

**Vinicius Sousa Pietra Pedroso**

**ESTUDO CLÍNICO E EXPERIMENTAL DA  
NEUROPARACOCCIDIOIDOMICOSE**

Belo Horizonte

Universidade Federal de Minas Gerais

2009

**Vinicius Sousa Pietra Pedroso**

**ESTUDO CLÍNICO E EXPERIMENTAL DA  
NEUROPARACOCCIDIOIDOMICOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

**Orientador:** Prof. Dr. Antônio Lúcio  
Teixeira

Belo Horizonte

Universidade Federal de Minas Gerais

2009

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

REITOR

Prof. Ronaldo Tadêu Pena

VICE-REITORA

Prof<sup>a</sup>. Heloisa Maria Murgel Starling

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof<sup>a</sup>. Elisabeth Ribeiro da Silva

PRÓ-REITOR DE PESQUISA

Prof. Carlos Alberto Pereira Tavares

### **FACULDADE DE MEDICINA**

DIRETOR

Prof. Francisco José Penna

VICE-DIRETOR

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Carlos Faria Santos Amaral

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

Prof. José Carlos Bruno da Silveira

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

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

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

Prof. Antônio Lúcio Teixeira Júnior

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

Prof. Antônio Lúcio Teixeira Júnior

Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Prof. Carlos Maurício Figueiredo Antunes

Prof. José Roberto Lambertucci

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

Jader Bernardo Camponizzi (representante discente)

Aos meus pais, Mariângela e Enio.

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Mariângela e ao meu pai, Enio, por sempre me apoiarem e me incentivarem. Um agradecimento especial ao meu pai por disponibilizar os dados de seus pacientes acompanhados no ambulatório.

À Silvinha e aos meus familiares, por sempre acreditarem em mim.

Ao professor Antônio Lúcio Teixeira, pela oportunidade de crescimento, pela dedicação e por ser um exemplo para mim.

Ao professor Manoel Otávio da Costa Rocha, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, pelas preciosas lições na disciplina de Prática Docente e pela oportunidade de encarar minhas limitações e tirar daí estímulo para a superação.

À Marcinha, pela imensa e fundamental ajuda, sem a qual eu nunca teria conseguido realizar este trabalho.

Aos amigos do grupo de Neuroinflamação, David, Norinne, Aline, Débora e Vanessa pela acolhida, pela disposição em ajudar e pela ótima companhia em viagens.

Ao professor Antônio Luiz Pinho Ribeiro, não somente pelos ensinamentos durante a Pós-Graduação, mas durante minha Iniciação Científica também.

Ao professor Mauro Teixeira, chefe do laboratório de Imunofarmacologia, pela possibilidade de desenvolvimento deste trabalho.

Às professoras Daniele de Souza e Patrícia Cisalpino, por disponibilizarem as amostras de *Paracoccidioides brasiliensis*.

Ao professor Helton José dos Reis, por permitir a utilização de seu laboratório para a realização dos experimentos com SHIRPA.

À professora Vanessa Pinho da Silva, por permitir a utilização do Laboratório de Biologia do Sistema Linfóide para a realização dos experimentos de microscopia intravital.

À professora Elizabeth Ribeiro da Silva, por permitir a utilização do Laboratório de Neurobiologia para a preparação das lâminas histológicas.

À professora Rosa Arantes, pela colaboração na análise histopatológica.

Ao Carlos Henrique, técnico do laboratório de Neurobiologia, pela ajuda na preparação das lâminas.

À Patrícia Campi, pela ajuda na preparação dos inóculos para infecção dos animais.

A todos do Laboratório de Imunofarmacologia, pelo convívio e pela ajuda.

Às funcionárias da biblioteca Baeta Viana, pela ajuda na complicada localização dos trabalhos de Neuroparacoccidiodomicose.

A todos do CTR-DIP, em especial Stanley e Juliana, pela disponibilidade e auxílio.

À Ana Cláudia Lyon, pela gentileza de ceder o banco de dados de sua tese.

A todos os meus amigos, que, de longe ou de perto, sempre me apoiaram.

À Mel, pelas tardes com camundongos.

À Paulinha, por dar sentido a tudo.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

“Daí a estranha característica do olhar médico; ele é tomado em uma espiral indefinida: dirige-se ao que há de visível na doença, mas a partir do doente, que oculta este visível, mostrando-o; conseqüentemente, para conhecer, ele deve reconhecer. E esse olhar, progredindo, recua, visto que só atinge a verdade da doença deixando-a vencê-lo, esquivando-se e permitindo ao próprio mal realizar, em seus fenômenos, sua natureza.”

Michel Foucault, 1963

## RESUMO

A Paracoccidioidomicose (PCM) é a micose sistêmica mais importante da América Latina, com grande relevância no Brasil, principalmente nos estados de São Paulo e Minas Gerais. Gera custos sociais e econômicos derivados não apenas da doença ativa, mas também das freqüentes seqüelas. Pode atingir qualquer órgão e o comprometimento do sistema nervoso central (SNC) ocorre em torno de 9,9 a 27% dos casos. É uma forma grave e potencialmente incapacitante da doença, muitas vezes fatal. Deve, por isso, ser considerada no diagnóstico diferencial dos processos meningoencefalíticos e expansivos do SNC a fim de se estabelecer o tratamento precoce e evitar o surgimento de seqüelas incapacitantes. No presente trabalho, procurou-se realizar um estudo abrangente da Neuroparacoccidioidomicose (NPCM). Foi feita a primeira revisão sistemática dos casos neurológicos de PCM disponíveis na literatura, agregando 257 casos em 81 trabalhos publicados entre 1919 e 2007. A maioria dos trabalhos foi publicada após os anos 1970-1980. Aproximadamente 93% dos pacientes eram homens, principalmente lavradores, com idade média de 43 anos. O quadro caracterizou-se por sintomatologia motora ou de hipertensão intracraniana, com predomínio da forma crônica pseudotumoral. O período médio de evolução foi de 4,9 meses. As lesões foram principalmente supratentoriais (66,8%), localizando-se nos lobos frontais e parietais. A biópsia determinou o diagnóstico em 57,2% dos casos e utilizaram-se métodos de neuroimagem em 64,6% deles. Houve grande associação com a forma pulmonar da doença (59,1%). A mortalidade foi de 44,1%; 50,1% dos sobreviventes evoluíram com seqüelas,

principalmente motoras. Foi feita a análise das características epidemiológicas, clínicas e terapêuticas de oito casos de NPCM pertencentes a uma coorte de 213 casos de PCM atendidos no Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecto-Parasitárias Orestes Diniz (CTR-DIP) do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais desde outubro de 1976 a agosto de 2008, comparando-os com os pacientes com PCM sem comprometimento neurológico atendidos no ambulatório a fim de se observar possíveis características que poderiam distinguir a NPCM da PCM. A prevalência de NPCM foi de 4,0% na população estudada. Um paciente apresentou a forma subaguda da PCM e os outros sete apresentaram a forma crônica da doença. A forma pseudotumoral da NPCM ocorreu em todos os pacientes. 60% dos pacientes procedentes da região norte/nordeste de Minas Gerais desenvolveram NPCM. Foi observado o envolvimento neurológico de uma mãe e de seu filho. Os pacientes com NPCM exibiram perfis demográficos e clínicos similares ao descrito na literatura. A comparação dos casos de NPCM aos de PCM, revelou diferenças estatisticamente significativas em relação à procedência, presença de sintomas neurológicos e história familiar positiva de PCM. Essas diferenças em relação à procedência e à história familiar apontam para a necessidade de estudos que determinem fatores de susceptibilidade envolvidos no acometimento neurológico. A fim de se possibilitar uma observação dos mecanismos fisiopatológicos da NPCM, foi realizado um estudo experimental. No entanto, não há na literatura registros de modelos experimentais para o estudo da NPCM. Objetivou-se, então, o desenvolvimento de um modelo experimental da doença em camundongos. O modelo foi definido pela inoculação, por via intracraniana, de  $10^6$  células leveduriformes de

*Paracoccidioides brasiliensis* cepa Pb18/animal. A avaliação dos animais quanto à morbidade foi realizada com o protocolo SHIRPA, constatando-se alterações comportamentais nos domínios clínicos “reflexos e sensorio”, “estado neuropsiquiátrico”, “comportamento motor”, “função autônoma” e “tônus muscular”. A microscopia intravital revelou aumento significativo nas etapas de rolamento e de adesão leucocitárias nos vasos da pia-máter dos animais infectados após 4 semanas de infecção, mas não após 8 semanas. Foram removidos fragmentos dos cérebros dos animais para avaliação dos níveis teciduais das enzimas NAG e MPO, de citocinas, de quimiocinas e descrição das alterações histopatológicas. As enzimas MPO e NAG estava aumentadas após 4 e 8 semanas de infecção. Houve um aumento nos níveis da quimiocina MIG/CXCL9 após 4 semanas de infecção e de MIG/CXCL9, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MCP-1/CCL2 e RANTES/CCL5 após 8 semanas de infecção. A análise histológica das lesões demonstrou que a infecção experimental por via intracraniana leva à formação de alterações histopatológicas similares às lesões pseudotumorais e granulomatosas da NPCM anteriormente descritas, inclusive havendo disseminação das lesões para outras áreas do encéfalo. Assim, o desenvolvimento de um modelo experimental de NPCM em camundongos pode auxiliar no aprofundamento de inúmeras questões relativas à doença de modo a minimizar as descritas conseqüências dessa grave complicação da PCM.

**Palavras-chave:** Paracoccidioidomicose, Sistema Nervoso Central, Infecções Fúngicas do Sistema Nervoso Central, Modelo Experimental.

## SUMMARY

Paracoccidioidomycosis (PCM) is the most important systemic mycosis in Latin America and has great relevance in Brazil, especially in the states of São Paulo and Minas Gerais. It is related to social and economic costs derived from the active disease and from the frequent sequelae. PCM can affect several organs and central nervous system (CNS) involvement occurs in approximately 9.9 to 27% of the cases. It is a severe and potentially disabling complication of PCM, which, frequently, leads to death. For these reasons, Neuroparacoccidioidomycosis (NPCM) must be considered in the differential diagnosis of the meningeal and the tumoral/expansive processes of the CNS, in order to establish early treatment and to avoid the development of disabling sequelae. This work is a comprehensive study of NPCM. This is the first NPCM systematic review of the literature. 257 cases were found in 81 published works from 1919 to 2008, mainly after the 1970-1980 decades. Approximately 93% of the patients were men, especially rural workers, with mean age of 43 years. The commonest symptoms were those of motor deficits or intracranial hypertension. The chronic pseudotumoral form predominated. The mean period of evolution was 4.9 months. Lesions were mainly supratentorial, localizing in the frontal and parietal lobes. Diagnosis was determined by biopsy in 57.2% of the cases and neuroimaging methods were used by 64.6% of them. Most cases were associated with the pulmonary form of disease (59.1%). The mean mortality rate was 44.1%, and 50.1% of the survivors developed sequels, especially motor impairment. Epidemiological, clinical and therapeutic characteristics of eight NPCM patients which belonged to a cohort of 213 PCM cases assisted at

the Infectious Clinic of the University Hospital, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, from October 1976 to August 2008, were compared to PCM cases without neurological involvement in order to define singular features that could differentiate NPCM from PCM. The observed NPCM prevalence was 4.0%. One patient presented the sub acute form of PCM and the other seven presented the chronic form of the disease. The pseudotumoral form of NPCM occurred in all patients. 60.0% of the patients who proceeded from the north/northeast region of Minas Gerais state developed NPCM. The neurological involvement of a mother and her son was observed. NPCM patients exhibited demographical and clinical profiles similar to what is described in the literature. When NPCM cases were compared to PCM patients, there were differences in relation to origins, higher educational level, presence of neurological symptoms, and positive PCM family history. The differences in relation to patient's origins and family history point to the need of further studies to determine the susceptibility factors involved in the neurological compromise. An experimental study was conducted to permit the observation of the physiopathological mechanisms of NPCM. However, there is no registers in the literature concerning to experimental models of NPCM. Thus, a murine model of NPCM was developed. The model was defined by the intracranial inoculation of  $10^6$  *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells (strain Pb18)/animal. Morbidity was evaluated by the SHIRPA protocol, which revealed behavioral changes in the clinical domains "reflex and sensory function", "neuropsychiatric state", "motor behavior", "autonomous function", "muscle tone and strength". Intravital microscopy revealed an increased leukocyte rolling and adhesion in the brain microvasculature of infected mice at 4 weeks post infection, but not after 8

weeks. Fragments of the brain were removed to evaluate cerebral levels of NAG and MPO enzymes, cytokines, chemokines and histopathological alterations. NAG and MPO enzymes were elevated in the brain of infected mice at 4 and 8 weeks post infection. There was an increase in the levels of the chemokine MIG/CXCL9 at 4 weeks post infection and of the chemokines MIG/CXCL9, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MCP-1/CCL2 e RANTES/CCL5 at 8 weeks post infection. Histological analysis showed granulomatous and pseudotumoral lesions similar to the histopathological alterations classically attributed to NPCM, including dissemination to other parts of the CNS. Thus, the establishment of a NPCM experimental model can provide the conditions to study further aspects of the disease which could help to diminish its severe consequences.

**Keywords:** Paracoccidioidomycosis, Central Nervous System, Central Nervous System Fungal Infections, Experimental Model.

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 Distribuição das publicações sobre Neuroparacoccidioidomicose ao longo das décadas desde sua primeira descrição.....72
- Gráfico 2 Curva de sobrevivência de camundongos C57BL/6 infectados por via intracraniana com os inóculos de  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  células leveduriformes de Pb18 e animais controle (CT) que receberam solução salina PBS.....85
- Gráfico 3 Massa corporal dos camundongos C57BL/6 infectados por via intracraniana com  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  células leveduriformes de Pb18 ao longo de 60 dias .....87
- Gráfico 4 Consumo alimentar dos camundongos C57BL/6 infectados por via intracraniana com  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  células leveduriformes de Pb18 e animais controle (CT), após 60 dias .....88
- Gráfico 5 Curvas de desempenho na aplicação do protocolo SHIRPA divididas por domínios em camundongos C57BL/6 infectados por via intracraniana com  $10^6$  células leveduriformes de Pb18 e inoculados por via intracraniana com solução salina PBS ao longo de 60 dias.....90
- Gráfico 6 Número de leucócitos nas etapas de rolamento e de adesão na microcirculação da pia-máter, observado pela técnica de microscopia intravital em camundongos C57BL/6 infectados

	por via intracraniana com $10^6$ células leveduriformes de Pb18 e inoculados por via intracraniana com solução salina PBS após 4 e 8 semanas .....	91
Gráfico 7	Acúmulo de neutrófilos e macrófagos em tecido cerebral de camundongos C57BL/6 controle e infectados por via intracraniana com $10^6$ células leveduriformes de Pb18 após 4 e 8 semanas .....	93
Gráfico 8	Dosagem das citocinas e quimiocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL4, KC/CXCL1, MIG/CXCL9, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MCP-1/CCL2 e RANTES/CCL5 em tecido cerebral de camundongos C57BL/6 infectados por via intracraniana com $10^6$ células leveduriformes de Pb18 e inoculados por via intracraniana com solução salina PBS observados após 4 e 8 semanas de infecção .....	94

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Tomografia computadorizada de encéfalo de um paciente atendido no CTR-DIP Orestes Diniz, Hospital das Clínicas, UFMG .....44
Figura 2	Esquema representativo do local de inoculação no crânio dos camundongos .....60
Figura 3	Esquema representativo do local onde foi realizada a janela no crânio dos camundongos, permitindo assim visualização dos vasos da pia-máter .....65
Figura 4	Fotomicrografias de cérebro de camundongos C57BL/6 infectados com $10^6$ células leveduriformes de Pb18 por via intracraniana após 4 e 8 semanas.....97

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Prevalência de acometimento do sistema nervoso central no curso da infecção paracoccidiodomicótica em 14 estudos realizados de 1943 a 2004 .....	39
Tabela 2	Principais alterações clínicas observadas em pacientes com Neuroparacoccidiodomicose descritas em três estudos diferentes.....	41
Tabela 3	Principais esquemas terapêuticos para o tratamento da Neuroparacoccidiodomicose .....	46
Tabela 4	Principais sinais e sintomas neurológicos observados em 257 pacientes com Neuroparacoccidiodomicose.....	73
Tabela 5	Principais regiões no sistema nervoso central de localização de lesões na Neuroparacoccidiodomicose .....	74
Tabela 6	Freqüência de comprometimento de outros órgãos na Neuroparacoccidiodomicose.....	75
Tabela 7	Esquemas terapêuticos empregados no tratamento da Neuroparacoccidiodomicose.....	76
Tabela 8	Seqüelas observadas entre os casos de Neuroparacoccidiodomicose.....	76
Tabela 9	Aspectos clínicos e demográficos exibidos por oito pacientes com Neuroparacoccidiodomicose atendidos no Centro de Referência em Doenças Infecto-Parasitárias Orestes Diniz	

do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, entre 1976 e 2008.....79

Tabela 10 Comparação de aspectos demográficos entre pacientes com Neuroparacoccidioidomicose (NPCM) e Paracoccidioidomicose (PCM) atendidos no Centro de Referência em Doenças Infecto-Parasitárias Orestes Diniz do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, entre 1976 e 2008.....82

Tabela 11 Comparação de aspectos clínicos entre pacientes com Neuroparacoccidioidomicose (NPCM) e Paracoccidioidomicose (PCM) atendidos no Centro de Referência em Doenças Infecto-Parasitárias Orestes Diniz do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, entre 1976 e 2008.....84

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ANOVA	Análise de variância
BSA	Soralbumina bovina ( <i>Bovine Serum Albumine</i> )
$\text{CaCl}_2$	Cloreto de cálcio
CCL	Quimiocina que possui duas cisteínas consecutivas na extremidade N-terminal
CEBIO	Centro de Bioterismo
CL	Quimiocina que possui uma cisteína na extremidade N-terminal
CT	Grupo de animais controle
CTR-DIP	Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecto-Parasitárias Orestes Diniz
$\text{CX}_3\text{CL}$	Quimiocina que possui três outros aminoácidos entre as duas cisteínas na extremidade N-terminal
CXCL	Quimiocina que possui um outro aminoácido entre as duas cisteínas da extremidade N-terminal
D	Direito
dL	Decilitro
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio-padrão
E	Esquerdo

EDTA	Ácido etil-diamino-tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático ( <i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i> )
EUA	Estados Unidos da América
EV	Via endovenosa
g	Grama
H <sub>2</sub> O	Água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
HE	Coloração hematoxilina-eosina
HLA	Antígeno leucocitário humano
HSV-1	<i>Herpes simplex</i> vírus tipo 1
IDD	Imunodifusão dupla
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina da família G
IL10	Interleucina 10
IL12	Interleucina 12
IL4	Interleucina 4
KC/CXCL1	Proteína quimioatraente de neutrófilos
KCl	Cloreto de potássio
kg	Quilograma
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monopotássico
L	Litro
LD <sub>50</sub>	Dose letal para 50%
M	Molar

MA	Massachusetts
MCP-1/CCL2	Proteína quimioatraente para monócito 1
mg	Miligrama
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
MID	Membro inferior direito
MIG/CXCL9	Monocina induzida por IFN-γ
MIP-1α/CCL3	Proteína quimioatraente de macrófagos, monócitos e linfócitos T CD8+
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MPO	Mieloperoxidase
MSE	Membro superior esquerdo
n	Número de indivíduos
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato dissódico
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaEDTA	Etil-diamino-tetra-acetato dissódico
NAG	N-acetilglicosaminidase
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
nm	Nanômetro
NPCM	Neuroparacoccidioidomicose
°C	Graus Celsius
OPD	o-fenilendiamina
PB	Grupo de animais infectados
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>

PBS	Tampão fosfato de sódio ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PCM	Paracoccidiodomicose
pH	Potencial hidrogeniônico
RANTES/CCL5	Proteína quimioatraente de linfócitos T ativados e eosinófilos
RNM	Ressonância nuclear magnética
rpm	Rotações por minuto
SHIRPA	SmithKline Beecham Pharmaceuticals; Harwell MRC Mouse Genome Centre and Mammalian Genetics Unit Imperial College School of Medicine at St Mary's Royal London Hospital; St Bartholomew's; Royal London School of Medicine; Phenotype Assessment
SMT-TMP	Sulfametoxazol-Trimetoprim
SNC	Sistema nervoso central
SP	São Paulo
T1	Tempo 1 de relaxamento
T2	Tempo 2 de relaxamento
TC	Tomografia computadorizada
Th1	Linfócito T <i>helper</i> tipo 1
Th2	Linfócito T <i>helper</i> tipo 2
TMB	3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UI	Unidade Internacional
v/v	Volume-volume por cento

VA	Virginia
VO	Via oral
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i>

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	30
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	34
2.1 Revisão narrativa da literatura.....	34
2.1.1 Paracoccidiodomicose: epidemiologia e apresentação clínica .....	34
2.1.2 Neuroparacoccidiodomicose.....	37
2.1.3 Diagnóstico .....	42
2.1.4 Tratamento .....	45
2.2 O modelo animal de Paracoccidiodomicose .....	48
3 OBJETIVOS .....	55
3.1 Objetivos gerais .....	55
3.2 Objetivos específicos.....	55
4 MÉTODOS .....	57
4.1 Estudo clínico .....	57
4.1.1 Revisão sistemática da literatura .....	57
4.1.2 Pacientes .....	57
4.2 Estudo experimental.....	58
4.2.1 Animais.....	58
4.2.2 Isolado fúngico.....	58
4.2.3 Preparação do inóculo para infecção dos animais .....	59
4.2.4 Infecção dos animais .....	59
4.2.5 Peso e consumo alimentar .....	60
4.2.6 Processamento das amostras cerebrais de camundongo .....	61
4.2.7 Determinação de citocinas e quimiocinas por ELISA .....	62
4.2.8 Ensaio para detecção dos níveis de atividade de N-acetilglicosaminidase (NAG) tecidual.....	63
4.2.9 Ensaio para detecção dos níveis de atividade de mieloperoxidase (MPO) tecidual.....	64
4.2.10 Microscopia intravital em cérebro de camundongo.....	65
4.2.11 Método histológico.....	66
4.2.12 SHIRPA .....	69
4.3 Análise estatística.....	70
5 RESULTADOS .....	72

5.1 Revisão sistemática da literatura .....	72
5.2 Análise da casuística do CTR-DIP do Hospital das Clínicas da UFMG .....	77
5.3 Estudo experimental .....	85
5.3.1 Curva de sobrevivência e padronização do inóculo .....	85
5.3.2 Sinais clínicos .....	86
5.3.3 Morbidade (Protocolo SHIRPA) .....	88
5.3.4 Interação leucócito-endotélio .....	91
5.3.5 Detecção dos níveis de atividade de mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglicosaminidase (NAG) teciduais .....	92
5.3.6 Produção de citocinas e quimiocinas .....	93
5.3.7 Alterações histopatológicas .....	95
6 DISCUSSÃO .....	99
7 CONCLUSÕES .....	116
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	118



## ***Introdução***

## 1 INTRODUÇÃO

O ano de 2008 marcou os cem anos da publicação de *“Uma mycose pseudococcidica localizada na bocca e observada no Brazil: contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas”*, feita por Adolpho Lutz, na qual o médico brasileiro descreve os aspectos clínicos, histopatológicos e micológicos de dois casos de uma nova enfermidade, desconhecida até então, e que, atualmente, é denominada Paracoccidioidomicose (PCM) (Marques, 2008).

A PCM é a micose sistêmica mais importante da América Latina, acometendo cerca de dez milhões de pessoas no continente. Destas, estima-se que 2% desenvolverão formas disseminadas da doença. O Brasil acumula cerca de 80% dos casos descritos, exibindo distribuição regional heterogênea, com destaque para os estados da região Sudeste, principalmente São Paulo e Minas Gerais, como áreas endêmicas de elevada incidência (da Silva *et al.*, 2000). Sua importância em saúde coletiva relaciona-se a custos sociais e econômicos derivados não apenas da doença ativa, que acomete predominantemente indivíduos no auge da capacidade produtiva, mas também das freqüentes seqüelas, motivo comum de incapacitação para o trabalho. A doença posicionou-se como a oitava causa de mortes entre as doenças infecto-parasitárias no Brasil no período de 1980 a 1995, alcançando uma taxa média anual de 1,45/milhão de habitantes (Mendes, 2005).

A PCM pode atingir virtualmente qualquer órgão: os pulmões (50-100%), a pele, as mucosas, os linfonodos, as adrenais. O comprometimento do sistema nervoso central (SNC) ocorre em torno de 9,9 a 27% dos casos, sendo

bem mais freqüente do que se admitia e é uma forma grave e potencialmente incapacitante da doença, muitas vezes fatal (Fagundes-Pereyra *et al.*, 2006).

Este trabalho dedicou-se a realizar um abrangente estudo da forma neurológica da PCM, em vista do fato de que as informações disponíveis na literatura acerca da Neuroparacoccidioidomicose (NPCM) ainda estarem notavelmente fragmentadas e baseadas em relatos de casos únicos ou de pequenas séries de casos.

