



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUISTA FILHO” UNESP
Faculdade de Medicina de Botucatu

Adriele Dandara Levorato

Avaliação da bioquímica sanguínea de pacientes com paracoccidioidomicose, tratados com cotrimoxazol ou itraconazol.

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

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Poncio Mendes

Botucatu/SP

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO” UNESP
Faculdade de Medicina de Botucatu

Adriele Dandara Levorato

**Avaliação da bioquímica sanguínea de
pacientes com paracoccidioidomicose,
tratados com cotrimoxazol ou
itraconazol.**

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

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Poncio Mendes

Botucatu/SP

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO” UNESP
Faculdade de Medicina de Botucatu

Adriele Dandara Levorato

**Avaliação da bioquímica sanguínea de
pacientes com paracoccidioidomicose,
tratados com cotrimoxazol ou
itraconazol.**

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

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Poncio Mendes

Botucatu/SP

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Levorato, Adriele Dandara.

Avaliação da bioquímica sanguínea de pacientes com paracoccidioidomicose, tratados com cotrimoxazol ou itraconazol / Adriele Dandara Levorato. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Rinaldo Poncio Mendes

Capes: 40101096

1. Paracoccidioides brasiliensis. 2. Paracoccidioidomicose - Tratamento. 3. Agentes antiinfeciosos. 4. Fígado - Pesquisa. 5. Vias biliares - Pesquisa. 6. Distúrbios do metabolismo..

Palavras-chave: Alterações hepáticas e metabólicas; Bioquímica sanguínea; Cotrimoxazol; Itraconazol; Paracoccidioides brasiliensis.

Epígrafe

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”. Charles Chaplin

Dedicatória

*Aos meus pais **Dirço e Luzia**, que não mediram esforços para a minha formação profissional, pelos abraços e beijos todas às segundas-feiras, por sempre estarem me esperando aos finais de semana. Obrigada por tudo. Amo vocês.*

*À minha irmã **Cleice**, pelo incentivo, apoio e palavras de conforto durante os momentos difíceis durante esta caminhada. Amor por toda a vida.*

*Ao meu namorado e grande amigo **Diego**, por sempre me apoiar nas decisões a serem tomadas, por sempre dizer “Calma, vai dar tudo certo” e que apesar da distância manteve-se sempre presente através dos pensamentos. Te amo.*

*Ao meu orientador, **Dr. Rinaldo “Tiete” Poncio Mendes**,
não apenas pela orientação deste trabalho,
mas pelos conselhos, paciência, ensinamentos e
por acreditar na minha capacidade profissional.
Muito obrigada.*

*Aos **pacientes** atendidos no Ambulatório de Blastomicose –
Hospital das Clínicas – UNESP, pelas conversas e sorrisos sinceros.*

Agradecimientos

A Deus, por guiar os meus passos, por mostrar os caminhos que devem ser seguidos e pelo conforto durante os momentos que mais precisei.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

A toda equipe de trabalho, Dr. Ricardo de Souza Cavalcante, Dra. Daniela Vanessa Moris, Tatiane Fernanda Sylvestre, Priscila Zacarias de Azevedo, Vanessa Martinez Manfio, Jéssica Cristina Bilizário Nogueiro Andrade, James Venturini e Camila Marcheti.

Aos colaboradores desse trabalho, Dra. Daniela Vanessa Moris, Tatiane Fernanda Sylvestre, Priscila Zacarias de Azevedo, Dr. Ricardo de Souza Cavalcante, Vanessa Martinez Manfio e Jéssica Cristina Bilizário Nogueiro Andrade, pela ajuda no levantamento de todos os dados, paciência e apoio.

À amiga e profissional Daniela Vanessa Moris, que iniciou o presente trabalho e que me guiou para dar continuidade. Este mérito também é seu.

À Dr^a Lúcia R. Carvalho, do Departamento de Bioestatística – IB / Unesp, pelas análises estatísticas deste trabalho e por me socorrer em vários momentos.

Aos amigos e pós-graduandos do Laboratório de Pesquisa de Doenças Tropicais - LEPDT, Mariana Gatto, Mariana Miziara, Francilene Capel, Laura Mendes, Karen Ingrid Tasca, Andréia Amaral, Leonardo Medeiros e Thayssa Carvalho, pela convivência, reclamações e risos. Admiro cada um a seu modo.

Ao funcionário do LEPDT e amigo, Carlos Roberto Gonçalves de Lima – Carlinhos, pela convivência, conselhos e apoio em todos os momentos.

Às amigas e companheiras de república Mariana Gatto e Tatiane Fernanda Sylvestre, por todo apoio concedido nos momentos de alegrias e tristezas, risos e pelo companheirismo durante todos esses anos.

À minha amiga e companheira Tatiane Fernanda Sylvestre, pelo convívio diário desde o tempo da graduação em Araraquara. Você é muito especial.

Aos funcionários da Pós-Graduação e do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, em especial Solange S. Cagliari e Bruno Quirino Jorgetto, pelo auxílio e atenção em todos os momentos.

À coordenadoria e ao programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos e confiança em meu trabalho.

Aos responsáveis pelo LEPDT, Sueli Aparecida Calvi e Rodrigo Mattos dos Santos, pelo auxílio nos momentos que precisei.

Sumário

SUMÁRIO

I) Introdução geral.....	01
1. Aspectos gerais da paracoccidioomicose.....	01
1.1. Aspectos laboratoriais da paracoccidioomicose.....	06
1.2. Tratamento da paracoccidioomicose.....	07
2. Objetivos.....	09
2.1. Objetivos gerais.....	09
2.2. Objetivos específicos.....	09
3. Referências Bibliográficas.....	09
 II) Artigo 1 – Evaluation of hepatobiliary function in patients with paracoccidioomycosis treated with trimethoprim-sulfamethoxazole or itraconazole.....	 14
1. Introduction.....	15
2. Patients and Methods.....	16
2.1. Study design.....	16
2.2. Study population.....	17
2.3. Classification of clinical forms.....	18
2.4. Outcomes.....	18
2.5. Methods.....	18
2.6. Prevalence and incidence.....	19
2.7. Criteria of drug-induced liver injury.....	19
2.8. Statistical analysis of results.....	20

3. Results.....	21
4. Discussion.....	37
5. References.....	44

III) Artigo 3 – Evolução de reações de fase aguda e de variáveis metabólicas em pacientes com paracoccidoidomicose tratados com cotrimoxazol ou itraconazol....

1. Introdução.....	53
2. Pacientes e Métodos.....	54
2.1. População estudada.....	55
2.1.2. Classificação das formas clínicas.....	55
2.1.3. Dados clínicos e laboratoriais.....	55
2.2. Desenho do estudo.....	56
2.2.1. Prevalência e incidência.....	56
2.2.2. Intensidade das alterações observadas após introdução de antifúngico.....	57
2.2.3. Avaliação laboratorial.....	57
2.2.4. Desfechos.....	58
2.2.5. Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.....	59
2.2.6. Avaliação estatística dos resultados.....	59
3. Resultados.....	60
4. Discussão.....	81
5. Referências.....	87

IV) Conclusões.....94

Artigo 1 – Evaluation of hepatobiliary system in patients with paracoccidioidomycosis treated with trimethoprim-sulfamethoxazole or itraconazole.....	94
Artigo 2 – Evolução de reações de fase aguda e de variáveis metabólicas em pacientes com paracoccidioidomicose tratados com cotrimoxazol ou itraconazol.....	95
V) Anexo	96

Resumo

Resumo

Estudos sobre as alterações da bioquímica sanguínea na paracoccidiodomicose (PCM), antes e durante o tratamento, são escassos e em geral apresentam casuísticas pequenas e curto tempo de seguimento. Assim, foi realizado um estudo prospectivo com 200 pacientes com PCM submetidos à avaliação das alterações hepatobiliares, metabólicas e reações de fase aguda à admissão e durante o seguimento do tratamento com cotrimoxazol (CMX) ou itraconazol (ITC). Dos 200 pacientes, 149 apresentaram a forma crônica (FC) e 51 a forma aguda/subaguda (FA); 31 foram tratados com ITC e 169 com CMX. Avaliações clínicas e da bioquímica sanguínea foram realizadas antes de se iniciar o tratamento, definido como momento 0 (M_0) e, a seguir, periodicamente, até que os pacientes apresentassem cura clínica, definida pelo desaparecimento da sintomatologia apresentada à admissão e redução da velocidade de hemossedimentação (VHS) a valores normais (M_3), que ocorreu após 18 a 23 semanas de tratamento. Entre estes dois momentos, os pacientes foram avaliados a intervalos definidos em semanas, em relação ao início do tratamento: M_1 : 4 a 6 e M_2 : 7 a 10. Os níveis séricos de bilirrubina conjugada (BC), bilirrubina total (BT), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (F $\bar{A}$), gama-glutamilttransferase (γ -GT), triglicerídes, glicose, colesterol total, lípides totais, cálcio, ácido úrico, fósforo, proteínas totais e frações, mucoproteínas, α_1 -glicoproteína ácida e eletroforese de proteínas séricas foram dosados no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP. Os dados foram apresentados como razões entre o valor absoluto e o limite superior de normalidade para as variáveis que avaliaram a função hepatobiliar, e com os limites superiores e, ou, inferiores para as variáveis metabólicas e reações de fase aguda. A avaliação da função hepática revelou que na admissão do paciente, como decorrência da PCM que os níveis séricos de F $\bar{A}$ e γ -GT foram as variáveis com maior prevalência;

enquanto BT, BC e γ -GT apresentaram as maiores elevações. Entre as três variáveis com alterações mais prevalentes, F $\bar{A}$ e γ -GT predominaram na FA enquanto ALT não diferiu segundo forma clínica; BC e γ -GT apresentaram maior intensidade na FA enquanto a BT não diferiu segundo forma clínica. Após introdução do tratamento antifúngico, observou-se alteração de todas as variáveis; ALT e F $\bar{A}$ foram as variáveis com maior incidência de elevação; enquanto CB revelou a maior intensidade de elevação. Entre as duas variáveis com maior incidência, F $\bar{A}$ apresentou maior incidência de elevação na FA que na FC, enquanto, a incidência de elevação de ALT não diferiu segundo forma clínica. A incidência de elevação de F $\bar{A}$ e γ -GT não variou segundo antifúngico; a elevação dos níveis séricos de BC e BT foram mais frequentes em pacientes tratados com ITC do que com CMX. As alterações do tipo hepatocelular predominaram em pacientes tratados com CMX enquanto, os do tipo colestático leve em doentes que receberam ITC. Os pacientes que receberam CMX tiveram normalizados os níveis séricos de ALT, BC, FA e γ -GT e reduzidos os de AST e BT durante o tratamento, enquanto, os que receberam ITC mantiveram elevados os níveis séricos de ALT, BT, BC, F $\bar{A}$ e γ -GT, e tiveram reduzidos apenas os de AST. A avaliação das alterações metabólicas e reações de fase aguda revelou que na admissão ao Serviço a prevalência de alterações laboratoriais variou de 3,0% para os níveis séricos elevados de ácido úrico a 98,0% para os níveis de γ -globulina em pacientes com a FA enquanto, aqueles com a FC apresentaram uma variação de 3,5% para os níveis séricos diminuídos de glicose a 99,3% para os níveis elevados de gama-globulina. Após introdução do antifúngico, a incidência de alterações variou de 3,2% para os níveis séricos diminuídos de fósforo a 15,9% para os níveis séricos elevados de triglicérides. Os pacientes com a FC apresentaram maior incidência de alterações dos níveis séricos de colesterol total, triglicérides, glicose, cálcio e ácido úrico que os doentes com a FA. O

presente estudo revelou que são muito complexas as alterações da função hepatobiliar e metabólicas, que devem ser avaliadas e monitoradas durante o tratamento da PCM.

Summary

Summary

Studies on the alterations in blood biochemistry in paracoccidioidomycosis (PCM), before and during treatment are scarce and generally have small patients number and short follow-up time. Thus, a prospective study was conducted with 200 patients with PCM submitted to the evaluation of hepatobiliary function, metabolic and acute phase reactions alterations at admission and during follow-up of treatment with cotrimoxazole (CMX) or itraconazole (ITC). Of the 200 patients, 149 presented a chronic form (CF), and 51 the acute subacute form (AF), 31 were treated with ITC, and 169 were treated with CMX. Clinical and blood biochemistry were performed before starting the treatment, defined as time 0 (M_0), and then periodically until the patients had clinical cure, defined as the disappearance of the symptomatology presented at admission and regression of the erythrocyte sedimentation rate to normal (M_3), which occurred after 18 to 23 weeks of treatment. Between these two moments, the patients were evaluated at intervals defined in weeks, compared to the beginning of treatment: M_1 : 4-6 and M_2 : 7-10. The serum levels of conjugated bilirubin (CB), total bilirubin (TB), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase ($F\bar{A}$), gamma- glutamyltransferase (γ -GT), triglycerides, glucose, total cholesterol, total lipids, calcium, uric acid, phosphorus, total proteins and fractions, mucoproteins, α_1 -acid glycoprotein and serum protein electrophoresis were measured at the Central Laboratory of the Hospital of the Faculty of Medicine of Botucatu - UNESP. Data were presented as ratios between the absolute value and the upper limit of normality for the variables that assessed hepatobiliary function, and with upper and/or lower limit of the metabolic variables and acute phase reactions. The evaluation of hepatobiliary function revealed that the patient's admission as a result of the PCM that serum levels of $F\bar{A}$ and γ -GT were the variables with the highest prevalence, while TB, CB and γ -GT showed the highest elevations. Among the three variables with

more frequent alterations, the F $\bar{A}$ and γ -GT predominated in AF, while ALT did not differ by clinical form; γ -GT and CB showed higher intensity in AF, while BT did not differ by clinical form. After introduction of antifungal treatment, we observed changes in all variables, ALT and F $\bar{A}$ were the variables with the highest incidence of elevation, while CB had the highest intensity of elevation. Between the two variables with the highest incidence, F $\bar{A}$ showed a higher incidence of elevation in AF than in CF, while the incidence elevation of ALT did not differ by clinical form. The incidence of elevated F $\bar{A}$ and γ -GT serum levels did not vary according antifungal; elevation of serum levels of CB and TB were more frequent in patients treated with ITC than those CMX. Alterations of hepatocellular type predominated in patients treated with CMX, while the mild cholestatic type in patients receiving ITC. Patients who had received CMX normalized serum levels of ALT, CB, ALP and γ -GT and low the AST and TB, whereas those who received ITC remained with elevated serum levels of ALT, TB, CB, ALP and γ -GT, and had only reduced the AST. The evaluation of metabolic alterations and acute phase reactions revealed that at admission to Service the prevalence of laboratory abnormalities ranged from 3.0% to elevated uric acid serum levels to 98.0% for γ -globulin serum levels in patients with AF, while those with CF varied from 3.5% glucose serum levels decreased to 99.3 % for the high levels of gamma- globulin. After introduction of antifungal, the incidence of alterations ranged from 3.2% for phosphorus serum levels decreased to 15.9 % for elevated serum levels of triglycerides. Patients with CF had higher incidence of alterations in serum levels of total cholesterol, triglycerides, glucose, calcium and uric acid than those patients with AF. The present study revealed that are very complex the alterations of hepatobiliary function and metabolics, which must be evaluated and monitored during treatment of PCM.

I. Introdução geral

I) Introdução geral

1. Aspectos gerais da paracoccidioidomicose

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada por fungos termodimórficos do complexo *Paracoccidioides brasiliensis* e do complexo *Paracoccidioides lutzii*.¹ Confinada à América Latina, é endêmica em área que se estende do México à Argentina.² Apesar de incompletos, os dados disponíveis indicam maior incidência dessa micose no Brasil, onde é diagnosticada com grande frequência no Estado de São Paulo.³

Foi descrita pela primeira vez por Adolpho Lutz⁴ em 1908 que, em lesões bucais de dois pacientes de São Paulo, encontrou fungos esféricos, com morfologia diferente da revelada pelo *Coccidioides immitis*. As principais manifestações clínicas dos pacientes incluíam amolecimento dos dentes e comprometimento de mucosa oral, laringe, linfonodos, glândula salivar e traqueia. Lutz registrou que o exame histopatológico desses pacientes revelava reação tuberculóide com fungos, células gigantes, células epitelióides e fungos com exo-esporulação. Esse pesquisador também isolou o fungo em cultivo, demonstrou a existência das fases micelial em cultivo à temperatura ambiente e leveduriforme em pacientes infectados, e reproduziu a doença em cobaias. Deve-se registrar que poucos pesquisadores foram tão completos ao descreverem uma nova doença e seu agente etiológico.

Essa micose foi inicialmente denominada Blastomicose Sul-Americana (BSA) ou Doença de Lutz, Splendore e Almeida⁵. No entanto, a oficialização do termo paracoccidioidomicose se deu no *First Pan American Symposium on Paracoccidioidomycosis*, realizado em Medellín, Colômbia, única denominação utilizada por Ayello em sua conferência de abertura, na qual abordou aspectos históricos dessa micose sistêmica.⁶ Essa denominação se justifica, pois casos autóctones de PCM já tinham

sido descritos na América Central, e no México, motivo pelo qual deixava de ser unicamente sul-americana. Além disso, já se iniciava uma nova abordagem na sistemática de fungos, ligando-se o nome da doença ao de seu agente etiológico.

Uma das principais características desse fungo imperfeito é o dimorfismo térmico. Em tecidos humanos e em culturas mantidas a 37°C apresenta-se na fase leveduriforme, sua forma patogênica, com parede rica em α -glucana. Em temperatura ambiente apresenta-se na fase filamentosa, sua forma infectante, que ocorre em natureza, com parede rica em β -glucana.²

Apesar de existirem áreas endêmicas bem definidas para este patógeno, o nicho ecológico de sua fase sapróbia continua mal caracterizado, devido ao pequeno número de vezes em que o fungo foi isolado do ambiente^{7,8} ao longo período de latência da doença⁹ e ao pequeno número de relatos da doença em animais domésticos⁹ ou selvagens^{11,12}. Em 1986, Naiff et al.¹³ relataram o isolamento de *P. brasiliensis* em tatus (*Dasypus novemcinctus*) estudados em Tucuruí - Pará, área considerada não-endêmica para esta doença.

Admite-se que a infecção seja adquirida quando propágulos da fase micelial do fungo são inalados, instalando-se nos alvéolos pulmonares. A seguir, o fungo passa à fase leveduriforme, transformação considerada fundamental para que se estabeleça a infecção^{14,15}. O fungo pode, então, se disseminar por via hematogênica e/ou linfática para qualquer parte do organismo.¹⁴ A penetração cutânea direta do fungo é muito rara, apesar de ter sido documentada em alguns casos, em acidentes com espinhos e em laboratório.

Ao entrar no organismo, *P. brasiliensis* pode ser destruído imediatamente ou multiplicar-se, produzindo uma lesão de inoculação e se disseminando para linfonodos regionais. Desta forma, constitui-se o complexo primário, formado pelo polo parenquimatoso, pela linfangite ascendente e pelo pólo ganglionar. A infecção paracoccidióidica pode regredir ou progredir, dependendo de fatores ligados ao fungo e ao hospedeiro. A regressão pode ser acompanhada de destruição de todos os fungos, formando-se cicatriz local estéril ou se acompanhar da persistência de focos quiescentes, com fungos viáveis. A progressão da infecção determina o aparecimento de sinais e sintomas, o que caracteriza a doença ativa ¹⁶. Os focos latentes podem apresentar reativação posterior, denominada reinfecção endógena, e levar à doença ativa.

As manifestações clínicas da PCM se relacionam, em geral, ao comprometimento de pulmões, pele, mucosa das vias aerodigestivas superiores, adrenais e de órgãos ricos no sistema fagocítico mononuclear, tais como fígado, baço, linfonodos e medula óssea ¹⁴. No entanto, deve-se registrar que a PCM pode comprometer qualquer órgão, aparelho ou sistema.

