissão</u> , dos pacientes com PCM crônica que apresentaram <u>inatividade da doença</u> no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006.....	88
Tabela 15 -	Distribuição, por <u>tempo de doença pré-tratamento</u> , dos pacientes com PCM crônica que apresentaram <u>inatividade da doença</u> no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006.....	89
Tabela 16 -	Distribuição, por <u>forma de apresentação</u> , dos pacientes com PCM crônica que apresentaram <u>inatividade da doença</u> no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006.....	89
Tabela 17 -	Distribuição, por <u>esquema terapêutico</u> utilizado, dos pacientes com PCM crônica que apresentaram <u>inatividade da doença</u> no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006.....	90
Tabela 18 -	Resultado da regressão logística binária para identificação dos preditores de evolução da PCM crônica dos pacientes atendidos no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006. “Passo zero”.....	92
Tabela 19 -	Resultado da regressão logística binária para identificação dos preditores de evolução da PCM crônica dos pacientes atendidos no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006. “Passo um” – variável incluída: “esquema terapêutico”.....	93
Tabela 20 -	Resultado da regressão logística binária para identificação dos preditores de evolução da PCM crônica dos pacientes atendidos no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006. “Passo dois” – variável incluída: “acometimento de mucosas”.....	94

Tabela 21 -	Distribuição, por <u>tempo de tratamento e atividade da doença</u> , dos pacientes com PCM crônica que participaram do <u>estudo imunológico</u> no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006.....	97
Tabela 22 -	Área sob a <u>curva ROC</u> , pontos de corte e os respectivos valores de sensibilidade e especificidade para os marcadores inflamatórios séricos estudados nos pacientes com PCM crônica atendidos no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina de soro bovino (<i>Bovine Serum Albumine</i>)
CBO	Classificação Brasileira de Ocupações
CCL	Quimiocina com duas cisteínas consecutivas na extremidade N-terminal
CXCL	Quimiocina em que um outro aminoácido se situa entre as duas cisteínas na extremidade N-terminal
DO	Densidade óptica (medida no teste ELISA)
EBP	Proteína de ligação a estrógeno (<i>Estrogen Binding Protein</i>)
EBV	Epstein-Barr Vírus
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
Forma L	Forma leveduriforme
Forma M	Forma micelial
Forma Y	Forma leveduriforme (do inglês <i>yeast</i> , levedura)
gp43	Glicoproteína de 43 kDa
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
IFN γ	Interferon gama
IgA, E, G, M	Imunoglobulina A, E, G, M
IgG anti-Pb	Imunoglobulina G anti- <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
IL	Interleucina
kDa	Kilodalton (unidade de massa atômica ou molecular)
L-DOPA	Dopamina levógira
NK (células)	Células <i>Natural Killer</i>
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>)

PBS	Solução salina com tampão fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCM	Paracoccidiodomicose
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pH	Potencial hidrogeniônico
ROC (curva)	<i>Receiver-Operator Characteristic</i>
sTNF-R	Receptor solúvel de TNF α (<i>Soluble TNF receptor</i>)
TGF β	Fator de crescimento tumoral beta (<i>Tumor Growth Factor beta</i>)
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa (<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>)
VDRL	<i>Venereal Diseases Research Laboratory</i> (teste sorológico não-treponêmico usado para diagnóstico e seguimento terapêutico de casos de sífilis)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	24
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	27
2.1 <u>Histórico</u>	27
2.2 <u>Agente etiológico</u>	28
2.2.1 Taxonomia.....	29
2.2.2 Morfologia.....	29
2.2.3 Ecologia.....	31
2.2.4 Interação parasita-hospedeiro e fatores de virulência do fungo.....	34
2.3 <u>Epidemiologia</u>	37
2.3.1 Incidência, prevalência e mortalidade.....	37
2.3.2 Dados sócio-demográficos.....	39
2.4 <u>Modo de infecção</u>	41
2.5 <u>Imunologia da PCM</u>	42
2.5.1 Papel do TNF e de seus receptores solúveis.....	43
2.5.2 Papel das quimiocinas.....	46
2.6 <u>Quadro clínico</u>	49
2.7 <u>Diagnóstico</u>	52
2.7.1 Micológico.....	53
2.7.2 Anátomo-patológico.....	53
2.7.3 Sorológico.....	55
2.7.4 Intradermorreação.....	57
2.8 <u>Tratamento</u>	58
2.9 <u>Controle de cura e profilaxia</u>	60

3 JUSTIFICATIVA.....	62
4 OBJETIVOS.....	63
4.1 <u>Objetivo geral</u>	63
4.2 <u>Objetivos específicos</u>	63
5 PACIENTES E MÉTODOS.....	65
5.1 <u>Estudo clínico</u>	65
5.1.1 População estudada.....	66
5.1.2 Critério de inclusão.....	67
5.1.3 Critério de exclusão e perdas.....	68
5.2 <u>Estudo imunológico</u>	68
5.2.1 População estudada.....	69
5.2.2 Critério de inclusão.....	69
5.2.3 Critério de exclusão e perdas.....	70
5.2.4 Processamento do sangue para obtenção do soro.....	70
5.2.5 Dosagem de anticorpos IgG anti- <i>P. brasiliensis</i> (Pb) no soro.....	70
5.2.6 Processamento do soro para dosagem de IgG anti-Pb, sTNF-R1 e R2.....	71
5.2.7 Processamento do soro para dosagem de quimiocinas.....	71
5.2.8 Processamento das amostras para realização dos testes ELISA.....	72
5.3 <u>Desenho do estudo</u>	73
5.4 <u>Análise estatística dos dados</u>	74
5.5 <u>Pesquisa bibliográfica</u>	75
6 RESULTADOS.....	77
6.1 <u>Características clínicas e epidemiológicas da população estudada</u>	77
6.2 <u>Inatividade clínica</u>	85
6.2.1 Análise dos preditores de evolução da PCM crônica.....	91
6.3 <u>Dosagem sérica de anticorpos e marcadores inflamatórios</u>	96
6.3.1 Dosagem sérica de anticorpos específicos anti- <i>P. brasiliensis</i> (Pb).....	101

6.3.2 Dosagem sérica de sTNF-R1 e sTNF-R2.....	101
6.3.3 Dosagem sérica de quimiocinas.....	102
7 DISCUSSÃO.....	112
7.1 <u>Características clínicas e epidemiológicas da população estudada</u>	112
7.2 <u>Inatividade clínica</u>	116
7.3 <u>Dosagem sérica de anticorpos e marcadores inflamatórios</u>	120
7.3.1 Dosagem sérica de anticorpos específicos anti- <i>P. brasiliensis</i> (Pb).....	121
7.3.2 Dosagem sérica de sTNF-R1 e sTNF-R2.....	123
7.3.3 Dosagem sérica de quimiocinas.....	125
8 CONCLUSÕES.....	130
9 LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	132
10 PROPOSIÇÕES.....	133
REFERÊNCIAS.....	134
APÊNDICES.....	146
A–Termo de consentimento livre e esclarecido.....	147
B–Protocolo para primeira consulta de pacientes com paracoccidiodomicose.....	148
C–Protocolo para retorno de pacientes com paracoccidiodomicose.....	154
D–Bancos de dados dos pacientes e controles que participaram do estudo.....	155
E–Estatísticas da análise de regressão logística realizada com o banco de dados clínicos dos pacientes com paracoccidiodomicose.....	164
F–Estatísticas das curvas ROC elaboradas e dos estudos de correlação entre os marcadores estudados.....	176
ANEXO – Documento de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais – COEP/UFMG.....	185

1 INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é a micose sistêmica mais prevalente na América Latina e a maioria dos casos da doença ocorre no Brasil (Restrepo *et al.*, 2001). Afeta principalmente adultos masculinos em áreas rurais e é a oitava causa mais comum de morte entre as doenças infecto-parasitárias crônicas recorrentes no Brasil, superando inclusive a leishmaniose, com taxa de mortalidade de 1,45 por milhão de habitantes (Coutinho *et al.*, 2002).

A PCM é causada pelo fungo termo-dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, conhecido apenas em sua forma assexuada até o presente (Goldani *et al.*, 1995; Restrepo, 1985; Restrepo *et al.*, 2001). Seu habitat natural é presumivelmente o solo, onde ele é encontrado como micélio, que é a sua forma infectante. A infecção é habitualmente deflagrada pela inalação de propágulos fúngicos, os quais alcançam o epitélio alveolar pulmonar, onde se diferenciam na forma leveduriforme, sua forma parasitária (Borges-Walmsley *et al.*, 2002). O fungo pode ser eliminado por células do hospedeiro imunologicamente competente ou, caso contrário, dissemina-se a outros órgãos e tecidos por via linfática ou hematogênica, caracterizando a PCM-doença. Pode ainda permanecer viável, formando um foco quiescente, o qual pode ser ativado posteriormente, originando sinais e sintomas tardios da PCM ou quadros de recidiva (Benard *et al.*, 2001; Franco, 1987; Franco *et al.*, 1993; Mamoni & Blotta, 2006).

O fungo *P. brasiliensis* é capaz de se instalar em qualquer órgão ou tecido do corpo humano, sendo os mais acometidos: pulmões, linfonodos, tegumento e glândulas adrenais; em menor proporção, baço, fígado, intestinos, pâncreas, ossos,

órgãos genitais, sistema nervoso e rins, entre outros, podem ser afetados (Borges-Walmsley *et al.*, 2002; Franco *et al.*, 1987; Marques, 2003; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

As formas clínicas de PCM são múltiplas e dinâmicas, o que dificulta sua classificação (Padilha-Gonçalves, 1996). Desde o consenso estabelecido em Medellín, na Colômbia, em 1986, é classificada como: PCM-infecção; PCM-doença, que pode ser aguda ou subaguda (tipo juvenil), ou crônica (tipo adulto); e formas residuais ou seqüelas (Franco *et al.*, 1987; Montenegro, 1986).

Está bem estabelecido que a forma clínica da doença depende basicamente da resposta imunológica do paciente. Pacientes com PCM grave comumente apresentam resposta imunológica adaptativa deficiente em seu ramo celular, haja vista que a principal defesa do hospedeiro contra o fungo é representada pela resposta mediada por células, em detrimento da resposta humoral (Mamoni *et al.*, 2002; Mamoni & Blotta, 2005; Nogueira *et al.*, 2006a).

A determinação do momento adequado para interromper o tratamento representa uma preocupação importante na abordagem do paciente com PCM. Os critérios atuais para definição de cura são clínicos, radiológicos e sorológicos. O paciente deve apresentar: completa remissão da sintomatologia e cicatrização das lesões; estabilização de alterações à radiografia de tórax, ultra-sonografia abdominal, tomografia computadorizada e/ou ressonância magnética; e títulos negativos ou baixos (inferiores a 1:2) dos exames sorológicos anti-*P. brasiliensis* (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). Os exames sorológicos, entretanto, não estão disponíveis na rotina da maioria dos serviços de saúde públicos. Além do mais, não existe na prática clínica nenhum parâmetro que seja realmente confiável para

determinar a atividade da PCM, nem que permita prever ou prevenir as suas recidivas, que são muito comuns.

Foi demonstrado que, em diversas doenças infecciosas, inflamatórias e auto-imunes, a concentração sérica de receptores solúveis do Fator de Necrose Tumoral (sTNF-R) possui correlação mais próxima com a atividade dessas doenças do que outros parâmetros considerados seus marcadores específicos (Aderka, 1996; Corvino *et al.*, 2007; Girardin *et al.*, 1992).

As quimiocinas representam uma grande família de citocinas de baixo peso molecular com propriedade quimiotática seletiva. Elas participam do recrutamento de leucócitos para locais de inflamação em diversas condições (Charo & Ransohoff, 2006; Colobran *et al.*, 2007a; Ono *et al.*, 2003). Os seus níveis também estão associados com a atividade de diversas doenças inflamatórias e infecciosas (Alessandri *et al.*, 2006; Moreira *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2005; Souza-Pereira *et al.*, 2006).

Este estudo justifica-se pela necessidade de parâmetros clínicos, laboratoriais e imunológicos confiáveis para a definição de cura dos pacientes com PCM. Tem como objetivo avaliar se a dosagem de sTNF-R e de quimiocinas poderia auxiliar na determinação do momento adequado para a suspensão da terapia antifúngica em pacientes com PCM e, assim, talvez contribuir para a diminuição das taxas de recidiva da doença, ao indicar precocemente o retorno da sua atividade e a necessidade de reintrodução da terapêutica. Esses constituem os maiores desafios clínicos da abordagem da PCM.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico

A paracoccidioidomicose (PCM), também conhecida como blastomicose brasileira, blastomicose sul-americana, granuloma paracoccidióidico, moléstia de Lutz-Splendore-Almeida, granulomatose paracoccidióidica ou granulomatose blastomicóide tropical, foi primeiramente descrita por Adolpho Lutz (Lutz, 1908), cujo interesse foi despertado a partir do encontro de microrganismo desconhecido em lesões orais vegetantes. Alphonso Splendore, após estudo mais aprofundado da morfologia do fungo, propôs em 1912 a denominação *Zymonema brasiliense* para o patógeno. Os seus trabalhos impulsionaram o estudo clínico e micológico da PCM (Splendore, 1912). Floriano Paulo de Almeida, em 1930, sugeriu a denominação *Paracoccidioides brasiliensis* ao agente da PCM, criando um novo gênero para o microrganismo (Almeida, 1930, 1946).

A partir de 1930, verifica-se amplo desenvolvimento de pesquisas sobre a doença e seu agente etiológico, principalmente com os avanços na área da imunologia, da terapêutica e da epidemiologia e com o surgimento de novas tecnologias, tais como a microscopia eletrônica e técnicas de citoquímica (Lacaz *et al.*, 1963; Lauand, 1966; Minguetti *et al.*, 1983a,b).

2.2 Agente etiológico

O agente etiológico da PCM é o fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (Splendore, 1912) Almeida, 1930. Ele foi isolado pela primeira vez por Lutz, em 1908, e sua forma sexuada ainda é desconhecida. Desde sua descrição, em 1930, *P. brasiliensis* era considerada uma espécie clonal, com reprodução assexuada exclusiva. Entretanto, há evidências que indicam a presença de recombinações, levando ao surgimento de espécies crípticas (Carvalho *et al.*, 2005; Hebelers-Barbosa *et al.*, 2003; Matute *et al.*, 2006).

Um complexo de espécies crípticas (do grego, *kryptē*, e do latim, *crypta*: oculto, escondido) é um grupo de espécies que preenchem o critério biológico de “espécie”, ou seja, são reprodutivamente isoladas uma da outra, embora sejam morfológicamente idênticas; elas possuem discretas diferenças genéticas e podem ser separadas apenas por meio de estudos não-morfológicos, tais como análise de seqüência de DNA e outras técnicas de Biologia Molecular. Determinar se duas populações indistinguíveis constituem espécies crípticas, irmãs ou verdadeiras é somente o primeiro passo para o estudo da especiação (Cryptic, 2008; McKenna, 2007; RPM, 2005).

Matute e colaboradores (2006) comprovaram a existência de pelo menos três espécies crípticas de *P. brasiliensis*: S1 (*species 1*), com 38 isolados oriundos do Brasil, Argentina, Paraguai, Peru ou Venezuela; PS2 (*phylogenetic species 2*), com cinco isolados do Brasil e um da Venezuela; e PS3 (*phylogenetic species 3*), com 21 isolados da Colômbia. A divergência genética média entre S1 e PS2 foi mais de três vezes superior ao observado entre os isolados dentro de cada um dos grupos; entre

S1 e PS3, essa diferença foi de 1,5 vez. Há evidência de possível reprodução sexuada em S1; em PS2 e em PS3, entretanto, tal aspecto não pode ser excluído.

Nos isolados do Brasil (S1 e PS2), foram relatadas variações no potencial de virulência e na expressão gênica. Demonstrou-se também que essas duas espécies crípticas são capazes de produzir PCM em humanos e em tatus (Carvalho *et al.*, 2005; Hebeler-Barbosa *et al.*, 2003).

2.2.1 Taxonomia

O microrganismo *P. brasiliensis* atualmente pertence às seguintes categorias taxonômicas: Superreino Eukaryota; Reino Fungi; Subreino Dikarya; Filo Ascomycota; Subfilo Pezizomycotina; Classe Eurotiomycetes; Subclasse Eurotiomycetidae; Ordem Onygenales; Família Ajellomycetaceae; Gênero Paracoccidioides; Espécie *Paracoccidioides brasiliensis* (US National Institutes of Health).

2.2.2 Morfologia

As colônias de *P. brasiliensis* podem apresentar aspectos morfológicos distintos, dependendo do meio de cultivo e, principalmente, da temperatura de

incubação. Esse fenômeno, denominado dimorfismo, é reversível (Borges-Walmsley *et al.*, 2002; Brummer *et al.*, 1993; San-Blas, 1993a,b).

À temperatura ambiente, o fungo apresenta-se na forma micelial (forma M). Suas colônias são inicialmente lisas e, mais tarde, são cobertas por micélio aéreo de cor branca a bronze, sendo comparadas por Lutz (1908) a “pêlos de ratinhos brancos”. Ao exame microscópico, são encontrados filamentos micelianos finos, septados, com esporos terminais ou intercalares. Nessa condição, não possuem estruturas típicas da espécie (Brummer *et al.*, 1993; Garcia *et al.*, 1993; Marques, 1998).

À temperatura de 37 °C, *P. brasiliensis* assume forma de levedura (forma L ou Y – do inglês *yeast*). Nessas condições, as colônias são cêreas, rugosas ou cerebriformes, de cor creme a bronze. Ao exame microscópico, o padrão mais comumente observado é representado por células leveduriformes relativamente grandes (podendo atingir 5 a 25 µm no seu maior diâmetro), com parede espessa birrefringente e gemulação randômica (a qual pode ser simples, múltipla ou ausente). Podem ser verificadas também outras formas, descritas como: pequenas (com diâmetro médio de 5 µm); filamentosas, semelhantes a tubos germinativos; caliciformes; em haltere; células com septações, entre outras (Brummer *et al.*, 1993; Garcia *et al.*, 1993; Marques, 1998).

2.2.3 Ecologia

A localização precisa do nicho ambiental de *P. brasiliensis* permanece incerta. Mackinnon e colaboradores (1953) verificaram que a maioria dos casos de PCM ocorria em indivíduos que mantinham contato com florestas em suas atividades laborativas, principalmente ao longo de rios. Outros trabalhos comprovaram tais observações, acrescentando algumas características ecológicas das áreas de maior prevalência da doença, tais como: altos índices pluviométricos, invernos curtos, verões chuvosos e temperaturas anuais amenas, em torno de 17 °C a 24 °C (Bagagli *et al.*, 2003; Bopp & Bernardi, 1967; Borelli, 1961; Calle *et al.*, 2001; Chirife & Del Rio, 1965). A presença de árvores não-nativas, dos gêneros *Pinus* e *Eucalyptus*, também se mostrou positivamente associada ao fungo (Bagagli *et al.*, 1998).

O fungo foi isolado esporadicamente a partir de cultivo do solo de áreas endêmicas de PCM (Albornoz, 1971; Negroni, 1966; Silva-Vergara *et al.*, 1998; Shome & Batista, 1963). Estudo recente (Terçarioli *et al.*, 2007) demonstrou que *P. brasiliensis* é capaz de se desenvolver tanto em solos argilosos quanto em arenosos, desde que a taxa de umidade seja elevada. A maior incidência da doença em áreas de solo argiloso pode ser devida à sua maior adequação para atividades agrícolas.

O crescimento do fungo é prejudicado ou inibido pela alta concentração de alumínio trocável (*exchangeable aluminum*), que também é tóxico para as plantas. O maior nível de alumínio trocável é encontrado, em geral, em solos mais ácidos. A acidez do solo é representada basicamente por dois componentes, que se encontram em equilíbrio: a fase sólida, que é constituída pelas argilas, pela matéria orgânica e pelos óxidos de ferro e alumínio; e a fase líquida, que é a solução do

solo. Os íons hidrogênio (H^+) dissociados na fase líquida do solo são denominados “acidez ativa”, que é estimada pelo pH. Os demais íons H^+ e os íons alumínio (Al^{+3}), ligados à fase sólida, são denominados “acidez potencial”. Apenas parte dos íons alumínio (Al^{+3}) é deslocada por outros cátions, sendo, por isso, denominada de alumínio trocável ou “acidez trocável” (Pitta *et al.*, 2007).

Na área investigada no referido trabalho (Terçarioli *et al.*, 2007), no município de Botucatu-SP e adjacências, em apenas um, de nove locais de coleta, o fungo não foi isolado, exatamente no local onde os níveis de alumínio trocável eram muito elevados. As amostras de espécimes clínicos de tatus que viviam nessa mesma área também foram negativas para a pesquisa de *P. brasiliensis*. Nos outros oito locais de coleta, estudos de Biologia Molecular evidenciaram a presença do fungo no solo oriundo do interior das tocas dos tatus, mas não da sua superfície. Tal resultado pode decorrer da menor variação de umidade, temperatura, iluminação e de outros fatores abióticos do solo do interior das tocas em comparação com o material coletado da sua superfície exterior (Terçarioli *et al.*, 2007).

Na Colômbia, são observadas taxas significativamente mais elevadas de PCM-infecção em indivíduos que relatam contato com tatus. Esses animais podem ser considerados sentinelas do nicho ambiental do fungo (Cadavid & Restrepo, 1993; Restrepo *et al.*, 2001).

Várias descobertas importantes sobre a reservárea do fungo, ou nicho ambiental, extra-humano, conforme definição de Grossi (1970), têm sido trazidas pelos estudos em áreas com casos de PCM em crianças, visto que elas apresentam baixo índice migratório. Cadavid e Restrepo (1993) demonstraram associação estatisticamente significativa de altas taxas de PCM-infecção com a presença de cursos fluviais, contato com tatus e suas tocas e trabalho em hortas.

Na Amazônia, onde se acreditava que a PCM era rara, foram demonstrados casos em crianças que viviam desde seu nascimento em áreas de fronteira agrícola, com desmatamento gradual da floresta nativa (Fonseca *et al.*, 1999).

O mero contato com tais áreas de floresta, no entanto, não parece determinante para a infecção por *P. brasiliensis*. Em populações indígenas que baseiam suas atividades no extrativismo, não há relatos de casos de PCM e a reatividade à paracoccidioidina varia de 6,4% a 14,9%. Entre índios que praticam a agricultura, porém, a doença já foi diagnosticada e a intradermorreação com paracoccidioidina é positiva em mais de 40% dos indivíduos (Coimbra Jr *et al.*, 1994). Na Argentina, em área de construção de uma usina hidrelétrica às margens do rio Paraná, onde não havia relato prévio da infecção, a positividade à paracoccidioidina foi detectada em 11,4% dos indivíduos (Mangiaterra *et al.*, 1999). Isso sugere que as mudanças ambientais provocadas pelo homem, sobretudo quando envolvem o ato de revolver ou escavar o solo, são importantes para a formação de aerossóis infectivos.

O fungo *P. brasiliensis* já foi isolado do trato intestinal de morcegos – *Artibeus lituratus* (Grose & Tamsitt, 1965), do fígado e cólon de um sagüi – *Saimiri sciureus* (Johnson & Lang, 1977), das fezes de um pingüim – *Pygoscelis adeliae* (Garcia *et al.*, 1993) e do fígado, baço, pulmões e linfonodos mesentéricos de tatus-galinha – *Dasypus novemcinctus* (Bagagli *et al.*, 1998; Bagagli *et al.*, 2003; Naiff *et al.*, 1986; Vergara & Martinez, 1999).

Os tatus-galinha não são apenas reservatórios de *P. brasiliensis*; eles também podem ser acometidos por PCM, com desenvolvimento de granulomas ricos em células leveduriformes comprovados por exame anátomo-patológico dos órgãos supramencionados (Bagagli *et al.*, 1998; Vergara & Martinez, 1999). No tatu-do-rabo-

de-porco – *Cabassous centralis*, o fungo foi recentemente isolado por técnicas de Biologia Molecular (Corredor *et al.*, 2005). Em outras espécies de tatus, porém, como *D. kapplari*, *D. septemcinctus* e *Euphractus sexcinctus*, que compartilham os mesmos hábitos dentro das reserváreas de *P. brasiliensis*, não foi demonstrada positividade em tentativas de isolamento do fungo (Restrepo *et al.*, 2001).

A positividade sorológica em cães de ambiente rural, suburbano e urbano foi de 89,5%, 48,8% e 14,8%, respectivamente. A reatividade à paracoccidioidina foi de 38,1% e 13,1% nos cães procedentes de regiões rurais e suburbanas, respectivamente. Entretanto, o fungo *P. brasiliensis* não foi isolado em cultivo de nenhum desses animais nem foi encontrado em exame anátomo-patológico de seus órgãos à necrópsia (Ono *et al.*, 2001). Resultados similares já haviam sido descritos desde a década de 1970 (Costa & Fava-Netto, 1978; Mós & Fava-Netto, 1974). Recentemente, porém, descobriu-se que a PCM pode ocorrer nos cães, provocando linfadenomegalia cervical com infiltrado inflamatório granulomatoso rico em leveduras (Ricci *et al.*, 2004).

2.2.4 Interação parasita-hospedeiro e fatores de virulência do fungo

É conhecido que os estrógenos diminuem ou retardam a transformação de *P. brasiliensis* na forma M para a forma Y, através da interação com alguns de seus receptores. Existe uma proteína de ligação a estrógeno (*Estrogen Binding Protein* – EBP) no citoplasma do fungo, com atividade não esclarecida para o mesmo e que possui maior afinidade pelo estradiol (em relação aos demais estrógenos). É

possível que essa proteína proteja as mulheres ou as torne mais resistentes ao desenvolvimento da PCM-doença a partir da PCM-infecção (Franco, 1987; Franco *et al.*, 1987; Franco *et al.*, 1993; Restrepo *et al.*, 1984).

A glicoproteína de peso molecular 43 kDa (gp43), também denominada antígeno E₂ de Yarzabal, é uma proteína que age como receptor de laminina, sendo provavelmente responsável pela adesão de leveduras de *P. brasiliensis* às células do hospedeiro. Popi *et al.* (2002) demonstraram que a gp43 inibe a capacidade de fagocitose de macrófagos de camundongos, bem como sua atividade fungicida. Esse é o mais importante antígeno exocelular do fungo em sua fase leveduriforme e talvez seja o seu principal fator de virulência (Borges-Walmsley *et al.*, 2002; Camargo & Franco, 2000; Hogan *et al.*, 1996; Mendes-Giannini *et al.*, 2000; Travassos *et al.*, 1995).

É sugerido por observações indiretas que o polissacarídeo α -1,3-glucana, encontrado externamente na parede celular de leveduras de *P. brasiliensis*, represente outro fator de virulência. Em modelos animais, demonstrou-se que o cultivo por tempo prolongado de isolados virulentos do fungo leva, inevitavelmente, à redução da concentração de α -1,3-glucana na parede das células, diminuição da espessura da parede celular mensurada por microscopia eletrônica e perda da sua virulência em modelos animais. Essas modificações são revertidas tanto pela sua inoculação sucessiva em animais quanto pelo seu crescimento *in vitro* em meios suplementados com soro fetal bovino. Acredita-se que essa molécula possa proteger o fungo contra o ataque de leucócitos do hospedeiro, formando um invólucro, já que os fagócitos não possuem α -glucanases. Por outro lado, o polissacarídeo β -glucana, cuja concentração na parede celular de *P. brasiliensis* é inversamente proporcional à de α -1,3-glucana, é um potente indutor de resposta inflamatória e, portanto, sua

presença em maior proporção torna mais fácil o reconhecimento do fungo pelo sistema imunológico do organismo parasitado e o conseqüente estabelecimento de resposta inflamatória contra o parasita, visando a sua eliminação (Borges-Walmsley *et al.*, 2002; Hogan *et al.*, 1996).

Foi descrita também uma serina-tiol proteinase exo-celular de *P. brasiliensis* em fase leveduriforme que cliva, *in vitro*, proteínas humanas associadas com a membrana basal em pH neutro, a saber, laminina, fibronectina, colágeno tipo IV e proteoglicanos. A gp43 *per se* poderia mediar a ligação a laminina, agindo sinergicamente com a enzima degradadora da membrana basal, que parece ser potencialmente relevante na disseminação do fungo pelos tecidos do hospedeiro (San-Blas *et al.*, 2000).

Estudos recentes demonstraram que as células de *P. brasiliensis* produzem melanina na presença de L-DOPA (Gómez *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2006). A melanina é sabidamente um fator de virulência encontrado em diversos patógenos de plantas e animais (Borges-Walmsley *et al.*, 2002; Gómez & Nosanchuk, 2003). A taxa de fagocitose das células de *P. brasiliensis*, quando melanizadas, é significativamente reduzida, independente da origem do macrófago. A normalização da fagocitose é estabelecida após a adição de anticorpos específicos anti-melanina ao meio onde se encontra o fungo. As células fúngicas melanizadas são também menos susceptíveis à fagocitose mediada por complemento e aos efeitos fungicidas e fungistáticos de produtos derivados de oxigênio e nitrogênio, em comparação às células fúngicas não-melanizadas. Além disso, verificou-se maior resistência daquelas células a antifúngicos potentes, como Anfotericina B e azólicos (Silva *et al.*, 2006).

2.3 Epidemiologia

A PCM foi descrita em 14 países, do México (latitude 23° N) à Argentina (latitude 34° S); não há relato de casos no Chile, Nicarágua e Guiana.

2.3.1 Incidência, prevalência e mortalidade

A PCM é a micose sistêmica de maior prevalência na América Latina, sendo a maioria dos casos verificada no Brasil, Colômbia e Venezuela. O Brasil concentra cerca de 80% dos casos. Há regiões com alta prevalência da doença situadas ao lado de outras com prevalência muito baixa. A estimativa da sua incidência em áreas endêmicas da América Latina situa-se em um a três casos por 100.000 habitantes. (Brummer *et al.*, 1993; Restrepo *et al.*, 2001; Restrepo, 1985).

Estima-se, a partir de estudos de reatividade à paracoccidioidina e de técnicas de Biologia Molecular, que pelo menos 11% da população da área endêmica tenham contato com o fungo. Em algumas áreas do Brasil, a PCM-infecção ocorre em até 43,8% da população (Brummer *et al.*, 1993; Coimbra Jr *et al.*, 1994; Maluf *et al.*, 2003; Martinez *et al.*, 2002; Restrepo *et al.*, 2001).

A doença é endêmica em todo o Brasil. Entretanto, a ausência de notificação compulsória representa um dos fatores que torna difícil estabelecer com precisão a sua prevalência e a sua incidência nos diferentes estados brasileiros. Outro fator importante é o longo período de incubação da PCM, o que possibilita que a

localidade onde é feito o diagnóstico nem sempre corresponda àquela onde a infecção foi adquirida.

De 1980 a 1995, foram registrados 3181 óbitos por PCM no Brasil, o que representa média anual de 198,81 mortes e uma taxa de mortalidade de 1,45/milhão de habitantes. Essa taxa de mortalidade é a maior entre as micoses sistêmicas e é a oitava entre as doenças infecto-parasitárias crônicas recorrentes, superando inclusive a leishmaniose. Isso demonstra que a doença possui grande magnitude e pequena visibilidade (Coutinho *et al.*, 2002). A sua taxa de letalidade varia de 2% a 23%; pode atingir 30% quando associada à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Coutinho *et al.*, 2002; Marques, 1998; Marques *et al.*, 1998; Paniago *et al.*, 2003). Entre as regiões brasileiras, as maiores taxas de mortalidade por milhão de habitantes são verificadas no Sul (2,59) e Centro-Oeste (2,35), seguidos, em ordem decrescente, por Sudeste (1,81), Norte (1,06) e Nordeste (0,20). Essas taxas mais elevadas são observadas nos estados de: Mato Grosso do Sul (4,39), Rondônia (3,65), Paraná (3,52) e Mato Grosso (3,22). O estado de Minas Gerais aparece em décimo primeiro lugar, com taxa de mortalidade de 1,66/milhão de habitantes, pouco acima da média nacional (Coutinho *et al.*, 2002). Estudo realizado no Paraná, sobre registros das regiões Sul e Sudeste, de 1980 a 1998, apresenta resultados semelhantes (Bittencourt *et al.*, 2005).