Inicialmente foi feita revisão narrativa da literatura sobre a NPCM (trabalho publicado pela *Revista Brasileira de Neurologia*, 44 (3): 33-40. 2008). A seguir, uma revisão sistemática dos casos neurológicos de PCM disponíveis na literatura foi realizada, agregando informações de 257 casos individuais de NPCM. As informações obtidas a partir desse trabalho puderam compor um panorama dos aspectos epidemiológicos, clínicos, diagnósticos e terapêuticos da doença (trabalho submetido à *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, registro nº 3227).

A seguir, foi feita a análise das características epidemiológicas, clínicas e terapêuticas de oito casos de NPCM atendidos no Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecto-Parasitárias Orestes Diniz (CTR-DIP) do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, comparando-os com a casuística de pacientes com PCM sem comprometimento neurológico atendidos no ambulatório (trabalho submetido à revista *Tropical Medicine and International Health*, registro TMIH-S-09-00273). Tal comparação foi feita porque poucos trabalhos na literatura estabelecem análises entre pacientes com a forma neurológica e pacientes sem a forma neurológica da PCM e os que o fazem realizam somente investigações diagnósticas, observando a

detecção de determinados antígenos no soro de pacientes com e sem doença neurológica, ou avaliando-se a capacidade de detecção desses marcadores no líquido.

Após a análise dos mencionados dados clínicos, a fim de se possibilitar uma observação mais profunda dos mecanismos fisiopatológicos da NPCM, optou-se por se fazer um estudo experimental. A experimentação animal é um recurso amplamente conhecido, que se presta ao estudo aprofundado das doenças humanas. Atualmente, o camundongo é a espécie animal mais comumente utilizada na pesquisa da PCM, estando o modelo da infecção pulmonar por via intra-traqueal bem estabelecido, bem como os de outras formas de infecção sistêmica (intraperitoneal, subcutânea, venosa) (Coelho *et al.*, 1994). Entretanto, não existem evidências de que esses modelos experimentais exibam comprometimento do SNC e os animais infectados não apresentam sintomatologia neurológica. Assim não existia um modelo animal que permitisse o estudo específico da interação entre o fungo e o sistema nervoso central. Em razão disso, este estudo objetivou o desenvolvimento de um modelo experimental da doença em camundongos, com infecção por via intracraniana, que viesse a possibilitar a avaliação de aspectos clínicos, imunológicos e histopatológicos desses animais e tornar-se disponível para novos estudos sobre o desenvolvimento da doença. Além disso, os conhecimentos obtidos a partir dos estudos sobre a PCM podem não somente ser fundamentais para o melhor entendimento da doença em si, como também ter importantes aplicações para pesquisadores que trabalham com outros fungos (Soares *et al.*, 2008).

## ***Revisão da Literatura***

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Revisão narrativa da literatura (artigo publicado pela Revista Brasileira de Neurologia)

► Rev Bras Neurol, 44 (3): 33-40, 2008

## Paracoccidioidomicose com comprometimento do sistema nervoso central: revisão de literatura

Paracoccidioidomycose with central nervous system involvement: review of the literature

Vinícius Sousa Pintra Pedrosa<sup>1</sup>, Márcia de Carvalho Vilela<sup>2</sup>,  
Enio Roberto Pintra Pedrosa<sup>3</sup>, Antônio Lúcio Teixeira<sup>3</sup>

### Resumo

A Paracoccidioidomicose (PCM), considerada a miíose profunda mais importante da América Latina, é causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. O Brasil apresenta o maior número de casos, especialmente na região Sudeste. A doença pode acometer inúmeras regiões como a pele, as mucosas. O envolvimento do sistema nervoso central (SNC) ocorre em aproximadamente 10% dos casos e sua incidência pode ser subestimada devido à ocorrência de formas assintomáticas, avaliação neurológica inadequada, falta de testes específicos de neuroimagem e baixa frequência de estudo do SNC em neuropatias. As formas de apresentação são a meningite/meningoencefalite, raras, e a paracoccidioidomielite, mais frequente. A sintomatologia é diversa, variando conforme a localização das lesões, e não específica. Os métodos de neuroimagem são considerados essenciais no auxílio diagnóstico, o exame de líquido cefalorraquidiano é pouco específico e métodos sorológicos ainda têm valor limitado, sendo usados principalmente para seguimento da resposta ao tratamento, especialmente orais, para qualquer forma de apresentação, é a associação sulfametoxazol-trimetoprim. Evita-se a amphotericin B para os casos de resistência ou intolerância às sulfonamidas. Uma alternativa são os antifúngos, como o itraconazol ou o fluconazol. Ainda não se estabeleceram parâmetros definitivos para indicar o momento seguro de interrupção do tratamento ou para sua reintrodução precoce em caso de recidiva. A PCM deve ser considerada no diagnóstico diferencial das doenças meningoencefálicas e espinais do SNC, dependendo de um alto grau de suspeição do médico a fim de se estabelecer o tratamento precoce e evitar o surgimento de sequelas incapacitantes.

**Unitermos:** Paracoccidioidomicose, Sistema Nervoso Central, Infecções Fúngicas do Sistema Nervoso Central.

### Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM), considered the most important systemic mycosis in Latin America, is caused by the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Brazil has the greatest amount of reported cases, especially in the Southeastern region. The disease can affect several sites as the lung, the skin and the mucous membranes. Central nervous system (CNS) involvement occurs approximately in 10% of the cases, and its incidence can be underestimated due to the occurrence of asymptomatic cases, inadequate neurological evaluation, no specific neuroimaging exams, and low frequency of SNC investigation in neuropathies. Neuroparacoccidioidomycosis (NPCM) comprises meningeal form, which is rare, and the most frequent paracoccidioidomycosis. The symptoms are varied, depending on the location of the lesions, and not specific. Neuroimaging methods are considered essential for the diagnosis. Examination of the cerebral spinal fluid is not specific and serological methods still have limited value, being used mainly in the evaluation of treatment response. The first choice for PCM treatment is the association sulfametoxazol-trimetoprim. Amphotericin B is reserved for the cases of resistance or intolerance to sulfonamides. Alternatively there are itraconazole or fluconazole. No treatment parameters were yet established to indicate the ideal moment for interrupting drug treatment or for its early reintroduction. NPCM must be considered in the differential diagnosis of the meningeal and the tumoral infective processes of the CNS, depending on a high suspicion level of the physician in order to establish the early treatment and to avoid the development of disabling sequelae.

**Keywords:** Paracoccidioidomycosis, Central Nervous System, Central Nervous System Fungal Infections.

<sup>1</sup>Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da UFMG, Laboratório de Imunofarmacologia do ICB/UFMG.

<sup>2</sup>Doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da UFMG, Laboratório de Imunofarmacologia do ICB/UFMG.

<sup>3</sup>Professor do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UFMG.

#### 2.1.1 Paracoccidioidomicose: epidemiologia e apresentação clínica

A PCM é uma doença infecciosa sistêmica, endêmica às áreas subtropicais das Américas Central e do Sul, que se estendem do México à Argentina, com exceção do Chile, Antilhas e Guianas. Foi inicialmente descrita por Adolpho Lutz, em 1908, e seu agente etiológico, o fungo dimórfico

*Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), foi caracterizado por Alfonso Splendore, em 1912, e por Floriano Paulo de Almeida, em 1930. A infecção se dá por via inalatória, sem transmissão interpessoal.

É considerada a mais importante micose profunda da América Latina. Ocorre também sob formas assintomáticas ou frustras e estima-se que aproximadamente dez milhões de pessoas estejam infectadas no continente. Destas aproximadamente 2% desenvolverão formas disseminadas da doença (McEwen *et al.*, 1995).

O Brasil acumula cerca de 80% dos casos descritos (Fagundes-Pereyra *et al.*, 2006), seguido da Colômbia, Venezuela e Guatemala (Lorenzoni *et al.*, 2002). A doença possui distribuição regional heterogênea no país, destacando-se os estados da região Sudeste, principalmente São Paulo e Minas Gerais, como áreas endêmicas de elevada incidência (da Silva *et al.*, 2000).

A real prevalência da PCM é ainda desconhecida, mas tem-se tentado estimá-la por meio de testes sorológicos. Detectaram-se anticorpos anti-*Pb* em 27% dos soros de doadores de sangue no Brasil (Maluf *et al.*, 2003). Já foram realizados diversos inquéritos populacionais com testes intradérmicos no Brasil e em países vizinhos. A positividade de indivíduos assintomáticos nesses testes variou de 2% a 70%, verificando-se maior reatividade nas áreas sabidamente endêmicas e na população rural (Martinez, 2005). Um inquérito semelhante realizado entre índios da região Amazônica encontrou prevalência que variou de 6,4% a 43,8% entre diferentes tribos (Forjaz *et al.*, 1999).

A dificuldade de se determinar a real prevalência da doença reside, sobretudo, no fato de que não há notificação compulsória nacional. No estado de Minas Gerais, uma resolução da Secretaria de Estado da Saúde de 16 de

maio de 2008, tornou obrigatória a notificação da doença. Estima-se que sua incidência anual nas áreas endêmicas da América Latina situe-se entre um e três casos novos por 100.000 habitantes.

A PCM pode acometer indivíduos em todas as faixas etárias, a partir dos dois anos de idade, mas há marcante predominância entre os 30 e os 50 anos. Até a puberdade, a incidência é a mesma para ambos os sexos, entretanto torna-se mais freqüente entre os homens na idade adulta, em proporção de 11:1 (Fagundes-Pereyra *et al.*, 2006). Explica-se esse fenômeno pela possível proteção conferida pelos estrógenos, que inibem a transformação de conídios em leveduras (evento necessário para a infecção) e, também, pelo menor envolvimento das mulheres com o trabalho em área rural (Camargo & Cano, 1994; Wanke & Londero, 1994).

O paciente típico é o trabalhador agrícola, de meia-idade, geralmente mal-nutrido, que inala a forma infectante do fungo, desenvolvendo uma doença pulmonar crônica. Assim, a PCM pode ser considerada doença ocupacional. Atualmente, entretanto, a doença tem sido descrita em indivíduos que habitam grandes centros urbanos, havendo relatos inclusive na Europa e Ásia (Japão), como “micose importada”. Sua incidência nessas regiões deve continuar aumentando devido ao crescimento do tráfego aéreo internacional e da imigração, podendo ser considerada, também, uma doença do viajante (Marchiori *et al.*, 1989; Van Damme *et al.*, 2006; Mayayo *et al.*, 2007).

No Brasil, sua importância em saúde coletiva relaciona-se a custos sociais e econômicos derivados não apenas da doença em atividade, que acomete predominantemente indivíduos no auge da idade produtiva, mas também das freqüentes seqüelas remanescentes, motivo comum de

incapacitação para o trabalho. De modo geral, a evolução da doença sem intervenção terapêutica específica resulta em óbito. A PCM foi a oitava causa de mortes entre as doenças infecto-parasitárias no Brasil, no período de 1980 a 1995, alcançando uma taxa média anual de 1,45/milhão de habitantes (Coutinho *et al.*, 2002; Mendes, 2005).

Duas formas clínicas principais são descritas: a aguda ou subaguda (tipo juvenil) e a crônica (tipo do adulto). A progressão das lesões primárias caracteriza a forma aguda/subaguda, que evolui rapidamente dentro de semanas a meses, sendo grave, com altas taxas de mortalidade devida à hipertrofia do sistema retículo-endotelial (com acometimento generalizado de linfonodos, além de fígado, baço e medula óssea) e progressiva disseminação fúngica. No entanto, em mais de 90% dos casos, é observada a forma crônica da doença, que surge por reativação de focos quiescentes, após período de latência variável, mas, geralmente, longo (Paniago *et al.*, 2007).

Outra forma clínica é a residual, em que não há mais fungos viáveis, porém resta a fibrose, gerando sintomas e sinais diversos de acordo com o sítio anatômico da lesão (insuficiência pulmonar, adrenal, hepática).

Os órgãos mais comumente afetados são os pulmões (50-100%), seguidos da pele, mucosas, linfonodos, adrenais, sistema nervoso central, fígado e ossos.

### **2.1.2 Neuroparacoccidioidomicose**

Pereira e Jacobs, em 1919, foram os primeiros a sugerir o envolvimento do SNC na PCM. Gurgel, um ano depois, fez referência a um caso de PCM generalizada com comprometimento neurológico observado em necropsia,

porém sem descrever o quadro clínico. Somente em 1943, Maffei relata o primeiro caso com comprovação anatomopatológica específica da infecção do SNC.

A infecção neurológica é sempre secundária e o fungo pode se disseminar por via hematogênica e/ou linfática ou, possivelmente, também por contigüidade. O acometimento simultâneo de outros órgãos ou sistemas não ocorre necessariamente, podendo ser esta forma a sua única localização (Inza *et al.*, 1985). Entretanto, em interessante observação feita por Marchiori *et al.* (1989), parece que o comprometimento radiologicamente detectável dos pulmões nos casos de lesão do SNC é mais freqüente que em outras formas generalizadas da doença. Assim, 3,1% dos pacientes com comprometimento do tubo digestivo na PCM apresentam quadro pulmonar (Pereira, 1983); 5% dos pacientes com envolvimento ósteo-articular, exibem lesões parenquimatosas pulmonares concomitantes (Marchiori, 1979) e 61-83% dos pacientes com comprometimento do SNC apresentam lesões pulmonares sugestivas de doença (Gasparetto *et al.*, 2003), assumindo o exame radiológico do tórax relativa importância na avaliação do paciente.

Em 21% dos casos, os sintomas neurológicos iniciam-se antes dos sistêmicos; em 33% ocorrem simultaneamente e, em 46%, eles surgem após os sintomas sistêmicos (de Almeida *et al.*, 2005).

A freqüência do acometimento do SNC foi inicialmente descrita como rara, possivelmente devido a apresentações assintomáticas, exame neurológico inadequado, falta de testes específicos como tomografia computadorizada (TC) ou ressonância nuclear magnética (RNM) e baixa freqüência de estudo do SNC em necropsias (de Moura *et al.*, 1994). Com os

novos métodos diagnósticos que surgiram nas últimas décadas, constatou-se que a NPCM constitui eventualidade bem mais freqüente que se admitia, ocorrendo em torno de 9,9 – 27% dos casos de PCM, chegando até mesmo a 36% em estudo necroscópico realizado por Franco *et al.* (1989). Em trabalho publicado por Hutzler *et al.* (1985), 40 pacientes com PCM e com exame clínico, neurológico e de líquido cefalorraquidiano normais foram submetidos a tomografia computadorizada do encéfalo encontrando-se 12,5% de positividade para o acometimento do SNC. Desses pacientes, 60% apresentaram, em épocas diferentes da observada, sintomas neurológicos; fato importante ao se considerar que a taxa de mortalidade da NPCM chega a 53% (Fagundes-Pereyra *et al.*, 2006).

**Tabela 1:** Prevalência de acometimento do sistema nervoso central no curso da infecção paracoccidiodomicótica em 14 estudos realizados de 1943 a 2004.

Maffei (1943)	1,2%
Niño (1946)	2,7%
Lacaz (1947)	30,7%
De Azevedo (1949)	27,8%
Canelas <i>et al.</i> (1951)	1,2%
Lima (1952)	1,8%
Machado Filho e Miranda (1960)	0,7%
del Negro (1961)	12,5%
Raphael (1966)	25%
Pereira <i>et al.</i> (1965)	9,65%
Peña (1967)	27,3%
Hutzler <i>et al.</i> (1985)	12,5%
Franco <i>et al.</i> (1989)	36%
de Almeida <i>et al.</i> (2004)	13,9%

As formas de apresentação clínica são a meningea, a meningoencefálica e a pseudotumoral, sendo esta última a mais freqüente (aproximadamente 96% dos casos), podendo assumir as formas de abscessos, granulomas, nódulos ou cistos intraparenquimatosos, preferencialmente de localização supratentorial, afetando mais comumente os hemisférios cerebrais.

As lesões infratentoriais também são descritas, envolvendo a ponte, o bulbo e, principalmente, o cerebelo. O comprometimento da medula espinhal é descrito como raro (de Almeida, 2005).

As lesões do parênquima encefálico podem ocorrer com granulomas solitários ou múltiplos. Apresentam-se como infiltrado de células histiocitárias e gigantes, com formação de granulomas com áreas centrais de necrose. Os fungos são abundantes na periferia dos granulomas. Encontram-se frequentemente arterites ou endarterites e a obliteração vascular pelo infiltrado inflamatório é considerada o fator mais importante na formação da necrose (Dominguez, 1961; Pedro *et al.*, 1980).

A afecção meníngea é tida como rara. Invernici *et al.* (2004) fazem referência a somente 16 casos publicados na literatura brasileira desde a primeira descrição da forma, em 1943, até o ano de 2002. Consiste em processo inflamatório crônico da base do encéfalo, podendo, ainda ocasionar sintomatologia radicular ou mielítica bastante semelhante à meningoencefalite tuberculosa (Corrêa *et al.*, 1991). Por essa semelhança acredita-se que a leptomeningite paracoccidioidomicótica também tenha origem na abertura de granulomas em focos subependimários para dentro sistema ventricular ou para o espaço subaracnóideo, lembrando a etiologia tuberculosa também por sua localização na leptomeninge da base do crânio e por seus aspectos clínicos, líquóricos e anatomopatológicos (Pedro *et al.*, 1980).

Contrariamente a outras micoses sistêmicas, como a Criptococose, a Histoplasmose disseminada e a Candidíase, a PCM não se relaciona usualmente a doenças imunossupressoras. Tal fato é motivo de controvérsia na literatura, podendo se dever à presença do Pb em nichos ecológicos

específicos, ao contrário dos outros patógenos citados, os quais possuem distribuição ubíqua. No entanto, observou-se que linfócitos T CD4+ têm papéis variáveis na imunidade contra a PCM em hospedeiros com diferentes perfis de susceptibilidade, ao passo que células CD8+ têm maior relevância na imunoproteção, podendo explicar a possível falta de associação entre PCM e AIDS (Chiarella *et al.*, 2007). Além disso, do ponto de vista genético, apesar de haver registros na literatura da associação positiva da PCM com a expressão de alguns antígenos HLA (como A9, B13, B22 e B40), não se demonstrou associação específica entre NPCM e nenhum alelo HLA (de Almeida *et al.*, 2004).

A sintomatologia da NPCM é diversa, variando conforme a localização das lesões, podendo haver hipertensão intracraniana, crises epiléticas, déficits motores ou sensoriais, ataxia cerebelar, afasia e outros. Em três diferentes estudos realizados por de Almeida *et al.* (2004), Elias Jr *et al.* (2005) e Fagundes-Pereyra (2006), os autores observaram as seguintes distribuições de sinais e sintomas em 24, 20 e 13 casos de NPCM, respectivamente:

**Tabela 2:** Principais alterações clínicas observadas em pacientes com Neuroparoccidiodomicose descritas em três estudos diferentes.

Sinais e Sintomas	de Almeida <i>et al.</i> (2004)	Elias Jr <i>et al.</i> (2005)	Fagundes-Pereyra (2006)
Crises epiléticas	33,3%	20%	46,1%
Déficits motores	25%	-	53,8%
Sinais cerebelares	25%	40%	-
Cefaléia	20,8%	55%	46,1%
Hidrocefalia	20,8%	-	-
Alterações cognitivas	12,5%	20%	53,8%
Parestesia	12,5%	-	-
Sinais bulbares	8,3%	-	-
Compressão medular	4,2%	10% (medular e sinais meníngeos)	-
Tremor de Holmes	4,2%	-	-
Emagrecimento	-	-	46,1%

### 2.1.3 Diagnóstico

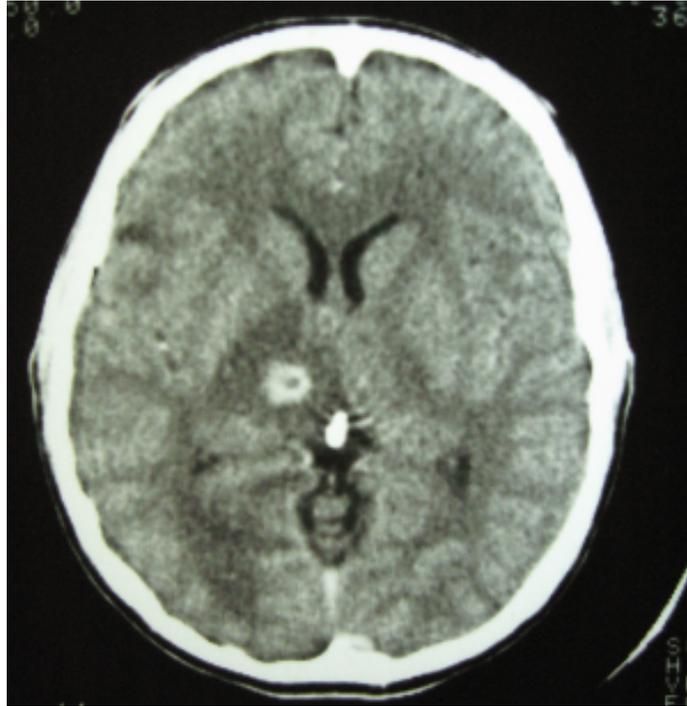
Essa falta de especificidade dos sintomas torna difícil o diagnóstico da NPCM, que também é complicado devido à baixa sensibilidade dos testes diagnósticos, à ocorrência isolada da NPCM e à falta de infecção sistêmica prévia. Os exames laboratoriais complementares são, de maneira geral, inespecíficos, porém podem ser indicativos. A radiografia de tórax pode ser útil para evidenciar comprometimento pulmonar concomitante (Marchiori *et al.*, 1989). Os métodos de neuroimagem (TC e RNM) são considerados essenciais na demonstração do envolvimento neurológico da doença, especialmente na forma granulomatosa (Magalhães *et al.*, 1993). Porém, a apresentação meníngea pode simular outras formas de meningite inflamatória crônica e a forma pseudotumoral pode aparecer como outros processos expansivos intracranianos nos estudos de imagem. Assim, o diagnóstico definitivo é obtido apenas quando os fungos são observados histologicamente ou isolados de biópsias ou de líquido, sendo, no entanto, raro o isolamento do agente a partir deste.

Além disto, o líquido em geral é límpido e sua pressão é normal (Minguetti, 1983). Pode, no entanto, apresentar alterações inespecíficas como leve pleocitose, proteínas normais ou aumentadas, atingindo valores de 200 mg/dL, glicorraquia normal ou diminuída e cloretos normais.

A propedêutica radiológica (TC, RNM) deve sempre trazer maior subsídio ao esclarecimento do envolvimento encefálico ou intramedular (Morato-Fernandez *et al.*, 1991). Pela TC, os granulomas paracoccidioidomicóticos apresentam-se como lesões arredondadas, de localização variável, sem sinais de formação ou de destruição ósseas, com

edema perifocal discreto a intenso, discreto efeito de massa e captação de contraste em anel (somente na periferia) devendo ser feito diagnóstico diferencial com abscessos, gliomas, metástases e, mais raramente, meningiomas, infartos ou hematomas em resolução. Minguetti (1983) realizou interessante trabalho de caracterização das lesões na NPCM observadas na TC, chamando a atenção para que, sempre que se observar através de TC uma lesão que acumula contraste em forma de anel, inclua-se na lista de hipóteses diagnósticas a possibilidade de uma lesão granulomatosa, como são os granulomas paracoccidioidomicóticos, os tuberculosos e os toxoplasmáticos. Gasparetto *et al.* (2003) analisaram 17 casos de NPCM pela TC, caracterizando-as segundo a observação de hipercaptação anular (em 94% dos casos), edema perifocal (em 82% dos casos, sendo grave em 57% deles), hidrocefalia (em 41% dos casos, sendo grave em 3 pacientes), lesões hipodensas (em 53% dos casos) e irregulares (em 76% dos casos), com calcificação intralesional e septação menos frequentes (23%). Observou-se uma correlação entre o tempo de diagnóstico (sendo este compreendido como o período sintomático pré-diagnóstico) e a aparência das lesões, de modo que pacientes com mais de 5 meses de evolução tendiam a apresentar lesões hiperdensas e pacientes com menos de 5 meses, apresentavam lesões hipodensas.

**Figura 1:** CTP, 39 anos, sexo masculino, iniciou, em maio de 2001, quadro de tosse e expectoração amarelada, emagrecimento e linfadenomegalia cervical. Em março de 2002, passou a apresentar crises epilépticas, hemiparesia e parestesia à esquerda. A tomografia computadorizada do encéfalo revelou lesão expansiva no tálamo direito. Diagnosticado com paracoccidiodomicose sistêmica foi tratado com anfotericina B (dose total 3,0g) e sulfametoxazol-trimetoprim. Em 2008, ainda encontra-se em uso de cetoconazol e carbamazepina, persistindo com redução da força e parestesia no dimídio esquerdo.  
*Fonte: CTR-DIP Orestes Diniz, Hospital das Clínicas, UFMG.*



Já na RNM, as lesões foram caracterizadas por iso ou hiposinal em T1, hiposinal em T2, com edema periférico e realce nodular ou em anel após a administração de contraste (Magalhães *et al.*, 1993).