A PCM se apresenta sob três formas clínicas principais: forma aguda ou subaguda, forma crônica e forma residual. A forma aguda ou subaguda, também chamada forma juvenil, é responsável por 20 a 25% dos casos, acomete em geral crianças, adolescentes e adultos jovens, caracteriza-se por apresentar instalação mais rápida, de algumas semanas a poucos meses e apresentar envolvimento predominante do sistema reticuloendotelial, isto é, baço, fígado, nódulos linfáticos e medula óssea. Nessa forma clínica as manifestações pulmonares são raras e a presença de lesões de mucosa das vias aerodigestivas superiores é pouco frequente. Nos tecidos são encontrados muitos fungos em multiplicação e granulomas em geral frouxos. A forma crônica ou do adulto ocorre em 75% a 80% dos casos, em geral acomete indivíduos com idade superior a 30 anos e que apresentam história

clínica de longa duração, com frequência acima de seis meses. As manifestações pulmonares são muito frequentes e em geral associadas ao comprometimento de outros órgãos, tais como mucosa das vias aerodigestivas superiores, pele e, por vezes, adrenais. As formas residuais, também denominadas sequelas, são observadas após tratamento e se caracterizam pelas manifestações clínicas ligadas às sequelas observadas após tratamento, entre as quais se destacam fibrose e enfisema pulmonar e síndrome de Addison.^{17,18}

Como não é doença de notificação compulsória no Brasil, a real prevalência da PCM não pode ser calculada. Coutinho et al.¹⁹ estudaram 3181 óbitos por PCM no Brasil, entre 1980 e 1995, e demonstraram a grande magnitude e a baixa visibilidade dessa micose, destacando que constituía a oitava causa de mortalidade por doença predominantemente crônica ou repetitiva, entre as infecciosas e parasitárias, e a mais elevada taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas. Os autores também relataram que a taxa média de mortalidade anual era de 1,45 para um milhão de habitantes. No Estado de São Paulo, a paracoccidioidomicose passou a ser de notificação obrigatória a partir de junho de 2009.

A infecção é muito mais frequente que a doença, pois muitos indivíduos se infectam com o fungo, mantêm focos latentes por toda a vida e nunca adoecem. Inquérito realizado em Pratânia (SP), por meio de reações intradérmicas com paracoccidioidina e histoplasmina, no mesmo indivíduo, revelou que 51,2% da população eram, ao mesmo tempo, paracoccidioidino-positivos e histoplasmino-negativos, o que demonstra elevada prevalência de infecção paracoccidióidica, pois os outros fungos que poderiam propiciar reação cruzada com antígenos de *P. brasiliensis* não têm sido identificados na região. Esse mesmo estudo revelou que, entre crianças de 5 a 13 anos de idade, essa prevalência era igual a 32,5%, o que demonstra contato precoce com o fungo.²⁰

A PCM é observada em pacientes que tiveram ou se encontram em contato direto e prolongado com o solo, como os trabalhadores rurais.^{3,14,21,22} Predomina em indivíduos do sexo masculino, com razão de masculinidade de 7,2:1, e é mais prevalente na faixa etária entre 30 e 59.^{3,21,22,23} O estrogênio pode explicar a menor prevalência de PCM em pacientes do sexo feminino, pois retarda ou impede as transições micélio-levedura e conídio-levedura, necessárias para que o fungo atinja a fase patogênica, o que pode explicar o reduzido número de mulheres afetadas pela doença na idade adulta e a observação da mesma prevalência em ambos os sexos em pacientes com idade inferior a 13 anos.^{22,24}

Os doentes com PCM revelam comprometimento imune celular específico, isto é, resposta deficiente a antígenos de *P. brasiliensis*, mas não aos de outros agentes infecciosos.²⁵ Falhas na apresentação do antígeno, excesso de antígenos e de imunocomplexos circulantes e deficiência de receptores para interleucina-2 (IL-2) parecem estar ligados a uma resposta insatisfatória das células T. O comprometimento da resposta das células T se acompanha de diminuição da atividade fungicida dos macrófagos. Portanto, os pacientes apresentam comprometimento do perfil Th1 da resposta imune celular, com baixos níveis de TNF- α , IFN- γ e IL-2, associado à manutenção ou à elevação da produção de IL-5, IL-10 e TGF- β , que caracteriza a exacerbação do perfil Th2.²⁶

A produção de anticorpos específicos se encontra aumentada em pacientes com as formas aguda e crônica da PCM.²⁷ No entanto, além de facilitar a opsonização de células fúngicas, não se conhece outra ação dos anticorpos na defesa do hospedeiro. Além disso, deve-se registrar que a gravidade da doença guarda relação inversa com a resposta imune celular e direta com os níveis séricos de anticorpos específicos.^{28,29}

1.1. Aspectos laboratoriais da paracoccidioidomicose

Sendo a PCM uma doença sistêmica, além de cuidadosas anamnese e exame físico, uma série de exames complementares deve ser solicitada, antes do tratamento e durante o seguimento de cada paciente visando a avaliação da gravidade do paciente, assim a resposta ao tratamento. Esses exames compreendem hemograma completo, velocidade de hemossedimentação, provas bioquímicas hepáticas, renais e metabólicas e eletroforese de proteínas.³⁰

O hemograma no momento do diagnóstico da PCM revela em geral anemia normocítica e normocrômica. Leucocitose pode ser observada com maior frequência nos pacientes com a forma clínica crônica grave. A eosinofilia é a alteração mais frequente da PCM, principalmente em pacientes com a forma aguda/subaguda. A velocidade de hemossedimentação está aumentada na maior parte dos casos, normalizando-se durante o tratamento.³¹⁻³³

Os exames bioquímicos realizados antes da introdução do tratamento antifúngico refletem alterações induzidas pela PCM que devem se normalizar após terapêutica eficaz. Por outro lado, há exames que se revelam normais antes da introdução do tratamento e que se alteram após a utilização do antifúngico, refletindo sua toxicidade. Entre eles destacam-se os que avaliam fígado e rins.

Assim, esse estudo bioquímico contribui de forma relevante para uma avaliação mais completa do paciente e de sua resposta ao tratamento. Apesar de sua importância, poucos são as publicações que avaliaram a bioquímica do sangue de pacientes com PCM e são raros os estudos que abordam o seguimento após introdução do tratamento medicamentoso.

Os níveis séricos de mucoproteínas, α_1 -glicoproteína ácida e proteína C reativa também se encontram elevados e tendem à normalização durante o tratamento. A eletroforese de proteínas séricas apresenta diminuição dos níveis de albumina e elevação dos níveis da γ -globulina, estas alterações revertem-se com o tratamento.^{32,34} Um estudo com 30 pacientes com a forma crônica e 12 com a forma aguda, revelou o aumento dos níveis de α_2 -globulina e γ -globulina na forma crônica e níveis de proteínas totais, α_1 -globulina, α_2 -globulina e γ -globulina na forma aguda/subaguda.³⁵

Nogueira et al, monitoraram dados laboratoriais à admissão e durante o seguimento da terapia de 38 crianças com paracoccidiodomicose com idade até 14 anos, tratados por 24-30 meses com derivado sulfamídico ou cetoconazol. Os exames revelaram anemia, eosinofilia, bilirrubinas e aminotransferases elevadas até três meses de tratamento, hipoalbuminemia, até seis meses e leucócitos, velocidade de hemossedimentação normalizaram-se após nove a 12 meses de tratamento.³⁶

1.2. Tratamento da paracoccidiodomicose

O tratamento da PCM consiste em duas fases: inicial ou de ataque e de manutenção. O tratamento de ataque persiste até que se observem cura clínica e normalização da velocidade de hemossedimentação. O tratamento de manutenção deve ser mantido até um ano após as curas micológica, radiológica e sorológica. As drogas eficazes contra a PCM compreendem três grupos: anfotericina B, do grupo dos antibióticos poliênicos; sulfadiazina e associação sulfametoxazol-trimetoprim; e azólicos, entre os quais se destacam o cetoconazol, derivado imidazólico e o itraconazol, derivado triazólico de primeira geração.³⁰

A associação sulfametoxazol-trimetoprim também denominada cotrimoxazol (CMX), revelou-se muito eficaz no tratamento da PCM. Queixas de intolerância gástrica são relatadas em alguns casos, sendo necessária a substituição da medicação. A hepatotoxicidade é observada com frequência, com discreto aumento dos níveis séricos de aminotransferases, bilirrubinas, fosfatase alcalina e γ -glutamilttransferase. Além disso, também se observa alterações da função renal, com discreto aumento dos níveis séricos de ureia e creatinina. O CMX apresenta vantagem de ser distribuído gratuitamente pelos serviços ligados ao Ministério da Saúde e Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, para tratamento de doenças bacterianas e da PCM. Assim, os resultados satisfatórios observados no tratamento da PCM, associada à sua distribuição gratuita, fizeram com que o CMX se tornasse a droga de escolha no tratamento da maior parte dos pacientes com essa micose sistêmica.³⁷

O itraconazol (ITC), na maioria dos casos relatados na literatura, é uma excelente opção no tratamento da PCM, devido sua eficácia e tolerabilidade. Derivado triazólico de primeira geração com uma afinidade seletiva pelo citocromo P-450 da célula fúngica, esta característica permite que pequenas concentrações do itraconazol dificultem a biossíntese do ergosterol, sem interferir nas substâncias dependentes do citocromo P-450 humano, como o colesterol.^{38,39}

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

1. Avaliar a bioquímica sanguínea de pacientes com paracoccidioidomicose (PCM) antes e após a introdução do tratamento antifúngico.

2.2. Objetivos específicos:

1. Avaliar as alterações bioquímicas induzidas em pacientes com PCM;
2. Avaliar a emergência de alterações bioquímicas sanguíneas observadas após a introdução do tratamento antifúngico com cotrimoxazol (CMX) ou itraconazol (ITC), em especial sobre o sistema hepatobiliar, nas reações de fase aguda e nas alterações metabólicas.

3. Referências bibliográficas

1. Teixeira MM, Theodoro RC, Carvalho MJA, Fernandes L, Paes HC, et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylo Evol* 2009; 52: 273-83.
2. Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia: J Med Vet Mycol* 1985; 23: 323-34.
3. Marques SA, Franco MF, Mendes RP, Silva NCA, Baccili C, Curcelli ED, et al. Aspectos epidemiológicos da paracoccidioidomicose na área endêmica de Botucatu (São Paulo-Brasil). *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1983; 25 (2): 87-92.
4. Lutz A. Uma mycose pseudococcidica localisada na bocca e observada no Brazil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas. *Brazil-Med*. 1908; 13: 121-24.

5. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. Micologia Médica. In: Paracoccidoidomicose. 8^a ed. São Paulo, Brasil: Editora Sarvier, 1991; p. 248-61.
6. Ajello L. Paracoccidoidomycosis: a historical review. In: Paracoccidoidomycosis. PAHO Sci. Publ.; 1972. p.254.
7. Albornoz MB. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. Sabouraudia 1971; 9: 248-53.
8. Franco M, Bagagli E, Scapolio S, Lacaz CS. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. Med Mycol 2000; 38: 185 – 91.
9. Restrepo A. Morphological aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* in lymph nodes: implications for the prolonged latency of paracoccidoidomycosis? Med Mycol 2000; 38: 317-22.
10. Ricci G, Mota FT, Wakamatsu A, Serafim RC, Borra RC, Franco M. Canine paracoccidoidomycosis. Med Mycol 2004; 42: 379-83.
11. Grose E, Tamsitt JR. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. Sabouraudia 1965; 4(2): 124-5.
12. Costa EO, Diniz LSM, Fava Netto C, Arruda C, Dagli MLZ. Delayed hypersensitivity test with paracoccidioidin in captive Latin America wild mammals. J Med Vet Mycol 1995; 33: 39-42.
13. Naiff RD, Ferreira LCL, Barrett TV, Naiff MF, Arias JR. Paracoccidoidomicose enzoótica em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no estado do Pará. Rev Inst Med Trop São Paulo 1986; 28(1): 19-27.
14. Franco M. Host-parasite relationships in paracoccidoidomycosis. J Med Vet Mycol 1986; 25:5-18.

15. Camargo ZP, Franco MF. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev Iberoam Micol* 2000; 17:41-48.
16. Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Mota NGS. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop* 1987; 20(2): 129-32.
17. Mendes RP. The gamut of clinical manifestations. *In*: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton: CRC Press; 1994. p. 233-58.
18. Manual de Vigilância e Controle da Paracoccidioidomicose. Secretaria de Estado da Saúde - Coordenadoria de Controle de Doenças - Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. São Paulo, 2008.
19. Coutinho Z F, Silva D, Lazéra M, Petri V, Oliveira R M, Sabroza P C, et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saúde Pública* 2002; 18(5): 1441-54.
20. 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]. Pós Graduação em Doenças Tropicais: Faculdade de Medicina de Botucatu / UNESP; 2004.
21. Giraldo R, Restrepo A, Gutiérrez F, Robledo M, Londoño F, Hernández H, et al. Pathogenesis of paracoccidioidomycosis: a model based on the study of 46 patients. *Mycopathologia* 1976; 58(2): 63-70.
22. Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect Immun* 1984; 46(2): 346-53.

23. Moreto TC, Marques MEA, Oliveira MLSC, Moris DV, Carvalho LR, Mendes RP. Trans R Soc Trop Med Hyg 2011; 105: 473– 478
24. Borges-Walmsley MI, Chen D, Shu X, Walmsley AR. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. Microbiologia 2002; 10(2): 80-7.
25. 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(1): 7-12.
26. 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(4): 248-52.
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 counter immunoelectrophoresis and complement fixation. J Med Vet Mycol 1997; 35: 213-17.
28. Mota NGS, Rezkallah-Iwasso MT, Peraçoli MTS, Audi RC, Mendes RP, Marcondes J, et al. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. Trans R Soc Trop Med Hyg 1985; 79: 765-72.
29. Biagioni L, Souza MJ, Chamma LG, Mendes RP, Marques SA, Mota NGS, Franco M. Serology of paracoccidioidomycosis. II. Correlation between class-specific antibodies and clinical forms of the disease. Trans R Soc Trop Med Hyg 1984; 78: 617 – 21.
30. Shikanai-Yasuda, Telles Filho FQ, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. Consenso de paracoccidioidomicose. Rev Soc Bras Med Trop 2006; 39: 297-310.

31. Cunha AC, Almeida FP, Lacaz CS. O hemograma e o mielograma na granulomatose paracoccidióidica (Blastomicose Sul-Americana). *An Fac Med* 1948; 24-26.
32. Shikanai-Yasuda MA, Higaki Y, Uip DE, Mori NS, Del Negro G, et al. Comprometimento da medula óssea e eosinofilia na paracoccidioidomicose. *Rev Inst Med Trop* 1982; 34:85.
33. Martinez R, Fiorillo AM. Efeito do tratamento da blastomicose sul-americana (paracoccidioidomicose) sobre parametros do metabolismo do ferro. *Rev Inst Med Trop* 1978; 20:190.
34. Fiorillo AM, Takaoka L, Fernandes LAR. Estudo das proteínas séricas na blastomicose sul-americana. *Rev Soc Bras Med Trop* 1972; 6:117.
35. Marquez AD, Moreira APV, Leonello PC, Nakanishi FA, Itano EN. Serum proteins and fractions, HDL-cholesterol and total IgG and IgE levels in cases of acute and chronic paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009; 42(3): 245-49.
36. Nogueira MGS, Andrade GMQ, Tonelli E, Diniz SN, Goes AM, Cisalpino PS. Aspectos laboratoriais evolutivos de crianças em tratamento da paracoccidioidomicose. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39(5): 478-83.
37. Barbosa W, Vasconcellos WMP. Ação da sulfametoxazol associada ao trimetoprim na terapêutica da blastomicose sul-americana. *Rev Patol Trop* 1973; 3(2): 329-39.
38. Naranjo et al. Treatment of paracoccidioidomycosis with itraconazole. *J Med Vet Mycol* 1990; 28:67-76.
39. Mendes RP, Barraviera B, Souza LR, Pereira PCM, Marcondes-Machado J, Franco MF, et al. Evaluation of itraconazole in the treatment of paracoccidioidomycosis (PBM). *Rev Argent Micol* 1992;15-86.

II. Artigo 1

II) Artigo 1 - Evaluation of hepatobiliary system in patients with paracoccidioidomycosis treated with trimethoprim-sulfamethoxazole or itraconazole.

Adrielle D. Levorato^a, Daniela V. Moris^b, Ricardo de Souza Cavalcante^a, Tatiane F. Sylvestre^a, Priscila Z. de Azevedo^a, Lídia R Carvalho^c, Rinaldo P. Mendes^a.

^a Tropical Disease Area, Faculdade de Medicina de Botucatu- São Paulo State University-UNESP, Brazil.

^b Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Brazil.

^c Bioestatisc Department, Biosciences Institute, São Paulo State University-UNESP, Brazil.

Abstract

A prospective study was performed in 200 paracoccidioidomycosis (PCM) patients, 51 of whom with the acute/subacute form (AF) and 149 with the chronic form (CF), submitted to the evaluation of the hepatobiliary system at admission and during the follow-up treatment with the trimethoprim-sulfamethoxazole combination - SXT or itraconazole - ITC. This study aimed to better evaluate the involvement of the hepatobiliary system in PCM and the effect of these antifungal compounds on the hepatobiliary system. Clinical and blood chemistry evaluations were performed before treatment (moment 0 – M0) and periodically until the patients had reached clinical cure and normal erythrocyte sedimentation rate (moment 3 - M₃). Serum levels of conjugated bilirubin (CB), total bilirubin (TB), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) and gamma-glutamyltransferase (γ-GT) were evaluated. At admission,

the prevalence of lab tests with elevated values ranged from 6.2% for TB to 32.6% for γ -GT. After treatment, the incidence of elevated serum levels ranged from 8.5% for TB to 33.0% for ALT. This incidence was higher in the AF than in the CF for the variables CB, AST, ALP and γ -GT; however, the intensity of the elevations was higher in the CF. The predominant pattern of the alterations differed as to antifungal compound: hepatocellular in patients treated with SXT (64.7%) and mixed/mild with ITC (60.0%). The course of the alterations during the treatment showed regression to normal values in patients receiving SXT and persistence with ITC. Our findings contribute to a safe follow-up of PCM patients under treatment.

1. Introduction

Paracoccidioidomycosis (PCM), an endemic disease in Latin America, is a systemic mycosis caused by thermally dimorphic fungi of the *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* complexes (1,2,3). When not appropriately treated, PCM progressively worsens and may end in the death of the patient.

A Brazilian study on death certificates 1980 – 1995 revealed a mortality rate from PCM of 1.45/1,000,000 inhabitants and identifies this mycosis as the eighth leading cause of death by predominantly chronic or recurrent infectious and parasitic diseases (4). A study performed in São Paulo State (Brazil) between 1985 and 2005 reported a PCM mortality rate of 2.66/1.000.000 inhabitants, 1.58 of them from the disease and 1.08 from associated causes, and in the Botucatu region (São Paulo State), these numbers reach 8.73, 4.89 and 3.84, respectively, demonstrating the hyper-endemic status of this area and the importance of this mycosis (5).

Itraconazole (ITC) and the trimethoprim-sulfamethoxazole combination (SXT) are the main antifungal compounds used in PCM treatment, which should be maintained for a long time (6-17).

To better evaluate every PCM patient and to monitor the treatment, several laboratory tests are necessary: acute phase reactions, erythrocyte sedimentation rate, blood chemistry evaluating the hepatobiliary and kidney system, and metabolic alterations. However, few studies have evaluated the hepatobiliary function of PCM patients and are limited by small patient numbers and short follow-up periods. (7,8,9,10,11,13,15,17).

