



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA

RICARDO DE SOUZA CAVALCANTE

COMPARAÇÃO DO COTRIMOXAZOL COM O ITRACONAZOL NO TRATAMENTO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Doutor

Orientador: Prof. Titular Rinaldo Poncio Mendes

BOTUCATU – SP
2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

RICARDO DE SOUZA CAVALCANTE

**COMPARAÇÃO DO COTRIMOXAZOL COM O ITRACONAZOL NO
TRATAMENTO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Doutor

Orientador: Prof. Titular Rinaldo Poncio Mendes

**BOTUCATU – SP
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Cavalcante, Ricardo de Souza.

Comparação do cotrimoxazol com o itraconazol na paracoccidioidomicose /
Ricardo de Souza Cavalcante. - Botucatu, 2013

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina
de Botucatu

Orientador: Rinaldo Poncio Mendes

Capes: 40101096

1. Paracoccidioidomicose - Diagnóstico. 2. Fibrose pulmonar. 3. Enfisema
pulmonar. 4. Pulmões – Doenças – Tratamento. 5. Espirometria. 6. Monócitos.
7. Tomografia.

Palavras-chave: Fibrose e enfisema; Itraconazol; Monócitos;
Paracoccidioidomicose; Sulfametoxazol-trimetoprim (cotrimoxazol).



Dedicatória

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e à minha esposa

“A esperança é um sonho que caminha”.

Aristóteles (384 – 322 a.c)



Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, a família, a saúde e a oportunidade do trabalho

Aos meus queridos pais, José e Heliani, pela dedicação que sempre me prestaram e pelo caminho que me ensinaram a trilhar permitindo todas as minhas conquistas

À minha amada esposa Loren, pelo companheirismo e apoio incondicional, pela paciência e a compreensão nos momentos mais difíceis

Ao amigo e professor Rinaldo “Tietê” Poncio Mendes, pelos ensinamentos que me transmitiu em todos esses anos de convívio, pela paciência e o companheirismo na execução deste trabalho

Ao amigo e professor Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza, pelo apoio e incentivo

Ao amigo James Venturini sem o qual este trabalho não se realizaria

Ao grupo de pesquisa em micoses: Daniela Vanessa Moris de Oliveira, Tatiane F Silvestre, Adriele D Levorato, Camila M Marchetti, Priscila Zacarias de Azevedo, Vanessa Manfio e Jéssica CBN de Andrade



Colaboradores

COLABORADORES

I. COMPARAÇÃO DO ITRACONAZOL COM O COTRIMOXAZOL NO TRATAMENTO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE

Tatiane Fernanda Sylvestre

Adriele Dandara Levorato

Lídia Rachel de Carvalho

II. DETERMINAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DE MONÓCITOS DE PACIENTES COM PARACOCCIDIOIDOMICOSE ANTES E APÓS TRATAMENTO ANTIFÚNGICO

James Venturini

Camila Martins Marchetti

Bárbara Casella Amorim

Marjorie de Assis Golim

Priscila Zacarias de Azevedo

Maria Sueli Parreira de Arruda

III. SEQUELAS PULMONARES NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE. CORRELAÇÃO ENTRE VARIÁVEIS CLÍNICAS, IMUNOLÓGICAS MORFOLÓGICAS E FUNCIONAIS.

Marcela de Oliveira

Sérgio Marrone Ribeiro

Hugo Hyung Bok Yoo

Diana Rodrigues de Pina Miranda

Lídia Rachel de Carvalho



Sumário

SUMÁRIO

Seção	Página
Resumo	01
Primeiro artigo: Comparação do itraconazol com o cotrimoxazol no tratamento da paracoccidioidomicose	05
Segundo artigo: Determinação fenotípica e funcional de monócitos de pacientes com paracoccidioidomicose antes e após tratamento antifúngico	32
Terceiro artigo: Sequelas pulmonares na paracoccidioidomicose. Correlação entre variáveis clínicas, imunológicas morfológicas e funcionais	50
Conclusões	67



Resumo

RESUMO

Esta tese “**Comparação do cotrimoxazol com o itraconazol no tratamento da paracoccidioidomicose**” foi elaborada no formato de três artigos científicos, cujos resumos são apresentados abaixo.

COMPARAÇÃO DO ITRACONAZOL COM O COTRIMOXAZOL NO TRATAMENTO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE

Introdução. Não há estudos publicados que tenham comparado itraconazol (ITC), associação sulfametoxazol-trimetoprim (cotrimoxazol – CMX) e ITC seguido de CMX (ITC/CMX), no tratamento da paracoccidioidomicose (PCM). Este estudo foi realizado para comparar eficácia, efetividade, segurança e tempos necessários para se alcançar cura clínica e sorológica em pacientes com PCM tratados com ITC ou CMX, antifúngicos mais utilizados nessa micose. **Métodos.** Foi conduzido um estudo *quasi-experimental* em 177 pacientes com diagnóstico confirmado ou provável de PCM, virgens de tratamento ou com doença reativada e há pelo menos seis meses sem antifúngicos. Foram consideradas duas fases no tratamento: 1) inicial ou de ataque, mantido até se obter cura clínica e normalização da velocidade de hemossedimentação; 2) complementar, mantido até obtenção da cura sorológica. A comparação de médias foi feita pelo teste de Mann-Whitney, a de frequências pelo teste do chi-quadrado e das variáveis em função do tempo pelas curvas de Kaplan-Meier e regressão de Cox, utilizando-se $p \leq 0,05$ para indicação de diferenças significantes. **Resultados.** No tratamento de ataque, 47 pacientes tratados com ITC e 130 que receberam CMX não revelaram diferença de eficácia e efetividade, mas foi menor o tempo de cura clínica para os que receberam ITC que os tratados com CMX (105 vs 159 dias; $p=0,001$), em especial pacientes com forma crônica. No tratamento complementar, eficácia e efetividade foram similares nos três tratamentos, porém o tempo de cura sorológica foi menor com ITC (161 dias) e CMX (495 dias) do que com ITC/CMX (881 dias) [$p=0,02$]. Os preditores independentes de menor tempo de cura sorológica foram tratamento com ITC [razão de risco = 6,61; IC95% (2,01-21,75)] e CMX [razão de risco = 5,11; IC95% (1,91-13,67)]. A prevalência de

efeitos colaterais foi menor com ITC (6,4%) do que com CMX (20,0%; $p=0,03$).

Conclusão. Este estudo revelou cura clínica mais precoce e maior tolerância ao ITC, que permitem considerá-lo antifúngico de primeira escolha no tratamento da PCM.

DETERMINAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DE MONÓCITOS DE PACIENTES COM PARACOCCIDIOIDOMICOSE ANTES E APÓS TRATAMENTO ANTIFÚNGICO

Introdução. A resposta imune frente à paracoccidiodomicose (PCM) tem revelado a importância da participação dos monócitos, precursores dos macrófagos teciduais. Recentemente, foi demonstrado, em outras doenças, subpopulações de monócitos, com funções e comportamentos distintos. Há uma escassez de estudos relacionando o tratamento antifúngico e imunidade na PCM. O presente estudo visa buscar informações que agreguem conhecimentos da interação hospedeiro-parasita e biomarcadores que sejam úteis para o monitoramento imunológico durante o seguimento dos pacientes. Para tanto, o presente estudo teve por objetivo avaliar aspectos fenotípicos e funcionais de monócitos circulantes, antes e após tratamento antifúngico.

Métodos. Foram estudados 23 pacientes com a forma crônica da PCM confirmada pela identificação de formas típicas da fase leveduriforme em materiais clínicos ou de anticorpos séricos específicos pesquisados pela reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, 11 dos quais na fase pré-tratamento – grupo não tratado (GNT) e 12 em cura aparente (GCA), atendidos na Disciplina de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP. Foram incluídos pacientes com comprometimento pulmonar paracoccidióidico que se encontravam na fase pré-tratamento ou de cura aparente. Um grupo de seis indivíduos saudáveis foi utilizado como controle (GC). Após obtenção do sangue periférico dos indivíduos, foi realizada imunofenotipagem dos monócitos por citometria de fluxo, cultura de monócitos e quantificação de mediadores e citocinas produzidas por estas células, com e sem estímulo antigênico. A comparação de mais de duas amostras independentes foi feita pelo teste ANOVA, com pós-teste Tukey, utilizando-se $p<0,05$ para diferenças significativas. **Resultados.** A imunofenotipagem dos

monócitos revelou maior quantidade de monócitos “intermediários” (CD14⁺CD16⁺) para GNT quando comparado a GCA e GC ($p<0.05$), que não diferiram entre si. Não se observou diferenças na dosagem de IL-6, IL-10 e MIP-1 α com e sem estímulo antigênico nos três grupos. A produção de IL-1 β e TNF α sob estímulo de antígeno específico do *Paracoccidioides brasiliensis* (AgPb) foi maior para GNT e GCA do que para GC ($p<0.05$). O mesmo resultado se repetiu para a produção espontânea de TNF α . A quantificação de citocinas pró-fibrogênicas revelou maior produção de TGF- β 1 sob estímulo do AgPb para GNT do que para GC ($p<0.05$), enquanto GCA apresentou produção intermediária. A quantificação do FGF-b sob estímulo de LPS e AgPb revelou-se maior para GNT do que GCA e GC ($p<0.05$), que não diferiram entre si. **Conclusões.** A elevada produção de monócitos “intermediários” observada no momento do diagnóstico e a produção precoce e persistente de citocinas pró-fibrogênicas apresentam-se como marcadores da evolução para fibrose na PCM.

SEQUELAS PULMONARES NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE. CORRELAÇÃO ENTRE VARIÁVEIS CLÍNICAS, IMUNOLÓGICAS MORFOLÓGICAS E FUNCIONAIS.

Introdução. A despeito do tratamento antifúngico eficaz, são freqüentes as sequelas pulmonares na paracoccidioidomicose (PCM), caracterizadas principalmente por fibrose e enfisema paracicatricial, que levam ao desenvolvimento de insuficiência pulmonar crônica. O objetivo deste estudo foi quantificar a presença de fibrose e enfisema em pacientes com PCM e correlacioná-la com variáveis clínicas e espirométricas. **Métodos.** Foram estudados 16 pacientes com a forma crônica da PCM, que já tinham apresentado cura clínica e sorológica e se encontravam em cura aparente, nos quais foram realizadas tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR) e espirometria. A fibrose e o enfisema pulmonares foram quantificados utilizando-se um algoritmo computacional. A comparação de médias foi feita utilizando-se o teste de Mann-Whitney e o de Friedman; as correlações, o teste de Pearson; e as evoluções sorológicas em função do tempo, a regressão linear. As diferenças foram consideradas significantes quando $p\leq 0.05$ para um teste

bicaudal. **Resultados.** Fibrose e enfisema foram observados em todos os pacientes. A mediana da fibrose foi de 1,84% [1,08 – 2,39%] e do enfisema 4,04% [1,04 – 15,28%]. Não houve correlação entre estas duas variáveis e os parâmetros clínicos e espirométricos. A regressão linear de IDD em função do tempo de tratamento diferiu entre pacientes com maior ($\geq 4,04\%$) dos com menor quantidade de enfisema ($< 4,04\%$; $p=0,04$). O tempo de cura clínica revelou correlação inversa com a capacidade vital forçada ($r = -0,580$; $p=0,04$) e com o volume expiratório forçado em um segundo ($r = -0,571$; $p=0,04$). Prevaleceu o padrão obstrutivo na espirometria e valores reduzidos de fluxo expiratório forçado médio entre 25 e 75% da curva de CVF quando comparados aos outros parâmetros funcionais ($p<0,001$). **Conclusões.** O comprometimento funcional dos pulmões é mais intenso em pacientes que exigem maior tempo de tratamento para obtenção de cura clínica. O fluxo expiratório forçado foi a variável funcional mais afetada, sugerindo comprometimento mais intenso de pequenas vias aéreas. A avaliação quantitativa de fibrose e enfisema permitiu melhor avaliação das seqüelas pulmonares da PCM.



Primeiro artigo:

**Comparação do itraconazol com o cotrimoxazol
no tratamento da paracoccidioidomicose**

COMPARAÇÃO DO ITRACONAZOL COM O COTRIMOXAZOL NO TRATAMENTO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE

RESUMO

Introdução. Não há estudos publicados que tenham comparado itraconazol (ITC), associação sulfametoxazol-trimetoprim (cotrimoxazol – CMX) e ITC seguido de CMX (ITC/CMX), no tratamento da paracoccidioidomicose (PCM). Este estudo foi realizado para comparar eficácia, efetividade, segurança e tempos necessários para se alcançar cura clínica e sorológica em pacientes com PCM tratados com ITC ou CMX, antifúngicos mais utilizados nessa micose. **Métodos.** Foi conduzido um estudo *quasi-experimental* em 177 pacientes com diagnóstico confirmado ou provável de PCM, virgens de tratamento ou com doença reativada e há pelo menos seis meses sem antifúngicos. Foram consideradas duas fases no tratamento: 1) inicial ou de ataque, mantido até se obter cura clínica e normalização da velocidade de hemossedimentação; 2) complementar, mantido até obtenção da cura sorológica. A comparação de médias foi feita pelo teste de Mann-Whitney, a de frequências pelo teste do chi-quadrado e das variáveis em função do tempo pelas curvas de Kaplan-Meier e regressão de Cox, utilizando-se $p \leq 0,05$ para indicação de diferenças significantes. **Resultados.** No tratamento de ataque, 47 pacientes tratados com ITC e 130 que receberam CMX não revelaram diferença de eficácia e efetividade, mas foi menor o tempo de cura clínica para os que receberam ITC que os tratados com CMX (105 vs 159 dias; $p=0,001$), em especial pacientes com forma crônica. No tratamento complementar, eficácia e efetividade foram similares nos três tratamentos, porém o tempo de cura sorológica foi menor com ITC (161 dias) e CMX (495 dias) do que com ITC/CMX (881 dias) [$p=0,02$]. Os preditores independentes de menor tempo de cura sorológica foram tratamento com ITC [razão de risco = 6,61; IC95% (2,01-21,75)] e CMX [razão de risco = 5,11; IC95% (1,91-13,67)]. A prevalência de efeitos colaterais foi menor com ITC (6,4%) do que com CMX (20,0%; $p=0,03$). **Conclusão.** Este estudo revelou cura clínica mais precoce e maior tolerância ao ITC, que permitem considerá-lo antifúngico de primeira escolha no tratamento da PCM.

INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é micose endêmica da América Latina causada por fungos dimórficos do complexo *Paracoccidioides brasiliensis* e do complexo *Paracoccidioides lutzii*, que têm como seu habitat natural o solo ⁽¹⁾. Apresenta-se sob três formas clínicas principais: a) forma aguda/subaguda, que predomina em crianças, adolescentes e adultos jovens, comprometendo órgãos ricos no sistema fagocítico mononuclear; b) forma crônica, que afeta indivíduos adultos, que em geral são ou foram trabalhadores rurais, com grande predomínio do sexo masculino e caracterizada pelo envolvimento de pulmões e mucosa das vias aero-digestivas superiores; c) formas residuais, caracterizadas pelas seqüelas observadas após tratamento eficaz, em especial pulmões, laringe e adrenais ⁽²⁾

Após a sua descrição em 1908 por Adolfo Lutz ⁽³⁾, até a década de 1940 a PCM apresentava evolução fatal devido a ausência de drogas para tratamento. Desde então, fármacos têm sido utilizados para esta terapia, com boa resposta. Inicialmente, foi demonstrada a ação dos compostos sulfanilamídicos, com a introdução da sulfapiridina ⁽⁴⁾. Seguiu-se, em 1958, a introdução da anfotericina B, antifúngico potente de amplo espectro, que se mostrou eficaz no tratamento da PCM ⁽⁵⁾, mas de manejo difícil devido aos efeitos colaterais que ocasiona e à necessidade de administração intravenosa em paciente hospitalizado por tempo prolongado. Com a demonstração de sua eficácia por Barbosa & Vansconcelos (1973), a associação sulfametoxazol-trimetoprim (cotrimoxazol - CMX) passou a ser amplamente utilizada no tratamento da PCM ⁽⁶⁾. No final dos anos 1970 o desenvolvimento dos derivados imidazólicos permitiu ampliar as opções terapêuticas, especialmente com o cetoconazol ^(7, 8) até que no final dos anos 1980, com o lançamento do itraconazol (ITC), derivado triazólico 10 a 50 vezes mais ativo contra o *P. brasiliensis* que o cetoconazol, esta droga tornou-se muito utilizada por sua eficácia e segurança ^(9, 10, 11). Em passado recente, o voriconazol, derivado triazólico de segunda geração, revelou ser tão eficaz quanto o ITC no tratamento da PCM, porém menos seguro ⁽¹²⁾.

A despeito deste arsenal terapêutico desenvolvido nas últimas décadas, apenas quatro estudos foram comparativos ^(12, 13, 14, 15). Em 2006 foi publicado o

primeiro consenso brasileiro sobre diagnóstico e tratamento da PCM, que indicou ITC e CMX como drogas de escolha ⁽¹⁶⁾. No entanto, não foi publicado nenhum estudo que compare estes dois antifúngicos na terapia da PCM.

OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi comparar eficácia, efetividade e segurança do ITC com a do CMX no tratamento de ataque e complementar da PCM, bem como os tempos para se alcançar cura clínica, normalização da velocidade de hemossedimentação e das reações de fase aguda, e negatificação persistente da reação da imunodifusão dupla em gel de ágar.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foram estudados 177 pacientes com PCM, atendidos na Disciplina de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista, no período compreendido entre 1988 e 2012.

O atendimento inicial foi feito em enfermaria, triagem ou pronto-socorro por um dos infectologistas do Serviço, ao qual coube a escolha do antifúngico utilizado no tratamento. Os exames realizados à admissão, antes da instituição do tratamento, assim como a periodicidade do seguimento e os exames complementares solicitados, eram padronizados e comuns a todos os pacientes, independentemente do esquema terapêutico instituído. Os pacientes internados eram, após a alta hospitalar, encaminhados ao Ambulatório de Paracoccidioidomicose, assim como os que eram atendidos na Triagem e no Pronto-Socorro do Hospital das Clínicas, o que ocorria logo após o primeiro atendimento. No Ambulatório, o atendimento de todos os pacientes sempre foi supervisionado pelo mesmo médico, que utilizou o protocolo padronizado.

Critérios de inclusão. Foram incluídos no presente estudo os seguintes pacientes com paracoccidioidomicose: a) casos confirmados, caracterizados pela presença de manifestações clínicas compatíveis e identificação de formas típicas da fase leveduriforme de *P. brasiliensis* em materiais clínicos; b) casos prováveis, caracterizados pela presença de manifestações clínicas compatíveis e detecção de anticorpos séricos específicos pela reação de imunodifusão

dupla em gel de agar, mas nos quais o *P. brasiliensis* não foi identificado ⁽¹⁶⁾; c) pacientes virgens de tratamento ou que iniciaram terapia para PCM há menos de 30 dias; d) pacientes com novo episódio de atividade clínica, com diagnóstico micológico e, ou, sorológico e que se encontravam há pelo menos seis meses sem uso de medicação antifúngica; e) pacientes que receberam tratamento inicial com ITC ou com CMX.