Alguns autores propõem a escolha de métodos sorológicos para o diagnóstico da PCM e, entre eles, a imunodifusão dupla (IDD) tem sido o método mais citado (Laniado-Laborín, 2007). A IDD tem sensibilidade e especificidade que podem variar de 65 a 100% dependendo do tipo de antígeno usado (Marques da Silva *et al.*, 2003). A contra-imunoeletroforese é outro método usado para o diagnóstico precoce e, como a IDD, os antígenos usados podem variar entre laboratórios. Existe um teste de ELISA para

anticorpos anti-Pb que utiliza um filtrado de células leveduriformes de Pb como antígeno, tendo sido reportadas sensibilidade de 100% e especificidade de 88%, considerando um ponto de corte de 1:40 (Laniado-Laborín, 2007). Entretanto, exames sorológicos ainda estão pouco disponíveis para o diagnóstico na prática clínica, sendo usados principalmente para seguimento da resposta ao tratamento.

O diagnóstico diferencial da NPCM deve incluir abscessos cerebrais, gliomas, metástases, neurocisticercose (Duarte RD et al, 1997), tuberculose e toxoplasmose (Minguetti, 1983).

#### **2.1.4 Tratamento**

O tratamento da PCM pode ser feito com sulfamidoterapia, que tem baixo custo, sendo geralmente utilizada a associação sulfametoxazol e trimetoprim, preferencialmente para casos benignos ou como terapêutica de manutenção. O uso de imidazólicos é bastante difundido: cetoconazol é medicamento de custo relativamente baixo, alta eficácia antifúngica, porém com elevado potencial de hepatotoxicidade e grande número de interações medicamentosas; itraconazol é considerado droga de primeira escolha para tratamento de PCM na maioria dos casos, por sua elevada eficácia e segurança, porém tem custo elevado; fluconazol tem eficácia inferior em comparação aos demais imidazólicos, mas é a droga com maior biodisponibilidade, sendo o único azólico que atravessa a barreira hematoencefálica, estando indicada para casos de NPCM. Casos muito graves como a forma juvenil ou formas disseminadas em adultos devem ser preferencialmente tratados em regime de internação hospitalar com

anfotericina B, medicamento de ação rápida, sendo seu uso limitado pela sua elevada toxicidade renal, hepática e cardíaca. Outros medicamentos (e.g., saperconazol, voriconazol, terbinafina, etc.) ainda têm seu uso restrito em nosso meio.

Atualmente, o tratamento de escolha tanto para a forma meningoencefálica quanto para a forma pseudotumoral da NPCM é a associação sulfametoxazol-trimetoprim (de Almeida, 2005; Laniado-Laborín, 2007; Paniago *et al.*, 2007). As sulfas são consideradas as drogas de escolha em função da facilidade de administração, boa penetração no SNC e baixo custo, reservando-se a anfotericina B somente para casos de resistência ou intolerância às sulfonamidas. Existem relatos de casos bem-sucedidos tratados com itraconazol. O fluconazol, como já mencionado, também pode ser uma alternativa para o tratamento em razão de sua excelente penetração no SNC, porém é pouco utilizado para esse fim.

**Tabela 3:** Principais esquemas terapêuticos para o tratamento da Neuroparacoccidiodomicose

<b>Droga</b>	<b>Dose</b>	<b>Via de administração</b>	<b>Intervalo entre doses</b>
<b>Sulfametoxazol/ Trimetoprim</b> (EV até melhora clínica, iniciar VO assim que possível)	800/160mg (2 ampolas)	EV	8/8 horas
	800-1200/160-240 mg	VO	12/12 horas
<b>Anfotericina B</b> (dose total de 50 mg/kg ou 2 a 3 g para adultos)	1mg/kg (iniciar com 0,25 mg/kg e, segundo a tolerância, aumentar até atingir 1mg/kg)	EV (infusão por 6 horas)	24/24 horas (posteriormente, 48/48horas)
<b>Itraconazol</b>	200mg	VO	24/24 horas
<b>Fluconazol</b>	200-400mg	EV ou VO (de acordo com a gravidade)	12/12 horas ou 24/24 horas

Além do tratamento conservador, procedimentos neurocirúrgicos estão indicados quando as condições topográficas e/ou evolutivas exigem solução urgente, ou seja, quando há hipertensão intracraniana, hidrocefalia, compressão medular, efeito de massa significativo ou falha na terapêutica clínica. Granuloma único, acessível cirurgicamente e com sintomatologia de processo expansivo em evolução constitui indicação cirúrgica precisa. A intervenção neurocirúrgica para fins diagnósticos é contra-indicada por diversos autores (Marchiori *et al.*, 1989).

O tempo mínimo de duração do tratamento situa-se em torno de dois anos para os casos de NPCM. Entretanto ainda não foram estabelecidos parâmetros confiáveis que permitam apontar o momento ideal e seguro para a interrupção da terapêutica, bem como para sua reintrodução precoce em caso de recidivas. A literatura orienta que a duração do tratamento esteja relacionada à obtenção de critérios de cura clínicos (regressão dos sinais e sintomas, cicatrização de lesões e involução de linfadenopatias), radiológicos (estabilização das imagens radiológicas) e imunológicos (negativação dos títulos de imunodifusão dupla ou estabilização do título em 1:2, verificada em três amostras de soro com intervalo de dois meses). É, entretanto, muito comum a observação de pacientes que apresentam recidiva da doença a cada interrupção do tratamento. Assim, faz-se amplamente necessário determinar parâmetros ou testes laboratoriais que possibilitem maior segurança ao médico na decisão quanto à duração da terapêutica.

## 2.2 Modelo animal de Paracoccidioidomicose

A experimentação animal é um recurso amplamente difundido, que possibilita o estudo aprofundado das doenças humanas e a geração de novo conhecimento a partir disso. De modo geral, a experimentação animal fornece importantes dados no que diz respeito ao conhecimento científico básico e aplicado, este último de valor especial para a Medicina. Isso é válido, também, para a PCM, pois os modelos experimentais correspondentes têm permitido uma melhor compreensão sobre diversos aspectos da doença (Coelho *et al.*, 1994).

Não se pode perder de vista, entretanto, que nesses modelos animais, freqüentemente, são criadas condições que podem não corresponder exatamente àquelas que ocorrem em humanos. Apesar desse fato, seu objetivo é fornecer respostas a questões específicas por meio da concentração de esforços em determinados aspectos da doença em estudo. Assim, julgamento criterioso deve ser feito ao se analisar as informações obtidas por meio desses estudos e, principalmente, ao se extrapolar tais resultados para realidade humana.

Como exposto, inúmeras questões surgem durante o estudo da PCM e a utilização de modelos experimentais pode representar uma ferramenta útil na tentativa de se chegar às suas respostas, por exemplo:

Por que somente uma pequena proporção de indivíduos expostos ao fungo desenvolve a doença? Quais fatores estariam relacionados a isso? A resposta imune do hospedeiro? A dose infectante? A cepa do fungo?

Como o fungo permanece viável no organismo por tanto tempo? É necessária uma exposição contínua ao fungo para desenvolver a doença?

Por que alguns indivíduos desenvolvem a forma neurológica da doença?  
Quais fatores determinam a penetração e a proliferação do fungo no SNC?  
Como o tecido nervoso responde a essa agressão?

Esses são apenas alguns exemplos de questões ainda obscuras. Todos esses fatos estimulam tentativas de descobrir o nicho ecológico do agente, de determinar a rota exata de infecção e de estudar o curso da doença desde os seus estágios mais precoces.

As primeiras tentativas de se produzir uma infecção experimental com o Pb em animais datam da descoberta do próprio fungo. Splendore (1910) mencionou ter injetado material coletado de lesões humanas em porquinhos-da-índia, gatos, cães e macacos, ao relatar novos casos de PCM. No entanto, o primeiro experimento bem sucedido documentado na literatura foi o de Montenegro (1927) que observou o desenvolvimento invariável de orquite específica em porquinhos-da-índia ao infectá-los, por via intratesticular, com uma suspensão de amostras também obtida de lesões humanas.

Nessas investigações experimentais iniciais, os inóculos consistiam basicamente de material coletado de lesões humanas e os resultados eram muito variáveis. Hoje, ao contrário, todos os estudos incluem registros detalhados das linhagens animais e das cepas do fungo usadas. Entretanto, cabe a crítica de que cada grupo de pesquisa trabalha com suas próprias cepas, as quais são codificadas por números ou letras, e são descritas de acordo com critérios arbitrários de classificação, como tendo baixa, moderada ou alta virulência, ou como apresentando crescimento lento ou rápido, ou como agente isolado de paciente A ou B, sem observar a critérios universais. Outro ponto que deve ser enfatizado é que a maior parte dos estudos experimentais

utiliza a forma leveduriforme do Pb, enquanto o homem adquire naturalmente a infecção a partir das conídias produzidas pelo micélio.

Quando as múltiplas variáveis envolvidas são propriamente controladas, os estudos experimentais podem permitir a determinação da interação fungo-hospedeiro, a caracterização das lesões precoces e progressivas, a investigação da forma e da rota de disseminação, a descrição da morfologia do agente nos tecidos, a definição do papel da resposta imunológica no desenvolvimento da doença, a observação da susceptibilidade de diferentes órgãos ao ataque do fungo e a descoberta da resposta a diferentes agentes terapêuticos. Ou seja, uma melhor compreensão do curso da doença.

Diferentes espécies foram usadas para o estudo experimental da PCM, mas especialmente a partir da década de 1980, as mais utilizadas foram camundongos e hamsters; ratos também vêm sendo usados para o estudo de fibrogênese, da patogênese do granuloma, dentre outros.

O camundongo é atualmente a espécie mais comumente utilizada na pesquisa animal da PCM, principalmente após meados dos anos 1980, em razão da descrição da tecnologia “*knockout*” por Mário Capecchi, Martin Evans e Oliver Smithies (Manis, 2007). Essa técnica proporcionou a possibilidade do uso de linhagens animais isogênicas, através da supressão de genes específicos, permitindo a criação de modelos com as mais diversas características genéticas e inaugurando uma nova era na biologia experimental. Isso propiciou o estudo a fundo de inúmeros fatores específicos relativos aos processos fisiopatológicos, como, por exemplo, os que poderiam coordenar a relação fungo-hospedeiro na PCM.

Porém, em 1959, bem antes desse salto tecnológico, um importante experimento realizado por Mackinnon, em camundongos, levou a uma abordagem completamente nova no que diz respeito à patogênese da PCM humana (Mackinnon, 1959). Ele infectou camundongos da linhagem Swiss por sete diferentes vias, utilizando uma suspensão de Pb e os estudou durante até 160 dias após a infecção. Os animais infectados por instilação nasal sofreram disseminação hematogênica, incluindo linfonodos regionais. A via endovenosa produziu infecção com lesão pulmonar em todos os animais. O autor enfatizou os freqüentes achados de miosite nesse grupo e propôs que as lesões pulmonares teriam começado no endotélio capilar. Após inoculação intraperitoneal, a disseminação ocorreu somente em certos camundongos, dos quais todos desenvolveram lesões pulmonares. Quando a inoculação foi realizada por via lingual, subcutânea ou intestinal, não houve infecção. Esses resultados levaram Mackinnon à hipótese, amplamente aceita hoje, de que a PCM humana se inicia nos pulmões após a inalação do fungo e não através da pele ou das mucosas, e de que a disseminação se dá por vias hematogênica ou linfática. Lesões mucosas ou cutâneas seriam secundárias à miosite subjacente.

Depois do trabalho de Mackinnon, muitos investigadores utilizaram a via intratraqueal de infecção, mais próxima da via natural, para estudar a relação fungo-hospedeiro na micose. McEwen *et al.* (1987), também utilizando camundongos, observaram que as conídias de Pb eram altamente infectantes quando instiladas pela via intra-nasal, apoiando a hipótese de que essas partículas são o elemento infectante na natureza e adquiridas via inalação.

Porém, diversas outras vias “não-naturais” de infecção têm sido utilizadas na investigação experimental da doença e, entre elas, destaca-se a via intraperitoneal. Por esta via, Conant & Howell Jr (1942) obtiveram, pela primeira vez, infecção com disseminação em camundongos restrita aos órgãos do abdome. Apesar de não reproduzir o mecanismo natural de entrada do fungo no organismo, a via intraperitoneal ganhou grande aceitação devido ao fato de ser um procedimento simples, facilmente reprodutível e efetivo. Provavelmente, nenhum outro modelo murino produziu mais publicações que focassem nos vários aspectos da relação fungo-hospedeiro (Coelho *et al.*, 1994).

Estudos em animais demonstram que espécies diferentes exibem susceptibilidades distintas ao Pb. Em adição, a susceptibilidade parece variar dentro de uma mesma espécie de acordo com a idade, o sexo ou a linhagem, assim como com o inóculo, a virulência do isolado do fungo ou, até mesmo, com a rota de inoculação (Calich *et al.*, 1985; Singer-Vermes *et al.*, 1995; Arruda *et al.*, 2007).

Assim, por meio da via intraperitoneal de inoculação, Calich *et al.* (1985) analisaram a susceptibilidade de dez linhagens de camundongos à infecção e as separaram em linhagens sensíveis (B10.D2/oSn, B10.A, B10D2/nSn), intermediárias (BALB/c, C57BL/10, CBA, C3H/Fe), resistentes (C3H/HeJ) e extremamente resistentes (A/Sn, A/J, DBA/2).

A via intracraniana de inoculação nunca foi descrita entre as inúmeras rotas testadas (intra-traqueal, intraperitoneal, subcutânea, venosa, nasal, oral, gástrica, lingual, intramuscular, retal, intestinal) e não existe um modelo animal que permita o estudo específico da interação entre o Pb e o SNC. O

desenvolvimento de um modelo animal de NPCM pode ser útil para o estudo dos inúmeros fatores obscuros que cercam essa grave complicação da doença. Objetivando o estudo de outras micoses profundas com comprometimento encefálico, Blasi *et al.* (1992) desenvolveram um modelo de Criptococose cerebral inoculando suspensões de *Cryptococcus neoformans* em camundongos por via intracraniana. Desse mesmo modo, Chiller *et al.* (2002) estudaram um modelo de infecção cerebral por *Aspergillus fumigatus* e Capilla *et al.* (2004) criaram um modelo murino de Scedosporiose cerebral, por meio do inoculação intracraniana do fungo *Scedosporium apiospermum*.

## ***Objetivos***

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivos gerais**

Estudar as características clínicas de casos humanos de NPCM e desenvolver um modelo experimental em camundongos de NPCM.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- I. Realizar uma revisão narrativa e uma revisão sistemática da literatura sobre a NPCM.
- II. Descrever oito casos de NPCM atendidos no Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecto-Parasitárias (Anexo Orestes Diniz - CTR-DIP) do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais comparando-os com a casuística de pacientes com PCM sem comprometimento neurológico atendidos no ambulatório.
- III. Desenvolver um modelo experimental de NPCM em camundongo.

## ***Métodos***

## **4 MÉTODOS**

### **4.1 Estudo clínico**

#### **4.1.1 Revisão Sistemática da Literatura**

Foram utilizados os bancos de dados MEDLINE e LILACS para a realização de pesquisas iniciais a partir dos termos de busca *neuroparacoccidioidomycosis*, *central nervous system paracoccidioidomycosis*, *neurological paracoccidioidomycosis*. Em seguida, foram realizadas buscas de todas as referências bibliográficas dos estudos obtidos inicialmente na tentativa de conseguir o maior número de publicações disponíveis no assunto. As informações demográficas e clínicas dos relatos contidos em todos os trabalhos foram reunidas e sistematizadas em um banco de dados gerado no programa SPSS 12.0 a fim de viabilizar análise estatística.

#### **4.1.2 Pacientes**

De outubro de 1976 a agosto de 2008, foram atendidos 213 casos de PCM. No ambulatório, os atendimentos foram registrados em protocolo de pesquisa específico e os dados agrupados em um banco de dados gerado no programa SPSS 12.0 para análise estatística. Aproximadamente 95% desses pacientes tiveram o diagnóstico firmado com base em algum exame complementar (biópsia, ensaio imunológico, cultura, exame micológico a fresco ou esfregaço citológico) ou pela necropsia e os 5% restantes tiveram o diagnóstico realizado clinicamente.

Nove desses 213 casos apresentaram hipótese de comprometimento neurológico da PCM. Um caso, no entanto, foi excluído, pois não foi realizada propedêutica confirmatória de lesão no sistema nervoso central.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (ETIC 154/09).

## **4.2 Estudo Experimental**

### **4.2.1 Animais**

Foram utilizados, neste trabalho, camundongos selvagens C57BL/6 machos, com idade entre seis a oito semanas, obtidos do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO/UFMG). Todos os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura (24°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) com livre acesso à ração e à água.

Os métodos apresentados a seguir foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (118/2008).

### **4.2.2 Isolado fúngico**

A amostra do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, cepa Pb18, foi obtida junto ao Laboratório de Biologia de Microrganismos do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. O isolado altamente virulento Pb18 é mantido em meio sólido de YPD (“Yeast Peptone Dextrose”) na fase de levedura em estufa a 37°C e utilizado após um período de 5 a 7 dias de crescimento. O meio de

cultura YPD é composto de 1% extrato de levedura, 2% peptona de caseína, 2% de dextrose e 1,5% de ágar.

#### **4.2.3 Preparação do inóculo para infecção dos animais**

Após o período de crescimento de 5 a 7 dias, as células fúngicas foram transferidas para tubos plásticos (15 mL) contendo 5 mL de tampão fosfato PBS (1,15 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 8 g de NaCl; 0,2 g de KCl; 0,2 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e água destilada para 1.000 mL, pH 7,4) e centrifugadas a 8.000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante obtido foi descartado e o precipitado, ressuspenso em 3 mL de PBS. Em seguida, a suspensão obtida foi misturada continuamente durante 2 minutos em “vortex” para a separação dos grumos celulares. Após esse processo, a suspensão foi colocada para “descansar” durante 2 minutos, de forma que as partículas maiores sedimentaram-se por gravidade e a porção superior, contendo células isoladas, foi utilizada.

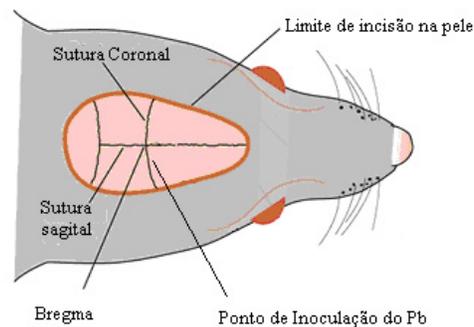
As concentrações celulares em suspensão foram estimadas em câmara de Neubauer. O volume foi ajustado para concentrações finais de  $1 \times 10^1$ ;  $1 \times 10^2$ ;  $1 \times 10^3$ ;  $1 \times 10^4$ ;  $1 \times 10^5$ ;  $1 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$  células por 10  $\mu\text{L}$  para a infecção dos animais.

#### **4.2.4 Infecção dos animais**

Para a padronização da dose do inóculo, camundongos foram anestesiados por via intraperitoneal com uma solução de xilazina (10 mg/kg, Rompun, Bayer) e ketamina (150 mg/Kg, Laboratório Cristália, SP). Os animais foram divididos em sete grupos e foram infectados, por via intracraniana, com as seguintes concentrações de inóculos:  $1 \times 10^1$ ;  $1 \times 10^2$ ;  $1 \times 10^3$ ;  $1 \times 10^4$ ;  $1 \times 10^5$ ;

$1 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$  células fúngicas por 10  $\mu\text{L}$ . Utilizando-se seringas para insulina BD (0,3 mm: 0,8mm), foram injetados 10  $\mu\text{L}$  de suspensão de células leveduriformes por animal, 1 a 2 mm à direita do bregma, a 3 a 5 mm de profundidade. A padronização do inóculo foi obtida a partir do cálculo da dose letal para 50% dos animais ( $\text{LD}_{50}$ ) realizada pelo método de Reed-Muench (Reed & Muench, 1938).

**Figura 2:** Esquema representativo do local de inoculação no crânio dos camundongos.



#### 4.2.5 Peso e consumo alimentar

Os animais de todos os grupos foram pesados diariamente durante os 60 dias de experimento para quantificação da massa corporal.

Para a quantificação do consumo alimentar dos animais, foi realizado controle da oferta de ração, pesada em balança, a cada 6 dias durante os 60 dias de experimento, de modo que o consumo era definido pela subtração, a partir do total de ração oferecida na bandeja de alimentação de cada gaiola, da massa de ração restante na bandeja de alimentação de cada gaiola após 6 dias e da massa de ração recuperada do fundo de cada gaiola após o mesmo período.

#### **4.2.6 Processamento das amostras cerebrais de camundongo**

Retirou-se um dos hemisférios dos cérebros de animais infectados e controles. Esses hemisférios foram, então, devidamente acondicionados e estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, as amostras foram pesadas (100 mg) e colocadas em 1,0 mL de solução inibidora de proteases para extração de citocinas (NaCl 0,4 M; Fluoreto de Fenilmetilsufonila 0,1 mM; Cloreto de Benzetônio 0,1 mM; EDTA 10 mM; Tween 20 0,05%; Albumina de Soro Bovino - BSA - 0,5%; 20 UI de Aprotinina), preparada a partir de uma solução de tampão fosfato (8 g de NaCl; 0,2 g de KCl; 2,89 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  diluídos em 1 L) para preparação do homogenato. Os tecidos foram macerados em homogeneizador próprio (Power Gen 125, Fisher Scientific Pennsylvania, EUA) a uma velocidade ótima e a solução resultante foi centrifugada a 10.000 rpm, a  $4^{\circ}\text{C}$ , por 10 minutos (Centrífuga BR4, Jouan, Winchester, VA, EUA). O sobrenadante foi recolhido, aliquotado e estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até sua utilização para detecção de citocinas e quimiocinas teciduais pelo método ELISA. O sedimento remanescente após o processamento das amostras para esses ensaios foi utilizado para a detecção das atividades de N-acetilglicosaminidase (NAG) e mieloperoxidase (MPO) teciduais. Dessa forma, o sedimento foi ressuspenso em 1,9 mL de tampão fosfato - Buffer 1 - (NaCl 0,1 M;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,02 M; NaEDTA 0,015 M; pH 4,7), homogeneizado por 1 minuto e centrifugado a 10.000 rpm, a  $4^{\circ}\text{C}$ , por 10 minutos. Após essa etapa, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi submetido a lise hipotônica através da adição de 1,5 mL de solução de NaCl 0,2%, seguida, após 30 segundos, de adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5%. O conteúdo foi, então, homogeneizado e o volume total (3,0 mL) foi dividido em dois tubos (1,5

mL para cada tubo) para determinação das atividades de NAG e de MPO. Essas amostras foram centrifugadas a uma velocidade de 10.000 rpm, a 4°C, por 10 minutos, e o sobrenadante foi, posteriormente, descartado. Para o ensaio de NAG, as amostras foram ressuspensas e homogeneizadas em 0,8 mL de solução salina 0,9% com 0,1% v/v de Triton X-100, centrifugadas a 3.000 rpm, a 4°C, por 15 minutos, e o ensaio foi feito com o sobrenadante obtido. Já para o ensaio de MPO, as amostras foram ressuspensas em 0,8 mL de tampão fosfato ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$  0,05 M; Brometo de Hexadeciltrimetilamônio - HTAB - 0,5%; pH 5,4), homogeneizadas e submetidas a três ciclos de congelamento/descongelamento utilizando-se nitrogênio líquido. Essas amostras foram, então, centrifugadas a 10.000 rpm, a 4°C, por 15 minutos e o sobrenadante utilizado para o ensaio.

#### **4.2.7 Determinação de citocinas e quimiocinas por ELISA**

Os kits para ELISA de citocinas e quimiocinas murinas foram obtidos da R&D Systems (DuoSet) e utilizados de acordo com os procedimentos previamente descritos pelo fabricante. Todos os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

As concentrações de citocinas e quimiocinas foram avaliadas em sobrenadante de homogenato de 100 mg de tecido cerebral, em diluição 1:3, em tampão fosfato:albumina bovina (PBS:BSA 0,1%). Para isso, em uma placa de 96 poços, foram adicionados 100 µl de uma solução contendo uma concentração adequada do anticorpo captura-específico diluído em PBS, pH 7,4, que permaneceu em contato com a placa durante 18 horas, a 4°C.

Posteriormente, a placa foi lavada por 5 vezes com solução PBS/Tween 0,1% em um lavador de placas automático. Logo após, foram adicionados 200 µl de solução de bloqueio PBS:BSA 1%. O tempo de bloqueio foi de 2 horas. Foram adicionadas, então, as soluções-padrão de citocinas/quimiocinas em concentrações conhecidas e, também, as amostras. As placas foram incubadas por mais 18 horas, a 4°C. Foram adicionados, então, 100 µl de uma solução de anticorpo de detecção, e a placa permaneceu em incubação por 1 hora. Transcorrido esse período e após lavagem, foi adicionada à placa uma solução contendo estreptavidina ligada à peroxidase (1:4000). Após 30 minutos, a placa foi novamente lavada e, por fim, foi adicionado o tampão substrato contendo o-fenilenodiamina (OPD, Sigma) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck). A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1 M. O produto de oxidação do OPD foi detectado por colorimetria em um leitor de placas de ELISA (Molecular Devices, Spectra Mac 190) com filtro para o comprimento de onda de 492 nm.

#### **4.2.8 Ensaio para detecção dos níveis de atividade de N-acetilglicosaminidase (NAG) tecidual**

A quantificação do acúmulo de macrófagos nos tecidos foi obtida pelos ensaios de atividade de NAG como descrito anteriormente (Barcelos *et al.*, 2005).