Thus, this study aimed to better evaluate the hepatobiliary system of PCM patients at admission before introduction of the treatment as well as to evaluate the effects of the antifungal compounds ITC and SXT on these functional parameters.

2. Patients and Methods

This study was performed at the Infectious Diseases Service of the University Hospital of the Faculdade de Medicina de Botucatu, São Paulo State University (UNESP).

2.1. Study design

A prospective study was conducted in 200 PCM patients submitted to the evaluation of hepatobiliary system at admission at our institution and during the treatment follow-up with the SXT or ITC. One hundred forty-nine patients presented the chronic form (CF), and 51 the acute/subacute form (AF). Thirty-one patients were treated with ITC (G₁), and 169 were treated with SXT (G₂). ITC was orally administered in capsule

formulation once a day at a dose of 200 mg, and SXT was administered with 400 mg of sulfamethoxazole and 80 mg of trimethoprim using 3 tablets twice each day throughout the study period.

Clinical and blood chemistry evaluations were performed before starting the treatment, defined as moment 0 (M_0), and periodically until the patients exhibited clinical cure and regression of the erythrocyte sedimentation rate (ESR) to normal values, called the final moment- M_3 (18 to 23 weeks). Clinical cure was defined as the disappearance of the symptomatology previously exhibited by the patient. Between these two moments, the patients were evaluated at intervals defined in relationship to the number of weeks of treatment: M_1 : 4 to 6; M_2 : 7 to 10.

The study protocol was reviewed and approved by the institutional ethics committee.

2.2. Study population

The criteria for enrollment in the study included an age of 12 years or more and PCM confirmed by both a suggestive clinical picture and the identification of typical *P. brasiliensis* yeast forms in clinical materials (confirmed cases) or a suggestive clinical picture associated with serum antibodies determined by the double agar gel immunodiffusion test (probable cases). The patients included in the study were admitted between 1988 and 2011. Patients were excluded if they had other systemic diseases of infectious, inflammatory or neoplastic etiology; if they were pregnant or lactating; if they had a previous history of hypersensitivity or severe side effects to azoles or SXT; or if they were taking medications that affect the pharmacokinetics of these antifungal compounds or that can interact with them.

2.3. Classification of clinical forms

The classification of the clinical forms was carried out according to Mendes (17) and was done by the infectious diseases medical doctor responsible for attending the patients (6).

2.4. Outcomes

The prevalence, incidence, intensity and course of the hepatobiliary alterations were evaluated for patients treated with each antifungal compound. Comparisons between the groups were also performed.

2.5. Methods

Clinical information from each patient was obtained from the corresponding card, which was filled based on the specific record and from the attending physicians during the follow-up.

All of the laboratory data were collected at the Central Laboratory of the University Hospital. Serum levels of conjugated bilirubin (CB), total bilirubin (TB), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) and γ -glutamyltransferase (γ -GT) were the parameters measured to evaluate the hepatobiliary system.

2.6. Prevalence and Incidence

Prevalence indicates the percentage of patients with altered variables at admission and incidence the percentage of patients who developed alterations during the period of study, i.e., variables initially normal but altered after introduction of the antifungal compound or variables initially altered which increased the alterations after treatment.

2.7. Criteria of drug-induced liver injury

The criteria of drug-induced disorders used in the present study were proposed in an international consensus with a small modification and has been briefly presented (18).

All of the liver tests were expressed as a ratio between the value measured and the upper limit of the normal range (N). In the evaluation of its intensity the highest value observed after introduction of the antifungal compound was used. When the increase in the liver test results was between N and 2N, the finding was considered an “abnormality”, as it was suggested by the consensus (17), or a mild injury.

Liver injury was classified as hepatocellular, cholestatic or mixed according to the biochemical profile. Hepatocellular injury was defined as an increase of ALT alone or $R \geq 5$, where R is the ratio between the serum activity of ALT and the serum activity of ALP, measured at the same time and expressed as multiple of N. Cholestatic injury was defined as the increase of ALP above 2N alone or $R \leq 2$. Mixed injury was diagnosed when both ALT (above 2N) and ALP were increased and when R was between 2 and 5 ($2 < R < 5$). Mild mixed injury was diagnosed when both ALT and FA were between 1.1 and 1.9 and when $R < 2N$. An AST/ALT ratio ≥ 2 was considered suggestive of alcohol-induced liver injury.

The erythrocyte sedimentation rate (ESR) was determined by the Westergreen method employing blood anticoagulated with EDTA. The results were measured as millimeters in the first hour, and the upper limits of the reference values for men and women, respectively, are as follows: a) below age 50 years: 15 and 20; b) between ages 50 and 85 years: 20 and 30; and c) above 85 years: 30 and 42 (19,20).

2.8. Statistical analysis

All of the variables were submitted to a statistical analysis. The treatment groups were compared by the Kruskal-Wallis test for ordinal measurements and the chi-square test or Fisher's exact test for categorical measurements. The Wilcoxon test was performed for the analysis of paired samples. The *t* test was performed for the analysis of unpaired samples. Comparison of moments between clinical forms and treatment were used the tests of Friedman and Mann-Whitney. Significance was set at $p \leq 0.05$. These analysis were perform using the program SAS version 9.2.

3. Results

3.1. Evaluation of homogeneity all the groups.

The patients treated with ITC did not differ from those who received SXT as to age, gender, clinical form and severity (Table 1).

Table 1. Distribution of 200 paracoccidioidomycosis patients evaluated for hepatobiliary system as to age, gender, clinical form and treatment.

		Treatment		p value
		ITC (n=31)	CMX (n=169)	
Age (years)		42,6 ±15,1	43,0±14,5	0,91
Male gender (%)		84,3	88,7	0,49
Clinical form (%)				
	Acute	34,3	24,0	0,10
	Chronic	65,7	76,0	
Acute form (%)				0,45
	Severe	28,2	21,6	
	Moderate	6,2	2,4	
Chronic form (%)				0,41
	Mild	6,2	3,6	
	Moderate	53,2	56,9	
	Severe	6,2	15,6	

ITC – itraconazole; CMX – cotrimoxazole; Comparison of frequencies: chi-square test;
Comparison of means: Unpaired *t* test.

The results were be presented using tables with the number of individuals evaluated for every variable because not all tests were done on all patients.

3.2. The evaluation of hepatobiliary system upon admittance to service (M0).

The prevalence of lab tests with elevated values ranged from 6.2% for TB serum levels to 32.6% for γ -GT serum levels (Table 2).

Table 2 – Prevalence of increased serum levels of tests evaluating the hepatobiliary system of patients with active paracoccidioidomycosis before treatment (moment M₀).

Variable	Patients (n)	Prevalence (%)
AST	181	12.7 ^{BC}
ALT	181	18.2 ^{BC}
TB	178	6.2 ^C
CB	175	12.0 ^{BC}
ALP	181	26.0 ^{AB}
γ -GT	181	32.6 ^A

Teste de Cochran ($p=0.00001$). TB-total bilirubins; CB-conjugated bilirubin; AST-aspartate aminotransferase; ALT-alanine aminotransferase; ALP-alkaline phosphatase; γ -GT- γ -glutamyltransferase. Capital letters compare frequencies in the same column; frequencies with the same letter do not differ ($p>0.05$); frequencies with different letters indicate statistically significant difference ($p\leq 0.05$); N- number of patients.

A comparison of the elevated variables among the two clinical forms of PCM revealed that the median AST and CB values did not differ between the acute/subacute form (AF) and the chronic form (CF). However, the median ALP and γ -GT values were higher in AF patients than in CF patients, while ALT and TB values tended to be higher in AF patients (Table 3).

Table 3 – Median, 1st and 3rd quartiles of the increased serum levels of tests which evaluate the hepatobiliary system of patients with active paracoccidioidomycosis before treatment (moment M₀), as to clinical forms.

Variable	Clinical Form				P value
	Acute/ subacute	Patients (n)	Chronic	Patients (n)	
AST	2.40 [1.15;3.25]	10	1.25 [1.19;1.77]	13	0.13
ALT	2.17 [1.47;4.58]	11	1.64 [1.17;1.83]	22	0.06
TB	6.02 [3.51;9.27]	4	1.28 [1.13;1.73]	7	0.07
CB	4.75[2.00;14.95]	10	2.00 [1.30;9.50]	11	0.22
ALP	1.97 [1.35;3.52]	23	1.31 [1.08;1.70]	24	0.001
γ -GT	3.02 [1.61;4.86]	22	1.75 [1.15;2.45]	37	0.02

[] – 1st and 3rd quartiles. TB – total bilirubins; CB – conjugated bilirubin; AST – aspartate aminotransferase; ALT – alanine aminotransferase; ALP – alkaline phosphatase; γ -GT - γ -glutamyltransferase; N- number of patients.

The prevalence of evaluated serum levels of CB, ALP and γ -GT was higher in AF patients than in CF patients (Table 4).

Table 4- Prevalence of elevated serum levels of variables evaluating the hepatobiliary system before treatment as to clinical form.

Variable	Acute/subacute form		Chronic form		Level of significance
	Patients (n)	Alterations (%)	Patients (n)	Alterations (%)	
CB	46	21.7	129	8.5	$p < 0.05$
TB	46	8.7	132	5.3	$p = 0.20$
AST	46	21.7	135	9.6	$0.05 < p < 0.10$
ALT	46	23.9	135	16.3	$p > 0.10$
ALP	46	50.0	135	17.8	$p < 0.001$
γ -GT	46	47.8	135	24.7	$p < 0.02$

CB – conjugated bilirrubina; TB- total bilirrubina; AST- aspartate aminotransferase; ALT- alanina aminotransferase; ALP- alkaline phosphatase; γ -GT- γ - glutamyltransferase; n-number of patients.

Furthermore, comparison variables, two by two, showed that the ALT elevations were higher than those of AST, γ -GT than the ALP, and finally, the ALP than the ALT (Table 5).

Table 5– Comparative study of the intensity of variables evaluating the hepatobiliary system of patients with active paracoccidioidomycosis before treatment (moment M_0). Data presented as median, 1st and 3rd quartiles. Paired-sample testing of continuous data (Wilcoxon test).

Comparison 1 st versus 2 nd	Patients (n)	1 st variable	2 nd variable	<i>P</i> value
AST vs ALT	41	1.05 [0.74; 1.56]	1.50 [1.06; 2.08]	0.02
ALP vs γ -GT	81	1.07 [0.66; 1.64]	1.38 [0.96; 3.01]	< 0.001
ALP vs ALT	67	1.18 [0.80; 1.96]	0.89 [0.41; 1.71]	0.05

AST- aspartate aminotransferase; ALT – alanine aminotransferase; ALP – alkaline phosphatase; γ -GT - γ -glutamyltransferase; N – number of patients.

Comparing the prevalence of the biochemical markers of the hepatobiliary function reveals that ALT tended to be higher than AST, that γ -GT tended to be higher than ALP and that ALP tended to be higher than ALT (Figure 1).

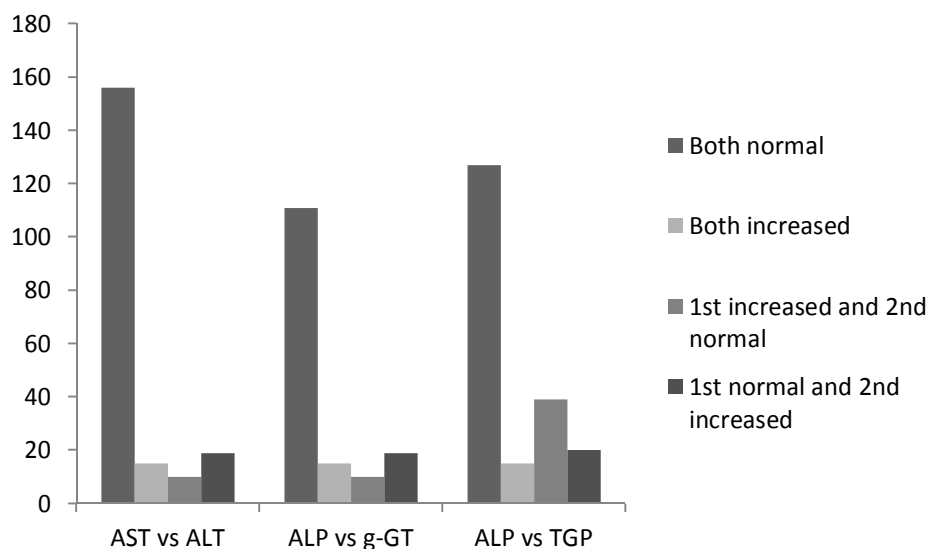


Figure 1 – Comparative study of the prevalence of variables evaluating the hepatobiliary system of patients with active paracoccidioidomycosis before treatment (moment M_0). Paired-sample testing of dichotomous data (McNemar test). AST – aspartate aminotransferase; ALT – alanine aminotransferase; AL –alkaline phosphatase; γ -GT-glutamyltransferase.

The DeRitis quotient, evaluated in 181 patients, was slightly higher than 1.0 in both AF patients and CF patients. No difference was observed according to clinical form (Table 4). However, when only the 42 patients with elevated aminotransferases were evaluated, values lower than 1.0 were observed, indicating a disproportionate increase in ALT compared with AST; this observation did not vary as to clinical form (Table 6).

Table 6 – DeRitis quotient, presented as median, 1st and 3rd quartiles, of patients with active paracoccidioidomycosis, evaluated before treatment (moment M₀), as to clinical form. A. Evaluation in 181 patients. B. Evaluation of the 42 patients showing increased aminotransferases serum levels.

Clinical Form	Median	1 st quartile	3 rd quartile	<i>p</i> value
A. Evaluation of all patients				0.59
Chronic (no.=135)	1.07	0.74	1.48	
Acute/subacute (no.=46)	1.14	0.67	1.63	
B. Evaluation of patients with increased aminotransferase				0.61
Chronic (no.=28)	0.63	0.44	1.39	
Acute/subacute (no.=14)	0.83	0.57	1.27	

3.3. Hepatobiliary system course in patients with acute/sub-acute and chronic forms of PCM.

Antifungal therapy resulted in AST normalization both in AF patients and in CF patients (Table 7).

Table 7 – Follow-up of aspartate aminotransferase serum levels of paracoccidioidomycosis-patients treated with itraconazole (ITC) or the trimethoprim-sulfamethoxazole combination (SXT) as to moment and clinical form. Evaluation of patients with increased serum levels at admission. Data presented as median, 1st and 3rd quartiles. Friedman test.

	Clinical Form		Treatment	
	Acute/subacute (n=11)	Chronic (n=14)	SXT (n=19)	ITC (n=6)
M0	1.35 [1.19;2.65] ^A	1.25 [1.2;1.76] ^A	1.35 [1.20;0.75] ^A	1.30 [1.15;2.75] ^A
M1	0.80 [0.55;1.36] ^B	0.55 [0.50;0.61] ^B	0.60 [0.54;1.19] ^{AB}	1.20 [0.90;1.40] ^{AB}
M2	0.90 [0.67;1.56] ^{AB}	0.83 [0.55;1.20] ^{AB}	0.90 [0.67;1.62] ^{AB}	1.05 [0.61;2.71] ^{AB}
M3	0.97 [0.43;1.16] ^B	0.78 [0.36;1.05] ^B	0.90 [0.46;1.19] ^B	1.05 [0.35;1.05] ^B
p value	<0.001	<0.001	0.01	0.04

[] – 1st and 3rd. Capital letters compare frequencies in the same column; frequencies with the same letter do not differ ($p>0.05$); frequencies with different letters indicate statistically significant difference ($p\leq 0.05$).

M₀ – before treatment, M₁ – 4 to 6; M₂ – 7 to 10; and M₃: clinical cure and regression of the erythrocyte sedimentation rate to normal values (18-23) weeks after beginning treatment; SXT – trimethoprim-sulfamethoxazole combination; ITC – itraconazole; N – number of patients.

Patients treated with SXT exhibited a reduction in the AST serum levels to normal values at M₃, whereas those treated with ITC exhibited a significant reduction at M₃ but continued to exhibit AST values above normal (Table 7).

Antifungal therapy led to ALT normalization at M₁ and M₂ but only in PCM patients with CF. At M₃, ALT serum levels tended to increase, exhibiting slightly elevated levels at M₀/M₂. AF patients continued to exhibit elevated ALT levels at M₃, which did not differ from the levels at other timepoints (Table 8).

Table 8 – Follow-up of alanine aminotransferase serum levels of paracoccidioidomycosis-patients treated with itraconazole (ITC) or the trimethoprim-sulfamethoxazole combination (SXT) as to moment and clinical form. Evaluation of patients with increased serum levels at admission. Data presented as median, 1st and 3rd quartiles. Friedman test.

	Clinical Form		Treatment	
	Acute/subacute (n=12)	Chronic (n=22)	SXT (n=28)	ITC (n=6)
M0	2.06 [1.50;4.28]	1.64 [1.17;1.83] ^A	1.69 [1.29;2.25] ^A	1.78 [1.56;2.17]
M1	2.14 [1.17;4.04]	0.72 [0.61;0.83] ^B	0.78 [0.61;1.33] ^{AB}	1.50 [1.11;2.13]
M2	1.11 [0.64;2.39]	0,78 [0.41;1.33] ^B	0.89 [0.41;1.39] ^B	1,11 [0.92;3.16]
M3	1.24 [0.67;2.68]	0.97[0.61;1.28] ^{AB}	1.06 [0.67;1.44] ^{AB}	1.28 [0.61;1.50]
P value	0.18	0.007	0.005	0.32

[] - 1st and 3rd quartiles Capital letters compare frequencies in the same column; frequencies with the same letter do not differ ($p>0.05$); frequencies with different letters indicate statistically significant difference ($p\leq 0.05$). M₀- before treatment, M₁: 4 to 6, M₂: 7 to 10 and M₃: clinical cure and regression of the erythrocyte sedimentation rate to normal values (18-23) after beginning treatment. SXT - trimethoprim-sulfamethoxazole combination. ITC - itraconazole; N-number of patients

Patients treated with SXT exhibited a reduction in the ALT serum levels to slightly above-normal values at M₃, whereas those treated with ITC exhibited no significant reduction at any moment (Table 8).

Antifungal therapy resulted in the progressive regression of TB serum levels and normalization at M₃ but only in patients with AF. Patients with CF continued to exhibit elevated TB levels at all timepoint, and the values did not differ among the timepoints (Table 9).

Table 9 – Follow-up of total bilirrubins serum levels of paracoccidioidomycosis-patients treated with itraconazole (ITC) or the trimethoprim-sulfamethoxazole combination (SXT) as to moment and clinical form. Evaluation of patients with increased serum levels at admission. Data presented as median, 1st and 3rd quartiles. Friedman test.

	Clinical Form		Treatment	
	Acute/subacute (n=5)	Chronic (n=7)	SXT (n=8)	ITC (n=4)
M0	5.80 [1.16;7.76] ^A	1.28 [1.12;1.73]	1.39 [1.05;3.05] ^A	3.51 [1.21;9.05]
M1	1.06 [0.61;3.00] ^{AB}	0.65 [0.50;1.30]	0.65 [0.40;2.80] ^{AB}	0.82 [0.58;1.18]
M2	0.70 [0.50;1.00] ^{AB}	1.00 [0.75;1.93]	1.00 [0.90;1.08] ^{AB}	0.50 [0.50;0.80]
M3	0.50 [0.28;1.52] ^B	1.00 [0.52;1.23]	0.55 [0.40;1.15] ^B	1.19 [0.60;1.67]
P value	0.019	0.19	0.04	0.15

[] - 1st and 3rd quartiles Capital letters compare frequencies in the same column; frequencies with the same letter do not differ ($p>0.05$); frequencies with different letters indicate statistically significant difference ($p\leq 0.05$). M₀- before treatment, M₁:4 to 6, M₂: 7 to 10 and M₃: clinical cure and regression of the erythrocyte sedimentation rate to normal values (18-23) weeks after beginning treatment. SXT: trimethoprim-sulfamethoxazole combination. ITC: itraconazole; N-number of patients.