Critérios de exclusão. Foram excluídos os pacientes que apresentavam doenças sistêmicas de etiologia infecciosa, parasitária, neoplásica ou inflamatória (conectivopatias) como co-morbidade, que recebiam drogas antifúngicas por qualquer outra indicação ou medicamentos que interferissem na cinética do ITC ou do CMX, gestantes e mulheres em fase de lactação

Classificação das formas clínicas. Os pacientes foram classificados segundo forma clínica e gravidade conforme Mendes ⁽²⁾ como descrito abaixo. A forma aguda ou subaguda, também denominada juvenil, se caracteriza por breve tempo de instalação, em geral de algumas semanas a poucos meses, incidindo preferencialmente em crianças, adolescentes e adultos jovens e predominando em órgãos ricos no sistema fagocítico-mononuclear, tais como linfonodos, fígado, baço e medula óssea. Quanto à gravidade foi classificada em moderada e grave, com base nos seguintes critérios: a) perda ponderal acima de 10% do peso habitual; b) reação de IDD com título igual ou superior a 1/64; c) comprometimento de linfonodos profundos ou superficiais com adenopatia do tipo tumoral ou supurativo; d) envolvimento de órgãos como ossos, intestinos, adrenais ou sistema nervoso central; e) reação intradérmica à paracoccidioidina negativa. A presença de pelo menos três desses critérios caracterizava caso grave, enquanto os que apresentavam no máximo dois deles eram considerados moderados. Não foram considerados quadros leves, nesta forma clínica. A forma crônica ou do adulto foi caracterizada pela instalação insidiosa, em geral superior a quatro e, com frequência, seis meses, em pacientes com mais de 30 anos de idade, comprometimento de pulmões e mucosa de vias aerodigestivas superiores e classificada em leve, moderada e grave. Os casos graves foram definidos pela presença de três ou mais dos seguintes critérios: a) perda ponderal maior que 10% do peso habitual; b) comprometimento pulmonar grave; c) comprometimento de outros órgãos, tal

como adrenais, sistema nervoso central e ósseo; d) envolvimento de linfonodos superficiais do tipo tumoral ou supurativo; d) reação de IDD igual ou superior a 1/64; e) reação intradérmica à paracoccidioidina negativa. Os casos moderados apresentavam perda ponderal entre 5 e 10% do peso corpóreo habitual, reação de IDD igual a 1/16 ou 1/32 e um ou dois dos demais critérios acima referidos, enquanto os casos leves revelavam perda ponderal menor que 5%, comprometimento exclusivo de pulmões, mucosa de vias aero-digestivas superiores ou pele, reação de IDD com títulos inferiores a 1/16 e reação intradérmica à paracoccidioidina positiva.

Intervenções. Os tratamentos com CMX ou com ITC constituíram as intervenções a que foram submetidos os pacientes estudados. O CMX foi administrado em adultos na dose de 1.440 mg 12/12 horas, em geral utilizando-se a via oral desde o início e, por vezes, iniciando-se por via intra-venosa, passando-se, a seguir, para a via oral. Crianças receberam 4 a 8 mg/kg de trimetoprim por via oral, a cada 12 h. Em ambos os casos, houve monitoramento dos níveis séricos do sulfametoxazol, que foram mantidos sempre acima de 70µg/mL no tratamento de ataque e acima de 50 µg/mL no de manutenção, com eventuais ajustes de dose. O ITC foi administrado sempre por via oral, na formulação em cápsulas, na dose de 200mg para adultos uma vez ao dia, após uma das refeições. Crianças receberam 5 a 10 mg/kg/dia de ITC. Alguns pacientes realizaram o tratamento de ataque com ITC e o complementar com CMX ou outro derivado sulfamídico como sulfadiazina ou sulfadoxina. A sulfadiazina foi administrada por via oral, na dose diária de 100mg/kg de peso corporal, divididos em quatro tomadas iguais, a cada 6 horas; a dose diária máxima administrada foi igual a 4,0g. A sulfadoxina foi administrada por via oral, uma vez por semana, na dose de 1,0g a 2,0g.

Tamanho da amostra. O tamanho amostral foi determinado considerando-se um erro tipo α igual a 5%, poder do teste de 80%, eficácia do CMX igual a 70% e do ITC igual a 95%, com base em resultados publicados previamente^(9, 10, 11, 12, 15, 17), utilizando-se a equação abaixo.

$$N = \frac{(z_{\alpha} + z_{\beta})^2 \cdot [p_1 \cdot (1,0 - p_1) + p_2 \cdot (1,0 - p_2)]}{d^2}$$

Em que,

N – menor número de pacientes em cada grupo;

d – diferença de eficácia entre tratamentos;

p₁ – proporção de sucessos terapêuticos esperados com CMX;

p₂ – proporção de sucessos terapêuticos esperados com ITC.

Assim, o tamanho amostral foi de pelo menos 33 pacientes em cada grupo. Considerando que outros critérios, além da eficácia, seriam avaliados, a amostra foi ampliada para este estudo.

Seguimento dos pacientes. No tratamento foram consideradas duas fases: tratamento inicial ou de ataque e tratamento complementar ⁽¹⁸⁾. O tratamento inicial ou de ataque foi mantido até que se observassem cura clínica, caracterizada pelo desaparecimento dos sinais e sintomas presentes à admissão do paciente, exceto os que se relacionassem a possíveis seqüelas, e pela normalização da velocidade de hemossedimentação. Para pacientes que, à admissão, não apresentavam elevação da velocidade de hemossedimentação, a normalização dos níveis séricos de γ -globulina, determinados pela eletroforese de proteínas séricas, passava a ser a variável utilizada na determinação do fim do tratamento inicial e início do tratamento complementar. Durante o tratamento inicial o paciente era submetido à avaliação clínica, radiológica, parasitológica, urinária, sorológica e da bioquímica sanguínea a cada mês.

O tratamento complementar se caracterizava pela avaliação clínica, sorológica e radiológica a cada três meses e persistia até um ano após observação de exames sorológicos persistentemente negativos.

Exames complementares. No seguimento de cada paciente foi realizado um grande número de exames complementares e, neste estudo, foram avaliados os que se seguem. A realização da reação de imunodifusão dupla em gel de agar, segundo Restrepo (1972), constituiu a avaliação sorológica de rotina ⁽¹⁹⁾ e a determinação da velocidade de hemossedimentação foi o exame hematológico avaliado. Da avaliação

bioquímica de sangue fazia parte a determinação dos níveis séricos de bilirrubinas conjugada e total, aminotransferases, fosfatase alcalina, γ -glutamilttransferase, uréia, creatinina, eletroforese de proteínas séricas, proteína C reativa (PCR) e mucoproteínas, depois substituída pela α_1 -glicoproteína ácida. Os exames hematológicos foram realizados no Laboratório do Hemocentro de Botucatu e os sorológicos no Laboratório de Pesquisa de Doenças Tropicais – Micologia Médica. Os exames bioquímicos de sangue foram realizados no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Todos os exames que avaliaram as funções hepatobiliar e renal foram apresentados como a razão entre o pico sérico observado e o limite superior de normalidade (N); aumentos entre N a 2N foram considerados leves, entre 2N e 3N moderados e acima de 3N intensos ⁽²⁹⁾.

Além de outros exames complementares de rotina, parte do protocolo de seguimento dos pacientes, outras avaliações também foram solicitadas sempre que houvesse indicação clínica.

Delineamento do estudo. Quatro grupos de pacientes foram constituídos neste estudo, em função dos antifúngicos utilizados no tratamento de ataque e no complementar:

G₁ – constituído de pacientes que receberam ITC no tratamento de ataque e no complementar;

G₂ – constituído de que receberam ITC no tratamento de ataque e CMX no complementar;

G₃ – constituído de pacientes que receberam ITC no tratamento de ataque e sulfamídicos no complementar;

G₄ – constituído de pacientes que receberam CMX no tratamento de ataque e no complementar.

O tratamento de cada paciente foi instituído de forma aleatória, pelo infectologista que fez o primeiro atendimento, sem qualquer influência dos pacientes ou dos pesquisadores que desenvolveram este estudo. Como não houve randomização dos pacientes, trata-se de um estudo *quasi-experimental*.

Devido ao pequeno número de pacientes que compôs o grupo G₃, este braço só foi incluído na avaliação do tratamento inicial.

Avaliação de homogeneidade. A homogeneidade entre os grupos de pacientes que receberam ITC (G_1 , G_2 e G_3 somados) ou CMX (G_4) como tratamento inicial foi avaliada segundo idade, gênero, forma clínica e gravidade.

Desfechos. As seguintes definições foram utilizadas para a medida dos desfechos: (1) cura clínica – desaparecimento dos sinais e sintomas presentes antes do início da terapia antifúngica, excetuando-se as manifestações residuais decorrentes de seqüelas; (2) cura sorológica – pesquisa negativa, persistente durante um ano, de anticorpos séricos específicos, determinados pela reação de imunodifusão dupla em gel de ágar; a data do primeiro exame sorológico não reagente da série de um ano de pesquisas negativas foi considerada referencial para o cálculo do tempo de conversão a uma sorologia negativa; (3) falha terapêutica: persistência da sintomatologia ou sua recrudescência após instituição da terapia antifúngica ou a persistência de anticorpos séricos específicos, determinados pela IDD, em qualquer título; (4) cura aparente - cura clínica e sorológica observada por dois anos após a suspensão do tratamento; (5) efeitos colaterais – reações adversas relatadas pelos pacientes e, ou, detectadas por alterações laboratoriais; (6) sucesso terapêutico – presença de cura clínica, normalização da VHS ou γ -globulina e cura sorológica; (7) eficácia – frequência de sucesso terapêutico, medida em porcentagem, avaliada apenas em pacientes que fizeram tratamento adequado; (8) efetividade – frequência de sucesso terapêutico, medida em porcentagem, observada no conjunto de pacientes incluídos no estudo, caracterizando o estudo *intention-to-treat*.

Foram considerados os seguintes desfechos:

1. Desfechos primários

- a. Primeiro – avaliação do tratamento de ataque: (1) eficácia; (2) efetividade; (3) tempo necessário para se alcançar a cura clínica; (4) tempo necessário para normalização da velocidade de hemossedimentação;
- b. Segundo – avaliação do tratamento complementar: 1) eficácia; (2) efetividade; (3) tempo necessário para se alcançar a cura sorológica;
- c. Terceiro – avaliação da cura aparente: frequência de pacientes que alcançaram critérios de cura aparente.

- d. Quarto – avaliação da segurança do tratamento: frequência de efeitos colaterais detectados por manifestações clínicas e alterações laboratoriais.

2. Desfechos secundários

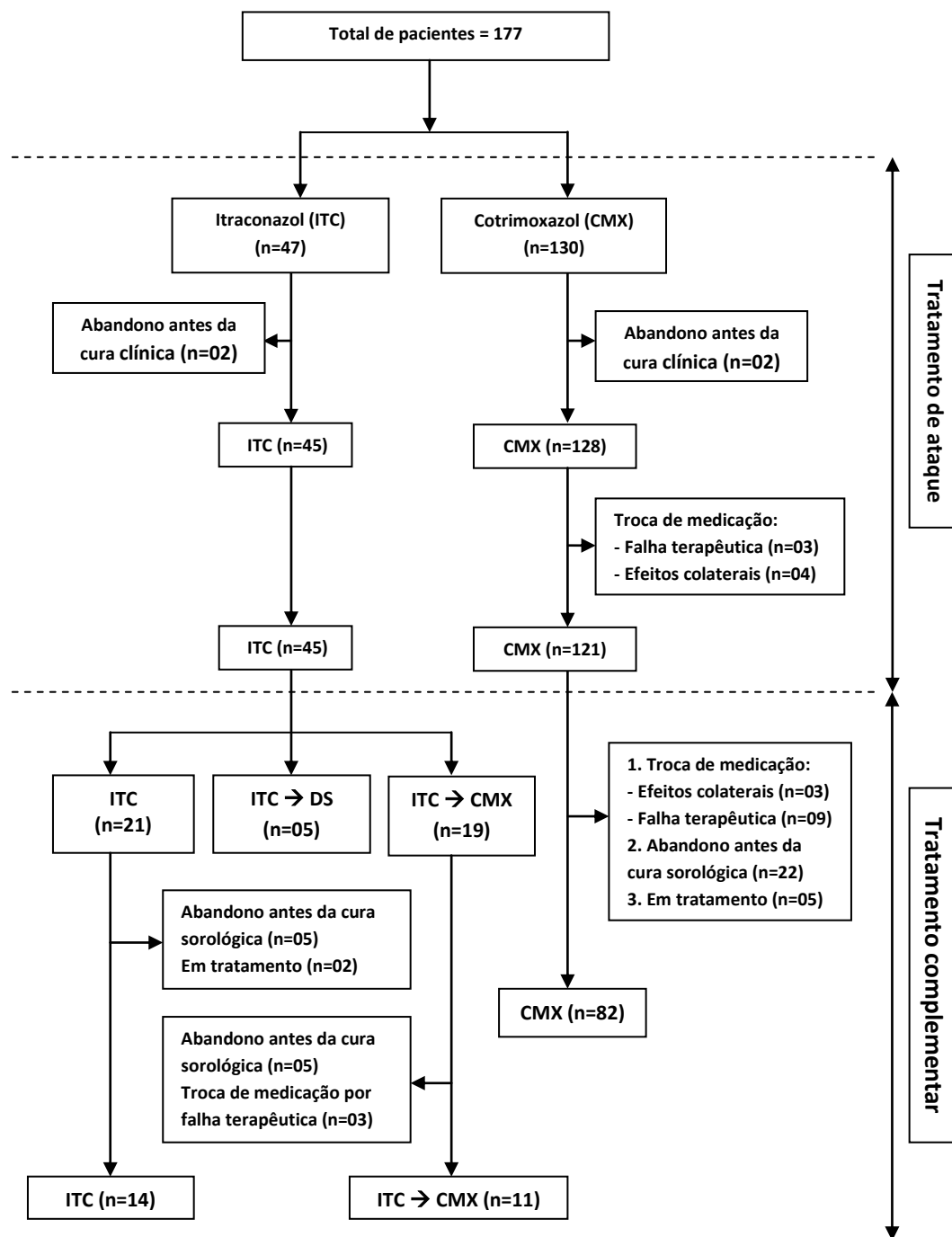
- a. Primeiro – comparação, duas a duas, da sensibilidade da VHS e das provas de atividade inflamatória (PCR, α_1 – glicoproteína ácida e γ -globulina) segundo forma clínica;
- b. Segundo – comparação do tempo necessário para que as reações de fase aguda retornassem a valores normais, segundo forma clínica e antifúngico utilizado.

Comitê de Ética em Pesquisa. O presente estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

Análise estatística dos resultados. Cada variável contínua foi apresentada como mediana e 1º e 3º quartis. Na comparação dessas variáveis utilizou-se teste de Mann-Whitney para amostras independentes. A análise de variáveis em função do tempo foi feita pela curva de Kaplan Meier e a avaliação de fatores de risco nessa análise foi realizada pela regressão de Cox. As variáveis categóricas foram apresentadas como porcentagem e comparadas pelo teste do χ^2 ou pela prova exata de Fisher. Essas análises estatísticas foram realizadas segundo as especificações de Zar ⁽²¹⁾. Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando-se o programa SAS versão 9.3. A hipótese de nulidade foi rejeitada admitindo-se um erro tipo α igual ou inferior a 5%, em teste bicaudal. Valores entre 5 e 10% foram interpretados como tendência.

RESULTADOS

Cento e setenta e sete pacientes preencheram os critérios de inclusão no estudo. A figura 1 apresenta o fluxograma de alocação dos pacientes em função do esquema terapêutico utilizado e dos momentos de avaliação dos desfechos.



ITC – itraconazol; CMX – cotrimoxazol; DS – Derivado sulfamídico (sulfadiazina ou sulfadoxina).
ITC → CMX – itraconazol seguido de cotrimoxazol com ou sem sulfadiazina.

Figura 1. Fluxograma de alocação de 177 pacientes com paracoccidioidomicose segundo tratamento e momento de análise dos desfechos.

Desfechos primários

1. Primeiro desfecho – tratamento de ataque

a. Avaliação de homogeneidade dos grupos no tratamento inicial ou de ataque

Os pacientes que receberam ITC não diferiram segundo idade, gênero e forma clínica dos que foram tratados com CMX no tratamento inicial (tabela 1).

b. Avaliação da eficácia e da efetividade do tratamento de ataque

ITC e CMX revelaram a mesma eficácia e efetividade no tratamento de ataque da PCM ($p>0,05$) [figura 2].

c. Avaliação do tempo de cura clínica e normalização da VHS.

Os pacientes que receberam tratamento inicial com ITC mostraram menor tempo para obtenção de cura clínica (105 dias) que aqueles tratados com CMX (159 dias) [$p=0,001$]. No entanto, o tempo necessário para se alcançar cura clínica não diferiu segundo tratamento ($p>0,05$) em pacientes com forma aguda/subaguda mas, em pacientes com a forma crônica, foi menor com ITC (112 vs 159 dias; $p<0,001$) [tabela 2^a, figura 3]. O tempo necessário para a normalização da VHS não diferiu segundo tratamento utilizado ($p>0,05$) [tabela 2b].

Tabela 1. Distribuição, segundo aspectos epidemiológicos, clínicos e sorológicos, de 177 pacientes com paracoccidioidomicose no tratamento de ataque e no complementar.

	Tratamento de ataque		Valor de <i>p</i>	Tratamento complementar			Valor de <i>p</i>
	ITC (n=47)	CMX (n=130)		ITC (n=21)	ITC/CMX (n=19)	CMX (n=121)	
Idade (anos)	43,0 [33,5 – 53,8]	45,5 [35,0 – 54,0]	0,65	53,0 [42,0 – 60,0] ^a	37,0 [32,0 – 42,0] ^c	45,5 [34,0 – 54,0] ^b	0,002
Gênero masculino (%)	87,2	88,5	0,82	84,2	89,5	87,9	0,93
Forma clínica (%)			0,63				0,25
Aguda/Subaguda	29,8	26,2		21,1	42,1	27,6	
Crônica	70,2	73,8		78,9	57,9	72,4	
Forma Aguda/Subaguda (%)			0,65				0,45
Moderada	0,0	3,1		0,0	0,0	3,4	
Grave	29,8	23,1		21,1	42,1	24,2	
Forma Crônica (%)			0,65				0,57
Leve	6,4	4,6		5,3	10,3	5,2	
Moderada	51,1	56,2		57,9	31,6	54,8	
Grave	12,8	13,1		15,8	15,8	12,9	
IDD inicial (1:)	16 [2 – 64]	16 [4 – 64]	0,38	4 [2 – 16] ^c	64 [8 – 128] ^a	16 [4 – 64] ^{ab}	0,03

ITC – itraconazol; CMX – cotrimoxazol; ITC/CMX – itraconazol seguido de cotrimoxazol. Comparação entre medianas: teste de Mann-Whitney – dados apresentados como mediana, 1º e 3º quartis; Comparação entre frequências: teste do chi-quadrado.