Para isso, foram adicionados 100 µL de sobrenadante das amostras previamente processadas e 100 µL de uma solução de p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminidina (Sigma), diluída em tampão citrato/fosfato (ácido cítrico 0,1 M; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M; pH 4,5) na concentração final de 2,24 mM, a uma placa de 96 poços, que foi, então, incubada a 37°C, por 10 minutos. Ao final dessa etapa,

adicionaram-se 100 µL de tampão glicina 0,2 M (pH 10,6) para interromper a reação. As placas de 96 poços foram lidas em leitor ELISA (Molecular Devices, Spectra Mac 190) a 405 nm. O conteúdo de macrófagos foi calculado com base na curva-padrão de NAG, feita pela coleta de macrófagos peritoneais recolhidos de animais estimulados com 3 mL de tioglicolato 3% (dados não mostrados).

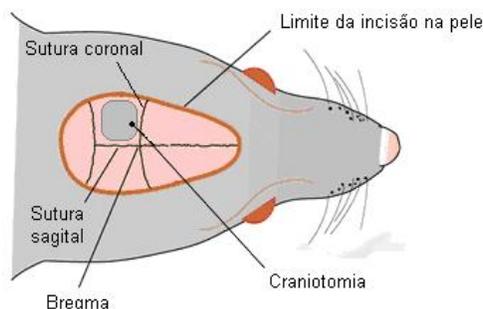
#### **4.2.9 Ensaio para detecção dos níveis de Mieloperoxidase (MPO) tecidual**

A quantificação do acúmulo de neutrófilos nos tecidos foi obtida pelos ensaios de atividade de MPO como descrito anteriormente (Souza *et al.*, 2002). Para isso, foram adicionados 25 µL de sobrenadante das amostras de tecidos previamente processadas e 25 µL de uma solução de 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, Sigma) dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck), com concentração final de 1,6 mM, a uma placa de 96 poços, que foi, então, incubada a 37°C, por 5 minutos. Após esta etapa, adicionaram-se 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluída em tampão fosfato (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 M; HTAB 0,5%; pH 5,4) numa concentração final de 0,003% v/v, e a placa foi novamente incubada a 37°C por 5 minutos. Ao final dessa etapa, adicionaram-se 100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 M para interromper a reação. As placas foram lidas em leitor de ELISA (Molecular Devices, Spectra Mac 190) a 450 nm. O conteúdo de neutrófilos foi calculado com base na curva-padrão de MPO feita pela coleta de neutrófilos peritoneais recolhidos de animais estimulados com 3 mL de caseína 5% (dados não mostrados).

#### 4.2.10 Microscopia intravital em cérebro de camundongo

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com uma solução de xilazina (10 mg/kg, Rompun, Bayer) e ketamina (150 mg/Kg, Laboratório Cristália, SP). Uma veia da cauda foi canulada para administração do corante rodamina 6G (0.3 mg/kg. Sigma). A rodamina é um corante de células que se acumula nas mitocôndrias e possibilita a visualização do leucócito mesmo na presença de uma alta velocidade de fluxo sanguíneo. A temperatura corporal dos animais foi mantida a 37° C com o auxílio de uma manta térmica (Fine Science Tools, FST, Canadá) colocada em contato com o corpo do animal. A craniotomia foi realizada na região parietal, utilizando-se uma broca de ponta fina (Micromotor LB100, Beltec, Araraquara, SP). A dura-máter e a aracnóide foram removidas, sendo formada uma janela para visualização dos vasos sanguíneos da pia-máter. Esse procedimento não rompe a barreira vascular da microvasculatura cerebral. A superfície do cérebro foi continuamente superfundida com uma solução de fluido cerebrospinal artificial composta por (em mmol/L) NaCl: 132; KCl: 1,95; CaCl<sub>2</sub>: 1,71; MgCl<sub>2</sub>: 0,64; NaHCO<sub>3</sub>: 24,6; dextrose: 3,71; e uréia: 6,7 à temperatura de 37°C e pH 7,35, que manteve a preparação estável.

**Figura 3:** Esquema representativo do local onde foi realizada a janela no crânio dos camundongos, permitindo assim visualização dos vasos da pia-máter.



Um microscópio Nikon 50i, com objetiva de 10X, foi utilizado para observar os eventos microcirculatórios nos vasos cerebrais. Após a localização dos vasos a serem estudados, injetou-se pequena quantidade (0,5 mg/kg) do corante rodamina 6G por via endovenosa. A fluorescência associada à rodamina foi visualizada com epi-iluminação a 510-560 nm usando um filtro de emissão de 590 nm. Uma câmera de vídeo digital acoplada ao microscópio e a um computador capturou as imagens que foram processadas pelo software NIS-Elements D3.00 (Laboratory Imaging, Nikon) para posterior análise do número de leucócitos em rolamento e adesão.

O rolamento de leucócitos foi definido como “células se movendo a uma velocidade menor que a do fluxo sanguíneo”. Considerou-se “leucócito rolando” todos aqueles que passaram por uma linha imaginária transversal ao vaso durante 30 segundos. Leucócitos foram considerados “aderidos ao endotélio” quando permaneceram estacionados por um período de 30 segundos em um fragmento de vaso de aproximadamente 100 µm. Os dois parâmetros foram mensurados em três vasos diferentes para cada janela de observação e foi feita uma média para cada animal. Rolamento e adesão leucocitários foram expressos como número de células/minuto e células/100 µm, respectivamente (Vilela *et al.*, 2008, 2009).

#### **4.2.11 Método histológico**

Para analisar as alterações provocadas pela infecção do Pb no SNC foram realizados cortes histológicos nos cérebros dos animais. Após a realização da microscopia intravital, os camundongos foram sacrificados e o hemisfério direito dos cérebros foram coletados e incluídos em uma solução de

formalina 10% tamponada. A solução de formol permitiu a preservação da morfologia e composição tecidual. Todos os fragmentos foram submetidos à desidratação, com a finalidade de remover a água presente nos mesmos. O processo de desidratação foi realizado em concentrações crescentes de álcool (álcoois 70%, 80%, 95% e absolutos I, II e III), sendo que os fragmentos permaneceram imersos por um período de 30 minutos em cada álcool. Após a etapa de desidratação, foi realizado o processo de diafanização, que tem como objetivo tornar o tecido translúcido. A diafanização consistiu em submeter os fragmentos a dois banhos de xilol com duração de 20 minutos cada. Posteriormente, os tecidos foram impregnados em Paraplast® em dois banhos de 30 minutos e, finalmente, incluídos em blocos de Paraplast®.

Os blocos de Paraplast®, contendo os fragmentos do cérebro, foram submetidos à microtomia, sendo obtidos cortes seriados com 4 µm de espessura. Cada corte foi colocado em banho-maria a 40-45°C para que as fitas fossem esticadas e logo depois as lâminas foram colocadas em estufa para secarem a temperatura de 60°C.

A coloração de rotina com Hematoxilina de Harris e Eosina (HE) foi realizada nas lâminas com cortes do tecido cerebral para uma observação geral das alterações histopatológicas.

O processo de coloração se iniciou com a imersão das lâminas em dois banhos de xilol, de duração de 15 minutos cada, para desparafinização. Em seguida, para hidratação, essas lâminas foram imersas em banhos de álcoois absoluto, 90%, 80%, 70%, e água, durando, cada um dos banhos, 5 minutos. Após a hidratação, as lâminas foram imersas no corante Hematoxilina de Harris (corante ácido) por 20 segundos, em seguida lavadas em água corrente por 5

minutos. A seguir foi feita a diferenciação com a passagem rápida das lâminas em álcool-acidulado. Novamente as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos. Finalizada esta etapa, as lâminas foram imersas no corante Eosina (corante básico), por 30 segundos, e em seguida lavadas em água corrente rapidamente, submetendo-se a nova desidratação por rápidas imersões em álcoois 70%, 80%, 95% e absolutos I, II e III. Em seguida, as lâminas foram imersas em três banhos seqüenciais de xilol para diafanização e montadas com Entellan (Merck) e lamínula.

A coloração de Grocott também foi realizada nas lâminas com cortes do tecido cerebral para observação das estruturas fúngicas.

O processo de coloração se iniciou com a desparafinização das lâminas de modo semelhante ao método de HE. Em seguida, as lâminas foram hidratadas em água corrente por 2 minutos. Estas foram então imersas em Ácido Crômico 4% e incubadas em estufa por 15 minutos. A seguir, as lâminas foram lavadas em água corrente para se retirar o excesso de solução e foi gotejada solução de Bissulfito de Sódio 1% sobre as mesmas, ficando em repouso por 1 minuto. O conteúdo sobre as lâminas foi desprezado e elas foram novamente lavadas em água corrente. As lâminas foram, então, imersas em “solução de uso” (6,4 mL de solução de Prata Metanamina, 6,4 mL de água destilada, 0,5 mL de Bórax 5%) aquecidas e incubadas em estufa por 15 minutos. Depois disso, as lâminas foram retiradas da “solução de uso”, lavadas em água corrente e gotejadas com Cloreto de Ouro 0,2%, ficando em repouso até o clareamento dos cortes. O conteúdo sobre as lâminas foi novamente desprezado e elas foram lavadas em água corrente. A seguir, foi gotejada sobre as lâminas solução de Hipossulfito de Sódio 5% e elas permaneceram

em repouso por 1 minuto. O conteúdo sobre as lâminas foi desprezado, elas foram lavadas em água corrente e imersas em solução Verde Luz 1% por 30 segundos. As lâminas foram então lavadas em água corrente, removendo-se o excesso do corante, desidratadas, diafanizadas e montadas, assim como no método de HE.

As lâminas coradas foram avaliadas em microscópio óptico utilizando-se objetivas de 4, 10, 40 e 100X.

#### **4.2.12 SHIRPA**

Para avaliação da morbidade foi utilizado o protocolo SHIRPA (sigla que significa **S**mithKline Beecham Pharmaceuticals; **H**arwell MRC Mouse Genome Centre and Mammalian Genetics Unit Imperial College School of Medicine at St Mary's Royal London Hospital; **S**t Bartholomew's; **R**oyal London School of Medicine; **P**henotype **A**ssessment) (Rogers *et al.*, 1997, 2001). O protocolo foi aplicado diariamente em todos os animais do segundo dia pré-infecção até o fim da primeira semana pós-infecção. A partir daí, foi aplicado com intervalos de dois a três dias até o sexagésimo dia pós-infecção. O teste se inicia com a pesagem do animal. A seguir, ele é colocado em uma jarra de observação por 5 minutos e avaliam-se posição corporal, atividade espontânea, taxa de respiração, presença de tremor, defecação (número de bolos fecais), micção, número de “*headings*” (apoio apenas sobre as patas traseiras) e “*groomings*” (o “limpar”, movimentos dirigidos à cabeça ou ao corpo, efetuados com as patas dianteiras). A seguir, o animal é solto em uma arena (ou “*open-field*”) e são observados excitação de transferência, atividade locomotora (número de entradas em quadrados demarcados na arena em 30 segundos), fechamento

de pálpebras, piloereção, ambulação, elevação pélvica, elevação da cauda, escape ao toque e passividade posicional. O animal é então suspenso pela cauda e avaliado sobre uma grade colocada em cima da arena quanto à presença de encurvamento de tronco, ação de segurar as patas traseiras, posicionamento visual, força ao agarrar, tônus corporal, *pinna reflex*, reflexo corneal, beliscada nos dedos da pata traseira e manobra do arame. A seguir, o animal sofre uma restrição supina na mão do examinador e é medido o comprimento corporal. São, então, avaliados cor da pele, frequência cardíaca, tônus dos membros, tônus abdominal, lacrimejação, salivação, mordida provocada, reflexo postural, *geotaxis* negativo, medo, irritabilidade, agressão e vocalização. Comportamentos bizarros e convulsões são também anotados.

#### **4.3 Análise estatística**

Para a comparação das variáveis contínuas observadas na revisão sistemática da literatura, foi utilizado o teste t para amostras independentes. Para a comparação das variáveis categóricas entre pacientes com PCM sem comprometimento neurológico e pacientes com NPCM, foi utilizado o teste exato de Fisher. A significância estatística foi estabelecida em  $p < 0,05$ .

Os dados da análise experimental foram apresentados com média  $\pm$  desvio-padrão (DP). Foi utilizado o teste estatístico Kaplan-Meier para as curvas de sobrevida. Para a análise das curvas obtidas pelo protocolo SHIRPA, foi utilizado o teste de Wilcoxon. Para análise das dosagens de citocinas e quimiocinas, bem como das atividades de NAG e MPO, os testes t de Student e ANOVA, com pós-teste de Tukey, foram utilizados. A significância estatística foi estabelecida em  $p < 0,05$ .

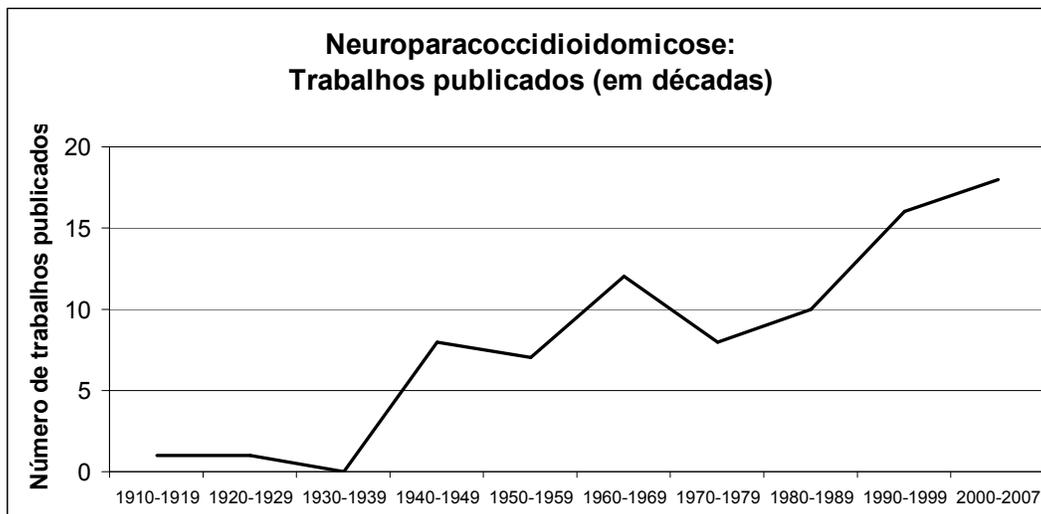
## ***Resultados***

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Revisão sistemática da literatura

Foram encontrados 81 trabalhos publicados no período compreendido entre os anos de 1919 e 2007, os quais relatavam 266 casos. Após cuidadosa análise de todos os casos, foram identificados nove pacientes cujos relatos apareciam em mais de um trabalho, de modo que foram analisadas as histórias de 257 pacientes com NPCM. A natureza dos trabalhos variou desde relatos de casos únicos até séries de casos. Dentre estes, o estudo que concentrou a maior casuística foi o de Almeida *et al.* (2004), em que foram analisados aspectos clínicos e laboratoriais de 24 pacientes com NPCM. A distribuição dos trabalhos ao longo do tempo é representada no **Gráfico 1**.

**Gráfico 1: Distribuição das publicações sobre Neuroparacoccidioidomicose ao longo das décadas desde sua primeira descrição.**



A distribuição entre os sexos foi notadamente desigual ( $p=0,005$ ; teste t para amostras independentes), com aproximadamente 93% dos pacientes pertencentes ao sexo masculino. A idade média foi de aproximadamente 43 anos ( $\pm 9,57$ ), variando de 12 a 66 anos. A média de idade foi diferente de acordo com o gênero, sendo de aproximadamente 44 anos entre os pacientes

do sexo masculino e de 34 anos entre as mulheres ( $p=0,021$ ; teste t para amostras independentes). Com relação à distribuição dos pacientes de acordo com a atividade profissional, 56% deles eram lavradores, 12% eram motoristas, 4% trabalhavam na construção civil, 2% exerciam atividades de faxineiro e 26% possuíam alguma outra ocupação.

A **Tabela 4** apresenta a frequência de observação dos principais sinais e sintomas apresentados pelos pacientes durante o curso da doença, destacando-se os sinais motores e os de hipertensão intracraniana.

**Tabela 4: Principais sinais e sintomas neurológicos observados em 257 pacientes com Neuroparacoccidioidomiose.**

<b>Neuroparacoccidioidomiose: sinais e sintomas (%)</b>	
Sinais e sintomas motores	49,8
Sinais e sintomas sugestivos de hipertensão intracraniana	48,9
Crises epilépticas	24,9
Sinais e sintomas cerebelares	22,2
Sinais e sintomas cognitivos	21,3
Sintomas sensitivos	18,1
Sinais meníngeos	8,6
Sinais e sintomas medulares	8,1

O tempo médio de evolução da doença, definido como o período de tempo entre o início do quadro neurológico e a procura por atendimento médico, foi de 4,9 meses variando de poucos dias a até 18 meses.

Aproximadamente 98,3% dos pacientes apresentavam a forma crônica da PCM, enquanto 1,7% apresentavam a forma aguda. A forma pseudotumoral da NPCM foi observada em 89,4% dos casos, ao passo que 10,6% exibiam a forma meningoencefálica.

A **Tabela 5** apresenta a frequência de observação de lesões paracoccidioidomiosíticas em sítios anatômicos do SNC. Esses valores representam a distribuição anatômica das lesões possível de ser definida com

base nos relatos da literatura. Entretanto, a especificidade da localização das mesmas é bastante variável nos diferentes trabalhos. Assim, o esforço de se determinar com maior acurácia os sítios exatos de localização das lesões foi limitado pela disponibilidade de informações nos relatos. Desse modo, o somatório das lesões encontradas em níveis mais específicos (e.g., lobo parietal) pode não corresponder ao total de lesões observadas no compartimento anatômico mais geral (e.g., compartimento supratentorial). Do mesmo modo, o somatório de lesões observadas nos compartimentos mais gerais pode exceder 100% pelo fato de haver concomitância de lesões nesses sítios em alguns casos. Apesar dessas limitações, essas informações exibem um panorama da distribuição de lesões no SNC e observou-se que as lesões nos hemisférios cerebrais, sobretudo lobos frontal e parietal, e no cerebelo foram as mais freqüentes.

**Tabela 5: Principais regiões no sistema nervoso central de localização de lesões em 257 pacientes com Neuroparacoccidioidomicose.**

<b>Neuroparacoccidioidomicose: distribuição das lesões (% do total de pacientes)</b>		
<b>Supratentorial:  66,8</b>	<b>Hemisférios cerebrais:  47,6</b>	<b>Frontal: 13,1</b>
		<b>Parietal: 17,0</b>
		<b>Temporal: 7,9</b>
		<b>Occipital: 8,7</b>
	<b>Núcleos da base: 3,5</b>	
<b>Tálamo: 6,6</b>		
<b>Infratentorial:  42,4</b>	<b>Cerebelo: 28,8</b>	
	<b>Tronco:  14,4</b>	<b>Mesencéfalo: 3,5</b>
		<b>Ponte: 3,5</b>
		<b>Bulbo: 2,2</b>
<b>Medular: 9,2 (Cervical: 2,6, Torácica: 4,8, Lombar: 0, Sacral: 0)</b>		
<b>Ventrículos: 2,2</b>		

O diagnóstico foi estabelecido através da biópsia em 57,2% dos casos; por métodos sorológicos em 25,7% deles; por cultura em 23,3%. O estudo do líquido contribuiu para definição do diagnóstico em 16,3% dos casos, sendo

16,3% dos casos com a utilização de métodos imunológicos, 1,9% por meio da microscopia direta e 1,2% pela cultura. Aproximadamente 53,7% dos pacientes realizaram exames tomográficos do encéfalo e 10,9%, ressonância magnética. Cerca de 71,2% dos pacientes com NPCM apresentaram alterações à radiografia torácica.

A **Tabela 6** apresenta a distribuição do acometimento simultâneo de sítios externos ao SNC observada entre os pacientes com NPCM, sendo o pulmão o órgão mais afetado.

**Tabela 6: Frequência de comprometimento de outros órgãos em 257 pacientes com Neuroparacoccidioimicose.**

<b>Neuroparacoccidioimicose: associação com PCM em outros sítios (%)</b>	
Pulmões	59,1
Mucosas	27,2
Pele	16,3
Linfonodos	15,9
Adrenais	10,9
Ossos	0,39

A **Tabela 7** mostra a frequência de utilização dos diferentes esquemas terapêuticos para a NPCM observada entre os casos. O tempo médio de tratamento descrito foi de 8,2 meses, variando desde a completa falta de tratamento até 30,9 meses de terapia. Assim como na **Tabela 5**, o somatório total dos diferentes tratamentos excede 100% pelo freqüente emprego de mais de um único esquema terapêutico no tratamento dos pacientes com NPCM.

**Tabela 7: Esquemas terapêuticos empregados no tratamento de 257 pacientes com Neuroparacoccidioidomicose.**

<b>Neuroparacoccidioidomicose: distribuição de freqüência da utilização de cada tipo de tratamento (%)</b>	
Anfotericina B	31,3
Antimicrobiano sulfamídico (incluindo SMT-TMP)	57,5
Sulfametoxazol-Trimetoprim (SMT-TMP)	36,3
Derivado azólico	7,8
Cetoconazol	3,3
Itraconazol	3,9
Fluconazol	3,3
Outro azólico	0,0
Tratamento cirúrgico	38,5

Aproximadamente 55,9% dos pacientes evoluíram com melhora do quadro, enquanto 44,1% deles faleceram. Entre os pacientes que obtiveram melhora, 50,1% permaneceram com algum tipo de seqüela (**Tabela 8**).

**Tabela 8: Seqüelas observadas entre 257 pacientes com Neuroparacoccidioidomicose.**

<b>Neuroparacoccidioidomicose: Distribuição de freqüência do tipo de seqüela (%)</b>	
Seqüelas motoras	29,8
Seqüelas sensitivas	8,3
Crises epilépticas	4,8
Seqüelas medulares	4,8
Seqüelas cognitivas	2,4

Finalmente, com relação ao acompanhamento tomográfico dos pacientes, naqueles casos em que este ocorreu, observou-se melhora radiológica total em 22,0% dos casos, melhora moderada em 72,0% deles, melhora leve em 2,0% e não foram observadas alterações das lesões em 4,0% dos casos.

## **5.2 Análise da casuística do CTR-DIP do Hospital das Clínicas da UFMG**

De 213 pacientes acompanhados no Ambulatório do CTR-DIP do Hospital das Clínicas da UFMG, oito apresentaram NPCM. Observou-se, portanto, uma prevalência de aproximadamente 4,0% de acometimento do SNC na população observada. Sete pacientes (87,5%) eram do sexo masculino, com idade média de 42 anos, variando de 24 a 61 anos. Sete deles apresentaram a forma crônica da PCM e um, a forma subaguda. Todos os pacientes manifestaram a forma pseudotumoral da NPCM.

Quatro pacientes apresentavam história de trabalho como lavradores, dois relatavam trabalho como pedreiros, uma paciente dizia-se do lar e não havia registro sobre a ocupação em um caso.

Seis pacientes possuíam história prévia de PCM não neurológica e, em dois casos, o primeiro diagnóstico de PCM se deu juntamente ao quadro neurológico. Em nenhum dos casos a doença se limitou ao comprometimento do SNC, sendo a pele o sítio mais acometido (62,5%), seguido pelos pulmões e linfonodos (37,5%) e pelas mucosas (25,0%). O acometimento laríngeo e adrenal também foi observado. A **Tabela 9** reúne as informações clínicas sobre os casos individualmente.

O quadro clínico apresentado pelos pacientes caracterizou-se principalmente por sinais de hipertensão intracraniana (62,5% dos casos), com a cefaléia sendo a queixa mais freqüente. Déficits motores foram observados em 44,4% dos casos; 33,3% dos pacientes apresentaram crises epilépticas, 33,3% deles exibiram déficits sensitivos e 33,3% dos casos apresentaram déficits cognitivos.

O tempo médio de evolução do quadro neurológico, definido como início dos sintomas até a busca por atendimento médico, foi de 3,8 meses, variando de uma semana a um ano.

Todos os pacientes foram submetidos a tomografia computadorizada do encéfalo e, com relação à localização anatômica das lesões, 75% delas eram supratentoriais, enquanto 50% eram infratentoriais. Essa soma excede 100% pela concomitância de lesões supratentoriais e infratentorias em 25% dos casos. No compartimento supratentorial, os lobos frontais foram os mais acometidos, abrigando 37,5% das lesões, seguidos pelos lobos temporais e parietais (25,0% cada um) e lobos occipitais, núcleos da base e tálamo (12,5% cada um). Já no compartimento infratentorial, observaram-se lesões somente no cerebelo.

Todos os pacientes foram tratados com mais de uma droga, sendo a combinação de anfotericina B com alguma sulfa, especialmente a associação sulfametoxazol-trimetoprim, a mais utilizada (n=6). Os agentes azólicos também foram bastante usados, e, entre eles, destaca-se o cetoconazol (n=4). O tempo médio de tratamento observado foi de 4,5 anos e não houve mortes. Procedimentos neurocirúrgicos (craniotomia com drenagem de abscesso) foram realizados em três casos.