2.3.2 Dados sócio-demográficos

A PCM-doença é mais comum em indivíduos com 30 a 50 anos de idade. De acordo com a casuística estudada, de 3% a 10% dos pacientes com a doença têm menos de 15 anos de idade (Blotta *et al.*, 1999; Brummer *et al.*, 1993; Marques *et al.*, 1998; Nogueira *et al.*, 2006a; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

A PCM-doença é mais freqüente no sexo masculino, com proporção que varia de 5,4 a 10,0 homens para cada mulher acometida (Blotta *et al.*, 1999; Marques *et al.*, 1998; Paniago *et al.*, 2003). Em casuísticas de casos de PCM com acometimento exclusivo de mucosa, essa proporção parece mais alta, variando de 19,3 a 30,0:1 (Bicalho *et al.*, 2001; Godoy & Reichart, 2003; Verli *et al.*, 2005). Em inquéritos soropidemiológicos com paracoccidioidina, porém, não há diferença entre os sexos nas taxas de PCM-infecção. Isso sugere que a progressão da infecção subclínica para doença seja muito mais comum nos homens. Além do mais, não há diferença significativa na proporção de gêneros entre as crianças com PCM. Após os 50 anos de idade, tende a ocorrer aumento relativo na razão de mulheres acometidas. Esses dados sugerem uma influência hormonal no desenvolvimento da doença, provavelmente associada à proteína de ligação a estrógeno (EBP) presente no citoplasma de *P. brasiliensis*, conforme previamente descrito (Brummer *et al.*, 1993; Camargo & Franco, 2000; Franco, 1987; Franco *et al.*, 1987,1993; Restrepo *et al.*, 1984).

As atividades que envolvem o manejo do solo estão relacionadas à aquisição da infecção e incluem: práticas agrícolas, terraplenagem, jardinagem, transporte de produtos vegetais, entre outras. Os trabalhadores rurais são os mais comumente

acometidos, porém há relatos de casos em pessoas que nunca saíram de áreas urbanas (Brummer *et al.*, 1993; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

A proporção de trabalhadores rurais nas diversas populações de pacientes estudados varia de 44,3% a 76,2%; as atividades ligadas à construção civil também são comumente reportadas, em 5% a 20% dos casos (Bicalho *et al.*, 2001; Blotta *et al.*, 1999; Godoy & Reichart, 2003; Marques *et al.*, 1998; Paniago *et al.*, 2003; Verli *et al.*, 2005).

A influência da etnia na PCM é difícil de estabelecer, dada a grande miscigenação presente nas áreas de endemicidade dessa doença. Indivíduos leucodermas parecem ser acometidos com maior frequência do que os demais (Brummer *et al.*, 1993). Estudos de antígenos de histocompatibilidade indicam que o HLA-B40 é significativamente mais freqüente nos pacientes brasileiros em comparação com controles sadios. Os portadores do HLA-B40 têm risco 4,3 a 29,2 vezes maior de desenvolver a doença (Goldani *et al.*, 1991; Lacerda *et al.*, 1988). A frequência de HLA-A2, B7 e B21 também se mostrou aumentada nos pacientes e os haplótipos B40/Cw1 e A2/B40 apresentaram correlação positiva com a doença. Nenhum antígeno testado apresentou efeito protetor contra PCM (Goldani *et al.*, 1991). Na Colômbia, demonstrou-se risco 5,5 vezes maior de adoecer entre os portadores de HLA-A9 e B13 (Restrepo *et al.*, 1983). A análise desses dados sugere uma susceptibilidade genética à PCM.

2.4 Modo de infecção

Em quase todos os casos, o fungo *P. brasiliensis* invade o organismo humano pelas vias aéreas, provocando, habitualmente lesões primárias situadas na orofaringe e/ou laringe. As manifestações pulmonares podem decorrer diretamente da inalação de células fúngicas ou ser consequência de disseminação linfática ou hematogênica, a partir das lesões primárias (Borges-Walmsley *et al.*, 2002; Franco *et al.*, 1987).

Raramente, podem ser verificadas lesões tegumentares primárias. Em 1975, Castro e colaboradores descreveram o caso de um biólogo que inoculou acidentalmente material de linfonodo de um paciente com PCM no dorso de sua mão. A cura completa foi obtida após a exérese da lesão e o uso de Sulfametoxazol por 45 dias. Outros três casos de PCM cutânea primária foram descritos pelos mesmos autores, também com boa evolução e ausência de recidiva em seguimento de nove anos após sulfamidoterapia (Proença *et al.*, 1981). Gimenez (1994) descreveu dois casos de PCM com lesão perianal isolada em indivíduos que tinham o hábito de realizar higiene local com folhas. Há relato de um paciente cuja lesão, localizada na região cervical, foi precedida por um corte acidental na barbearia por lâmina presumivelmente contaminada (García-Bustínduy *et al.*, 2000). Não foi demonstrado em nenhum desses casos acometimento de outro órgão, além da pele, por *P. brasiliensis*.

2.5 Imunologia da PCM

Estudos pioneiros sobre a imunologia da PCM, realizados no final da década de 1980 e início da seguinte, já haviam evidenciado que a resistência à infecção por *P. brasiliensis* está associada à ativação efetiva de fagócitos, enquanto a ativação policlonal de linfócitos B, com conseqüente elevação dos níveis de anticorpos específicos, resulta em disseminação do fungo e maior gravidade da doença (Calich *et al.*, 1998).

Calich e Kashino (1998) verificaram em camundongos que a produção precoce de altos níveis de Fator de Necrose Tumoral (TNF)- α e Interferon (IFN)- γ seguida pela secreção sustentada de Interleucina (IL)-12 e IFN γ induz um fenótipo resistente à infecção por *P. brasiliensis*. Ao contrário, uma secreção transitória e discreta de TNF α e IFN γ , associada à produção de IL-5, IL-10 e Fator de Crescimento Tumoral (TGF)- β , é típica de animais susceptíveis, que desenvolvem doença progressiva. Ensaio mais recentes, usando citometria de fluxo e frequência de polimorfismos genéticos, comprovaram o importante papel das citocinas tipo Th1, sobretudo de IFN γ e TNF α , na determinação da resistência imunológica do hospedeiro contra *P. brasiliensis* (Diniz *et al.*, 2001; Bozzi *et al.*, 2004, 2006).

A administração de IL-12 também revelou papel protetor em camundongos, deflagrando um intenso infiltrado inflamatório mononuclear nos pulmões, com menor disseminação de *P. brasiliensis* para outros órgãos (Arruda *et al.*, 2002). Resultados similares foram encontrados por Romano e colaboradores (2002) ao adicionar IL-12 e anticorpos monoclonais neutralizantes anti-IL-10 a culturas de células mononucleares de sangue periférico (*Peripheral Blood Mononuclear Cells* – PBMC) de pacientes com PCM.

Esses achados foram ratificados por Souto e colaboradores (2003), que demonstraram que o IFN γ modula a produção de quimiocinas nos pulmões de camundongos infectados com *P. brasiliensis*, ao induzir quimiocinas associadas a resposta Th1 e seus receptores, conforme discutido adiante.

Pina e colaboradores (2004) demonstraram que camundongos deficientes em IL-4, quando infectados por *P. brasiliensis*, apresentavam concentrações pulmonares mais elevadas de IFN γ e menores de citocinas tipo Th2, tais como IL-5 e IL-10. Esse padrão resultava na formação de granulomas coesos e bem organizados, aumentando a capacidade de destruição do patógeno pelos macrófagos alveolares e, em consequência, reduzindo a carga fúngica.

Dosagens no soro dos pacientes com PCM aguda (tipo juvenil) demonstraram concentrações aumentadas de citocinas tipo Th2, tais como, IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β 1, e de anticorpos específicos tipo IgG4, IgE e IgA (Nogueira *et al.*, 2006b; Mamoni *et al.*, 2002; Mamoni & Blotta, 2005). Nos pacientes com PCM crônica (tipo adulto), há ativação preferencial da resposta imunológica tipo Th1 e baixos níveis séricos de anticorpos específicos (Mamoni *et al.*, 2002).

2.5.1 Papel do TNF e de seus receptores solúveis

O TNF, uma citocina pró-inflamatória produzida por diversas células, sobretudo macrófagos ativados, tem papel essencial nos mecanismos de defesa do hospedeiro, inclusive na resposta humana contra *P. brasiliensis* (Aderka, 1996; Calich & Kashino, 1998; Peschon *et al.*, 1998).

As atividades biológicas do TNF são mediadas por dois receptores de superfície estruturalmente relacionados, mas funcionalmente distintos. São eles: TNF-R p55 (ou TNF-R1, expresso por quase todos os tipos de células) e TNF-R p75 (ou TNF-R2, expresso primariamente por linfócitos T, linfócitos B, células de linhagem mielóide e células endoteliais). Ambos podem ser liberados na circulação por clivagem proteolítica, regulando, assim, os níveis das moléculas “livres” de TNF, que são biologicamente ativas (Aderka, 1996; Peschon *et al.*, 1998).

As interações entre a molécula de TNF e seus receptores solúveis (sTNF-R) são complexas. Esses receptores podem atuar como:

- a) Antagonistas de TNF, quando seus níveis são notavelmente mais elevados do que os da citocina;
- b) Proteínas carreadoras de TNF entre os compartimentos corporais;
- c) Estabilizadores da atividade biológica de TNF, prolongando sua meia-vida;
- d) “Tampões” de TNF, inibindo os efeitos da concentração elevada da citocina e liberando-a lentamente (Aderka, 1996).

Em várias doenças infecciosas, inflamatórias e auto-imunes, a concentração sérica de sTNF-R possui correlação mais estreita com a atividade da doença do que outros parâmetros considerados marcadores específicos da mesma (Aderka, 1996; Corvino *et al.*, 2007; Girardin *et al.*, 1992; Peschon *et al.*, 1998).

Corvino e colaboradores (2007) verificaram que os níveis de ambos os sTNF-R estão significativamente aumentados nos pacientes com PCM ativa em relação aos controles saudáveis. As concentrações de sTNF-R2 estão significativamente mais elevadas em pacientes com PCM aguda (tipo juvenil) do que naqueles com a forma crônica (tipo adulto) e diminuem progressivamente ao longo de dois anos de

tratamento. A concentração de sTNF-R2 permanece constante ao longo do tratamento nos pacientes com PCM crônica. Os níveis de sTNF-R1 foram mais elevados no grupo de PCM crônica e apresentaram redução gradual durante o seguimento. No grupo de PCM aguda, os níveis de sTNF-R1 apresentaram elevação progressiva ao longo dos dois anos de acompanhamento.

Em casos de tuberculose pulmonar, que, como a PCM, é doença infecciosa associada à formação de granuloma, os níveis séricos de sTNF-R1 e sTNF-R2 pré-tratamento estão elevados. Suas concentrações normalizam após quatro a seis meses de tratamento (Alessandri *et al.*, 2006).

Em outras doenças infecciosas, como hanseníase, malária, febre tifóide e endocardite bacteriana subaguda, os níveis séricos de sTNF-R1 e sTNF-R2 têm valor prognóstico (Keuter *et al.*, 1994; Kern *et al.*, 1992, 1993; Munk *et al.*, 1999). Pacientes com leishmaniose visceral não tratados apresentam altos níveis de sTNF-R1 e sTNF-R2 no soro em comparação com controles sadios. Nos pacientes com resposta terapêutica favorável, esses níveis caem abruptamente; nos casos refratários, por outro lado, eles permanecem elevados. Os pacientes que recidivam apresentam concentrações séricas crescentes de tais marcadores, em concomitância ao retorno dos sinais e sintomas da doença (Zijlstra *et al.*, 1995).

2.5.2 Papel das quimiocinas

As quimiocinas constituem uma grande família de citocinas de baixo peso molecular, de 8 a 15 kDa, com propriedade quimiotática seletiva. Elas participam do recrutamento de leucócitos para locais de inflamação em diversas condições; influenciam a maturação, o processo de *homing* relacionado à vigilância imunológica e a ativação de leucócitos; e contribuem para a patogênese de diversas doenças (Charo & Ransohoff, 2006; Colobran *et al.*, 2007a; Ono *et al.*, 2003).

As quimiocinas são agrupadas em quatro subfamílias: CXC, CC, CX3C e C, de acordo com o número de resíduos conservados de cisteína (C) na extremidade N-terminal da molécula e com o espaçamento entre eles. As várias quimiocinas e seus receptores são expressos por leucócitos, células endoteliais, epiteliais e musculares, entre outras (Charo & Ransohoff, 2006; Colobran *et al.*, 2007a; Ono *et al.*, 2003).

Os níveis das quimiocinas estão associados com a atividade de diversas doenças inflamatórias e infecciosas (Alessandri *et al.*, 2006; Moreira *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2005; Souza-Pereira *et al.*, 2006).

Pacientes com tuberculose ativa apresentam níveis aumentados de CXCL8, CXCL9, CCL11 e sTNF-R1. Esses níveis retornam ao seu valor basal após quatro a seis meses de tratamento, exceto CCL11, cujos níveis permanecem altos ao final dos seis meses de quimioterapia (Alessandri *et al.*, 2006).

Foi demonstrado que o IFN γ modula a produção de quimiocinas nos pulmões de camundongos infectados com *P. brasiliensis*, induzindo a secreção de CCL2, CCL3, CCL5, CXCL9 e CXCL10. Em consequência, promove a ativação de macrófagos e a formação efetiva de granulomas, que são essenciais para a proteção

do hospedeiro contra a disseminação de *P. brasiliensis*. No referido trabalho, verificou-se que CCL3 estimula a migração precoce de neutrófilos aos pulmões dos animais infectados por *P. brasiliensis*, até que os níveis de IFN γ atinjam concentrações adequadas; a partir daí, forma-se um infiltrado mononuclear (Souto *et al.*, 2003).

Na PCM, as dosagens séricas de CXCL9 e CXCL10 estão aumentadas nos pacientes com doença aguda ou crônica, em comparação com o grupo controle. Não há diferença estatística entre os níveis de CCL2 de pacientes e controles (Corvino *et al.*, 2007).

As quimiocinas CXCL9 e CXCL10 possuem propriedades quimiotáticas para células Th1 e bloqueiam a migração de células Th2, enquanto CCL11 e CCL24 são potentes quimiotáticos para eosinófilos, mastócitos e linfócitos Th2, com papel fundamental em processos alérgicos (Colobran *et al.*, 2007a).

CCL2 atrai células mononucleares, sobretudo monócitos, células dendríticas, células *Natural Killer* (NK) e linfócitos T de memória (Charo & Ransohoff, 2006; Colobran *et al.*, 2007a). Paradoxalmente, ela pode exercer quimiotaxia para basófilos e eosinófilos, participando em reações alérgicas e direcionando a polarização dos linfócitos T *helper* para Th2 (Gu *et al.*, 2000).

Flores-Villanueva e colaboradores (2005) evidenciaram que CCL2 pode inibir a produção de IL-12, aumentando, assim, a susceptibilidade do hospedeiro à infecção por *Mycobacterium tuberculosis*. Isso foi previamente descrito por Braun e colaboradores (2000), que observaram que tal inibição ocorria preferencialmente em monócitos ativados no sítio da inflamação, em comparação com células dendríticas derivadas de monócitos em linfonodos.

Foi também descrito que CCL2 inibe diretamente a produção de IL-12 por macrófagos e que níveis elevados da mesma são encontrados, em geral, em granulomas da esquistossomose, em que a resposta é tipo Th2, e não em granulomas de micobacterioses, nos quais a resposta é tipo Th1 (Chensue *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 1998). Por outro lado, estudos com células mononucleares de indivíduos saudáveis e de pacientes com tuberculose pulmonar ativa revelaram concentrações elevadas tanto de CCL2 quanto de CCL3 em resposta à infecção por *M. tuberculosis* (Sadek *et al.*, 1998).

CCL2 participa do fenômeno de imunorregulação, que é desejável na fase tardia de processos infecciosos, quando a carga parasitária já se encontra reduzida e um estado de ativação imunológica persistente é mais lesivo do que benéfico. As concentrações de outras quimiocinas, como CCL3 (de modo menos expressivo), CCL4 e CCL5, também estão aumentadas neste contexto, regulando a indução de tal fenômeno através da modulação da expressão de CCL2 (DePaolo *et al.*, 2004; Karpus *et al.*, 1998).

CCL3 é responsável pelo recrutamento de monócitos e linfócitos T, mas sua participação nos mecanismos de doenças não está completamente esclarecida. Seus níveis estão aumentados, por exemplo, na artrite reumatóide (Charo & Ronsohoff, 2006), na pneumonite de hipersensibilidade (Denis, 1995), na sarcoidose e na fibrose pulmonar idiopática (Standiford *et al.*, 1993). Essa quimiocina também está associada à esclerose múltipla e à susceptibilidade e progressão da infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (Colobran *et al.*, 2007b).

2.6 Quadro clínico

A PCM apresenta período de incubação longo, em média de 15 anos, variando de um a 60 anos. Isso pode ser verificado pela descrição de casos “importados” diagnosticados em áreas não-endêmicas, como Japão e países da Europa, em pacientes provenientes da América Latina (Brummer *et al.*, 1993; Ginarte *et al.*, 2003; Kamei *et al.*, 2003).

A PCM é uma doença evolutiva e sistêmica e, portanto, suas formas clínicas não são estáticas (Padilha-Gonçalves, 1996), o que dificulta a sua classificação.

Desde o consenso estabelecido em Medellín, na Colômbia, em 1986 (Franco *et al.*, 1987; Montenegro, 1986), a PCM é classificada como:

- a) **PCM-infecção**: período em que a doença encontra-se silenciosa, sem sinais ou sintomas aparentes. O hospedeiro pode desenvolver, nesta fase, resposta imunológica específica contra o fungo e, assim, a intradermorreação com paracoccidioidina pode ser positiva. Nesta fase, podem ocorrer:
 - a.1) Regressão do foco infeccioso, com destruição do fungo e formação de cicatrizes estéreis;
 - a.2) Regressão, com manutenção de fungos viáveis e formação de um foco quiescente, o qual pode ser responsável por manifestações tardias da doença ou por recidivas; ou
 - a.3) Progressão, levando ao aparecimento de sinais e sintomas;
- b) **PCM-doença**: caracterizada pelo aparecimento de manifestações clínicas, através da evolução direta do complexo primário (o qual se constitui da lesão de inoculação e de 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:

b.1) Forma aguda ou subaguda (tipo juvenil): a partir de uma lesão primária geralmente não detectada, ocorre progressão rápida por disseminação linfática ou linfo-hematogênica ao sistema mononuclear fagocitário (baço, fígado, linfonodos e medula óssea), com disfunção dos órgãos acometidos, que pode ser moderada ou intensa. Pode simular a evolução clínica de uma doença linfoproliferativa sistêmica, como a leucemia ou o linfoma. Representa 5% a 15% dos casos de PCM-doença. É mais comum em jovens, na primeira ou segunda décadas de vida, e ocorre igualmente em ambos os sexos. Sua taxa de letalidade é, em média, superior a 10%, e pior prognóstico associa-se à presença de icterícia e ascite (Nogueira *et al.*, 2006a). 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. Observam-se, ao exame histopatológico, granulomas frouxos com grande número de células leveduriformes que se multiplicam ativamente;

b.2) Forma crônica (tipo adulto): a partir do complexo primário ou de um foco quiescente, a doença progride lentamente para o estabelecimento de sintomatologia leve, moderada ou intensa, eventualmente fatal. Representa cerca de 85% a 95% dos casos de PCM-doença. É mais comum em adultos do sexo masculino.

Sua apresentação clínica mais freqüente é a pulmonar ou tegumentar, com ou sem linfadenomegalia reacional. A resposta imunológica é variável, de acordo com a gravidade das manifestações clínicas. Em relação à forma aguda, verificam-se, ao exame histopatológico, mais granulomas epitelióides compactos com menor número de células fúngicas. Pode ser:

b.2.1)Unifocal: quando um único órgão ou sistema é acometido.

O órgão afetado com maior freqüência é o pulmão, caracterizando a forma unifocal pulmonar. É eventual o envolvimento mucocutâneo isolado (forma unifocal tegumentar). Em situações mais raras, a doença pode se manifestar exclusivamente em um foco metastático em qualquer outro órgão, o que caracteriza a forma unifocal extra-pulmonar. Um exemplo peculiar dessa forma é a neuroparacoccidioidomicose, que pode afetar qualquer área do sistema nervoso central, sendo mais comuns as lesões intracranianas expansivas (Almeida *et al.*, 2004);

b.2.2)Multifocal: por disseminação broncogênica, linfática ou hematogênica, o fungo atinge outros órgãos ou sistemas, como pele, mucosas, linfonodos, sistema nervoso central, intestinos, ossos, adrenais e órgãos genitais;

- c) **Formas residuais ou seqüelas**: apesar de não haver mais células viáveis do parasita, a fibrose resultante do processo inflamatório pode resultar em disfunções diversas, dependendo do órgão afetado (insuficiência pulmonar, adrenal, renal, colestase, etc.).

A doença, sendo dinâmica e polimórfica, costuma apresentar recidivas, nas quais as manifestações clínicas podem diferir daquelas ocorridas em episódios prévios. Variações na intensidade, extensão, disseminação e características das lesões dependem basicamente de alterações da virulência do fungo e de flutuações da resposta imunológica do hospedeiro. Todos esses fatores tornam complexo o estabelecimento de uma classificação adequada para a doença (Franco *et al.*, 1987; Padilha-Gonçalves, 1996). A palavra “cura” não é apropriada aos casos de PCM. Pela dificuldade de erradicação do fungo, os pacientes têm o risco potencial de apresentar uma recidiva tardia a qualquer momento; assim, o termo mais adequado é “cura clínica” ou “cura aparente” (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

2.7 Diagnóstico

Alguns exames laboratoriais são úteis para confirmar a suspeita clínica de PCM. Entre eles, podem-se citar os exames micológicos, anátomo-patológicos e sorológicos.

2.7.1 Micológico

Sendo a PCM uma doença infecciosa, seu diagnóstico de certeza é estabelecido pelo encontro de células fúngicas em exames microbiológicos. Ao exame direto de espécimes clínicos diversos, de acordo com a forma clínica da doença, as células leveduriformes de *P. brasiliensis* são identificadas com relativa facilidade pela sua morfologia peculiar. O fungo apresenta crescimento lento em meios de cultura, demorando em média duas a três semanas para iniciar seu desenvolvimento em ágar Sabouraud-dextrose, à temperatura ambiente ou a 37 °C. A taxa de isolamento de *P. brasiliensis* a partir dos espécimes clínicos varia de 86% a 100%. O espécime clínico também pode ser inoculado em animal suscetível à PCM (hamster, rato ou camundongo), geralmente por via testicular ou intraperitoneal, sendo, então, identificado em tecidos ou culturas; esse método, porém, é utilizado quase exclusivamente em laboratórios de pesquisa (Brummer *et al.*, 1993; Marques, 2003; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

2.7.2 Anátomo-patológico

A identificação do parasita em tecidos constitui método diagnóstico de grande relevância, sendo muito utilizado na prática clínica. De acordo com Camargo e Franco (2000) e Marques (1998), a inflamação paracoccidióidica pode assumir padrões que se correlacionam fortemente com a resposta imunológica do paciente:

a) **Granulomatoso-epitelióide**: o granuloma pode ser compacto ou frouxo.

a.1)**Granuloma compacto**: o granuloma é bem definido, de padrão tuberculóide, formado por células epitelióides e células gigantes multinucleadas, freqüentemente numerosas, muitas contendo o fungo degenerado, em quiescência ou em reprodução ativa. Podem ser observados linfócitos, plasmócitos, eosinófilos e células *Natural Killer* (NK). É considerado o padrão mais eficiente para limitar a disseminação do patógeno;

a.2)**Granuloma frouxo**: a reação epitelióide é mal definida. São observadas células gigantes multinucleadas em número variável e inflamação predominantemente exsudativa, com edema e congestão, o que confere o aspecto de frouxidão à lesão;

b) **Necrosante-exsudativo**: a necrose pode ser isquêmica, por falta de aporte sanguíneo; caseosa, semelhante à observada nas lesões de tuberculose; gomóide, liquefativa, com fungos numerosos; ou supurativa, em padrão semelhante a abscesso, com numerosos neutrófilos e fungos;

c) **Misto (granulomatoso-necrosante)**: observa-se combinação dos elementos descritos, com padrão granulomatoso na periferia da lesão e necrose central.

2.7.3 Sorológico

Dentre os métodos diagnósticos indiretos, as reações sorológicas são as mais utilizadas na prática clínica. A sorologia para a PCM, além de auxiliar no diagnóstico, é útil no controle de cura dos pacientes. Com o uso de técnicas padronizadas e antígenos adequados, a sensibilidade e a especificidade desses testes variam de 85% a 100% (Marques, 2003; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

Em geral, os pacientes com PCM não têm produção deficiente de anticorpos específicos, desde que não haja a concomitância de imunossupressão. Nas formas agudas disseminadas, os títulos de IgG anti-*P. brasiliensis* são habitualmente mais elevados do que em pacientes com quadros clínicos crônicos mais localizados; nesses últimos, eventualmente o resultado do teste sorológico é falso-negativo. (Brummer *et al.*, 1993; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

A detecção de anticorpos em pacientes com PCM apresenta variações. Assim, é freqüente o aumento de IgM em casos com lesões em linfonodos, de IgA em pacientes com menos de um ano de doença e de IgE quando existe deficiência da imunidade celular, sobretudo diante de evolução aguda ou subaguda grave (Brummer *et al.*, 1993).

O antígeno mais utilizado em reações sorológicas para detecção da doença é a gp43. Trata-se do principal antígeno exocelular de *P. brasiliensis* na fase de levedura. Os testes que utilizam esse antígeno, no entanto, podem apresentar reação cruzada com soros de casos de histoplasmose, lobomicose ou, mais raramente, aspergilose. A preparação de um antígeno apropriado tem sido o maior problema dos exames imunológicos; essa etapa é mais importante do que

propriamente a técnica sorológica (Camargo & Franco, 2000; Marques, 2003; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

A imunodifusão dupla é uma das técnicas sorológicas mais utilizadas para diagnóstico da infecção por *P. brasiliensis*, com sensibilidade de 65% a 95% e especificidade em torno de 97%. A técnica de contra-immunoeletoforese, com especificidade semelhante e sensibilidade discretamente superior, também representa recurso diagnóstico confiável. Ambos os testes, por serem qualitativos e quantitativos, permitem acompanhamento de controle de cura (Camargo & Franco, 2000; Marques, 2003).

O ensaio imunoenzimático (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay* – ELISA) é mais rápido e mais apropriado para teste simultâneo de grande número de soros (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). O seu uso inicial na PCM foi realizado em 1976 na Argentina (Pons *et al.*, 1976). Sua sensibilidade situa-se próxima de 100% e sua especificidade, em torno de 88% (Mendes-Giannini *et al.*, 1984). Pode ser obtida especificidade entre 97% e 100% com a técnica de “ELISA-abs”, na qual é feita absorção prévia do soroteste com filtrado antigênico de *H. capsulatum* (Camargo & Franco, 2000; Marques, 2003; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

A técnica de *immunoblotting* permite especificar os tipos de anticorpos séricos contra os diversos determinantes antigênicos do fungo. Dois estudos distintos mostraram que, além da gp43, que é o antígeno imunodominante, reconhecido por 100% dos pacientes, também outros quatro determinantes apresentam alta reatividade com IgG: os antígenos com 70, 52, 43 e 20-21 kDa. O método é altamente sensível e permite seguimento da redução dos títulos ao longo do tratamento, mas sua grande desvantagem é o custo elevado (Blotta & Camargo,

1993; Camargo *et al.*, 1989; Camargo & Franco, 2000; Marques, 2003; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

A reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) possibilita a amplificação de quantidades mínimas de material genético do patógeno em diversos espécimes clínicos e, portanto, tem sensibilidade altíssima. Os maiores desafios do método são o desenvolvimento de substratos específicos – os *primers* – para a reação e a preservação da integridade do material genético do fungo na amostra. Essa técnica ainda não é utilizada de rotina para diagnóstico da PCM, sendo restrita a centros de pesquisa (Gomes *et al.*, 2000; Marques, 2003; Ricci *et al.*, 2007; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

2.7.4 Intradermorreação

Na PCM, a intradermorreação não tem valor para o diagnóstico da doença, mas, sobretudo, em inquéritos epidemiológicos, para identificação de indivíduos que já tiveram contato com o fungo, ou seja, PCM-infecção. Há imensa variedade de antígenos que podem ser utilizados, os quais são denominados paracoccidioidinas. A reatividade a esses antígenos pode ser um método complementar útil na avaliação do estado imunológico dos pacientes com as diversas manifestações da doença. A conversão de um paciente com doença grave, antes não reativo ao teste, e que se torna reativo durante o tratamento, é sinal de melhora da imunidade celular, o que sugere bom prognóstico (Brummer *et al.*, 1993; Negroni & Robles, 1974).

2.8 Tratamento

Para o tratamento da PCM, têm-se disponíveis diversos medicamentos eficazes, mas com limitação decorrente de sua toxicidade, interação medicamentosa ou custo. De modo geral, *P. brasiliensis* é um fungo sensível à maioria das drogas antifúngicas (Marques, 2003; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

A Sulfapiridina foi a primeira droga utilizada no tratamento da PCM (Ribeiro, 1940). A sulfamidoterapia oral, utilizando Sulfadiazina ou a combinação Sulfametoxazol e Trimetoprim (800 mg / 160 mg, a cada oito ou 12 horas), apesar da menor eficácia em comparação com os demais esquemas terapêuticos da PCM, tem custo relativamente baixo e está disponível na rede pública de saúde de quase todos os municípios do Brasil. É indicada principalmente nos casos benignos ou localizados da doença. Também pode ser usada como terapia de manutenção, a ser iniciada após seis meses de tratamento com outra droga, com a finalidade de reduzir as recidivas da doença, que são muito comuns. Devido à menor eficácia antifúngica dessa classe de drogas, sugere-se um tratamento mais longo, de dois a cinco anos, se for usada isoladamente. A taxa de recidivas é alta: pode atingir 35% nos pacientes acompanhados por 10 anos após a interrupção do tratamento (Brummer *et al.*, 1993; Marques, 2003; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

A Anfotericina B foi a segunda droga introduzida no tratamento da PCM (Lacaz & Sampaio, 1958). Por sua elevada toxicidade sistêmica, sobretudo renal, e por ser administrada por via endovenosa, deve ser reservada para casos graves de PCM, que necessitem de pronta intervenção. Possui ampla ação antifúngica. A dose diária varia de acordo com a tolerância do paciente, sendo no máximo 50 mg/dia, até

se atingir dose acumulada que varia de 1,5 g até 5 g, de acordo com a gravidade do quadro clínico. As apresentações lipossomais da droga têm toxicidade bastante inferior, porém seu custo é muito elevado. A resposta terapêutica é usualmente rápida; entretanto, sugere-se que seja associada com sulfamidoterapia para se evitarem as recidivas, que ainda assim podem ocorrer em 20% a 30% dos casos (Brummer *et al.*, 1993; Marques, 2003; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

Os derivados azólicos constituem opção de grande uso em nosso meio. Seu uso, na maioria dos casos, pode ser suspenso com segurança após 12 a 18 meses de tratamento. O Itraconazol (100 a 200 mg/dia) tem sido a droga de escolha, por sua maior eficácia e tolerância. Permite o controle das formas leves e moderadas da PCM em menor tempo e com menor taxa de recidivas, isto é, 3% a 5% dos casos. O Cetoconazol (200 a 400 mg/dia) é uma alternativa de custo menor, também eficaz; entretanto, possui hepatotoxicidade significativa e interação com inúmeras drogas. A taxa de recidiva em seguimento de três anos após sua suspensão é de 11%. O Fluconazol (150 a 450 mg/dia) não é tão eficaz quanto os demais azólicos. É utilizado por via endovenosa como droga de escolha em casos de PCM do sistema nervoso central, por ser o azólico que possui melhor penetração na barreira hematoencefálica (Brummer *et al.*, 1993; Marques, 2003; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

A Caspofungina não demonstrou eficácia *in vitro* contra *P. brasiliensis*. Outros medicamentos, como Saperconazol, Voriconazol e Terbinafina ainda têm uso limitado no tratamento da PCM em nosso meio, devido à falta de estudos controlados sobre os mesmos e ao seu alto custo (Marques, 2003; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

2.9 Controle de cura e profilaxia

A determinação do momento correto para a interrupção do tratamento constitui uma preocupação importante na abordagem do paciente com PCM. Os critérios atuais para definição de cura da PCM, segundo o Consenso em Paracoccidiodomicose (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006) são os seguintes:

- a) Clínico: regressão dos sinais e sintomas da PCM, incluindo a cicatrização das lesões tegumentares, involução das linfadenopatias e recuperação do peso corporal. Sintomas residuais que eventualmente persistam, sejam respiratórios, laríngeos, gastrintestinais, adrenais ou neurológicos, não representam necessariamente atividade da doença;
- b) Radiológico: estabilização de alterações à radiografia de tórax, ultrasonografia abdominal, tomografia computadorizada e/ou ressonância magnética, registradas com intervalo de três meses;
- c) Sorológico: títulos negativos ou baixos (inferiores a 1:2) de testes sorológicos anti-*P. brasiliensis*, observados em duas amostras de soro coletadas com intervalo de seis meses, após tempo recomendado de tratamento com cada droga, de acordo com a gravidade do quadro clínico.