Patients treated with SXT exhibited a progressive reduction and normalization of TB serum levels at M₃, whereas those treated with ITC exhibited no significant reduction at any moment (Table 9).

Antifungal therapy led to the progressive regression of CB serum levels and normalization at M₂ but only in patients with CF. Patients with AF continued to exhibit elevated levels at all timepoints, and the levels did not differ over time (Table 10).

Table 10 – Follow-up of conjugated bilirrubins serum levels of paracoccidioidomycosis- patients treated with itraconazole (ITC) or the trimethoprim-sulfametoxazole combination (SXT) as to moment and clinical form. Evaluation of patients with increased serum levels at admission. Data presented as median, 1st and 3rd quartiles. Friedman test.

	Clinical Form		Treatment	
	Acute/subacute (n=11)	Chronic (n=13)	SXT (n=17)	ITC (n=7)
M0	3.00 [2.00;14.04]	2.00 [1.28;5.50] ^A	2.33 [1.3;11.96] ^A	3.00 [1.48;9.23]
M1	1.67 [0.61;5.81]	1.50 [0.50;6.25] ^{AB}	0.80 [0.50;7.25] ^B	3,25 [2.00;4.00]
M2	1.67 [0.46;2.46]	0.80 [0.50;6.67] ^B	0.80 [0.35;2.45] ^B	1.00 [0.65;2.55]
M3	2.00 [0.46;7.45]	1.00 [0.00;1.88] ^B	0.60 [0.04;2.13] ^B	2.35 [1.48;4.75]
P value	0.14	0.004	<0.001	0.51

[] - 1st and 3rd quartiles Capital letters compare frequencies in the same column; frequencies with the same letter do not differ ($p>0.05$); frequencies with different letters indicate statistically significant difference ($p\leq 0.05$).). M₀- before treatment, M₁:4 to 6, M₂: 7 to 10 and M₃: clinical cure and regression of the erythrocyte sedimentation rate to normal values (18-23) weeks after beginning treatment. SXT: trimethoprim-sulfamethoxazole combination. ITC: itraconazole; N-number of patients.

Patients treated with SXT exhibited a normalization of CB serum levels at M₂, whereas those treated with ITC did not exhibit a significant reduction at any moment (Table 10).

Antifungal therapy led to progressive regression of ALP serum levels, with slightly elevated values at M₃ but only in patients with AF. Patients with CF exhibited progressive reduction and normalization of serum levels at M₃ (Table 11).

Table 11 – Follow-up of alkaline phosphatase serum levels of paracoccidioidomycosis-patients treated with itraconazole (ITC) or the trimethoprim-sulfamethoxazole combination (SXT) as to moment and clinical form. Evaluation of patients with increased serum levels at admission. Data presented as median, 1st and 3rd quartiles. Friedman test.

	Clinical Form		Treatment	
	Acute/subacute (n=29)	Chronic (n=26)	SXT (n=44)	ITC (n=8)
M0	2.18 [1.33;3.68] ^A	1.22 [1.08;1.68] ^A	1.53 [1.16;2.26] ^A	1.30 [1.10;2.24]
M1	1.75 [1.24;3.13] ^{AB}	1.09 [0.95;1.33] ^B	1.25 [0.98;1.84] ^{AB}	1.30 [1.10;2.24]
M2	1.27 [0.81;1.47] ^B	1.10 [0.91;1.26] ^B	1.13 [0.81;1.37] ^{BC}	1.30 [1.10;2.24]
M3	1.09 [0.74;2.05] ^B	0.87 [0.72;1.21] ^B	1.05 [0.71;1.61] ^C	1.30 [1.10;2.24]
P value	<0.001	0.001	<0.001	0.65

[] - 1st and 3rd quartiles Capital letters compare frequencies in the same column; frequencies with the same letter do not differ ($p>0.05$); frequencies with different letters indicate statistically significant difference ($p\leq 0.05$).). M₀- before treatment, M₁: 4 to 6, M₂: 7 to 10 and M₃: clinical cure and regression of the erythrocyte sedimentation rate to normal values (18-23) weeks after beginning treatment. SXT: trimethoprim-sulfamethoxazole combination. ITC: itraconazole; N-number of patients.

Patients treated with SXT exhibited a progressive reduction of ALP serum levels with slightly elevated values at M₃, whereas those treated with ITC exhibited no significant reduction at any moment (Table 11).

Antifungal therapy led to progressive regression and normalization of γ -GT serum levels at M₃ but only in patients with AF. Patients with CF exhibited serum levels normalization as early as at M₂ (Table 12).

Table 12 – Follow-up of γ -glutamyltransferase serum levels of paracoccidioidomycosis- patients treated with itraconazole (ITC) or the trimethoprim-sulfamethoxazole combination (SXT) as to moment and clinical form. Evaluation of patients with increased serum levels at admission. Data presented as median, 1st and 3rd quartiles. Friedman test.

	Clinical Form		Treatment	
	Acute/subacute (n=26)	Chronic (n=40)	SXT (n=55)	ITC (n=11)
M0	3.02 [1.56;4.86] ^{AB}	1.57 [1.12;2.11] ^A	1.79 [1.19;3.44] ^A	2.21 [1.21;6.31]
M1	1.88 [0.82;4.26] ^B	1.07 [0.72;1.73] ^B	1.20 [0.72;2.15] ^B	2.04 [0.93;5.01]
M2	1.00 [0.46;2.23] ^{BC}	0.93 [0.60;1.47] ^B	0.96 [0.58;1.46] ^B	1.57 [0.70;1.81]
M3	0.80 [0.53;2.11] ^C	0.99 [0.65;1.63] ^B	0.86 [0.54;1.37] ^B	1.14 [0.70;3.85]
P value	<0.001	<0.001	<0.001	0.30

[] - 1st and 3rd quartiles Capital letters compare frequencies in the same column; frequencies with the same letter do not differ ($p>0.05$); frequencies with different letters indicate statistically significant difference ($p\leq 0.05$).). M₀- before treatment, M₁: 4 to 6, M₂: 7 to 10 and M₃: clinical cure and regression of the erythrocyte sedimentation rate to normal values (18-23) weeks after beginning treatment. SXT: trimethoprim-sulfamethoxazole combination; ITC: itraconazole; N- number of patients.

Patients treated with SXT exhibited a progressive reduction in γ -GT serum levels and normalization as early as at M₂, whereas those treated with ITC exhibited no significant reduction at any moment (Table 12).

The starting of antifungal therapy allowed us to evaluate the incidence of increases in the variables under study, which ranged from 8.5% for TB to 33.0% for AST (Table 13).

Table 13 – Incidence of increased serum levels of laboratory tests evaluating the hepatobiliary system of paracoccidioidomycosis patients after the introduction of antifungal compounds.

Variable	Patients (n)	Incidence (%)
AST	200	24,0
ALT	200	33,0
TB	197	8,5
CB	194	17,9
ALP	200	29,0
γ-GT	200	28,5

AST – aspartate aminotransferase; ALT – alanine aminotransferase; TB – total bilirubin;
 CB – conjugated bilirubina; ALP – alkaline phosphatase; γ-GT – γ-glutamyltransferase; N-number of patients.

The incidence of increased serum levels AST, CB, ALP and γ-GT as to clinical form after the institution of antifungal treatment revealed that patients with the AF showed higher values of AST, CB, ALP and γ-GT than those with the CF. Nevertheless, the incidences of elevations did not vary as to treatment (Table 14).

Table 14- Incidence in percentage of increased serum levels in tests evaluating the hepatobiliary system in patients with the acute/subacute or the chronic form of paracoccidioidomycosis after the introduction of the treatment. Data presented as percentage. Chi-square test and Fisher exact test.

Variables	Clinical form		Treatment	
	Acute/subacute form	Chronic form	SXT	ITC
	(n=51) (%)	(n=149) (%)	(n=169) (%)	(n=31) (%)
AST	21.6 ^a	9.4 ^b	11.3	19.4
ALT	23.5	14.8	17.0	20.0
TB	9.8	4.7	4.8	13.0
CB	21.6 ^a	8.7 ^b	10.0	23.0
ALP	56.9 ^a	17.3 ^b	26.0	26.0
γ-GT	51.0 ^a	26.8 ^b	33.0	36.0

AST- asparte aminotransferase; ALT- alanine aminotransferase; TB- total bilirrubina; CB- conjugated bilirrubina; ALP- alkaline phosphatase; γ-GT- γ-glutamyltransferase; n-number of patients. Lower-case letters compare medians in the same line; medians followed by different letters are statistically different ($p<0.005$); medians with no letters do not differ.

The intensity of the elevated serum levels was higher in the AF for ALP and tended to be higher in the AF for ALT (Table 15). Nevertheless there was no influence of the treatment (Table 15).

Table 15. Intensity of increased blood chemistry tests evaluating the hepatobiliary system of paracoccidioidomycosis patients with antifungal treatment. Evaluations as to clinical form and antifungal compound. Data presented as median, 1st and 3rd quartiles. Mann-Whitney test.

Variable	Clinical Form				SXT	Treatment		
	Acute/subacute	Patients (n)	Chronic	Patients (n)		Patients (n)	ITC	Patients (n)
AST	1,32 [1,15;1,62]	20	1,41 [1,22;1,96]	28	1.32 [1.15;1.65]	42	1.37 [1.25;2.60]	6
ALT	1,53 [1,22;2,39] ^b	20	2,08 [1,31;3,19] ^a	46	1.61 [1.23;2.85]	59	2.11 [1.50;3.06]	7
TB	1,34 [1,26;1,93]	8	1,30 [1,00;2,41]	10	1.30 [1.15;1.54]	8	1.60 [1.30;4.10]	9
CB	2,35 [1,67;3,63]	11	2,70 [2,11;7,75]	25	2.58 [1.69;5.25]	24	2.35 [1.69;4.00]	12
ALP	1,20 [1,12;1,66] ^b	22	1,82 [1,24;2,61] ^a	36	1.42 [1.17;1.97]	43	1.14 [1.07;1.74]	8
γ-GT	1,41 [1,11;2,64]	13	1,57 [1,08;5,10]	25	1.41 [1.11;2.82]	46	2.22 [1.06;5.89]	11

[]- 1st and 3rd quartiles. AST- aspartate aminotransferase; ALT- alanine aminotransferase; TB- total bilirubin; CB-conjugated bilirubin; ALP- alkaline phosphatase; γ-GT- γ-glutamyltransferase; SXT- trimethoprim-sulfamethoxazole; ITC- itraconazole; n-number of patients. Lower-case letters compare medians in the same line; medians followed by different letters are statistically different ($p<0.005$); medians with no letters do not differ.

Comparing the prevalence of the elevated markers of hepatobiliary system upon patient admission and after the introduction of antifungal therapy, we observed a rise in AST and ALT, a slight increase in TB, CB and ALP, and a reduction in γ -GT (Figure 2).

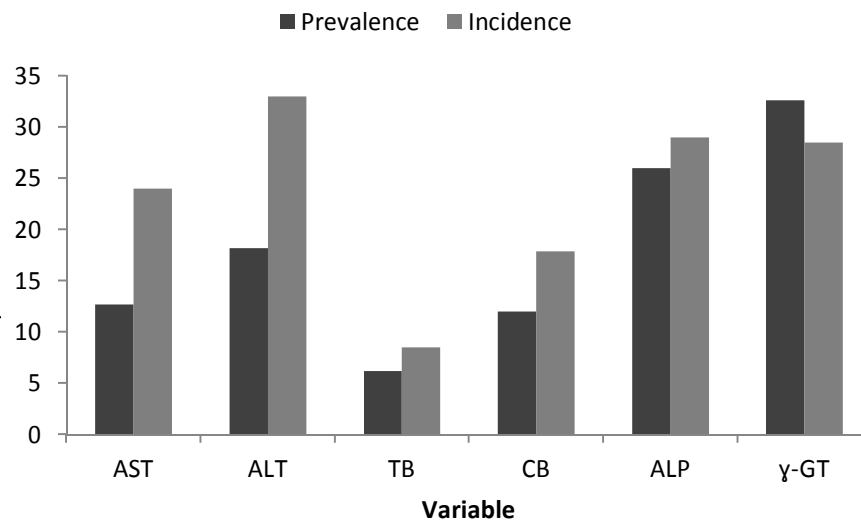


Figure 2 – Prevalence and incidence of increased serum levels of blood chemistry tests evaluating the hepatobiliary system of paracoccidioidomycosis-patients before and after treatment with itraconazole or the trimethoprim-sulfamethoxazole combination. Prevalence- percentage of patients is altered variables at admission. Incidence- percentage of patients who developed alterations during the period of study. AST – aspartate aminotransferase; ALT – alanine aminotransferase; TB – total bilirubin; CB –conjugated bilirubin; ALP – alkaline phosphatase; - γ -GT - glutamyltransferase.

4. Discussion

Several autopsy studies have demonstrated the paracoccidioidal involvement of the hepatobiliary system (21,22,23,24,25,26). Taken together, 44.6% of the 314 autopsied PCM patients exhibited hepatic and/or bile duct injury.

The evaluation of the hepatobiliary system of PCM patients before and during treatment with SXT or ITC was routinely performed and was the aim of this study.

Few studies have addressed the changes in the hepatobiliary system of PCM patients before treatment. Some authors have presented a case report (27), others have focused on biopsy or autopsy findings (26,28), and still others have not assessed either the prevalence or intensity of such changes (29,30). Therefore, the findings of this study will be compared to those of Fiorillo et al. (1982) (31), who evaluated the serum levels of TB, CB, AST and ALP in 121 patients, whose distribution as to clinical forms was not presented, and to those of Ferreira (1993) (32), who evaluated bilirubin, aminotransferases, ALP and γ -GT in 24 patients with the AF of PCM.

Our study identified increases in all of the parameters evaluating the hepatobiliary system to different degrees (from 6.2% in TB to 32.6% in γ -GT) and intensities (from 1.15 for AST to 14.95 for CB).

In the present study, the overall prevalence of elevated AST levels was 12.7%, very close to the 16.5% observed by Fiorillo et al. (1982) (31). Approximately 21.7% of AF patients exhibited elevated AST serum levels, and 23.9% exhibited elevated ALT levels; in total, aminotransferases were elevated in 30.4% of the patients. Ferreira (1993) (32) observed elevated aminotransferases in 25.0% of their patients, similar to our study, although they did not specify the AST and ALT values.

Increased aminotransferases may be explained by hepatocellular injuries caused by the fungus (20, 21,23,26,27).

The overall prevalence of elevated TB serum levels was 6.2%, very close than the 8.5% observed by Fiorillo et al. (1982) (31), and the prevalence of elevated CB was 12.0%, which does not significantly differ from the 8.5% reported by Fiorillo et al. (1982) (31). Elevated CB was observed in 21.7% of AF patients, elevated TB was observed in 8.7%, and bilirubin was elevated in 21.7%. Ferreira (1993) (32) observed an increase in the bilirubin levels in 25.0% of patients without differentiating between TB and CB, a prevalence that does not significantly differ from that observed in the present study. The overall prevalence of elevated ALP observed in this study was 26.0%, which is much lower than the 46.3% observed by Fiorillo et al. (1982) (31). Ferreira (1993) (32) reported that 61.9% of AF patients exhibited elevated levels of ALP, which is higher than the 50.0% demonstrated by this study. Elevated CB and ALP are the result of intra-hepatic cholestasis caused by paracoccidioid infections to the liver parenchyma, including granulomas, or by the extrinsic compression of extra-hepatic bile ducts (21,22,23,24,25,26).

The prevalence of elevated γ -GT serum levels was 47.8% in AF patients, which is very close than the 41.1% observed by Ferreira (1993) (32). Such elevations in serum levels may be explained by injuries to the canaliculi of liver cells and to the epithelial cells of the bile ducts caused by PCM (20, 21,23,26,27).

The prevalence of elevated ALP, CB and γ -GT serum levels in AF patients was higher than in CF patients, suggesting the predominance of cholestatic injury as well as damage to the cell membrane in patients with the juvenile form, characterized by impairment of organs rich in mononuclear phagocytic system, including the liver (17).

No studies are known to have addressed the follow-up of hepatobiliary system in PCM patients after the introduction of antifungal therapy. A literature review identified only five studies that evaluated the use of SXT and five studies on ITC. Some authors reported that aminotransferases serum levels were not altered by the use of SXT (12,13); Mendes et al. (1996) (15) reported the elevation of blood markers of hepatobiliary system in 74% of cases but did not specify the changes found; other authors (14,16) made no reference to changes in hepatobiliary system.

ITC evaluation for PCM treatment was conducted by authors focusing on efficacy but is limited to data appraising hepatobiliary system. Restrepo et al. (1987) (7) and Naranjo et al. (1987) (9) reported that there were no changes in bilirubin, aminotransferases or ALP after the introduction of ITC treatment for PCM. Negroni et al. (1987) (8) evaluated the serum levels of bilirubin, AST, ALT, and ALP and reported an increase in the enzymes but made no reference to their intensity or incidence. Shikanai-Yasuda et al. (2002) (10) reported that ITC did not alter bilirubin serum levels but did alter ALP ones, although they failed to report the incidence or intensity. Queiroz-Telles et al. (2007) (11) reported that patients treated with ITC exhibited no change in the serum levels of ALP, AST, ALT or γ -GT.

The absence of changes in bilirubin, AST, ALT and ALP (7,8,9), the absence of changes in ALP, AST, ALT and γ -GT (11), increases in ALP (10), and the absence of changes in ALP, AST, ALT and γ -GT (10) have been previously reported.

In the current study, all parameters used to evaluate hepatobiliary system after the introduction of antifungal treatment were elevated, with different incidences and intensities. The incidence varied from 8.5% for TB serum levels to 33.0% for ALT serum levels.

The treatment did not influence the incidence of elevated AST, ALT, TB, ALP and γ -GT. The only difference observed was regarding CB, which exhibited a higher incidence of elevated levels in ITC-treated patients. More to the point, the incidence of elevated serum levels of AST and ALP was higher in AF patients than in CF patients.

Tucker et al. (1990) (33) evaluated the use of ITC in 189 patients suffering from different systemic mycoses and found an overall incidence of elevated levels equal to 1.0% for bilirubin, 5.0% for aminotransferases, and 2.0% for ALP after the use of daily doses of 400 mg ITC in 167 patients and 50 to 200 mg ITC for the remaining patients; for 88.4% of such patients, the mean treatment time was five months. The incidence of changes in this study was much smaller than the one revealed in the current study.

The predominant alteration in the pattern of hepatobiliary system differed depending on the treatment used – hepatocellular for SXT (64.7%) and mixed/mild for ITC (60.0%).

The changing behavior of the study parameters varied depending on the clinical condition of the patients. In CF, all of the parameters that evaluated hepatobiliary system normalized by the end of initial treatment, except for CB, whereas in AF, the DB, ALT and ALP levels remained high at the end of treatment. Such findings suggest that hepatic injury is larger and/or more persistent in AF than in CF and should be taken into account during patient follow-up.

In the current study, the course of the parameters used to evaluate hepatobiliary system during initial treatment also varied according to the antifungal agent used. Patients treated with SXT exhibited regression in the serum levels of AST, TB, CB and γ -GT to the normal values; the levels of ALT and ALP regressed from their peak but continued to be higher than normal. In contrast, patients who received ITC did not exhibit changes in the

serum levels of ALT, TB, CB, ALP or γ -GT but did exhibit a wild decrease in AST. These findings suggest the relatively higher safety of SXT. Additionally, knowing the behavior of each antifungal compound is essential to patient follow-up.