**Tabela 9: Aspectos clínicos e demográficos exibidos por oito pacientes com Neuroparacoccidioomicose atendidos no Centro de Referência em Doenças Infecto-Parasitárias Orestes Diniz do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, entre 1976 e 2008.**

Sujeito	Sexo	Idade (anos)	Ocupação	Quadro clínico	História prévia de PCM	Tempo de evolução	Diagnóstico	Lesões	Outros sítios	Forma	Tratamento realizado	Tempo de Tratamento	Sequelas
1	F	61	Do lar	Dor e parestesia em MID	PCM pulmonar, linfonda, hepática e cutânea 10 anos antes	5 meses	Biópsia TC	Cerebelo	Pele Linfonodos	Crônica Pseudotumoral	Anfotericina B SMT-TMP Cetoconazol	3 meses	Sensitiva
2	M	40	Sem informação	Hipo/disestesia em dimídio E Paralisia facial E Hemiparesia E Dificuldade de fala Dismetria Crises epilépticas	Sem história prévia	5 meses	Escarro TC	Lobo Frontal Lobo Occipital Núcleos da Base Tálamo	Pulmões Linfonodos	Crônica Pseudotumoral	Anfotericina B SMT-TMP Cetoconazol	6 anos	Motora, sensitiva e crises epilépticas
3	M	24	Lavrador	Paraplegia Paresia III D Paresia facial D Incontinência esfinteriana Tonteira Cefaléia Crises epilépticas Níveis sensitivos em T7(D) e T9(E)	PCM linfonodal 9 anos antes	15 dias	TC	Várias lesões cerebrais Cerebelo	Pele Mucosa Linfonodos	Sub-aguda Pseudotumoral	Anfotericina B SMT-TMP	4 anos	Sem sequelas
4	M	30	Lavrador	Cefaléia frontal bilateral Papiledema Confusão mental Zumbidos	PCM linfonodal, cutânea, mucosa e pulmonar 7 anos antes	20 dias	TC	Lobo Frontal Lobo Temporal	Pele	Crônica Pseudotumoral	Anfotericina B Sulfadiazina	4 anos	Sem sequelas

Sujeito	Sexo	Idade (anos)	Ocupação	Quadro clínico	História prévia de PCM	Tempo de evolução	Diagnóstico	Lesões	Outros sítios	Forma	Tratamento realizado	Tempo de Tratamento	Sequelas
5	M	46	Lavrador	Cefaléia holocraniana Hemiparesia D Confusão mental Tonteira Diminuição da acuidade visual Diminuição do paladar	Sem história prévia	1 ano	Biópsia TC	Lobo Parietal	Pele	Crônica Pseudotumoral	Amfotericina B Sulfadiazina Cetoconazol Fluconazol Cirúrgico	6 anos e 5 meses	Motora e sensitiva
6	M	51	Lavrador	Cefaléia intensa Vômitos Febre Astenia Sudorese Tonteira	PCM cutânea 4 meses antes	Poucos dias	Biópsia TC	Lobo Parietal Cerebelo	Pulmões Pele	Crônica Pseudotumoral	Amfotericina B SMT-TMP Cirúrgico	7 anos	Sem sequelas
7	M	44	Pedreiro	Crises epilépticas Paresia MSE Paralisia facial E Confusão mental Alteração de fala	PCM linfonodal e pulmonar 8 meses antes	1 semana	Biópsia TC	Lobo Frontal Lobo Temporal	Pulmões Adrenal	Crônica Pseudotumoral	Amfotericina B SMT-TMP Cetoconazol Cirúrgico	8 anos	Crises epilépticas
8	M	40	Pedreiro	Cefaléia e vertigem	PCM laringea e mucosa 6 anos antes	-	Biópsia TC	Cerebelo	Laringe, Mucosa oral	Crônica Pseudotumoral	SMT-TMP Itraconazol	6 meses	Distúrbio de marcha

MID: membro inferior direito, MSE: membro superior esquerdo, E: esquerdo, D: direito, TC: tomografia computadorizada, SMT-TMP: sulfametoxazol-trimetoprim

Aproximadamente 63% dos pacientes evoluíram com alguma seqüela após a melhora, de modo que 60% dos casos permaneceram com déficits sensitivos, 40% com déficits motores ou crises epilépticas e 20% permaneceram com distúrbios de marcha.

Após a caracterização dos casos, as informações relativas aos pacientes com NPCM foram comparadas com as informações dos demais pacientes com PCM sem comprometimento neurológico (**Tabelas 10 e 11**).

Na **Tabela 10**, comparam-se os perfis demográficos das duas populações. Não houve diferença estatística com relação à distribuição de gêneros e de idade. Houve 42 casos de PCM naturais das macrorregiões do estado de Minas Gerais onde nasceram pacientes que vieram a desenvolver a forma neurológica da doença. Essa distribuição foi estatisticamente desigual com relação aos casos naturais da macrorregião norte/nordeste (os casos de NPCM representaram 60% dos casos da região,  $p < 0,001$ , teste exato de Fisher) e com relação aos casos provenientes de outros estados do país (Bahia, Espírito Santo e Pernambuco;  $p = 0,042$ , teste exato de Fisher). Não houve diferença significativa com relação à região dos vales do Jequitinhonha/Mucuri.

No que diz respeito à ocupação dos pacientes, não foi observada diferença estatística entre os grupos. No entanto, observou-se diferença com relação ao grau de escolaridade dos pacientes, como se observa na **Tabela 10**.

**Tabela 10: Comparação de aspectos demográficos entre pacientes com Neuroparacoccidioidomicose (NPCM) e Paracoccidioidomicose (PCM) atendidos no Centro de Referência em Doenças Infecto-Parasitárias Orestes Diniz do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, entre 1976 e 2008.**

	<b>NPCM</b>	<b>PCM</b>	<b>Valor-p</b>
<b>Número de pacientes</b>	8	205	-
<b>Sexo (%)</b>			
Masculino	87,5	80,7	>0,05
Feminino	12,5	19,3	>0,05
<b>Idade (anos)</b>	43,25 (+13,67)	35,70 (+18,10)	>0,05
<b>Naturalidade (%)</b> (por macrorregião de MG)			
Central	-	27,3	
Vale do Rio Doce	-	18,2	
Zona da Mata	-	14,3	
Jequitinhonha/Mucuri	14,3	9,7	>0,05
Centro-Oeste	-	9,7	
Sul/Sudoeste	-	6,5	
Norte/Nordeste	42,9	1,3	<0,001
Triângulo/Alto Paranaíba	-	1,3	
Outros Estados	42,9	11,7	0,042
<b>Profissão (%)</b>			
Lavrador	25,0	43,4	>0,05
Construção civil	-	7,2	
Do lar	12,5	4,6	
Doméstica	-	5,3	
Estudante	-	7,2	
Outros	62,5	32,3	
<b>Escolaridade (%)</b>			
Analfabeto	16,7	22,6	<0,001
Alfabetizado	-	11,3	
Primário	16,7	51,9	
1º grau completo	66,7	4,7	
2º grau completo	-	9,4	

Na **Tabela 11**, comparam-se aspectos clínicos dos dois grupos. O tempo médio de evolução da doença foi de 11,14 meses entre os pacientes com a forma neurológica e de 13,83 meses entre os pacientes sem a forma neurológica, sem diferença estatística entre os grupos. Não houve diferença, também, com relação à forma de diagnóstico.

Foram registrados, no protocolo de atendimento, diversos sinais e sintomas clínicos exibidos pelos pacientes ao primeiro atendimento. O acometimento do SNC não gerou diferenças no que diz respeito à presença de sintomas e sinais gerais como emagrecimento, astenia, linfadenomegalias,

lesões cutâneas, prurido cutâneo, icterícia, colúria, hipo/acolia, obstrução nasal, rouquidão, disfonia, disfagia, odinofagia, azia/pirose, vômitos, dor abdominal, distensão abdominal, diarreia, hemorragia digestiva, artralgia/artrite, edema, dor óssea, dor torácica, dispnéia, tosse, expectoração ou cheira torácica. No entanto, houve associação positiva (teste exato de Fisher) entre a forma neurológica da doença e a presença de cefaléia ( $p=0,001$ ), sudorese ( $p=0,004$ ), crises epilépticas ( $p=0,006$ ) e tonteira ( $p=0,028$ ). Observou-se, também, associação negativa entre a presença de lesões mucosas e o acometimento do sistema nervoso central ( $p=0,029$ ). A presença de déficit focal ao exame físico foi estatisticamente diferente entre os grupos, com valor  $p$  de  $0,011$  (teste exato de Fisher).

Com relação ao passado mórbido dos pacientes, não foi observada relação entre história prévia de PCM, asma, úlcera péptica, tuberculose, esquistossomose, sífilis, AIDS, leishmaniose, neoplasia, pneumoconioses, doenças sexualmente transmissíveis, doença neurológica, internações ou realização de cirurgias com o desenvolvimento de NPCM.

Não houve diferença entre a associação das diversas formas da doença (linfonodal, cutânea, pulmonar, adrenal, gastrintestinal, mucosa, genital, hepática, renal, óssea, esplênica, pancreática, laríngea ou disseminada) com a ocorrência do acometimento do SNC.

Não houve diferença entre os grupos com relação à história de uso de drogas endovenosas, de tabagismo atual ou prévio ou de etilismo atual ou prévio. No entanto, observou-se uma relação estatisticamente significativa entre a história familiar positiva de PCM e o desenvolvimento da forma

neurológica da doença ao se comparar os dois grupos ( $p=0,014$ ; teste exato de Fisher).

Finalmente, não houve diferença entre a ocorrência de recidivas entre os dois grupos, nem entre o tempo decorrido até a recidiva.

**Tabela 11: Comparação de aspectos clínicos entre pacientes com Neuroparacoccidioidomicose (NPCM) e Paracoccidioidomicose (PCM) atendidos no Centro de Referência em Doenças Infecto-Parasitárias Orestes Diniz do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, entre 1976 e 2008.**

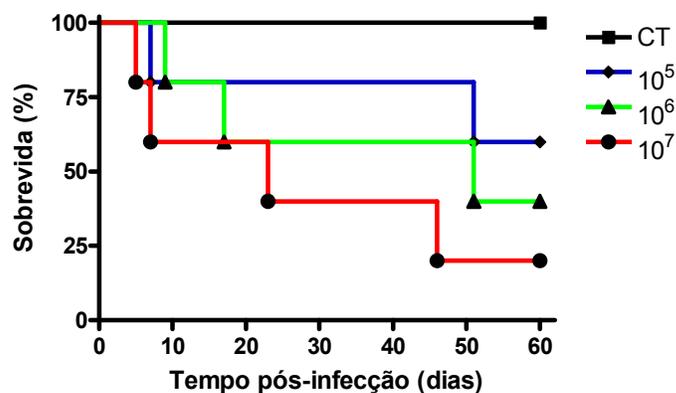
	<b>NPCM</b>	<b>PCM</b>	<b>Valor-p</b>
<b>Tempo de evolução (meses)</b>	11,14	13,83	>0,05
<b>Diagnóstico (%)</b>			
Biópsia	74,1	81,9	0,054
Exame a fresco	14,3	9,7	
Clínico	-	6,5	
Cultura	14,3	0,6	
Ensaio imunológico	-	-	
Esfregaço citológico	-	0,6	
Necropsia	-	-	
Combinação	-	0,6	
<b>Quadro clínico (%)</b>			
Cefaléia	75,0	18,3	0,001
Sudorese	75,0	23,5	0,004
Crises epilépticas	37,5	3,9	0,006
Tonteira	66,7	21,3	0,028
Lesões Mucosas	12,5	54,0	0,029
Déficit focal	40,0	2,4	0,014
<b>Sítios afetados (%)</b>			
Linfonodos	62,5	68,2	>0,05
Mucosas	28,6	55,9	
Pele	62,5	35,9	
Pulmões	42,9	32,5	
Laringe	0,0	12,4	
Disseminada	14,3	10,5	
Fígado	0,0	4,7	
Gastrointestinal	0,0	4,1	
Ossos	0,0	3,5	
Adrenais	0,0	1,8	
Baço	0,0	1,8	
Rins	0,0	1,2	
Pâncreas	0,0	1,2	
<b>História familiar de PCM (%)</b>	33,3	1,4	

## 5.3 Estudo experimental

### 5.3.1 Curva de sobrevida e padronização do inóculo

Camundongos C57BL/6 foram infectados por via intracraniana com inóculos crescentes de  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  células leveduriformes de Pb18. Animais controle receberam injeções de igual volume de solução salina PBS. Os animais foram acompanhados diariamente durante 60 dias para a determinação de curvas de sobrevida a fim de se padronizar a dose a ser utilizada. As quatro primeiras doses de inóculos do fungo não levaram a um desfecho letal em nenhum dos animais observados, assim como a injeção de salina controle. Já os animais dos grupos  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  apresentaram as curvas de sobrevida mostradas pelo **Gráfico 2**.

**Gráfico 2:** Curva de sobrevida de camundongos C57BL/6 infectados por via intracraniana com os inóculos de  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  células leveduriformes de Pb18 e animais controle (CT) que receberam solução salina PBS. Os animais foram acompanhados ao longo de 60 dias. Os animais CT, assim como os animais que receberam inóculos de  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  células leveduriformes de Pb18 apresentaram 100% de sobrevida durante todo o tempo avaliado (apresentados somente os dados dos animais CT). Experimento realizado com  $n = 5$  animais por grupo. Teste estatístico: Kaplan-Meier. Significância de  $p < 0,05$ .



Observa-se que os camundongos C57BL/6 infectados com  $10^7$  células leveduriformes de Pb18 começaram a morrer no quinto dia pós-infecção, chegando a 80% de mortalidade ao final do experimento. Os animais

infectados com  $10^6$  células leveduriformes de Pb18 começaram a morrer no nono dia pós-infecção, atingindo 60% de mortalidade ao final do experimento; e, finalmente, os animais infectados com  $10^5$  células leveduriformes de Pb18 começaram a morrer no sétimo dia pós-infecção, chegando a 40% de mortalidade no período observado. Após a análise da curva de sobrevivência, a dose letal para 50% dos animais ( $LD_{50}$ ) foi calculada a partir do método de Reed-Muench para padronização do inóculo, obtendo-se um valor aproximado de  $10^{5,7}$  células leveduriformes de Pb18. Assim, foi escolhido o inóculo de  $10^6$  células leveduriformes de Pb18 como dose padrão para o desenvolvimento do modelo experimental.

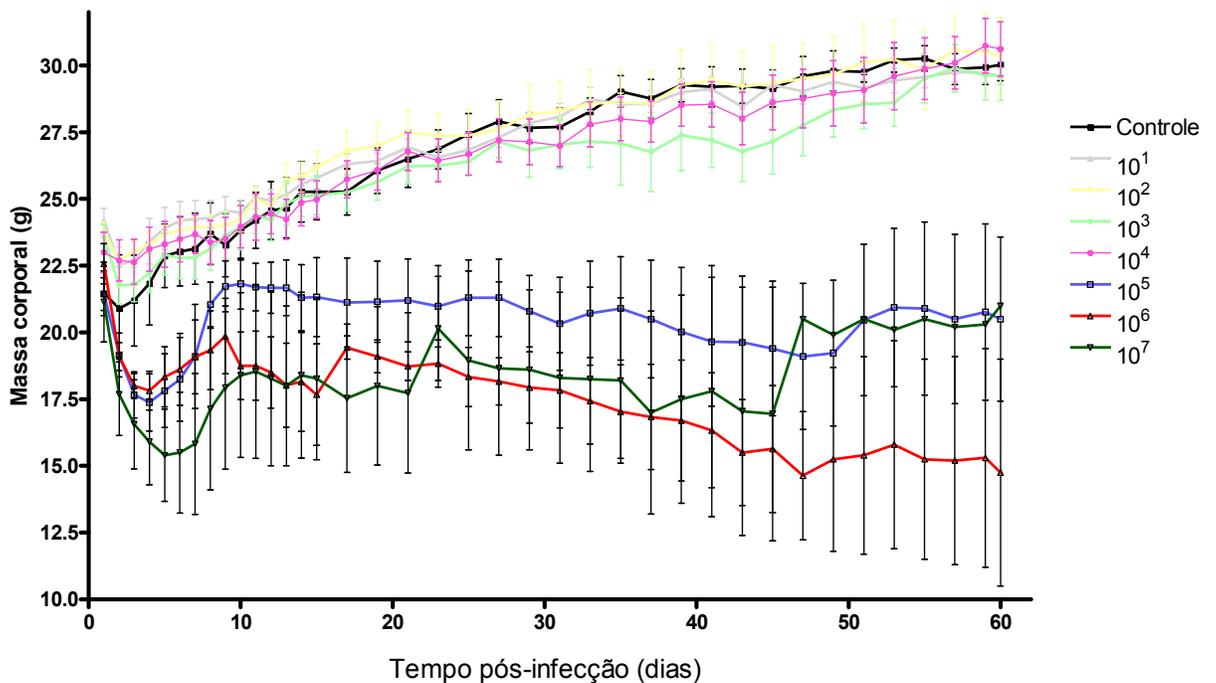
### **5.3.2 Sinais clínicos**

Os grupos experimentais acompanhados para a definição do inóculo foram avaliados também quanto à manifestação de sinais clínicos de doença. Sinais característicos de encefalite (paresia, alterações posturais e movimentos estereotipados, como andar em círculos) puderam ser observados em alguns animais do grupo  $10^7$  a partir do primeiro dia pós-infecção e, nos animais dos grupos  $10^6$  e  $10^5$ , a partir do terceiro dia pós-infecção. Os animais dos demais grupos não apresentaram sinais clínicos de doença.

A massa corporal dos animais foi medida durante todo o experimento (**Gráfico 3**). Os animais nos grupos  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  perderam peso em relação aos animais dos grupos controle,  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$  e  $10^4$  ( $p < 0,001$ ) durante todo o período do experimento. Estes últimos grupos não apresentaram diferença entre si ( $p > 0,05$ ). Observou-se diferença entre os grupos  $10^5$  e  $10^6/10^7$  ( $p < 0,001$

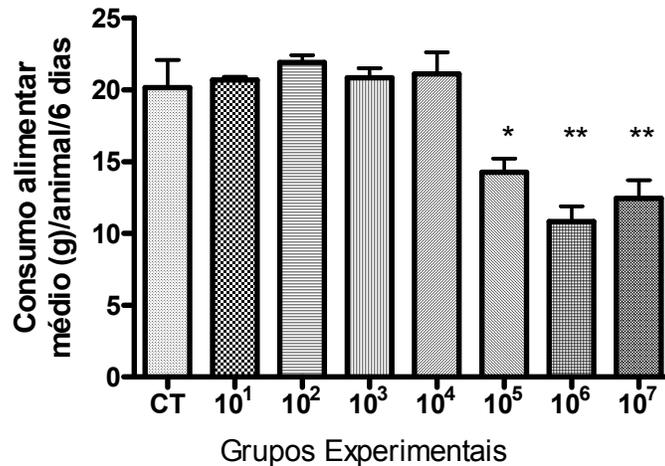
e  $p < 0,001$  respectivamente). Estes dois últimos, no entanto, não diferiram estatisticamente entre si.

**Gráfico 3:** Massa corporal dos camundongos C57BL/6 (inicialmente  $n = 5$  em cada grupo) infectados por via intracraniana com  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  células leveduriformes de Pb18. Os animais foram acompanhados por 60 dias. Os camundongos dos grupos  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  apresentaram perda de massa corporal ao longo do curso da infecção. Foi utilizado o teste ANOVA com comparações múltiplas de Bonferroni. Os valores representam média e  $\pm$  DP da massa por dia.



O consumo alimentar dos animais foi controlado a fim de se observar alterações nesse parâmetro. O consumo médio por animal por seis dias após 60 dias de infecção não foi estatisticamente diferente entre os grupos controle,  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$  e  $10^4$ , sendo, em média, de 20,7 g/animal/6 dias. Já os animais dos grupos  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$ , apresentaram redução do consumo alimentar, sendo este, em média, de 12,5 g/animal/6 dias. (**Gráfico 4**)

**Gráfico 4:** Consumo alimentar dos camundongos C57BL/6 (inicialmente  $n = 5$  em cada grupo) infectados por via intracraniana com  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  células leveduriformes de Pb18 e animais controle (CT), acompanhados por 60 dias. Os valores representam o consumo alimentar médio por animal em 6 dias após 60 dias de infecção. Os animais dos grupos  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  apresentaram redução do consumo alimentar durante todo o experimento. Foi utilizado o teste ANOVA, com pós-teste de Tukey. Os valores representam média e  $\pm$  DP do consumo alimentar por animal por 6 dias (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$ )

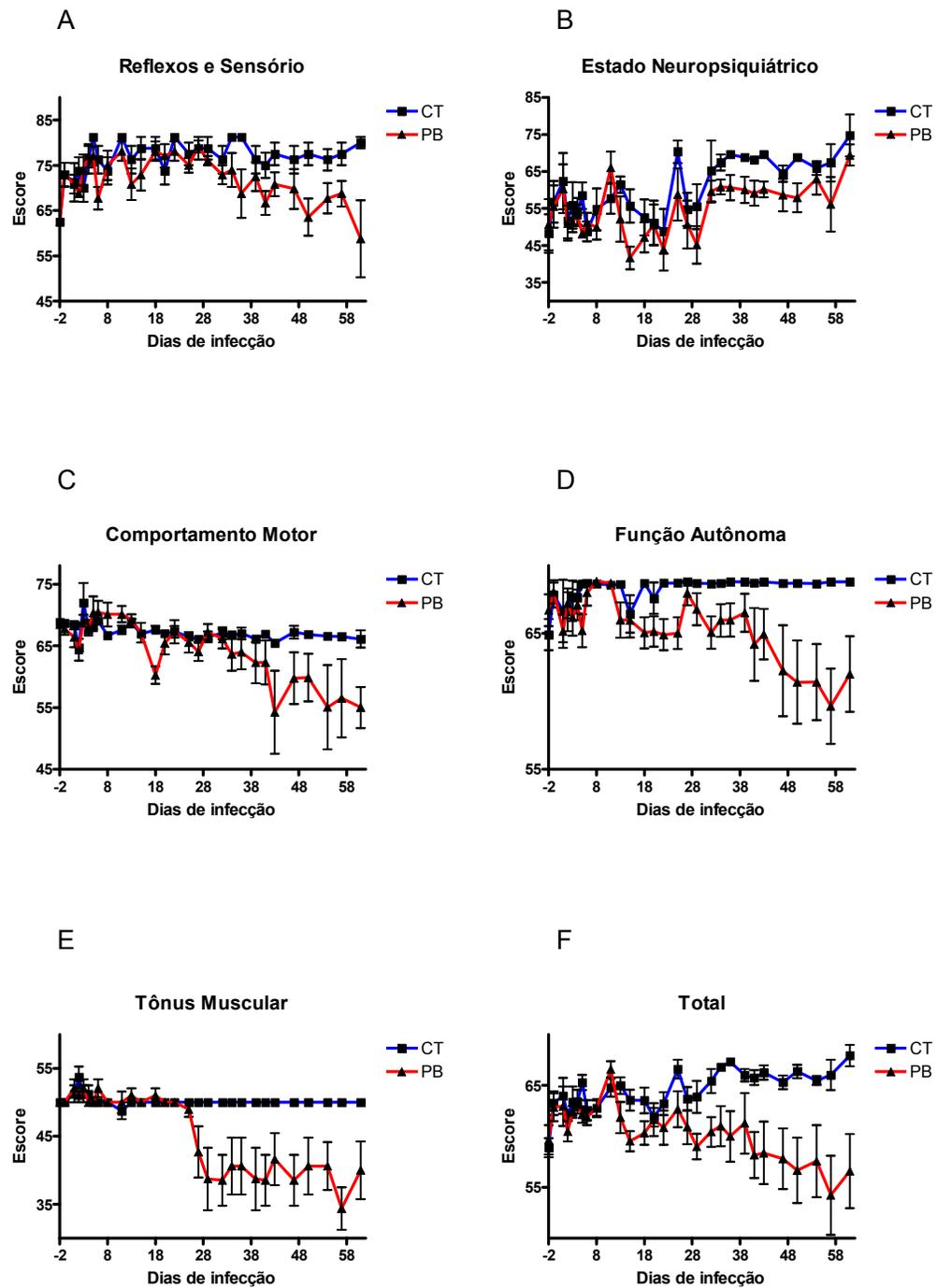


### 5.3.3 Morbidade (Protocolo SHIRPA)

Após o estabelecimento do inóculo com dose de  $10^6$  células leveduriformes de Pb18, foi realizado um novo experimento para a avaliação da morbidade nos animais. Onze camundongos C57BL/6 foram divididos em dois grupos: um grupo formado por seis animais infectados com o inóculo padronizado (grupo PB) e um grupo controle de cinco animais (grupo CT), os quais receberam uma injeção intracraniana de solução salina PBS. Esses animais foram acompanhados por mais 60 dias e submetidos rotineiramente ao protocolo SHIRPA para quantificação mais específica da morbidade gerada pela infecção. Os resultados são apresentados agrupados em cinco domínios clínicos (reflexos e sensório, estado neuropsiquiátrico, comportamento motor, função autônoma e tônus muscular; **Gráficos 5 A, B, C, D e E**, respectivamente) e pela soma destes, representando o escore total (**Gráfico 5**

F) segundo Lackner *et al.* (2006). As curvas foram comparadas com a utilização do teste de Wilcoxon, observando-se significância estatística para todos os domínios (valores de p: 0,0002; <0,0001; 0,0033; <0,0001; 0,0011; <0,0001; respectivamente). A partir do momento em que se observou diferença estatística entre os animais do grupo PB e do grupo CT, essa diferença permaneceu até o sexagésimo dia de observação. Assim, os primeiros domínios a apresentar diferença significativa foram “estado neuropsiquiátrico” e “função autônoma”, ambos a partir do vigésimo segundo dia de infecção. O domínio “reflexos e sensorio” passou a exibir diferença estatística depois de 32 dias de infecção, seguido pelo domínio “tônus muscular”, que apresentou significância após o 39º dia. O último domínio a se alterar significativamente foi “comportamento motor”, a partir de 43 dias de infecção. A soma de todos os domínios mostrou significância estatística após o décimo quinto dia de infecção.