Até atingirem a inatividade clínica, o que usualmente ocorre nos primeiros três meses de tratamento, os pacientes devem ser avaliados mensalmente. A seguir, os retornos passam a ser trimestrais ou semestrais. Os controles clínico, micológico e imunológico devem ser realizados a intervalos semestrais e, após, anualmente, a fim de se fazer diagnóstico precoce de recidivas e instituir prontamente a sua terapêutica. A intradermorreação com paracoccidiodina deve ser realizada antes e

depois do tratamento; ela pode apresentar viragem com a terapia apropriada, o que indica melhora do ramo celular da resposta imunológica adaptativa do paciente contra o parasita (Brummer *et al.*, 1993; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

A profilaxia da PCM é ainda assunto complexo, haja vista que seu agente etiológico não foi identificado até o presente em seu habitat natural e parece estar associado a hospedeiros animais, o que torna inviável a sua erradicação. Por outro lado, diversos pesquisadores têm-se dedicado ao desenvolvimento de vacinas anti-PCM, utilizando frações de gp43, com estímulo à produção de IFN γ por linfócitos T CD4⁺, o que favoreceria o ramo celular da resposta imunológica adaptativa em detrimento de seu ramo humoral, tornando mais eficiente a defesa do hospedeiro contra *P. brasiliensis* (Deepe, 1997). Dados recentes de diversos grupos de pesquisa sugerem que os imunobiológicos baseados num único epítopo não são eficientes o bastante para induzir uma resposta imunológica protetora completa. A combinação de múltiplos epítopos de linfócitos B e/ou T num *pool* ou reunidos num único polipeptídeo apresentou aumento na imunogenicidade de 48% para 86% em termos de reconhecimento pelo sistema imunológico dos pacientes avaliados. Essa abordagem revela que é possível o desenvolvimento de um imunobiológico que poderia atuar como coadjuvante à terapia antifúngica, melhorando sua eficácia e reduzindo o tempo de tratamento dos pacientes com PCM (Iwai *et al.*, 2007).

3 JUSTIFICATIVA

Na literatura pesquisada, os únicos estudos de pacientes com PCM que descrevem aspectos relacionados à inatividade da doença, bem como fatores associados a bom ou mau prognóstico, foram publicados por um grupo de pesquisa em Infectologia Pediátrica de Belo Horizonte, Minas Gerais. Na referida casuística, são estudados 38 crianças e adolescentes com PCM aguda (Nogueira *et al.*, 2006a,b). Não há trabalhos semelhantes com casos de PCM crônica.

Quanto aos critérios de cura definidos pelo Consenso em Paracoccidiodomicose (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006), há muitas limitações na prática clínica. Os testes sorológicos não estão disponíveis na rotina da maioria dos serviços públicos de saúde. Além do mais, não há nenhum parâmetro realmente confiável que se correlacione com a atividade da doença e o fato de proceder de acordo com as recomendações do consenso não é suficiente para se prevenirem as recidivas da PCM. Alguns marcadores inflamatórios, como sTNF-R e quimiocinas, em associação aos critérios clínico-laboratoriais e aos resultados sorológicos, poderiam auxiliar na determinação do momento adequado para a suspensão da terapia antifúngica nos pacientes com PCM.

Apenas um trabalho (Corvino *et al.*, 2007), com seguimento de 24 meses, apresenta dosagens de sTNF-R e quimiocinas em pacientes com PCM. Seus resultados demonstram aumento significativo dos níveis de marcadores associados a resposta tipo Th1 nos pacientes com PCM ativa, em relação aos controles sadios. No entanto, mais estudos e com tempo de seguimento maior são necessários para se avaliar a utilidade desses parâmetros na prática clínica.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar o perfil clínico e imunológico de pacientes com PCM crônica, buscando estabelecer parâmetros para seu controle de cura.

4.2 Objetivos específicos

- a) Descrever as características sócio-demográficas e clínicas da população estudada;
- b) Determinar o tempo médio decorrido desde o início do tratamento antifúngico pelos pacientes até a inativação clínica da doença;
- c) Identificar fatores associados ao prognóstico dos pacientes com PCM crônica;
- d) Estudar o comportamento dos anticorpos anti-*P. brasiliensis*, dos receptores solúveis de TNF e de quimiocinas nos pacientes com PCM crônica ao diagnóstico e ao longo do tratamento;
- e) Correlacionar os parâmetros sorológicos e os níveis de marcadores inflamatórios entre si e com a atividade da doença;

- f) Estabelecer critérios para o controle de cura da doença e interrupção do tratamento com base nos parâmetros sorológicos e inflamatórios estudados.

5 PACIENTES E MÉTODOS

Este trabalho é composto por duas partes: um estudo clínico e um estudo imunológico. Foi realizado com pacientes do Ambulatório de Paracoccidiodomicose do Centro de Treinamento e Referência de Doenças Infecto-Parasitárias – CTR-DIP, Anexo Orestes Diniz, do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

O estudo clínico envolveu todos os pacientes com PCM crônica atendidos no referido Serviço, desde março de 2001 até dezembro de 2006, totalizando 75 pacientes.

O estudo imunológico foi realizado numa amostra dessa população, composta por 26 pacientes, conforme descrito a seguir.

Para documentar o aceite em participar do estudo, os pacientes assinaram um termo de consentimento pós-informado (APÊNDICE A).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – COEP/UFMG (ANEXO).

5.1 Estudo clínico

O estudo clínico envolveu todos os pacientes com PCM crônica atendidos no referido Serviço, desde março de 2001 até dezembro de 2006, totalizando 75 pacientes.

5.1.1 População estudada

Foram acompanhados 75 pacientes adultos em avaliações semestrais desde a primeira consulta e o início da terapia antifúngica. Em cada avaliação, os pacientes foram submetidos a anamnese detalhada e exame clínico geral, conforme protocolos padronizados para primeira consulta (APÊNDICE B) e consultas subseqüentes (APÊNDICE C).

Todos os pacientes apresentavam a forma crônica da PCM (tipo adulto), em estádios diversos de gravidade, comprovada por achado de *P. brasiliensis* em exame micológico direto de espécimes clínicos ou em exame anátomo-patológico de biópsias de tecidos.

Com a finalidade de avaliar o estado clínico dos pacientes e de excluir outras doenças, foram realizados de rotina em todos os pacientes os seguintes exames:

- a) Hematológicos (hemograma, coagulograma e velocidade de hemossedimentação);
- b) Bioquímicos de sangue (glicemia de jejum, perfil lipídico, ferro sérico e ferritina, provas de função renal e hepática, ionograma);
- c) Sorológicos (VDRL, anti-HIV, anti-EBV – Epstein-Barr vírus, sorologia para hepatites virais, toxoplasmose, citomegalovirose, doença de Chagas);
- d) Radiografia de tórax em duas incidências;
- e) Ultra-sonografia abdominal total;
- f) Teste tuberculínico;
- g) Prova de função pulmonar (espirometria);
- h) Eletrocardiograma;

- i) Exame de rotina de urina;
- j) Exame parasitológico de fezes.

Outros exames laboratoriais foram solicitados de acordo com a indicação clínica do médico assistente.

Conforme o Consenso em Paracoccidiodomicose (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006), inatividade clínica foi definida como ausência de sinais ou sintomas atribuídos à PCM, associada à normalização dos exames laboratoriais e radiológicos. Casos com alterações compatíveis com seqüelas da doença foram avaliados cuidadosa e seriadamente para melhor definição do estado de atividade da mesma.

Na primeira consulta e, posteriormente, a cada seis meses, todos os pacientes foram submetidos a coleta de sangue para a realização de testes sorológicos e dosagem sérica de marcadores inflamatórios (sTNF-R1, sTNF-R2 e quimiocinas), conforme descrito a seguir.

5.1.2 Critério de inclusão

Foram incluídos no estudo todos os pacientes atendidos no Ambulatório de Paracoccidiodomicose do CTR-DIP, Anexo Orestes Diniz, do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, de março de 2001 a dezembro de 2006, com diagnóstico de PCM crônica confirmado por exame clínico e achado do parasita em exame micológico direto de espécimes clínicos ou em exame anátomo-patológico de biópsias de tecidos.

Não foi realizado cálculo amostral. Haja vista que a PCM não é doença de notificação compulsória, sua prevalência não é conhecida ao certo; portanto, foram estudados todos os pacientes atendidos no serviço supramencionado, que é referência no estado de Minas Gerais para o tratamento de PCM.

5.1.3 Critério de exclusão e perdas

O critério de exclusão foi a recusa do paciente em participar do estudo. Nenhum dos pacientes atendidos no referido Serviço foi excluído do estudo clínico.

Dez pacientes foram atendidos apenas uma vez. As informações obtidas na primeira consulta dos mesmos foram avaliadas; porém, como não houve retorno, eles constituíram perdas no estudo prospectivo, que analisou a evolução dos casos, sobretudo com relação à inatividade clínica.

5.2 Estudo imunológico

As dosagens de marcadores inflamatórios por ensaio imunoenzimático (teste ELISA) foram realizadas no Laboratório de Imunofarmacologia do Instituto de Ciências Biológicas – ICB/UFMG, coordenado pelo Prof. Mauro Martins Teixeira, sob supervisão e orientação do Prof. Antônio Lúcio Teixeira Jr.

5.2.1 População estudada

O estudo imunológico foi realizado numa amostra de 26 pacientes do total de 75 atendidos no Ambulatório de Paracoccidioidomicose de março de 2001 a dezembro de 2006. Foram utilizadas amostras coletadas na ocasião do diagnóstico e após seis, 12 e 36 meses de tratamento.

Para comparação, foram recrutados 37 voluntários sadios pareados com os mesmos por idade. Todos os voluntários foram submetidos a anamnese e exame clínico detalhado para se excluir a presença de doenças como micoses subcutâneas ou sistêmicas, tuberculose, hanseníase, leishmaniose, doença de Chagas e doenças inflamatórias auto-imunes.

5.2.2 Critério de inclusão

Foram incluídos no estudo imunológico os pacientes do estudo clínico que tinham amostras de soro em pelo menos três das quatro ocasiões testadas (primeira consulta, seis meses, 12 meses e 36 meses). O total de 26 pacientes preencheu tal critério. Não foi realizado cálculo amostral para determinação do número de pacientes deste estudo; foi utilizada a amostra de conveniência.

5.2.3 Critério de exclusão e perdas

Foram excluídos do estudo imunológico os pacientes do estudo clínico que tinham duas ou menos amostras de soro devido a perdas por falhas na coleta, processamento ou armazenamento.

5.2.4 Processamento do sangue para obtenção do soro

O sangue foi coletado de forma asséptica em tubos de vácuo, sem anticoagulante. Logo após, foi centrifugado a 1.500 rpm, por 5 minutos. O sobrenadante (soro) foi, então, transferido para microtubos Eppendorf de 500 µL, em alíquotas de 200 µL. Essas alíquotas foram identificadas com as iniciais do paciente e a data da coleta e, em seguida, armazenadas a -70°C até a realização dos experimentos.

5.2.5 Dosagem de anticorpos IgG anti-*P. brasiliensis* (Pb) no soro

Os experimentos para dosagem sérica de anticorpos IgG contra antígenos somáticos de *P. brasiliensis* foram realizados através de testes ELISA no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas – ICB/UFMG, coordenado pelo Prof. Alfredo Miranda

de Góes. Os resultados das dosagens são apresentados em densidade óptica (*Optical Density* – OD) no comprimento de onda de 492 nm.

5.2.6 Processamento do soro para dosagem de IgG anti-Pb, sTNF-R1 e R2

As alíquotas de soro foram deixadas em temperatura ambiente, até descongelamento. O anticorpo de captura, na concentração fornecida pelo fabricante (DuoSet R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), foi diluído em PBS (solução salina com tampão fosfato – *Phosphate Buffered Saline*) e foi adicionado a cada poço da placa. Todas as placas foram deixadas durante a noite em geladeira, a 4°C. As alíquotas também foram deixadas na mesma temperatura durante esse intervalo, em tubos Eppendorf.

5.2.7 Processamento do soro para dosagem de quimiocinas

As alíquotas de soro foram deixadas em temperatura ambiente, até descongelamento. O excesso de proteínas foi removido por precipitação através da adição de sal e ácido, conforme realizado rotineiramente no Laboratório de Imunofarmacologia do Instituto de Ciências Biológicas – ICB/UFMG. Um volume de 200 µL de solução contendo ácido trifluoracético a 1,2% e cloreto de sódio (NaCl) a 1,35M foi adicionado a cada alíquota de soro. Após homogeneização, essas amostras foram deixadas por 7 minutos a temperatura ambiente e, em seguida,

centrifugadas a 10.000 rpm, a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante (300 µL) foi retirado e seu pH foi ajustado para 7,4.

O anticorpo de captura, na concentração fornecida pelo fabricante (DuoSet R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), foi diluído em PBS e adicionado a cada poço da placa. Todas as placas foram deixadas durante a noite em geladeira, a 4°C. As amostras preparadas também foram mantidas na mesma temperatura durante esse intervalo, em tubos Eppendorf.

5.2.8 Processamento das amostras para realização dos testes ELISA

Após incubação durante a noite, as placas foram lavadas quatro vezes com solução de Tween 20 (Sigma) a 0,05% em PBS. Em seguida, cada poço da placa foi bloqueado com BSA (albumina de soro bovino – *Bovine Serum Albumine*) a 10% em PBS e incubado por 1 hora em temperatura ambiente antes de ser submetido a nova lavagem, igual à anterior. As amostras foram adicionadas aos poços (100 µL/poço) e as placas foram deixadas durante a noite em geladeira, a 4°C.

No dia seguinte, as placas foram lavadas, conforme descrito, e o anticorpo de detecção, na concentração fornecida pelo fabricante, foi diluído em PBS e adicionado a cada poço. As placas, então, foram incubadas em temperatura ambiente por duas horas e, em seguida, novamente lavadas, conforme descrito acima.

A cada poço, foi adicionado como substrato cromogênico o reagente α -fenilenediamina, e a placa foi deixada em recipiente escuro por tempo máximo de 15

minutos. Ao final desse período de repouso, a reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 1M a cada poço. A leitura foi realizada por um leitor de placas de ELISA em comprimento de onda de 492 nm (EMax[®] Precision Microplate Reader, Molecular Devices, California, CA, USA). A transferência dos dados para o computador e sua análise foi feita pelo programa SoftMax Pro 5 (Molecular Devices, California, CA, USA).

Para dosagem de sTNF-R1 e sTNF-R2, foram utilizados kits de ELISA sanduíche (DuoSet R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) com limite de detecção de 5 pg/mL. Para a dosagem de CCL2, CCL3, CCL11 e CCL24 foram utilizados kits semelhantes, do mesmo fabricante, com limite de detecção de 10 pg/mL. Para a dosagem de CXCL9, foi utilizado kit de ELISA sanduíche com anticorpos pareados (Pharmigen, San Diego, CA, USA), com limite de detecção de 10 pg/mL.

5.3 Desenho do estudo

Trata-se de estudo prospectivo, descritivo e analítico. Foram acompanhados 75 pacientes adultos atendidos no ambulatório supramencionado, entre março de 2001 e dezembro de 2006. Foram estudadas as características clínicas e epidemiológicas desses pacientes e eles foram avaliados quanto à sua evolução e os possíveis fatores que influenciaram a mesma, tendo como variável dependente a “inatividade clínica”.

Para o estudo imunológico, foram utilizadas as amostras de soro de 26 dos pacientes, na ocasião do diagnóstico e após seis, 12 e 36 meses de tratamento. Para

comparação, foram recrutados 37 voluntários sadios pareados com os mesmos por idade. Nesses 63 indivíduos, foram dosados marcadores inflamatórios, conforme descrito.

5.4 Análise estatística dos dados

Os dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes do estudo foram organizados em banco de dados (APÊNDICE D) no programa SPSS 15.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A análise descritiva, a distribuição de frequência das variáveis estudadas e a regressão logística binária para identificação das covariáveis associadas à variável-resposta “inatividade clínica” foram realizadas com o referido programa.

A regressão logística é usada para prever um resultado com base em valores de um conjunto de variáveis. É similar à regressão linear, mas nessa as variáveis são contínuas. A regressão logística binária é adequada para modelos em que a variável dependente é dicotômica; as variáveis independentes podem ser intervalares ou categóricas. Quando há mais do que dois resultados possíveis e eles não possuem uma ordenação inerente, usa-se a regressão logística multinomial. Quando há mais de dois resultados possíveis e eles são ordenados, usa-se a regressão ordinal. Quando há mais de dois resultados possíveis e as variáveis independentes são contínuas, usa-se a análise discriminante. Quando a variável dependente é contínua e algumas variáveis independentes ou todas elas são categóricas, usa-se o modelo linear generalizado univariado (SPSS 15.0, 2006).

Os dados dos testes ELISA foram testados quanto à normalidade de distribuição e plotados em gráficos de dispersão, nos quais as linhas representam as medianas. Foi realizada análise não-paramétrica com o teste Mann-Whitney para comparação de dados não-pareados de dois grupos. Diferenças entre três ou mais grupos foram avaliadas usando-se o teste Kruskal-Wallis e o pós-teste Dunn de comparação múltipla. O teste de Spearman foi utilizado para avaliar a correlação entre os parâmetros estudados. O nível de significância estatística foi estabelecido em $p < 0,05$.

Curvas ROC (*Receiver-Operator Characteristic*) foram utilizadas para definir os valores de corte das concentrações séricas dos marcadores inflamatórios. Para o objetivo do presente estudo, o valor de corte escolhido para cada parâmetro foi aquele que maximizou a soma de sensibilidade e especificidade (Kelly *et al.*, 2008; Youden, 1950).

Todos os cálculos foram feitos pelos programas GraphPad Prism versão 4.00 para Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) e SPSS 15.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

5.5 Pesquisa bibliográfica

O levantamento bibliográfico foi realizado nos bancos de dados da PubMed (Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos da América). Os termos pesquisados foram selecionados nos Descritores em Ciências da Saúde (DeCS): “paracoccidioidomycosis” ou “paracoccidioides” AND “immunology”, “cytokine”,

“chemokine”, “tnf”, “tnf receptor”, “epidemiology”, “ecology”, “serology”, “pathogenesis”, “treatment”. Os termos foram pesquisados nos campos título e resumo. Não foram utilizados filtros de data, para se conseguir localizar trabalhos de importância histórica na investigação da doença. A partir das referências dos artigos lidos e de artigos indicados como correlatos pelo banco de dados PubMed, foram identificados outros trabalhos relevantes para o presente estudo.

6 RESULTADOS

Ao longo do período de coleta, de março de 2001 a dezembro de 2006, foram atendidos 75 pacientes com PCM no Ambulatório de Paracoccidioidomicose do CTR-DIP, Anexo Orestes Diniz, do Hospital das Clínicas – UFMG.

6.1 Características clínicas e epidemiológicas da população estudada

A idade dos pacientes estudados variou de 18 a 74 anos, sendo a média \pm desvio-padrão de $44,6 \pm 14,4$ anos. A proporção de gênero masculino/feminino foi de 64/11 (85% eram homens e 15%, mulheres). A distribuição dos pacientes por faixa etária é apresentada na TAB. 1. Dezesesseis (21%) pacientes tinham 31 a 40 anos na primeira consulta; 20 (27%), entre 41 e 50 anos; e 13 (17%), entre 51 e 60 anos.

TABELA 1
Distribuição por faixa etária, na primeira consulta, dos pacientes com PCM crônica
atendidos no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006.

Faixa etária	N (%)
Abaixo de 20 anos	3 (4)
De 21 a 30 anos	11 (15)
De 31 a 40 anos	16 (21)
De 41 a 50 anos	20 (27)
De 51 a 60 anos	13 (17)
De 61 a 70 anos	9 (12)
Acima de 71 anos	3 (4)
TOTAL	75 (100)

A maioria dos pacientes era procedente de área rural do estado de Minas Gerais (48 casos; 64%); 21 (28%) vinham de áreas urbanas de Minas Gerais e 4 (5%), de outros estados, sendo dois do Espírito Santo, um da Bahia e um de Goiás (TAB. 2).

TABELA 2
Procedência dos pacientes com PCM crônica atendidos no Hospital das Clínicas –
UFMG, 2001-2006.

Procedência	N (%)
Minas Gerais – área rural	48 (64)
Minas Gerais – área urbana	21 (28)
Outros estados	4 (5)
Não informado	2 (3)
TOTAL	75 (100)

De acordo com a Classificação Brasileira de Ocupações (CBO – Brasil, 2003), 29 (38,7%) pacientes eram, na primeira consulta, trabalhadores da construção civil, 27 (36%) eram trabalhadores agrícolas e 8 (11%) eram trabalhadores de serviços domésticos em geral (TAB. 3).

TABELA 3
Profissão, na primeira consulta, dos pacientes com PCM crônica atendidos no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006.

Profissão	N (%)
Trabalhador da construção civil	29 (38,7)
Trabalhador agrícola	27 (36)
Trabalhador de serviços domésticos	8 (11)
Outra	10 (13)
Não informado	1 (1,3)
TOTAL	75 (100)

Entre os trabalhadores da construção civil, 48% eram procedentes de áreas rurais de Minas Gerais e 41%, de áreas urbanas do estado. Entre os trabalhadores agrícolas, as respectivas proporções foram de 78% e 18% e entre os trabalhadores de serviços domésticos, de 88% e 12%. O total de 16 (21%) de 75 pacientes eram procedentes de áreas urbanas de Minas Gerais e não tiveram contato anterior com trabalho agrícola (TAB. 4).

TABELA 4
Distribuição por profissão e procedência dos pacientes com PCM crônica atendidos no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006.

Profissão	Procedência				Total N (%)
	MG rural	MG urbana	Outros	NI	
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	
Construção civil	14/29 (48)	12/29 (41)	2/29 (7)	1/29 (4)	29 (100)
Trabalhador agrícola	21/27 (78)	5/27 (18)	1/27 (4)	-	27 (100)
Trabalhador doméstico	7/8 (88)	1/8 (12)	-	-	8 (100)
Outra	6/10 (60)	3/10 (30)	1/10 (10)	-	10 (100)
Não informado	-	-	-	1	1
TOTAL	48	21	4	2	75

MG: Minas Gerais; Outros: outros estados; NI: não informado.

Em 37 (49%) pacientes com PCM crônica, o tratamento da doença foi iniciado após quatro a 12 meses do início da sintomatologia (mediana: 5 meses). Em 9 (12%) pacientes, o tempo foi de um mês; em 12 (16%), de dois a três meses; em 18 (24%), de quatro a seis meses; em 19 (25%), de sete a 12 meses; em 10 (13%), de mais de um até três anos; e em 2 (3%), mais de três anos. O tempo máximo observado foi de 5 anos, em um paciente (TAB. 5).

TABELA 5
Tempo de doença pré-tratamento dos pacientes com PCM crônica atendidos no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006.

Tempo de doença pré-tratamento	N (%)
Até 1 mês	9 (12)
De 2 a 3 meses	12 (16)
De 4 a 6 meses	18 (24)
De 7 a 12 meses	19 (25)
De mais de 1 ano até 3 anos	10 (13)
Mais de 3 anos	2 (3)
Não informado	5 (7)
TOTAL	75 (100)

Quanto à forma clínica, 53 (70,7%) pacientes apresentaram PCM multifocal; 21 (28%), PCM unifocal tegumentar; e um paciente apresentou PCM unifocal pulmonar (TAB. 6).

TABELA 6
Formas de apresentação de PCM crônica dos pacientes atendidos no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006.

Forma clínica	N (%)
Multifocal	53 (70,7)
Unifocal tegumentar	21 (28)
Unifocal pulmonar	1 (1,3)
TOTAL	75 (100)

A maior proporção de PCM multifocal foi verificada entre os pacientes com 51 a 60 anos de idade (92%); no grupo de 61 a 70 anos, o percentual foi de 33%. Nas demais faixas etárias, essa proporção variou de 67% a 75% (TAB. 7).

TABELA 7
Formas de apresentação de PCM crônica, por faixa etária, na primeira consulta dos pacientes atendidos no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006.

Faixa etária	Forma clínica			Total N (%)
	Multi*	Uni T*	Uni P*	
	N (%)	N (%)	N (%)	
Abaixo de 20 anos	2/3 (67)	1/3 (33)	-	3 (100)
De 21 a 30 anos	8/11 (73)	3/11 (27)	-	11 (100)
De 31 a 40 anos	11/16 (69)	5/16 (31)	-	16 (100)
De 41 a 50 anos	15/20 (75)	4/20 (20)	1/20 (5)	20 (100)
De 51 a 60 anos	12/13 (92)	1/13 (8)	-	13 (100)
De 61 a 70 anos	3/9 (33)	6/9 (67)	-	9 (100)
Acima de 71 anos	2/3 (67)	1/3 (33)	-	3 (100)
TOTAL	53	21	1	75

*Multi: multifocal; Uni T: unifocal tegumentar; Uni P: unifocal pulmonar.

Os principais achados clínicos dos pacientes estudados estão apresentados na TAB. 8. Emagrecimento e astenia foram os sintomas mais comuns ao exame inicial, sendo encontrados em 57 (76%) e 48 (64%) pacientes, respectivamente. A linfadenomegalia estava presente em 38 (51%) pacientes.

TABELA 8
Achados clínicos na primeira consulta dos pacientes com PCM crônica atendidos no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006.

Achados clínicos	N (%)	Achados clínicos	N (%)
Emagrecimento	57 (76)	Diarréia	10 (13)
Astenia	48 (64)	Artralgia	9 (12)
Linfadenomegalia	38 (51)	Icterícia	9 (12)
Febre	28 (37)	Convulsões	7 (9)
Cefaléia	17 (23)	Dor óssea	7 (9)
Náusea / vômitos	14 (19)	Distensão abdominal	5 (7)
Dor abdominal	11 (15)	Sinais motores focais	5 (7)
Constipação	11 (15)	Sangramento gastrointestinal	4 (5)

Os locais mais comuns de lesões da PCM na população estudada são mostrados na TAB. 9. As lesões paracoccidioidomicóticas, confirmadas pelo achado anátomo-patológico ou microbiológico do fungo, localizaram-se nas mucosas em 49 (65%) pacientes; no pulmão, em 31 (41%) pacientes; nos linfonodos, em 29 (39%) pacientes; e na pele, em 28 (37%) pacientes.

TABELA 9
Localização das lesões de PCM crônica dos pacientes atendidos no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006.

Local	N (%)	Local	N (%)
Mucosas	49 (65)	Fígado	2 (3)
Pulmões	31 (41)	Pâncreas	2 (3)
Linfonodos	29 (39)	Trato gastrointestinal	2 (3)
Pele	28 (37)	Baço	1 (1,3)
Cérebro	6 (8)	Ossos	1 (1,3)
Adrenal	3 (4)	Trato gênito-urinário	1 (1,3)

Quanto ao tratamento antifúngico, 15 (20%) pacientes usaram Anfotericina B; desses, 2 (3%) usaram-na em associação com azólicos; 4 (5%), em associação com sulfas; e 9 (12%), em associação a azólicos e sulfas. Os azólicos foram usados por 38 (51%) pacientes durante algum período da terapia; em 15 (20%) desses casos, como droga antifúngica única, e em 12 (16%), em associação com as sulfas. A administração de sulfas, representadas pela associação de Sulfametoxazol e Trimetoprim, foi realizada de forma isolada em 23 (31%) pacientes. A associação de drogas foi realizada em 27 (36%) pacientes. Dez pacientes (13%) não retornaram após a primeira avaliação e, portanto, não foi possível saber se eles usaram a medicação prescrita (TAB. 10). Oito pacientes, até o final do seguimento, estavam com a medicação antifúngica suspensa por orientação médica, após tempo mínimo de três anos de tratamento.

TABELA 10
Esquemas terapêuticos utilizados pelos pacientes com PCM crônica atendidos no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006.

Esquemas terapêuticos	N (%)
Azólicos (exclusivamente)	15 (20)
Sulfas (exclusivamente)	23 (31)
Associação de drogas	27 (36)
• Anfotericina B + Azólicos + Sulfas	9 (12)
• Anfotericina B + Azólicos	2 (3)
• Anfotericina B + Sulfas	4 (5)
• Azólicos + Sulfas	12 (16)
Não confirmado (sem retorno)	10 (13)
TOTAL	75 (100)

6.2 Inatividade clínica

O acompanhamento evolutivo dos pacientes revelou que 53 (71%) pacientes alcançaram a inatividade clínica, sendo 43 (81%) homens e 10 (19%) mulheres. Do total de 64 homens e 11 mulheres, 67% e 91%, respectivamente, atingiram inatividade clínica durante o seguimento. Durante este estudo, o óbito foi constatado em duas mulheres (do total de 11), por causa não relacionada diretamente à PCM em ambos os casos. Nenhum homem faleceu nesse intervalo.

O tempo decorrido desde o início do primeiro tratamento (quando houve mais de um) até a inatividade clínica variou de um mês a 14 anos (mediana: 5,5 meses).

Dez (19%) dos 53 pacientes demoraram um mês; 9 (17%), de dois a três meses; 8 (15%), de quatro a seis meses; 7 (13%), de sete a 12 meses; 7 (13%), de 13 meses a três anos; 5 (10%), de mais de três até cinco anos; e 6 (11%), mais de cinco anos (TAB. 11). A informação sobre esse dado não foi encontrada em um caso.

TABELA 11
Tempo decorrido desde o início do tratamento até a inatividade da doença dos
pacientes com PCM crônica atendidos no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006.

Tempo do início do tratamento até a inatividade clínica	N (%)
Até 1 mês	10 (19)
De 2 a 3 meses	9 (17)
De 4 a 6 meses	8 (15)
De 7 a 12 meses	7 (13)
De mais de 1 ano até 3 anos	7 (13)
De mais de 3 anos até 5 anos	5 (10)
Mais de 5 anos	6 (11)
Não informado	1 (2)
TOTAL	53 (100)

A idade média \pm desvio-padrão no grupo que atingiu a inatividade clínica foi de $45,0 \pm 14,8$ anos; no outro grupo, sem inatividade clínica, foi de $43,6 \pm 13,8$ anos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

A distribuição por faixa etária dos pacientes que atingiram inatividade clínica é apresentada na TAB. 12. Maior percentual de inatividade foi verificado nos pacientes com 21 a 30 anos (82%) e 51 a 60 anos (85%) de idade.

TABELA 12
Distribuição, por faixa etária, dos pacientes com PCM crônica que apresentaram inatividade da doença no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006.

Faixa etária	N (%)
Abaixo de 20 anos	2/3 (67)
De 21 a 30 anos	9/11 (82)
De 31 a 40 anos	8/16 (50)
De 41 a 50 anos	14/20 (70)
De 51 a 60 anos	11/13 (85)
De 61 a 70 anos	7/9 (78)
Acima de 71 anos	2/3 (67)
TOTAL	53/75 (71)

A inatividade clínica foi observada em 67% dos pacientes com PCM procedentes de áreas rurais de Minas Gerais; em 71% dos procedentes de áreas urbanas do estado; e em 100% dos procedentes de outros estados (TAB. 13).

TABELA 13
Distribuição, por procedência, dos pacientes com PCM crônica que apresentaram inatividade da doença no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006.

Procedência	N (%)
Minas Gerais – área rural	32/48 (67)
Minas Gerais – área urbana	15/21 (71)
Outros estados	4/4 (100)
Não informado	2/2 (100)
TOTAL	53/75 (100)

O maior percentual de inatividade clínica foi verificado entre os trabalhadores de serviços domésticos (88%). Entre os trabalhadores da construção civil e os agrícolas, esse percentual foi de 79% e 59%, respectivamente (TAB. 14).

TABELA 14
Distribuição, por profissão, dos pacientes com PCM crônica que apresentaram inatividade da doença no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006.

Profissão	N (%)
Trabalhador da construção civil	23/29 (79)
Trabalhador agrícola	16/27 (59)
Trabalhador de serviços domésticos	7/8 (88)
Outra	6/10 (60)
Não informado	1/1 (100)
TOTAL	53/75 (71)

A proporção de pacientes que alcançaram inatividade clínica foi menor entre os pacientes com dois a três meses de doença pré-tratamento (58%) Nos demais grupos, o percentual de inatividade clínica de acordo com o tempo de doença variou de 67% a 75%. Esses dados são apresentados na TAB. 15.