SXT is widely used to treat bacterial infections (34), *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (35) and PCM (12,13,14,15,16) and is usually well-tolerated after oral and intravenous administration, although hepatic injury has been reported (36,37,38). Evaluation of the SXT-induced hepatotoxicity in PCM patients is relevant due to the wide use of this compound and the long treatment length(6).

Hepatocellular injury has been the most frequent type of hepatic lesion caused by SXT (37,39,40), although the development of a cholestatic pattern has frequently been reported (38,41,42,43). Our results, evaluated by blood chemistry variables, indicated a strong predominance of the hepatocellular injury, some cases with mixed injury and few cases of cholestatic reaction, which is consistent with the literature. Cholestatic injury could be related to older patients, as a study reported that 9 out of 10 patients were older than 48 years (38).

The histopathologic findings in patients with hepatocellular lesions are characterized by multiple disseminated focal areas of necrosis or massive necrosis in fatal cases (44).

The histopathologic findings in patients with cholestatic liver injury include centrilobular cholestasis (perivenular, zone III), mild-to-moderate portal inflammation and feathery degeneration (38). The ultrastructural demonstration of characteristic lysosomal changes in the liver further suggests drug-related hepatic injury (38). Hepatic phospholipidosis, defined as the accumulation of characteristic lamellated, membranous

deposits in newly formed lysosomes, can also be observed in patients receiving SXT therapy (38).

The biochemical mechanisms of SXT liver injury are not completely known. Sulfamethoxazole (SMZ) is conjugated by hepatic N-acetyltransferases, forming predominantly the water-soluble N⁴-acetylsulfamethoxazole and, to a lesser degree, the highly lipid-soluble N¹-acetylSMZ (45). Thus, patients with increased N¹-acetylSMZ formation could exhibit cholestasis and phospholipidosis by injury to cell membranes and accumulation in lysosomes (38). Genetic polymorphism in the acetylation of sulfanilamide drugs is well known and could lead to increased formation of the highly lipid-soluble N¹-acetylSMZ (38,46,47). Phospholipidosis could also be caused by inhibition of lysosomal enzyme phospholipase A₁, as was demonstrated with other drugs (48,49). Although sulfamethoxazole has been considered responsible for liver injury induced by SXT, the recurrence of jaundice after challenge with trimethoprim alone has been reported (50).

Both types of hepatic toxicity, cholestatic and hepatocellular, could be ascribed to acquired hypersensitivity, as is suggested by the past history of previous contact with sulfonamide compounds. A patient with a previous history of long contact with sulfa compounds that he mixed daily into hog feed presented with cholestatic hepatitis after ingestion of SXT for seven days (41). Another patient, a 70-year-old man, developed two episodes of skin rash after SXT intake and recurrence of these signs, in addition to jaundice, one day after he took two pills of this medication (40). Upon hospitalization, the patient was deeply icteric, with very high aminotransferases serum levels, and his condition progressed to hepatic failure and death. The autopsy revealed a cut surface with a diffuse mottled pattern of patchy necrosis. Microscopic examination revealed, in some areas, massive hepatic necrosis with the disappearance of lobules, collapsed reticulum framework, inflammatory cells, and proliferating bile ducts. Lymphocytes, monocytes and

a notable number of eosinophils constituted the inflammatory infiltrate (40). The metabolic pathway through CyP450 leads to the formation of reactive metabolites, which, after covalent binding, is transformed into a substance which functions as a haptene (46). A latent period between the start of drug intake and the onset of clinical manifestations ranges from 5 to 14 days (44), but in subsequent administrations it may be less than one day (40). A poorer prognosis of the acute hepatocellular disease in the elderly could be explained by the sluggish regenerative potential of the liver in these patients (40).

SXT-induced hepatotoxicity in PCM patients is not rare, frequently is not intense, is predominated by the hepatocellular type, and is reversible while this antifungal compound is maintained. However, its mechanism remains unclear and must be investigated.

The mechanism of ITC-induced liver damage is not well known, but ketoconazole-induced hepatotoxicity may be due to metabolic idiosyncrasy (51).

Considering that phenobarbital, an inducer of cytochrome P450 (CyP450), prevents ITC hepatotoxicity and that SKF525A, an inhibitor of CyP450, increases ITC hepatotoxicity, we can conclude that this enzymatic system plays a role in the detoxification of ITC and/or its reactive metabolites (52,53). However, it remains unclear which molecule is responsible for the hepatotoxicity observed clinically and laboratorially in patients treated with ITC.

The decrease of ATP was observed with low concentrations of ITC and was shown to be dose-dependent. It is possible that lower doses of ITC could cause inhibition of mitochondrial respiration, whereas the higher ones could be responsible for the disruption of the whole hepatocyte (53).

The prolonged use of ITC in rats results in histopathological alterations in the liver, typically necrosis, bile duct hyperplasia, and biliary cirrhosis, accompanied by liver enlargement and increased AST and ALT activities (54).

Thus, it is possible that ITC can cause an auto-inhibition of its metabolism, thereby inducing hepatotoxicity (53). Inhibition of CyP450 could lead to the use of an alternative route for metabolism of ITC, such as the flavin-containing monooxygenase (FMO), as has been suggested for ketoconazole (51). The cytochrome P450-mediated monooxygenases are known to metabolize many compounds and are genetically regulated (55).

ITC-induced hepatotoxicity in PCM patients is not as rare, frequently is not intense, is predominated by the mixed mild type, and is not reversible while this antifungal compound is maintained. However, its mechanism remains unclear, although some evidence exists that CyP450 plays a key role. The CyP450 isoenzyme involved in the hepatotoxicity observed in human patients treated with ITC must be investigated.

Our study showed that hepatotoxicity caused by SXT and ITC is not rare and not intense, and present different patterns; however SXT- induced alterations are reversible during the treatment while those caused by ITC are not. These findings should be considered in the choice of the antifungal compound to treat PCM patients.

5. References

1. Franco M, Peraçoli MT, Soares A, Montenegro R, Mendes RP, Meira DA. 1987. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. J. Med. Vet. Mycol. 25: 05-18.
2. Matute DR, McEwen JG, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, Rauscher JT. 2006. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. Mol. Biol. Evol. 23 (1): 65-73.

3. Theodoro RC, Teixeira MM, Felipe MSS, Paduan KS. 2012. Genus *Paracoccidioides*: species recognition and biographic aspects. *PLoS One*. 7(5): 1-15.
4. Coutinho ZF, Silva D, Lazéra M, Petri V, Oliveira RM, Sabroza PC, Wanke B. 2002. *Paracoccidioidomycosis* mortality in Brazil (1980-1995). *Cad. Saúde Pública*. 18 (5):1441-1454.
5. Santo AH. 2008. Tendência de Mortalidade relacionada à paracoccidioidomicose, Estado de São Paulo, Brasil, 1985 a 2005: estudo usando causas múltiplas de mortalidade. *Rev. Panam. Salud Publica*. 23(5): 313-324.
6. Shikanai-Yasuda MA, Telles FQ, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. 2006. Consenso de Paracoccidioidomicose. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 39: 297-310.
7. Restrepo A, Gomez I, Robledo J, Patiño MM, Cano LE. 1987. Itraconazole in the treatment of paracoccidioidomycosis: a preliminar report. *Rev. Infec. Dis*. 9:51-56.
8. Negroni R, Palmieri O, Koren F, Tiraboschi N, Galimberti RL. 1987. Oral treatment of paracoccidioidomycosis and histoplasmosis with itraconazole in humans. *Rev. Infect. Dis*. 9 (supp I): 47-50.
9. Naranjo MS, Trujillo M, Munera MI, Restrepo P, Gomez I, Restrepo A. 1990. Treatment of paracoccidioidomycosis with itraconazole. *J. Med. Vet. Mycol*. 28: 67-76.
10. Shikanai-Yasuda MA, Bernard G, Higaki Y, Del Negro GMB, Hoo S, Vaccari EH, Gryschek RCB, Segurado AAC, Barone AA, Andrade DR. 2002. Randomized trial with itraconazole, ketoconazole and sulfadiazine in paracoccidioidomycosis. *Med. Mycol*. 40: 411-417.

11. Queiroz-Telles F, Goldani LZ, Schlamm HT, Goodrich JM, Espinel-Ingroff, Shikanai-Yasuda MA. 2007. An open-label comparative pilot study of oral voriconazole and itraconazole for long-term treatment of paracoccidioidomycosis. *Clin. Infect. Dis.* 45: 1462-1469.
12. Barbosa W, Vasconcellos WMP. 1973. Ação da sulfametoxazol associada ao trimetoprim na terapêutica da blastomicose sul-americana. *Rev. Patol. Trop.* 3 (2): 329-339.
13. Furtado T, Marcos AR, Maia FAA. 1975. Terapêutica da blastomicose sul-americana pela associação trimetoprim-sulfametoxazol. *Folha Med.* 71 (3): 275-279.
14. Pedrosa PN, Wanke B, Coura JR. 1974. Emprego da associação sulfametoxazol-trimetoprim no tratamento da paracoccidioidomicose (Blastomicose sul-americana). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 8(3): 160-165
15. Mendes RP, Meira DA, Marcondes-Machado J, Pereira PCM, Barraviera B, Souza LR, Nagem VD, Reis BAR, Mattos MCI, Morceli J. 1996. Sulfamethoxazole-trimethoprim combination (SMZ-TPM) in the treatment of paracoccidioidomycosis (PBM), abstr P-240, p-112. XXXII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Goiânia, GO.
16. Queiroz-Telles F, Ribeiro CE, Cuevas IB, Carvalho M. 1996. Terapêutica da paracoccidioidomicose (PCM) com a associação trimetoprim-sulfametoxazol (TMSZ), abstr P-241, p-112. XXXII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Goiânia, GO.
17. Mendes RP. 1994. The gamut of clinical manifestations. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo Moreno A, Del Negro G. *Paracoccidioidomycosis*. CRC, Boca Raton. 233-258.

18. Bénichou C. 1990. Criteria of drug induced liver disorders. Report of an International Consensus Meeting. *J. Hepatol.* 11: 272-276.
19. Bottiger LE, Svedberg CA, 1967. Normal erythrocyte sedimentation rate and age. *Br. Med. J.* 8: 85-87.
20. Zauber NP, Zauber AG. 1987. Hematologic data for healthy very old people. *Am. M. Assoc.* 257(16): 2181-2184.
21. Raphael A, Campana AO, Waiman J. 1964. Coma hepático na blastomicose sul americana. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 10: 151-154.
22. Montenegro MR, Franco MF. 1994. Pathology: In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. *Paracoccidioidomycosis*. CRC, Boca Raton. 131-150.
23. Brass K. Observaciones sobre la anatomia patológica, patogénesis y evolución de La paracoccidioidomycosis. 1969. *Mycopathol. Mycol. Applic.* 37:119-138.
24. Boccalandro I, Mello e Albuquerque FJ. 1960. Icterícia e comprometimento hepático na blastomicose sul-americana. A propósito de 10 casos. Revisão bibliográfica. *Rev. Paul. Med.* 56: 350-366.
25. Salfelder K, Doehnert G, Doehnert HR. 1969. Paracoccidioidomycosis: anatomic studies with complete autopsies. *Virchows Arch. Abt. A Path. Anat.* 348: 51-76.
26. Teixeira R, Gayotto LC, Brito T. 1978. Morphological patterns of the liver in South American blastomycosis. *Histopathology.* 02: 231-237
27. Goffi FS, Ferriarini E. 1960. Icterícia obstrutiva por granuloma blastomicótico de colédoco. *Rev. Paul. Med.* 57:12-21.

28. Brito T, Castro RM, Shiroma M. 1968. Biópsia hepática na blastomicose sul americana. Rev. Inst. Med. Trop. 10: 188-191.
29. Daher RR, Vasconcellos WMP. 1973. Fígado e blastomicose sul-americana. J. Bras. Med. 83-90.
30. Pinto WP. 1980. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de São Paulo. São Paulo, Brasil.
31. Fiorillo MA, Martinez R, Moraes CR. 1982. Lesões do aparelho digestivo. In: Del Negro G, Lacaz CS, Fiorillo AD. Paracoccidioidomicose blastomicose sul americana. Sarvier. 180-193.
32. Ferreira MS. 1993. Contribuição para o estudo clínico-laboratorial e terapêutico da formação juvenil da Paracoccidioidomicose. Rev. Pat. Trop. 22(2): 267-406.
33. Tucker RM, Haq Y, Denning DW, Stevens DA. 1990. Adverse events associated with itraconazole in 189 patients on chronic therapy. J Antimicrob Chemother. 26: 561-566.
34. Brumfitt W, Pursell R. 1973. Trimethoprim-sulfamethoxazole in the treatment of bacteriuria in women. J. Infect. Dis. 28: 657-663.
35. Winston DJ, Lau WJ, Gale RP, Young LS. 1980. Trimethoprim-sulfamethoxazole for the treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia. Ann. Inter. Med. 92:762-769.
36. Dossing M, Andreassen PB. 1982. Drug-induced liver disease in Denmark: an analysis of 572 cases of hepatotoxicity reported to the Danish board of adverse reactions to drugs. Scand. J. Gastroenterol. 17:205-211.
37. Colluci CF, Cicero ML. 1975. Hepatic necrosis and trimethoprim-sulfamethoxazole. J. Am. Med. Ass. 233:952-953.

38. Muñoz SJ, Martinez-Hernandez A, Maddrey WC. 1990. Intrahepatic cholestasis and phospholipidosis associated with the use of trimethoprim-sulfamethoxazole. *Hepatology*. 12: 342-347.
39. Horak J, Mertl L, Hrabal P. 1984. Severe liver injury due to sulfamethoxazole-trimethoprim and sulfamethoxydiazine. *Hepatogastroenterology*. 31:199-200.
40. Ronsohoff DF, Jacobs G. 1981. Terminal hepatic failure following a small dose of sulfamethoxazole-trimethoprim. *Gastroenterology*. 80: 816-819.
41. Thies PW, Dull WL. 1984. Trimethoprim-sulfamethoxazole-induced cholestatic hepatitis. *Arch. Intern. Med*. 144: 1691-1692.
42. Nair SS, Kaplan JM, Levine LH, Geraci K. 1980. Trimethoprim-sulfamethoxazole-induced intrahepatic cholestasis. *Ann. Inter. Med*. 92: 511-512.
43. Abi-Mansur P, Ardiaca MC, Allam C. 1981. Trimethoprim-sulfamethoxazole – induced cholestasis. *Am. J. Gastroenterol*. 76:356-359.
44. Dujovne CA, Chan CH, Zimmerman HJ. 1967. Sulfonamide hepatic injury. Review of the literature and report of a case due to sulfamethoxazole. *New England. J. Med*. 277: 785-788.
45. Vree TB, Helster YA, Damama JE, Van Der KE, O'Reilly WJ. 1979. Pharmacokinetics of N'-acetylsulphamethoxazole in man. *Clin. Pharmacokinet*. 4:310-319.
46. Shear NH, Spielberg SP, Grant DM, Tank BK. 1986. Differences in metabolism of sulfonamides predisposing to idiosyncratic toxicity. *Ann. Inter. Med*. 105: 179-184.
47. Barraviera B, Pereira PCM, Mendes RP, Marcondes-Machado J, Lima CRG, Meira DA. 1989. Evaluation of the acetylador phenotype, renal function and sérum sulfadiazine

levels in patients with paracoccidioidomycosis treated with cotrimazine (a combination of sulfadiazine and trimethoprim). *Mycopathologia*.108:107-112.

48. Hostetler KY, Reasor M, Yasaki PJ.1985. Chloroquine-induced phospholipid fatty liver. *J. Biol. Chem.* 260: 215-219.

49. Hostetler KY, Giordano JR, Jellison EJ.1988. *In vitro* inhibition of lysosomal phospholipase A₁ of rat lung by amiodarone and desthylamiodarone. *Biochim. Biophys Acta.* 959: 916-21.

50. Tanner AR. 1986. Hepatic cholestasis induced by trimethoprim. *Br. Med. J.* 293: 1072-1073.

51. Rodriguez RJ, Alcosta DJ. 1997. N- deacetyl ketoconazole-induced hepatotoxicity in a primary culture system of a rat hepatocytes. *Toxicology.* 117: 123-131.

52. Somchit N, Wong CW, Zuraini A, Bustamam AA, Hasiah AH, Khairi HM, Sulaiman MR, Israf DA. 2006. Involvement of phenobarbital and SKF 525A in the hepatotoxicity of antifungal drugs itraconazole and fluconazole in rats. *Drug Chem Toxicol.* 29: 237-253.

53. Somchit N, Ngee CS, Yaakob A, Ahmad Z, Zakaria ZA. 2009. Effects of cytochrome P450 inhibitors on itraconazole and fluconazole induced cytotoxicity in hepatocytes. *J. Toxicol.* 2009: 01-07.

54. Somchit N, Norshahida AR, Hasiah AH, Zuraini A, Sulaiman MR, Noordin MM. 2004. Hepatotoxicity induced by antifungal drugs itraconazole and fluconazole in rats: a comparative in vitro study. *Hum Exp Toxicol.* 23: 519-525.

55. Nebert DW, Jensen NM. 1979. The Ah locus: genetic regulation of the metabolism of carcinogens, drugs, and other environmental chemicals by cytochrome P-450 mediated monooxygenases. *CRC. Crit. Rev. Biochem.* 6: 401-437.

III. Artigo 2

III) Artigo 2 - Evolução de reações de fase aguda e de variáveis metabólicas em pacientes com paracoccidioidomicose tratados com cotrimoxazol e itraconazol.

^aLevorato AD, ^aCavalcante RS, ^aManfio VM, ^bMendes RR, ^cCarvalho LR, ^aMendes RP.

^a Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Brasil.

^b Departamento de Nutrição, Universidade Federal do Sergipe, UFS, Brasil

^c Departamento de Bioestatística, Instituto de Biociências, UNESP, Brasil.

Resumo

Um estudo prospectivo foi realizado em 200 pacientes com paracoccidioidomicose (PCM), 51 com a forma aguda/subaguda (FA) e 149 com a forma crônica (FC), submetidos à avaliação das alterações metabólicas e reações de fase aguda à admissão e durante o tratamento de 169 com cotrimoxazol (CMX) e de 31 doentes com itraconazol (ITC). Avaliação clínica e da bioquímica sanguínea foram realizadas antes do tratamento (momento 0 – M₀) e periodicamente até os pacientes apresentassem cura clínica e normalização da velocidade de hemossedimentação (momento 3 – M₃). Os níveis séricos de triglicérides, glicose, colesterol total, lípides totais, cálcio, ácido úrico, fósforo, proteínas totais e frações, mucoproteínas e α_1 -glicoproteína ácida e eletroforese de proteínas foram calculados como razão entre o valor observado e o limite inferior e, ou, superior de normalidade. Na admissão, a prevalência de alterações laboratoriais variou de 3,0% para os níveis séricos elevados de ácido úrico a 98,0% para os níveis elevados de γ -globulina em pacientes com a FA, e de 3,5% para os níveis séricos diminuídos de glicose a 99,3% para os níveis elevados de γ -globulina em pacientes com a FC. Após a introdução

do tratamento, os níveis séricos elevados de triglicérides e colesterol total foram as variáveis que apresentaram maior incidência. Essas variáveis com elevação predominaram na FC, mas não diferiram segundo antifúngico. Os níveis séricos de colesterol total e fósforo apresentaram maior incidência de níveis diminuídos, que não diferiram segundo forma clínica. Os níveis séricos diminuídos de colesterol total não diferiu entre antifúngicos, no entanto, os níveis séricos diminuídos de fósforo apresentaram maior incidência nos pacientes tratados com ITC do que com CMX. As variáveis inicialmente alteradas se normalizaram ao longo do tratamento antifúngico. Os pacientes tratados com ITC apresentaram uma recuperação mais intensa dos níveis séricos de colesterol total e γ -globulina. No presente estudo, as alterações observadas revelam que é necessária a avaliação e o monitoramento desses parâmetros durante o tratamento da PCM.