**Gráfico 5:** Curvas de desempenho na aplicação do protocolo SHIRPA divididas por domínios em camundongos C57BL/6 infectados por via intracraniana com  $10^6$  células leveduriformes de Pb18 (grupo PB, n=6) e inoculados por via intracraniana com solução salina PBS (grupo CT, n=5) observados durante 60 dias.

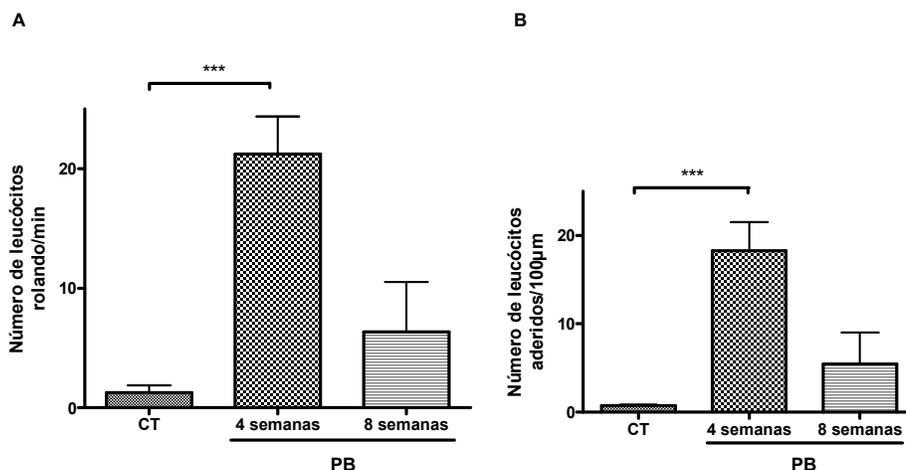


### 5.3.4 Interação leucócito-endotélio

Para a avaliação das interações leucócito-endotélio na microvasculatura da pia-máter, animais infectados com  $10^6$  células leveduriformes de Pb18 (grupo PB, n=20) e animais controle (grupo CT, n=10) foram submetidos a uma craniotomia para exposição da vasculatura meníngea. Os animais foram então submetidos à técnica de microscopia intravital após 4 (grupo PB n=10; grupo CT n=5) e 8 (grupo PB n=10; grupo CT n=5) semanas de experimento.

Os camundongos do grupo PB apresentaram aumento significativo no número de células nas etapas de rolamento e de adesão ( $p < 0,001$  para ambos) leucocitária no endotélio meníngeo (**Gráfico 6 A e B**, respectivamente) após 4 semanas de infecção. Esse aumento foi estatisticamente diferente quando comparado aos camundongos controle. Entretanto, após 8 semanas de evolução, não houve diferença estatística entre os grupos.

**Gráfico 6:** Número de leucócitos nas etapas de rolamento (A) e adesão (B) na microcirculação da pia-máter, observado pela técnica de microscopia intravital. Camundongos C57BL/6 (n=10 em cada tempo) infectados com  $10^6$  células leveduriformes de Pb18 por via intracraniana foram submetidos à técnica de microscopia intravital 4 e 8 semanas pós-infecção. Os dados representam média  $\pm$  DP de leucócitos por minuto (rolamento) e leucócitos por  $100 \mu\text{m}$  de vaso (adesão). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos ( $***p < 0,001$ ) quando comparados ao animais do grupo CT. Foram utilizados os testes estatísticos ANOVA com pós-teste de Tukey.



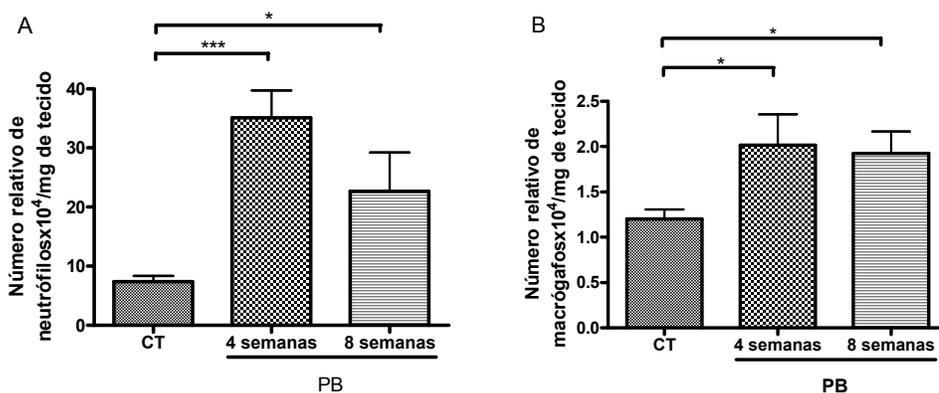
### **5.3.5 Detecção dos níveis de atividade de mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglicosaminidase (NAG) teciduais**

Para a determinação do influxo de neutrófilos e macrófagos no tecido cerebral dos animais, foram dosadas as atividades teciduais das enzimas MPO e NAG, respectivamente (**Gráfico 7**).

A atividade tecidual de MPO apresentou-se elevada no grupo PB em relação ao controle após 4 e 8 semanas de infecção ( $p=0,0002$ , ANOVA, **Gráfico 7 A**). Ao se fazer o pós-teste de Tukey, observaram-se valores de  $p<0,001$  para o grupo PB após 4 semanas em relação ao grupo CT e de  $p<0,05$  para o grupo PB após 8 semanas em relação ao grupo CT. Não houve diferença estatística entre os animais do grupo PB em 4 e 8 semanas pós-infecção.

A atividade tecidual de NAG apresentou-se elevada no grupo PB em relação ao controle após 4 e 8 semanas de infecção ( $p=0,0347$ , ANOVA, **Gráfico 7 B**). Ao se fazer o pós-teste de Tukey, no entanto, não se observaram valores significativos de  $p$ . Comparando-se os animais nos dois tempos de infecção isoladamente em relação ao grupo controle pelo teste  $t$  para amostra não-pareadas, observaram-se valores de  $p=0,0261$  para os animais após 4 semanas de infecção e de  $p=0,0141$  para os animais após 8 semanas de infecção. Não houve diferença estatística entre os animais do grupo PB em 4 e 8 semanas pós-infecção.

**Gráfico 7:** Acúmulo de neutrófilos (A) e macrófagos (B) em tecido cerebral de camundongos C57BL/6 controle e infectados por via intracraniana com  $10^6$  células leveduriformes de Pb18. Os animais foram sacrificados 4 e 8 semanas após a infecção. O acúmulo de células foi avaliado pela dosagem da atividade de MPO e NAG teciduais, respectivamente. Os resultados representam o número relativo de neutrófilos ( $\times 10^4$ ) e macrófagos ( $\times 10^4$ ) por mg de tecido e são a média de 4 a 5 animais para cada grupo. A análise feita pela ANOVA mostrou valor de p em (A) de 0,0002 quando o grupo PB foi comparado ao CT; e, em (B), de 0,0347. (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ )



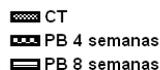
### 5.3.6 Produção de citocinas e quimiocinas

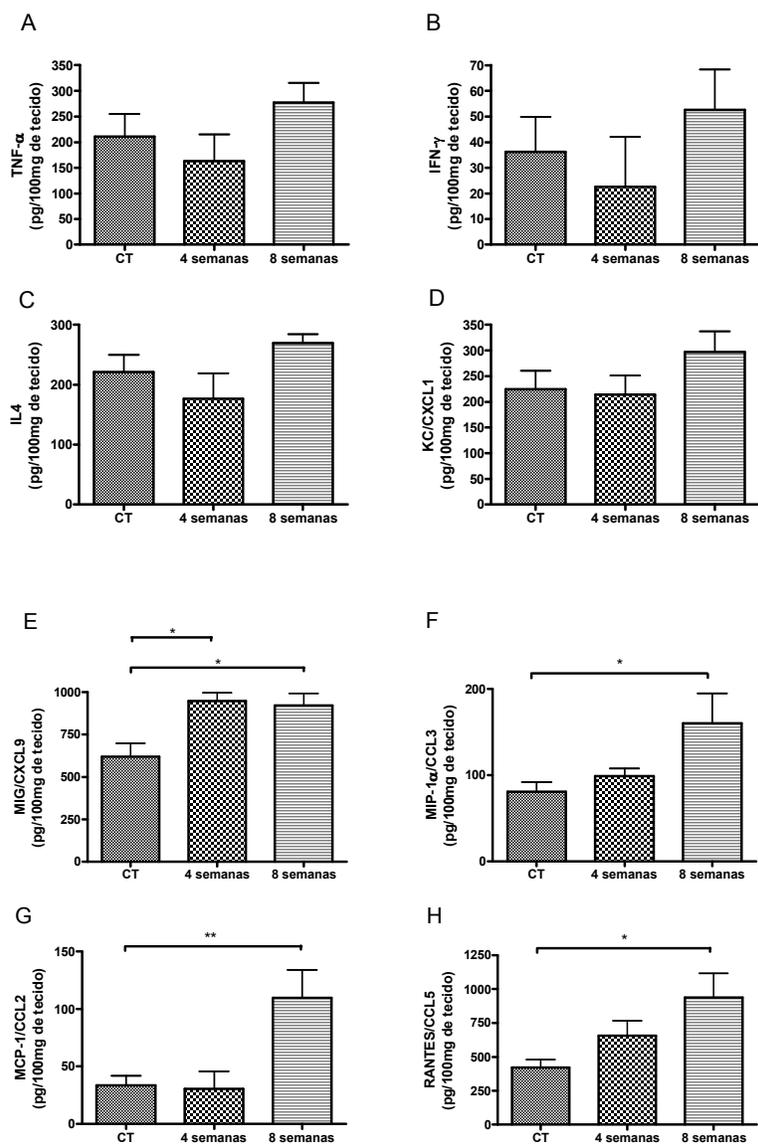
As citocinas e quimiocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL4, KC/CXCL1, MIG/CXCL9, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MCP-1/CCL2 e RANTES/CCL5 foram dosadas no tecido cerebral dos animais com o objetivo de se avaliar a síntese das mesmas nos camundongos do grupo PB após 4 e 8 semanas de infecção e no grupo CT (Gráfico 8)

Após 4 semanas de infecção, observou-se aumento estatisticamente significativo de expressão somente da quimiocina MIG/CXCL9, quando realizada a comparação entre camundongos dos grupos PB e CT ( $p < 0,05$ ; Gráfico 8 E).

**Gráfico 8:** Dosagem das citocinas e quimiocinas TNF- $\alpha$  (A), IFN- $\gamma$  (B), IL4 (C), KC/CXCL1 (D), MIG/CXCL9 (E), MIP-1 $\alpha$ /CCL3 (F), MCP-1/CCL2 (G) e RANTES/CCL5 (H) em tecido cerebral de camundongos C57BL/6 infectados por via intracraniana com  $10^6$  células leveduriformes de Pb18 (grupo PB, n=20) e inoculados por via intracraniana com solução salina PBS (grupo CT, n=10) observados após 4 (n=10) e 8 (n=10) semanas de infecção. Os valores de quimiocinas produzidas pelos camundongos foram considerados estatisticamente significativos (\*\*p<0,01,\*p<0,05) quando comparados ao grupo controle. Foi usado o teste estatístico ANOVA com pós-teste de Tukey.

Legenda


  
 CT
   
 PB 4 semanas
   
 PB 8 semanas



Após 8 semanas de infecção o aumento de expressão da quimiocina MIG/CXCL9 permaneceu ( $p<0,05$ ; **Gráfico 8 E**) e foi observado, ainda,

aumento estatisticamente significativo de expressão das quimiocinas MIP-1 $\alpha$ /CCL3 ( $p < 0,05$ ; **Gráfico 8 F**), MCP-1/CCL2 ( $p < 0,01$ ; **Gráfico 8 G**) e RANTES/CCL5 ( $p < 0,05$ ; **Gráfico 8 H**), quando realizada a comparação entre camundongos dos grupos PB e CT.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas com relação à expressão das citocinas e quimiocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL4, KC/CXCL1 entre os animais dos grupos PB e CT em nenhum dos tempos estudados (**Gráficos 8 A, B, C e D**, respectivamente).

### **5.3.7 Alterações histopatológicas**

Foram examinados cortes histológicos de cérebro corados em HE (**Figura 4 A, B, C, F, G**) e Grocott (**Figura 4 D, F-inset**), representativos de 20 animais inoculados com  $10^6$  células leveduriformes de Pb18 por via intracraniana profunda (3-5 mm de profundidade no hemisfério direito) e sacrificados após 4 (**Figura 4 C, D**) e 8 semanas (**Figura 4 A, B, E, F, G**); em dois experimentos repetidos.

Os animais controle injetados com solução salina PBS não apresentaram alterações significativas em ambos os tempos examinados (não documentados).

Observa-se que, nos animais sacrificados com 8 semanas, as lesões, já presentes 4 semanas pós-infecção, aumentaram de volume assumindo a forma de nódulos e aspecto pseudotumoral (**Figura 4 D, F**), sendo o seu aspecto heterogêneo, principalmente devido ao aparecimento de grandes áreas de necrose (G \*), com e sem deposição das estruturas fúngicas coradas pelo Grocott (**Figura 4 D, E, F-“inset”**, detalhe em Grocott da região demarcada

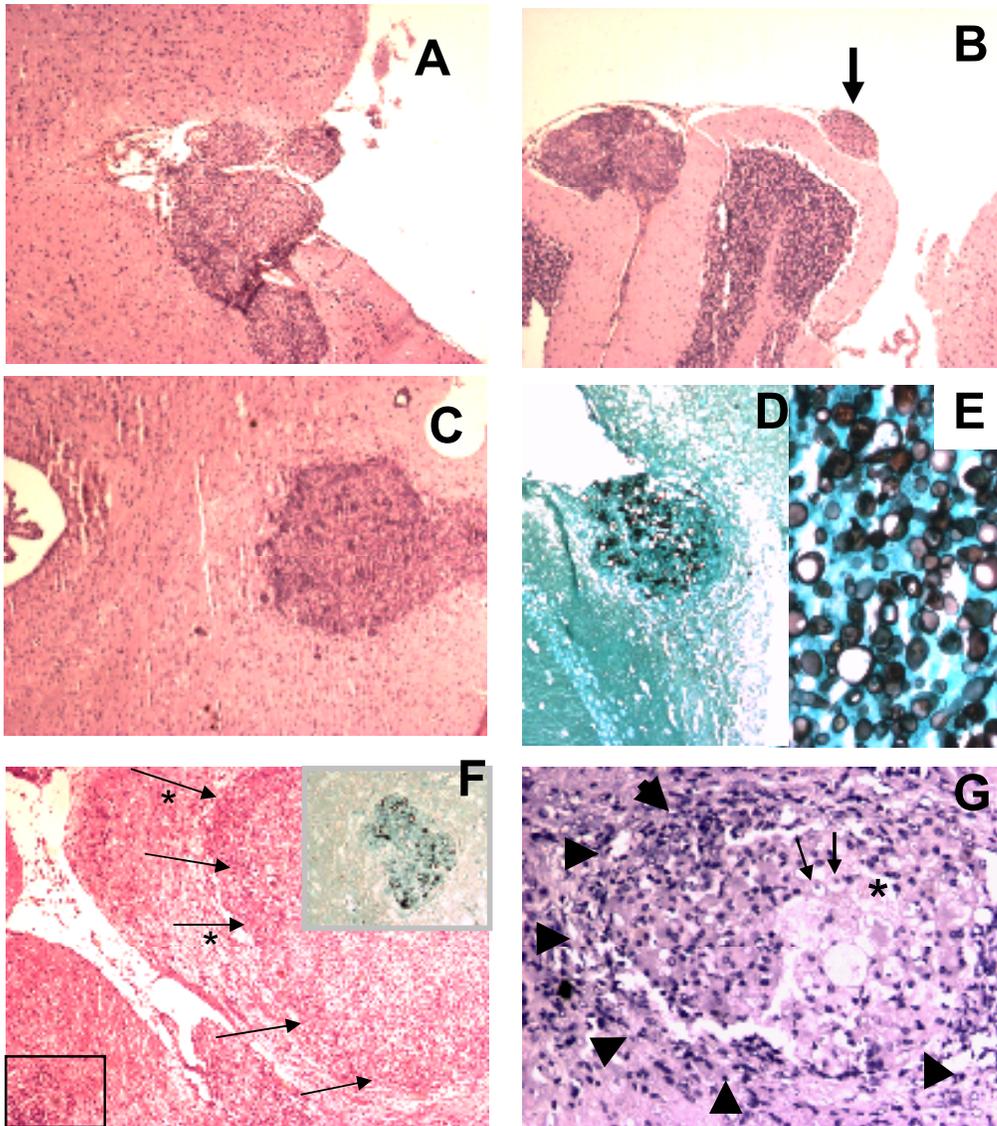
por quadrado em HE), mas também visíveis em HE (**Figura 4 F**, delimitado por quadrado; G, setas finas).

Podemos observar também a presença regular de lesões ao longo do trajeto da injeção, com freqüentes formações nodulares associadas à parede do III ventrículo (**Figura 4 A**), muitas vezes rompendo-se dentro dos mesmos e estendendo-se para a fossa posterior e atingindo as meninges, inclusive no cerebelo (**Figura 4 B**).

**Figura 4:** Fotomicrografias de cérebro de camundongos C57BL/6 infectados com  $10^6$  células leveduriformes de Pb18 por via intracraniana após 4 e 8 semanas.

**Legenda:**

- A, B, C, F, G (H&E)
- D, F (inset) Grocott
- A, B, D, F (inset) 4X
- C, F 10X
- G 40X
- E 100X



***Discussão***

## 6 Discussão

Este é o primeiro trabalho a realizar uma revisão sistemática dos casos neurológicos de PCM disponíveis na literatura, agregando informações de 257 casos individuais da doença.

A análise dos dados confirma a tendência de aumento do volume de relatos de casos de NPCM ao longo do tempo, principalmente após as décadas de 1970-1980, fato que talvez seja explicado pela evolução dos métodos diagnósticos, especialmente os de neuroimagem (Almeida *et al.*, 2004; Elias Jr *et al.*, 2005).

Poucos trabalhos na literatura estabelecem comparações entre pacientes com a forma neurológica e pacientes sem a forma neurológica da PCM. Na maior parte desses trabalhos comparativos, realizaram-se somente investigações diagnósticas, comparando-se a detecção de determinados antígenos no soro de pacientes com e sem doença neurológica, ou avaliando-se a capacidade de detecção desses marcadores no líquido (da Silva *et al.*, 2003, 2004; Reis *et al.*, 2005). Cabe mencionar ainda o trabalho de Almeida *et al.* (2005), que, a partir da descrição da associação entre PCM e alguns alelos do antígeno leucocitário humano (HLA) ou de histocompatibilidade principal, realizaram um estudo com o objetivo de investigar essa associação na NPCM. Portanto, faltam trabalhos que buscam definir objetivamente aspectos singulares da NPCM em relação à PCM. Isso pode ser, em parte, definido a partir da análise sistemática dos casos de NPCM descritos.

A distribuição dos casos segundo sexo segue o padrão geral observado para a PCM, com predominância no sexo masculino em proporção aproximada a 11:1 (Fagundes-Pereyra *et al.*, 2006). A média de idade dos pacientes com a

forma neurológica da doença também foi semelhante à média de idade geral observada entre os casos de PCM (Gasparetto *et al.*, 2003). Entretanto, de modo interessante, observou-se, entre os casos do sexo feminino, uma tendência ao surgimento da doença em pacientes significativamente mais jovens que entre os do sexo masculino, fato até certo ponto inesperado ao se considerar a relativa proteção feminina ao desenvolvimento da PCM durante o período reprodutivo da vida.

Com relação à ocupação profissional dos indivíduos, foi observada clara predominância do acometimento de lavradores, em concordância com o perfil amplamente atribuído à PCM (da Silva *et al.*, 2000).

O quadro clínico caracteriza-se principalmente pela ocorrência de sinais e sintomas motores, especialmente alterações na força muscular, associados a sinais e sintomas sugestivos de hipertensão intracraniana, como cefaléia ou papiledema. O surgimento de crises epiléticas, sinais e sintomas cerebelares, como ataxia, e transtornos mentais, como *delirium*, também foram relativamente comuns.

Houve clara predominância do surgimento de lesões no compartimento supratentorial, seguido pelo infratentorial. Naquele houve predominância de lesões nos hemisférios cerebrais, especialmente nos lobos frontais e parietais. No compartimento infratentorial, o acometimento ocorre principalmente no cerebelo. Entre os casos medulares, há predominância de lesões nos segmentos torácicos, seguidos pelos cervicais. Essa observação sugere que a disseminação da doença seja principalmente por via hematogênica, em razão da predominância de lesões em áreas com alto fluxo sanguíneo, especialmente os territórios das artérias cerebrais anterior e média, ramos terminais da artéria

carótida interna (Machado, 2002). Desse modo, o fungo deve estabelecer uma relação com a barreira hematoencefálica, penetrando-a através de algum mecanismo ainda não descrito.

A forma de definição do diagnóstico confirmou a pequena importância atribuída pela análise do líquido. Esse fato está de acordo com a postura habitual de não se realizar punção lombar na suspeita de lesões expansivas ou estruturais do SNC (Sempere *et al.*, 2007). É notável, por outro lado, o papel dos métodos de imagem na abordagem desses pacientes.

Uma grande parcela dos pacientes com a forma neurológica da doença apresentou quadro pulmonar simultâneo, inclusive com alterações à radiografia de tórax. Esses dados encontram-se de acordo com as observações de Marchiori *et al.* (1989), reforçando o papel da radiografia de tórax na abordagem diagnóstica desses pacientes.

Observou-se predominância de pacientes com a forma crônica da doença em sua apresentação pseudotumoral, fato que explicaria o quadro sintomatológico compatível com processo expansivo intracraniano anteriormente descrito, ou seja, sinais de hipertensão intracraniana.

Com relação ao tratamento, houve predominância da utilização de sulfamidas, especialmente da associação sulfametoxazol-trimetoprim, fato que se encontra de acordo com as orientações gerais para o tratamento da NPCM (de Almeida, 2005; Laniado-Laborín, 2007; Paniago *et al.*, 2007). Observa-se, também, o significativo volume de procedimentos cirúrgicos, muitas vezes indicados em razão da incapacidade de definição prévia do diagnóstico, só realizado após a realização do procedimento.

A análise do desfecho dos quadros mostrou elevado índice de mortalidade. Além disso, a frequência de permanência de seqüelas após a resolução dos casos mostrou-se bastante elevada, com predominância de alterações em funções motoras.

Em conclusão, a revisão sistemática da literatura permitiu amplo levantamento das informações disponíveis sobre o comprometimento neurológico da PCM a partir de 257 casos observados desde 1919 até 2007. Possibilitou-se, então, a composição de um panorama dos aspectos epidemiológicos, clínicos, diagnósticos e terapêuticos da doença, o qual chamou a atenção para a elevada mortalidade e, principalmente, para a importante determinação de seqüelas nos pacientes sobreviventes.

Assim, com o intuito de se investigar possíveis parâmetros demográficos e clínicos que pudessem evidenciar aspectos singulares da NPCM em relação à PCM sem comprometimento neurológico e que pudessem ser úteis para o diagnóstico mais precoce da doença e redução de sua morbi-mortalidade, foram descritos oito casos de NPCM e comparadas suas características demográficas e clínicas às de pacientes com PCM sem sintomas neurológicos. Todos os pacientes pertencem a uma coorte seguida de 1976 a 2008 no Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecto-Parasitárias Orestes Diniz do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Segundo nossas informações, este é o primeiro trabalho a comparar dados clínicos de pacientes com PCM com e sem envolvimento do SNC.

A prevalência de 4,0% da NPCM encontrada na população estudada está abaixo da média de aproximadamente 12,5% descrita na literatura (Hutzler *et al.*, 1985; de Almeida, 2005). Essa prevalência é variável, de acordo com os

diversos autores, de 0 a 36% (Pereira *et al.*, 1965; Raphael, 1966; Plá *et al.*, 1994). É interessante notar que, de acordo com a tendência observada de aumento do diagnóstico de casos neurológicos da doença nas últimas décadas (Tristano *et al.*, 2004; de Almeida, 2005; Fagundes-Pereyra *et al.*, 2006), a maior parte dos pacientes estudados aqui (75%) teve o diagnóstico após a década de 90, principalmente após o ano 2000 e, ao se corrigir a prevalência para a população com diagnóstico de PCM realizado na mesma época, esse valor sobe para 7,7%.