TABELA 15
Distribuição, por tempo de doença pré-tratamento, dos pacientes com PCM crônica que apresentaram inatividade da doença no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006.

Tempo de doença pré-tratamento	N (%)
Até 1 mês	6/9 (67)
De 2 a 3 meses	7/12 (58)
De 4 a 6 meses	13/18 (72)
De 7 a 12 meses	14/19 (74)
Mais de 1 ano	9/12 (75)
Não informado	4/5 (80)
TOTAL	53/75 (71)

A inatividade clínica foi atingida por 38 (72%) dos 53 pacientes com PCM multifocal; por 14 (67%) dos 21 pacientes com PCM unifocal tegumentar; e pelo único paciente com PCM unifocal pulmonar (TAB. 16).

TABELA 16
Distribuição, por forma de apresentação, dos pacientes com PCM crônica que apresentaram inatividade da doença no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006.

Forma clínica	N (%)
Multifocal	38/53 (72)
Unifocal tegumentar	14/21 (67)
Unifocal pulmonar	1/1 (100)
TOTAL	53/75 (71)

A inatividade clínica foi obtida por 13 (87%) dos 15 pacientes que receberam Anfotericina B como tratamento; por 12 (80%) de 15 que receberam apenas azólicos; por 7 (58%) de 12 que receberam azólicos associados a sulfas; e por 21 (91%) dos 23 que receberam somente sulfamidoterapia (TAB. 17).

TABELA 17
Distribuição, por esquema terapêutico utilizado, dos pacientes com PCM crônica que apresentaram inatividade da doença no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006.

Esquema terapêutico	N (%)
Azólicos (exclusivamente)	12/15 (80)
Sulfas (exclusivamente)	21/23 (91)
Associação de drogas	20/27 (77)
• Anfotericina B + Azólicos + Sulfas	8/9 (89)
• Anfotericina B + Azólicos	2/2 (100)
• Anfotericina B + Sulfas	3/4 (75)
• Azólicos + Sulfas	7/12 (58)
TOTAL	53/75 (71)

6.2.1 Análise dos preditores de evolução da PCM crônica

Foram analisados os possíveis preditores da evolução dos pacientes com PCM crônica, considerando como variável dependente “inatividade clínica”, codificada como 0 (quando a PCM tornou-se inativa com a terapia específica) ou 1 (quando a PCM permaneceu ativa a despeito da terapia específica, até o final do seguimento). Visto que essa variável é dicotômica, o teste mais adequado para a análise é a regressão logística binária.

O método de seleção de variáveis usado foi a seleção progressiva com razão de probabilidades, em que as variáveis são selecionadas com base na significância do escore estatístico. No modelo inicial, nenhum preditor é selecionado e todas as variáveis são analisadas em conjunto. A cada passo, o preditor com maior escore estatístico – cujo valor de significância (valor-p) deve ser menor do que 0,05 – é adicionado ao modelo. Esse processo é repetido até que, no último passo, nenhuma variável apresente valor-p menor do que 0,05; então, nenhuma outra é selecionada e encerra-se a análise.

O modelo inicial (“passo zero”) identificou “esquema terapêutico” como o preditor com maior escore estatístico (escore: 34,061; $p < 0,001$). As categorias dessa variável que apresentaram valor-p significativo foram os tratamentos com azólicos exclusivamente (escore: 30,228; $p < 0,001$) e a combinação de azólicos e sulfas (escore: 6,008; $p = 0,014$).

No “passo um”, com a variável “esquema terapêutico” incluída na equação, a variável “acometimento de mucosas” apresentou o maior escore estatístico (escore: 7,608; $p = 0,006$). Dos 49 pacientes com lesão em mucosas, 30 (61%) apresentaram

inatividade da doença e 19 (39%) permaneceram com doença ativa ao final do seguimento. Dos 26 pacientes que não possuíam mucosas acometidas, 23 (88%) evoluíram com remissão da PCM e 3%, não.

No “passo dois”, com a inclusão da variável “acometimento de mucosas” na equação, além da variável “esquema terapêutico” que havia sido selecionada no “passo um”, nenhuma outra apresentou valor de significância (valor-p) menor do que 0,05 e a análise foi encerrada. Esses dados são mostrados nas TAB. 18, TAB. 19 e TAB. 20. Todas as análises estatísticas da etapa de regressão logística são mostradas de modo mais detalhado no APÊNDICE E.

TABELA 18
Resultado da regressão logística binária para identificação dos preditores de evolução da PCM crônica dos pacientes atendidos no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006. “Passo zero”.

PASSO ZERO		
Variáveis	Escore estatístico	Valor-p
Idade	0,756	0,384
Sexo	4,098	0,043
Procedência	2,439	0,295
Profissão	5,377	0,146
Forma clínica	0,680	0,712
Tempo de doença pré-tratamento	0,586	0,444
<u>Esquema terapêutico*</u>	34,061*	<0,001*
• <u>Azólicos exclusivamente</u>	30,288*	<0,001*
• Sulfas exclusivamente	1,310	0,252
• Anfotericina B + Azólicos + Sulfas	0,042	0,837
• Anfotericina B + Azólicos	0,398	0,528
• Anfotericina B + Sulfas	0,398	0,528
• <u>Azólicos + Sulfas</u>	6,008*	0,014*
Sinais e sintomas:		
• Artralgia	1,104	0,293
• Astenia	0,515	0,473
• Cefaléia	0,056	0,812
• Constipação	1,500	0,221
• Convulsão	0,021	0,886
• Diarréia	1,104	0,293
• Distensão abdominal	2,122	0,145

• Dor abdominal	3,578	0,059
• Dor óssea	2,122	0,145
• Emagrecimento	0,019	0,890
• Febre	0,724	0,395
• Icterícia	0,745	0,388
• Linfadenomegalia	1,237	0,266
• Náusea / vômitos	5,198	0,023
• Sangramento gastrointestinal	0,021	0,886
• Sinais motores focais	0,808	0,369
Localização das lesões:		
• Adrenal	0,808	0,369
• Baço	0,398	0,528
• Cérebro	1,232	0,267
• Fígado	0,398	0,528
• Linfonodos	2,132	0,144
• Mucosas	5,350	0,021
• Ossos	0,398	0,528
• Pâncreas	0,808	0,369
• Pele	4,040	0,044
• Pulmões	0,913	0,339
• Trato gastrointestinal	0,808	0,369
• Trato gênito-urinário	0,398	0,528

* Maior escore estatístico e $p < 0,05$ (significância estatística).

TABELA 19
Resultado da regressão logística binária para identificação dos preditores de evolução da PCM crônica dos pacientes atendidos no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006. “Passo um” – variável incluída: “esquema terapêutico”.

PASSO UM – Variável incluída: “esquema terapêutico”		
Variáveis não incluídas	Escore estatístico	Valor-p
Idade	1,196	0,274
Sexo	2,749	0,097
Procedência	2,279	0,320
Profissão	7,447	0,059
Forma clínica	0,184	0,912
Tempo de doença pré-tratamento	1,661	0,198
Sinais e sintomas:		
• Artralgia	0,003	0,956
• Astenia	0,294	0,588
• Cefaléia	0,832	0,362
• Constipação	0,139	0,709
• Convulsão	0,105	0,746
• Diarréia	2,477	0,115

• Distensão abdominal	0,417	0,519
• Dor abdominal	2,577	0,108
• Dor óssea	1,069	0,301
• Emagrecimento	0,464	0,496
• Febre	1,880	0,170
• Icterícia	1,488	0,223
• Linfadenomegalia	0,603	0,437
• Náusea / vômitos	3,469	0,063
• Sangramento gastrointestinal	0,093	0,760
• Sinais motores focais	0	1,000
Localização das lesões:		
• Adrenal	0,197	0,657
• Baço	0	1,000
• Cérebro	0	1,000
• Fígado	0	1,000
• Linfonodos	1,782	0,182
• <u>Mucosas*</u>	7,608*	0,006*
• Ossos	0,105	0,746
• Pâncreas	0	1,000
• Pele	2,843	0,092
• Pulmões	1,191	0,275
• Trato gastrointestinal	0	1,000
• Trato gênito-urinário	0,197	0,657

* Maior escore estatístico e $p < 0,05$ (significância estatística).

TABELA 20
Resultado da regressão logística binária para identificação dos preditores de
evolução da PCM crônica dos pacientes atendidos no Hospital das Clínicas – UFMG,
2001-2006. “Passo dois” – variável incluída: “acometimento de mucosas”.

PASSO DOIS – Variável incluída: “acometimento de mucosas”		
Variáveis não incluídas	Escore estatístico	Valor-p*
Idade	3,099	0,078
Sexo	0,864	0,353
Procedência	0,873	0,646
Profissão	6,204	0,102
Forma clínica	0,127	0,938
Tempo de doença pré-tratamento	2,471	0,116
Sinais e sintomas:		
• Artralgia	0,854	0,355
• Astenia	0,005	0,945
• Cefaléia	0,415	0,519
• Constipação	1,214	0,271
• Convulsão	0	1,000

• Diarréia	0,165	0,685
• Distensão abdominal	0,441	0,507
• Dor abdominal	0,165	0,685
• Dor óssea	0,633	0,426
• Emagrecimento	0,398	0,528
• Febre	0,208	0,648
• Icterícia	0	1,000
• Linfadenomegalia	0,478	0,489
• Náusea / vômitos	0,518	0,472
• Sangramento gastrointestinal	0,165	0,685
• Sinais motores focais	0	1,000
Localização das lesões:		
• Adrenal	0	1,000
• Baço	0	1,000
• Cérebro	0	1,000
• Fígado	0	1,000
• Linfonodos	0,103	0,748
• Ossos	0	1,000
• Pâncreas	0	1,000
• Pele	0,461	0,497
• Pulmões	0,283	0,595
• Trato gastrointestinal	0	1,000
• Trato gênito-urinário	0,278	0,598

* Nenhuma variável apresentou $p < 0,05$.

6.3 Dosagem sérica de anticorpos e marcadores inflamatórios

Participaram desta etapa do estudo 26 pacientes com idade (média \pm desvio-padrão) de $44,4 \pm 13,8$ anos e proporção de gênero masculino/feminino de 23/3 (88% eram homens e 12%, mulheres). Três deles apresentavam a forma unifocal tegumentar; um, a forma unifocal pulmonar; e os restantes, formas multifocais de PCM crônica.

A casuística teve variações em decorrência das perdas durante o tempo de acompanhamento. Dessa forma, foram utilizadas nos experimentos amostras de 21 pacientes com seis meses de tratamento; de 23 pacientes com 12 meses; e de 17 pacientes com 36 meses.

Para comparação, foram coletadas amostras de soro de 37 voluntários sadios pareados com o grupo de pacientes por idade (média \pm desvio-padrão: $41,1 \pm 14,2$ anos; proporção de gênero masculino/feminino: 28/9).

Todos os 26 pacientes apresentavam doença ativa na primeira consulta. A inatividade clínica foi obtida por 6 (29%) de 21 pacientes após seis meses; por 18 (78%) de 23 pacientes após 12 meses; e por todos os 17 (100%) pacientes após 36 meses (TAB. 21).

TABELA 21
Distribuição, por tempo de tratamento e atividade da doença, dos pacientes com PCM crônica que participaram do estudo imunológico no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006.

Atividade clínica	Tempo de tratamento – N (%)			
	1ª consulta - t0	6 meses - t6	12 meses - t12	36 meses - t36
PCM ativa	26 (100)	15 (71)	5 (22)	0
PCM inativa	0	6 (29)	18 (78)	17 (100)
TOTAL	26 (100)	21 (100)	23 (100)	17 (100)

A TAB. 22 mostra as estatísticas das curvas ROC para os marcadores inflamatórios séricos estudados. Para comparação, foram utilizados os valores das dosagens nos pacientes com PCM crônica pré-tratamento versus os valores das dosagens no grupo controle. Os pontos de corte definidos são os valores limítrofes que separam um caso considerado “normal” de um “anormal”. Quanto maior a distância entre a curva e a linha de referência, maior a utilidade do marcador testado para discriminar pacientes e controles. Maior área sob a curva foi observada para os anticorpos IgG anti-Pb, sTNF-R1 e sTNF-R2, com $p < 0,0001$. As quimiocinas CXCL9 e CCL24 também se mostraram úteis para discriminar os pacientes com PCM crônica não tratados dos controles saudáveis, com $p = 0,001$ e $p = 0,01$, respectivamente. As curvas ROC elaboradas para todos os marcadores inflamatórios estudados são mostradas no GRAF. 1. O GRAF. 2 mostra as curvas ROC elaboradas para anticorpos IgG anti-Pb, sTNF-R1 e sTNF-R2. Todas as estatísticas referentes às curvas ROC e estudos de correlação dos níveis dos marcadores dosados são apresentados detalhadamente no APÊNDICE F.

TABELA 22
Área sob a curva ROC, pontos de corte e os respectivos valores de sensibilidade e especificidade para os marcadores inflamatórios séricos estudados nos pacientes com PCM crônica atendidos no Hospital das Clínicas – UFMG, 2001-2006.

Marcador	Área sob a curva	Valor-p	Valor de corte (pg/mL)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
IgG anti-Pb*	0,964	<0,0001*	0,20 ⁺	95	94
sTNF-R1*	0,893	<0,0001*	544	85	84
sTNF-R2*	0,944	<0,0001*	1.732	89	89
CXCL9*	0,744	0,001*	312	77	78
CCL2	0,634	0,07	1.101	42	95
CCL3	0,629	0,08	56	50	81
CCL11	0,507	0,93	248	46	70
CCL24*	0,689	0,01*	2.885	85	57

*p<0,05 (significância estatística).

⁺Valor expresso em OD, a 492 nm.

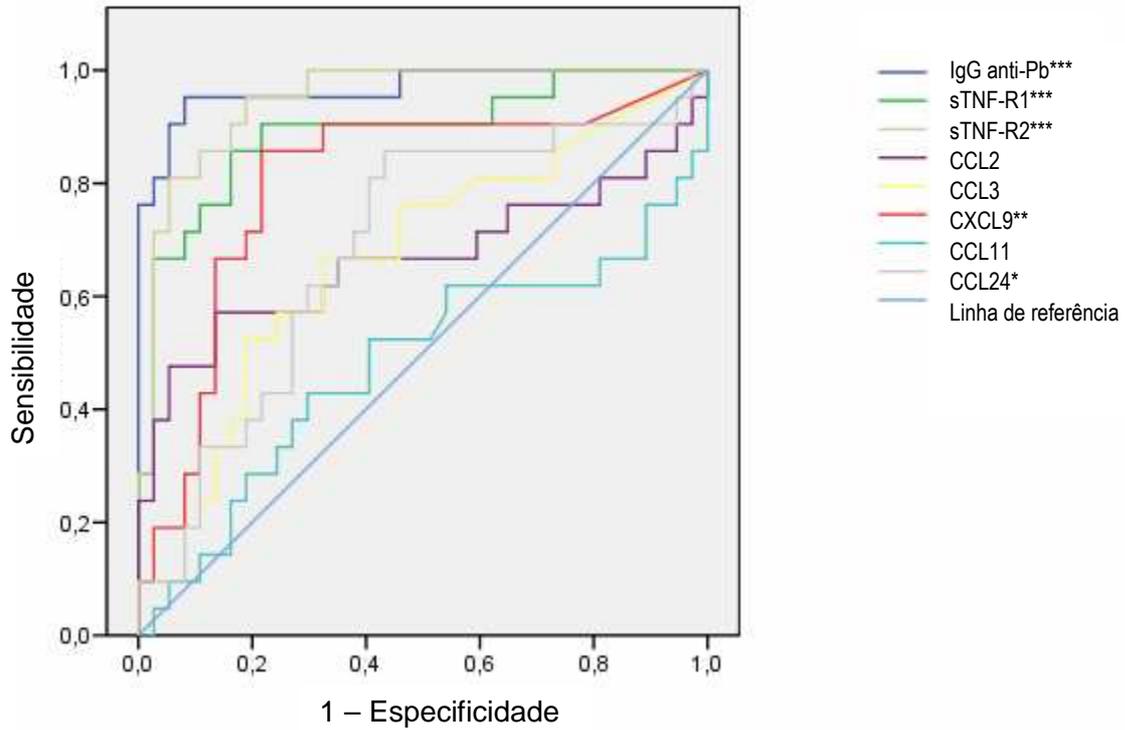


Gráfico 1- Curvas ROC para os marcadores séricos estudados nos pacientes com paracoccidioidomicose crônica (PCM) não tratados (t0) e nos controles sadios. PCM: N=21 (IgG anti-Pb); N=26 (sTNF-R1, sTNF-R2 e quimiocinas). Controles: N=37. *** $p < 0,0001$; ** $p = 0,001$; * $p = 0,01$.

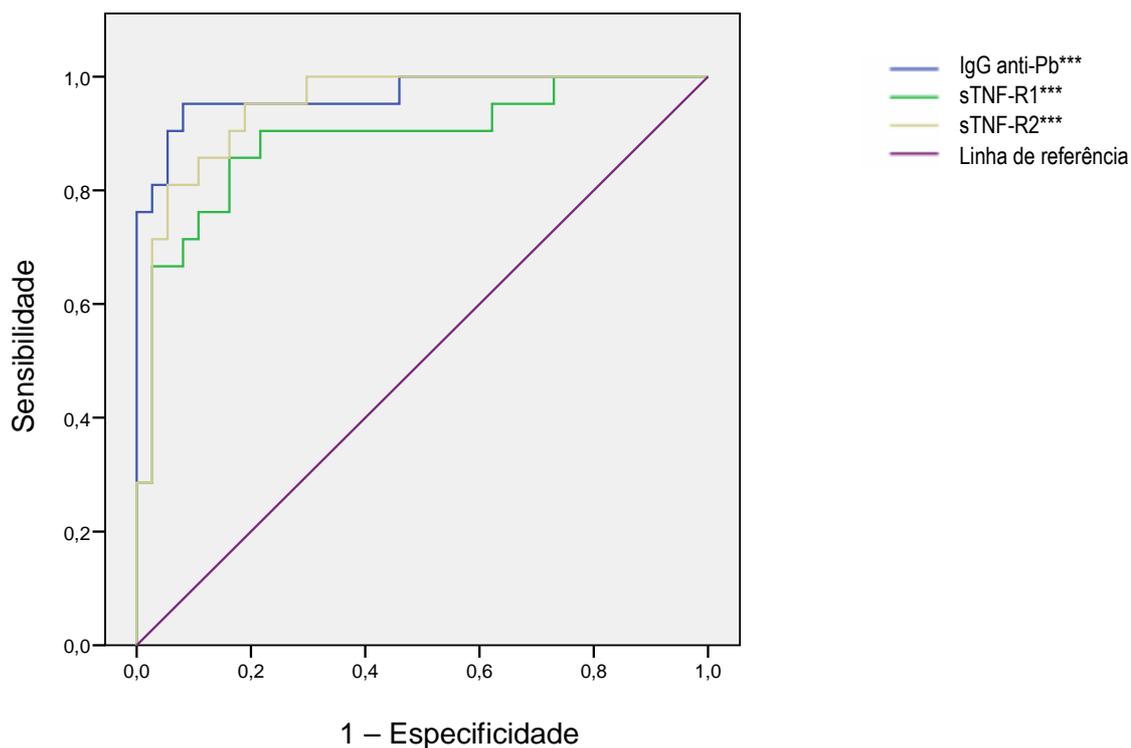


Gráfico 2- Curvas ROC para anticorpos IgG anti-*Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), sTNF-R1 e sTNF-R2 dosados no soro dos pacientes com paracoccidioidomicose crônica (PCM) não tratados (t0) e nos controles saudios. PCM: N=21 (IgG anti-Pb); N=26 (sTNF-R1 e sTNF-R2). Controles: N=37. *p<0,0001.**

6.3.1 Dosagem sérica de anticorpos específicos anti-*P. brasiliensis*

Os pacientes com PCM apresentaram níveis significativamente elevados de anticorpos IgG anti-Pb em relação ao grupo controle durante todo o seguimento. Esses níveis reduziram progressivamente; entretanto, permaneceram acima do ponto de corte de 0,20 (OD) em 8 (80%) de dez pacientes após 36 meses de tratamento (GRAF. 3). Apenas 1 (5%) de 21 pacientes possuía nível de IgG anti-Pb abaixo do referido ponto de corte antes de iniciar o tratamento; entretanto, ele apresentava, na ocasião, elevação de sTNF-R1, sTNF-R2 e CXCL9. O coeficiente de correlação entre IgG anti-Pb e cada um desses marcadores foi de 0,548 ($p < 0,01$); 0,531 ($p < 0,01$); e 0,415 ($p < 0,01$), respectivamente.

6.3.2 Dosagem sérica de sTNF-R1 e sTNF-R2

Na primeira consulta, os níveis séricos de sTNF-R1 e sTNF-R2 estavam significativamente aumentados nos pacientes com PCM em comparação com o grupo controle. Esses níveis diminuíram com o tratamento específico, mas a concentração de sTNF-R1 manteve-se elevada após 36 meses do início do tratamento (GRAF. 4 e 5). Os níveis de sTNF-R1 e sTNF-R2 estavam acima do ponto de corte de 544 e 1.732 pg/mL em 22 (85%) e 23 (96%) de 26 pacientes, respectivamente, na ocasião do diagnóstico, com discordância em dois casos. Após 36 meses, tais níveis diminuíram em 10 (59%) e 11 (65%) de 17 pacientes e ficaram

abaixo do referido ponto de corte em 5 (29%) e 8 (47%) casos, respectivamente. O coeficiente de correlação entre esses marcadores foi de 0,738 ($p < 0,01$).

6.3.3 Dosagem sérica de quimiocinas

A concentração de CXCL9 estava significativamente mais alta em indivíduos com PCM não-tratados, em comparação com o grupo controle. Após seis meses de tratamento, essa concentração já não era diferente daquela encontrada nos indivíduos sadios e continuou a diminuir progressivamente (GRAF. 6). Os níveis de CXCL9 estavam abaixo do ponto de corte de 312 pg/mL em 20 (77%) de 26 pacientes antes do tratamento, incluindo um dos dois casos que apresentavam simultaneamente níveis reduzidos de sTNF-R1 e sTNF-R2. Após 36 meses, tais níveis diminuíram em 13 (76%) de 17 pacientes e foram inferiores ao referido ponto de corte em 14 (82%) casos. Um dos três pacientes que não atingiram a concentração de CXCL9 dos controles sadios ao final do seguimento possuía simultaneamente baixos níveis de sTNF-R1 e sTNF-R2. O coeficiente de correlação entre CXCL9 e sTNF-R1 foi de 0,432 ($p < 0,01$); entre CXCL9 e sTNF-R2, de 0,454 ($p < 0,01$).

Os níveis de CCL2 estavam elevados em todos os grupos de pacientes com PCM em tratamento. Após 12 meses em uso de antifúngicos, tais níveis eram significativamente mais altos do que em pacientes não-tratados. Os pacientes apresentaram redução na concentração de CCL2 após 36 meses em tratamento, mas essa ainda permaneceu alta em comparação com o grupo controle (GRAF. 7).

Os níveis de CCL2 pré-tratamento estavam acima do ponto de corte de 1.101 pg/mL em 11 (42%) de 26 pacientes. Durante o estudo, 24 de 26 pacientes apresentaram aumento dos níveis de CCL2, que foi detectado aos seis meses em 13 (54%), aos 12 meses em 10 (42%) e aos 36 meses em 1 (4%) dos casos. Nove pacientes apresentaram aumento progressivo da concentração da quimiocina. Um dos dois pacientes que não apresentaram elevação dos níveis de CCL2 durante o tratamento possuía o maior nível na ocasião do diagnóstico, e ele diminuiu progressivamente.

A curva de CCL3 foi similar à de CCL2 (coeficiente de correlação: 0,287; $p < 0,05$). Seus níveis achavam-se elevados após seis meses e aumentaram ainda mais após 12 meses de tratamento. A concentração de CCL3 continuava elevada em dois pacientes após completados 36 meses em tratamento (GRAF. 8). Os níveis de CCL3 pré-tratamento estavam acima do ponto de corte de 56 pg/mL em 13 (50%) de 26 pacientes. Durante o acompanhamento, 21 (81%) de 26 pacientes tiveram aumento da concentração da quimiocina, que foi detectado aos seis meses em 10 (48%), aos 12 meses em 9 (43%) e aos 36 meses em 2 (9%) dos casos. Oito pacientes apresentaram elevação progressiva do nível de CCL3.

Os níveis de CCL24 mostraram aumento discreto, porém significativo, nos pacientes com PCM crônica após 36 meses de terapia antifúngica (GRAF. 9). Em dois pacientes, ambos com PCM cerebral, foram detectados níveis muito elevados de CCL24 em três das quatro dosagens realizadas ao longo do seu seguimento

Os níveis de CCL11 dos pacientes com PCM na ocasião do diagnóstico foram semelhantes aos dos controles sadios de PCM e não se alteraram após início do tratamento (GRAF. 10).

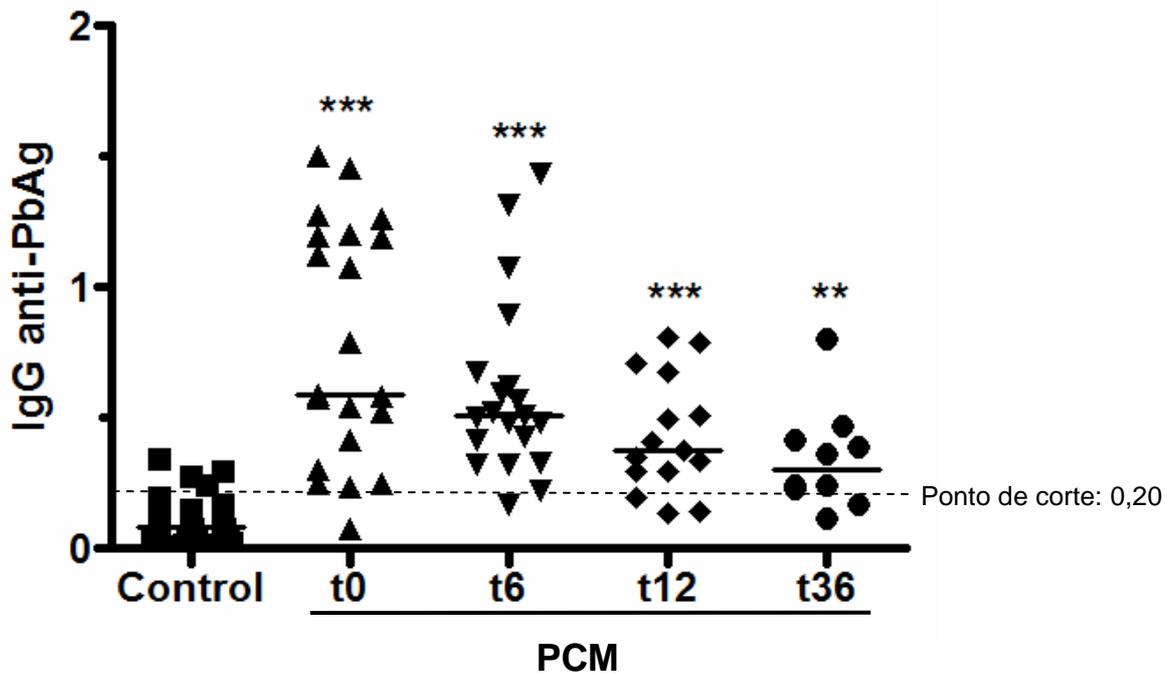


Gráfico 3- Concentração de anticorpos IgG anti-*Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) no soro de controles sadios e pacientes com paracoccidioidomicose crônica (PCM), ao diagnóstico (t0; N=21), após 6 meses (t6; N=20), após 12 meses (t12; N=16) e após 36 meses (t36; N=10) de início de tratamento antifúngico, em comparação com controles sadios (N=37). Os resultados são expressos em OD (*Optical Density* – Densidade Óptica) no comprimento de onda de 492 nm. As linhas horizontais representam a mediana dos valores. A linha tracejada representa o ponto de corte definido pelo método da curva ROC. A análise estatística foi realizada com o teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste Dunn de comparação múltipla. *p<0,001; **p<0,01 (vs. controle).**

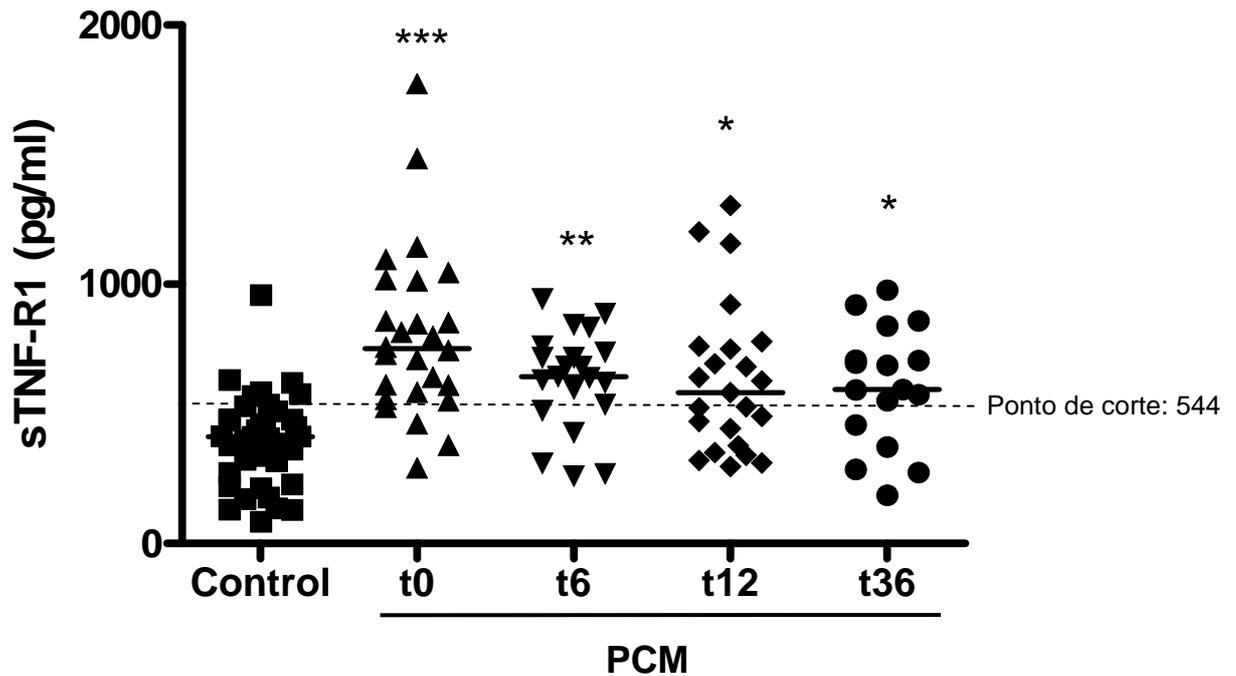


Gráfico 4- Concentração de sTNF-R1 no soro de controles saudáveis e pacientes com paracoccidioidomicose crônica (PCM), ao diagnóstico (t0; N=26), após 6 meses (t6; N=21), após 12 meses (t12; N=23) e após 36 meses (t36; N=17) de início de tratamento antifúngico, em comparação com controles saudáveis (N=37). As linhas horizontais representam a mediana dos valores. A linha tracejada representa o ponto de corte definido pelo método da curva ROC. A análise estatística foi realizada com o teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste Dunn de comparação múltipla. * $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ (vs. controle).**