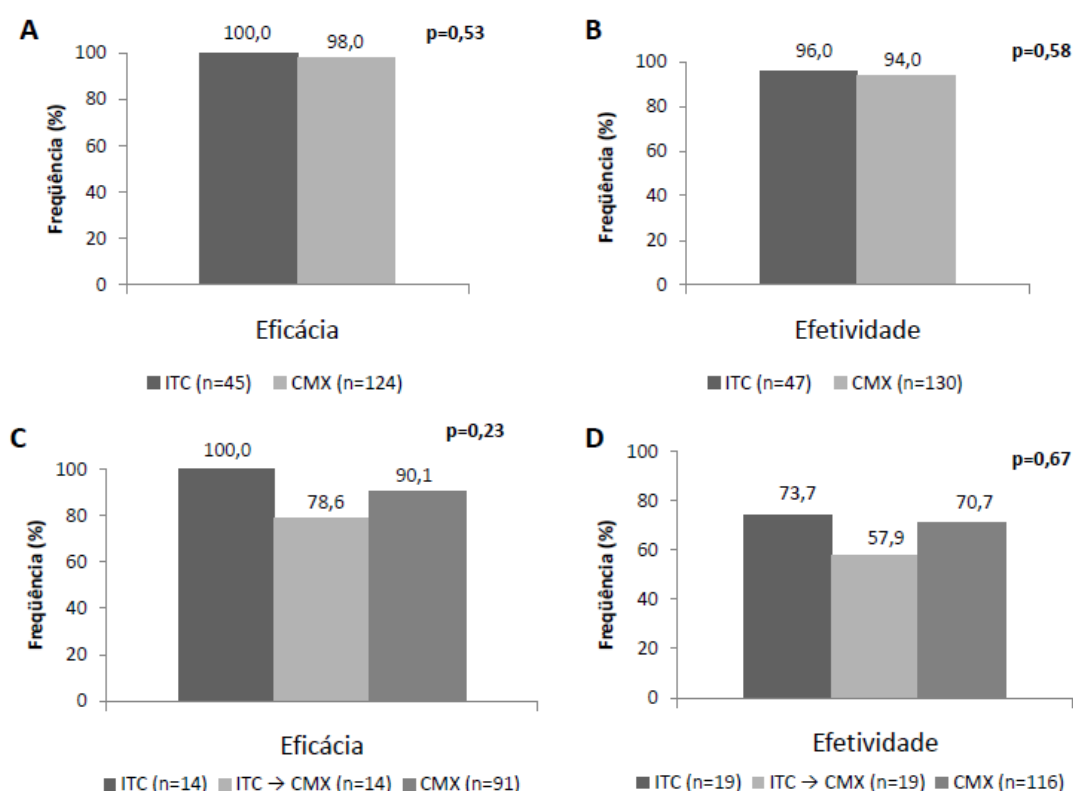


Figura 2. Eficácia (A) e efetividade (B) do tratamento de ataque em 177 pacientes com paracoccidiodomicose segundo esquema terapêutico utilizado e eficácia (C) e efetividade (D) do tratamento complementar em 138 pacientes com paracoccidiodomicose segundo esquema terapêutico utilizado.

2. Segundo desfecho – tratamento complementar

a. Avaliação de homogeneidade entre os grupos

Os pacientes tratados apenas com ITC apresentaram idade maior que aqueles que receberam cotrimoxazol que, por sua vez, foi maior do que os tratados com ITC seguido de cotrimoxazol. Não houve diferença quanto a gênero, forma clínica e gravidade entre estes grupos [tabela 1]. Os níveis séricos de anticorpos eram mais elevados nos pacientes tratados inicialmente com ITC e, a seguir, com CMX dos que os que receberam apenas ITC; os pacientes tratados apenas com CMX apresentaram níveis séricos de anticorpos que não diferiram dos que receberam ITC seguido de CMX, mas eram superiores ao dos pacientes tratados com apenas com ITC [tabela 1].

Tabela 2a. Análise de Kaplan-Meier para comparação do tempo, em dias, para se alcançar cura clínica e sorológica em 177 e 138 pacientes com paracoccidioidomicose, respectivamente, segundo antifúngico utilizado e forma clínica. As medianas dos tempos se encontram entre parênteses.

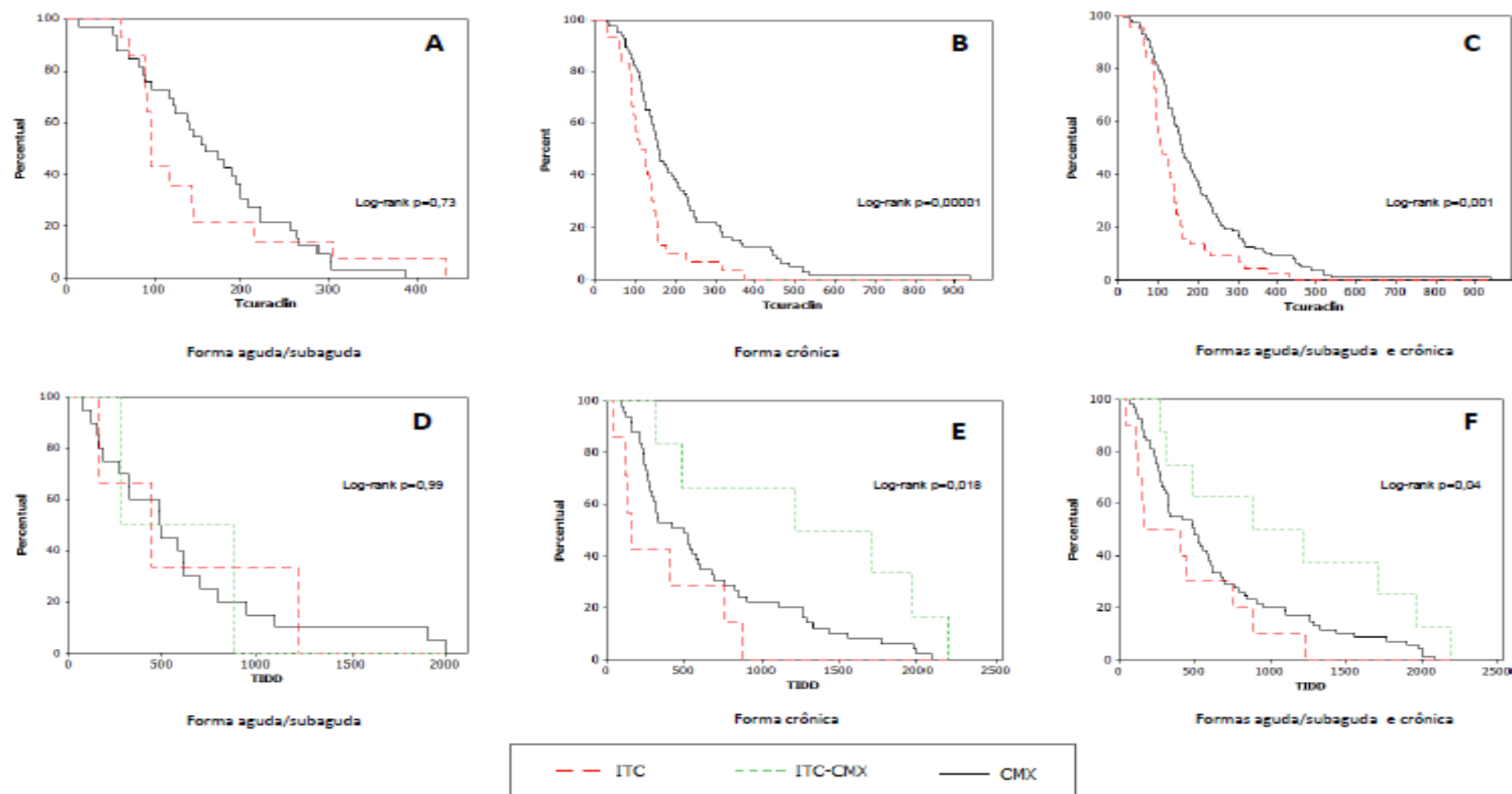
Variável principal	Variável secundária	Variável terciária	Contrastes	Valor de p	Interpretação
Tempo de cura clínica	Tratamento	Aguda	ITC (96) vs CMX (159)	0,73	ITC = CMX
		Crônica	ITC (112) vs CMX (159)	0,00001	ITC < CMX
		Aguda + Crônica	ITC (105) vs CMX (159)	0,001	ITC < CMX
	Forma clínica		AM vs AG vs CL vs CM vs CG	0,001	
			AM (71) vs AG (159)	0,001	AM < AG
			AM (71) vs CL (76)	0,48	AM = CL
			AM (71) vs CM (152)	0,00001	AM < CM
			AM (71) vs CG (196)	0,00001	AM < CG
			AG (159) vs CL (76)	0,00001	AG > CL
			AG (159) vs CM (152) vs CG (196)	0,12	AG = CM = CG
			CL (76) vs CG (196)	0,00001	CL < CG
			CL (76) vs CM (152)	0,00001	CL < CM
Tempo de cura sorológica	Tratamento	Aguda	ITC (441) vs CMX (488) vs ITC/CMX (273)	0,99	ITC = CMX = ITC/CMX
		Crônica	ITC (159) vs CMX (497) vs ITC/CMX (1217)	0,018	(ITC = CMX) < ITC/CMX
		Aguda + Crônica	ITC (161) vs CMX (495) vs ITC/CMX (881)	0,02	(ITC = CMX) < ITC/CMX
	Forma clínica		AM vs AG vs CL vs CM vs CG	0,04	
			AM (157) vs AG (495)	0,027	AM < AG
			AM (157) vs CL (159)	0,65	AM = CL
			AM (157) vs CM (425)	0,023	AM < CM
			AM (157) vs CG (551)	0,049	AM < CG
			AG (495) vs CL (159)	0,12	AG = CL
			AG (495) vs CM (425) vs CG (551)	0,99	AG = CM = CG
			CL (159) vs CG (551)	0,08	CL = CG
			CL (159) vs CM (425)	0,049	CL < CM

ITC – itraconazol; CMX – cotrimoxazol; ITC/CMX – itraconazol seguido de cotrimoxazol; AM – forma aguda moderada; AG – forma aguda grave; CL – forma crônica leve; CM – forma crônica moderada; CG – forma crônica grave.

Tabela 2b. Análise de Kaplan-Meier para comparação do tempo, em dias, para se alcançar a normalização da velocidade de hemossedimentação (VHS) e das provas de atividade inflamatória em 177 pacientes com paracoccidiodomicose, segundo antifúngico utilizado e forma clínica. As medianas dos tempos se encontram entre parênteses.

Variável principal	Variável secundária	Variável terciária	Contrastes	Valor de p	Interpretação
Tempo da VHS	Tratamento	Aguda	ITC (145) vs CMX (117)	0,52	ITC = CMX
		Crônica	ITC (95) vs CMX (116)	0,33	ITC = CMX
		Aguda + Crônica	ITC (95) vs CMX (117)	0,70	ITC = CMX
	Forma clínica	AM vs AG vs CL vs CM vs CG		0,008	
		AM (39) vs AG (138)		0,005	AM < AG
		AM (39) vs CL (63)		0,42	AM = CL
		AM (39) vs CM (103)		0,002	AM < CM
		AM (39) vs CG (110)		0,001	AM < CG
		AG (138) vs CL (63)		0,13	AG = CL
		AG (138) vs CM (103) vs CG (110)		0,83	AG = CM = CG
		CL (63) vs CG (110)		0,19	CL = CG
		CL (63) vs CM (103)		0,19	CL = CM
Tempo de PCR	Tratamento	ITC (97) vs CMX (95)		0,93	ITC = CMX
Tempo de Muco	Tratamento	ITC (58) vs CMX (92)		0,93	ITC = CMX
	Forma clínica	AM (99) vs AG (92) vs CL (21) vs CM (53) vs CG (106)		0,38	AM = AG = CL = CM = CG
Tempo da α 1-glicop	Tratamento	ITC (70) vs CMX (103)		0,55	ITC = CMX
Tempo da γ -glob	Tratamento	ITC (158) vs CMX (175)		0,96	ITC = CMX
	Forma clínica	AM (99) vs AG (187) vs CL (63) vs CM (161) vs CG (142)		0,07	AM = AG = CL = CM = CG

VHS – velocidade de hemossedimentação; PCR – proteína C reativa; Muco – mucoproteína; α 1-glicop – α 1-glicoproteína ácida; γ -glob – γ -globulina; ITC – itraconazol; CMX – cotrimoxazol; ITC/CMX – itraconazol seguido de cotrimoxazol; AM – forma aguda moderada; AG – forma aguda grave; CL – forma crônica leve; CM – forma crônica moderada; CG – forma crônica grave.



ITC – itraconazol; CMX – cotrimoxazol; ITC/CMX – itraconazol seguido de cotrimoxazol. Touradín – tempo, em dias, para cura clínica; TIDD – tempo, em dias, para cura sorológica.

Figura 3. Curvas de Kaplan-Meier para avaliação do tempo necessário para se alcançar cura clínica e cura sorológica em pacientes com paracoccidioidomicose segundo antifúngico utilizado e forma clínica. A-C: avaliação da cura clínica em 177 pacientes - (A) forma aguda/subaguda; (B) forma crônica; (C) formas aguda/subaguda e crônica. D-F: avaliação da cura sorológica em 138 pacientes - (D) forma aguda/subaguda; (E) forma crônica; (F) formas aguda/subaguda e crônica.

a. Eficácia e efetividade do tratamento de manutenção

Não houve diferença de eficácia e efetividade entre os grupos de pacientes tratados apenas com ITC ou CMX e aqueles que receberam ITC no tratamento inicial seguido de CMX para o tratamento complementar [Figura 2].

b. Avaliação do tempo necessário para alcançar a cura sorológica

O tempo de cura sorológica não diferiu entre o grupo tratado apenas com ITC (Md=161 dias) e aquele que recebeu apenas CMX (Md=495 dias) [p=0.13], mas ambos foram menores que o observado no grupo que recebeu ITC no tratamento de ataque e CMX no complementar (Md=881 dias) [p=0.02]. Este achado repetiu-se para os pacientes com forma crônica da PCM, porém não com a forma aguda [tabela 2ª; figura 3]. A análise multivariada feita pelo modelo de regressão de Cox demonstrou que o tratamento com ITC ou CMX foi preditor de menor tempo para se obter a cura sorológica quando comparado com o esquema ITC seguido de CMX [tabela 3].

Tabela 3. Análise multivariada para identificação de preditores do tempo para se alcançar cura sorológica em 138 pacientes com paracoccidioidomicose.

	Razão de risco (IC95%)	Valor de p
Idade	1,003 (0,985 – 1,023)	0,72
Forma aguda vs forma crônica	0,370 (0,123 – 1,110)	0,07
IDD inicial	0,910 (0,822 – 1,008)	0,07
Tempo de cura clínica	0,998 (0,996 – 1,000)	0,06
Forma clínica*		
Aguda grave	0,422 (0,134 – 1,331)	0,14
Crônica leve	4,152 (1,452 – 11,873)	0,008
Crônica grave	1,618 (0,726 – 3,602)	0,23
Tratamento**		
Itraconazol	6,615 (2,012 – 21,749)	0,009
Cotrimoxazol	5,110 (1,910 – 13,668)	0,001

IDD – imunodifusão em gel de ágar específica para *P. brasiliensis*.

* Na avaliação das formas clínicas, a forma crônica moderada foi considerada referência para avaliação do tempo de cura sorológica.

** Na avaliação do tratamento, itraconazol seguido de cotrimoxazol foi considerado referência para avaliação do tempo de cura sorológica.

3. Terceiro Desfecho – Cura aparente

Foi elevada a prevalência de pacientes que alcançaram cura aparente: 92,9% com ITC, 95,1% com CMX e 100,0% com ITC seguido de CMX, que não diferiram entre si ($p>0,05$).

4. Quarto Desfecho – Avaliação da segurança do tratamento

A incidência de queixas clínicas observadas após instituição do tratamento de ataque foi menor em pacientes que receberam ITC (6,4%) que aqueles tratados com CMX (20,0%) [$p=0,03$]. A epigastria foi mais freqüente em pacientes que receberam CMX (13,8%) que nos tratados com ITC (2,1%) [$p=0,05$]. Cefaléia (2,1%) e tontura (2,1%) também foram relatados por pacientes tratados com ITC, enquanto diarreia (3,8%), vômitos (0,8%) e erupções cutâneas (0,8%) foram referidos pelos que receberam CMX. Os dois antifúngicos levaram a alterações das funções hepatobiliar e renal. A única variável que revelou diferença entre tratamentos foi a bilirrubina direta, que se mostrou alterada com maior freqüência nos pacientes que receberam ITC (34,6%) do que nos tratados com CMX (3,6%; [$p<0,001$]) [tabela 4]. Por outro lado, a intensidade das alterações foi em geral leve, exceto para γ – GT em pacientes que receberam ITC, com mediana de elevação igual a 6,5 vezes o limite superior de normalidade. A comparação entre antifúngicos revelou apenas uma tendência a ser maior a elevação de γ – GT no grupo tratado com ITC que naquele que recebeu CMX ($p=0,07$).

A descontinuação do tratamento devido a efeitos colaterais não diferiu entre antifúngicos: 0,0% para ITC e 3,8% para CMX ($p=0,20$).

Tabela 4. Alterações da bioquímica sanguínea secundárias à utilização de antifúngicos em 177 pacientes com paracoccidioidomicose.

	Frequência de alterações (%)		Valor de p	Intensidade das alterações		Valor de p
	ITC	CMX		ITC	CMX	
AST	11,5	17,6	0,34	1,2 [1,1 – 6,8]	1,3 [1,1 – 1,5]	0,85
ALT	19,2	29,4	0,44	1,5 [1,5 – 3,1]	1,5 [1,2 -2,2]	0,59
FA	11,5	16,9	0,38	1,7 [1,1 – 2,1]	1,2 [1,2 -1,5]	0,80
γ – GT	11,5	11,8	0,63	6,5 [1,5 – 6,6]	1,3 [1,1 – 1,7]	0,07
BT	7,7	2,4	0,23	1,3 [1,2 – 1,4]	2,7 [1,9 – 3,5]	0,12
BD	34,6	3,6	<0,001	2,0 [1,7 – 4,0]	3,3 [2,3 – 16,7]	0,30
Uréia	10,3	15,1	0,38	1,2 [1,1 – 1,5]	1,1 [1,1 – 1,2]	0,41
Creatinina	6,9	9,7	0,48	1,1 [1,1 – 1,1]	1,1 [1,1 – 1,2]	0,63

AST – Aspartato amino-transferase; ALT – Alanina amino-transferase; γ – GT – Gama-glutamil transferase; FA – Fosfatase alcalina; BT – Bilirrubina total; BD – Bilirrubina direta. A comparação das variáveis categóricas foi feita pelos testes de χ^2 e exato de Fisher, e a de variáveis contínuas pelo teste de Mann-Whitney.

Desfecho secundário

A sensibilidade da VHS e das provas de atividade inflamatória são apresentadas nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5. Sensibilidade da velocidade de hemossedimentação e das provas de atividade inflamatória antes da introdução da terapia antifúngica em 177 pacientes com paracoccidioidomicose.

	Aguda/Subaguda	Crônica	Valor de p	Aguda/Subaguda + Crônica
VHS	84,8	54,5	<0,01	62,7
Proteína C reativa	56,5	53,6	0,99	54,4
Mucoproteína	66,7	57,1	0,63	60,0
α 1-glicoproteína ácida	38,9	47,4	0,72	45,2
γ -globulina	86,7	55,4	<0,01	63,9

VHS – velocidade de hemossedimentação; teste do chi-quadrado / teste exato de Fisher.

Tabela 6. Comparação, duas a duas, da sensibilidade da velocidade de hemossedimentação e provas de atividade inflamatória e avaliação do grau de concordância em 169 pacientes com paracoccidiodomicose.

1° vs 2°	Pacientes (n°)	1° (+) e 2° (+)	1° (-) e 2° (-)	1° (+) e 2° (-)	1° (-) e 2° (+)	Valor de p
VHS vs PCR	79	28	20	16	15	0,99
VHS vs Muco	70	36	14	14	06	0,10
VHS vs α 1-glico	73	23	28	12	10	0,80
VHS vs γ -globulina	166	75	33	27	31	0,70
PCR vs α 1-glico	57	19	24	10	04	0,20
PCR vs γ -globulina	79	25	14	18	22	0,60
Muco vs γ -globulina	70	32	13	10	15	0,40
α 1-glico vs γ -globulina	73	20	17	13	23	0,10

VHS – velocidade de hemossedimentação; PCR – proteína c reativa; Muco – mucoproteína; α 1-glico – α 1-glicoproteína ácida; γ -globulina – gama-globulina. Teste de McNemar.