1. Introdução

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença sistêmica granulomatosa causada por fungos termodimórficos do complexo *Paracoccidioides brasiliensis*, pelo *Paracoccidioides lutzii*, anteriormente denominado Pb01 e por fungos Pb01-símbios. ¹⁻³ É considerada a micose sistêmica mais prevalente na América Latina e o Brasil, o país com maior número de casos.

Estudo realizado no Brasil, utilizando atestados de óbito no período 1980 - 1995 revelou taxa de mortalidade devido à PCM de 1,45/1.000.000 habitantes, o que a colocou como a oitava causa de morte por doenças predominantemente crônicas ou repetitivas, entre as doenças infecciosas e parasitárias.⁴ No Estado de São Paulo, a taxa de mortalidade da PCM por um milhão de habitantes, no período 1985 - 2005 foi de 2,66, dos quais 1,58 como causa básica e 1,08 como causa associada. Na região de Botucatu, o mesmo autor revelou que esses números eram iguais a 8,73, 4,89, e 3,84, respectivamente,

demonstrando o estado hiper-endêmico desta área, que registra em média 15 casos novos por ano no Serviço de Infectologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.^{5,6}

A associação sulfametoxazol-trimetoprim, também denominada cotrimoxazol (CMX) e o itraconazol (ITC) são os principais compostos antifúngicos utilizados no tratamento da PCM, que é mantido por tempo prolongado.⁷⁻¹⁷

Na avaliação dos pacientes com PCM, vários testes laboratoriais têm sido realizados, entre os quais se encontram reações de fase aguda e bioquímica sanguínea para avaliação da função renal e de alterações metabólicas. No entanto, esses estudos utilizaram, em geral, pequeno número de pacientes e curtos períodos de seguimento.

O presente estudo teve como objetivos avaliar as reações de fase aguda e alterações metabólicas de pacientes com PCM à admissão, antes da instituição do tratamento antifúngico, para analisar os efeitos da doença e, após a instituição do tratamento com CMX ou ITC, para estudar a evolução das variáveis alteradas e a emergência de alterações induzidas pelo tratamento.

2. Pacientes e Métodos

Este estudo foi conduzido no Serviço de Infectologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

2.1. População estudada

Foram incluídos, neste estudo, pacientes com pelo menos 12 anos de idade, com PCM confirmada pela presença de quadro clínico sugestivo e identificação das formas típicas da fase leveduriforme de *Paracoccidioides brasiliensis* em materiais clínicos (casos confirmados) ou quadro clínico sugestivo associado à presença de anticorpos séricos específicos determinados pela reação da imunodifusão dupla em gel de ágar – IDD (casos prováveis). Os pacientes incluídos no estudo foram admitidos entre 1988 e 2011 e tratados com CMX ou com ITC. Foram considerados critérios de exclusão a presença de outras doenças sistêmicas de etiologia infecciosa, inflamatória ou neoplásica como comorbidade, gravidez, lactação, história anterior de hipersensibilidade ou efeitos colaterais graves a azólicos ou CMX e ingestão de medicamentos que pudessem afetar a farmacocinética destes antifúngicos ou interagir com eles.

2.1.2. Classificação das formas clínicas

A classificação da forma clínica de cada paciente foi feita pelo infectologista que atendeu esses doentes, de acordo com Mendes (1994) e com o Manual de Vigilância e Controle da Paracoccidioidomicose, proposto pela Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo (2008).^{18,19}

2.1.3. Dados clínicos e laboratoriais

As informações clínicas e laboratoriais de cada paciente foram obtidas de sua ficha padronizada, que foi preenchida com dados de seu prontuário clínico, cujos registros foram

feitos pelos médicos que atenderam os pacientes, supervisionados sempre pelo mesmo docente.

2.2. Desenho do estudo

Um estudo prospectivo foi realizado em 200 pacientes com PCM submetidos à avaliação metabólica e de reações de fase aguda à admissão e durante o seguimento do tratamento com CMX ou ITC, 149 dos quais apresentavam a forma crônica (FC) e 51 a forma aguda/subaguda (FA). Trinta e um pacientes foram tratados com ITC e 169 com CMX. O ITC foi administrado por via oral, na formulação em cápsula, na dose de 200mg uma vez ao dia, após uma refeição e o CMX em comprimidos com 400mg de sulfametoxazol e 80mg de trimetoprim, na dose de três comprimidos duas vezes ao dia, durante todo o período de estudo. Alguns pacientes iniciaram o tratamento com CMX por via venosa, nas mesmas doses e espaçamento, passando a seguir à via oral.

Avaliações clínicas e da bioquímica sanguínea foram realizadas antes de se iniciar o tratamento, definido como momento 0 (M_0) e, a seguir, periodicamente, até que os pacientes apresentassem cura clínica, definida pelo desaparecimento da sintomatologia apresentada à admissão e redução da velocidade de hemossedimentação (VHS) a valores normais (M_3), que ocorreu após 18 a 23 semanas de tratamento. Entre estes dois momentos, os pacientes foram avaliados a intervalos definidos em semanas, em relação ao início do tratamento: M_1 : 4 a 6 e M_2 : 7 a 10

2.2.1. Prevalência e incidência

Prevalência indica a porcentagem de pacientes com determinada variável alterada à admissão e incidência a porcentagem de pacientes que desenvolveram alteração da variável

analisada no período do estudo, isto é, parâmetro inicialmente normal, mas alterado após a introdução do antifúngico ou variável de início alterada, mas com aumento da alteração após o tratamento.

2.2.2. Intensidade das alterações observadas após introdução de antifúngico

Na avaliação da intensidade das variáveis que apresentaram alterações após introdução do antifúngico utilizou-se o valor mais elevado ou o mais baixo quando se analisou o aumento ou a diminuição do parâmetro, respectivamente.

2.2.3. Avaliação laboratorial

Foram avaliados os níveis séricos de triglicerídeos, glicose, colesterol total, lípides totais, cálcio, ácido úrico, fósforo, proteínas totais e frações, mucoproteínas, α_1 -glicoproteína ácida e eletroforese de proteínas séricas, no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP. Os resultados foram apresentados como razões entre os valores observados e o limite superior de normalidade apenas para os níveis séricos de triglicerídeos e gamaglobulina (γ -globulina). As demais variáveis foram apresentadas como razões entre os valores observados e os limites superiores e inferiores de normalidade.

$$\text{Índice} = \frac{\text{valor observado}}{\text{Limite superior de normalidade}}$$

$$\text{Índice} = \frac{\text{valor observado}}{\text{Limite inferior de normalidade}}$$

A VHS, utilizada na caracterização do momento M_3 , foi determinada pelo método de Westergreen empregando-se sangue anticoagulado com EDTA. Os resultados foram medidos em milímetros na primeira hora e os limites superiores de normalidade foram os que se seguem, para homens e mulheres, respectivamente: a) abaixo de 50 anos: 15 e 20; b) entre 50 e 85 anos: 20 e 30; c) acima de 85 anos: 30 e 42.^{20,21}

As variáveis alteradas, aumentadas ou diminuídas, serão apresentadas como se segue:

I. Intensificação de níveis previamente elevados; **II.** Elevação transitória de níveis previamente normais; **III.** Elevação persistente de níveis previamente normais; **IV.** Níveis previamente diminuídos que se tornaram ainda mais diminuídos; **V.** Diminuição transitória de níveis previamente normais; **VI.** Diminuição persistente de níveis previamente normais.

2.2.4. Desfechos

Cinco desfechos foram avaliados: 1º) Alterações observadas à admissão do paciente, antes da introdução do tratamento antifúngico, que devem ser representativas do efeito da doença sobre os pacientes; 2º) Evolução dessas variáveis após introdução do tratamento antifúngico com CMX ou ITC; 3º) Comparação da evolução dessas variáveis segundo tratamento instituído; 4º) Análise comparativa da incidência de efeitos colaterais observados com os antifúngicos utilizados no tratamento; 5º) Evolução das alterações bioquímicas representativas de efeitos colaterais dos antifúngicos, em função do tempo de tratamento.

2.2.5. Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, na reunião de 03 de dezembro de 2012 (Anexo 1).

2.2.6. Avaliação estatística dos resultados

Foram submetidos à avaliação estatística os grupos que contavam com pelo menos cinco pacientes. A comparação de frequências foi feita pelo teste do χ^2 . Para a comparação de duas médias foi utilizado o teste *t* de Student e para a avaliação quantitativa da evolução das variáveis foi realizada a análise de perfil. A análise de correlação foi realizada pelo teste de Spearman. A diferença de índices correlacionados foi feita pelo teste de Wilcoxon. Todos os testes foram realizados utilizando-se o programa SAS – *Statistical Analysis System*, versão 9.3, SAS Institute Inc., USA. As diferenças foram consideradas significativas admitindo-se um erro tipo α menor ou igual a 0,05.

3. Resultados

3.1. Avaliação da homogeneidade de todos os grupos

Os pacientes tratados com ITC não diferiu daqueles que receberam CMX de acordo com idade, sexo, forma clínica e gravidade (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição de 200 pacientes com paracoccidioomicose, submetidos à avaliação de reações de fase aguda e de variáveis metabólicas segundo idade, sexo, forma clínica, gravidade e tratamento.

		Tratamento		Valor de <i>p</i>
		ITC (n=31)	CMX (n=169)	
Idade (anos)		42,6 ±15,1	43,0±14,5	0,91
Sexo masculino (%)		84,3	88,7	0,49
Forma clínica (%)				
	Aguda	34,3	24,0	0,10
	Crônica	65,7	76,0	
Forma aguda (%)				0,45
	Grave	28,2	21,6	
	Moderada	6,2	2,4	
Forma crônica (%)				0,41
	Leve	6,2	3,6	
	Moderada	53,2	56,9	
	Grave	6,2	15,6	

ITC – itraconazol; CMX – cotrimoxazol; Comparação de frequências: teste do Chi-quadrado.
Comparação de médias: teste *t* não pareado.

Os resultados serão apresentados em tabelas, com o número de indivíduos avaliados em cada variável porque nem todos os testes foram realizados em todos os pacientes.

3.2. Avaliação das alterações metabólicas e reações de fase aguda no momento em que o paciente foi admitido no Serviço (M₀), antes da introdução do tratamento.

Em pacientes com a FA, a prevalência de testes laboratoriais com valores alterados variou de 3,0% para níveis séricos elevados de ácido úrico a 98% para de níveis séricos elevados γ -globulina. Os pacientes com a FC apresentaram variação da prevalência de valores alterados de 3,5% para os níveis séricos diminuídos de glicose a 99,3% para os níveis séricos elevados de γ - globulina (Tabelas 2 e 3).

A FA apresentou maior prevalência de níveis diminuídos de colesterol total, lípides, globulinas totais (dosadas por precipitação) e albumina (determinada por eletroforese) que a FC (Tabelas 2 e 3). A FC revelou maior prevalência de níveis elevados de colesterol total e tendência à maior frequência de concentrações elevadas de ácido úrico (Tabela 2).

Tabela 2- Prevalência de alterações de variáveis da bioquímica sanguínea de pacientes com paracoccidioidomicose em atividade, antes da instituição do tratamento antifúngico, segundo forma clínica. Comparação entre as formas aguda/subaguda (FA) e crônica (FC).

Variáveis alteradas	Forma clínica						Nível de significância (p)
	FA+FC		FA		FC		
	N	(%)	N	n(%)	N	n(%)	
[a] Triglicérides	187	10,7	45	2 (4,4)	142	18 (12,7)	0,12
[d] Glicose	187	4,3	46	3 (6,5)	141	5 (3,5)	0,39
[a] Glicose	187	14,9	46	7 (15,2)	141	21 (14,8)	0,94
[d] Colesterol	190	66,3	48	39 (81,3)	142	87 (61,3)	0,01
[a] Colesterol total	190	33,7	48	9 (18,8)	142	55 (38,7)	0,01
[d] Lípides totais	68	8,8	17	4 (23,5)	51	2 (3,9)	0,01
[d] Cálcio	184	7,1	43	5 (11,6)	141	8 (5,7)	0,18
[a] Cálcio	184	8,7	43	4 (9,3)	141	12 (8,5)	0,87
[a] Ácido úrico	143	11,9	33	1 (3,0)	110	17 (15,4)	0,07
[d] Fósforo	147	4,0	35	14 (40,0)	112	42 (37,5)	0,79
[a] Fósforo	147	14,3	35	5 (14,3)	112	16 (14,3)	1,00
[a] α ₁ -glicoproteína ácida	82	37,8	18	7 (38,9)	64	24 (37,5)	0,92
[d] Proteínas totais	187	4,8	47	2 (4,3)	140	7 (5,0)	0,84
[a] Proteínas totais	187	31,6	47	23 (48,9)	140	36 (25,7)	0,003
[d] Albumina	190	24,2	46	14 (30,4)	144	29 (20,2)	0,26
[a]Globulinas	185	73,0	45	38 (84,4)	140	97 (69,3)	0,046
[a]Mucoproteínas	91	52,7	23	13 (56,5)	68	35 (51,5)	0,68

N- número de pacientes estudados; n(%) – número (prevalência) de pacientes alterados; [a] – aumento de; [d] – diminuição de.

Tabela 3. Prevalência de alterações de frações avaliadas pela eletroforese de proteínas séricas de pacientes com paracoccidiodomicose em atividade, antes da instituição do tratamento antifúngico, segundo forma clínica. Comparação entre as formas aguda/subaguda (FA) e crônica (FC).

Variáveis alteradas	Forma clínica						Nível de significância (p)
	FA+FC		FA		FC		
	N	n(%)	N	n(%)	N	n(%)	
[d] Albumina	200	84 (42,0)	51	29 (56,9)	149	55 (36,9)	0,013
[a] α1- globulina	200	51 (25,5)	51	20 (39,2)	149	31 (20,8)	0,01
[a] α2- globulina	200	104 (52,0)	51	23 (45,0)	149	81 (54,3)	0,25
[d] β- globulina	200	11 (5,5)	51	6 (11,8)	149	5 (3,4)	0,02
[a] β-globulina	200	33 (16,5)	51	6 (11,8)	149	27 (18,1)	0,29
[a] γ- globulina	200	105 (99,0)	51	50 (98,0)	149	148 (99,3)	0,42
[d] Proteínas totais	200	9 (4,5)	51	3 (5,9)	149	6 (4,0)	0,59
[a] Proteínas totais	200	76 (38,0)	51	26 (51,0)	149	50 (33,5)	0,03

N- número de pacientes estudados; n(%) – número (prevalência) de alterados; [a] – aumento de; [d]–diminuição de.

A comparação da intensidade das variáveis alteradas segundo forma clínica da PCM revelou diferença em apenas três variáveis: níveis séricos de colesterol total e de albumina menores na FA que na FC e concentração de globulinas maiores na FA que na FC (Tabela 4).

A eletroforese de proteínas revelou que os níveis séricos de albumina eram mais diminuídos e os de γ -globulina eram mais elevados na FA que na FC (Tabela 5). Entre os pacientes com níveis diminuídos de β -globulina, observou-se forte tendência a ser mais intensa a diminuição observada na FC (Tabela 5).

Tabela 4. Intensidade de alteração de variáveis da bioquímica sanguínea de pacientes com paracoccidioidomicose em atividade, antes da instituição do tratamento antifúngico, segundo forma clínica. Comparação entre as formas aguda/subaguda (FA) e crônica (FC). Valores apresentados como média e desvio padrão.

Variáveis alteradas	Forma clínica				Nível de significância (p)
	FA		FC		
	N	±dp	n	±dp	
[a]Triglicérides	2	2,20 ± 1,70	18	1,37 ± 0,50	-
[d]Glicose	3	0,70 ±0,19	5	0,75 ± 0,34	-
[a]Glicose	7	1,23 ± 0,32	21	1,32 ± 0,41	0,59
[d]Colesterol total	39	0,72 ± 0,13	87	0,81 ± 0,13	≤0,001
[a]Colesterol total	9	1,26 ± 0,37	55	1,16 ± 0,17	0,18
[d]Lípides totais	4	0,82 ± 0,07	2	0,82 ± 0,12	-
[d]Cálcio	5	0,95 ± 0,04	8	0,95 ± 0,03	0,71
[a]Cálcio	4	1,04 ± 0,04	12	1,04 ± 0,04	-
[a]Ácido úrico	1	-	16	1,13 ± 0,12	-
[d]Fósforo	14	0,81 ± 0,10	42	0,86 ± 0,10	0,16
[a]Fósforo	5	1,06 ± 0,02	16	1,18 ± 0,18	0,18
[a]α ₁ -glicoproteína ácida	7	1,60 ± 0,51	24	1,39 ± 0,37	0,24
[d]Proteínas totais	2	0,85 ± 0,03	7	0,80 ± 0,29	-
[a]Proteínas totais	23	1,08 ± 0,08	36	1,10 ± 0,30	0,72
[d]Albumina	14	0,74± 0,21	29	0,83± 0,12	≤0,001
[a]Globulinas	38	1,44 ± 0,31	140	1,23 ± 0,20	≤0,001
[a]Mucoproteínas	13	1,60 ± 0,50	68	1,58 ± 0,43	0,91

n-número de pacientes com alteração; ±dp – média ± desvio padrão; [a]-aumento; [d]diminuição.

Tabela 5. Intensidade de alteração de frações avaliadas na eletroforese de proteínas séricas de pacientes com paracoccidiodomicose em atividade, antes da instituição do tratamento antifúngico, segundo forma clínica. Comparação entre as formas aguda/subaguda (FA) e crônica (FC). Valores apresentados como média e desvio padrão.

Variáveis alteradas	Forma clínica				Nível de significância (p)
	FA		FC		
	N	±dp	n	±dp	
[d] Albumina	29	0,76 ± 0,17	55	0,84 ± 0,16	0,03
[a] α1- globulina	20	1,77 ± 1,67	32	1,59 ± 1,63	0,44
[a] α2- globulina	23	1,25 ± 0,15	81	1,24 ± 0,62	0,96
[d] β- globulina	6	0,89 ± 0,14	5	0,67 ± 0,18	0,056
[a] β- globulina	26	1,08 ± 0,08	7	1,17 ± 0,16	0,19
[a] γ- globulina	50	3,53 ± 1,43	148	2,43 ± 0,83	≤0,001
[d] Proteínas totais	5	0,90 ± 0,12	6	0,97 ± 0,03	0,92
[a] Proteínas totais	26	1,07 ± 0,07	50	1,05 ± 0,05	0,09

n- número de pacientes com alteração; ±Dp – média ± desvio padrão; [a]-aumento; [d]-diminuição;

Os índices dos níveis séricos de albumina e de γ-globulina apresentaram correlação inversa, com $r_s=0,326$ [0,448;0,192] e nível de significância $p<0,0001$. A comparação dos níveis séricos de albumina, avaliados por precipitação e pela eletroforese de proteínas séricas, revelou medianas mais baixas no método eletroforético (1,05 vs 1,14; $p=0,0001$).

Os índices dos níveis séricos diminuídos de cálcio e de colesterol total apresentaram correlação direta com $r_s= 0,159$ [0,66;0,44] e nível de significância $p=0,60$.

No presente estudo, os pacientes que apresentaram níveis séricos elevados de fósforo não revelaram níveis diminuídos de cálcio, descartando uma deficiência na ação do paratormônio.

A correlação dos níveis séricos diminuídos de colesterol total e albumina, revelou uma tendência a ter uma correlação direta com $r_s=0,28$ [0,01; 0,53] e nível de significância $p=0,05$.