Aproximadamente 88% dos pacientes com NPCM apresentavam a forma crônica da PCM, o que está de acordo com as informações da literatura (Pereira *et al.*, 1965; Paniago *et al.*, 2007). Além disso, todos os casos relatados neste trabalho exibiam a apresentação pseudotumoral, predominantemente supratentorial, a qual é a forma mais comum, correspondendo a cerca de 96% dos casos segundo a literatura.

Apesar de não ter havido mortes entre os casos relatados, a morbidade gerada pela doença foi elevada. Aproximadamente 63% dos pacientes evoluíram com alguma seqüela. Além disso, observa-se que o tempo de evolução da doença neurológica não foi superior a 20 dias entre os pacientes que evoluíram sem seqüelas, ao passo que esse tempo de evolução parece ser maior entre os pacientes que permaneceram com alguma seqüela. Isso alerta para o fato de que, com o diagnóstico e tratamento precoces, a morbidade causada pela doença talvez possa ser significativamente reduzida.

Os aspectos epidemiológicos observados entre os grupos de pacientes com NPCM e PCM não diferiram com relação à distribuição de gêneros, idade e profissão, e todos estavam de acordo com os dados encontrados na literatura

(Plá *et al.*, 1994; Fagundes-Pereyra *et al.*, 2006). Também não houve diferenças com relação a hábitos de vida como consumo de drogas endovenosas, tabagismo ou etilismo. Observou-se diferença significativa ( $p < 0,001$ ) no que diz respeito à ocorrência de casos de NPCM em pacientes provenientes da região Norte/Nordeste do estado de Minas Gerais, correspondendo a 60% dos casos dali originados, fato que, apesar do pequeno número de pacientes estudados, poderia suscitar a hipótese de que cepas do Pb presentes na região seriam mais propensas à penetração no SNC. Essa hipótese vai ao encontro do que diz Franco (1987): *“a prevalência das formas clínicas e a freqüência de envolvimento de órgãos pela doença variam em diferentes áreas endêmicas. É tentador se pensar que esses achados estejam relacionados à presença de diferentes cepas do Pb”*.

Outra diferença encontrada correspondeu ao nível educacional dos pacientes, maior entre aqueles com NPCM ( $p < 0,001$ ). Esse dado, aparentemente sem explicação, poderia simplesmente corresponder a um viés de amostragem, já que a maior parte dos pacientes com NPCM foram diagnosticados após 1990, pertencendo a uma parcela da população com maior tempo de escolaridade.

Com relação às características clínicas dos pacientes, não foram observadas diferenças significativas entre o tempo de evolução da doença nos pacientes que desenvolveram ou não a forma neurológica. Tal fato sugere que o acometimento neurológico não se associa a um curso mais arrastado ou longo de doença. Do mesmo modo, a forma de definição do diagnóstico etiológico não diferiu entre os dois grupos, observando-se, entretanto, a evidente importância dos métodos de neuroimagem para a identificação das

lesões nos casos de NPCM. A análise das manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes apontou a extrema importância da sintomatologia neurológica na avaliação desses casos, havendo grande significância no que diz respeito, principalmente, à presença de cefaléia ( $p=0,001$ ), sudorese ( $p=0,004$ ), crises epilépticas ( $p=0,006$ ), tonteiras ( $p=0,028$ ) e déficits focais ao exame físico ( $p=0,014$ ). A presença dessas queixas em pacientes com PCM deve suscitar a hipótese do comprometimento neurológico da doença. Outro fato interessante é a observação de uma associação da NPCM com uma história familiar positiva de PCM ( $p=0,014$ ). Há, na literatura, relatos do acometimento neurológico entre familiares com PCM e, no presente trabalho, relata-se o acometimento de uma mãe e de seu filho (casos 1 e 2). Já foram descritos fatores de susceptibilidade genéticos relacionados à PCM, como os antígenos HLA-A9 (relacionado à forma pulmonar crônica não-disseminada), HLA-B13 (Restrepo *et al.*, 1983) e HLA-B40 (Lacerda *et al.*, 1988). No entanto, tais associações não foram encontradas em pacientes com NPCM (Almeida *et al.*, 2005). Assim, os mecanismos de susceptibilidade ao desenvolvimento da forma neurológica da doença devem depender de interações entre fatores do fungo e fatores predisponentes do hospedeiro, talvez ao nível da barreira hematoencefálica, determinando a penetração do microrganismo através de um processo ainda não descrito.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas com relação ao acometimento de sítios não-neurológicos entre os dois grupos de pacientes. Em contraste com alguns dados presentes na literatura, essa diferença não foi observada inclusive com relação à forma disseminada da doença. Paniago *et al.* (2007) sugerem que o acometimento neurológico estaria

associado a estados de imunodepressão grave e disseminação intensa da doença, o que não foi observado aqui. Assim, como os dados apresentados neste trabalho sugerem que a forma neurológica da doença não se relaciona à disseminação intensa ou a um curso longo de doença, deve haver outros fatores além da simples imunodepressão que estariam envolvidos na infecção do SNC.

Assim, os aspectos demográficos e clínicos dos oito casos de NPCM relatados são similares aos atribuídos a essa forma da doença pela literatura. O diagnóstico e o tratamento precoces mostraram-se fundamentais e, em comparação aos pacientes sem NPCM, pôde ser observada a grande importância do exame neurológico. A observação de que a positividade da história familiar para o acometimento neurológico foi diferente entre os dois grupos, sinaliza para a necessidade de mais estudos no sentido de determinar fatores de susceptibilidade envolvidos na infecção neurológica.

De modo a permitir o aprofundamento do estudo da NPCM, seguiu-se para a investigação experimental. Modelos experimentais de reprodução da infecção pelo Pb estão bem definidos pela literatura (Coelho *et al.*, 1994). Tais modelos, apesar de desenvolverem quadros de infecção paracoccidioidomicótica pulmonar ou sistêmica gerada por diversas rotas de infecção, não apresentam evidências de comprometimento do SNC. Desse modo, não há registros de estudos em animais que visassem à interação do fungo com o tecido nervoso.

Em decorrência disso, no presente trabalho, os animais foram infectados diretamente por via intracraniana dividindo-os em sete diferentes grupos que receberam, respectivamente,  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  células

leveduriformes de Pb, cepa PB18, com o intuito de se observar infecção encefálica e de se estabelecer a melhor dose para se padronizar o modelo. A via intracraniana de inoculação é descrita para diversos modelos experimentais murinos de infecção fúngica (como nos modelos de infecção por *Cryptococcus neoformans* (Blasi *et al.*, 1992), *Aspergillus fumigatus* (Chiller *et al.*, 2002) e *Scedosporium apiospermum* (Capilla *et al.*, 2004)) e não-fúngica (como nos modelos de meningite por *Streptococcus pneumoniae* (Winkler *et al.*, 2009) ou de encefalite por HSV-1 (Vilela *et al.*, 2008, 2009)).

Os animais infectados com  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  células leveduriformes de Pb desenvolveram a doença, manifestando perda de massa corporal, alterações motoras, alterações da posição corporal e diminuição do consumo alimentar. A curva de sobrevivência demonstrou que a mortalidade estava relacionada à magnitude do inóculo. Assim, o inóculo de  $10^6$  células/animal foi escolhido por representar a dose mais próxima do cálculo da dose LD<sub>50</sub> obtida pelo método de Reed-Muench (Reed & Muech, 1938). Esse resultado está de acordo com os dados da literatura para a padronização de outros modelos da doença, os quais utilizam exatamente a mesma dose de inóculo, apesar de usarem vias diversas de infecção, como a intravenosa ou intraqueal (Calich *et al.*, 1998).

Após a definição da via de infecção e do inóculo, foi possível padronizar o modelo experimental a fim de se caracterizar alguns aspectos relacionados à morbidade, imunologia e histopatologia da doença.

A morbidade foi avaliada pelo protocolo SHIRPA, um protocolo bem estabelecido de testes comportamentais para caracterização fenotípica de camundongos (Rogers *et al.*, 1997, 2001). Constatou-se que a infecção experimental foi capaz de gerar alterações comportamentais nos animais

observados e que foi possível quantificar essa morbidade e, até mesmo, categorizá-la em domínios clínicos funcionais diferentes (reflexos e sensorio, estado neuropsiquiátrico, comportamento motor, função autônoma e tônus muscular). Tal fato é importante, pois, além de haver demonstrado o acometimento progressivo de funções nos testes realizados, apresentando piores resultados nos escores com o passar do tempo, pode permitir a análise do impacto de diversas variáveis (terapêuticas, genéticas, imunológicas) no desfecho clínico da doença em futuros estudos no modelo desenvolvido.

Após a caracterização do quadro clínico desenvolvido pelos animais, alguns aspectos da resposta imune contra a presença do fungo no tecido nervoso foram avaliados. Inicialmente, foi avaliado o processo de recrutamento celular.

Poucos trabalhos na literatura utilizam a técnica de microscopia intravital por fluorescência para estudar as interações leucócito-endotélio na micro-circulação da pia-máter. Como exemplo, citam-se os trabalhos de Vilela *et al.* (2008, 2009), em que a técnica foi usada para estudar o tráfego leucocitário em um modelo experimental de encefalite herpética. A microscopia intravital é uma ferramenta dinâmica que permite o estudo de vários passos envolvidos no processo de transmigração leucocitária. Os vasos das meninges são utilizados já que o cérebro não é um órgão translúcido, o que impede a visualização das etapas da transmigração de leucócitos para o parênquima (Ley, 2001). No entanto, ela permite correlacionar os níveis das interações leucócito-endotélio com a intensidade do processo inflamatório tecidual.

A visualização dessas interações *in vivo* em um vaso inflamado tem revelado que, inicialmente, as células se aproximam do endotélio, em seguida,

rolam e depois aderem firmemente à parede do endotélio até que o leucócito alcance o tecido inflamado (Kerfoot & Kubes, 2002).

No presente estudo, os animais do grupo PB estudados apresentaram um aumento significativo nas etapas de rolamento e de adesão leucocitárias nos vasos da pia-máter em relação aos animais do grupo CT após 4 semanas de infecção. Esse aumento, no entanto, não se manteve após 8 semanas. Tal fato pode ser explicado com base no padrão de influxo celular nas lesões granulomatosas descrito pela literatura, o qual se apresenta graficamente como uma curva em ascensão com um pico seguido por uma queda ao longo do tempo. As lesões granulomatosas passam por diversas fases em sua formação, as quais são diferentes quanto ao volume de células migratórias e à natureza dessas células. No início da infecção, as células começam a migrar para o tecido em uma primeira fase chamada de “iniciação”. O influxo de células aumenta gradativamente na fase de “acúmulo”, atingindo um pico na transição desta para a fase “efetora”. Essa movimentação celular, então, cai progressivamente até níveis mínimos durante a última fase de “resolução” (Co *et al.*, 2003). É possível supor que as lesões já se encontrassem próximas da fase evolutiva de resolução por volta da oitava semana de infecção.

Além disso, as dosagens das atividades teciduais das enzimas MPO e NAG, as quais são indicativas da presença de neutrófilos e macrófagos, respectivamente, no tecido, demonstraram um aumento significativo após 4 e 8 semanas de infecção em relação aos animais controle, mostrando a presença dessas células no tecido. Por fim, as observações histológicas de infiltrado de leucócitos nas meninges e no parênquima cerebral também são indicativas de que as células inflamatórias transmigraram o endotélio.

A seguir, foram dosadas algumas citocinas e quimiocinas no tecido cerebral. Citocinas são proteínas secretadas por células do sistema imune ou mesmo não-imunes, as quais medeiam muitas das funções desempenhadas por aquelas células (Abbas *et al.*, 2003). As quimiocinas são um grupo de citocinas de baixo peso molecular, que estão relacionadas aos processos de recrutamento e de migração celulares, constituindo uma superfamília de mais de 40 pequenas citocinas (Bonecchi *et al.*, 2009). Quatro subfamílias de quimiocinas são caracterizadas com base na posição dos dois primeiros resíduos de cisteína na porção N-terminal da molécula (CX<sub>3</sub>CL, CXCL, CCL e CL). A primeira das duas maiores subfamílias, quimiocinas CXC (que inclui KC/CXCL1 e MIG/CXCL9), atrai preferencialmente neutrófilos. A segunda subfamília, quimiocinas CC (que inclui MCP-1/CCL2, MIP-1 $\alpha$ /CCL3 e RANTES/CCL5), atrai e ativa células mononucleares (Kuna *et al.*, 1998; Loetscher *et al.*, 1996).

A regulação dos mecanismos de entrada de leucócitos no SNC ainda não está totalmente elucidada, porém vários estudos já mostraram os papéis de citocinas e de quimiocinas, que estimulam a expressão de moléculas de adesão na superfície de linfócitos no processo de migração para o parênquima cerebral (Ransohoff, 2002).

O perfil de produção de citocinas, assim como os diversos tipos de células apresentadoras de antígenos presentes em diferentes órgãos ou tecidos, tem uma profunda influência na resposta imune e determina diferentes desfechos das doenças. No presente trabalho, observou-se que, após 4 semanas de infecção, somente a quimiona MIG/CXCL9 encontrava-se aumentada em relação aos animais controle. Após 8 semanas de infecção,

MIG/CXCL9 permaneceu aumentada, havendo aumento também de MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MCP-1/CCL2 e RANTES/CCL5. A detecção de níveis mais elevados das quimiocinas da família CCL após 8 semanas de infecção pode se dever ao acúmulo de células mononucleares no tecido cerebral, apesar de os dados de microscopia intravital mostrarem que nessa fase a migração celular já não é tão intensa, assim como a detecção de MIG/CXCL9 nos dois tempos estudados. Não foram determinados quais tipos celulares estavam produzindo as quimiocinas detectadas, isto é, se estas estavam sendo produzidas pelas células residentes do tecido ou pelas células migratórias e quais eram os tipos celulares destas, podendo ser este tema para próximos estudos. Assim sendo, MIG/CXCL9, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MCP-1/CCL2 e RANTES/CCL5 parecem estar relacionadas ao recrutamento celular no acometimento neurológico da PCM. O envolvimento dessas quimiocinas no desenvolvimento da PCM já foi demonstrado em modelos experimentais de PCM pulmonar induzidos por via intratraqueal ou intravenosa (Souto *et al.*, 2003; Calich *et al.*, 1998; Calich & Kashino, 1998). É interessante, ainda, notar que Lyon *et al.* (2009) observaram, em pacientes com PCM crônica e quadro clínico localizado, que MIG/CXCL9 foi um marcador associado à resposta imunológica do tipo Th1, mostrando-se mais adequado para estimar a persistência de atividade inflamatória que os anticorpos IgG específicos.

Não foram detectados níveis estatisticamente significativos nas dosagens teciduais de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL4 e KC/CXCL1. O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória produzida por uma grande variedade de células, cuja importância nos mecanismos de defesa do hospedeiro contra o Pb é reconhecida na literatura. Calich *et al.* (1985) definiram diversas linhagens de

camundongos em relação à susceptibilidade à infecção pelo Pb, separando-as em linhagens sensíveis, intermediárias, resistentes e extremamente resistentes. Estudos posteriores demonstraram diferentes padrões de resposta imune exibidas por linhagens classificadas nos pólos sensíveis e resistentes. Assim, camundongos resistentes apresentaram níveis altos de TNF- $\alpha$  durante a infecção, ao passo que animais sensíveis apresentaram baixa produção da citocina. Starobinas *et al.*, por outro lado, encontraram baixos níveis de TNF- $\alpha$  durante todo o período de infecção em ambas as linhagens (Calich *et al.*, 1998). Os animais C57BL/6 podem ser classificados como intermediários quanto à susceptibilidade à infecção pelo Pb, podendo ser essa a razão dos baixos níveis detectados da citocina. Do mesmo modo, estudos com as linhagens resistentes e susceptíveis de camundongos demonstraram que estes produziam IFN- $\gamma$  transitoriamente e em baixos níveis, ao passo que aqueles produziam persistentemente altos níveis da citocina, com pico na segunda semana pós-infecção. O papel do IFN- $\gamma$  também é reconhecido na resposta imune contra o Pb e o perfil de susceptibilidade intermediária dos animais C57BL/6 pode estar relacionado aos baixos níveis detectados, assim como o tempo de infecção em que foram feitas as observações. Aspecto interessante é a relação entre IL12 (potente indutora da secreção de IFN- $\gamma$ ) e a infecção pelo Pb. Sabe-se que essa citocina exerce um efeito protetor no curso da doença e esse efeito é mais provavelmente exercido pela diminuição da produção de citocinas do tipo Th2 (IL4 e IL10) do que pelo aumento sustentado da síntese de IFN- $\gamma$  (Calich *et al.*, 1998). Um achado similar ocorre em camundongos infectados sistemicamente com *C. albicans*, mostrando que a produção de IFN- $\gamma$  ocorre em animais com ambos os padrões de sensibilidade e de resistência e

que o desenvolvimento da resposta Th1 correlaciona-se com os níveis de IL12 e não com os de IFN- $\gamma$  (Romani *et al.*, 1994). Assim, o estudo do papel de IL12 no modelo de NPCM pode ser assunto para futuras investigações. A produção de IL4 não foi observada neste estudo e seu papel no curso da infecção pelo Pb é motivo de controvérsias. Arruda *et al.* (2004) sugeriram que IL4 pode exercer um papel de proteção ou de exacerbação da doença dependente do padrão genético do hospedeiro. No entanto há trabalhos sugerindo não haver papel algum para essa citocina na doença, descrevendo sua detecção somente após períodos tardios de infecção (após 12 semanas), em níveis baixos e transitórios e em ambas as linhagens polares de susceptibilidade (Calich *et al.*, 1998). Por fim, apesar de haver descrições da relação entre KC/CXCL1 e o recrutamento de neutrófilos na fase aguda da infecção pulmonar experimental, não foram observados níveis significativos da quimiocina na infecção crônica cerebral.

A análise histológica das lesões demonstrou que a infecção experimental por via intracraniana leva à formação de alterações histopatológicas similares às lesões pseudotumorais e granulomatosas da NPCM anteriormente descritas (Nóbrega & Spina-França, 1994), inclusive havendo disseminação das lesões para outras áreas do encéfalo com a presença do fungo sendo revelada pelo método de coloração histológica de Grocott.

Assim, o desenvolvimento de um modelo experimental de NPCM em camundongos, os quais apresentaram lesões histopatologicamente semelhantes às lesões humanas, manifestaram, frente ao protocolo SHIRPA, sintomatologia diversa gerada pela infecção (assim como foi definido pela

revisão sistemática da literatura), pode auxiliar no aprofundamento de inúmeras questões relativas à doença (como aquelas levantadas pela análise da casuística com relação à susceptibilidade genética à infecção neurológica, características predisponentes do fungo e papel do sistema imune). Desse modo, mesmo apesar das limitações dos modelos experimentais, estudos futuros poderão avaliar fatores envolvidos no desenvolvimento e no tratamento da NPCM de modo a minimizar as descritas conseqüências dessa complicação grave da PCM.

***Conclusões***

## 7 CONCLUSÕES

1. A revisão sistemática da literatura da NPCM apontou para a elevada mortalidade e para a determinação de seqüelas nos pacientes, as quais alertam para que a NPCM deva ser considerada no diagnóstico diferencial de processos expansivos e/ou meningoencefalíticos do SNC;
2. A análise dos casos sugeriu que o diagnóstico e o tratamento precoces mostraram-se eficazes, sendo observada grande importância do exame neurológico. A história familiar positiva e a diferença com relação à procedência dos pacientes sinalizam para a possibilidade de mais estudos no sentido de determinar fatores de susceptibilidade envolvidos na infecção neurológica;
3. O modelo murino de NPCM foi definido pela inoculação, por via intracraniana, de  $10^6$  células leveduriformes de Pb18/animal. Caracterizado por alterações comportamentais, aumento nas etapas de rolamento e de adesão leucocitárias nos vasos da pia-máter somente após 4 semanas de infecção, aumento das enzimas MPO e NAG após 4 e 8 semanas de infecção, elevação dos níveis da quimiocina MIG/CXCL9 após 4 semanas de infecção e de MIG/CXCL9, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MCP-1/CCL2 e RANTES/CCL5 após 8 semanas de infecção, observação de lesões pseudotumorais e granulomatosas, com disseminação das lesões para outras áreas do encéfalo.

## ***Referências bibliográficas***

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PODER, J.S. Citocinas. In: \_\_\_\_\_. **Imunologia celular e molecular**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003. p. 235-240.

ARAÚJO, J.C.; WERNECK, L.; CRAVO, M.A. South american blastomycosis presentig as a posterior fossa tumor. **Journal of Neurosurgery**, v. 49, p. 425-428. 1978.

ARGOLLO, A.; REIS, V.L.L.; NIEMEYER, P. *et al.* Central nervous system involvement in south american blastomycosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 1, p. 37-39. 1978.

ARRUDA C.; KASHINO S.S.; FAZIOLI R.A. *et al.* A primary subcutaneous infection with *Paracoccidioides brasiliensis* leads to immunoprotection or exacerbated disease depending on the route of challenge. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 3, p. 308-316. 2007.

ARRUDA, C.; VALENTE-FERREIRA, R.C.; PINA A. *et al.* Dual role of interleukin-4 (IL-4) in pulmonary paracoccidioidomycosis: endogenous IL-4 can induce protection or exacerbation of disease depending on the host genetic pattern. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 7, p. 3932-3940. 2004.

AUN, R.A. Blastomicose do cerebelo: forma tumoral. **Arquivos do Hospital da Santa Casa de São Paulo**, v. 3, n. 1, p. 63-70. 1957.

BARCELOS, L.S.; TALVANI, A.; TEIXEIRA, A.S. *et al.* Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 78, p. 352-358. 2005.

BLASI, E.; BARLUZZI, R.; MAZZOLLA, R. *et al.* Experimental model of intracerebral infection with *Cryptococcus neoformans*: roles of phagocytes and opsonization. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 9, p. 3682-3688. 1992.

BONECCHI, R.; GALLIERA, E.; BORRONI, E.M. *et al.* Chemokines and chemokine receptors: an overview. **Frontiers in Bioscience**, v.1, n. 14, p. 540-551. 2009.

BRAGA, F.M.; OKAMURA, M. Blastomicose medular: apresentação de um caso cirúrgico. **Seara Médica Neurocirúrgica (São Paulo)**, v. 1, n. 4, p. 435-441. 1973.

BRANDÃO, C.B.P.A.; BALDI, J.; STROPPIA, A.T. *et al.* Blastomicose sul-americana: abscesso cerebral e forma pulmonar tumoral. **HE Revista**, v. 1, n. 2, p. 137-141. 1974.

CALICH, V.L.; KASHINO, S.S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 5, p. 615-623. 1998.

CALICH, V.L.; SINGER-VERMES, L.M.; SIQUEIRA, A.M. *et al.* Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 66, n. 5, p. 585-594. 1985.

CALICH, V.L.; VAZ, C.A.; BURGER, E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Research in Immunology**, v. 149, n. 4-5, p. 407-417. 1998.

CAMARGO, Z.P.; CANO R., L.E. Humoral Immunity. In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A. *et al.* **Paracoccidioidomycosis**. 1ª ed. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 187-201.

CAMPOS, E.C.; CADEMARTORI, M.S. Blastomicose mesencefálica. **Neurobiologia**, v. 26, n. 2, p. 83-102. 1963.

CANELAS, H.M.; PINTO LIMA F.; BITTENCOURT J.M.T. *et al.* Blastomicose do sistema nervoso. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 9, p. 203-222. 1951.

CAPILLA, J.; MAYAYO, E.; SERENA, C. *et al.* A novel murine model of cerebral scedosporiosis: lack of efficacy of amphotericin B. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, p. 1092-1095. 2004.

CASIELLO, A.; KLASS, R. A proposito de una blastomicosis paracoccidioides a forma de granuloma pulmonar y meningeo. **Revista Médica de Rosario**, v. 37, p. 748-768. 1947.

CHIARELLA, A.P.; ARRUDA, C.; PINA, A. *et al.* The relative importance of CD4+ and CD8+ T cells in immunity to pulmonary Paracoccidioidomycosis. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 1078-1088. 2007.

CHILLER, T.M.; LUQUE, J.C.; SOBEL, R.A. *et al.* Development of a murine model of cerebral aspergillosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 4, p. 574-577. 2002.

CO, D.O.; HOGAN, L.H.; IL-KIM, S. *et al.* T cell contributions to the different phases of granuloma formation. **Immunology Letters**, v. 92, p. 135-142. 2004.

COELHO, K.I.R.; DEFAVERI, J.; REZKALLAH-IWASSO; M.T. *et al.* Experimental Paracoccidioidomycosis. In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A. *et al.* **Paracoccidioidomycosis**. 1ª ed. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 87-108.

COLLI, B.O.; ASSIRATTI JR, J.A.; MACHADO, H.R. *et al.* Intramedullary spinal cord paracoccidioidomycosis. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 54, n. 3, p. 466-473. 1996.

CONANT, N.F.; HOWELL JR, A. The similarity of the fungi causing South American blastomycosis (paracoccidioidal granuloma) and North American blastomycosis (Gilchrist's disease). **Journal of Investigative Dermatology**, v. 5, p. 353-370. 1942.

CORRÊA; R.B.; PUCCIONI-SOHLER, M.; ARTEMENKO, S.R.T. *et al.* Apresentação neurológica incomum no curso de paracoccidioidomycose: relato de um caso. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 49, n. 4, p. 456-459. 1991.