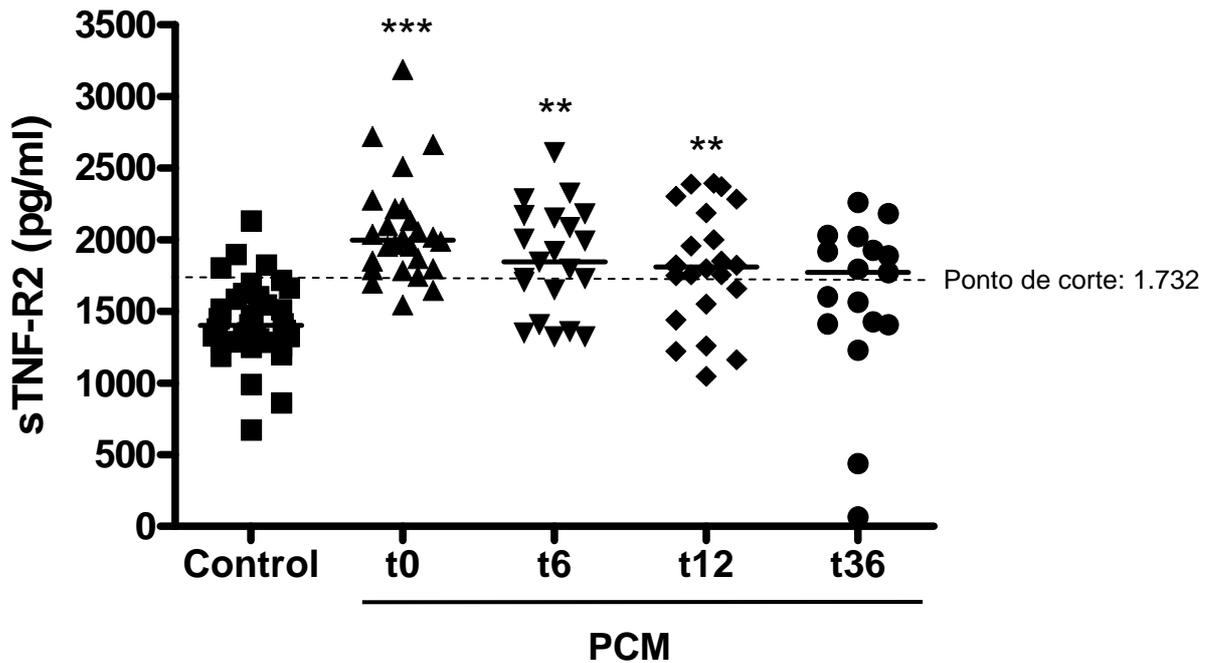


Gráfico 5- Concentração de sTNF-R2 no soro de controles sadios e pacientes com paracoccidioidomicose crônica (PCM), ao diagnóstico (t0; N=26), após 6 meses (t6; N=21), após 12 meses (t12; N=23) e após 36 meses (t36; N=17) de início de tratamento antifúngico, em comparação com controles sadios (N=37). As linhas horizontais representam a mediana dos valores. A linha tracejada representa o ponto de corte definido pelo método da curva ROC. A análise estatística foi realizada com o teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste Dunn de comparação múltipla. * $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ (vs. controle).**

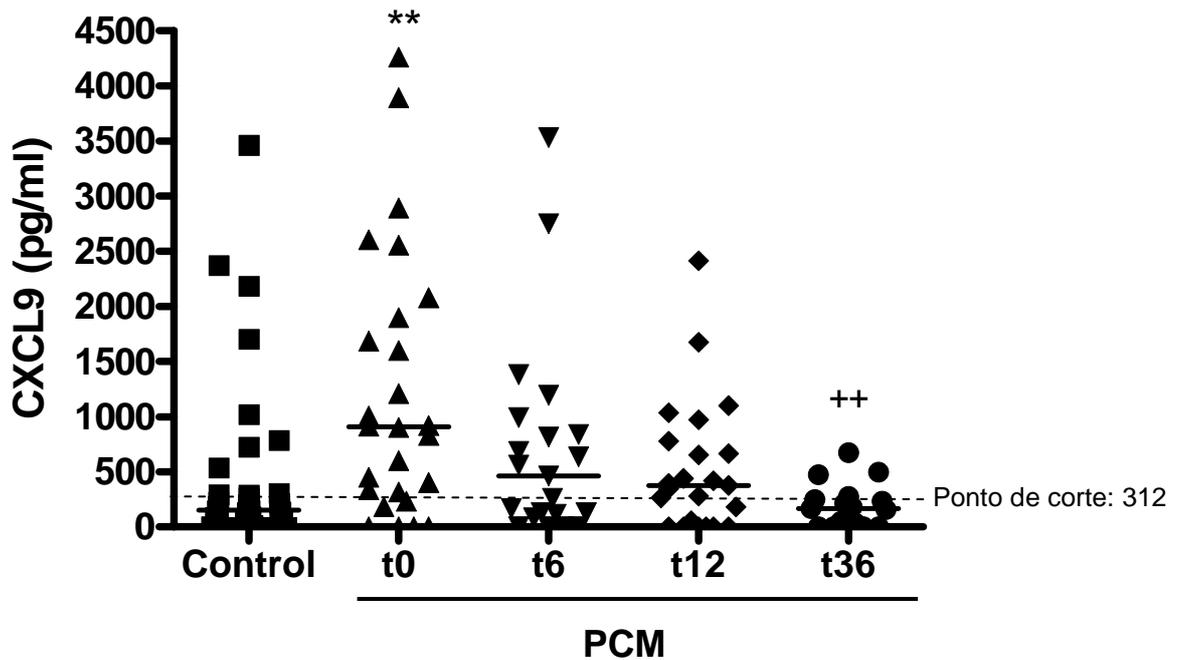


Gráfico 6- Concentração de CXCL9 no soro de controles saudáveis e pacientes com paracoccidioidomicose crônica (PCM), ao diagnóstico (t0; N=26), após 6 meses (t6; N=21), após 12 meses (t12; N=23) e após 36 meses (t36; N=17) de início de tratamento antifúngico, em comparação com controles saudáveis (N=37). As linhas horizontais representam a mediana dos valores. A linha tracejada representa o ponto de corte definido pelo método da curva ROC. A análise estatística foi realizada com o teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste Dunn de comparação múltipla. **p<0,01 (vs. controle); ++p<0,01 (vs. t0).

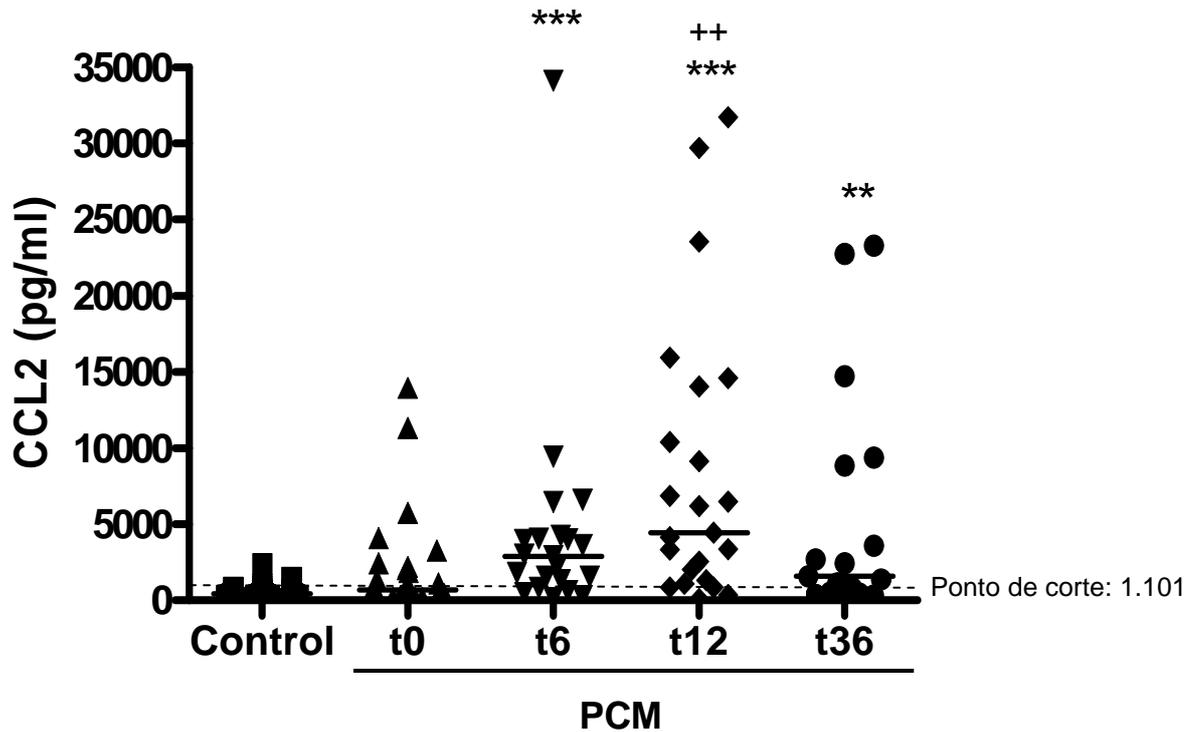


Gráfico 7- Concentração de CCL2 no soro de controles saudáveis e pacientes com paracoccidioidomicose crônica (PCM), ao diagnóstico (t0; N=26), após 6 meses (t6; N=21), após 12 meses (t12; N=23) e após 36 meses (t36; N=17) de início de tratamento antifúngico, em comparação com controles saudáveis (N=37). As linhas horizontais representam a mediana dos valores. A linha tracejada representa o ponto de corte definido pelo método da curva ROC. A análise estatística foi realizada com o teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste Dunn de comparação múltipla. * $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ (vs. controle); ++ $p < 0,01$ (vs. t0).**

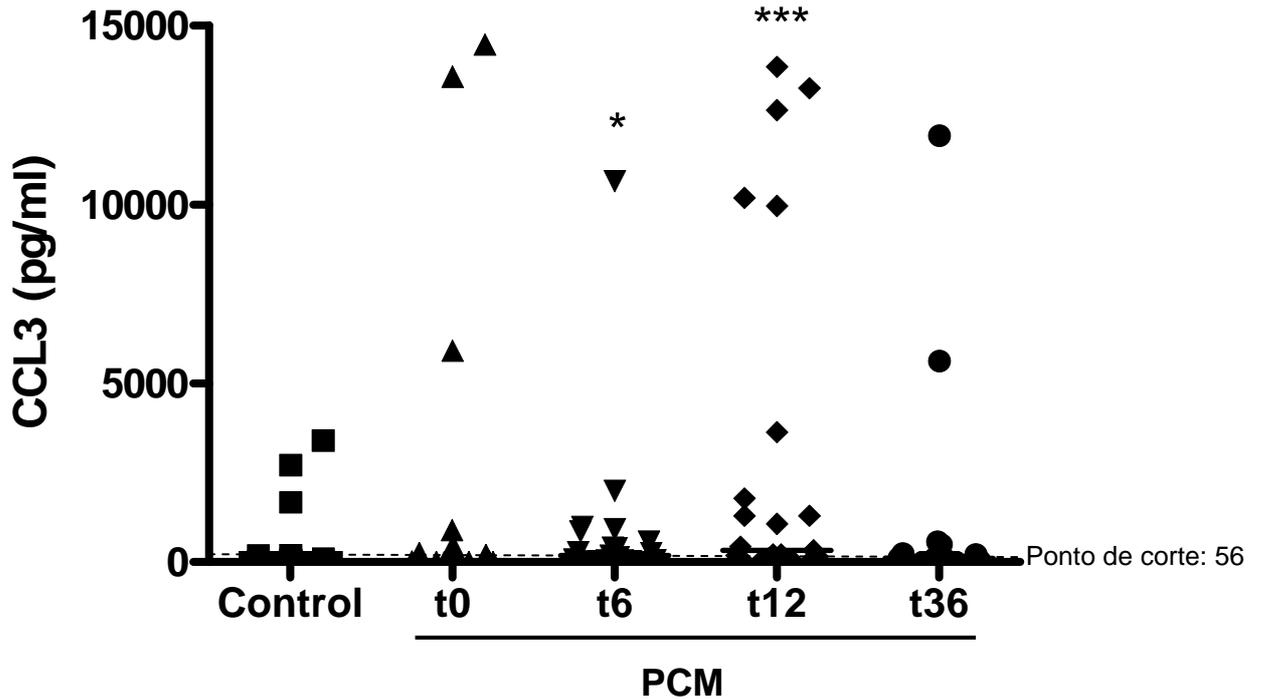


Gráfico 8- Concentração de CCL3 no soro de controles saudáveis e pacientes com paracoccidioidomicose crônica (PCM), ao diagnóstico (t0; N=26), após 6 meses (t6; N=21), após 12 meses (t12; N=23) e após 36 meses (t36; N=17) de início de tratamento antifúngico, em comparação com controles saudáveis (N=37). As linhas horizontais representam a mediana dos valores. A linha tracejada representa o ponto de corte definido pelo método da curva ROC. A análise estatística foi realizada com o teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste Dunn de comparação múltipla. * $p < 0,001$; * $p < 0,05$ (vs. controle).**

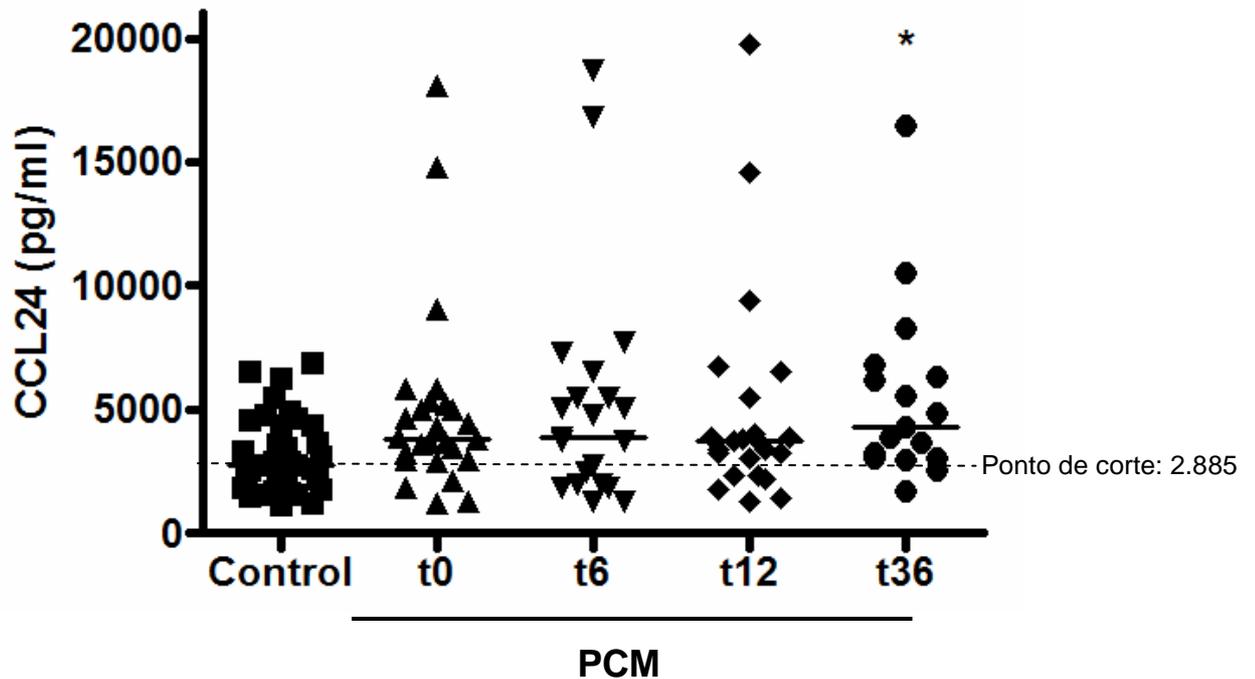


Gráfico 9- Concentração de CCL24 no soro de controles saudáveis e pacientes com paracoccidioidomicose crônica (PCM), ao diagnóstico (t0; N=26), após 6 meses (t6; N=21), após 12 meses (t12; N=23) e após 36 meses (t36; N=17) de início de tratamento antifúngico, em comparação com controles saudáveis (N=37). As linhas horizontais representam a mediana dos valores. A linha tracejada representa o ponto de corte definido pelo método da curva ROC. A análise estatística foi realizada com o teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste Dunn de comparação múltipla. *p<0,05 (vs. controle).

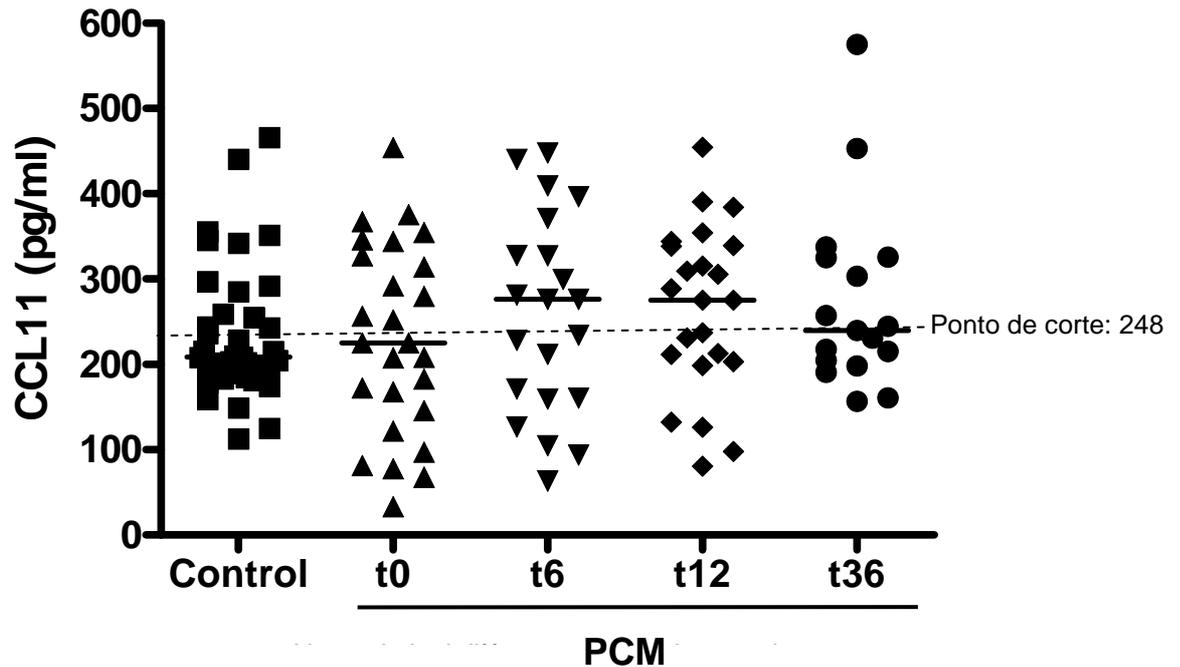


Gráfico 10- Concentração de CCL11 no soro de controles saudáveis e pacientes com paracoccidioidomicose crônica (PCM), ao diagnóstico (t0; N=26), após 6 meses (t6; N=21), após 12 meses (t12; N=23) e após 36 meses (t36; N=17) de início de tratamento antifúngico, em comparação com controles saudáveis (N=37). As linhas horizontais representam a mediana dos valores. A linha tracejada representa o ponto de corte definido pelo método da curva ROC. A análise estatística foi realizada com o teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste Dunn de comparação múltipla. Não foi observada diferença estatística entre os grupos.

7 DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou que a maioria dos pacientes apresenta evolução favorável, atingindo o estado de doença inativa nos primeiros seis meses de tratamento. As variáveis “esquema terapêutico” e “acometimento de mucosas” foram os mais significativos preditores de mau prognóstico em PCM crônica; tratamentos com azólicos isoladamente ou combinados a sulfas associaram-se a menor percentual de cura clínica. As concentrações séricas de IgG anti-Pb, sTNF-R1, sTNF-R2 e CXCL9 decrescem ao longo do tratamento nos pacientes com PCM crônica (tipo adulto). O declínio da concentração de CXCL9 é o mais rápido dentre os marcadores citados. Os níveis de CCL2 e CCL3 elevam-se nos pacientes com PCM ao longo do primeiro ano de tratamento e os de CCL24 têm discreto aumento após 36 meses de terapia antifúngica. Não se observa diferença estatisticamente significativa entre os níveis de CCL11 do grupo de pacientes e os do grupo controle, durante todo o seguimento.

7.1 Características clínicas e epidemiológicas da população estudada

A média de idade dos pacientes estudados foi de 44,6 anos e maior proporção deles (48%) apresentava 31 a 50 anos, o que está de acordo com dados da literatura (Bicalho *et al.*, 2001; Blotta *et al.*, 1999; Godoy & Reichart, 2003; Paniago *et al.*, 2003). A proporção de gênero homem:mulher foi de 5,8:1, que é

concordante com estudo realizado no estado de São Paulo por Blotta e colaboradores (1999), porém inferior à proporção encontrada em outras casuísticas descritas (Bicalho *et al.*, 2001; Godoy & Reichart, 2003; Marques *et al.*, 1998; Paniago *et al.*, 2003), que relataram de 8,8 a 30 homens acometidos para cada mulher.

Os estudos encontrados que descrevem a profissão dos pacientes com PCM mostram que a maior parte (45,5% a 76%) deles trabalha em atividades agrícolas (Bicalho *et al.*, 2001; Blotta *et al.*, 1999; Godoy & Reichart, 2003; Marques *et al.*, 1998; Paniago *et al.*, 2003). Na presente casuística, os trabalhadores agrícolas representaram 36% da população estudada, sendo superados pelos trabalhadores da construção civil (38,7%). Considerando o grupo todo de pacientes, a maioria deles (57 de 73 casos, ou 78%) afirmou que vivera ou trabalhara em área rural durante algum período de sua vida. No grupo dos trabalhadores da construção civil e nos de serviços domésticos, observou-se que 48% e 88%, respectivamente, dos pacientes eram procedentes de áreas rurais do estado de Minas Gerais. Após migrar para os centros urbanos, muitos trabalhadores agrícolas são inseridos no mercado de trabalho no ramo da construção civil, como já descrito (Blotta *et al.*, 1999).

O maior percentual (41%) de pacientes procedentes de áreas urbanas de Minas Gerais foi observado entre os trabalhadores da construção civil. Isso pode ser explicado pelo fato de que as atividades de tal ramo também envolvem o preparo e o ato de revolver o solo, o que está sabidamente relacionado à geração de aerossóis infectivos de *P. brasiliensis* (Coimbra Jr *et al.*, 1994; Mangiaterra *et al.*, 1999; Restrepo *et al.*, 2001). Esses dados poderiam sugerir uma tendência a mudança no perfil epidemiológico da PCM, caracterizando uma gradual urbanização da mesma. Por outro lado, a PCM é doença de longo período de incubação e, durante a análise

do banco de dados, não foi possível determinar o número de trabalhadores da construção civil que tiveram contato ocupacional com lavoura no passado e que, provavelmente, teriam adquirido a infecção por *P. brasiliensis* antes de migrarem para áreas urbanas.

A forma clínica predominante no presente trabalho foi a multifocal crônica. Emagrecimento, astenia e linfadenomegalia foram os achados clínicos mais comuns na primeira consulta, tendo ocorrido em 76%, 64% e 51% dos pacientes, respectivamente. O sítio de acometimento mais comum neste estudo foi a mucosa (65%), seguido por pulmões (41%), linfonodos (39%) e pele (37%). Essas observações estão em concordância com publicações prévias (Blotta *et al.*, 1999; Marques *et al.*, 1998; Paniago *et al.*, 2003). No estudo de Paniago e colaboradores (2003), foi verificado acometimento de adrenais em 12 (2,8%) de 422 pacientes, de ossos em 6 (1,4%) e do sistema nervoso central em 6 (1,4%) casos. Na presente casuística, o envolvimento dos referidos sítios ocorreu em 3 (4%), 1 (1,3%) e 6 (8%) de 75 pacientes. O percentual de lesões de PCM localizadas em ossos, portanto, foi similar; lesões em adrenais e, sobretudo, no sistema nervoso central, foram mais freqüentes neste trabalho. Estudo de Almeida e colaboradores (2004), realizado em Curitiba, no Paraná, verificou acometimento do sistema nervoso central em 13,9% dos pacientes, superior ao encontrado na população do presente trabalho.

Em duas pacientes (3%), foi constatado óbito durante o período de seis anos do estudo. Em nenhum dos casos, entretanto, a causa da morte foi a PCM. Outros estudos demonstraram que a letalidade da PCM varia de 2% a 23% (Coutinho *et al.*, 2002; Marques, 1998; Marques *et al.*, 1998; Paniago *et al.*, 2003). Essa diferença provavelmente decorre do fato de que, na presente casuística, nenhum paciente

apresentava a forma aguda ou subaguda da doença, sabidamente associada a maior taxa de letalidade.

Os esquemas terapêuticos adotados variam, sobretudo, de acordo com a disponibilidade de drogas antifúngicas nos diferentes serviços. A gravidade do quadro clínico da PCM também pode influenciar a escolha da medicação a ser prescrita; assim, medicações administradas por via endovenosa, como a Anfotericina B, são preferidas em casos graves de PCM. No presente estudo, 20% dos pacientes foram tratados exclusivamente com azólicos, 31% receberam apenas sulfamidoterapia e 20% foram tratados com Anfotericina B. Estudo de Paniago e colaboradores (2003), realizado no estado do Mato Grosso do Sul, revelou que 90,3% dos 422 pacientes com diagnóstico de PCM fizeram uso da associação de Sulfametoxazol e Trimetoprim, por ser medicação de baixo custo e disponível nos serviços de saúde públicos da região. Outro trabalho, realizado na cidade de Botucatu, no estado de São Paulo, mostrou que a Anfotericina B foi utilizada por 46%, Cetoconazol, por 28%; Itraconazol, por 18%; sulfamidoterapia, por 46%; e Terbinafina, por 1% dos 315 pacientes (Marques *et al.*, 1998).

O relato do tempo de doença pré-tratamento foi encontrado em apenas um trabalho, cuja casuística era composta exclusivamente por pacientes com PCM crônica unifocal tegumentar com manifestações em mucosa oral. No referido trabalho, a média \pm desvio-padrão da variável em questão foi de $7,66 \pm 7,95$ meses (mín.-máx.: 3 semanas-4 anos); em 70,5% dos pacientes, o tratamento foi iniciado em até seis meses após o início dos sintomas (Bicalho *et al.*, 2001). No presente estudo, a mediana foi de 5 meses, com máximo de cinco anos, sendo igual ou inferior a seis meses em 52% dos pacientes. O achado de intervalo discretamente mais longo pode ser explicado pelo fato de que, nesta casuística, os sítios de

acometimento incluem órgãos diversos, cujas manifestações podem ser menos aparentes do que as de mucosas de vias aéreas superiores, levando a um atraso no diagnóstico.

7.2 Inatividade clínica

Não foram encontrados, na literatura pesquisada, estudos de pacientes com PCM crônica com enfoque na inatividade da doença. Estudo realizado nos principais serviços públicos de Infectologia Pediátrica de Belo Horizonte, Minas Gerais, com 38 casos de PCM aguda (Nogueira *et al.*, 2006a,b), demonstrou que a metade dos pacientes não apresentava mais sintomas da doença no nono mês de tratamento e que 17% do total permanecia com pelo menos um sintoma aos 30 meses de tratamento.

No presente trabalho, foi constatada remissão clínica em 71% dos pacientes acompanhados de março de 2001 a dezembro de 2006. A maioria dos pacientes (51%) atingiu a inatividade clínica em até seis meses de tratamento; em 34%, esse tempo foi superior a doze meses e em 21%, superior a 36 meses. Em comparação com o estudo de Nogueira e colaboradores (2006), verifica-se menor tempo necessário para 50% dos pacientes alcançarem a inatividade da doença (seis *versus* nove meses), porém um percentual maior de indivíduos permanecia com lesões ativas após 36 meses de tratamento. Portanto, a PCM crônica parece responder discretamente mais rápido à terapia específica do que a PCM aguda na maioria dos casos. Em qualquer das formas clínicas, faz-se necessário manter o tratamento por

longo período, de preferência superior a dois anos, a fim de se evitarem as suas recidivas.

Entre os 11 pacientes com PCM crônica que apresentaram tempo superior a 36 meses, após o início do primeiro tratamento, para remissão dos sintomas, houve pacientes com quadro leve, moderado e grave; alguns usavam a medicação regularmente, outros não. Acredita-se que alguns pacientes sejam mais vulneráveis imunologicamente do que outros; assim, ainda que a forma de apresentação da doença não pareça grave, eles teriam maior dificuldade em eliminar o fungo do organismo por apresentarem menor eficiência da resposta imunológica tipo Th1. Entretanto, apenas um paciente deste grupo participou do estudo imunológico, o que dificulta a elaboração de conclusões quanto a essa questão.

A proporção homem:mulher verificada no grupo que atingiu inatividade clínica foi de 4,3:1. No grupo que permaneceu com doença ativa, foi de 21:1 (21 homens e uma mulher). A variável sexo, no entanto, não foi considerada significativamente associada à inatividade clínica na regressão logística.

Apesar de não haver diferença estatisticamente significativa entre a média de idade do grupo que atingiu inatividade clínica e a média do outro grupo, maior percentual de pacientes que tiveram evolução favorável foi verificado entre aqueles na faixa etária de 21 a 30 anos (82%) e de 51 a 60 anos (85%). No primeiro intervalo, o melhor prognóstico pode estar associado com a menor incidência de comorbidades, já que os pacientes eram mais jovens. A amostra de pacientes com menos de 20 anos era constituída por apenas três pacientes e, portanto, muito pequena para se elaborarem inferências. No segundo intervalo, o maior percentual de remissão clínica pode ser explicado pela menor exposição ocupacional dos pacientes ao fungo, já que muitos se aposentam nessa faixa etária. Entre 61 e 70

anos, o percentual de inativação da PCM foi elevado também (78%); acima de 71 anos, havia somente três pacientes, o que levou à mesma limitação verificada para a faixa etária inferior a 20 anos.

As proporções das formas de apresentação clínica entre as diferentes faixas etárias não parecem estar associadas à evolução clínica dos pacientes, visto que o menor percentual relativo (8%, em contraposição à média geral de 28%) de pacientes com forma unifocal, que supostamente seria mais branda do que a forma multifocal, foi verificado no grupo com 51 a 60 anos de idade. Esse grupo foi o que apresentou maior proporção de pacientes com PCM que atingiram inatividade da doença.

Maior percentual de inativação foi verificado entre os trabalhadores domésticos (88%); apenas um paciente desse grupo, o único do sexo masculino, permaneceu com doença ativa ao final do seguimento. Os trabalhadores agrícolas formaram o grupo com menor proporção de pacientes que apresentaram remissão da doença (59%); entre os trabalhadores da construção civil, foi verificado percentual intermediário (79%). Essas observações provavelmente se devem à diferença no grau de exposição direta dos indivíduos aos aerossóis infectivos de *P. brasiliensis*, presentes no solo, durante as atividades laborativas; tal exposição é presumivelmente maior nos lavradores do que nos pedreiros e inferior nos donos-de-casa. Entretanto, a profissão do paciente não foi considerada um preditor de evolução da PCM crônica com significância estatística na regressão logística.

O esquema terapêutico utilizado foi considerado preditor significativo de evolução da PCM crônica (escore: 34,061; $p < 0,001$). Menor percentual de cura clínica foi observado entre os pacientes que usaram azólicos exclusivamente (80%) ou em associação a sulfas (58%). Treze (89%) dos 15 pacientes que receberam

Anfotericina B tiveram remissão da doença, o que pode ser devido à sua elevada eficácia antifúngica. Tal proporção foi de 80% entre os pacientes que utilizaram monoterapia com azólicos e de 91% entre aqueles que usaram exclusivamente sulfamidoterapia. Isso poderia refletir a diferença de eficácia entre as medicações, mas tal assertiva não pode ser feita, visto que os pacientes tratados exclusivamente com sulfamidoterapia têm, em geral, quadros mais brandos de PCM do que aqueles dos demais grupos, constituindo um viés. Além disso, seria necessário acompanhar os pacientes após a suspensão da medicação, por período mínimo de cinco anos, para se inferir sobre a eficácia da mesma. Neste estudo, apenas oito pacientes tiveram a terapia antifúngica suspensa por orientação médica, após período mínimo de três anos de tratamento, e nenhum deles apresentou recidiva durante seu acompanhamento.

A procedência, o tempo de doença pré-tratamento e a forma de apresentação clínica da PCM crônica (multifocal *versus* unifocal) não foram considerados fatores estatisticamente significativos na determinação da evolução da doença.

Nogueira e colaboradores (2006a,b) identificaram ascite e hipoalbuminemia como fatores de mau prognóstico, associados à maior frequência de óbitos. No presente trabalho, a regressão logística revelou que a presença de lesão em mucosas está estatisticamente associada a má evolução dos casos de PCM crônica (escore: 7,608; $p=0,006$). Dos 49 pacientes com lesão em mucosas, 30 (61%) apresentaram inatividade da doença e 19 (39%) permaneciam com doença ativa ao final do seguimento; dos 26 pacientes que não possuíam mucosas acometidas, 23 (88%) evoluíram com remissão da PCM e 3 (12%) tiveram má evolução apesar da terapia antifúngica instituída. Esse aspecto não foi previamente descrito na PCM. Na leishmaniose tegumentar americana, a forma mucosa está associada a maior

refratariedade ao tratamento. Em comparação com as outras formas clínicas da doença, a leishmaniose mucosa caracteriza-se por forte ativação de resposta imunológica do tipo Th1 e pequeno número de células parasitas no tecido do hospedeiro (BRASIL, 2007). É possível que a formação de granulomas compactos dificulte o acesso da droga até as células do agente etiológico, dificultando sua eliminação e, por conseguinte, prejudicando a resposta ao tratamento e retardando a cura clínica do paciente.