3.3. Avaliação evolutiva das variáveis alteradas na admissão ao Serviço.

3.3.1. Colesterol total. Os níveis baixos de colesterol total se elevaram após introdução do tratamento antifúngico, tanto na FA quanto na FC (Figura 1A). Além disso, a recuperação dos níveis séricos de colesterol total foi maior em pacientes tratados com ITC (Figura 1B).

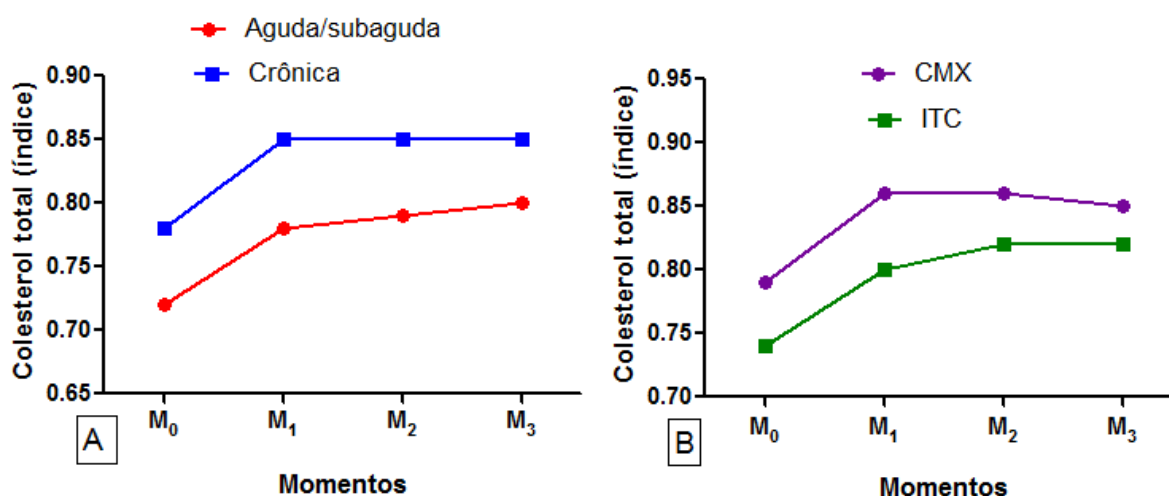


Figura 1. Média dos índices dos níveis séricos de colesterol total, inicialmente diminuídos, em pacientes com as formas aguda/subaguda e crônica da paracoccidioidomicose. **A.** Comparação entre formas clínicas segundo momentos: efeito de forma clínica ($p=0,016$); efeito de momento ($p<0,0001$); interação forma clínica x momento ($p=0,34$). **B.** Comparação entre antifúngicos segundo momentos: efeito de medicamento ($p=0,023$); efeito de momento ($p=0,007$); interação medicamento x momento ($p=0,72$). CMX- cotrimoxazol; ITC- itraconazol; M₀: pré-tratamento; M₁: 4 a 6 semanas após o início do tratamento; M₂: 7-10; M₃: cura clínica e normalização da velocidade de hemossedimentação (18 a 23 semanas).

3.3.2. Albumina (precipitação). Os níveis séricos de albumina, determinados por precipitação, se elevam com o tratamento (Figura 2A e 2B). No entanto, esse aumento não difere em função da forma clínica (Figura 2A). Os pacientes tratados com ITC apresentaram forte tendência ao aumento dos níveis de albumina quando comparados com os tratados com CMX (Figura 2B).

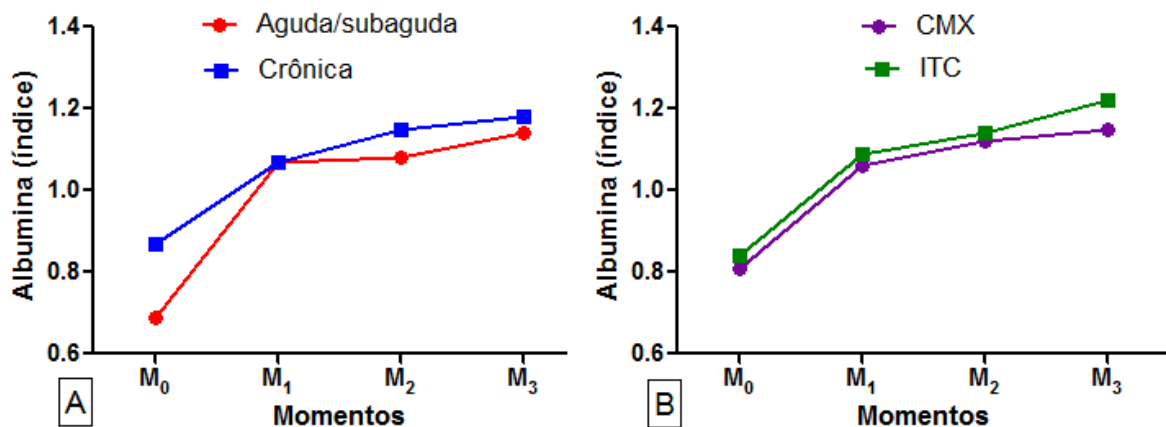


Figura 2. Média dos índices dos níveis séricos de albumina em pacientes com as formas aguda/subaguda e crônica da paracoccidioidomicose. **A.** Comparação entre formas clínicas segundo momentos: efeito de forma clínica ($p=0,52$); efeito de momento ($p<0,0001$); interação forma clínica x momento ($p=0,95$). **B.** Comparação entre os antifúngicos segundo momentos: efeito de medicamento ($p=0,06$); efeito de momento ($p<0,001$); interação medicamento x momento ($p=0,08$). CMX- cotrimoxazol; ITC- itraconazol; M₀: pré-tratamento; M₁: 4 a 6 semanas após o início do tratamento; M₂: 7-10; M₃: cura clínica e normalização da velocidade de hemossedimentação (18-23 semanas).

3.3.3. Albumina (eletroforese de proteínas). A eletroforese de proteínas séricas revelou que os níveis séricos de albumina, determinados por eletroforese de proteínas, se elevam com o tratamento (Figura 3A e 3B). No entanto, essa recuperação não difere segundo forma clínica ou antifúngico utilizado (Figura 3A e 3B).

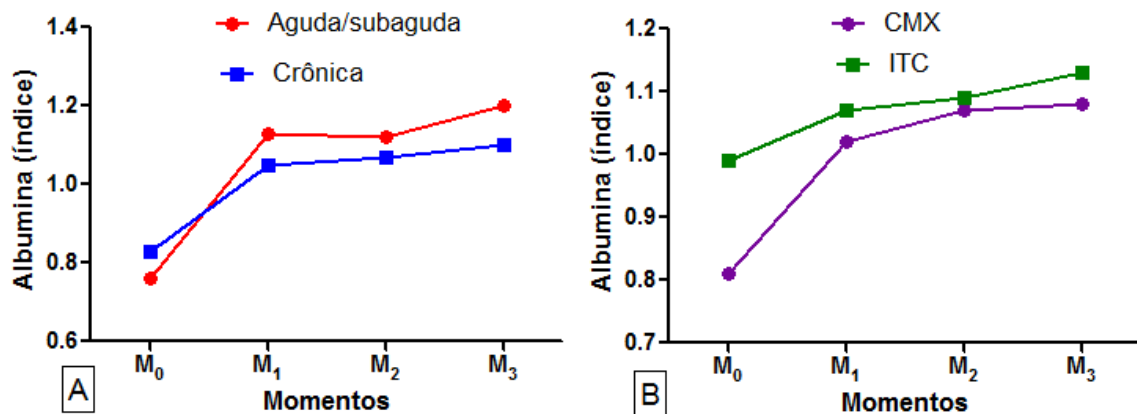


Figura 3. Média dos índices dos níveis de albumina determinados pela eletroforese de proteínas séricas em pacientes com as formas aguda/subaguda e crônica da paracoccidiodomicose. **A.** Comparação entre formas clínicas segundo momentos: efeito de forma clínica ($p=0,72$); efeito de momento ($p<0,0001$); interação forma clínica x momento ($p=0,26$). **B.** Comparação entre antifúngicos segundo momentos: efeito de medicamento ($p=0,58$); efeito de momento ($p<0,0001$); interação medicamento x momento ($p=0,87$); CMX- cotrimoxazol; ITC- itraconazol; M₀: pré-tratamento; M₁: 4 a 6 semanas após o início do tratamento; M₂: 7-10; M₃: cura clínica e normalização da velocidade de hemossedimentação (18-23 semanas).

3.3.4. γ -globulina. Os pacientes com a FA revelaram uma diminuição mais intensa dos níveis séricos de γ -globulina do que os pacientes com a FC (Figura 4A). Além disso, os pacientes tratados com ITC apresentaram uma recuperação mais acentuada dos níveis de γ -globulina do que aqueles tratados com CMX (Figura 4B).

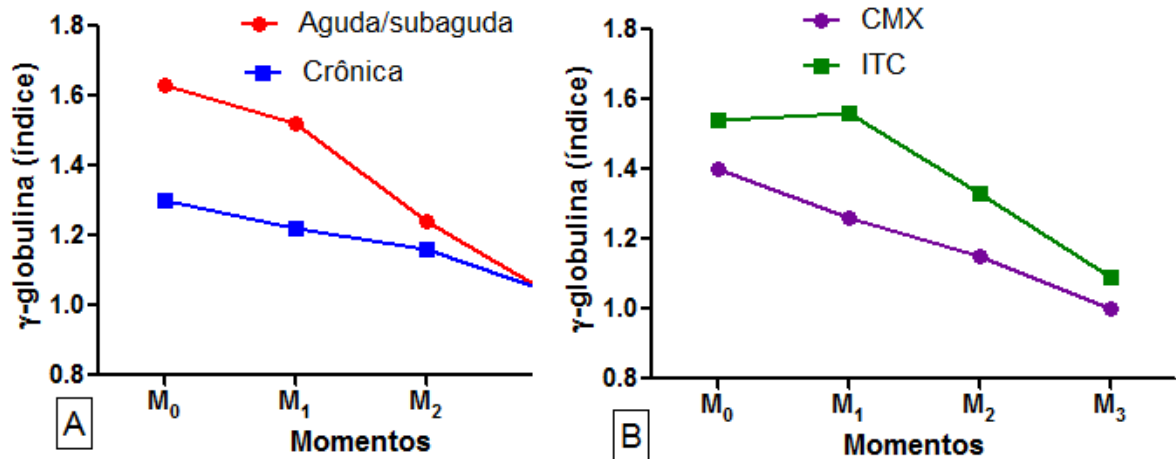


Figura 4. Médias dos índices das frações de γ -globulina em pacientes com as formas aguda/subaguda e crônica da paracoccidioidomicose. **A.** Comparação entre formas clínicas segundo momentos: efeito de forma clínica ($p=0,001$), efeito de momento ($p<0,0001$); interação forma clínica x momento ($p<0,0001$). **B.** Comparação entre antifúngicos segundo momentos: efeito de medicamento ($p=0,047$); efeito de momento ($p<0,0001$); interação medicamento x momento ($p=0,45$). CMX- cotrimoxazol; ITC- itraconazol; M₀: pré-tratamento; M₁: 4 a 6 semanas após o início do tratamento; M₂: 7-10; M₃: cura clínica e normalização da velocidade de hemossedimentação (18-23 semanas).

3.4. Avaliação das variáveis que se alteraram após introdução do tratamento antifúngico.

A incidência das variáveis que se elevaram com a introdução do tratamento antifúngico variou de 3,2% para os níveis séricos de fósforo a 15,9% para os níveis séricos de triglicérides (Tabela 6). A comparação entre formas clínicas revelou que a incidência de elevação dos níveis séricos de triglicérides foi maior na FC que na FA ($p=0,009$). Além disso, os pacientes tratados com ITC revelaram maior incidência de elevação dos níveis séricos de cálcio ($p=0,012$) e de ácido úrico ($p=0,007$) que os pacientes que receberam CMX (Tabela 6).

Tabela 6. Incidência, expressa em porcentagem, de elevação dos níveis séricos de variáveis da bioquímica sanguínea depois da introdução do tratamento com Cotrimoxazol (CMX) ou itraconazol (ITC). Comparação das incidências entre forma aguda/subaguda (FA) e crônica (FC) e segundo antifúngico utilizado.

Variáveis	I	II	III	I+II+III	FA vs FC		Nível de significância	CMX vs ITC		Nível de significância
Triglicérides	4,1	4,1	7,7	15,9	4,1	20,0	0,009	15,9	16,7	0,91
Colesterol total	2,0	5,1	3,0	10,1	4,0	12,2	0,09	10,1	10,3	0,97
Glicose	0,0	5,6	6,7	8,6	4,0	14,9	0,04	12,1	12,5	0,96
Cálcio	1,1	7,3	0,0	8,35	6,6	8,9	0,62	6,2	20,0	0,012
Fósforo	0,6	2,6	0,0	3,2	13,8	0,0	-	13,8	0,0	-
Ácido úrico	1,4	3,4	0,0	4,76	5,8	3,7	0,58	3,3	11,5	0,007

I. Intensificação de níveis séricos previamente elevados; **II.** Elevação transitória de níveis previamente normais; **III.** Elevação persistente de níveis séricos previamente normais.

A incidência de variáveis que diminuíram após a introdução do tratamento antifúngico variou de 3,1% para os níveis séricos de glicose a 25,3% para os níveis séricos de fósforo (Tabela 7). A comparação entre formas clínicas não revelou diferença entre as incidências. No entanto, os pacientes tratados com ITC revelaram maior incidência de diminuição dos níveis séricos de cálcio ($p<0,0001$) e de fósforo ($p=0,018$) (Tabela 7).

Tabela 7. Incidência, expressa em porcentagem, de diminuição dos níveis séricos de variáveis da bioquímica sanguínea depois da introdução do tratamento com Cotrimoxazol (CMX) ou itraconazol (ITC). Comparação das incidências entre forma aguda/subaguda (FA) e crônica (FC) e segundo antifúngico utilizado.

Variáveis	IV	V	VI	IV+V+VI	FA vs FC		Nível de significância	CMX vs ITC		Nível de significância
Colesterol total	4,0	8,6	0,0	12,6	8,0	14,2	0,24	11,3	20,6	0,16
Glicose	0,0	2,6	0,5	3,1	1,0	2,0	0,63	2,4	6,2	0,25
Lípides totais	2,9	1,5	0,0	4,4	5,8	3,9	0,73	3,5	9,0	0,49
Cálcio	0,5	5,2	0,0	5,7	6,6	5,5	0,77	2,5	23,3	<0,0001
Fósforo	14,0	7,3	4,0	25,3	19,4	27,2	0,35	21,3	42,8	0,018

IV. Níveis previamente diminuídos, que se tornaram ainda mais diminuídos; **V.** Diminuição transitória de níveis previamente normais; **VI.** Diminuição persistente de níveis previamente normais.

3.4.1. Colesterol Total. Os pacientes com a FC apresentaram aumento transitório do colesterol total, durante o tratamento com CMX (Figura 5). A evolução dessa variável não foi feita em pacientes com a FA devido ao pequeno número de casos que apresentaram essa alteração (dois).

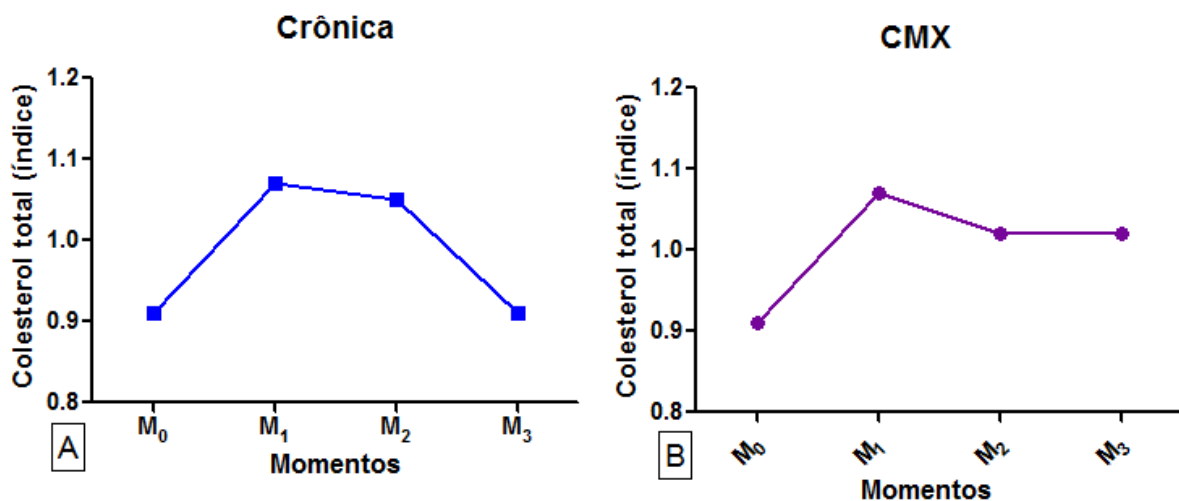


Figura 5. Média dos índices dos níveis séricos de colesterol total observados em pacientes com paracoccidioidomicose. **A.** Evolução de 18 pacientes com a forma crônica, segundo momento ($p=0,87$). **B.** Evolução de 17 pacientes com a forma crônica tratados com cotrimoxazol, segundo momento ($p=0,87$); CMX- cotrimoxazol; M₀: pré-tratamento; M₁: 4 a 6 semanas após o início do tratamento; M₂: 7-10; M₃: cura clínica e normalização da velocidade de hemossedimentação (18-23 semanas).

3.4.2. Triglicérides. Os níveis séricos de triglicérides de pacientes com a FC revelaram aumento dos níveis ao longo do tratamento (Figura 6A), que não diferiu entre tratamentos (Figura 6B). A evolução dessa variável não foi feita em pacientes com a FA devido ao pequeno número de casos que apresentaram essa alteração (dois).

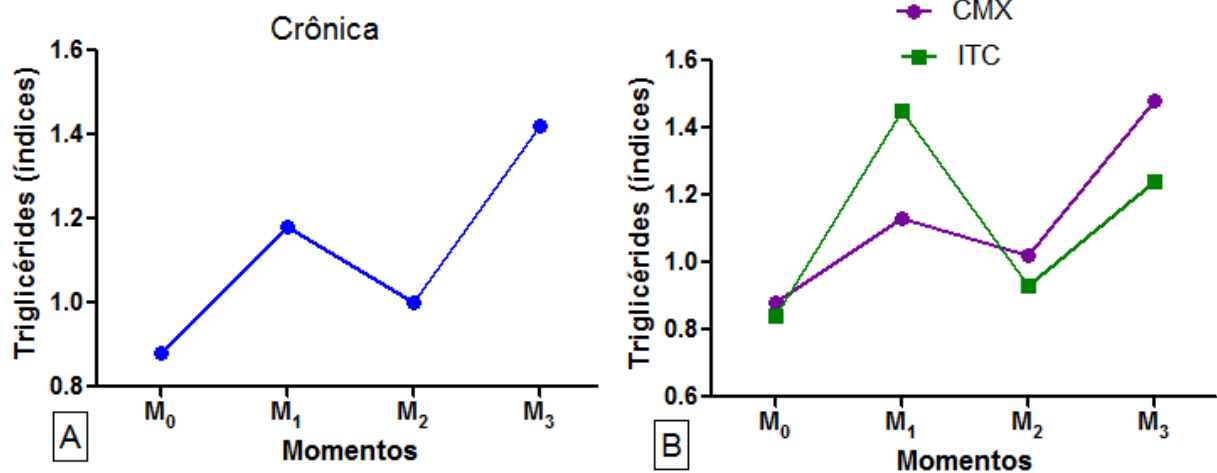


Figura 6. Média dos índices dos níveis séricos de triglicérides em pacientes com a forma crônica da paracoccidioidomicose. **A.** Evolução de 29 pacientes com a forma crônica, segundo momento ($p<0,001$). **B.** Comparação entre antifúngicos segundo momento: efeito de medicamento ($p=0,86$); efeito de momento ($p=0,04$); interação medicamento x momento ($p=0,79$). CMX- cotrimoxazol; ITC- itraconazol; M₀: pré-tratamento; M₁: 4 a 6 semanas após o início do tratamento; M₂: 7-10; M₃: cura clínica e normalização da velocidade de hemossedimentação (18-23 semanas).