COUTINHO, Z.F.; SILVA, D.; LAZERA, M. *et al.* Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 5, pp.1441-1454. 2002.

DA CUNHA, J.C.P.; MAGALDI, C.; BARROS, C. Localização nervosa da blastomycose sul-americana. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 12, p. 702-706. 1955.

DA SILVA, C.E.A.P.; CORDEIRO, A.F.; GOLLNER, A.M. *et al.* Paracoccidioidomycose do sistema nervoso central: relato de caso. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 58, n. 3-A, p. 741-747. 2000.

DA SILVA, S.H.M.; COLOMBO, A.L.; BLOTTA, M.H.S.L. *et al.* Detection of circulating gp43 antigen in serum, cerebrospinal fluid and bronchoalveolar lavage fluid of patients with paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3675-3680. 2003.

DA SILVA, S.H.M.; GROSSO, D.M.; LOPES, J.D. *et al.* Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* gp70 circulating antigen and follow-up of patients undergoing antimycotic therapy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4480-4486. 2004.

DANTAS, A.M.; YAMANE, R.; CAMARA, A.G. South american blastomycosis: ophthalmic and oculomotor nerve lesions. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 43, n. 4, p. 386-388. 1990.

DE ALMEIDA, S.M. Central nervous system paracoccidioidomycosis: an overview. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 2, p. 126-133. 2005.

DE ALMEIDA, S.M.; QUEIROZ-TELLES, F.; DOI, E.M. *et al.* Anti-gp43 antibodies in the cerebrospinal fluid of patients with central nervous system involvement by paracoccidioidomycosis. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 118, p. 864-868. 2002.

DE ALMEIDA, S.M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TEIVE, H.A.G. *et al.* Central nervous system paracoccidioidomycosis: clinical features and laboratorial findings. **The Journal of Infection**, v. 48, n. 2, p. 193-198. 2004.

DE ALMEIDA, S.M.; REBELATTO, C.L.K.; QUEIROZ-TELLES, F. *et al.* Major histocompatibility complex and central nervous system involvement by paracoccidioidomycosis. **The Journal of Infection**, v. 51, p. 2, p. 140-143. 2005.

DE AZEVEDO, A.P. Lesões do sistema nervoso central na doença de Lutz (blastomicose brasileira). **O Hospital**, v. 36, n. 4, p. 21-49. 1949.

DE CAMPOS, E.P.; BONASSER, F.; CERUTTI JR, C. *et al.* Itraconazole and fluconazole in three neuro-paracoccidioidomycosis patients. **A Folha Médica**, v. 112, n. 2, p. 173-176. 1996.

DE MOURA, L.P.; RAFFIN, C.N.; DEL NEGRO, G.M.B. *et al.* Paracoccidioidomicose evidenciando comprometimento medular tratada com sucesso por fluconazol. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 52, n. 1, p. 82-86. 1994.

DE SOUSA, M.R.; XAVIER, A.J.; VIEIRA, N.R.N. *et al.* Paracoccidioidomicose crônica disseminada com caquexia, lesão pulmonar grave e granuloma cerebral em paciente sem imunodeficiência adquirida. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 5, n. 4, p. 257-260. 1995.

DEL NEGRO, G. Localização supra-renal da blastomicose sul-americana. 1961. Tese – Universidade de São Paulo.

DEL NEGRO, G.; MELO E ALBUQUERQUE, F.J.; DE CAMPOS, E.P. Localização nervosa da blastomicose sul-americana. **Revista do Hospital das Clínicas**, v. 9, n. 1, p. 64-80. 1954.

DO VALLE, A.C.F.; SKACEL, M.; COSTA, R.L.B. *et al.* A case of intraspinal Paracoccidioidomycosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 40, n. 3, p. 203-207. 1998.

DOMINGUEZ, A.C. Paracoccidioides del sistema nervioso central. **Gaceta Medica de Caracas**, v. 70, p. 377-387. 1961.

DUARTE, A.L.W.P.; BARUFFA, G.; TERRA, H.B.G. *et al.* Paracoccidioidomicose sistêmica com envolvimento do sistema nervoso central. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 4, p. 439-442. 1999.

DUARTE, R.D.; MAIA, A.L.; DUARTE, J.A. *et al.* Paracoccidioidomicose cerebral: relato de um caso e revisão de literatura. **Revista Pesquisa Médica**, v. 31, n. 2, p. 37-41. 1997.

ELIAS JR, J.; DOS SANTOS, A.C.; CARLOTTI JR, C.G. *et al.* Central nervous system paracoccidioidomycosis: diagnosis and treatment. **Surgical Neurology**, v. 63, n. S1:13–S1:21. 2005.

FAGUNDES-PEREYRA, W.J.; CARVALHO, G.T.C.; GÓES, A.M. *et al.* Paracoccidioidomycose do sistema nervoso central: análise de 13 casos. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 64, n. 2-A, p. 269-276. 2006.

FARAGE FILHO, M.; BRAGA, M.R.G.; KUHN, M.L.S. Granuloma blastomicótico na medula cervical: registro de um caso. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 35, n. 2, p. 151-155. 1977.

FIALHO, A. Um caso de localização cerebral da micose de Lutz. **Jornal Brasileiro de Neurologia**, v. 1, p. 378-383. 1949.

FINAMOR, L.P.; MUCCIOLI, C.; MARTINS, M.C. *et al.* Ocular and central nervous system Paracoccidioidomycosis in a pregnant woman with acquired immunodeficiency syndrome. **American Journal of Ophthalmology**, v. 134, n. 3, p- 456-459. 2002.

FORJAZ, M.H.H.; FISCHMAN, O.; DE CAMARGO, Z.P. *et al.* Paracoccidioidomycose em índios brasileiros da tribo Suruí: estudo clínico-laboratorial de 2 casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 5, p. 571-575. 1999.

FRANÇA JR, M.C.; DE CASTRO, R.; BALTHAZAR, M.L.F. *et al.* Focal status epilepticus as the first manifestation of Paracoccidioidomycosis. **European Journal of Neurology**, v. 12, p. 73-74. 2005.

FRANCO, F.M. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 25, n. 1, p 5-18. 1987.

FRANCO, G.M.; HALLACK, K.A.; DE SOUZA, S.F. *et al.* Granuloma de cerebello: relato de um caso. **HU Revista**, v. 12, n. 1, p. 51-60. 1985.

FRANCO, M.; MENDES, R.P.; MOSCARDI-BACCHI, M. *et al.* Paracoccidioidomycosis. **Baillière's Clinical Tropical Medicine and Communicable Diseases**, v. 4, p. 185-220. 1989.

GASPARETTO, E.L.; LIU, C.B.; DE CARVALHO NETO, A. *et al.* Central nervous system paracoccidioidomycosis: imaging findings in 17 cases. **Journal of Computer Assisted Tomography**, v. 27, n. 1, p.12-17. 2003.

GONZALES, G.; BOGGINO, J. Para la casuística de las formas meningoencefálicas de la enfermedad de Lutz-Splendore-Almeida (granuloma paracoccidioidico). **Anales de la Facultad de Ciencias Médicas (Asunción)**, v. 4, n. 19, p. 66-78. 1944.

GUERREIRO, C.A.M.; CHULUC, S.S.D.; BRANCHINI, M.L.N. A new treatment for large cerebral paracoccidioidomycosis. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 45, n. 4, p. 419-423. 1987.

GURGEL, N. Blastomycose generalizada. **Brazil-Médico**, v. 34, p. 540-541. 1920.

GUZMÁN, J.R. Paracoccidioidosis del sistema nervioso central: presentación de dos casos. **Investigación Clínica**, v. 15, p. 87-101. 1965.

HUTZLER, R.U.; BRUSSI, M.L.P.; CAPITANI, C.M. *et al.* Acometimento neurológico da paracoccidioidomicose avaliado pela tomografia computadorizada de crânio. **Revista Paulista de Medicina**, v. 103, n. 5, p. 243-244. 1985.

INVERNICI, L.A.; DE BUONE, M.R.; RIEGGER, A. *et al.* Pseudotumores cerebrais por paracoccidioidomicose. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, v. 15, n. 3, p. 119-122. 2004.

INZA, M.A.; NEGRONI, R.; MONTEVERDE, D.A. *et al.* Paracoccidioidomycosis con localización restringida al sistema nervioso. **Revista Neurológica Argentina**, v. 11, n. 2, p. 71-77. 1985.

KAWAYAMA, T.; SAWA, A.; SUEYASU, Y. *et al.* Chronic pulmonary paracoccidioidomycosis in a Japanese adult. **Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi**, v. 34, n. 8, p. 911-915. 1996.

KERFOOT, S.M.; KUBES, P. Overlapping roles of P-selectin and alpha 4 integrin to recruit leukocytes to the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Immunology**, v. 169, p. 1000-1006. 2002.

KUNA, P.; ALAM, R.; RUTA, U. *et al.* RANTES induces nasal mucosal inflammation rich in eosinophils, basophils, and lymphocytes in vivo. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 157, p. 873-879. 1998.

LACAZ, C.S.; ASSIS, J.L.; BITTENCOURT, J.M.T. Micoses do Sistema Nervoso. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 5, p. 1-52. 1947.

LACERDA, G.B.; ARCE-GOMEZ, B.; TELLES FILHO, F.Q. Increased frequency of HLA-B40 in patients with Paracoccidioidomycosis. **Journal of Medical Veterinary Mycology**, v. 26, p. 253-256. 1988.

LACKNER, P.; BEER, R.; HEUSSLER, V. *et al.* Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 32, p. 177-188. 2006.

LAMBERTUCCI, J.R.; LANA-PEIXOTO, M.A.; PITELLA, J.E.H. Paracoccidioidomicose do sistema nervoso central. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 4, p. 395-396. 2001.

LANIADO-LABORÍN, R. Coccidioidomycosis and other endemic mycoses in Mexico. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 24, p. 249-258. 2007.

LEAL FILHO, M.B.; BORGES, G.; DA SILVA JR, G.R. *et al.* Paracoccidioidomicose em hemisfério cerebral e tronco encefálico: relato de caso. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 64, n. 3-A, p. 686-689. 2006.

LEMMI, O.; PIMENTA, A.M. Granuloma paracoccidióidico cerebral: a propósito de um caso operado. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 18, p. 58-63. 1960.

LEVY, J.A.; DILLON, N.; MENEZES NETO, J.R. *et al.* Meningite na blastomicose sul-americana. **Revista Paulista de Medicina**, v. 55, p. 518-520. 1959.

LEY, K. **Physiology of Inflammation**. 1ª ed. New York: Oxford University Press, 2001. 546p.

LIMA, F.X.P. Contribuição ao estudo clínico e terapêutico da blastomicose sul-americana visceral. 1952. Tese – Universidade de São Paulo.

LOETSCHER, P.; SEITZ, M.; CLARK-LEWIS, I. *et al.* Activation of NK cells by CC chemokines. Chemotaxis, Ca<sup>2+</sup> mobilization, and enzyme release. **Journal of Immunology**, v. 156, p. 322-327. 1996.

LORENZONI, P.J.; CHANG, M.R.; PANIAGO, A.M.M. *et al.* Meningite paracoccidioidomicótica: relato de caso. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 60, n. 4, p.1015-1018. 2002.

LYON, A.C.; TEIXEIRA, M.M.; ARAÚJO, S.A. *et al.* Serum levels of sTNF-R1, sTNF-R2 and CXCL9 correlate with disease activity in adult type paracoccidioidomycosis. **Acta Tropica**, v. 109, n. 3, p. 213-218. 2009.

MACHADO FILHO, J.; MIRANDA, J.L. Considerações relativas à blastomicose sul-americana. Localizações, sintomas iniciais, vias de penetração e disseminação em 313 casos consecutivos. **O Hospital**, v. 58, n. 1, p. 99-137. 1960.

MACHADO, A.B.M. Vascularização do sistema nervosa central e barreiras encefálicas. In: \_\_\_\_\_. **Neuroanatomia Funcional**. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 87-99.

MACKINNON, J.E. Pathogenesis of South American blastomycosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, n. 6, p. 487-494. 1959.

MAFFEI, W.E. Micose do sistema nervoso. **Anais da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 29, p. 297-322. 1943.

MAGALHÃES, A.C.A.; BACHESCHI, L.A.; CARAMELLI, P. *et al.* Paracoccidioidomicose do sistema nervoso central: estudo de cinco casos por ressonância magnética. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 48, n. 2, p. 94-97. 1993.

MALUF, M.L.F.; PEREIRA, S.R.C.; TAKAHACHI, G. *et al.* Prevalência de paracoccidioidomicose-infecção determinada através de teste sorológico em doadores de sangue na região Noroeste do Paraná, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p.11-16. 2003.

MANIS, J.P. Knock out, knock in, knock down - genetically manipulated mice and the Nobel Prize. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 24, p. 2426-2429. 2007.

MARCHIORI, E.; FREITAS, M.A.L.; LIMA, R.A.M. Paracoccidioidomicose medular: relato de um caso. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 47, n. 2, p. 224-229. 1989.

MARCHIORI, E.S. Aspectos radiológicos das lesões osteoarticulares na blastomicose sul americana. 1979. Tese – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

MARQUES DA SILVA, S.H.; COLOMBO, A.L.; BLOTTA, M.H.S.L. *et al.* Detection of circulating gp43 antigen in serum, cerebrospinal fluid, and bronchoalveolar lavage fluid of patients with paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3675-3680. 2003.

MARQUES, S. A. Paracoccidioidomicose: centenário do primeiro relato de caso. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, n. 3, p. 271-273. 2008.

MARTINEZ, R. Paracoccidioidomicose (Blastomicose Sul-Americana). In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 3ªed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 1373-1375.

MAYAYO, E.; LÓPEZ-ARACIL, V.; FERNÁNDEZ-TORRES, B. *et al.* Report of an imported cutaneous disseminated case of paracoccidioidomycosis. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 24, n. 1, p. 44-46. 2007.

MCEWEN, J.G.; BEDOYA, V.; PALATINO, M.M. *et al.* Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by inhalation of conidia. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 25, p. 165-175. 1987.

MCEWEN, J.G.; GARCIA, A.M.; ORTIZ, B.L. *et al.* In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Archives of Medical Research**, v. 26, n. 3, p. 305-306. 1995.

MENDES, R.P. Paracoccidioidomicose (Blastomicose Sul-Americana). In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 3ªed. São Paulo: Atheneu. 2005. p. 1383-1390.

MINGUETTI, G. Tomografia computadorizada dos granulomas blastomicóticos encefálicos. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 25, n. 3, p. 99-107. 1983.

MONTENEGRO, J. Acerca da inoculabilidade da blastomicose no Brasil. **Brazil-Médico**, v. 41, p. 808-812. 1927.

MORATO-FERNANDEZ, R.N.; BERALDO, P.S.S.; MARINI, M. *et al.* Paracoccidioidomicose de localização intramedular e cerebral. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 49, n. 2, p. 192-197. 1991

NEGRONI, R.; HELOU, S. Problemas clínicos en micología médica: problema nº 3. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 20, p. 31-33. 2003.

NETTO, C.F. Contribuição para o estudo imunológico da blastomicose de Lutz (blastomicose sul-americana). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 21, p. 99-194. 1961.

NIÑO, F. Granuloma paracoccidióidico en la República Argentina: síntesis de nuestros conocimientos actuales. **Boletín del Instituto de Clínica Quirúrgica**, v. 22, p. 335-342. 1946.

NÓBREGA, J.P.S.; SPINA-FRANÇA, A. Neuroparacoccidioidomycosis. In: FRANCO, M. *et al.* **Paracoccidioidomycosis**. 1ª ed. Boca Raton: CRC Press. 1994. p. 321-330.

NOHMI, N.; ROCHA, F.; NETTO, C.F. Paracoccidioidomicose de localização cerebral. **Revista da Associação Médica de Minas Gerais**, v. 32, n.1/4, p. 38-40. 1981.

NOLETO, P.A.; DE LIMA, D.B.; PINTO, J.R. *et al.* Paracoccidioidomicose: diagnóstico diferencial com tumor cerebral. **Ars Cvrandi**, v. 16, p. 88-96. 1983.

OLIVEIRA, H.A.; ALMEIDA, A.L.G.; LYRO, A.S. *et al.* Blastomicose cerebral: forma tumoral. **Revista Médica do HSE**, v. 23, p. 247-248. 1971.

PACHECO, R.A.B.; ARRUDA, W.A.; HUNHEVICZ, S.C. *et al.* Thoracic intraspinal paracoccidioidomycosis. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 54, n. 3, p. 474-478. 1996.

PAGLIOLI, E.; TIBIRIÇÁ, P.Q.T.; BECKER, P.F.L. Micoses do sistema nervoso: estudo de dois casos. **Anais da Faculdade de Medicina de Porto Alegre**, v. 2, p. 171-182. 1951.

PANIAGO, A.M.; DE OLIVEIRA, P.A.; AGUIAR, E.S. *et al.* Neuroparacoccidioidomycosis: analysis of 13 cases observed in an endemic area in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 4, p. 414-420. 2007.

PEDRO, R.J.; BRANCHINI, M.L.M.; DE LUCCA, R.S. *et al.* Paracoccidioidomycose de sistema nervoso central: a propósito de dois casos. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 22, n. 5, p. 269-274. 1980.

PEÑA, C.E. Compromiso del sistema nervioso central em blastomycosis suramericana. **Mycologia Applicata**, v. 33, p. 280-288. 1967.

PEREIRA, A.A. Paracoccidioidomycose gastro-entérica: estudo radiológico. 1983. Tese – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

PEREIRA, J.M.; JACOBS, F. Um caso de blastomycose cutânea com accesos epilépticos. **Annaes Paulista de Medicina e Cirurgia**, v. 10, n. 1, p. 217-219. 1919.

PEREIRA, W.C.; RAPHAEL, A.; SALLUM, J. Lesões neurológicas na blastomycose sul-americana: estudo anatomopatológico de 14 casos. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 23, n. 2, p. 95-112. 1965.

PEREIRA, W.C.; RAPHAEL, A.; TENUTO, R.A. *et al.* Localização encefálica da blastomycose sul-americana: considerações a propósito de 9 casos. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 23, n. 2, p. 113-126. 1965.

PERINO, F.R.; LAVARELLO, A.; DIMIER, H.G. Blastomycosis sudamericana: granuloma paracoccidioidico de lozalización pulmonar y cerebral. **La Prensa Médica Argentina**, v. 49, n. 11, p. 607-613. 1962.

PIMENTA, A.M.; MARQUES, J.S.; SETTANI, F.A.P. Blastomycose cerebral, forma tumoral. **Seara Médica Neurocirúrgica (São Paulo)**, v. 1, n. 1, p. 73-84. 1972.

PINTO, J.P.; DA SILVA, A.Q.; DA SILVEIRA, O. Blastomycose cerebral: forma isolada com sintomatologia de tumor cerebral. **Revista Médica do Paraná**, v. 28, n. 2, p. 57-62. 1959.

PLÁ, M.P.; HARTUNG, C.; MENDOZA, P. *et al.* Neuroparacoccidioidomycosis: case reports and review. **Mycopathologia**, v. 127, p. 139-144. 1994.

PRADO, J.M.; INSAUSTI, T.; MATERA, R.F. Contribución al estudio de las coccidio y paracoccidiomycosis del sistema nervioso. **Archivos de Neurocirugía**, v. 3, p. 90-106. 1946.

RANSOHOFF, R.M. The chemokine system in neuroinflammation: an update. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. 152-156. 2002.

RAPHAEL, A. Localização nervosa da blastomicose sul-americana. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 24, n. 2, p. 69-90. 1966.

RAPHAEL, A.; PEREIRA, W.C. Granuloma blastomicótico cerebral: relato de um caso tratado cirurgicamente e com anfotericina B. **Revista do Hospital das Clínicas**, v. 17, p. 430-433. 1962.

REED, L.J.; MUENCH, H.A. Simple method of estimating fifty per cent endpoints. **American Journal of Hygiene**, v. 27, p. 493-497. 1938.

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

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

RITTER, F.H. Tumor cerebral granulomatoso por paracoccidióide: a propósito de dois casos operados. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 6, p. 352-359. 1948.

ROCCA, E.D.; FRANCO, J. Granuloma micótico cerebral. **Revista de Neuropsiquiatria**, v. 2, p. 107-110. 1957.

RODACKI, M.A.; DE TONI, G.; BORBA, L.A. *et al.* Paracoccidioidomycosis of the central nervous system: CT findings. **Neuroradiology**, v. 37, p. 636-641. 1995.

ROGERS, D.C.; FISHER, E.M.C.; BROWN, S.D.M. *et al.* Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. **Mammalian Genome**, v. 8, p. 711-713. 1997.

ROGERS, D.C.; PETERS, J.; MARTIN, J.E. *et al.* SHIRPA, a protocol for behavioral assessment: validation for longitudinal study of neurological dysfunction in mice. **Neuroscience Letters**, v. 306, p. 89-92. 2001.

ROMANI, L.; MENCACCI, A.; TONNETTI, L. *et al.* Interleukin-12 but not interferon-gamma production correlates with induction of T helper type-1 phenotype in murine candidiasis. **European Journal of Immunology**, v. 24, n. 4, p. 909-915. 1994.

SAMMARTINO, R. Absceso cerebeloso por *Paracoccidioides brasiliensis*. **Archivos de La Sociedad Argentina de Anatomia Normal y Patológica**, v. 9, p. 360-367. 1947.

SARAVIA, J.G.; RESTREPO, M.T.; TORO, G.G. *et al.* Paracoccidioidomycosis del sistema nervioso central. **Revista Facultad de**

**Medicina de la Universidad Nacional de Colômbia**, v. 39, n. 1, p. 27-37. 1973.

SEMPERE, A.P.; BERENQUER-RUIZ, L.; LEZCANO-RODAS, M. *et al.* Punción lumbar: indicaciones, contraindicaciones, complicaciones y técnica de realización. **Revista de Neurología**, v. 45, n. 7, p. 433-436. 2007.

SINGER-VERMES, L.M.; SAKAMOTO, T.N.; VAZ, C.A. *et al.* Influence of the genetic pattern and sex of mice in experimental paracoccidioidomycosis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 101, n. 1, p. 114-120. 1995.

SOARES, C.M.A.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; FELIPE, M.S.S. *et al.* A Centennial: Discovery of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathologia**, v. 165, p. 179-181. 2008.

SOUTO, J.T.; ALIBERTI, J.C.; CAMPANELLI, A.P. *et al.* Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice is modulated by interferon-gamma. **American Journal of Pathology**, v. 163, n. 2, p. 583-590. 2003.

SOUZA, D.G.; SOARES, A.C.; PINHO, V. *et al.* Increased mortality and inflammation in tumor necrosis factor-stimulated gene-14 transgenic mice after ischemia and reperfusion injury. **American Journal of Pathology**, v. 160, p. 1755-1765. 2002.

SPLENDORE, A. Blastomycoses americanas. **Brazil-Médico**, v. 24, p. 153-157. 1910.

TEIVE, H.A.G.; ARRUDA, W.O.; RAMINA, R. *et al.* Paracoccidioidomycosis granuloma simulating posterior fossa tumour. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 84, p. 562-563. 1991.

TRISTANO, A.G.; CHOLLET, M.E.; WILLSON, M.; PEREZ, J.; TROCCOLI, M. Central nervous system Paracoccidioidomycosis: case report and review. **Investigación Clínica**, v. 45, n. 3, p. 277-288. 2004.

TUROVETZKY, A.; KOREN, F.; NEGRONI, R. *et al.* Lesión expansiva en cerebelo por *Paracoccidioides brasiliensis*. **Revista Argentina de Micología**, v. 3, n. 3, p. 9-12. 1980.

VAN DAMME, P.A.; BIERENBROODSPOT, F.; TELGTT, D.S. *et al.* A case of imported paracoccidioidomycosis: an awkward infection in the Netherlands. **Medical Mycology**, v. 44, n. 1, p. 13-18. 2006.

VILELA, M.C.; MANSUR, D.S.; LACERDA-QUEIROZ, N. *et al.* The chemokine CCL5 is essential for leukocyte recruitment in a model of severe Herpes simplex encephalitis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1153, p. 256-263. 2009.

VILELA, M.C.; MANSUR, D.S.; LACERDA-QUEIROZ, N. *et al.* Traffic of leukocytes in the central nervous system is associated with chemokine up-regulation in a severe model of herpes simplex encephalitis: an intravital microscopy study. **Neuroscience Letters**, v. 445, n. 1, p. 18-22. 2008.

VILLA, L.A., TOBÓN A.; RESTREPO, A. *et al.* Central nervous system paracoccidioidomycosis: report of a case successfully treated with itraconazole. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, n. 4, p. 231-234. 2000.

WANKE, B.; LONDERO, A.T. Epidemiology and Paracoccidioidomycosis Infection. In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A. *et al.* **Paracoccidioidomycosis**. 1<sup>a</sup> ed. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 109-120.

WINKLER, F.; ANGELE, B.; PFISTER, H.W. *et al.* Simvastatin attenuates leukocyte recruitment in experimental bacterial meningitis. **International Immunopharmacology**, v. 9, n. 3, p. 371-374. 2009.

WITTIG, E.O.; KASTING, G.; LEAL, R. Neuroblastomiose: registro de três casos. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 26, n. 1, p. 73-79. 1968.