Tabela 7. Avaliação do grau de concordância da sensibilidade da velocidade de hemossedimentação e provas de atividade inflamatória em 169 pacientes com paracoccidiodomicose.

1° vs 2°	Valor de kappa	IC95%	Grau de confiança
VHS vs PCR	0,21	0,00 – 0,42	Leve
VHS vs Muco	0,37	0,14 – 0,61	Leve
VHS vs γ -globulina	0,27	0,11 – 0,42	Leve
PCR vs α 1-glico	0,51	0,28 – 0,73	Moderado
PCR vs γ -globulina	0,00	0,00 – 0,22	Leve
Muco vs γ -globulina	0,27	0,03 – 0,51	Leve
α 1-glico vs γ -globulina	0,03	0,00 – 0,25	Leve

VHS – velocidade de hemossedimentação; PCR – proteína c reativa; Muco – mucoproteína; α 1-glico – α 1-glicoproteína ácida; γ -globulina – gama-globulina. IC95%: intervalo de confiança 95%.

A comparação dos tempos necessários para a obtenção de valores normais de VHS e provas de atividade inflamatória não revelou diferença segundo tratamento instituído, conforme revela a tabela 2b.

DISCUSSÃO

Apesar da terapia antifúngica eficaz, sabe-se que pacientes com PCM apresentam focos latentes de *P. brasiliensis*, o que torna necessária a manutenção do medicamento até a recuperação da imunidade celular, para que se evitar recaída da doença. Assim, a duração da terapia antifúngica na PCM é prolongada, orientada pela redução dos níveis séricos de anticorpos específicos contra o fungo, determinados por DID, até que se tornem negativos. Enquanto sintomático e apresentar valores elevados da VHS, o paciente é submetido ao tratamento inicial. Em geral, ele apresenta cura clínica muito antes de alcançar cura sorológica, determinando um período de ausência de sintomatologia, mas com utilização de antifúngico, que constitui o tratamento complementar ⁽¹⁸⁾. São etapas muito distintas do tratamento e, por isso, serão analisadas separadamente.

A homogeneidade entre os grupos de pacientes que realizaram o tratamento de ataque com ITC ou CMX confere consistência aos resultados observados. Nesta etapa, demonstrou-se elevada eficácia e efetividade e uma rápida cura clínica nos pacientes tratados com ITC, confirmando achados de Queiroz-Telles et al. (2006), que observaram eficácia de 100% e efetividade de 94% com o ITC ⁽¹²⁾. Estudos anteriores revelaram resultados diferentes. Naranjo et al.⁽¹¹⁾, avaliando 47 pacientes com PCM, encontraram 89% de melhora clínica substancial e apenas 2% de cura durante os seis primeiros meses de tratamento. Em ensaio clínico randomizado, Shikanai-Yasuda et al. observaram 57% de cura e 43% de melhora clínica em 14 pacientes com PCM avaliados após seis meses de tratamento com ITC ⁽¹⁵⁾. Essas diferenças talvez possam ser justificadas pela utilização de doses diárias menores de ITC (50 – 100 mg) e pelo menor tempo de avaliação, de no máximo seis meses, que poderia explicar o grande número de pacientes com melhora parcial, mas ainda sem cura clínica. Considerando que o efeito do ITC é concentração-dependente ⁽²²⁾, doses mais elevadas potencializariam o efeito antifúngico, garantindo uma melhora clínica mais rápida. No presente estudo foram utilizadas doses diárias de 200 mg, o que pode justificar a elevada taxa de cura clínica observada mais precocemente que em estudos anteriores.

As elevadas taxas de eficácia e efetividade observadas com o CMX foram semelhantes às observadas por outros autores, que variaram de 62 a 100% ^(6, 17, 23). No entanto, observou-se diferença no tempo de cura clínica. O presente estudo demonstrou uma mediana de 162 dias para se alcançar a cura clínica de pacientes tratados com CMX, enquanto Barbosa & Vasconcelos observaram recuperação em no máximo 35 dias ⁽⁶⁾. No entanto, estes autores avaliaram apenas a regressão das lesões como critério de resposta clínica. No presente estudo, o critério de cura incluiu outras variáveis, tais como a recuperação da disposição para o trabalho e do peso corpóreo, o que poderia explicar essa grande diferença.

A eficácia e a efetividade do ITC e do CMX foram muito satisfatórias no tratamento de ataque. Apesar de haver três pacientes com falha terapêutica e dois com necessidade de descontinuar o tratamento por efeitos colaterais no grupo que recebeu CMX, nenhuma diferença foi observada entre esses dois grupos, justificando a indicação feita pelo consenso brasileiro de tratamento da PCM⁽¹⁶⁾. No entanto, esses tratamentos diferiram quanto à velocidade com que atuaram. Em pacientes com a forma crônica da PCM, a cura clínica foi mais rápida nos tratados com ITC que naqueles que receberam CMX. Considerando-se que 75 a 90% dos pacientes com PCM apresentam a forma crônica ^(24, 25), pode-se avaliar a importância deste achado, que é inédito, por permitir a redução do tempo de tratamento e, desta forma, aumentar a adesão a ele.

Os grupos de estudo sofreram modificações ao se passar da fase de tratamento inicial para o de complementação, pois, com a cura clínica, alguns pacientes abandonaram o tratamento. Além disso, em alguns pacientes o ITC foi substituído pelo CMX no tratamento complementar, por ter distribuição gratuita pelos Serviços de saúde pública.

O grupo tratado com ITC seguido de CMX foi composto por pacientes mais jovens que os dos demais grupos. Apesar disso, ITC e CMX apresentaram elevada eficácia no tratamento complementar, que não diferiu entre esses grupos, justificando, uma vez mais, suas indicações pelo consenso brasileiro de PCM⁽¹⁶⁾. No entanto, o abandono de alguns pacientes em ambos os grupos e a observação de falha terapêutica e efeitos colaterais em pacientes tratados com CMX levaram a uma redução do sucesso terapêutico e, portanto,

a uma efetividade menor que a eficácia. Deve-se considerar, no entanto, que a efetividade desses dois tratamentos não foi estatisticamente diferente.

Não há estudos que tenham avaliado o tratamento com ITC por tempo prolongado, tampouco o tempo necessário à obtenção de cura sorológica. Shikanai-Yasuda et al. observaram redução significativa dos títulos séricos de anticorpos específicos aos 10 meses de tratamento com ITC ⁽¹⁵⁾. Naranjo et al. realizaram avaliação de apenas seis pacientes por mais de 12 meses e observaram redução semelhante ⁽¹¹⁾. No entanto, não há descrição quanto ao tempo necessário para se obter cura sorológica, em ambos os estudos. Quanto ao CMX, Valle et al. (1993) observaram cura sorológica em 72% dos casos, mas também não descreveram o tempo necessário para sua obtenção ⁽¹⁷⁾.

O tempo para se obter a cura sorológica não diferiu entre os grupos tratados com ITC ou CMX. Como os pacientes com PCM apresentam depressão da imunidade celular ⁽²⁶⁾ e estímulo à produção de anticorpos ⁽²⁷⁾ que são antígeno-dependentes, a cura sorológica parece depender da recuperação da resposta imune do paciente e não diretamente da ação dos antifúngicos, que atuariam reduzindo a carga fúngica, propiciando o restabelecimento do equilíbrio imunológico, que ocorre tardiamente ⁽²⁸⁾. Talvez este possa ser um fenômeno independente da droga utilizada. A tendência de menor tempo para obtenção de cura sorológica em pacientes com forma crônica tratados com ITC pode estar relacionada aos títulos séricos iniciais mais baixos, encontrados neste grupo.

O grupo tratado com ITC seguido de CMX não apresentou diferença de eficácia e efetividade quando comparado às de pacientes que receberam apenas ITC ou CMX. No entanto, chamou a atenção o elevado tempo de cura sorológica, bem superior ao observado em pacientes tratados com ITC ou CMX, em especial na forma crônica, achado que depende de estudos complementares para ser explicado.

Foi elevada a incidência de pacientes que alcançaram cura aparente, o que evidencia a elevada efetividade destas drogas no tratamento da PCM. Também já foi demonstrado que as reativações são em geral mais tardias ⁽²⁹⁾, o que não constituiu objetivo deste estudo.

Tanto ITC como CMX demonstraram segurança no tratamento da PCM, com incidência de efeitos colaterais que não foram diferentes. Apenas um

pequeno número de pacientes tratados com CMX precisou modificar a terapia em decorrência dos efeitos colaterais. O grupo tratado com ITC apresentou cefaléia, tontura e epigastralgia como principais efeitos colaterais. Estudos prévios com ITC apontaram poucos efeitos colaterais referidos pelos pacientes - cefaléia, exantema, dor epigástrica, e alterações de enzimas hepáticas ^(11, 12, 15). Os pacientes tratados com CMX apresentaram maior incidência de efeitos colaterais clinicamente manifestos devido à elevada frequência de dor epigástrica.

A VHS e as provas de atividade inflamatória revelaram redução com a terapia antifúngica. O tempo de regressão dessas variáveis ao normal se revelou mais próximo da cura clínica que da sorológica, confirmando que são critérios para avaliação da resposta terapêutica precoce, como foi proposto no presente estudo.

Apesar da não interferência dos pesquisadores na escolha do antifúngico, este estudo não foi randomizado nem duplo cego, que proporciona o maior nível de evidência para se avaliar tratamento, fato que constitui uma limitação desta pesquisa.

O presente estudo demonstrou que pacientes tratados com ITC apresentam cura clínica mais precoce e maior tolerância clínica ao tratamento, quando comparado ao CMX. Como é administrado em dose única diária e deve ser ingerido após uma refeição, a utilização do ITC é mais prática que a do CMX. No entanto, ainda parece necessária melhor avaliação quanto ao tratamento complementar. Os achados do presente estudo permitem considerar o ITC como antifúngico de primeira escolha no tratamento da PCM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Teixeira MM, Theodoro RC, Carvalho MJ et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol.* 2009; 52(2):273-83.
2. Mendes RP. The gamut of clinical manifestations, *In*: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G (eds.), *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1994: 233–258.

3. Lutz A. Uma micose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomyces americanas. Braz Med. 1908; 22:121-4; 141-4.
4. Ribeiro DO. Nova terapêutica para a blastomicose. Publ. Med. (S. Paulo). 1940; 12:36-54.
5. Lacaz CS e Sampaio SAP. Tratamento da blastomicose sul-aamericana com anfotericina B. Resultados preliminares. Rev. Paul. Med. 1958; 52:443-450.
6. Barbosa W & Vasconcelos WM. Ação da sulfamatoxazol associada a trimetoprim na terapêutica da blastomicose sul-americana. Rev. Pat. Trop. 1973; 2:329-339.
7. Negroni R, Gonzalez Montaner LJ, Palma Beltran O et al. Resultados Del ketoconazol (R-41400) em el tratamiento de la paracoccidioidomycosis y la histoplasmosis. Rev. Argent. Micol. 1979; 2:12-18.
8. Restrepo A, Stevens DA, Gómez I et al. Ketoconazole: a new drug for the treatment of paracoccidioidomycosis. Rev. Infect. Dis. 1980; 72:35-45.
9. Negroni R, Palmieri O, Koren F et al. Oral treatment of paracoccidioidomycosis and histoplasmosis with itraconazole in humans. Rev. Infect. Dis. 1987; 9(S1):S47-S50.
10. Restrepo A, Gomez I, Robledo J et al. Itraconazole in the treatment of paracoccidioidomycosis: a preliminary report. Rev. Infect. Dis. 1987; 9(S1):S51-S56.
11. Naranjo MS, Trujillo M, Munera MI et al. Treatment of paracoccidioidomycosis with itraconazole. J Med Vet Mycol 1990; 28:67-76.
12. Queiroz-Telles F, Goldani LZ, Schlamm HT et al. An open-label comparative pilot study of oral voriconazole and itraconazole for long-term treatment of paracoccidioidomycosis. Clin Infect Dis. 2007 Dec 1;45(11):1462-9.
13. Marques SA, Dillon NL, Franco MF et al. Paracoccidioidomycosis: a comparative study of the evolutionary serologic, clinical and radiologic

- results for patients treated with ketoconazole or amphotericin B plus sulfonamides. *Mycopathologia*. 1983; 89:19-23.
14. Dillon NL, Sampaio SA, Haberman MC et al. Delayed results of treatment of paracoccidioidomycosis with amphotericin B plus sulfamides versus amphotericin B alone. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. 1986; 28:263-266.
 15. Shikanai-Yasuda MA, Benard G, Higaki Y et al. Randomized Trial with itraconazole, ketoconazole and sulfadiazine in paracoccidioidomycosis. *Med Mycol* 2002; 40:411-417.
 16. Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho FQ, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. Consenso em paracoccidioidomicose. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39(3):297-310.
 17. Valle ACF, Wanke B, Wanke NCF et al. Tratamento da paracoccidioidomicose – Estudo retrospectivo de 500 casos. *An. Bras. Dermatol*. 1993; 68:65-70.
 18. Mendes RP, Negroni R, Arechavala A. Treatment and control of cure, *In*: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G (eds.), *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1994: 373–392.
 19. Restrepo A & Moncada LH. Indirect fluorescent-antibody and quantitative agar-gel immunodiffusion tests for the serological diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Appl Microbiol*. 1972; 24:132-137.
 20. Bénichou C (1990) Criteria of drug-induced liver disorders. Report of an International Consensus Meeting. *J Hepatol* 11: 272-276.
 21. Zar JH. Biostatistical analysis. New Jersey, Prentice Hall, 5 ed., 2010.
 22. Andes D. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antifungals. *Infect Dis Clin North Am*. 2006; 20:679-697.
 23. Mendes RP, Meira DA, Marcondes-Machado J et al. Sulfamethoxazol-trimethoprim combination (CMX) in the treatment of paracoccidioidomycosis (PBM). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 1996; 29(supl 1):112.
 24. Fabris LR, Andrade UV, Santos AF, Marques APC, Oliveira SMVL, Mendes RP, Paniago AMM. Decreasing prevalence of the acute/subacute clinical form of paracoccidioidomycosis in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 2013 [em publicação].

25. Azevedo PZ, Moris DV, Sylvestre TF, Levorato AD, Andrade JCBN, Cavalcante RS, Carvalho LR, Mendes RP. Incidência da admissão de pacientes com paracoccidioidomicose no período 1988 - 2012 em Serviço universitário da Região de Botucatu (São Paulo, Brasil). Anais do XLIX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Campo Grande (MS), 2013; resumo 357.
26. Benard G, Hong MA, Del Negro GMB, Batista L, Shikanai-Yasuda MA, Duarte AJS. Antigen-specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 54: 7 – 12.
27. Bueno JP, Mendes-Giannini MJS, Del Negro GMB, Assis CM, Takiguti CK, Shikanai-Yasuda MA. IgG, IgM and IgA antibody response for the diagnosis and follow-up of paracoccidioidomycosis: comparison of counterimmunoelectrophoresis and complement fixation. *J Med Vet Mycol* 1997; 35: 213 – 7.
28. Peraçoli MTS, Soares AMVC, Mendes RP, Marques SA, Guastale H, Meira DA, Iwasso MT. Cell-mediated immunity in patients with the chronic form of paracoccidioidomycosis. Early and late evaluation. *Rev Iber Micol* 1988; 5(suppl): 69.
29. Sylvestre TF, Venturini J, Vicentini AP, Moris DV, Carvalho LR, Mendes RP. Avaliação da acurácia do teste enzimaimunoensaio e de sua contribuição no seguimento de pacientes com paracoccidioidomicose e no diagnóstico de doença reativada. Dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, 2013.

Segundo artigo:

**Determinação fenotípica e funcional de monócitos
de pacientes paracoccidioidomicose antes e após
tratamento antifúngico**

DETERMINAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DE MONÓCITOS DE PACIENTES COM PARACOCCIDIOIDOMICOSE ANTES E APÓS TRATAMENTO ANTIFÚNGICO

Resumo

Introdução. A resposta imune frente à paracoccidiodomicose (PCM) tem revelado a importância da participação dos monócitos, precursores dos macrófagos teciduais. Recentemente, foi demonstrado, em outras doenças, subpopulações de monócitos, com funções e comportamentos distintos. Há uma escassez de estudos relacionando o tratamento antifúngico e imunidade na PCM. O presente estudo visa buscar informações que agreguem conhecimentos da interação hospedeiro-parasita e biomarcadores que sejam úteis para o monitoramento imunológico durante o seguimento dos pacientes. Para tanto, o presente estudo teve por objetivo avaliar aspectos fenotípicos e funcionais de monócitos circulantes, antes e após tratamento antifúngico.

Métodos. Foram estudados 23 pacientes com a forma crônica da PCM confirmada pela identificação de formas típicas da fase leveduriforme em materiais clínicos ou de anticorpos séricos específicos pesquisados pela reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, 11 dos quais na fase pré-tratamento – grupo não tratado (GNT) e 12 em cura aparente (GCA), atendidos na Disciplina de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP. Foram incluídos pacientes com comprometimento pulmonar paracoccidíóidico que se encontravam na fase pré-tratamento ou de cura aparente. Um grupo de seis indivíduos saudáveis foi utilizado como controle (GC). Após obtenção do sangue periférico dos indivíduos, foi realizada imunofenotipagem dos monócitos por citometria de fluxo, cultura de monócitos e quantificação de mediadores e citocinas produzidas por estas células, com e sem estímulo antigênico. A comparação de mais de duas amostras independentes foi feita pelo teste ANOVA, com pós-teste Tukey, utilizando-se $p < 0,05$ para diferenças significativas. **Resultados.** A imunofenotipagem dos monócitos revelou maior quantidade de monócitos “intermediários” ($CD14^+CD16^+$) para GNT quando comparado a GCA e GC ($p < 0.05$), que não diferiram entre si. Não se observou diferenças na dosagem de IL-6, IL-10 e

MIP-1 α com e sem estímulo antigênico nos três grupos. A produção de IL-1 β e TNF α sob estímulo de antígeno específico do *Paracoccidioides brasiliensis* (AgPb) foi maior para GNT e GCA do que para GC ($p < 0,05$). O mesmo resultado se repetiu para a produção espontânea de TNF α . A quantificação de citocinas pró-fibrogênicas revelou maior produção de TGF- β 1 sob estímulo do AgPb para GNT do que para GC ($p < 0,05$), enquanto GCA apresentou produção intermediária. A quantificação do FGF-b sob estímulo de LPS e AgPb revelou-se maior para GNT do que GCA e GC ($p < 0,05$), que não diferiram entre si. **Conclusões.** A elevada produção de monócitos “intermediários” observada no momento do diagnóstico e a produção precoce e persistente de citocinas pró-fibrogênicas apresentam-se como marcadores da evolução para fibrose na PCM.

INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é micose sistêmica, granulomatosa, causada por fungos termodimórficos do complexo *Paracoccidioides brasiliensis* e *P. Lutzii*.⁽¹⁻³⁾ As principais formas clínicas da PCM são aguda/subaguda e crônica. A forma aguda/sub-aguda em geral compromete crianças, adolescentes e adultos jovens, apresenta história clínica de curta duração e exibe manifestações clínicas compatíveis com o comprometimento do sistema fagocítico mononuclear. A forma crônica em geral compromete adultos com mais de 30 anos de idade, que apresentam doença de longa duração, que acomete pulmões e mucosa das vias aerodigestivas superiores com grande frequência. Muitos pacientes apresentam seqüelas após tratamento da PCM, que constituem as formas residuais.⁽⁴⁾ Assim como observado em outras infecções granulomatosas, o controle da PCM depende da resposta imune celular antígeno-específica.⁽⁵⁾ Tem sido observado que durante doença ativa, o perfil Th1 encontra-se comprometido, principalmente nas formas mais graves da doença⁽⁶⁾. Após tratamento eficaz, os pacientes apresentam recuperação da resposta imune⁽⁷⁾. Apesar de a resposta imune adaptativa estar bem caracterizada na PCM, a imunidade frente aos fungos do gênero

Paracoccidioides é complexa, e envolve outros subtipos celulares, incluindo os fagócitos mononucleares⁽¹⁾.