7.3 Dosagem sérica de anticorpos e marcadores inflamatórios

Na amostra de 26 pacientes que participaram do estudo imunológico, todos tinham doença ativa na primeira consulta. A remissão clínica foi constatada em 29%, 78% e 100% dos casos após seis, 12 e 36 meses de tratamento, respectivamente. Todavia, a concentração de nenhum dos marcadores séricos estudados atingiu os níveis considerados normais, ou seja, abaixo do ponto de corte estabelecido pelo método da curva ROC, em proporção tão elevada de pacientes, em cada um dos tempos de medida. Isso reflete a existência de atividade inflamatória residual ou persistente, a despeito do desaparecimento dos sintomas. Portanto, a inatividade clínica, isoladamente, não deve ser considerada parâmetro confiável para a interrupção do tratamento dos pacientes com PCM crônica.

As curvas ROC foram construídas para cada marcador sérico estudado, no intuito de se determinar quais deles poderiam ser parâmetros úteis para separar os indivíduos sadios dos pacientes com PCM crônica. Para tal fim, avaliou-se a área sob a curva, cujo valor varia de 0,5 a 1,0: quanto mais próximo esse valor for de 1,0,

maiores são a sensibilidade e a especificidade do teste. Neste trabalho, os maiores valores de área sob a curva foram verificados para IgG anti-Pb (0,964), sTNF-R2 (0,944) e sTNF-R1 (0,893), com $p < 0,0001$. CXCL9 e CCL24 apresentaram área sob a curva de 0,744 ($p = 0,001$) e 0,689 ($p = 0,01$), respectivamente, e, portanto, foram menos precisas na discriminação dos grupos de controles sadios e de pacientes com PCM crônica. Os outros marcadores testados não apresentaram valor-p significativo.

7.3.1 Dosagem sérica de anticorpos específicos anti-*P. brasiliensis*

A dosagem de anticorpos IgG contra antígenos somáticos de *P. brasiliensis* (IgG anti-Pb), por método ELISA, revelou níveis elevados dos mesmos nos pacientes não tratados, com redução progressiva durante os 36 meses de seguimento. Do mesmo modo que sTNF-R1, esses níveis permaneceram elevados ao final do tempo de acompanhamento, em comparação com o grupo controle.

Conforme preconizado em diversos trabalhos, exames sorológicos são úteis como um dos critérios para definição da cura clínica dos pacientes com PCM, desde que o antígeno utilizado no teste seja apropriado e que o método de dosagem tenha alta sensibilidade e especificidade (Brummer *et al.*, 1993; Camargo & Franco, 2000; Marques, 2003; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

O exame sorológico realizado neste estudo mediu através de teste ELISA a produção de anticorpos contra antígenos somáticos de *P. brasiliensis*, preparados conforme descrição de Reis e colaboradores (2005). Foram verificadas sensibilidade

de 85% e especificidade de 84% no ponto de corte de 0,20, definido pela curva ROC. Esses valores são similares aos descritos na literatura para a contra-imunoeletroforese e para a imunodifusão dupla; para o teste ELISA, porém, a sensibilidade descrita é próxima de 100%, ou seja, superior ao encontrado neste estudo (Camargo & Franco, 2000; Marques, 2003; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). Tal diferença provavelmente decorre das distintas preparações antigênicas utilizadas. Não foram realizados exames sorológicos com outras técnicas nem com outras preparações antigênicas na população estudada.

O teste utilizado no presente trabalho mostrou-se adequado ao acompanhamento dos pacientes com PCM, e seus títulos decrescem ao longo do tratamento, embora possam permanecer fracamente positivos por toda a vida do paciente. No entanto, os antígenos somáticos utilizados para a detecção dos anticorpos IgG no soro dos pacientes não são padronizados até o momento para uso de rotina nos serviços de saúde do país, o que torna difícil a reprodutibilidade de tal teste em larga escala no presente.

Conforme demonstrado em trabalhos prévios, os pacientes imunocompetentes com PCM apresentam sorologia, em geral, positiva. Os títulos de anticorpos são habitualmente mais elevados nos pacientes com formas agudas generalizadas; naqueles com formas crônicas localizadas, o resultado pode ser falso-negativo (Brummer *et al.*, 1993; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). Na casuística aqui apresentada, apenas um paciente apresentou resultado negativo de IgG anti-Pb pré-tratamento, inferior ao ponto de corte de 0,20; esse paciente tinha PCM unifocal tegumentar, com lesões na pele do lábio superior e na mucosa nasal, diagnosticada oito anos antes de sua primeira consulta no Ambulatório de PCM do HC/UFMG. Apesar de ser um quadro localizado, seu controle foi extremamente difícil, a despeito

de tratamentos com associação de azólicos e sulfamídicos; a inatividade da doença foi alcançada apenas após o uso de Anfotericina B. Tal paciente, entretanto, tinha, desde a primeira consulta, níveis séricos bastante elevados de sTNF-R1, sTNF-R2 e CXCL9, sugerindo a presença de inflamação com deflagração de resposta Th1 associada a produção mínima de anticorpos IgG específicos, que foi detectada pela dosagem sérica dos marcadores inflamatórios, mas não pelo exame sorológico. Portanto, nos pacientes com quadro clínico localizado, como o paciente em questão, os marcadores associados à resposta imunológica tipo Th1, tais como sTNF-R1, sTNF-R2 e CXCL9, são mais adequados para estimar a persistência de atividade inflamatória do que os anticorpos IgG específicos.

7.3.2 Dosagem sérica de sTNF-R1 e sTNF-R2

Os pacientes estudados apresentaram altos níveis séricos de sTNF-R1 e de sTNF-R2 antes do tratamento, com lenta diminuição ao longo da terapia antifúngica, concomitante à redução da carga parasitária. Após 36 meses, a concentração de sTNF-R1 permanecia significativamente elevada em comparação à dos controles saudáveis.

No estudo de Alessandri e colaboradores (2006), em casos de tuberculose pulmonar, foi demonstrado que os níveis de ambos os receptores solúveis estavam aumentados no momento do diagnóstico e voltaram aos valores normais após quatro a seis meses de uso de tuberculostáticos. Na leishmaniose visceral, a diminuição dos níveis de sTNF-R1 e sTNF-R2 também ocorre prontamente nos pacientes com

resposta favorável ao tratamento (Zijlstra *et al.*, 1995). Esse achado está de acordo com o caráter mais insidioso da PCM em relação à tuberculose e à leishmaniose, o que justifica seu tratamento mais longo a fim de prevenir as recidivas da doença.

Por outro lado, os resultados aqui apresentados são discordantes dos de Corvino e colaboradores (2007), que descreveram aumento dos níveis de sTNF-R1, mas não de sTNF-R2, nos pacientes com PCM crônica. Foi verificada redução gradual dos níveis de sTNF-R1 durante o seguimento de 24 meses, como no presente trabalho. É possível que a discordância de resultado quanto a sTNF-R2 seja devida a diferença de critérios empregados para classificar os pacientes, ou ao fato de que os pacientes com PCM crônica daquele estudo apresentavam apenas formas mais leves da doença. Na casuística aqui apresentada, não havia nenhum paciente com PCM aguda (tipo juvenil), mas o quadro clínico dos pacientes estudados envolveu todo o espectro de gravidade da PCM crônica (tipo adulto).

O fato de a concentração de sTNF-R1 permanecer elevada nos pacientes com PCM pode refletir uma ativação residual ou persistente do sistema imunológico por *P. brasiliensis*, mesmo após um longo tratamento. Na forma crônica da PCM, sTNF-R1 parece um marcador mais fidedigno de atividade da doença do que sTNF-R2, embora sTNF-R2 seja mais preciso para separar os controles sadios dos pacientes com PCM não tratados, conforme descrito acima. A comprovação dessas hipóteses significa que o tratamento da PCM deve ser mantido enquanto os níveis de sTNF-R1 se mantiverem elevados. Seguindo tal critério, apenas cinco (29%) de 17 pacientes da amostra estudada poderiam ter seu tratamento suspenso ao final de 36 meses. Entretanto, outras investigações são necessárias para avaliar os diferentes papéis de cada receptor nos pacientes com PCM. A análise conjunta do estado clínico dos pacientes com os níveis desses marcadores inespecíficos, cujos

títulos apresentam correlação com a atividade da PCM, e com os anticorpos específicos anti-*P. brasiliensis*, cujos títulos podem permanecer positivos por toda a vida do paciente, poderia aumentar significativamente a acurácia da determinação do momento adequado para se interromper a terapia antifúngica dos pacientes com PCM.

7.3.3 Dosagem sérica de quimiocinas

A concentração de CXCL9 mostrou-se alta em pacientes com PCM crônica não tratada e diminuiu de modo progressivo com o tratamento específico. Os níveis de CXCL9 nos pacientes diminuíram mais rapidamente do que os de sTNF-R1 e sTNF-R2, exceto em um dos pacientes estudados, que teve PCM cerebral e níveis altíssimos de CCL24 nas dosagens aos seis, 12 e 36 meses de tratamento, conforme discutido a seguir. A concentração sérica de CXCL9 pode ser utilizada para discriminar pacientes com PCM crônica não tratados de controles sadios, porém a sensibilidade e a especificidade do teste no ponto de corte de 312 pg/mL é inferior à de IgG anti-Pb, sTNF-R1 e sTNF-R2. Como marcador de atividade inflamatória nos casos de PCM crônica, CXCL9 mostrou-se menos sensível do que sTNF-R1, sTNF-R2 e anticorpos IgG anti-Pb.

Corvino e colaboradores (2007) também verificaram níveis elevados de CXCL9 em pacientes com PCM ao diagnóstico, independente da forma clínica, em comparação com o grupo controle. Esse resultado era esperado na forma crônica da doença, na qual os pacientes têm maior resistência à infecção por *P. brasiliensis* do

que na forma aguda, devido à ativação preferencial da resposta imunológica tipo Th1. CXCL9 é uma quimiocina que atrai células Th1 e bloqueia a migração de células Th2 (Colobran *et al.*, 2007a). Esses achados foram ratificados por Souto e colaboradores (2003), que demonstraram que IFN γ modula a produção de quimiocinas nos pulmões de camundongos infectados com *P. brasiliensis*, induzindo, assim, a expressão de quimiocinas associadas à resposta Th1 e seus receptores.

Neste trabalho, foi demonstrada a elevação dos níveis de CCL2 e CCL3 nos pacientes com PCM crônica ao longo do primeiro ano de tratamento. O aumento da concentração de CCL2 é mais precoce, em geral, do que o da concentração de CCL3. Apenas um paciente não apresentou aumento dos níveis de CCL2; tal paciente também apresentou baixo nível de CCL3 durante todo o estudo. Pacientes não tratados apresentaram níveis séricos dessas quimiocinas semelhantes aos dos controles sadios e, portanto, nenhuma delas é útil para separar indivíduos sadios dos pacientes com PCM antes da terapia antifúngica. Ao final de 36 meses de tratamento, a concentração de CCL2 permanecia significativamente aumentada nos pacientes com PCM em relação aos controles e o nível de CCL3 havia retornado ao seu valor normal, exceto em dois pacientes. Esse aumento tardio já havia sido descrito por Souto e colaboradores (2003) e provavelmente não se relaciona a uma ativação primária da resposta imunológica tipo Th2, haja vista que os níveis de CCL11, classicamente associados ao recrutamento de células Th2, não se mostraram aumentados no grupo de pacientes com PCM (Charo & Ransohoff, 2006; Colobran *et al.*, 2007a).

Esse pico transitório das concentrações de CCL2 e CCL3 é provavelmente resultante do balanço fisiológico entre as respostas imunológicas Th1 e Th2. Em outras palavras, o declínio da resposta Th1 determinado pela redução da carga

fúngica decorrente do tratamento efetivo, levaria ao aumento transitório das citocinas e quimiocinas relacionadas à resposta Th2, incluindo CCL2 e CCL3. Tal hipótese está em concordância com ensaios prévios realizados em células mononucleares de indivíduos sadios e pacientes com tuberculose ativa, os quais revelaram concentrações crescentes de CCL2 e CCL3 em resposta à infecção por *M. tuberculosis* (Sadek *et al.*, 1998). Outra explicação possível relaciona-se ao fenômeno de imunorregulação, que pode ser modulado por CCL2 (DePaolo *et al.*, 2004; Karpus *et al.*, 1998).

Não parece provável que o aumento nos níveis séricos de CCL2 e CCL3 a partir de seis meses do início da terapia antifúngica seja devido ao retorno de *P. brasiliensis*, haja vista que eles tendem a diminuir a partir dos 12 meses de tratamento. É, no entanto, recomendável que os antifúngicos não sejam suspensos nesta fase de transição, em que a resposta Th2 está mais ativada, pois isso poderia favorecer a multiplicação de células fúngicas eventualmente persistentes, com conseqüente retorno da atividade da PCM. Mais estudos são necessários para investigar tal hipótese.

Os pacientes estudados também apresentaram elevação discreta, porém estatisticamente significativa, da concentração de CCL24 após 36 meses de terapia antifúngica. Dois pacientes, ambos com formas graves de PCM cerebral, que necessitaram de curso terapêutico com Anfotericina B, apresentaram níveis muito altos da quimiocina, em pelo menos três das quatro dosagens realizadas durante o acompanhamento, em nítida discrepância em relação aos demais pacientes. Um deles também possuía níveis altos de CXCL9 e anticorpos IgG anti-Pb após 36 meses. As demais quimiocinas, sTNF-R1 e sTNF-R2 haviam diminuído. O outro paciente possuía apenas aumento dos níveis de CCL2 e CCL3 ao final do

acompanhamento. Além desses dois, outros três pacientes que participaram do estudo imunológico também tiveram envolvimento cerebral por PCM, mas seus níveis de CCL24 não revelaram tal comportamento. Não há relatos semelhantes na literatura.

Portanto, os níveis de sTNF-R1, sTNF-R2, CXCL9 e anticorpos IgG anti-Pb dosados por ELISA são mais altos nos pacientes com PCM crônica não tratados e diminuem progressivamente ao longo da terapia antifúngica. Entre esses marcadores, sTNF-R1 e IgG anti-Pb permaneceram elevados em relação aos controles após 36 meses de tratamento. Isso sugere a presença de inflamação persistente nos pacientes com PCM crônica (tipo adulto) e justifica seu longo tratamento. Os níveis de sTNF-R2 e, sobretudo, de CXCL9, declinam mais rapidamente. Dentre os marcadores estudados, IgG anti-Pb e sTNF-R2 são os que discriminam com maior sensibilidade e especificidade os controles sadios dos pacientes com PCM crônica não tratada. As concentrações pré-tratamento de CCL2 e CCL3 estavam baixas e aumentaram significativamente após 12 meses de terapia, decrescendo a seguir. CCL24 também apresentou um pico tardio, aos 36 meses. Isso implica que o sucesso terapêutico nos pacientes com PCM pode estar associado a uma mudança transitória em seu padrão imunológico, de Th1 para Th2. Os parâmetros clínicos e sorológicos utilizados de rotina atualmente não são suficientes para determinar o momento correto para interromper a terapia antifúngica nos pacientes com PCM, e as recidivas são muito comuns. Mais investigações, com tempo de seguimento mais longo e com maior número de pacientes, são necessárias para determinar se algum desses marcadores inflamatórios pode ser usado como parâmetro confiável, possivelmente em associação aos critérios atuais,

para auxiliar nessa decisão, a qual é uma das maiores preocupações de todo médico que trata pacientes com PCM.

8 CONCLUSÕES

Os dados compilados neste trabalho permitem concluir que:

- a) Os preditores de mau prognóstico dos casos de PCM crônica foram esquema terapêutico – uso de azólicos isoladamente ou combinados a sulfas – e acometimento de mucosas;
- b) O estabelecimento de inatividade clínica nos pacientes com PCM crônica precede a remissão da atividade inflamatória mensurada pelos marcadores sorológicos e imunológicos;
- c) Ocorre uma mudança de padrão de resposta imunológica de Th1 para Th2 ao longo do tratamento dos pacientes com PCM crônica;
- d) O pico tardio das citocinas tipo Th2 pode refletir o fenômeno de imunorregulação ou resultar do balanço fisiológico entre as respostas Th1 e Th2;
- e) Os anticorpos IgG anti-Pb, sTNF-R2 e sTNF-R1, em ordem decrescente, foram os marcadores que apresentaram maior precisão na discriminação dos grupos de controles sadios e de pacientes com PCM crônica não tratada;
- f) Nos pacientes com PCM crônica com quadro clínico localizado, os marcadores inespecíficos associados à resposta imunológica tipo Th1, tais como sTNF-R1, sTNF-R2 e CXCL9, foram mais adequados para estimar a persistência de atividade inflamatória do que os anticorpos IgG específicos;

- g) Na forma crônica da PCM, sTNF-R1 parece ser um marcador mais fidedigno de atividade da doença do que sTNF-R2, embora sTNF-R2 seja mais preciso para separar os controles sadios dos pacientes com PCM não tratada.

9 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Constituíram limitações deste estudo:

- a) A ausência de resultados de sorologia pelas técnicas de imunodifusão dupla ou contra-immunoeletoforese;
- b) A ausência de resultados de sorologia com antígenos padronizados, tais como a gp43, cuja reprodutibilidade é maior;
- c) As perdas de pacientes constatadas ao longo do seguimento na etapa do estudo imunológico, que não permitiram que os marcadores fossem dosados, em todos os pacientes, em todos os tempos de medidas;
- d) A casuística pequena para avaliar a real importância dos preditores de mau prognóstico identificados na análise de regressão logística;
- e) A ausência de registro sobre as profissões anteriores dos pacientes, tornando difícil interpretar se o achado do grande percentual de trabalhadores da construção civil acometidos é devido a uma tendência à urbanização da PCM ou se esses indivíduos são ex-lavradores que adquiriram a infecção durante contato com atividades agrícolas;
- f) O uso da terapia antifúngica poderia, *per se*, interferir nos níveis dos marcadores inflamatórios dosados neste trabalho.

10 PROPOSIÇÕES

A partir dos resultados deste trabalho, sugerem-se as seguintes investigações:

- a) Acompanhamento dos pacientes com PCM que tiveram suspensa a terapia antifúngica a fim de se avaliarem as taxas de recidiva da PCM, após uso de diferentes esquemas terapêuticos;
- b) Acompanhamento dos pacientes com PCM que tiveram suspensa a terapia antifúngica a fim de se estudar prospectivamente o comportamento dos anticorpos específicos e dos marcadores inflamatórios inespecíficos dosados neste trabalho;
- c) Avaliação da associação de parâmetros laboratoriais rotineiros, tais como velocidade de hemossedimentação e proteína C reativa, com a inatividade clínica e com os marcadores inflamatórios dosados neste trabalho;
- d) Investigar se a suspensão da terapia antifúngica dos pacientes com PCM crônica durante a fase de pico dos níveis de quimiocinas tipo Th2 implicaria em maior taxa de recidiva da doença;
- e) Investigar se a análise conjunta do estado clínico dos pacientes com os níveis de marcadores inflamatórios inespecíficos e de anticorpos específicos anti-Pb poderia aumentar a acurácia da determinação do momento adequado para se interromper a terapia antifúngica dos pacientes com PCM.

REFERÊNCIAS

- ADERKA, D. The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 7, p. 231-240. 1996.
- ALBORNOZ, M.B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**, v. 9, p. 248-252. 1971.
- ALESSANDRI, A.L.; SOUZA, A.L.; OLIVEIRA, S.C. *et al.* Concentrations of CXCL8, CXCL9 and sTNFR1 in plasma of patients with pulmonary tuberculosis undergoing treatment. **Inflamm. Res.**, v. 55, p. 528-33. 2006.
- ALMEIDA, F. *Blastomyces e Paracoccidioides*. **An. Fac. Med. Sao Paulo**, v. 22, p. 61-71. 1946.
- ALMEIDA, F. Estudos comparativos do granuloma coccidioidico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasito brasileiro. **An. Fac. Med. Sao Paulo**, v. 5, p. 125-141. 1930.
- ALMEIDA, S.M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TEIVE, H.A.G. *et al.* Central Nervous system paracoccidioidomycosis: clinical features and laboratorial findings. **J. Infect.**, v. 48, p. 193-198. 2004.
- ARRUDA, C.; FRANCO, M.F.; KASHINO, S.S. *et al.* Interleukin-12 protects mice against disseminated infection caused by *Paracoccidioides brasiliensis* but enhances pulmonary inflammation. **Clin. Immunol.**, v. 103, p. 185-195. 2002.
- BAGAGLI, E.; FRANCO, M.; BOSCO, S.M. *et al.* High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. **Med. Mycol.**, v. 41, n. 3, p. 217-223. 2003.
- BAGAGLI, E.; SANO, A.; COELHO, K.I. *et al.* Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillus (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, p. 505-512. 1998.
- BENARD, G.; ROMANO, C.C.; CACERE, C.R. *et al.* Imbalance of IL-2, IFN- γ and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, v. 13, p. 248-252. 2001.
- BICALHO, R.N.; DO ESPÍRITO SANTO, M.F.; FERREIRA DE AGUIAR, M.C *et al.* Oral paracoccidioidomycosis: a retrospective study of 62 Brazilian patients. **Oral Diseases**, v. 7, p. 56-60. 2001.
- BITTENCOURT, J.I.M.; OLIVEIRA, R.M.; COUTINHO, Z.F. Paracoccidioidomycosis mortality in the State of Paraná, Brazil, 1980/1998. **Cad. Saude Publica**, v. 21, n. 6, p. 1856-1864. 2005.

BLOTTA, M.H.S.L.; CAMARGO, Z.P. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* antibodies in paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 3, p. 671-676. 1993.

BLOTTA, M.H.S.L.; MAMONI, R.L.; OLIVEIRA, S.J. *et al.* Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 61, n. 3, p. 390-394. 1999.

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

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

BORGES-WALMSLEY, M.I.; CHEN, D.; SHU, X. *et al.* The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends Microbiol.**, v. 10, n. 2, p. 80-87. 2002.

BOZZI, A.; REIS, B.S.; PRADO, F.L.S. *et al.* Modulation of CD28 and CD86 expression in patients with paracoccidioidomycosis in different periods of treatment. **Scand. J. Immunol.**, v. 60, p. 500-505. 2004.

BOZZI, A.; PEREIRA, P.P.N.; REIS, B.S. *et al.* Interleukin-10 and Tumor Necrosis Factor- α single nucleotide gene polymorphism frequency in paracoccidioidomycosis. **Hum. Immunol.**, v. 67, p. 931-939. 2006.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília, 2007.

BRASIL. MINISTÉRIO DO TRABALHO E EMPREGO. **Classificação Brasileira de Ocupações**. Disponível em: <<http://www.mtecbo.gov.br/busca.asp>>. Acesso em 21 abr. 2008.

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

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

CADAVID, D.; RESTREPO, A. Factors associated with *Paracoccidioides brasiliensis* infection among permanent residents of three endemic areas in Colombia. **Epidemiol. Infect.**, v. 111, p. 121-133. 1993.

CALICH, V.L.; KASHINO, S.S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, p. 615-623. 1998.

CALICH, V.L.G.; VAZ, C.A.C.; BURGER, E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Res. Immunol.**, v. 149, p. 407-417. 1998.

CALLE, D.; ROSERO, D.S.; OROZCO, L.C. *et al.* Paracoccidioidomycosis in Colombia: an ecological study. **Epidemiol. Infect.**, v. 126, p. 309-315. 2001.

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

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

CARVALHO, K.C.; GANIKO, L.; BATISTA, W.L. *et al.* Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* and gp43 expression in isolates bearing known PbGP43 genotype. **Microbes Infect.**, v. 7, p. 55-65. 2005.

CASTRO, R.M.; CUCÉ, L.C.; FAVA-NETTO, C. Paracoccidioidomicose. Inoculação experimental 'in anima nobile'. Relato de um caso. **Med. Cutan. Iber. Lat. Am.**, v. 3, p. 289-292. 1975.

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

CHENSUE, S.W.; WARMINGTON, K.; RUTH, J. Cytokine responses during mycobacterial and schistosomal antigen-induced pulmonary granuloma formation. Production of Th1 and Th2 cytokines and relative contribution of tumor necrosis factor. **Am. J. Pathol.**, v. 145, p. 1105-1113. 1994.

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

COIMBRA Jr, C.E.A.; WANKE, B.; SANTOS, R.V. *et al.* Paracoccidioidin and histoplasmin sensitivity in the Tupí-Mondé Amerindian populations from Brazilian Amazonia. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.88, p. 197-207. 1994.

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

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

CORREDOR, G.G.; PERALTA, L.A.; CASTAÑO, J.H. *et al.* The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. **Med. Mycol.**, v. 43, n. 3, p. 275-280. 2005.

CORVINO, C.L. ; MAMONI, R.L. ; FAGUNDES, G.Z.Z. *et al.* Serum interleukin-18 and soluble tumour necrosis factor receptor 2 are associated with disease severity in patients with paracoccidioidomycosis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 147, p. 483-490. 2007.

COSTA, E.O.; FAVA-NETTO, C. Contribution to the epidemiology of paracoccidioidomycosis and histoplasmosis in the state of São Paulo, Brazil. Paracoccidioidin and histoplasmin intradermic tests in domestic animals. **Sabouraudia**, v. 16, n. 2, p. 93-101. 1978.

COUTINHO, Z.F.; SILVA, D.; LAZÉRA, M.; *et al.* Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad. Saúde Pública**, v. 18, p. 1441-1454. 2002.

CRYPTIC species complex. In: **WIKIPEDIA**: the free encyclopedia, 16 abr. 2008. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Cryptic_species_complex&oldid=206002210>. Acesso em 21 abr. 2008.

DEEPE JR, G.S. Prospects for the development of fungal vaccines. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 10, n. 4, p. 585-596. 1997.

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

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

DINIZ, S.N.; CISALPINO, P.S.; FREIRE, A.T.F. *et al.* In vitro granulomas formation, NO production and cytokines profile from human mononuclear cells induced by fractionated antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Hum. Immunol.**, v. 62, p. 799-808. 2001.

FALCÃO, P.L.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; FRAGA, L.A. *et al.* Plasma concentrations and role of macrophage inflammatory protein-1 α during chronic *Schistosoma mansoni* infection in humans. **J. Infect. Dis.**, v. 186, p. 1696-1700. 2002.

FLORES-VILLANUEVA, P.O.; RUIZ-MORALES, J.A.; SONG, C.H. *et al.* A functional promoter polymorphism in monocyte chemoattractant protein-1 is associated with increased susceptibility to pulmonary tuberculosis. **J. Exp. Med.**, v. 202, n. 12, p. 1649-58. 2005.

FONSECA, E.R.; PARDAL, P.P.; SEVERO, L.C. Paracoccidioidomicose em crianças em Belém do Pará. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 32, p. 31-33. 1999.

FRANCO, M. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 25, p. 5-18. 1987.

FRANCO, M.; PERACOLI, M.T.; SOARES, A. *et al.* Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **Curr. Top. Med. Mycol.**, v. 5, p. 115-149. 1993.

FRANCO, M.F.; MONTENEGRO, M.R.; MENDES, R.P. *et al.* Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 20, n. 2, p. 129-132. 1987.

GARCIA, N.M.; DEL NEGRO, G.M.; HEINS-VACCARI, E.M. *et al.* *Paracoccidioides brasiliensis*, nova amostra isolada das fezes de um pingüim (*Pygoscelis adeliae*). **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 35, n. 3, p. 227-235. 1993.

GARCÍA-BUSTÍNDUY, M.; GUIMERÁ, F.J.; ARÉVALO, P. *et al.* Cutaneous primary paracoccidioidomycosis. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 14, n. 2, p. 113-117. 2000.

GIMENEZ, M.F. Paracoccidioidomycosis. **Mongr. Dermatol.**, v. 7, p. 285-291. 1994 *apud* GARCÍA-BUSTÍNDUY, M.; GUIMERÁ, F.J.; ARÉVALO, P. *et al.* Cutaneous primary paracoccidioidomycosis. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 14, n. 2, p. 113-117. 2000.

GINARTE, M.; PEREIRO Jr, M.; TORIBIO, J. Imported paracoccidioidomycosis in Spain. **Mycoses**, v. 46, p. 407-411. 2003.

GIRARDIN, E.; ROUX-LOMBARD, P.; GRAU, G.E. *et al.* Imbalance between tumour necrosis factor-alpha and soluble TNF receptor concentrations in severe meningococcaemia. The J5 Study Group. **Immunology**, v. 76, p. 20-23. 1992.

GODOY, H.; REICHART, P.A. Oral manifestations of paracoccidioidomycosis. Report of 21 cases from Argentina. **Mycoses**, v. 46, p. 412-417. 2003.

GOLDANI, L. Z.; MONTEIRO, C. M. C.; DONADI, E. A. *et al.* HLA antigens in Brazilian patients with paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 114, p. 89-91. 1991.

GOLDANI, L.Z.; SUGAR, A.M. Paracoccidioidomycosis and AIDS: an overview. **Clin. Infect. Dis.**, v. 21, n. 5, p. 1275-1281. 1995.

GOMES, G.M.; CISALPINO, P.S.; TABORDA, C.P. *et al.* PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 9, p. 3478-3480. 2000.

GÓMEZ, B.L.; NOSANCHUK, J.D. Melanin and fungi. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 16, n. 2, p. 91-96. 2003.

GÓMEZ, B.L.; NOSANCHUK, J.D.; DÍEZ, S. *et al.* Detection of melanin-like pigments in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro and during infection. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 9, p. 5760-5767. 2001.

GROSE, E.; TAMSITT, J.R. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. **Sabouraudia**, v. 4, n. 2, p. 124-125. 1965.

GROSSI, R. Concepto de reservárea - área endémica - área de importación de casos en ciertas enfermedades infecciosas. **Dermatol. Venez.**, v. 11, n. 1, p. 1055-1063. 1970.

GU, L.; TSENG, S.; HORNER, R.M. *et al.* Control of Th2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. **Nature**, v. 404, p. 407-411. 2000.

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

HOGAN, L.H.; KLEIN, B.S.; LEVITZ, S.M. Virulence factors of medically important fungi. **Clin Microb Rev**, v. 9, n. 4, p. 469-488. 1996.

IWAI, L.K.; YOSHIDA, M.; SADAHIRO, A. *et al.* T-Cell recognition of *Paracoccidioides brasiliensis* gp43-derived peptides in patients with paracoccidioidomycosis and healthy individuals. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 14, n. 4, p. 474-6. 2007.

JOHNSON, W.D.; LANG, C.M. Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis) in a squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). **Vet. Pathol.**, v. 14, n. 4, p. 368-371. 1977.

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

KARPUS, W.J.; KENNEDY, K.J.; KUNKEL, S.L. *et al.* Monocyte chemotactic protein 1 regulates oral tolerance induction by inhibition of T helper cell 1-related cytokines. **J. Exp. Med.**, v. 187, p. 733-741. 1998.

KELLY, M.J.; DUNSTAN, F.D.; LLOYD, K. *et al.* Evaluating cutpoints for the MHI-5 and MCS using the GHQ-12: a comparison of five different methods. **BMC Psychiatry**, v. 8, n. 1, p. 10-15. 2008.

KERN, P.; HEMMER, C.J.; GALLATI, H. *et al.* Soluble tumor necrosis factor receptors correlate with parasitemia and disease severity in human malaria. **J. Infect. Dis.**, v. 166, p. 930-934. 1992.

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

KEUTER, M.; DHARMANA, E.; GASEM, M.H. *et al.* Patterns of proinflammatory cytokines and inhibitors during typhoid fever. **J. Infect. Dis.**, v. 169, p. 1306-1311. 1994.

LACAZ, C.S.; SAMPAIO, S.A.P. Tratamiento de blastomicose sulamericana com Anfotericina B. Resultados preliminares. **Rev. Paulista Med.**, v. 52, p. 443-450. 1958.

LACAZ, C.S.; MINAMI, P.S.; RAMOS, W.F. Aspectos morfológicos do *Paracoccidioides brasiliensis* em vida parasitária. **Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. Sao Paulo**, v.18, p. 273-284. 1963.

LACERDA, G.B.; ARCE-GOMEZ, B.; TELLES FILHO, F.Q. Increased frequency of HLA-B40 in patients with paracoccidioidomycosis. **J Med Vet Mycol**, v. 26, p. 253-256. 1988.

LAUAND, F. Contribuição para o estudo da morfologia do *Paracoccidioides brasiliensis* nos tecidos orais. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 8, n. 2, p. 69-78. 1966.