Recentemente, diversos subtipos de monócitos têm sido reconhecidos em humanos e camundongos.⁽⁸⁻¹¹⁾ Em humanos, os monócitos “clássicos” são constituídos por células CD14⁺CD16⁻, os “não-clássicos”, CD14⁺CD16⁺⁺, e os “intermediários”, CD14⁺CD16⁺.⁽¹²⁾ Os monócitos “clássicos” constituem 90% dessas células, apresentam elevada expressão de CCR2 e pouca de CX3CR1 (*Fractalkine receptor*) e HLA-DR, intensa atividade fagocítica e elevada produção de IL-10; além disso, são os principais precursores de macrófagos teciduais. Do ponto de vista fenotípico, os monócitos “intermediários” apresentam elevada expressão de HLA-DR, CCR5 e receptor de manose; já os “inflamatórios” apresentam elevada expressão de CX3CR1. Apesar de esses subtipos produzirem grande quantidade de mediadores pró-inflamatórios, algumas diferenças funcionais entre eles têm sido documentada, como por exemplo, o envolvimento dos monócitos “intermediários” na infecção pelo HIV, pelo fato de expressarem CCR5, um dos ligantes para o vírus HIV-1. Já os monócitos “não-clássicos” têm sido implicados em diversos processos inflamatórios como artrite reumatóide, aterosclerose, sepse bacteriana e diversas doenças hepáticas.⁽¹²⁾

Considerando que os estudos relacionando o tratamento antifúngico e imunidade são negligenciados na PCM, o presente estudo visa buscar informações que agreguem conhecimentos da interação hospedeiro-parasita e biomarcadores que sejam úteis para o monitoramento imunológico durante o seguimentos dos pacientes, principalmente daqueles que apresentam o quadro de fibrose, seqüela importante que afeta aspectos sociais, econômicos e psicológico dos pacientes. Para tanto, o presente estudo teve por objetivo avaliar aspectos fenotípicos e funcionais de monócitos circulantes, antes e após tratamento antifúngico.

MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes. Foram estudados 23 pacientes com a forma crônica da PCM (PCM-p) confirmada pela identificação de formas típicas da fase leveduriforme em materiais clínicos ou de anticorpos séricos específicos pesquisados pela

reação de imunodifusão dupla em gel de ágar (IDD), 11 dos quais na fase pré-tratamento – grupo não tratado (GNT) e 12 em cura aparente (GCA), atendidos na Disciplina de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP. Presença de comprometimento pulmonar paracoccidióidico, encontrar-se na fase pré-tratamento ou de cura aparente e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido foram os critérios de inclusão utilizados. Presença de co-morbidade de origem infecciosa, inflamatória ou neoplásica, e utilização de antifúngicos ou de medicação imunossupressora foram considerados critérios de exclusão. Utilizaram-se os critérios de cura propostos por Mendes et al.⁽¹³⁾, que caracterizam cura aparente pela presença de cura clínica, definida como o desaparecimento da sintomatologia apresentada pelo paciente antes da introdução do tratamento antifúngico, normalização da velocidade de hemossedimentação, cura sorológica, revelada pela persistência, por um ano e com avaliações trimestrais, de pesquisa negativa de anticorpos séricos específicos pela IDD e, por fim, pela manutenção dessas condições por dois anos após a descontinuação do antifúngico.

A caracterização dos pacientes segundo gênero, idade (anos), forma clínica à admissão no Serviço, pesquisa de anticorpos séricos específicos, fase em que se encontrava o paciente no momento de sua avaliação, antifúngico utilizado e tempo de tratamento se encontram na tabela 1.

Tabela 1. Caracterização epidemiológica, clínica, sorológica e terapêutica de 23 pacientes com paracoccidioidomicose, avaliados antes do tratamento e com cura aparente.

Pacientes / Grupo	Gênero	Idade (anos)	Forma Clínica	IDD (1:) pré-tratamento	Droga antifúngica	Momento do estudo imunológico	Tempo de tratamento (meses)	Tempo pós-tratamento (meses)
P1/G1	M	60	FCM	16	—	Pré-tratamento	—	—
P2/G1	M	53	FCG	128	—	Pré-tratamento	—	—
P3/G1	M	59	FCM	32	—	Pré-tratamento	—	—
P4/G1	F	47	FCM	64	—	Pré-tratamento	—	—
P5/G1	M	44	FCM	64	—	Pré-tratamento	—	—
P6/G1	M	51	FCL	NR	—	Pré-tratamento	—	—
P7/G1	M	64	FCM	32	—	Pré-tratamento	—	—
P8/G1	M	59	FCM	32	—	Pré-tratamento	—	—
P9/G1	M	52	FCM	8	—	Pré-tratamento	—	—
P10/G1	M	47	FCM	32	—	Pré-tratamento	—	—
P11/G1	M	37	FCM	4	—	Pré-tratamento	—	—
P12/G2	M	56	FCM	16	CMX	Cura aparente	25	28
P13/G2	M	39	FCG	64	CMX	Cura aparente	173	37
P14/G2	M	60	FCL	16	CMX	Cura aparente	97	45
P15/G2	M	56	FCM	16	CMX	Cura aparente	26	3
P16/G2	M	50	FCM	512	CMX	Cura aparente	53	62
P17/G2	M	42	FCM	8	CMX	Cura aparente	28	83
P18/G2	M	42	FCM	NR	ITZ	Cura aparente	31	69
P19/G2	M	39	FCM	2	ITZ	Cura aparente	32	27
P20/G2	M	40	FCG	128	CMX / ITZ	Cura aparente	33 (CMX) / 49 (ITZ)	89
P21/G2	M	42	FCG	64	CMX / ITZ	Cura aparente	6 (CMX) / 131 (ITZ)	53
P22/G2	M	51	FCG	128	CMX / ITZ	Cura aparente	44 (CMX) / 12 (ITZ)	60
P23/G2	M	53	FCM	64	CMX	Cura aparente	84	65

IDD = imunodifusão dupla em gel de ágar; NR = não reagente; FCM = forma crônica moderada; FCG = forma crônica grave; FCL = forma crônica leve; CMX = Cotrimoxazol; ITZ = Itraconazol; M = masculino; F = feminino; Cura aparente: presença de cura clínica e negatificação sorológica que se mantém por dois anos após descontinuação do tratamento antifúngico

* Contrastes na admissão (G1 x G2)

Idade (anos): G1 = 52 (37-64); G2 = 46 (39-60); p = 0,18

Forma clínica: G1 = G2; p = 0,31

IDD (1:) admissão: G1 = 32 (NR-128); G2 = 32 (NR-512); p = 0,66.

Determinação dos níveis séricos de imunoglobulinas específicas. A imunidade humoral dos pacientes foi avaliada pela dosagem semi-quantitativa de anticorpos séricos, feita pela reação de imunodifusão dupla em gel de ágar (IDD), segundo as especificações de Restrepo⁽¹⁴⁾, no Laboratório de Pesquisa de Doenças Tropicais – Área de Micologia Médica.

Imunofenotipagem de monócitos. A análise do fenótipo dos monócitos em amostras de sangue foi realizada por citometria de fluxo utilizando-se os seguintes anticorpos conjugados aos marcadores fluorescentes: anti-CD14 (PE), anti-CD16 (PerCP) e anti-CD45 (APC). O volume de 100 µl de sangue periférico foi incubado com os anticorpos por 20 minutos, no escuro e a 4°C. Em seguida, foram adicionados 900 µL de tampão de lise em cada tubo e mantidos por 15 minutos, no escuro e à 4°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos, 300g, em temperatura ambiente e posteriormente lavadas em *Staining Buffer* (BD Pharmingen™). Após as lavagens, as células foram ressuspensas em 450 uL de *Staining Buffer* e submetidas à leitura em FACSCalibur™ (BD Biosciences). Os dados foram analisados utilizando-se o software *FlowJo*®.

Obtenção de monócitos humanos. Sangue periférico de pacientes e indivíduos saudáveis foi obtido por punção venosa, sendo 10 mL colocados em tubos estéreis contendo 20 U/mL de heparina (Liquemine-Roche). As células mononucleares foram recuperadas por meio de separação em gradiente de Ficoll-Hypaque e lavadas com solução salina tamponada com fosfato 0,1M pH 7,2 (PBS) e EDTA 0,01M (4°C), por 10 min a 200 g e, logo após, com meio de cultura RPMI 1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, N.Y.) por mais 10 min a 200 g. Após este procedimento, as células foram ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco) completo, isto é, suplementado com 2 mM de L-glutamina (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA), 40 mg/ mL de gentamicina e 10% de soro AB humano inativado (meio RPMI completo).

Cultura de monócitos. Após a obtenção das suspensões celulares, as amostras foram submetidas à determinação da viabilidade e do número total de células por amostra. A viabilidade das suspensões celulares foi determinada com azul Tripan a 0,1% em solução salina tamponada pH 7,2 e contadas em câmara de Neubauer. Somente as suspensões celulares com viabilidade

superior a 90% foram utilizadas nos protocolos experimentais. Para a determinação do número total de monócitos, as células foram diluídas 10 vezes em solução de vermelho neutro a 0,02% e incubadas a 37°C, durante 10 minutos. Os monócitos foram diferenciados por apresentarem citoplasma com granulos de coloração vermelha. Além disso, uma alíquota de cada suspensão celular foi avaliada quanto ao percentual de células CD14⁺ (humano), por citometria de fluxo. Foram utilizadas as suspensões que apresentarem 85% de células CD14⁺. A concentração foi ajustada para 2,0 x10⁶ células/mL. O total de 100 µL da suspensão de células foi distribuído em placas de cultura de tecido, de fundo plano e com tampa, contendo 96 orifícios. Após duas horas, os orifícios foram lavados duas vezes com RPMI-1640, para remoção das células não aderentes; em seguida, foram adicionados 100 µL de meio de cultura completo em cada orifício e às culturas celulares foram adicionados 10 µg/mL de LPS (lipopolissacáride da *E. coli*) e 20 µg/mL de antígeno de filtrado de cultura de *P. brasilensis* (rico em gp43). Foram realizados, ainda, ensaios controles sem adição de estímulos. A placa foi incubada a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂, por 24 e 48 horas. Após incubação, os sobrenadantes foram coletados, centrifugados a 1500 rpm por 10 min, aliquotados e estocados a -80°C.

Quantificação de mediadores/citocinas. A quantificação das citocinas IL-8, IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α, IL-12p70 foi realizada por citometria de fluxo de acordo com normas no fabricante (Human Inflammation Kit, BD™ Cytometric Bead Array, BD) e TGF-β1, CCL3/MIP-1α, VEGF e bFGF foi realizada pelo método imunoenzimático ELISA (kit DualSet, R&D Systems), conforme instruções do fabricante. Os resultados estão expressos em pg/mL, a partir de curva padrão estabelecida em cada ensaio.

Análise estatística dos resultados. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando-se o software *GraphPad InStat* versão 3.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e o nível de significância estabelecido para rejeitar a hipótese de nulidade foi de 5,0%. A comparação de mais de duas amostras independentes foi feita pelo teste ANOVA, com pós-teste Tukey⁽¹⁵⁾.

RESULTADOS

Determinação da distribuição das subpopulações de monócitos periféricos de pacientes com PCM antes do tratamento antifúngico e na cura aparente.

A distribuição de monócitos totais (CD45⁺CD14⁺) em pacientes com PCM não se revelou alterada em nenhum dos grupos avaliados (Fig. 1C). Do mesmo modo, as percentagens de monócitos “clássicos” (CD14⁺CD16⁻) e “não-clássicos” (CD14⁺CD16⁺⁺) não se mostraram alteradas (Fig. 1C). Por outro lado, a percentagem de monócitos “intermediários” (CD14⁺CD16⁺) encontrava-se elevada em pacientes do grupo NT (Fig. 1C e 1B) e normal no grupo CA (Fig. 1C).

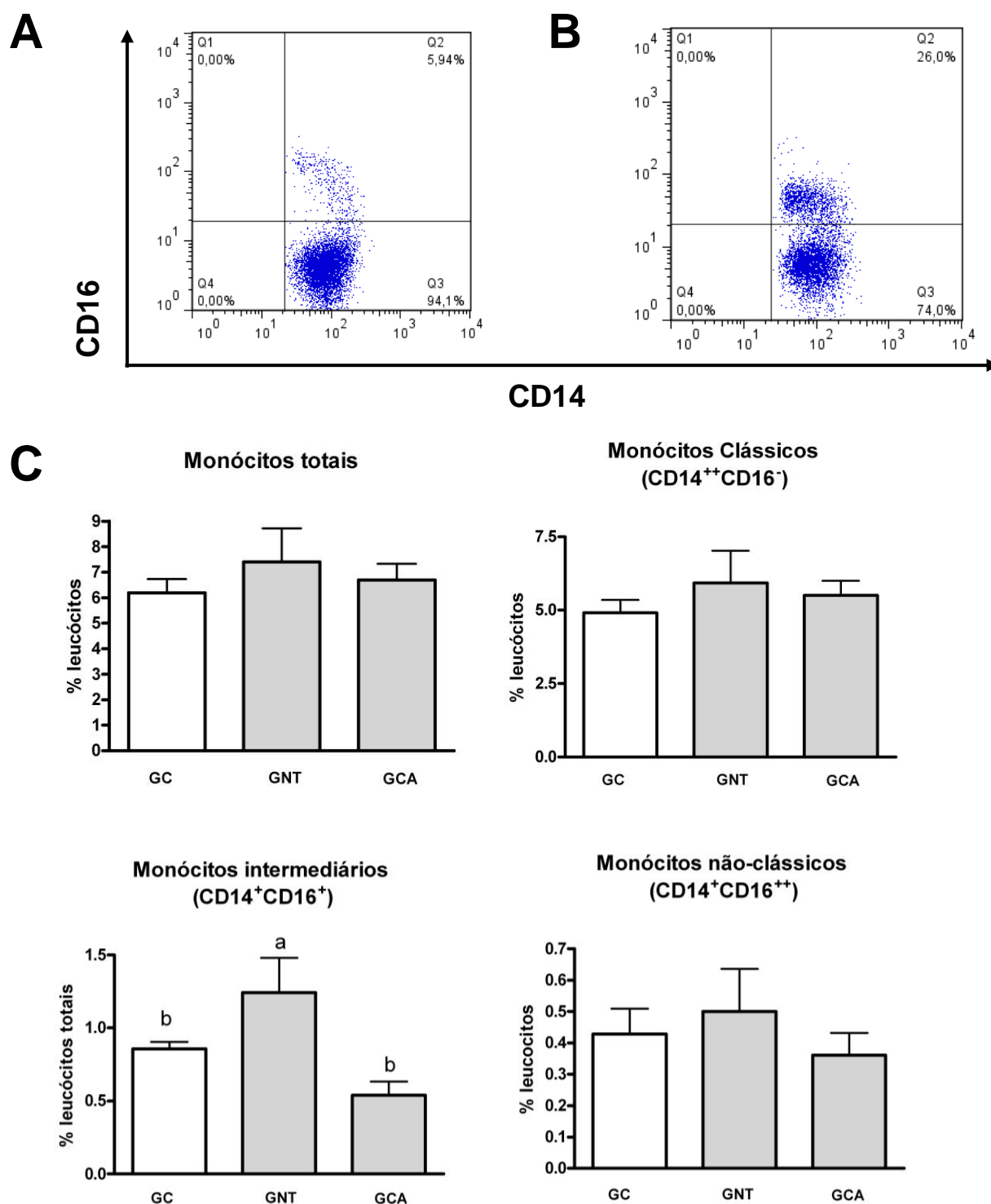


Figura 1. Subpopulações de monócitos sanguíneos. **(A e B).** Dot plots representativo demonstrando a presença de monócitos “clássicos”, CD14⁺CD16⁻ (Q3), e monócitos “não-clássicos” CD14⁺CD16⁺ e “intermediários CD14⁺CD16⁺⁺ (Q2) de indivíduo saudável **(A)** e pacientes não tratados **(B)**. **(C).** Distribuição dos monócitos totais do sangue periférico e de suas subpopulações de indivíduos saudáveis (GC, n=16), pacientes com PCM (PCM-p) antes do tratamento antifúngico (GNT, n=9) e PCM-p na cura aparente (GCA, n=12). Os valores estão expressos em médias \pm desvio-padrão. (Teste ANOVA, com pós-teste Tukey; onde letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupo; $p < 0,05$).

Produção de mediadores/citocinas por monócitos de pacientes com PCM em atividade, antes do tratamento e em doentes com cura aparente.

No presente estudo foram determinadas as concentrações de IL-8, IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10, IL-12p70, MIP-1 α , TGF- β 1, fator de crescimento de fibroblasto básico (FGFb) e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) em sobrenadante de cultura de monócitos e na presença ou ausência de estímulo inespecífico, com LPS ou específico, com filtrado de cultura de *P. brasiliensis*. Entre as citocinas analisadas no sobrenadante de cultura celular, os valores encontrados de IL-12p70 e VEGF estavam abaixo e os valores de IL-8 estavam acima do limite de detecção dos métodos utilizados, motivo pelo qual não puderam ser incluídos na análise.

Como se pode observar na Fig. 2, não foram observadas diferenças entre os grupos constituídos por indivíduos saudáveis, pacientes avaliados antes do tratamento e doentes com cura aparente quanto à produção de IL-6, IL10 e MIP-1 α . A produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α foi maior após estímulo específico em pacientes com PCM, independentemente da fase de tratamento, que no grupo controle. Além disso, a produção espontânea de TNF- α também foi maior nos dois grupos de pacientes. A produção de TGF- β 1 foi maior em pacientes não tratados que nos controles, cabendo aos doentes com cura aparente um valor intermediário entre os dois primeiros. A produção espontânea de FGFb não variou entre os três grupos estudados. No entanto, a produção de FGFb por monócitos estimulados com LPS e por antígeno de *P. brasiliensis* foi maior em pacientes não tratados que no grupo controle e em doentes com cura aparente.

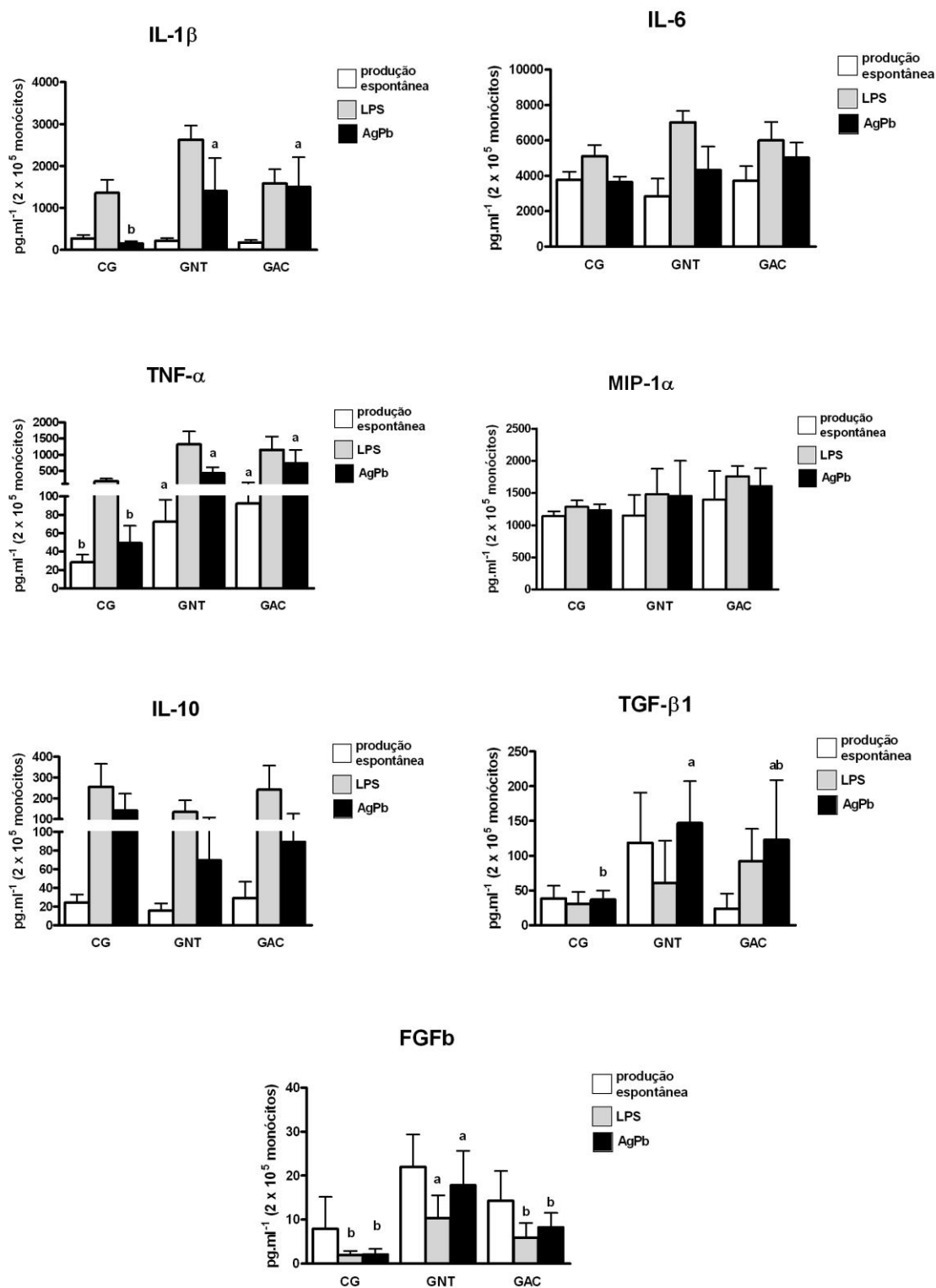


Figura 2. Determinação da produção de IL-1 β , IL-6, TNF- α , MIP-1 α , IL-10, TGF- β 1 e FGFb em sobrenadante de cultura de monócitos obtidos de indivíduos saudáveis (GC, n=6), pacientes com paracoccidiodomicose (PCM-p) antes do tratamento (GNT, n=9) e PCM-p na cura aparente (GCA, n=12). As células foram cultivadas na ausência (produção espontânea) e, ou, presença de lipopolissacarído (LPS) e antígeno de *P. brasiliensis* (AgPb). Os valores estão expressos em médias \pm desvio-padrão (ANOVA, com pós-teste Tukey; letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos; p < 0,05).

DISCUSSÃO

Na avaliação dos achados imunológicos de pacientes com a forma crônica da PCM, alguns aspectos devem ser levados em consideração. Em primeiro lugar, a FC é em geral causada por reativação de focos latentes, que assim se mantiveram durante períodos não passíveis de determinação, mas que podem ser tão longos quanto 30 anos.⁽¹⁶⁾ Isto significa que o hospedeiro já havia organizado uma resposta imune adaptativa contra o *P. brasiliensis*, que foi eficiente durante algum tempo. Por outro lado, em áreas endêmicas muitos indivíduos saudáveis apresentam teste intra-dérmico positivo à paracoccidioidina e negativo à histoplasmina, prevalência que pode chegar a 50%, indicando a existência de uma resposta imune adaptativa contra o *P. brasiliensis*.^(17,18) Em segundo lugar, esses pacientes apresentam história clínica de longa duração, em geral acima de quatro e com frequência maior do que seis meses. Portanto, a avaliação clínica e imunológica realizada à admissão no Serviço é feita em pacientes que já vêm respondendo à PCM, doença, porém sem sucesso, o que é demonstrado pela progressão do quadro clínico. Uma vez mais, estarão sendo avaliados padrões histopatológicos e imunológicos de um hospedeiro sensibilizado por *P. brasiliensis* e com respostas muitas vezes intensas, embora ineficazes. Em terceiro lugar, como os pulmões são em geral a porta de entrada desse fungo, as alterações iniciais devem ocorrer em nível alveolar e podem apresentar uma natureza exsudativa ou granulomatosa.⁽¹⁹⁾ O padrão exsudativo se caracteriza pela presença de exsudato mononuclear em lâmina e septo alveolares, além de edema, fibrina e número variável de polimorfonucleares (PMNs) e de fungos. Em sua apresentação mais grave observa-se destruição do parênquima pulmonar, que pode levar à formação de cavernas. Os fungos podem estar livres ou dentro de macrófagos. Nos septos alveolares observa-se discreta proliferação de fibras reticulínicas. O processo produtivo se caracteriza pelo padrão granulomatoso epitelióide, com células epitelióides e células gigantes multinucleadas. As lesões tendem a confluir, formando nódulos, por vezes com necrose central, que podem drenar seu conteúdo e, desta forma, formar cavernas. Fibrose reticulínica está presente em torno do granuloma, ligando os tecidos

peribrônquicos às paredes alveolares vizinhas. Em alguns pacientes observam-se granulomas intersticiais envolvidos por colágeno. Granulomas e fibrose são peribrônquicos.⁽¹⁾ O parênquima pulmonar também é destruído por fibrose progressiva, espontânea ou induzida por antifúngicos e até mesmo por infecções secundárias, levando ao enfisema para-cicatricial. A patogenia da fibrose parece envolver IL-8, por ativação endotelial e neutrofílica, e também pela ação local de citocinas, entre as quais as fibrogênicas TNF- α e TGF- β . A evolução do processo leva a um círculo vicioso de agressão e reparo, com fibrose, destruição da arquitetura pulmonar e enfisema para-cicatricial.

No presente estudo observou-se maior porcentagem dos monócitos “intermediários” no grupo não tratado (GNT). Estudos em processos infecciosos, como bacteremia por germes Gram-negativos, demonstraram aumento no número de monócitos CD16⁺ que retornaram ao normal após tratamento eficaz.⁽²⁰⁾ Além de processos infecciosos, estudos conduzidos em pacientes com doenças hepáticas crônicas têm revelado que a expansão dessas células na circulação e no fígado contribui com a perpetuação da inflamação intra-hepática e ativação pró-fibrinogênica.⁽²¹⁾ Assim, é possível que, também na PCM, essas células tenham papel fundamental na indução da fibrose, uma vez que monócitos de PCM-p ainda não tratados já produzem quantidades elevadas de TGF- β 1 e FGFb na presença de antígeno de *P. brasiliensis*. Como o início do processo de fibrose na PCM é precoce, estes resultados passam a ser ainda mais promissores e talvez possam auxiliar no seguimento desses pacientes. Apesar ainda de não se dispor de tratamento para a fibrose pulmonar, a elucidação dos mecanismos envolvidos em seu desenvolvimento poderão contribuir para sua profilaxia e, no futuro, para seu tratamento.

A produção de citocinas por monócitos de pacientes com PCM em atividade também foi avaliada por Peraçoli et al.⁽²²⁾ e Parisi-Fortes et al.⁽²³⁾, que estudaram monócitos não estimulados e estimulados com LPS. Esses autores, no entanto, não avaliaram todas as citocinas estudadas no presente estudo, nem a produção na fase de cura aparente e nem a produção estimulada por antígeno específico. O quadro suplementar 1 apresenta uma síntese dos achados dos três trabalhos.

Quadro Suplementar 1. Produção de citocinas por monócitos do sangue circulante de pacientes com paracoccidiodomicose confirmada e ainda não tratada. Avaliação da produção espontânea e induzida por lipopolissacáride (LPS). Comparação entre os achados do presente estudo e os da literatura.

Citocina	Produção espontânea			LPS		
	Estudo	Ref. ²²	Ref. ²³	Estudo	Ref. ²²	Ref. ²³
IL-1 β	N	↑	-	↑	↑	-
IL-6	N	↑	-	N	↑	-
TNF- α	↑	↑	↑	↑	↓	↓
IL-10	N	↑	↑	N	↑	N
TGF- β 1	≥N	↑	↑	N	N	↑

N – normal, não difere dos controles ↑ - maior que os controles ↓ - menor que os controles

Os três estudos revelaram produção espontânea elevada de TNF- α , que constitui o único achado totalmente concordante. A produção de IL-1 β e IL-6 revelaram-se normais no presente estudo, mas elevadas no de Peraçoli et al.⁽²²⁾, enquanto a produção de IL-10 foi normal neste estudo, mas elevada nos outros dois. A produção espontânea de TGF- β 1 apresentou tendência a se encontrar aumentada, o que, de certa forma, concorda com os resultados observados nos outros dois estudos.

Apenas quatro concordâncias foram observadas entre os três estudos em relação à produção de citocinas por monócitos estimulados com LPS: a produção aumentada de IL-1 β , observada no presente estudo e no de Peraçoli et al.⁽²²⁾, a produção normal de IL-10 observada neste estudo e no de Parisi-Fortes et al.⁽²³⁾ e a produção diminuída de TNF- α observada pelos outros autores, ao contrário dos valores elevados encontrados neste estudo. A produção de TGF- β 1 revelou-se normal neste estudo, concordando com os achados de Peraçoli et al.⁽²²⁾, mas discordando dos de Parisi-Fortes et al.⁽²³⁾, que observaram valores mais elevados. Como, no entanto, Peraçoli et al.⁽²²⁾ não caracterizaram a casuística estudada, é possível que dela também façam parte pacientes com a forma aguda/subaguda, o que poderia justificar as

diferenças observadas. Por outro lado, Parisi-Fortes et al.⁽²³⁾ também avaliaram apenas pacientes com a forma crônica, como no presente estudo, mas apenas duas citocinas foram por eles estudadas.

Os achados em relação à produção de citocinas por monócitos estimulados pelo antígeno do *P. brasiliensis* não podem ser comparados com os de outros autores, por serem inéditos. A produção elevada e persistente de IL-1 β e de TNF- α e a produção elevada de TGF- β 1 e FGFb em pacientes ainda não tratados, com tendência a decréscimo em doentes com cura aparente são dignos de registro. Além disso, a produção de IL-10 por monócitos de pacientes não tratados e de doentes em cura aparente tendeu a ser maior que a dos controles. A produção de citocinas pró-inflamatórias por monócitos estimulados por antígeno específico, antes e após tratamento antifúngico eficaz, sugere que essas células preservam essa função, apesar da infecção paracoccidióidica. Deve-se destacar o grande incremento (2,5 vezes) na produção de TGF- β 1, por monócitos de pacientes não tratados, estimulados com antígeno específico, que persiste em doentes com cura aparente. A persistência de produção elevada dessa citocina, que desempenha papel relevante na fibrogênese, conforme discutido anteriormente. Além disso, deve-se destacar a grande variabilidade de produção de TGF- β 1 de um paciente para outro, que poderia justificar a observação clínica de casos de PCM com diferentes graus de fibrose. Estudos com a finalidade de avaliar essa correlação já se encontram em andamento. Considerando que o TGF- β 1 também atua como regulador da resposta imune, no presente estudo foi determinada a produção de FGFb, citocina envolvida na fibrogênese, porém sem atividade reguladora da resposta imune. O presente estudo revelou produção muito elevada de FGFb por monócitos estimulados por antígeno específico, de pacientes com PCM em atividade, antes da introdução do tratamento antifúngico, que tende a decrescer em doentes com cura aparente. Esses resultados, associados à porcentagem elevada de monócitos CD14⁺CD16⁺ apresentada por esses pacientes, sugerem que os monócitos já alcançariam o tecido pulmonar com perfil pró-fibrótico e, assim, teriam um papel fundamental e precoce no desenvolvimento da fibrose pulmonar observada em pacientes com PCM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Franco M, Peraçoli MT, Soares A, Montenegro R, Mendes RP, Meira DA. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr Top Med Mycol.* 1993;5:115-49.
2. Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, Rauscher JT, Restrepo A, Morais F, Niño-Vega G, Taylor JW. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol.* 2006 23:65-73.
3. Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJ, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, Mendoza L, Bagagli E, San-Blas G, Felipe MS. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol.* 2009 52:273-83.
4. Mendes RP; Shikanai-Yasuda MA. Paracoccidioidomycose. In: Cimerman S; Cimerman B. *Medicina Tropical.* São Paulo: Atheneu. 2003. p. 505-45
5. Benard G, Hong MA, Del Negro GM, Batista L, Shikanai-Yasuda MA, Duarte AJ. Antigen-specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg.* 1996 54:7-12.
6. Benard G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* 2008 165:209-21
7. Benard G, Romano CC, Cacere CR, Juvenale M, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine* 2001;13:248-52.
8. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 1989;74:2527-34.

9. Ancuta P, Rao R, Moses A, Mehle A, Shaw SK, Luscinskas FW et al. Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *J Exp Med* 2003;197:1701-7.
10. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003;19:71-82.
11. Sunderkotter C, Nikolic T, Dillon MJ, Van Rooijen N, Stehling M, Drevets DA et al. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol* 2004;172:4410-7.
12. Zimmermann HW, Trautwein C, Tacke F. Functional role of monocytes and macrophages for the inflammatory response in acute liver injury. *Front Physiol.* 2012 Oct 19;3:56
13. Mendes RP, Negroni R, Arechavala A. Treatment and controlo of cure. *In: Franco F, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. Paracoccidioidomycosis. CRC Press, Boca Raton, 1ed, 1994: 373 – 392.*
14. Restrepo A. La prueba de inmunodifusion em el diagnostico de la paracoccidioidomycosis. *Sabouraudia* 1966;4:223-30.
15. Zar JH. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, 4 ed. New Jersey, 1999, 663p.
16. Balabanov K. South American Blastomycosis. First case in Bulgaria. *Savr. Med.* 16,1 : 23-27; 1965.
17. Rodrigues CC. Avaliação da infecção por *Histoplasma capsulatum* por meio de reações intradérmicas em moradores da zona urbana e rural do Município de Pratânia (SP). Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, 2004.

18. Marques AP, Oliveira SM, Rezende GR, Melo DA, Fernandes-Fitts SM, Pontes ER, Bonecini-Almeida Mda G, Camargo ZP, Paniago AM. Evaluation of *Paracoccidioides brasiliensis* Infection by gp 43 Intradermal Test in Rural Settlements in Central-West Brazil. *Mycopathologia*. 2013 176:41-7.
19. Montenegro MR, Franco M. Pathology. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, Boca Raton, Florida - USA, 1ed, 1994: 131 - 50.
20. Horelt A, Belge KU, Steppich B, Prinz J, Ziegler-Heitbrock L. The CD14+CD16+ monocytes in erysipelas are expanded and show reduced cytokine production. *Eur J Immunol*. 2002 May;32(5):1319-27.
21. Liaskou E, Zimmermann HW, Li KK, Oo YH, Suresh S, Stamataki Z, Qureshi O, Lalor PF, Shaw J, Syn WK, Curbishley SM, Adams DH. Monocyte subsets in human liver disease show distinct phenotypic and functional characteristics. *Hepatology*. 2013 57::385-98.
22. Peraçoli MT, Kurokawa CS, Calvi SA, Mendes RP, Pereira PC, Marques SA, Soares AM. Production of pro- and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect*. 2003 Apr;5(5):413-8.
23. Parise-Fortes MR, Marques SA, Soares AM, Kurokawa CS, Marques ME, Peracoli MT. Cytokines released from blood monocytes and expressed in mucocutaneous lesions of patients with paracoccidioidomycosis evaluated before and during trimethoprim-sulfamethoxazole treatment. *Br J Dermatol*. 2006 Apr;154(4):643-50.



Terceiro artigo:

**Sequelas pulmonares na paracoccidioidomicose
Correlação entre variáveis clínicas, imunológicas
morfológicas e funcionais**

SEQUELAS PULMONARES NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE. CORRELAÇÃO ENTRE VARIÁVEIS CLÍNICAS, IMUNOLÓGICAS MORFOLÓGICAS E FUNCIONAIS.

Resumo

Introdução. Apesar do tratamento antifúngico eficaz, são frequentes as sequelas pulmonares na paracoccidiodomicose (PCM), caracterizadas principalmente por fibrose e enfisema paracicatricial, que levam ao desenvolvimento de insuficiência pulmonar crônica. O objetivo deste estudo foi quantificar a presença de fibrose e enfisema em pacientes com PCM e correlacioná-la com variáveis clínicas e espirométricas. **Métodos.** Foram estudados 16 pacientes com a forma crônica da PCM, que já tinham apresentado cura clínica e sorológica e se encontravam em cura aparente, nos quais foram realizadas tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR) e espirometria. A fibrose e o enfisema pulmonares foram quantificados utilizando-se um algoritmo computacional. A comparação de médias foi feita utilizando-se o teste de Mann-Whitney e o de Friedman; as correlações, o teste de Pearson; e as evoluções sorológicas em função do tempo, a regressão linear. As diferenças foram consideradas significantes quando $p \leq 0,05$ para um teste bicaudal. **Resultados.** Fibrose e enfisema foram observados em todos os pacientes. A mediana da fibrose foi de 1,84% [1,08 – 2,39%] e do enfisema 4,04% [1,04 – 15,28%]. Não houve correlação entre estas duas variáveis e os parâmetros clínicos e espirométricos. A regressão linear de IDD em função do tempo de tratamento diferiu entre pacientes com maior ($\geq 4,04\%$) dos com menor quantidade de enfisema ($< 4,04\%$; $p=0,04$). O tempo de cura clínica revelou correlação inversa com a capacidade vital forçada ($r = -0,580$; $p=0,04$) e com o volume expiratório forçado em um segundo ($r = -0,571$; $p=0,04$). Prevaleceu o padrão obstrutivo na espirometria e valores reduzidos de fluxo expiratório forçado médio entre 25 e 75% da curva de CVF quando comparados aos outros parâmetros funcionais ($p < 0,001$). **Conclusões.** O comprometimento funcional dos pulmões é mais intenso em pacientes que exigem maior tempo de tratamento para obtenção de cura clínica. O fluxo expiratório forçado foi a variável funcional mais afetada, sugerindo comprometimento mais intenso de pequenas vias aéreas. A avaliação

quantitativa de fibrose e enfisema permitiu melhor avaliação das seqüelas pulmonares da PCM.

INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é a mais importante micose endêmica da América Latina, causada por fungos do complexo *Paracoccidioides brasiliensis* e do complexo *Paracoccidioides lutzii*, cuja porta de entrada são os pulmões, que também constituem o órgão comprometido com maior frequência (1, 2, 3).

Apesar da disponibilidade de tratamento eficaz, são freqüentes as seqüelas pulmonares, caracterizadas por fibrose e enfisema paracicatricial, que levam ao desenvolvimento de insuficiência pulmonar crônica, com predomínio do padrão obstrutivo (4, 5, 6).

A avaliação rotineira das seqüelas pulmonares é feita por meio de radiografia simples, tomografia axial computadorizada clássica e de alta resolução e de testes funcionais (4, 7).