LU, B.; RUTLEDGE, B.J.; GU, L. *et al.* Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. **J. Exp. Med.**, v. 187, p. 601-608. 1998.

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

LYON-DE-MOURA, A.C. Estudo comparativo do processo de infecção experimental de isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* obtidos de pacientes com diferentes formas clínicas de paracoccidioidomycose. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, 2004. Dissertação de Mestrado em Microbiologia.

MACKINNON, J.E.; ARTAGAVEYTIA-ALLENDE, R.C.; ARROYO, L. Sobre la especificidad de la intradermorreacción con paracoccidioidina. **An. Fac. Med. Univ. Repub. Montev. Urug.**, v. 38, n. 9-10, p. 363-382. 1953.

MALUF, M.L.F.; PEREIRA, S.R.C.; TAKAHACHI, G. *et al.* Prevalência de paracoccidioidomycose-infecção determinada através de teste sorológico em doadores de sangue na região Noroeste do Paraná, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, n. 1, p. 11-16. 2003.

MAMONI, R.L.; BLOTTA, M.H. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. **Cytokine**, v. 32, p. 20-29. 2005.

MAMONI, R.L.; BLOTTA, M.H.S.L. Flow-cytometric analysis of cytokine production in human paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, v. 35, p. 207-216. 2006.

MAMONI, R.L.; NOUER, S.A.; OLIVEIRA, S.J. *et al.* Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with juvenile form of paracoccidioidomycosis. **Med. Mycol.**, v. 40, p. 153-159. 2002.

MANGIATERRA, M.L.; GIUSIANO, G.E.; ALONSO, J.M. *et al.* *Paracoccidioides brasiliensis* infection in a subtropical region with important environmental changes. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v. 92, n. 3, p. 173-176. 1999. [Abstract]

- MARQUES, S.A. Paracoccidioidomicose. **An. Bras. Dermatol.**, v. 73, n. 5, p. 455-467. 1998.
- MARQUES, S.A. Paracoccidioidomicose: atualização epidemiológica, clínica e terapêutica. **An. Bras. Dermatol.**, v. 78, n. 2, p. 135-150. 2003.
- MARQUES, S.A.; DILLON, N.L.; CAMARGO, R.M.P. *et al.* Paracoccidioidomicose: estudo e aspectos clínicos no Departamento de Dermatologia da Escola de Medicina de Botucatu (São Paulo – Brasil). **An. Bras. Dermatol.**, v. 73, n. 5, p. 411-417. 1998.
- MARTINEZ, R.; VITALI, L.H.; HENRIQUES, J.H.S. *et al.* Inquérito soroprevalencial para infecções por fungos causadores de micoses sistêmicas na Reserva Indígena de Xacriabá, Estado de Minas Gerais. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35, n. 4, p. 347-350. 2003.
- MATUTE, D.R.; McEWEN, J.G.; PUCCIA, R. *et al.* Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol. Biol. Evol.**, v. 23, n. 1, p. 65-73. 2006.
- McKENNA, P. 'Hidden' species may be surprisingly common. **NewScientist.com**, 19 jul. 2007. Disponível em: <<http://www.newscientist.com/article/dn12293-hidden-species-may-be-surprisingly-common.html>>. Acesso em 21 abr. 2008.
- MENDES-GIANNINI, M.J.S.; CAMARGO, M.E.; LACAZ, C.S. *et al.* Immunoenzymatic absorption test for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 20, p. 103-108. 1984.
- MENDES-GIANNINI, M.J.S.; TAYLOR, M.L.; BOUCHARA, J.B. *et al.* Pathogenesis II: fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. **Med. Mycol**, v. 38, suppl. 1, p. 113-123. 2000.
- MINGUETTI, G.; HOFMEISTER, R.M.; FAVARO, M. *et al.* Ultraestrutura do *Paracoccidioides brasiliensis* I – Na fase filamentosa. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 25, n. 4, p. 152-160. 1983a.
- MINGUETTI, G.; HOFMEISTER, R.M.; FAVARO, M. *et al.* Ultraestrutura do *Paracoccidioides brasiliensis* I – Na fase leveduriforme. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 25, n. 4, p. 161-167. 1983b.
- MONTENEGRO, M.R.G. Formas clínicas da paracoccidioidomicose. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 28, p. 203-204. 1986.
- MOREIRA, M.A.; SOUZA, A.L.; LANA-PEIXOTO, M.A. *et al.* Chemokines in the cerebrospinal fluid of patients with active and stable relapsing-remitting multiple sclerosis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 39, p. 441-445. 2006.
- MÓS, E.N.; FAVA-NETTO, C. Contribuição ao estudo da paracoccidioidomicose. I. Possível papel epidemiológico de cães. Estudo sorológico e anatomo-patológico. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 16, n. 3, p. 154-159. 1974.

- MUNK, M.E.; ANDING, P.; SCHETTINI, A.P.M. *et al.* Soluble tumor necrosis factor alpha receptors in sera from leprosy patients. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 423-425. 1999.
- NAIFF, R.D.; FERREIRA, L.C.; BARRETT, T.V. *et al.* Paracoccidioidomicose enzoótica em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no Estado do Pará. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.**, v. 28, n. 1, p. 19-27. 1986.
- NEGRONI, P. El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprotificamente en el suelo Argentino. **Prensa Med. Argent.**, v. 53, p. 2381-2382. 1966.
- NEGRONI, R.; ROBLES, A. M. El valor pronóstico de la prueba cutanea en paracoccidioidomycosis. **Med. Cutan. Ibero Lat. Am.**, v. 2, n. 6, p. 453-457. 1974.
- NOGUEIRA, M.G.S.; ANDRADE, G.M.Q.; TONELLI, E. Clinical evolution of paracoccidioidomycosis in 38 children and teenagers. **Mycopathologia**, v. 161, p. 73-81. 2006a.
- NOGUEIRA, M.G.S.; ANDRADE, G.M.Q.; TONELLI, E. *et al.* Aspectos laboratoriais evolutivos de crianças em tratamento da paracoccidioidomicose. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39, p. 478-483. 2006b.
- ONO, M.A.; BRACARENSE, A.P.; MORAIS, H.S. *et al.* Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. **Med. Mycol.**, v. 39, n. 3, p. 277-282. 2001.
- ONO, S.J., NAKAMURA, T., MIYAZAKI, D. *et al.* Chemokines: roles in leukocyte development, trafficking, and effector function. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 111, p. 1185-1199. 2003.
- PADILHA-GONÇALVES, A. Paracoccidioidomicose: quadro clínico como expressão da imunopatologia. **An Bras Dermatol**, v. 71, p. 437-440. 1996.
- PANIAGO, A.M.M.; AGUIAR, J.I.A.; AGUIAR, E.S. *et al.* Paracoccidioidomicose: estudo clínico e epidemiológico de 422 casos observados no Estado de Mato Grosso do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, n. 4, p. 455-459. 2003.
- PESCHON, J.J.; TORRANCE, D.S.; STOCKING, K.L. *et al.* TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. **J. Immunol.**, v. 160, p. 943-952. 1998.
- PINA, A.; VALENTE-FERREIRA, R.C.; MOLINARI-MADLUM, E.E.W. *et al.* Absence of interleukin-4 determines less severe pulmonary paracoccidioidomycosis associated with impaired Th2 response. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 2369-2378. 2004.
- PITTA, G.V.E.; COELHO, A.M.; ALVES, V.M.C. *et al.* Fertilidade de solos – calagem e gessagem. In: CRUZ, J.C. (Ed). **Embrapa Milho e Sorgo** – Sistemas de produção, 2. Versão eletrônica. 3. ed. Set/2007. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/fercalagem.htm>. Acesso em 21/04/08.

PONS, L.; GIMENEZ, M.; GUILLERON, C. *et al.* La técnica de la inmunoperoxidase en la detección de anticuerpos específicos en la infección humana por *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medicina (B. Aires)**, v. 36, n. 5, p. 510-512. 1976.

POPI, A.F.; LOPES, J.D.; MARIANO, M. GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. **Cell. Immunol.**, v. 218, p. 87-94. 2002.

PROENÇA, N.G.; CASTRO, R.M.; ALONSO, F.F. Curso benigno de paracoccidioidomicose de possível inoculação cutânea. **AMB Rev. Ass. Med. Bras.**, v. 27, n. 6, p. 170-172. 1981.

REIS, B.S.; BOZZI, A.; PRADO, F.L. *et al.* Membrane and extracellular antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* (Mexo): identification of a 28-kDa protein suitable for immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **J. Immunol. Methods**, v. 307, p. 118-126. 2005.

RESTREPO, F.; RESTREPO, M.; RESTREPO, A. Blood groups and HLA antigens in paracoccidioidomycosis. **Sabouraudia**, v. 21, p. 35-39. 1983.

RESTREPO, A.; SALAZAR, M.E.; CANO, L.E. *et al.* Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, v. 46, p. 346-353. 1984.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Sabouraudia**, v. 23, p. 323-334. 1985.

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

RIBEIRO, O.D. Nova terapêutica para blastomicose. **Publ. Med.**, v. 12, p. 36-54. 1940 *apud* BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin Microb Rev**, v. 6, p. 89-117. 1993.

RICCI, G.; MOTA, F.T.; WAKAMATSU, A. *et al.* Canine paracoccidioidomycosis. **Med. Mycol.**, v. 42, p. 379-383. 2004.

RICCI, G.; SILVA, I.D.; SANO, A. *et al.* Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* by PCR in biopsies from patients with paracoccidioidomycosis: correlation with the histopathological pattern. **Pathologica**, v. 99, n. 2, p. 41-45. 2007.

ROMANO, C.C.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; DUARTE, A.J.S. *et al.* IL-12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the in vitro antigen-specific cellular immunosuppression of paracoccidioidomycosis patients. **Cytokine**, v. 18, p. 149-157. 2002.

R.P.M. Cryptic species. **Evolgen archive**, 18 jan. 2005. Disponível em: <<http://evolgen.blogspot.com/2005/01/cryptic-species.html>>. Acesso em: 21 abr. 2008.

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

SAN-BLAS, G. Biochemical and physiological aspects in the dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Arch. Med. Res.**, v. 24, n. 3, p. 267-268. 1993a.

SAN-BLAS, G. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 31, p. 99-113. 1993b.

SAN-BLAS, G.; TRAVASSOS, L.R.; FRIES, B.C. *et al.* Fungal morphogenesis and virulence. **Med. Mycol.**, v. 38, suppl. 1, p. 79-86. 2000.

SHIKANAI-YASUDA, M.A.; TELLES FILHO, F.Q.; MENDES, R.P. *et al.* Guidelines in paracoccidioidomycosis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39, p. 297-310. 2006.

SHOME, S.K.; BATISTA, A.C. Occurrence of *Paracoccidioides brasiliensis* in the soil of Recife, Brazil. **Rev. Fac. Med. Fed. Ceará**, v. 3, p. 90-94. 1963.

SILVA, M.B.; MARQUES, A.F.; NOSANCHUK, J.D. *et al.* Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. **Microbes Infect.**, v. 8, n. 1, p. 197-205. 2006.

SILVA-VERGARA, M.L.; MARTÍNEZ, R.; CHADU, A. *et al.* Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais, Brazil. **Med. Mycol.**, v. 36, p. 37-42. 1998.

SOUTO, J.T.; ALIBERTI, J.C.; CAMPANELLI, A.P. *et al.* Chemokine production and leukocyte recruitment in the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice is modulated by interferon- γ . **Am. J. Pathol.**, v. 163, p. 583-590. 2003.

SOUZA, A.L.; ROFFÊ, E.; PINHO, V. *et al.* Potential role of chemokine macrophage inflammatory protein-1 α in human and experimental schistosomiasis. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 2515-2523. 2005.

SOUZA-PEREIRA, S.R.; TEIXEIRA, A.L.; SILVA, L.C.S. *et al.* Serum and cerebral spinal fluid levels of chemokines and Th2 cytokines in *Schistosoma mansoni* myeloradiculopathy. **Parasite Immunol.**, v. 28, p. 473-478. 2006.

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

SPSS 15.0 for Windows. Chicago, IL, USA: SPSS Inc., 2006.

STANDIFORD, T.J.; ROLFE, M.W.; KUNKEL, S.L. *et al.* Macrophage inflammatory protein-1 alpha expression in interstitial lung disease. **J. Immunol.**, v. 151, p. 2852-63. 1993.

TEIXEIRA, A.L.; CARDOSO, F.; SOUZA, A.L.S.; TEIXEIRA, M.M. Increased serum concentrations of monokine induced by interferon- γ /CXCL9 and interferon- γ -inducible protein 10/CXCL-10 in Sydenham's chorea patients. **J. Neuroimmunol.**, v. 150, p. 157-162. 2004.

TERÇARIOLI, G.R.; BAGAGLI, E.; REIS, G.M. *et al.* Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. **BMC Microbiol.**, v. 22, n. 7, p. 92-99. 2007.

TRAVASSOS, L.R., PUCCIA, R.; CISALPINO, P. *et al.* Biochemistry and molecular biology of the main diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Arch. Med. Res.**, v. 26, n. 3, p. 297-304. 1995.

US NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. **National Center for Biotechnology Information – NCBI Taxonomy Database.** US National Library of Medicine. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>. Acesso em: 02 fev. 2008.

VERGARA, M.L.; MARTINEZ, R. Role of the armadillo *Dasypus novemcinctus* in the epidemiology of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 144, n. 3, p. 131-3. 1999.

VERLI, F.D.; MARINHO, S.A.; SOUZA, S.C. *et al.* Perfil clínico-epidemiológico dos pacientes portadores de paracoccidioidomicose no Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 38, n. 3, p. 234-237. 2005.

YOU DEN, W.J. Index for rating diagnostic tests. **Cancer**, v. 3, n. 1, p. 32-35. 1950 *apud* KELLY, M.J.; DUNSTAN, F.D.; LLOYD, K. *et al.* Evaluating cutpoints for the MHI-5 and MCS using the GHQ-12: a comparison of five different methods. **BMC Psychiatry**, v. 8, n. 1, p. 10-15. 2008.

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

APÊNDICES

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO DE PESQUISA: “Estudo clínico e imunológico de controle de cura de paracoccidiodomicose crônica”

PESQUISADORES: Ana Cláudia Lyon de Moura
Prof. Enio Roberto Pietra Pedroso

Você está sendo convidado a participar desta pesquisa científica como voluntário. Você pode escolher se quer participar ou não. Para isso, deverá ler este documento todo e perguntar a um dos pesquisadores tudo o que não entendeu antes de aceitar participar da pesquisa.

Esta pesquisa irá estudar a paracoccidiodomicose, que é a micose profunda mais comum no Brasil, que pode se manifestar em diversos órgãos, principalmente pulmões, gânglios, pele, ou vários órgãos ao mesmo tempo, podendo ser muito grave e até fatal. O objetivo da pesquisa é entender melhor essa doença, podendo ajudar, no futuro, em sua prevenção, tratamento e controle.

Todos os pacientes que concordarem em participar da pesquisa terão atendimento médico regular no Ambulatório do Anexo Orestes Diniz do Hospital das Clínicas da UFMG (CTR-DIP). Os pacientes deverão realizar periodicamente exames de sangue, radiografias de tórax, ultrassom abdominal, espirometria (“exame de sopro” que testa a função dos pulmões) e qualquer outro exame que o médico assistente julgue necessário para o acompanhamento do paciente e melhora de seu estado de saúde.

Depois que você estiver clinicamente recuperado (em relação à paracoccidiodomicose), depois de mais ou menos um ano e meio, você poderá receber orientação do médico para parar de usar os medicamentos que combatem a doença. Mesmo assim, deverá continuar comparecendo às consultas nos dias marcados pelo médico que o atender, periodicamente, para avaliação de seu estado de saúde. Caso você tenha algum sintoma antes do dia agendado para seu retorno, você deve comparecer ao Ambulatório Orestes Diniz numa segunda-feira à tarde ou, caso não seja possível esperar, vá ao Pronto-Atendimento do Hospital das Clínicas da UFMG.

O seu nome e todos os seus outros dados pessoais serão mantidos em sigilo (não serão informados a outras pessoas). Sua ficha médica com os seus dados e seus exames será conhecida somente pela equipe médica que atende você. Se você não quiser participar desta pesquisa, você receberá o mesmo tratamento e os mesmos cuidados da equipe do hospital que receberá quem estiver participando da pesquisa.

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

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

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

Belo Horizonte, ____ de _____ de _____ .

Assinatura do paciente

Assinatura do pesquisador responsável

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG

Av. Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II – 2º andar – sl.2005 – CEP31270-901 – BH-MG
Telefone: (31) 3409-4592 – Fax: (31) 3409-4516 – E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Ambulatório do Anexo Orestes Diniz (CTR-DIP) – Hospital das Clínicas – UFMG
Alameda Álvaro Celso, 241 – Santa Efigênia – Belo Horizonte – MG
Telefone: (31)3409-9547 (Prof. Enio) ou (31)9113-7776 (Ana Cláudia)

SAME: [] [] [] [] [] [] [] []

HISTÓRIA PREGRESSA (incluir história epidemiológica: mudanças de localidade, tempo em cada uma, contato com culturas agrícolas, etc):

PACIENTE EM USO ATUAL DE:

TRATAMENTO PRÉVIO DE PCM?

[] SIM; QUAL?

QUANDO?

[] NÃO

Doenças Prévias:	S	N	NS	Cód.
53. Asma				
54. Úlcera péptica				
55. Tuberculose				
56. Esquistossomose				
57. Sífilis				
58. SIDA				
59. Leishmaniose				
60. Neoplasia				
61. Doença do SNC				
62. Internações prévias				
63. Cirurgias prévias				
64. Pneumoconioses				
65. DST				
66. Outras				

Doenças Atuais:	S	N	NS	Cód.
67. Hipertensão arterial				
68. ICC / ICO				
69. DPOC				
70. Asma				
71. Úlcera péptica				
72. Tuberculose				
73. Esquistossomose				
74. Sífilis				
75. SIDA				
76. Leishmaniose				
77. Neoplasia				
78. Doença do SNC				
79. Doenças do Colágeno				
80. Doença de Chagas				
81. Síndrome de Addison				
82. DST				
83. Outras				

HISTÓRIA FAMILIAR:

	S	N	NS	Cód.
84. PCM				
85. Doença cardiovascular				
86. Doenças respiratórias				
87. Diabetes mellitus				
88. Neoplasias				
89. Outra doença infecciosa				
90. Doença de Chagas				
91. Esquistossomose				

HISTÓRIA SÓCIO-ECONÔMICA (descrever):

	S	N	NS	Cód.
92. Tabagismo atual				
93. Tabagismo prévio				
94. Etilismo atual				
95. Etilismo prévio				
96. Drogas ilícitas				
97. Contato com área rural				
98. Água em moradia				
99. Esgoto				
100. Trabalho com asbesto				
101. Trabalho com sílica				
102. Trabalho em minas				

SAME: [] [] [] [] [] [] [] []

APARELHO CARDIOVASCULAR

	S	N		Cód
177. Pulsos MMSS alterados				
178. Pulsos MMII alterados				
179. Pulsos centrais alterados				
180. Ictus cordis alterado				
181. Frêmito				
182. Bulhas alteradas				
183. Estalido protossistólico VD				
184. Estalido protossistólico VE				
Sopro cardíaco: 185. SS IM				
186. SS EA				
187. SD EM				
188. SD IA				

APARELHO DIGESTIVO

	S	N		Cód
200. Fígado palpável				
201. Tamanho: [] [] cm RCD				
202. [] [] cm AX				
203. Baço palpável				
204. Tamanho: Boyd []				
205. Sinais de irritação peritoneal				
206. Presença de massa palpável				

Fígado: borda, sensibilidade, consistência, superfície

Massa palpável: localização, tamanho, sensibilidade, consistência

EXAME NEUROLÓGICO

	S	N		Cód
207. Déficit focal				
208. Distúrbio do comportamento				
209. Distúrbio da consciência				
210. Distúrbio da marcha				
211. Papiledema				

HIPÓTESES DIAGNÓSTICAS:

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____

CONDUTA:

1. Exames solicitados: _____
 2. Prescrição: _____
 3. Orientações: _____
 4. Retorno em : ____ / ____ / ____
- Coleta de sangue para ICB hoje: sim () não()

Assinatura / Carimbo do médico e CRM

DATA												
VDRL												
HBsAg												
Anti-HBs												
HBeAg												
Anti-HBc												
Anti-HCV												
Anti-HAV												
Anti-HIV												
Anti-EBV												
Toxoplasm												
CMV												
Chagas												

DATA				
Urina Rotina				
EPF				
Biópsia:Local / Achado				
Cultura:Fonte / Achado				
Escarro:				
Raio X de tórax				
Fibronasolaringoscopia				
Ultra som abdominal				
TC tórax				
ECG				
Espirometria				

APÊNDICE C – PROTOCOLO PARA RETORNO DE PACIENTES COM PARACOCCIDIOIDOMICOSE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
HOSPITAL DAS CLÍNICAS
SEDT/DIP-HC-UFGM

SAME [] [] [] [] [] [] []

Protocolo [] [] [] [] [] []

PROTOCOLO DE PARACOCCIDIOIDOMICOSE E MICOSES PROFUNDAS**RETORNO****IDENTIFICAÇÃO:**

Data do exame: [] [] [] [] [] []

Data última consulta: [] [] [] [] [] []

1. Nome: _____

2. Idade: [] [] []

EVOLUÇÃO:

Medicação em uso: _____

Efeitos colaterais? Não () Sim (): quais?

EXAME FÍSICO

Peso: [] [] [] [] [] [] Kg

Altura: [] [] [] [] [] [] cm

Alterações relevantes:

PA deitado:.... [] X [] mmHg

PA assentado: [] X [] mmHg

PA em pé: [] X [] mmHg

Freq. Cardíaca: [] [] [] [] bpm

Freq. Pulso: [] [] [] [] ppm

Freq. Respirat: [] [] [] [] irpm

PCM clinicamente: ativa ()

inativa () → desde ___/___ (mês/ano)

Observações:

HIPÓTESES DIAGNÓSTICAS:

1. _____

2. _____

3. _____

4. _____

5. _____

CONDUTA:

1. Exames solicitados: _____

2. Prescrição: _____

3. Retorno em : ___ / ___ / ___

Assinatura / Carimbo do médico e CRM

Coleta de sangue para ICB hoje: sim () não ()

Última coleta: ___/___/___

APÊNDICE D – BANCOS DE DADOS DOS PACIENTES E CONTROLES QUE PARTICIPARAM DO ESTUDO

APÊNDICE E – ESTATÍSTICAS DA ANÁLISE DE
REGRESSÃO LOGÍSTICA REALIZADA COM O BANCO DE
DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES COM
PARACOCCIDIOIDOMICOSE

Logistic Regression

[DataSet1] C:\Users\user\Documents\Doutorado\SPSS\Banco de Dados tese Ana Lyon clin.sav

Case Processing Summary

Unweighted Cases ^b		N	Percent
Selected Cases ^a	Included in Analysis	64	85,3
	Missing Cases	11	14,7
	Total	75	100,0
Unselected Cases		0	,0
Total		75	100,0

a. The category variable renal is constant for all selected cases. Since a constant was requested in the model, it will be removed from the analysis.

b. If weight is in effect, see classification table for the total number of cases.

Dependent Variable Encoding

Original Value	Internal Value
0	0
1	1

Categorical Variables Codings

		Frequency	Parameter coding					
			(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
tratcod	0	10	1,000	,000	,000	,000	,000	,000
	1	13	,000	1,000	,000	,000	,000	,000
	2	22	,000	,000	1,000	,000	,000	,000
	3	8	,000	,000	,000	1,000	,000	,000
	4	1	,000	,000	,000	,000	1,000	,000
	5	3	,000	,000	,000	,000	,000	1,000
	6	7	,000	,000	,000	,000	,000	,000
12. Profissão	1	25	1,000	,000	,000			
	2	7	,000	1,000	,000			
	3	24	,000	,000	1,000			
	4	8	,000	,000	,000			
7. naturalidade CODIGO	1	18	1,000	,000				
	2	42	,000	1,000				
	3	4	,000	,000				
formcod	1	45	1,000	,000				
	2	18	,000	1,000				
	3	1	,000	,000				
pancreas	0	2	1,000					
	1	62	,000					
39. vômitos	0	11	1,000					
	1	53	,000					
38. Azia/pirose	0	12	1,000					
	1	52	,000					
sinfocais	0	2	1,000					
	1	62	,000					
32. convulsão	0	4	1,000					
	1	60	,000					
31. Cefaléia	0	13	1,000					
	1	51	,000					
30. Tonteira (nova)	0	15	1,000					
	1	49	,000					
26. Icterícia	0	7	1,000					
	1	57	,000					
22. Linfadenomegalias	0	32	1,000					
	1	32	,000					
21. Sudorese	0	18	1,000					
	1	46	,000					
20. Astenia/hipodinamia	0	40	1,000					
	1	24	,000					
19. Emagrecimento (Kg)	0	47	1,000					
	1	17	,000					

18. Febre	0	23	1,000				
	1	41	,000				
40. Dor abdominal	0	8	1,000				
	1	56	,000				
41. Distensão abdominal	0	5	1,000				
	1	59	,000				
42. diarreia	0	8	1,000				
	1	56	,000				
esplenica	0	1	1,000				
	1	63	,000				
adrenal	0	2	1,000				
	1	62	,000				
ossea	0	1	1,000				
	1	63	,000				
tgu	0	1	1,000				
	1	63	,000				
gastrint	0	2	1,000				
	1	62	,000				
hepatica	0	1	1,000				
	1	63	,000				
snc	0	3	1,000				
	1	61	,000				
cutanea	0	23	1,000				
	1	41	,000				
mucosa	0	43	1,000				
	1	21	,000				
43. constipação	0	9	1,000				
	1	55	,000				
44. hemorragia digestiva	0	4	1,000				
	1	60	,000				
45. Artralgia ou artrite	0	8	1,000				
	1	56	,000				
46. edema (nova)	0	10	1,000				
	1	54	,000				
47. Dor óssea	0	5	1,000				
	1	59	,000				
pulmonar	0	26	1,000				
	1	38	,000				
linfonodal	0	27	1,000				
	1	37	,000				
sexo	1	55	1,000				
	2	9	,000				

Block 0: Beginning Block

Iteration History^{a,b,c}

Iteration		-2 Log likelihood	Coefficients
			Constant
Step 1		76,101	-,875
0	2	76,049	-,937
	3	76,049	-,938

- a. Constant is included in the model.
 b. Initial -2 Log Likelihood: 76,049
 c. Estimation terminated at iteration number 3 because parameter estimates changed by less than ,001.

Classification Table^{a,b}

Observed		Predicted			
		inat		Percentage Correct	
		0	1		
Step 0	inat	0	46	0	100,0
		1	18	0	,0
Overall Percentage					71,9

- a. Constant is included in the model.
 b. The cut value is ,500

Variables in the Equation

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Step 0 Constant	-,938	,278	11,390	1	,001	,391

Variables not in the Equation^a

Step	Variables	Score	df	Sig.
0	sexo(1)	4,098	1	,043
	ldade	,756	1	,384
	natural	2,439	2	,295
	natural(1)	,432	1	,511
	natural(2)	1,640	1	,200
	profissã	5,377	3	,146
	profissã(1)	5,115	1	,024
	profissã(2)	,745	1	,388
	profissã(3)	2,494	1	,114
	formcod	,680	2	,712
	formcod(1)	,159	1	,690
	formcod(2)	,336	1	,562
	tratcod	34,061	6	,000
	tratcod(1)	30,288	1	,000
	tratcod(2)	1,310	1	,252
	tratcod(3)	6,008	1	,014
	tratcod(4)	,398	1	,528
	tratcod(5)	,398	1	,528
	tratcod(6)	,042	1	,837
	temposint	,586	1	,444
	febre(1)	,724	1	,395
	emagr(1)	,019	1	,890
	astenia(1)	,515	1	,473
	sudorese(1)	,001	1	,969
	linfad(1)	1,237	1	,266
	icteríci(1)	,745	1	,388
	tonteira(1)	,021	1	,886
	cefaléia(1)	,056	1	,812
	convulsã(1)	,021	1	,886
	sinfocais(1)	,808	1	,369
	aziapir(1)	,071	1	,789
	vomitos(1)	5,198	1	,023
	dorabd(1)	3,578	1	,059
	disabdom(1)	2,122	1	,145
	diarréia(1)	1,104	1	,293
	constipa(1)	1,500	1	,221
	hemdig(1)	,021	1	,886
	artralg(1)	1,104	1	,293
	edema(1)	,021	1	,886
	doróssea(1)	2,122	1	,145
	linfonodal(1)	2,132	1	,144
	pulmonar(1)	,913	1	,339
	mucosa(1)	5,350	1	,021
	cutanea(1)	4,040	1	,044
	snc(1)	1,232	1	,267
	hepatica(1)	,398	1	,528
	gastrint(1)	,808	1	,369
	tgu(1)	,398	1	,528
	ossea(1)	,398	1	,528
	adrenal(1)	,808	1	,369
esplenica(1)	,398	1	,528	
pancreas(1)	,808	1	,369	

a. Residual Chi-Squares are not computed because of redundancies.

Block 1: Method = Forward Stepwise (Likelihood Ratio)

Iteration History^{a,b,c,d}

Iteration	-2 Log likelihood	Coefficients								
		Constant	tratcod(1)	tratcod(2)	tratcod(3)	tratcod(4)	tratcod(5)	tratcod(6)	mucosa(1)	
Step 1	44,695	-2,000	4,000	,615	,364	1,500	,000	1,333		
1	40,540	-3,135	6,271	1,461	,971	2,625	,000	2,442		
3	39,518	-4,179	8,358	2,474	1,884	3,668	,000	3,486		
4	39,170	-5,194	10,388	3,489	2,892	4,683	,000	4,501		
5	39,043	-6,200	12,399	4,495	3,897	5,689	,000	5,507		
6	38,997	-7,202	14,403	5,497	4,899	6,691	,000	6,509		
7	38,980	-8,202	16,405	6,498	5,900	7,692	,000	7,509		
8	38,974	-9,203	18,405	7,498	6,900	8,692	,000	8,510		
9	38,972	-10,203	20,406	8,498	7,900	9,692	,000	9,510		
10	38,971	-11,203	22,406	9,498	8,900	10,692	,000	10,510		
11	38,971	-12,203	24,406	10,498	9,900	11,692	,000	11,510		
12	38,971	-13,203	26,406	11,498	10,900	12,692	,000	12,510		
13	38,971	-14,203	28,406	12,498	11,900	13,692	,000	13,510		
14	38,970	-15,203	30,406	13,498	12,900	14,692	,000	14,510		
15	38,970	-16,203	32,406	14,498	13,900	15,692	,000	15,510		
16	38,970	-17,203	34,406	15,498	14,900	16,692	,000	16,510		
17	38,970	-18,203	36,406	16,498	15,900	17,692	,000	17,510		
18	38,970	-19,203	38,406	17,498	16,900	18,692	,000	18,510		
19	38,970	-20,203	40,406	18,498	17,900	19,692	,000	19,510		
20	38,970	-21,203	42,406	19,498	18,900	20,692	,000	20,510		
Step 2	40,049	-2,939	3,953	,712	,556	2,165	,939	1,907	1,096	
2	32,206	-5,294	6,425	1,596	1,257	4,140	2,159	3,694	2,380	
3	29,290	-7,649	9,167	2,575	2,117	6,184	3,471	5,429	3,704	
4	28,077	-9,982	12,342	3,576	3,093	8,367	4,787	7,121	5,023	
5	27,559	-12,414	15,768	4,579	4,094	10,777	6,214	8,850	6,450	
6	27,341	-15,022	19,387	5,581	5,095	13,401	7,820	10,661	8,055	
7	27,251	-17,808	23,180	6,581	6,096	16,196	9,606	12,557	9,841	
8	27,216	-20,711	27,087	7,581	7,096	19,101	11,508	14,510	11,743	
9	27,203	-23,671	31,049	8,582	8,096	22,062	13,468	16,491	13,703	
10	27,198	-26,656	35,034	9,582	9,096	25,047	15,453	18,483	15,688	
11	27,196	-29,650	39,029	10,582	10,096	28,041	17,448	20,481	17,683	
12	27,195	-32,648	43,027	11,582	11,096	31,039	19,445	22,479	19,680	
13	27,195	-35,648	47,026	12,582	12,096	34,038	21,445	24,479	21,680	
14	27,195	-38,647	51,026	13,582	13,096	37,038	23,444	26,479	23,679	
15	27,195	-41,647	55,025	14,582	14,096	40,038	25,444	28,479	25,679	
16	27,195	-44,647	59,025	15,582	15,096	43,038	27,444	30,479	27,679	
17	27,195	-47,647	63,025	16,582	16,096	46,038	29,444	32,479	29,679	
18	27,195	-50,647	67,025	17,582	17,096	49,038	31,444	34,479	31,679	
19	27,195	-53,647	71,025	18,582	18,096	52,038	33,444	36,479	33,679	
20	27,195	-56,647	75,025	19,582	19,096	55,038	35,444	38,479	35,679	

a. Method: Forward Stepwise (Likelihood Ratio)

b. Constant is included in the model.

c. Initial -2 Log Likelihood: 76,049

d. Estimation terminated at iteration number 20 because maximum iterations has been reached. Final solution cannot be found.