A avaliação morfológica, feita por radiologistas experientes, oferece informações sobre as características e a distribuição das lesões pulmonares que, por comparação com padrões previamente observados, permitem a sugestão de um ou mais diagnósticos etiológicos. No entanto, tem se observado significativas variações intra e inter-observadores, que trazem algumas limitações à utilização destes métodos (8), problema que se acentua quando se procura quantificar essas lesões.

Estudo recente, realizado em pacientes com PCM tratada, avaliou a tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR), função pulmonar e a prova da caminhada e revelou predomínio do padrão obstrutivo leve e correlação direta entre dessaturação e intensidade do enfisema pulmonar (9).

O desenvolvimento de sistemas computacionais proporcionou uma avaliação mais objetiva das imagens de TCAR de pacientes com lesões pulmonares intersticiais (8), determinando as áreas lesadas como porcentagem da área total de cada pulmão.

Assim, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de quantificar as lesões pulmonares determinadas por fibrose e enfisema de pacientes com

PCM após tratamento eficaz e correlacioná-las com o tempo necessário para se obter cura clínica e sorológica, tempo de tratamento, a imunodifusão dupla em gel de ágar (IDD) antes do início da terapia e os parâmetros de função pulmonar.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foram avaliados 16 pacientes com PCM, atendidos na Disciplina de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista, no período compreendido entre 1988 e 2012. Os dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais foram obtidos de fichas padronizadas, preenchidas com base nos prontuários médicos.

Critérios de inclusão. Foram incluídos no presente estudo os seguintes pacientes com PCM: a) casos confirmados, caracterizados pela presença de manifestações clínicas compatíveis e identificação de formas típicas da fase leveduriforme de *Paracoccidioides* spp em materiais clínicos; b) casos prováveis, caracterizados pela presença de manifestações clínicas compatíveis e detecção de anticorpos séricos específicos pela reação de imunodifusão dupla em gel de Agar (IDD), mas nos quais o fungo não foi identificado ⁽¹⁰⁾; c) pacientes com forma crônica que alcançaram a cura aparente, definida pelo desaparecimento dos sinais e sintomas presentes antes do início da terapia antifúngica, excetuando-se as manifestações residuais decorrentes de seqüelas (cura clínica) e pesquisa negativa, persistente durante um ano, de anticorpos séricos específicos, pesquisados pela reação de imunodifusão dupla em gel de ágar (cura sorológica).

Todos os pacientes incluídos no estudo realizaram tratamento com a associação sulfametoxazol-trimetoprim (cotrimoxazol).

Critérios de exclusão. Foram excluídos os pacientes que apresentavam doenças sistêmicas de etiologia infecciosa, parasitária, neoplásica ou inflamatória (conectivopatias) como co-morbidade, gestantes e mulheres em fase de lactação.

Classificação das formas clínicas. Os pacientes com forma crônica foram classificados segundo gravidade conforme Mendes ⁽³⁾ como descrito abaixo. A forma crônica ou do adulto foi caracterizada pela instalação insidiosa,

em geral superior a quatro e, com freqüência, seis meses, em pacientes com mais de 30 anos de idade, com comprometimento de pulmões e mucosa das vias aerodigestivas superiores e classificada em leve, moderada e grave. Os casos graves foram definidos pela presença de três ou mais dos seguintes critérios: a) perda ponderal maior que 10% do peso corpóreo habitual; b) comprometimento pulmonar grave; c) comprometimento de outros órgãos, tal como adrenais, sistema nervoso central e ósseo; d) envolvimento de linfonodos superficiais do tipo tumoral ou supurativo; d) reação de IDD igual ou superior a 1/64; e) reação intradérmica à paracoccidioidina negativa. Os casos moderados apresentavam perda ponderal entre 5 e 10% do peso corpóreo habitual, reação de IDD igual a 1/16 ou 1/32 e um ou dois dos demais critérios acima referidos, enquanto os casos leves revelavam perda ponderal menor que 5%, comprometimento exclusivo de pulmões, mucosa de vias aero-digestivas superiores ou pele, reação de IDD com títulos inferiores a 1/16 e reação intradérmica à paracoccidioidina positiva.

Quantificação de fibrose e enfisema. A determinação de fibrose e enfisema foi feita segundo as especificações de Oliveira et al. (2012). As imagens de TCAR foram realizadas em tomógrafo helicoidal SCT-7000TS - Shimadzu Co em formato *Digital Imaging and Communications in Medicine* (DICOM). Às imagens obtidas aplicou-se algoritmo conforme descrito abaixo. A fibrose dos lobos superior, médio e inferior do pulmão direito e superior e inferior do pulmão esquerdo foi individualmente quantificada utilizando-se seis escores de 0 a 5; escore 0 foi caracterizado como ausência de fibrose e escore 5 como nível máximo desta variável. A mesma categorização foi utilizada para enfisema. Os segmentos foram analisados por algoritmo baseado em histograma, com os seguintes parâmetros: regiões com pixels abaixo de - 920 HU foram definidas como enfisema; entre - 919 e - 780 HU como pulmão normal; entre 0 e 150 HU como área de fibrose. Para análise, esta quantificação foi apresentada em porcentagem. Os pacientes foram divididos em dois grupos segundo a mediana da porcentagem de fibrose: a) pacientes com valores inferiores a 1,84%; b) pacientes com valores iguais ou superiores 1,84. A mesma divisão foi feita para enfisema: a) pacientes com valores menores que 4,04; b) pacientes com valores iguais ou superiores a 4,04.

A figura 1 revela a marcação da área de interesse em uma janela da TCAR, a definição da área de fibrose e, por fim, o histograma obtido.

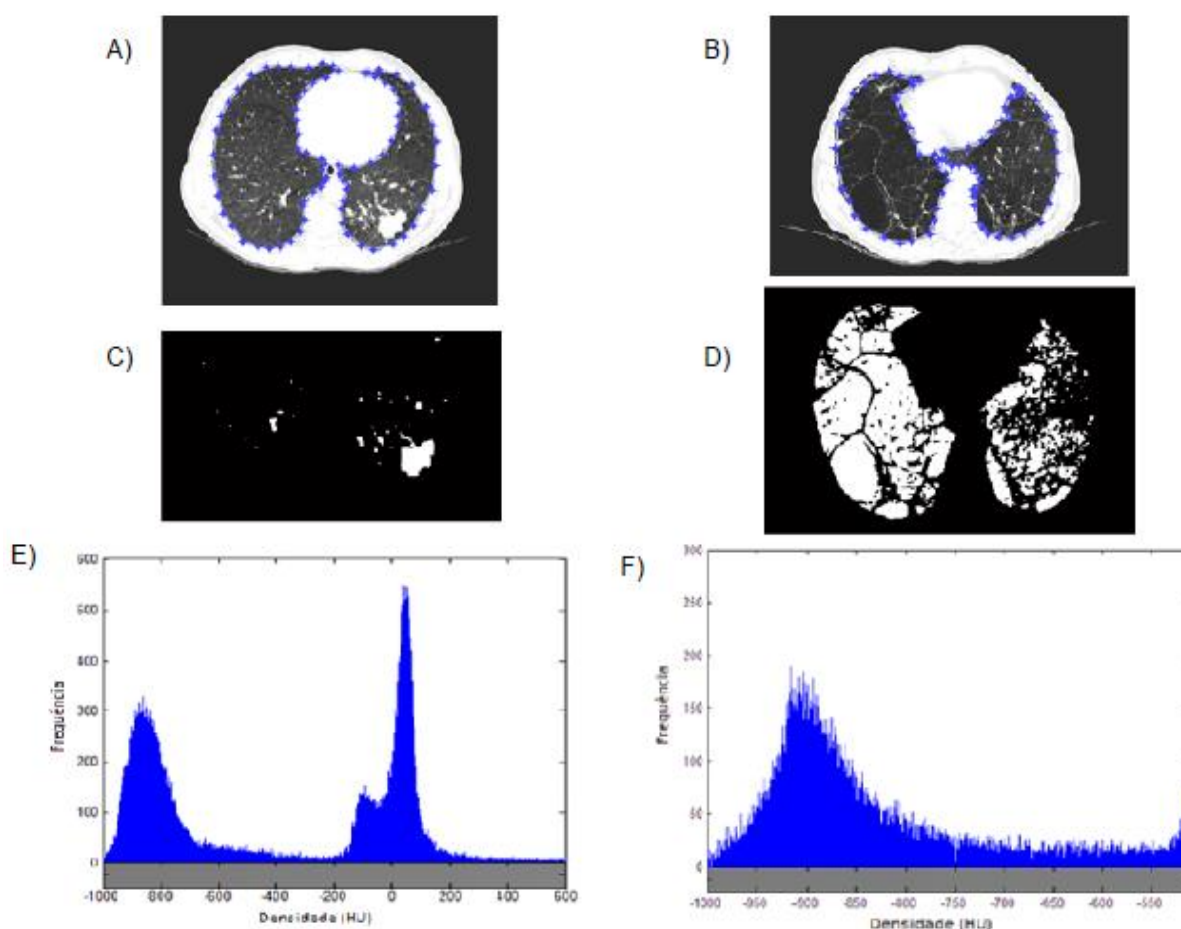


Figura 1. Algoritmo matemático para quantificação de fibrose e enfisema. A e B – Exemplo de segmentação da área pulmonar na TCAR. C – Área comprometida por fibrose. D – Área comprometida por enfisema. E e F – histograma da área pulmonar correspondente à fibrose e enfisema respectivamente.

Prova de função pulmonar. Foram realizadas espirometrias em 13 pacientes, no equipamento Koko 606055 versão 9.A, Ferraris Respiratory, conforme as recomendações padrão ⁽¹¹⁾, avaliando-se a capacidade vital forçada (CVF), o volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1), a relação VEF1/CVF e o fluxo expiratório forçado médio entre 25 e 75% da curva de CVF (FEF_{25-75%}). Foram utilizados valores preditos baseados na população brasileira ⁽¹²⁾. Para a classificação da gravidade do padrão obstrutivo utilizou-se

o seguinte parâmetro: leve – VEF1 80 – 61%; moderado – VEF1 60 – 41%; grave – VEF1 \leq 40%.

Desenho do estudo. Foi conduzido um estudo observacional para quantificar a fibrose e o enfisema pulmonares utilizando tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR) e avaliar parâmetros de função pulmonar, realizada nos pacientes com PCM após alcançarem cura aparente. Os pacientes foram divididos em dois grupos segundo a mediana da porcentagem de fibrose: a) pacientes com valores inferiores a 1,84%; b) pacientes com valores iguais ou superiores 1,84. A mesma divisão foi feita para enfisema: a) pacientes com valores menores que 4,04; b) pacientes com valores iguais ou superiores a 4,04. Os pacientes foram comparados segundo gravidade, IDD inicial, tempo para se obter a cura clínica e sorológica e tempo de tratamento. A interação entre as variáveis estudadas também foi investigada.

Comitê de Ética em Pesquisa. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. O termo de consentimento livre e esclarecido foi assinado por todos os pacientes, que eram adultos com maioridade.

Análise estatística dos resultados. Cada variável contínua foi apresentada como mediana e 1º e 3º quartis ou como média e desvio padrão. Na comparação dessas variáveis utilizou-se teste de Mann-Whitney para amostras independentes, teste de Friedman para amostras dependentes e nas correlações o teste de Pearson. Na análise de tempo para cura sorológica segundo intensidade de fibrose e enfisema utilizou-se a regressão linear. As variáveis categóricas foram apresentadas como porcentagem e comparadas pelo teste do χ^2 ou pela prova exata de Fisher. Essas análises estatísticas foram realizadas segundo as especificações de Zar ⁽¹³⁾. Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando-se o programa SAS versão 9.3. A hipótese de nulidade foi rejeitada admitindo-se um erro tipo α igual ou inferior a 5%, em teste bicaudal. Valores entre 5 e 10% foram interpretados como tendência.

RESULTADOS

Os dados epidemiológicos, clínicos e sorológicos e a evolução após introdução da terapia antifúngica encontram-se na tabela 1.

Tabela 1. Características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais de 16 pacientes com a forma crônica da paracoccidioidomicose em cura aparente. Dados categóricos estão apresentados como porcentagem e as contínuas como mediana, 1º e 3º quartis.

Pacientes (n=16)	
Idade (anos)	50,0 [39,0 – 57,0]
Gênero masculino (%)	87,5
Tabagismo	100,0
Forma crônica (%)	
Leve	6,2
Moderada	75,0
Grave	18,8
IDD inicial (1:)	32 [16 – 64]
Tempo de cura clínica (meses)	5,2 [4,2 – 11,8]
Tempo de cura sorológica (meses)	23,6 [17,2 – 42,1]
Tempo de tratamento (meses)	41,8 [31,9 – 58,6]

IDD – imunodifusão dupla em gel de agar.

A mediana da porcentagem de fibrose foi de 1,84% [1,08 – 2,39%] e a de enfisema foi 4,40% [1,04 – 15,28%]. Não se observou relação entre a gravidade dos pacientes e a intensidade de fibrose e enfisema, conforme revela a tabela 2.

Tabela 2. Avaliação de 16 pacientes com a forma crônica da paracoccidioidomicose em cura aparente. Níveis de fibrose e enfisema pulmonares, em porcentagem, determinados por algoritmo, segundo gravidade. Dados apresentados como média e desvio padrão.

	Forma crônica moderada (n=12)	Forma crônica grave (n=4)	Valor de p
Fibrose	1,58 ± 0,63	2,30 ± 1,03	0,12
Enfisema	8,54 ± 8,21	11,62 ± 15,32	0,62

A espirometria foi realizada em 13 pacientes, dos quais apenas um apresentou exame normal. Os outros 12 pacientes revelaram distúrbio ventilatório obstrutivo, nove dos quais eram leves, dois graves e um era moderado. A porcentagem do valor predito de FEF_{25-75%} (42%) foi inferior às observadas para CVF (98%), VEF1 (79%) e VEF1/CVF (82%) [p<0,001]; e a de CVF (98%) foi maior que a observadas para VEF1 (79%; p=0.01), como revela a tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros de função pulmonar de 13 pacientes com paracoccidiodomicose em cura aparente. Comparação pelo teste de Friedman.

	Pacientes (n)	Mediana, 1º e 3º quartis
CVF	13	3,96 [2,23 – 4,36]
% do predito		98 [74 – 105] ^A
VEF1	13	2,58 [1,51 – 3,08]
% do predito		79 [62 – 87] ^B
VEF1/CVF	13	0,66 [0,63 – 0,74]
% do predito		82 [79 – 93] ^{AB}
FEF_{25-75%}	08	1,32 [0,88 – 2,00]
% do predito		42 [31 – 68] ^C

CVF – capacidade vital forçada; VEF1 – volume expiratório forçado em 1 segundo;

FEF_{25-75%} – fluxo expiratório forçado médio entre 25 e 75% da curva de CVF.

Comparação entre variáveis em função do valor predito:

CVF vs VEF1 vs VEF1/CVF: CVF>VEF1; VEF1/CVF intermediário (p=0,01)

CVF vs VEF1 vs VEF1/CVF vs FEF_{25-75%}: FEF_{25-75%}<(CVF=VEF1=VEF1/CVF) [p<0,001]

Medianas seguidas da mesma letra não diferem entre si; letras diferentes indicam medianas que diferem entre si (p<0,05)

Observou-se correlação direta entre o tempo de cura clínica e os tempos de cura sorológica (r=0,576; p=0,03) e tempo de tratamento (r=0,586; p=0,02), conforme revela o quadro 1.

Quadro 1. Estudo de 16 pacientes com a forma crônica da paracoccidiodomicose após tratamento, em cura aparente. Correlação entre fibrose e enfisema, determinados por algoritmo, e variáveis clínicas, avaliada pelo coeficiente de correlação de Pearson. Resultados apresentados como valor de r e, entre parênteses o nível de significância.

	IDD inicial	Tempo de cura clínica	Tempo de cura sorológica	Tempo de tratamento
Tempo de cura clínica	0,210 (0,43)
Tempo de cura sorológica	- 0,161 (0,58)	0,576 (0,03)
Tempo de tratamento	- 0,305 (0,25)	0,586 (0,02)	0,912 (0,00)	...
Fibrose	- 0,306 (0,25)	0,259 (0,33)	0,252 (0,38)	0,137 (0,61)
Enfisema	0,163 (0,55)	- 0,078 (0,77)	- 0,004 (0,98)	0,092 (0,73)

IDD – imunodifusão dupla em gel de ágar.

Houve correlação inversa entre o tempo de cura clínica e os valores obtidos de CVF ($r=-0,580$; $p=0,04$) e VEF1 ($r=-0,571$; $p=0,04$). Esta correlação não ocorreu com a relação VEF1/CVF e com FEF_{25-75%}. A razão VEF1/CVF revelou tendência à correlação inversa com o tempo de tratamento ($p=0,09$) e tendência à correlação direta com fibrose ($p=0,09$), como mostra o quadro 2.

Quadro 2. Estudo de 13 pacientes com a forma crônica da paracoccidioidomicose após tratamento, em cura aparente. Correlação entre fibrose e enfisema determinados por algoritmo, parâmetros clínicos e variáveis que medem a função pulmonar pelo coeficiente de correlação de Pearson. Resultados apresentados como valor de r e, entre parênteses, o nível de significância.

	IDD inicial	Tempo de cura clínica	Tempo de cura sorológica	Tempo de tratamento	Fibrose	Enfisema
CVF	- 0,332 (0,27)	- 0,580 (0,04)	- 0,089 (0,79)	- 0,220 (0,47)	- 0,185 (0,54)	- 0,212 (0,49)
VEF1	- 0,311 (0,30)	- 0,571 (0,04)	- 0,143 (0,67)	- 0,295 (0,32)	- 0,107 (0,73)	- 0,163 (0,59)
VEF1/CVF	0,025 (0,93)	0,048 (0,87)	- 0,352 (0,29)	- 0,492 (0,09)	0,484 (0,09)	- 0,072 (0,82)
FEF_{25-75%}	- 0,389 (0,34)	- 0,422 (0,29)	- 0,041 (0,93)	- 0,332 (0,42)	0,368 (0,36)	- 0,229 (0,58)

IDD – imunodifusão dupla em gel de ágar; CVF – capacidade vital forçada; VEF1 – volume expiratório forçado em 1 segundo; FEF_{25-75%} - fluxo expiratório forçado médio entre 25 e 75% da curva de CVF.

As curvas de regressão dos níveis séricos de anticorpos em função do tempo de tratamento foram comparadas entre grupos de pacientes constituídos em relação à mediana dos valores de enfisema pulmonar (4,04%) [Figura 1] e à mediana das medidas de fibrose (1,84%) [Figura 2]. Observou-se diferença entre as retas de regressão dos grupos constituídos em função da intensidade de enfisema ($p=0,04$). No entanto, essas retas de regressão também revelam que esses dois grupos não diferiram em relação ao tempo de negativação sorológica. As retas de regressão não diferiram quando os pacientes foram divididos em grupos segundo a intensidade da fibrose ($p=0,93$).

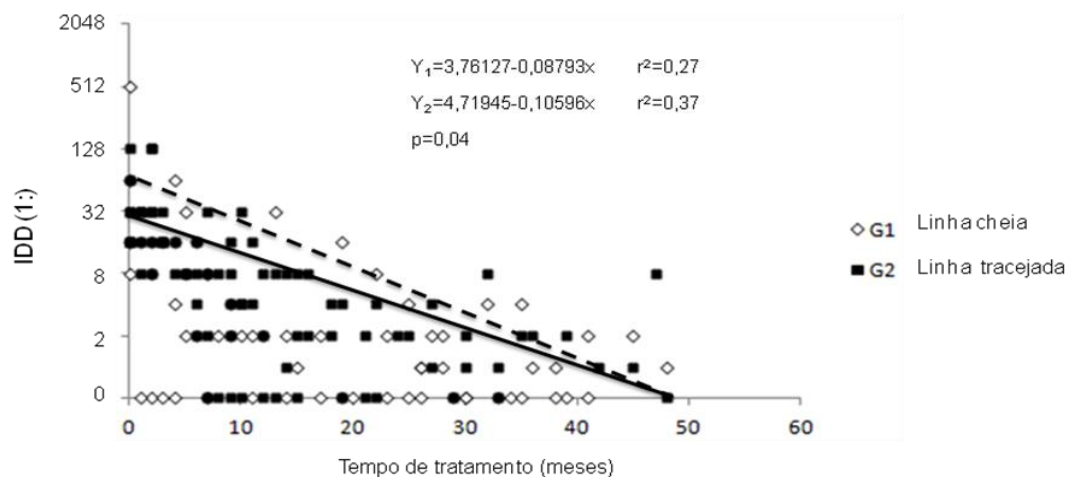


Figura 2. Curva de regressão linear da reação de imunodifusão dupla em gel de ágar (IDD) em função do tempo de tratamento segundo intensidade de enfisema pulmonar em 16 pacientes com a forma crônica da paracoccidioidomicose, em cura aparente. G1 – grupo com enfisema inferior a 4,04%; G2 – grupo com enfisema maior ou igual a 4,04%.

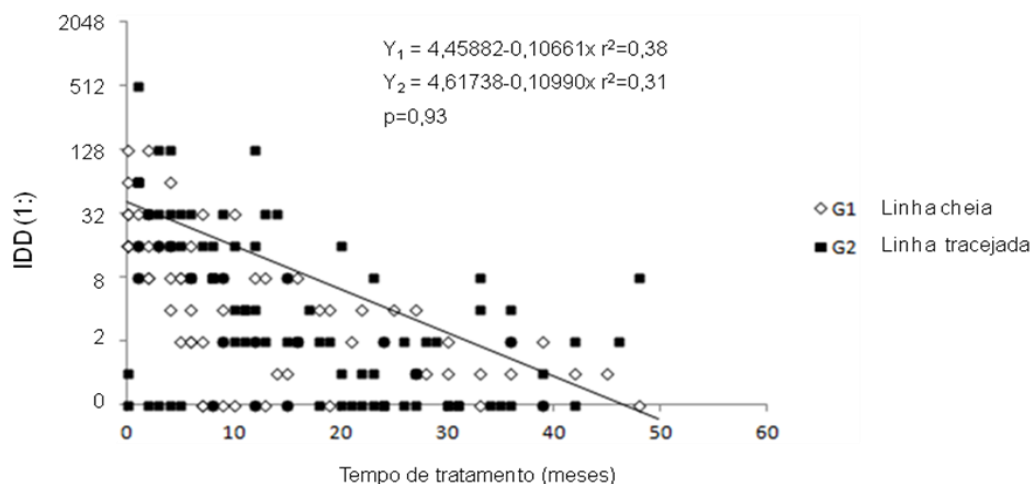


Figura 3. Curva de regressão linear da reação de imunodifusão dupla em gel de ágar (IDD) em função do tempo de tratamento segundo intensidade de fibrose pulmonar, em 16 pacientes com a forma crônica da paracoccidioidomicose, em cura aparente. G1 – grupo com fibrose inferior a 1,84%; G2 – grupo com fibrose maior ou igual a 1,84%.

DISCUSSÃO

A forma crônica da PCM se deve à reativação de focos endógenos latentes e se instala de forma lenta e progressiva, propiciando contato do fungo e de seus antígenos com os tecidos pulmonares por tempo prolongado, mesmo quando o diagnóstico é precoce ⁽¹⁴⁾. Nos casos em que o tratamento é instituído para outras doenças, infecciosas ou não, que constituíam diagnóstico diferencial, o tempo de sintomatologia e de agressão tecidual é ainda maior. A glicoproteína de 43kDa (gp43), antígeno dominante do *P. brasiliensis*, é sintetizada no ribossoma, transportada para a membrana citoplasmática e, a seguir, excretada por simples exocitose ou através de lomassomas ^(15, 16). A gp43 é uma protease ^(17, 18) e apresenta intensa atividade proteolítica sobre colágeno e elastina ⁽¹⁹⁾, levando à completa solubilização da elastina ⁽¹⁹⁾. Em pacientes com a forma crônica, a gp43 se encontra presente no soro e na urina antes do tratamento, mas ausente quando alcançam a cura aparente ^(20, 21). Estes achados, em seu conjunto, sugerem que *P. brasiliensis* e seus antígenos causam intensas lesões no parênquima pulmonar, com destruição da elastase e formação de enfisema. Além disso, demonstrou-se intensa e precoce atividade fibrogênica induzida por antígenos de *P. brasiliensis*, tanto em infecções experimentais ⁽²²⁾ quanto em pacientes ^(7, 23). Assim, a tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR) revelou que 33,8% dos pacientes com PCM, virgens de tratamento antifúngico, apresentavam enfisema pulmonar e que 29,9% revelavam fibrose à admissão ⁽²³⁾. Utilizando-se radiografia simples de tórax, observou-se que 31,8% de 47 pacientes apresentavam fibrose no momento do diagnóstico, que se elevou a 53,2% após tratamento com itraconazol ⁽⁷⁾, demonstrando também a grande incidência de seqüela na PCM. A produção das citocinas fibrogênicas, fator transformador do crescimento β (TGF- β) e o fator de crescimento de fibroblasto básico (FEF-b), se revela aumentada no momento do diagnóstico de pacientes com PCM, diminuindo com a instituição de tratamento específico ^(24, 25).

Apesar dos vários trabalhos publicados sobre PCM, poucos se dedicaram ao estudo de suas seqüelas e dos mecanismos imunopatogênicos que as induzem. A correlação entre achados tomográficos e histopatológicos foi realizada poucas vezes, mas trouxe grande contribuição ao conhecimento

das seqüelas pulmonares da PCM ⁽²⁶⁾. No entanto, a correlação entre evolução clínica, sorológica, tomográfica com quantificação de fibrose e enfisema, e funcional não tem sido avaliada e constituiu o objetivo deste estudo.

A fortíssima correlação positiva entre tempo de cura sorológica e tempo de tratamento indica adesão dos pacientes ao esquema terapêutico proposto.

A correlação direta entre tempo de cura clínica e tempo de cura sorológica valida, uma vez mais, a utilização da evolução sorológica, determinada pela IDD, como critério de cura da PCM ⁽²⁷⁻²⁹⁾. Como os objetivos do tratamento são a cura clínica e a recuperação da imunidade específica mediada por células, capaz de evitar futuras recaídas, a correlação indireta observada entre níveis séricos determinados por contraímuno eletroforese e normalização da produção de inter-leucina 2 (IL-2) e de interéferon- γ (IFN- γ) ⁽³⁰⁾ permite se inferir que a cura sorológica se acompanha de recuperação da imunidade celular.

A correlação positiva observada entre tempo de cura clínica e tempo de tratamento valida a indicação de um critério biológico na definição da duração da terapêutica ⁽²⁹⁾. Assim, pacientes com quadros mais leves deverão ser tratados por menor tempo que os mais graves.

Não se observou correlação entre intensidade de fibrose e de enfisema com gravidade do quadro clínico à admissão do paciente. No entanto, o valor de *p* se aproxima mais da significância para fibrose do que para enfisema. A ampliação da casuística poderá contribuir para a melhor avaliação desse aspecto.

As correlações indiretas observadas entre tempo de cura clínica e as variáveis funcionais capacidade vital forçada (CVF) e volume expiratório forçado em 1 segundo (VEF₁) sugerem que seriam mais intensas as lesões pulmonares dos pacientes que precisaram de maior tempo para desaparecimento da sintomatologia. Esses achados sugerem que a primeira fase do tratamento da PCM tem valor preditivo para as seqüelas que o paciente deverá apresentar, achado inédito no estudo do comprometimento pulmonar da PCM. Além disso, embora a razão VEF₁/CVF não apresente correlação com o tempo de cura clínica, revela uma tendência à correlação indireta com o tempo de tratamento, sugerindo que tratamentos mais prolongados, que em geral ocorrem em casos mais graves, se acompanham de piora funcional. Além

disso, essa razão também revela uma tendência à correlação direta com a intensidade da fibrose, talvez pela redução da CVF determinada pela fibrose.

O fluxo expiratório forçado ($FEF_{25-75\%}$) não apresentou correlação com variáveis imunológicas e terapêuticas, fibrose e enfisema. No entanto, foi a variável funcional que apresentou o menor valor relativo em função do valor preditivo. Como o $FEF_{25-75\%}$ mede a permeabilidade das pequenas vias aéreas e os estudos histopatológicos revelam a presença de granulomas peribronquiolares ⁽²⁶⁾ e a TCAR demonstra a presença de lesões nessa localização ⁽²⁶⁾, este achado talvez possa ser valorizado e investigado em maior número de pacientes.

Além das lesões induzidas pela PCM, deve-se levar em consideração o tabagismo, revelado por todos os pacientes, que também leva a alterações da função respiratória, com padrão obstrutivo.

A fibrose tem sido observada com grande precocidade, como foi demonstrado em modelos experimentais ⁽²²⁾ e na avaliação de pacientes ^(7, 23). Além disso, citocinas fibrogênicas, tais como TGF- β e FGF-b se encontram elevadas já na admissão do paciente, antes mesmo de se instituir o tratamento antifúngico ^(24, 25). Assim, a retração causada pela fibrose levaria a alterações da árvore respiratória, como acotovelamentos, que resultariam em obstrução das vias aéreas.

A imunopatogenia das seqüelas pulmonares da PCM ainda não se encontra completamente esclarecida, assim como o papel da fibrose e do enfisema. No entanto, a utilização do algoritmo para quantificação de fibrose e enfisema, a correlação inversa entre tempo de cura clínica e as variáveis funcionais CVF e VEF_1 , a tendência à correlação entre a razão VEF_1/CVF e o tempo de tratamento (correlação inversa) e entre essa razão e a intensidade da fibrose (correlação direta) e, por fim, a redução mais acentuada da $FEF_{25-75\%}$, trouxeram inegável contribuição ao conhecimento das seqüelas pulmonares.

Os achados do presente estudo também indicam a importância de se contar com um diagnóstico precoce, para a imediata introdução do tratamento antifúngico específico e eficaz, para reduzir os tempos de tratamento, de cura clínica e de cura sorológica, e a formação de fibrose e de enfisema paracitricial. As limitações apresentadas por pacientes com PCM, tratada e com cura aparente, no desempenho de suas atividades como trabalhador rural, que

em geral são bastante pesadas e, inclusive, na execução de atividades domiciliares de rotina devem constituir um estímulo para o estudo das lesões residuais desta micose endêmica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Teixeira MM, Theodoro RC, Carvalho MJ et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol.* 2009; 52(2):273-83.
2. Tani EM, Franco M: Pulmonary cytology in paracoccidioidomycosis. *Acta Cytol* 1984, 28:571-575.
3. Mendes RP. The gamut of clinical manifestations, *In*: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G (eds.), *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1994: 233–258.
4. Lemle A, Wanke B, Mandel MB: Pulmonary localization of paracoccidioidomycosis: lung function studies before and after treatment. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1983, 25:73-78.
5. Afonso JE, Nery LE, Romaldini H, Bogossian M, Ribeiro-Ratto O. Função pulmonar na paracoccidioiomucose (Blastomicose Sul-Americana). *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1979; 21:269-280.
6. Cock AM, Cano LE, Velez D, Aristizabal BH, Trujillo J, Restrepo A: Fibrotic sequelae in pulmonary paracoccidioidomycosis: histopathological aspects in BALB/c mice infected with viable and non-viable *paracoccidioides brasiliensis* propagules. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2000, 42:59-66.
7. Tobón AM, Agudelo CA, Osorio ML, Alvarez DL, Arango M et al. Residual Pulmonary Abnormalities in Adult Patients with Chronic Paracoccidioidomycosis: Prolonged Follow-Up after Itraconazole Therapy. *Clin Infect Dis* 2003; 37:898-904.
8. Oliveira M, Pina DR, Alvarez M, Velo AF, Cavalcante RS, Yamashita S, Mendes RP, Miranda JRA. Use of algorithms for semi-automatic quantification of pulmonary fibrosis and emphysema. *IFMBE Proceedings* 2012; 39: 819 – 22.

9. Costa AN, Benard G, Albuquerque ALP, Fujita CL, Magri ASK et al. The lung in paracoccidioidomycosis: new insights into old problems. *Clinics* 2013; 68:441-448.
10. Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho FQ, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. Consenso em paracoccidioidomicose. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39(3):297-310.
11. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, et al. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J*. 2005;26(2):319-38.
12. Pereira CA, Sato T, Rodrigues SC. New reference values for forced spirometry in white adults in Brazil. *J Bras Pneumol*. 2007;33(4):397-406.
13. Zar JH. Biostatistical analysis. New Jersey, Prentice Hall, 5 ed., 2010.
14. Franco M, Peracoli MT, Soares A, Montenegro R, Mendes RP, Meira DA: Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr Top Med Mycol* 1993, 5:115-149.
15. Campo-Aasen I, Cabral NA, Yarzabal L. Subcellular localization of antigen E2 of *Paracoccidioides brasiliensis*. Na immunoenzymatic election microscopy study. *Sabouraudia* 1980; 18: 167–171.
16. Sandoval MP, Del Negro GMB, Mendes-Giannini MJS, Brito T. Distribution of exoantigens and a 43-kDA glycoprotein in the yeast and mycelia forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Mycol Med* 1996; 6: 1 – 6.
17. Puccia R. Estudos bioquímicos e imunoquímicos sobre a gp43 de *Paracoccidioides brasiliensis*. Tese de doutoramento, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, Brasil, 1990.
18. Travassos LR. Immunochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis* antigens. *In*: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. Paracoccidioidomycosis. CRC, Boca Raton (Florida, USA), 1ed., 1994: 67 – 86.
19. Mendes-Giannini MJS, Moraes RA, Ricci TA. Proteolytic activity of the 43,000 molecular weight antigen secreted by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1990; 32: 384 – 5.
20. Mendes-Giannini MJS, Bueno JP, Shikanai-Yasuda MA, Ferreira AW, Masuda A. Detection of the 43,000-molecular-weight glycoprotein in sera

- of patients with paracoccidioidomycosis. J Clin Microbiol 1989; 27: 2842 – 5.
21. Salina MA, Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Barraviera B, Mendes-Giannini MJS. Detection of circulating Paracoccidioides brasiliensis antigen in urine of paracoccidioidomycosis patients before and during treatment. J Clin Microbiol 1998; 36: 1723 – 8.
 22. Franco L, Najvar L, Gomez B, Restrepo S, Graybill JR, Restrepo A. Experimental pulmonary fibrosis induced by Paracoccidioides brasiliensis conidia: measurement of local host responses. Am J Trop Med Hyg 1998; 58: 424 – 30.
 23. Souza AS Jr, Gasparetto EL, Davaus T, Escuissato DL, Marchiori E. High-Resolution CT findings of 77 patients with Untreated Pulmonary Paracoccidioidomycosis. Am J Roentg 2006; 187:1248-1252.
 24. Macedo AMRB. Produção de fator de necrose tumoral α (TNF- α) e de fator transformador do crescimento β (TGF- β) em pacientes com paracoccidioidomicose em atividade. Dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista – UNESP.
 25. Determinação fenotípica e funcional de monócitos de pacientes com paracoccidioidomicose antes e após tratamento antifúngico – segundo artigo apresentado nesta tese.
 26. Marchiori E, Valiante PM, Mano CM, Zanetti G, Escuissato DL, Souza AS, Jr., Capone D: Paracoccidioidomycosis: high-resolution computed tomography-pathologic correlation. Eur J Radiol 2011, 77:80-84.
 27. Restrepo M, A. Comportamiento inmunológico de veinte pacientes con paracoccidioidomicosis. Antioquia Med 1967; 17: 211 – 30.
 28. Cano LE, Restrepo A. Predictive value of serologic tests in the diagnosis and follow-up of patients with paracoccidioidomycosis. Rev Inst Med Trop São Paulo 1987; 29: 276 – 83.
 29. Mendes RP, Negroni R, Arechavala A. Treatment and control of cure. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. Paracoccidioidomycosis. CRC, Boca Raton (Florida, USA), 1ed., 1994: 373 – 92.

30. Benard G, Romano CC, Cacere CR, Juvenale M, Mendes-Giannini MJS, Duarte AJS. Imbalance of IL-2, IFN- γ and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine* 2001; 13: 248 – 52.
31. Franco L, Najvar L, Gomez B, Restrepo S, Graybill JR, Restrepo A. Experimental pulmonary fibrosis induced by *Paracoccidioides brasiliensis* conidia: measurement of local host responses. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 58: 424 – 30.



Conclusões

CONCLUSÕES

O presente estudo, nas condições em que foi desenvolvido, permite as conclusões abaixo relacionadas, apresentadas em três artigos.

I. COMPARAÇÃO DO ITRACONAZOL COM O COTRIMOXAZOL NO TRATAMENTO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE

- A eficácia e a efetividade do tratamento inicial com itraconazol não diferiu das observadas com cotrimoxazol.
- A eficácia e a efetividade observadas no tratamento complementar foram as mesmas em pacientes tratados com itraconazol, cotrimoxazol ou itraconazol seguido de cotrimoxazol.
- A cura clínica de pacientes com a forma crônica da PCM tratados com itraconazol foi mais rápida que naqueles tratados com cotrimoxazol.
- Pacientes que realizaram tratamento inicial e complementar com itraconazol ou cotrimoxazol apresentaram cura sorológica mais rápida que os que receberam itraconazol no tratamento inicial e cotrimoxazol no complementar.
- A tolerância dos pacientes ao itraconazol é maior que ao cotrimoxazol no tratamento da PCM.
- Menor tempo de cura clínica e maior tolerabilidade sugerem que o itraconazol seja a primeira escolha no tratamento da PCM.

II. DETERMINAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DE MONÓCITOS DE PACIENTES COM PARACOCCIDIOIDOMICOSE ANTES E APÓS TRATAMENTO ANTIFÚNGICO

- Em pacientes com PCM, os monócitos “intermediários” se encontram em maior número nos virgens de tratamento que naqueles em cura aparente.
- Monócitos de pacientes com PCM em cura aparente preservam a memória imunológica, caracterizada pela elevada produção de citocinas pró-inflamatórias quando estimulados com antígeno específico.

- Pacientes com PCM apresentam produção precoce de citocinas pró-fibrogênicas, que persiste após tratamento antifúngico.
- A precocidade da presença de monócitos intermediários e da produção persistente de citocinas pró-fibrogênicas constituem marcadores de evolução para fibrose, em pacientes com PCM.

III. SEQUELAS PULMONARES NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE. CORRELAÇÃO ENTRE VARIÁVEIS CLÍNICAS, IMUNOLÓGICAS MORFOLÓGICAS E FUNCIONAIS.

- Fibrose e enfisema apresentam elevada prevalência em pacientes com paracoccidiodomicose em cura aparente.
- A correlação direta observada entre tempo de cura clínica e tempo de tratamento, em pacientes com paracoccidiodomicose, valida a indicação de um critério biológico na definição da duração da terapêutica.
- O comprometimento funcional dos pulmões é mais intenso em pacientes que exigem maior tempo de tratamento para obtenção de cura clínica.
- O fluxo expiratório forçado foi a variável funcional mais afetada em pacientes com a forma residual da paracoccidiodomicose, sugerindo comprometimento mais intenso de pequenas vias aéreas.