Omnibus Tests of Model Coefficients

		Chi-square	df	Sig.
Step 1	Step	37,078	6	,000
	Block	37,078	6	,000
	Model	37,078	6	,000
Step 2	Step	11,775	1	,001
	Block	48,854	7	,000
	Model	48,854	7	,000

Model Summary

Step	-2 Log likelihood	Cox & Snell R Square	Nagelkerke R Square
1	38,970 ^a	,440	,632
2	27,195 ^a	,534	,768

a. Estimation terminated at iteration number 20 because maximum iterations has been reached. Final solution cannot be found.

Hosmer and Lemeshow Test

Step	Chi-square	df	Sig.
1	,000	4	1,000
2	,000	7	1,000

Contingency Table for Hosmer and Lemeshow Test

		inat = 0		inat = 1		Total
		Observed	Expected	Observed	Expected	
Step 1	1	8	8,000	0	,000	8
	2	20	20,000	2	2,000	22
	3	11	11,000	2	2,000	13
	4	2	2,000	1	1,000	3
	5	5	5,000	3	3,000	8
	6	0	,000	10	10,000	10
Step 2	1	8	8,000	0	,000	8
	2	4	4,000	0	,000	4
	3	6	6,000	0	,000	6
	4	2	2,000	0	,000	2
	5	13	13,000	2	2,000	15
	6	5	5,000	1	1,000	6
	7	8	8,000	2	2,000	10
	8	0	,000	4	4,000	4
	9	0	,000	9	9,000	9

Classification Table^a

Observed			Predicted		Percentage Correct
			inat		
			0	1	
Step 1	inat	0	46	0	100,0
		1	8	10	55,6
	Overall Percentage				87,5
Step 2	inat	0	46	0	100,0
		1	5	13	72,2
	Overall Percentage				92,2

a. The cut value is ,500

Variables in the Equation

		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95,0% C.I. for EXP(B)	
								Lower	Upper
Step 1 ^a	tratcod			3,454	6	,750			
	tratcod(1)	42,406	19807,310	,000	1	,998	3E+018	,000	.
	tratcod(2)	19,498	15191,513	,000	1	,999	3E+008	,000	.
	tratcod(3)	18,900	15191,513	,000	1	,999	2E+008	,000	.
	tratcod(4)	20,692	15191,513	,000	1	,999	1E+009	,000	.
	tratcod(5)	,000	42968,092	,000	1	1,000	1,000	,000	.
	tratcod(6)	20,510	15191,513	,000	1	,999	8E+008	,000	.
	Constant	-21,203	15191,513	,000	1	,999	,000		
Step 2 ^b	tratcod			,196	6	1,000			
	tratcod(1)	75,025	19693,090	,000	1	,997	4E+032	,000	.
	tratcod(2)	19,582	14589,733	,000	1	,999	3E+008	,000	.
	tratcod(3)	19,096	14589,733	,000	1	,999	2E+008	,000	.
	tratcod(4)	55,038	17087,067	,000	1	,997	8E+023	,000	.
	tratcod(5)	35,444	43674,280	,000	1	,999	2E+015	,000	.
	tratcod(6)	38,479	15909,900	,000	1	,998	5E+016	,000	.
	mucosa(1)	35,679	8894,244	,000	1	,997	3E+015	,000	.
Constant	-56,647	17087,067	,000	1	,997	,000			

a. Variable(s) entered on step 1: tratcod.

b. Variable(s) entered on step 2: mucosa.

Correlation Matrix

		Constant	tratcod(1)	tratcod(2)	tratcod(3)	tratcod(4)	tratcod(5)	tratcod(6)	mucosa(1)
Step 1	Constant	1,000	-,767	-1,000	-1,000	-1,000	-,354	-1,000	
	tratcod(1)	-,767	1,000	,767	,767	,767	,271	,767	
	tratcod(2)	-1,000	,767	1,000	1,000	1,000	,354	1,000	
	tratcod(3)	-1,000	,767	1,000	1,000	1,000	,354	1,000	
	tratcod(4)	-1,000	,767	1,000	1,000	1,000	,354	1,000	
	tratcod(5)	-,354	,271	,354	,354	,354	1,000	,354	
	tratcod(6)	-1,000	,767	1,000	1,000	1,000	,354	1,000	
Step 2	Constant	1,000	-,868	-,854	-,854	-1,000	-,391	-,931	-,521
	tratcod(1)	-,868	1,000	,741	,741	,868	,339	,808	,452
	tratcod(2)	-,854	,741	1,000	1,000	,854	,334	,917	,000
	tratcod(3)	-,854	,741	1,000	1,000	,854	,334	,917	,000
	tratcod(4)	-1,000	,868	,854	,854	1,000	,391	,931	,521
	tratcod(5)	-,391	,339	,334	,334	,391	1,000	,364	,204
	tratcod(6)	-,931	,808	,917	,917	,931	,364	1,000	,285
	mucosa(1)	-,521	,452	,000	,000	,521	,204	,285	1,000

Model if Term Removed

Variable	Model Log Likelihood	Change in -2 Log Likelihood	df	Sig. of the Change
Step 1 tratcod	-38,024	37,078	6	,000
Step 2 tratcod	-34,987	42,779	6	,000
mucosa	-19,485	11,775	1	,001

Casewise List^b

Case	Selected Status ^a	Observed	Predicted	Predicted Group	Temporary Variable	
		inat			Resid	ZResid
10	S	1**	,133	0	,867	2,550
14	S	1**	,000	0	1,000	35737,403
26	S	1**	,167	0	,833	2,236
56	S	1**	,167	0	,833	2,236
59	S	1**	,133	0	,867	2,550
66	S	0**	1,000	1	-1,000	-3E+007

a. S = Selected, U = Unselected cases, and ** = Misclassified cases.

b. Cases with studentized residuals greater than 2,000 are listed.

Variables not in the Equation

Step	Variables	Score	df	Sig.
1	sexo(1)	2,749	1	,097
	ldade	1,196	1	,274
	natural	2,279	2	,320
	natural(1)	,609	1	,435
	natural(2)	2,025	1	,155
	profissã	7,447	3	,059
	profissã(1)	7,231	1	,007
	profissã(2)	1,570	1	,210
	profissã(3)	1,913	1	,167
	formcod	,184	2	,912
	formcod(1)	,047	1	,829
	formcod(2)	,097	1	,756
	temposint	1,661	1	,198
	febre(1)	1,880	1	,170
	emagr(1)	,464	1	,496
	astenia(1)	,294	1	,588
	sudorese(1)	,468	1	,494
	linfad(1)	,603	1	,437
	icterici(1)	1,488	1	,223
	tonteira(1)	3,341	1	,068
	cefaléia(1)	,832	1	,362
	convulsã(1)	,105	1	,746
	sinfocais(1)	,000	1	1,000
	aziapir(1)	,230	1	,632
	vomitos(1)	3,469	1	,063
	dorabd(1)	2,577	1	,108
	disabdom(1)	,417	1	,519
	diarréia(1)	2,477	1	,115
	constipa(1)	,139	1	,709
	hemdig(1)	,093	1	,760
	artralg(1)	,003	1	,956
	edema(1)	1,305	1	,253
	doróssea(1)	1,069	1	,301
	linfonodal(1)	1,782	1	,182
	pulmonar(1)	1,191	1	,275
	mucosa(1)	7,608	1	,006
	cutanea(1)	2,843	1	,092
	snc(1)	,000	1	1,000
	hepatica(1)	,000	1	1,000
	gastrint(1)	,000	1	1,000
tgu(1)	,197	1	,657	
ossea(1)	,105	1	,746	
adrenal(1)	,197	1	,657	
esplenica(1)	,000	1	1,000	
pancreas(1)	,000	1	1,000	

Step	Variables			
2	sexo(1)	,864	1	,353
	ldade	3,099	1	,078
	natural	,873	2	,646
	natural(1)	,573	1	,449
	natural(2)	,813	1	,367
	profissã	6,204	3	,102
	profissã(1)	6,198	1	,013
	profissã(2)	,518	1	,472
	profissã(3)	3,015	1	,083
	formcod	,127	2	,938
	formcod(1)	,127	1	,721
	formcod(2)	,127	1	,721
	temposint	2,471	1	,116
	febre(1)	,208	1	,648
	emagr(1)	,398	1	,528
	astenia(1)	,005	1	,945
	sudorese(1)	1,140	1	,286
	linfad(1)	,478	1	,489
	icteríci(1)	,000	1	1,000
	tonteira(1)	,872	1	,350
	cefaléia(1)	,415	1	,519
	convulsã(1)	,000	1	1,000
	sinfocais(1)	,000	1	1,000
	aziapir(1)	,002	1	,964
	vomitos(1)	,518	1	,472
	dorabd(1)	,165	1	,685
	disabdom(1)	,441	1	,507
	diarréia(1)	,165	1	,685
	constipa(1)	1,214	1	,271
	hemdig(1)	,165	1	,685
	artralgí(1)	,854	1	,355
	edema(1)	,633	1	,426
	doróssea(1)	,633	1	,426
	linfonodal(1)	,103	1	,748
	pulmonar(1)	,283	1	,595
	cutanea(1)	,461	1	,497
	snc(1)	,000	1	1,000
	hepatica(1)	,000	1	1,000
	gastrint(1)	,000	1	1,000
	tgu(1)	,278	1	,598
ossea(1)	,000	1	1,000	
adrenal(1)	,000	1	1,000	
esplenica(1)	,000	1	1,000	
pancreas(1)	,000	1	1,000	

a. Residual Chi-Squares are not computed because of redundancies.

APÊNDICE F – ESTATÍSTICAS DAS CURVAS ROC
ELABORADAS E DOS ESTUDOS DE CORRELAÇÃO ENTRE
OS MARCADORES ESTUDADOS

ROC Curve

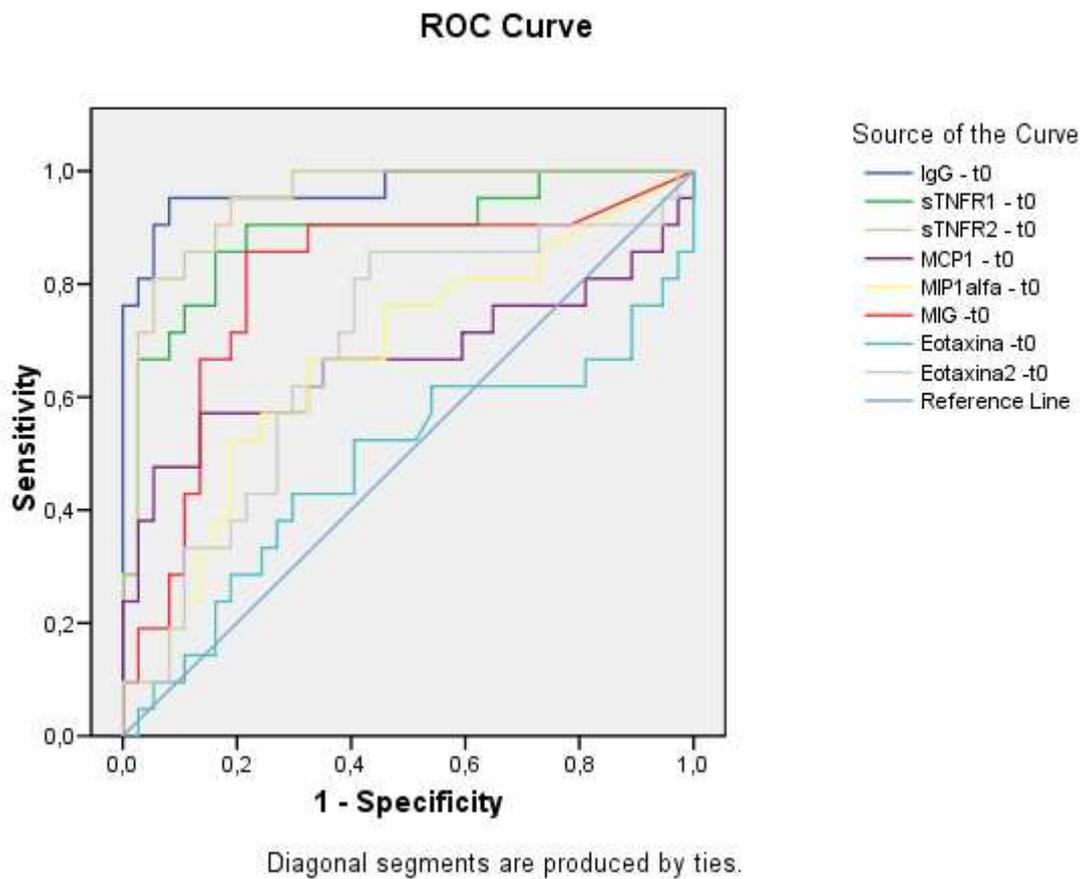
[DataSet1] C:\Users\user\Documents\Doutorado\SPSS\PCM serum dosages.sav

Case Processing Summary

	Valid N (listwise)
Control ^b	
Positive ^a	21
Negative	37
Missing	16

Larger values of the test result variable(s) indicate stronger evidence for a positive actual state.

- The positive actual state is 1.
- The test result variable(s): IgG - t0, MIG -t0 has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group.



Area Under the Curve

Test Result Variable(s)	Area	Std. Error(a)	Asymptotic Sig.(b)	Asymptotic 95% Confidence Interval	
	Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound
IgG - t0	,968	,024	,000	,922	1,014
sTNFR1 - t0	,891	,048	,000	,796	,985
sTNFR2 - t0	,947	,027	,000	,893	1,001
MCP1 - t0	,667	,086	,036	,497	,836
MIP1alfa - t0	,668	,076	,035	,519	,817
MIG -t0	,802	,065	,000	,673	,930
Eotaxina -t0	,481	,086	,808	,312	,650
Eotaxina2 -t0	,685	,075	,020	,539	,831

The test result variable(s): MIP1alfa - t0, MIG -t0, Eotaxina -t0 has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group. Statistics may be biased.

a Under the nonparametric assumption

b Null hypothesis: true area = 0.5

Coordinates of the Curve

Test Result Variable(s)	Positive if Greater Than or Equal To(a)	Sensitivity	1 - Specificity	Test Result Variable(s)	Positive if Greater Than or Equal To(a)	Sensitivity	1 - Specificity
sTNFR1 - t0	84,85600	1,000	1,000	sTNFR2 - t0	673,76000	1,000	1,000
	108,41550	1,000	,973		770,20950	1,000	,973
	131,40600	1,000	,946		929,50350	1,000	,946
	134,94400	1,000	,919		1090,75050	1,000	,919
	154,98850	1,000	,892		1194,69450	1,000	,892
	175,45950	1,000	,865		1226,74300	1,000	,865
	196,86050	1,000	,838		1255,57600	1,000	,838
	218,80750	1,000	,811		1270,09300	1,000	,811
	226,13550	1,000	,784		1284,38350	1,000	,784
	252,14300	1,000	,757		1289,60800	1,000	,757
	283,55500	1,000	,730		1301,70550	1,000	,730
	305,95950	,962	,730		1318,24200	1,000	,703
	322,13450	,962	,703		1327,28950	1,000	,676
	332,12950	,962	,676		1330,32750	1,000	,649
	351,99700	,962	,649		1336,56700	1,000	,622
	371,39450	,962	,622		1348,36200	1,000	,595
	380,03600	,923	,622		1362,53600	1,000	,568
	384,13700	,923	,595		1375,99100	1,000	,541
	392,84350	,923	,568		1391,98250	1,000	,514
	402,96000	,923	,541		1405,85400	1,000	,486
409,63650	,923	,514	1413,25100	1,000	,459		
412,85200	,923	,486	1434,69400	1,000	,432		

Test Result Variable(s)	Positive if Greater Than or Equal To(a)	Sensitivity	1 - Specificity	Test Result Variable(s)	Positive if Greater Than or Equal To(a)	Sensitivity	1 - Specificity
sTNFR1 - t0	414,68250	,923	,459	sTNFR2 - t0	1463,19800	1,000	,405
	424,52200	,923	,432		1477,49300	1,000	,378
	436,33700	,923	,405		1498,43650	1,000	,351
	445,30450	,923	,378		1517,55700	1,000	,324
	456,50500	,923	,351		1532,31000	1,000	,297
	462,37000	,885	,351		1547,23200	,962	,297
	469,36250	,885	,324		1568,39250	,962	,270
	477,35150	,885	,297		1597,09600	,962	,243
	479,51200	,885	,270		1617,66100	,962	,216
	495,65850	,885	,243		1637,84050	,962	,189
	518,77750	,885	,216		1656,14350	,923	,189
	529,03300	,846	,216		1680,73600	,923	,162
	534,65950	,846	,189		1697,74200	,885	,162
	544,48650	,846	,162		1710,28050	,885	,135
	553,94550	,808	,162		1731,67800	,885	,108
	563,45550	,769	,162		1763,35800	,846	,108
	573,52050	,769	,135		1786,26650	,808	,108
	580,81150	,769	,108		1792,93000	,769	,108
	584,96750	,731	,108		1801,77600	,731	,108
	598,20850	,731	,081		1817,11400	,731	,081
	611,83600	,692	,081		1839,51250	,731	,054
	616,59950	,654	,081		1859,85200	,692	,054
	626,61500	,654	,054		1884,55700	,654	,054
	637,51400	,654	,027		1926,35300	,654	,027
	676,87100	,615	,027		1953,72300	,615	,027
	721,11900	,577	,027		1961,83950	,577	,027
	738,85100	,538	,027		1977,60650	,538	,027
	752,07550	,500	,027		1996,80850	,500	,027
	778,33100	,462	,027		2011,95200	,462	,027
	807,51400	,423	,027		2026,55000	,423	,027
	831,69750	,385	,027		2044,90350	,385	,027
	850,19700	,346	,027		2076,26450	,346	,027
856,36400	,308	,027	2116,44400	,308	,027		
909,36150	,269	,027	2134,21150	,269	,027		
986,89450	,269	,000	2174,81250	,269	,000		
1016,97350	,231	,000	2218,74050	,231	,000		
1032,18150	,192	,000	2248,90800	,192	,000		
1070,36100	,154	,000	2393,16750	,154	,000		
1119,98300	,115	,000	2587,85700	,115	,000		
1314,83000	,077	,000	2691,66600	,077	,000		
1630,03200	,038	,000	2952,96550	,038	,000		
1775,99700	,000	,000	3188,50000	,000	,000		
MIG -t0	-1,00000	1,000	1,000	IgG -t0	-1,000000	1,000	1,000
	3,63450	,846	,784		,003000	1,000	,917
	12,18250	,846	,757		,009500	1,000	,896
	29,51650	,846	,730		,015500	1,000	,875

Test Result Variable(s)	Positive if Greater Than or Equal To(a)	Sensitivity	1 - Specificity	Test Result Variable(s)	Positive if Greater Than or Equal To(a)	Sensitivity	1 - Specificity
MIG -t0	61,13950	,846	,703	IgG -t0	,021000	1,000	,854
	85,42650	,846	,676		,024500	1,000	,833
	92,48600	,846	,649		,026500	1,000	,813
	113,96200	,846	,622		,031500	1,000	,792
	135,15850	,846	,595		,036500	1,000	,771
	142,50800	,846	,568		,038500	1,000	,708
	150,42350	,846	,514		,039250	1,000	,688
	161,73300	,846	,486		,041000	1,000	,667
	177,56200	,846	,459		,043000	1,000	,646
	184,34900	,808	,459		,045250	1,000	,625
	194,53800	,808	,432		,048000	1,000	,604
	205,42450	,808	,405		,051250	1,000	,583
	210,51750	,808	,378		,053750	1,000	,563
	220,00000	,808	,351		,060500	1,000	,542
	229,05450	,808	,324		,070250	1,000	,521
	249,52050	,769	,324		,073750	1,000	,500
	278,39700	,769	,297		,075500	1,000	,458
	292,68750	,769	,270		,077500	,952	,458
	300,05000	,769	,243		,079000	,952	,438
	311,72750	,769	,216		,082500	,952	,417
	328,16100	,731	,216		,086000	,952	,396
	371,24550	,692	,216		,087250	,952	,375
	428,52750	,654	,216		,088250	,952	,354
	496,18600	,615	,216		,091500	,952	,333
	570,03600	,615	,189		,095000	,952	,292
	663,22000	,577	,189		,096500	,952	,271
	755,43950	,577	,162		,097750	,952	,250
	807,29700	,577	,135		,098750	,952	,229
	866,04200	,538	,135		,099750	,952	,208
	908,46150	,500	,135		,101000	,952	,188
	917,76250	,462	,135		,102250	,952	,167
	964,39950	,423	,135		,105500	,952	,146
	1013,92950	,385	,135		,129250	,952	,104
	1115,14650	,385	,108		,159000	,952	,083
	1405,11900	,346	,108		,199750	,952	,063
	1643,68950	,308	,108		,237000	,905	,063
	1696,45750	,269	,108		,243500	,905	,042
	1802,37600	,269	,081		,246000	,857	,042
	1988,45700	,231	,081		,259500	,810	,042
	2130,28900	,192	,081		,285500	,810	,021
	2277,85200	,192	,054		,319500	,762	,021
	2464,24600	,192	,027		,378250	,762	,000
	2580,19050	,154	,027		,469500	,714	,000
	2748,41750	,115	,027		,532250	,667	,000
	3178,16400	,077	,027		,557000	,619	,000
	3679,65700	,077	,000		,576500	,571	,000
	4079,14550	,038	,000		,586000	,524	,000

Test Result Variable(s)	Positive if Greater Than or Equal To(a)	Sensitivity	1 - Specificity	Test Result Variable(s)	Positive if Greater Than or Equal To(a)	Sensitivity	1 - Specificity
MIG -t0	4264,34400	,000	,000	IgG -t0	,689750	,476	,000
					,932250	,429	,000
					1,099750	,381	,000
					1,154500	,333	,000
					1,189250	,286	,000
					1,196000	,238	,000
					1,230000	,190	,000
					1,266500	,143	,000
					1,362250	,095	,000
					1,477750	,048	,000
					2,503000	,000	,000
MCP1 - t0	-1,00000	1,000	1,000	MIP1alfa - t0	-1,00000	1,000	1,000
	4,48500	,962	1,000		,92450	,769	,730
	12,73450	,962	,973		2,01450	,731	,730
	45,51250	,923	,973		2,21750	,731	,703
	75,64000	,923	,946		2,42550	,731	,676
	77,82550	,885	,946		3,01250	,731	,649
	110,11250	,885	,919		4,46700	,731	,622
	147,77500	,885	,892		6,13200	,731	,595
	169,57800	,846	,892		10,19600	,692	,541
	190,59250	,808	,892		14,03950	,692	,514
	197,32800	,769	,892		14,55800	,692	,486
	217,81550	,769	,865		15,37100	,692	,459
	239,36300	,769	,838		16,62050	,654	,459
	264,21300	,769	,811		17,23050	,615	,459
	305,17450	,731	,811		18,89700	,615	,432
	326,65800	,731	,784		21,54000	,615	,405
	346,91000	,731	,757		23,20650	,615	,378
	371,71750	,731	,730		29,51300	,615	,351
	384,44700	,731	,703		35,76600	,615	,324
	391,50250	,731	,676		36,75800	,577	,324
	402,74800	,731	,649		37,59200	,538	,324
	413,30950	,692	,649		38,02450	,538	,297
	420,00950	,692	,622		38,44150	,538	,270
	428,82950	,692	,595		40,30300	,538	,243
	432,92150	,654	,595		45,72650	,500	,243
	435,67850	,654	,568		51,98550	,500	,216
	443,77400	,654	,541		55,73250	,500	,189
	450,19150	,615	,514		66,35850	,462	,189
	452,70650	,615	,486		77,23000	,423	,189
	457,02450	,615	,459		79,47450	,385	,189
	460,44650	,615	,432		89,00450	,385	,162
	493,53150	,615	,405		100,58850	,346	,162
	533,81650	,615	,378		120,01650	,346	,135
	546,62900	,615	,351		158,36800	,308	,135
	572,77350	,577	,351		186,02850	,269	,135

Test Result Variable(s)	Positive if Greater Than or Equal To(a)	Sensitivity	1 - Specificity	Test Result Variable(s)	Positive if Greater Than or Equal To(a)	Sensitivity	1 - Specificity
MCP1 - t0	608,30250	,577	,324	MIP1alfa - t0	197,12000	,269	,108
	622,89400	,538	,324		210,80550	,231	,108
	627,89250	,538	,297		236,12500	,231	,081
	634,37900	,538	,270		351,84850	,192	,081
	639,57400	,538	,243		670,04550	,154	,081
	648,22400	,538	,216		1288,05400	,115	,081
	664,46800	,500	,216		2202,94000	,115	,054
	679,14350	,500	,189		3059,50550	,115	,027
	697,32250	,500	,162		4651,72700	,115	,000
	711,84850	,500	,135		9737,03850	,077	,000
	743,62500	,462	,135		14022,35650	,038	,000
	812,99900	,423	,135		14474,96000	,000	,000
	879,47850	,423	,108				
	992,98750	,423	,081				
	1101,02700	,423	,054				
	1239,53950	,385	,054				
	1432,25100	,346	,054				
	1700,65300	,346	,027				
	1976,02900	,308	,027				
	2125,90550	,269	,027				
	2305,42300	,231	,027				
	2420,05450	,231	,000				
	2848,16700	,192	,000				
	3685,43200	,154	,000				
	4928,53350	,115	,000				
	8549,73500	,077	,000				
	12651,38550	,038	,000				
13965,98300	,000	,000					
Eotaxina - t0	32,26600	1,000	1,000	Eotaxina2 - t0	1125,80300	1,000	1,000
	50,55100	,962	1,000		1174,62600	1,000	,973
	72,75250	,923	1,000		1228,18550	,962	,973
	79,52450	,885	1,000		1263,93000	,962	,946
	89,36500	,846	1,000		1377,99900	,923	,946
	105,03300	,808	1,000		1501,63850	,923	,919
	117,25000	,808	,973		1545,84700	,923	,892
	123,41500	,769	,973		1575,36700	,923	,865
	135,36000	,769	,946		1640,24850	,923	,838
	147,34400	,731	,946		1738,30600	,923	,811
	154,22400	,731	,919		1814,17250	,923	,784
	163,70700	,731	,892		1832,72000	,923	,757
	170,15450	,692	,892		1929,85300	,885	,757
	173,51550	,654	,892		2059,49500	,885	,730
	176,65550	,654	,865		2103,39850	,846	,730
	179,83900	,654	,838		2155,18850	,846	,703
	181,80650	,654	,811		2212,97300	,846	,676
182,97400	,615	,811	2275,20650	,846	,649		
184,39300	,615	,784	2391,45500	,846	,622		
187,55900	,615	,757	2482,80750	,846	,595		

Test Result Variable(s)	Positive if Greater Than or Equal To(a)	Sensitivity	1 - Specificity	Test Result Variable(s)	Positive if Greater Than or Equal To(a)	Sensitivity	1 - Specificity
Eotaxina - t0	191,30600	,615	,730	Eotaxina2 - t0	2554,54900	,846	,568
	195,09050	,615	,703		2674,68250	,846	,514
	199,45900	,615	,649		2762,86100	,846	,486
	201,92000	,615	,622		2821,33600	,846	,459
	202,71200	,615	,595		2885,00850	,846	,432
	203,98950	,615	,568		2914,55150	,808	,432
	206,36650	,615	,541		2922,02800	,808	,405
	208,04250	,577	,541		2934,22100	,769	,405
	208,43850	,538	,514		3011,10200	,731	,405
	209,53550	,538	,486		3144,72800	,731	,378
	212,67750	,538	,459		3269,63650	,692	,378
	215,27300	,538	,432		3393,11800	,692	,351
	220,44400	,538	,405		3464,94250	,654	,351
	227,09350	,462	,405		3520,81250	,654	,324
	232,46000	,462	,378		3574,92400	,615	,324
	239,60500	,462	,351		3610,06250	,615	,297
	243,77200	,462	,324		3645,54150	,577	,297
	248,40650	,462	,297		3652,54700	,577	,270
	253,76700	,423	,297		3710,49350	,538	,270
	256,03400	,423	,270		3819,21550	,500	,270
	258,02050	,385	,270		4091,83300	,462	,270
	269,36600	,385	,243		4322,04250	,423	,270
	282,31650	,346	,243		4359,93700	,423	,243
	288,58200	,346	,216		4417,16100	,423	,216
	292,28400	,346	,189		4507,88600	,385	,216
	294,87150	,308	,189		4588,79100	,385	,189
	305,73600	,308	,162		4611,38700	,346	,189
	320,58750	,269	,162		4681,61050	,346	,162
	334,67350	,231	,162		4846,20750	,346	,135
	343,34050	,231	,135		4972,53800	,346	,108
	345,14300	,192	,135		5003,48500	,308	,108
	346,11650	,192	,108		5102,15900	,269	,108
	349,01200	,154	,108		5253,03550	,231	,108
	353,21600	,154	,081		5381,88300	,192	,108
	355,19500	,115	,081		5647,61850	,192	,081
	361,38000	,115	,054		5843,07250	,154	,081
	371,52450	,077	,054		6043,78050	,115	,081
	408,38300	,038	,054		6375,68500	,115	,054
	447,61050	,038	,027		6703,46350	,115	,027
	460,45900	,000	,027		7980,46850	,115	,000
	467,48400	,000	,000		11937,62050	,077	,000

The test result variable(s): MIG -t0, MCP1 - t0, MIP1alfa - t0, Eotaxina -t0 has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group.

a The smallest cutoff value is the minimum observed test value minus 1, and the largest cutoff value is the maximum observed test value plus 1. All the other cutoff values are the averages of two consecutive ordered observed test values.

Nonparametric Correlations

[DataSet1] C:\Users\user\Documents\Doutorado\SPSS\PCM serum dosages.sav

Correlations

			IgG - t0	sTNFR1 - t0	sTNFR2 - t0	MCP1 - t0	MIP1alfa - t0	MIG -t0	Eotaxina -t0	Eotaxina2 -t0
Spearman's rho	IgG - t0	Correlation Coefficient	1,000	,548**	,531**	,177	,243	,415**	-,086	,279*
		Sig. (2-tailed)	.	,000	,000	,183	,066	,001	,519	,034
		N	58	58	58	58	58	58	58	58
	sTNFR1 - t0	Correlation Coefficient	,548**	1,000	,738**	,335**	,269*	,432**	,085	,046
		Sig. (2-tailed)	,000	.	,000	,007	,033	,000	,509	,720
		N	58	63	63	63	63	63	63	63
	sTNFR2 - t0	Correlation Coefficient	,531**	,738**	1,000	,368**	,131	,454**	,038	,153
		Sig. (2-tailed)	,000	,000	.	,003	,307	,000	,767	,233
		N	58	63	63	63	63	63	63	63
	MCP1 - t0	Correlation Coefficient	,177	,335**	,368**	1,000	,287*	,298*	,607**	,285*
		Sig. (2-tailed)	,183	,007	,003	.	,023	,018	,000	,024
		N	58	63	63	63	63	63	63	63
	MIP1alfa - t0	Correlation Coefficient	,243	,269*	,131	,287*	1,000	,166	,281*	,107
		Sig. (2-tailed)	,066	,033	,307	,023	.	,194	,026	,402
		N	58	63	63	63	63	63	63	63
	MIG -t0	Correlation Coefficient	,415**	,432**	,454**	,298*	,166	1,000	,197	,195
		Sig. (2-tailed)	,001	,000	,000	,018	,194	.	,121	,126
		N	58	63	63	63	63	63	63	63
	Eotaxina -t0	Correlation Coefficient	-,086	,085	,038	,607**	,281*	,197	1,000	,330**
		Sig. (2-tailed)	,519	,509	,767	,000	,026	,121	.	,008
		N	58	63	63	63	63	63	63	63
	Eotaxina2 -t0	Correlation Coefficient	,279*	,046	,153	,285*	,107	,195	,330**	1,000
		Sig. (2-tailed)	,034	,720	,233	,024	,402	,126	,008	.
		N	58	63	63	63	63	63	63	63

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

* . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

ANEXO – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO DO ESTUDO
PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE MINAS GERAIS