3.4.3. Glicose. Vinte e dois pacientes com a forma crônica apresentaram discreta tendência ao aumento da glicemia ($p=0,09$) (Figura 7A). Quando analisados os 20 pacientes tratados com CMX, observou-se aumento significativo da glicemia ($p=0,02$) (Figura 7B). A evolução dessa variável não foi feita em pacientes com a FA devido ao pequeno número de casos que apresentaram essa alteração (dois).

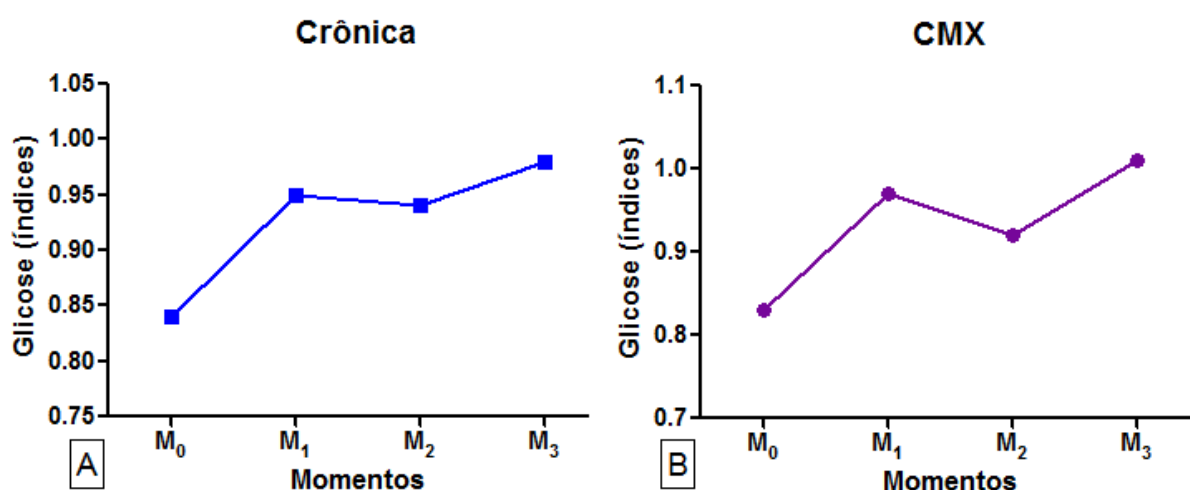


Figura 7. Média dos índices dos níveis séricos de glicose em pacientes com a forma crônica da paracoccidioidomicose. **A.** Evolução de 22 pacientes com a forma crônica, segundo momento ($p=0,09$). **B.** Evolução de 20 pacientes tratados com CMX, segundo momento ($p=0,02$); CMX- cotrimoxazol; M₀: pré-tratamento; M₁: 4 a 6 semanas após o início do tratamento; M₂: 7-10; M₃: cura clínica e normalização da velocidade de hemossedimentação (18-23 semanas).

3.4.4. Cálcio. Oito pacientes com a FC revelaram níveis séricos de cálcio mais baixos que á admissão, durante o tratamento antifúngico, que, no entanto, foram transitórios (Figura 8A). Sete desses pacientes foram tratados com ITC, revelando o mesmo comportamento (Figura 8B). A evolução dessa variável não foi feita em pacientes com a FA devido ao pequeno número de casos que apresentaram essa alteração (três).

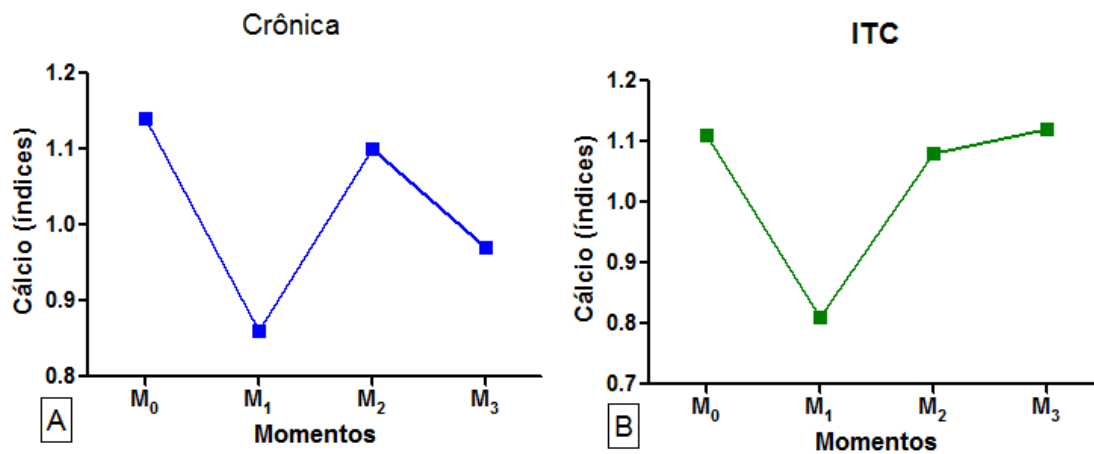


Figura 8. Média dos índices dos níveis séricos de cálcio em pacientes com a forma crônica da paracoccidioidomicose. **A.** Evolução de oito pacientes com a forma crônica, segundo momento ($p=0,29$). **B.** Evolução de sete pacientes tratados com ITC, segundo momento ($p=0,31$); ITC- itraconazol; M₀: pré-tratamento; M₁: 4 a 6 semanas após o início do tratamento; M₂: 7-10; M₃: cura clínica e normalização da velocidade de hemossedimentação (18-23 semanas).

Dezesseis pacientes com PCM, 13 dos quais com a FC, revelaram níveis séricos de cálcio mais elevados que á admissão, durante o tratamento antifúngico, que, no entanto, foram transitórios (Figura 9A). Esses achados não diferem segundo tratamento antifúngico (Figura 9B). A evolução dessa variável não foi feita em pacientes com a FA devido ao pequeno número de casos que apresentaram essa alteração (três).

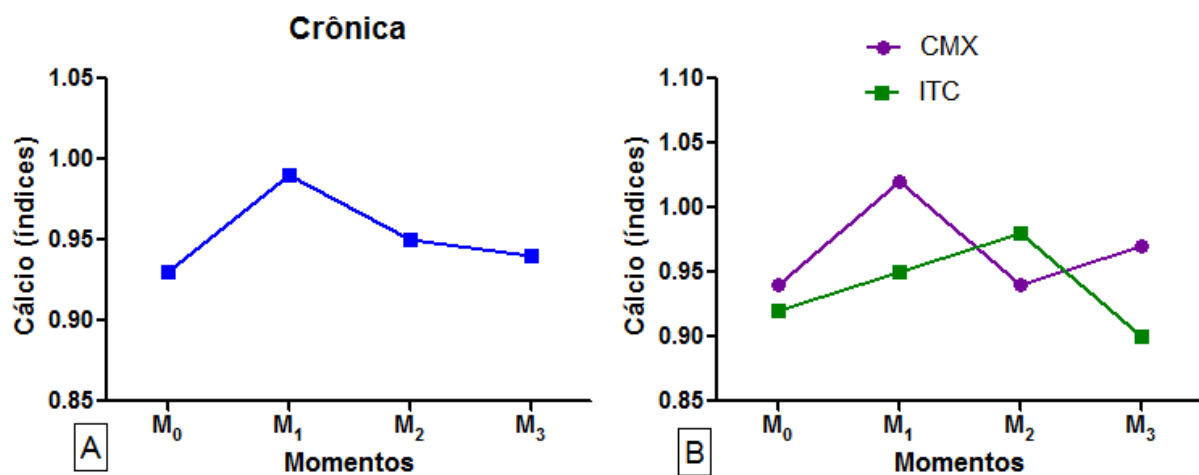


Figura 9. Média dos índices dos níveis séricos de cálcio em pacientes com a forma crônica da paracoccidioidomicose. **A.** Evolução de 13 pacientes, segundo momento ($p=0,52$). **B.** Comparação entre antifúngicos e momentos: efeito de momento: $p=0,74$; efeito de medicamento ($p=0,51$); efeito interação medicamento e momento ($p=0,74$); CMX- cotrimoxazol; ITC- itraconazol; M₀: pré-tratamento; M₁: 4 a 6 semanas após o início do tratamento; M₂: 7-10; M₃: cura clínica e normalização da velocidade de hemossedimentação (18-23 semanas).

3.4.5. Ácido úrico. Os níveis séricos de ácido úrico em cinco pacientes com a FC apresentaram elevação transitória (Figura 10). A análise segundo forma aguda/subaguda ou tratamento antifúngico não foi realizada devido ao pequeno número de casos que apresentaram essa alteração.

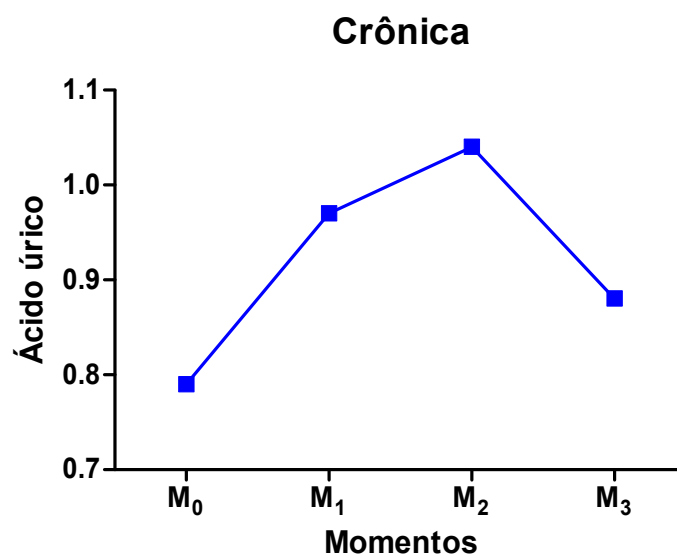


Figura 10. Média dos índices dos níveis séricos de fósforo em pacientes com a forma crônica da paracoccidiodomicose. Evolução de cinco pacientes, segundo momento ($p=0,56$).

4. Discussão

As alterações dos níveis séricos de colesterol podem ser explicadas pela ativação de citocinas pró-inflamatórias e pelo acometimento do sistema linfático, que é mais intenso na FA.

Na PCM experimental murina, algumas citocinas pró-inflamatórias, em especial fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6), interferem no metabolismo lipídico hepático, promovendo alterações significativas na lipogênese e na síntese de lipoproteínas.²²

Em pacientes não tratados, a FA da PCM apresenta níveis séricos de IL-18 e receptores solúveis de TNF (sTNFR_{II}) mais elevados que na FC.²³ Essas citocinas promovem ativação do fator de transcrição nuclear Kappa B (NF κ B), que leva à produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6.²⁴ Desse modo é possível que o sinergismo entre essas cinco citocinas interfira no metabolismo lipídico hepático, resultando em concentrações séricas diminuídas de colesterol, como foi observado no presente estudo. Após a introdução dos antifúngicos, com a reversão do quadro infeccioso¹⁸ e a diminuição dos níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias²³, o padrão metabólico lipídico e a lipemia seriam restabelecidos.

Sabe-se que pacientes com PCM apresentam significativo comprometimento do sistema linfático²⁵⁻³², o que pode prejudicar a absorção de ácidos graxos de cadeia longa e muito longa, uma vez que os quilomicrons que carregam tais nutrientes utilizam esse sistema como transporte do intestino até desembocar na veia subclávia esquerda.³³

A reduzida chegada de ácidos graxos no fígado, especialmente os ácidos graxos saturados, tem se mostrado capaz de reduzir as concentrações séricas de colesterol. Ácidos graxos saturados, em especial láurico, mirístico e palmítico (C12:0, C14:0 e C16:0) são capazes de reduzir o número de receptores hepáticos de lipoproteínas de baixa densidade

(LDL)³⁴, bem como aumentar a quantidade de colesterol esterificado transportado nas LDL, devido à sua conformação química retilínea.³⁵

Independentemente das possíveis causas da redução sérica de colesterol em pacientes não tratados (momento M_0), bem como de sua elevação após tratamento antifúngico, é fundamental considerar que há diferentes frações de lipoproteínas carreadoras de colesterol na circulação sistêmica.³⁶

O colesterol encontrado nas LDLs tem sido considerado fator de risco para doenças cardiovasculares. Essa lipoproteína (LDL) é composta principalmente de colesterol e uma única apolipoproteína, a apo B100, podendo ser captada por células hepáticas ou periféricas por meio de receptores específicos (LDL-R).³⁷

A concentração sérica de LDL sofre relevante influência da expressão dos LDL-R nos hepatócitos e da atividade da enzima hidroximetilglutaril (HMG) CoA redutase, enzima-chave para a síntese intracelular do colesterol hepático. Com a queda do conteúdo intracelular do colesterol, ocorre aumento da expressão de LDL-R nos hepatócitos e, assim, maior captação dessa e de outras lipoproteínas, como as de densidade muito baixa (VLDL) e intermediária (IDL).³⁷ Desta forma, ao considerar que a infecção paracoccidióidica altera a lipemia, seria interessante avaliar os possíveis mecanismos pelos quais esse quadro infeccioso causaria tais modificações, agindo em especial nos LDL-R dos hepatócitos, sobre a atividade da HMG- CoA redutase, ou até mesmo por reduzir seu precursor (acetil-CoA) em virtude de quadros de subnutrição grave, uma vez que as citocinas inflamatórias são consideradas potentes agentes anorexígenos.

As partículas de lipoproteínas de densidade alta (HDL) são formadas predominantemente no fígado e seu principal conteúdo proteico é representado pelas apos AI e AII. O colesterol livre da HDL, recebido das membranas celulares, é esterificado por ação da lecitina-colesterolaciltransferase (LCAT). A apo AI, principal proteína da HDL, é

cofator dessa enzima. O processo de esterificação do colesterol, que ocorre principalmente nas HDLs, é fundamental para sua estabilização e transporte no plasma, no centro desta partícula. A HDL transporta o colesterol até o fígado, onde este é captado pelos receptores SR-B1.³⁷

Desta forma, ao considerar que a infecção paracoccidióidica altera a lipemia, seria interessante avaliar os possíveis mecanismos pelos quais esse quadro infeccioso causaria tais modificações, agindo em especial sobre a síntese e captação hepática da HDL. No entanto, Marquez et al.³⁸, observaram que os níveis séricos de HDL-colesterol não se encontravam alterados e não diferiram segundo forma clínica.

Os níveis de triglicérides revelaram um aumento de 4,4% nos pacientes com a FA e 12,7% na FC no momento M₀. O aumento de triglicérides durante processo inflamatório/infeccioso é caracterizado pelo aumento de VLDL.³⁹ Algumas citocinas, como TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6 e IFN- γ , desencadeiam diminuição da ativação da lipase lipoproteica responsável pela hidrólise de triglicérides, transportados por quilomicrons e VLDL, levando ao aumento dos níveis séricos de triglicérides.^{40,41}

Tucker et al.,⁴² observaram hipertrigliceridemia em 9,0% dos 189 pacientes estudados, com diferentes infecções fúngicas e diversas co-morbidades. No presente estudo a hipertrigliceridemia foi observada tanto em pacientes tratados com CMX tanto quanto naqueles que receberam ITC, e nenhum deles apresentava co-morbidade, portanto, é possível que a alteração dos níveis séricos de triglicérides esteja mais relacionada à resposta inflamatória ao processo infeccioso do que ao antifúngico utilizado.

Glicemia elevada foi observada tanto na FA quanto na FC, com a mesma prevalência (FA=15,0%; FC=14,8%) e intensidade (FA=1,23; FC=1,32).

A captação de glicose por tecidos ocorre, em sua maioria, por intermédio de transportadores de glicose (GLUTs), porém, o transportador insulino-sensível (GLUT-4),

encontrado no tecido adiposo e tecido muscular esquelético, depende da sinalização da insulina. Tal sinalização se inicia com sua ligação a um receptor específico de membrana (IR), resultando em fosforilação em tirosina de diversos substratos, incluindo substratos do receptor de insulina 1 e 2 (IRS-1 e IRS-2), ativação de proteína fosfatidilinositol-3-quinase (PI3q), aumento da fosforilação em serina da proteína quinase B (Akt) e da translocação da proteína GLUT-4 para a membrana celular e captação da glicose circulante em humanos.⁴³

Processos inflamatórios ativam substratos intermediários da via de sinalização do TNF- α , como a serina quinase JNK (*c-jun N-terminal Kinase*) que, por sua vez, interferem na funcionalidade dos substratos do receptor de insulina, o IRS-1 e IRS-2. Uma vez fosforilados em serina pela JNK, a possibilidade de serem fosforilados em tirosina pelo receptor de insulina fica comprometida, o que contribui para a resistência à transdução do sinal da insulina através dessa via, levando à hiperglicemia.⁴⁴

Além disso, pode-se destacar a ação das citocinas pró-inflamatórias sobre a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-córtex adrenal, capaz de levar à maior liberação de cortisol e consequente ativação da via neoglicogênica, o que pode resultar em hiperglicemia.⁴⁵

A hiperglicemia reduz a fagocitose e os fatores de proteção intracelular, reduz a aderência dos granulócitos, restringe a quimiotaxia dos neutrófilos e a fixação do complemento e, ainda, reduz a produção de radicais superóxidos, prejudicando, dessa forma, a imunocompetência.⁴⁴

Discreta elevação dos níveis séricos de ácido úrico foi observada em 16,1% dos pacientes que receberam ITC, esse achado não tem sido relatado⁴², mas, vem sendo observado com outros antimicrobianos como pirazinamida, que inibe a secreção tubular renal do ácido úrico.^{46,47}

A concentração de cálcio extracelular é muito bem regulada pelo paratormônio (PTH), sintetizado pelas glândulas paratireoides e pela forma ativa da vitamina D, que é o dihidroxicolecalciferol (1,25-DHC). O 1,25-DHC promove a absorção intestinal de cálcio principalmente através da formação de uma proteína ligadora de cálcio nas células do epitélio intestinal. A síntese da vitamina D se inicia na pele, a partir do colesterol (7-dihidrocolesterol) que, sob a ação da radiação solar ultravioleta, é transformado em colecalciferol D₃. A seguir, esse composto sofre duas hidroxilações – a primeira no fígado e a segunda nos rins. Assim, pode-se sugerir que os baixos níveis de cálcio sérico, observados em 11,6% dos pacientes com a FA e 5,7% dos que apresentavam a FC, se devem aos níveis diminuídos de colesterol sérico, observados nesses doentes. A correlação direta observada entre níveis séricos de cálcio com os de colesterol, em pacientes com baixas concentrações deste íon, reforça essa hipótese. As lesões hepáticas, também observadas na PCM²⁵⁻³², podem estar desempenhando importante papel no comprometimento da formação do DHC e, por fim, nos baixos níveis séricos de cálcio.

Por outro lado, as flutuações dos níveis séricos de albumina interferem nas dosagens do cálcio total.⁴⁸ Assim, os baixos níveis de cálcio total, observados no presente estudo, podem ser explicados pela hipoalbuminemia revelada pelos pacientes com PCM.

Por fim, o presente estudo permite descartar uma deficiência na ação do PTH, pois neste caso, o clearance de fósforo deveria estar diminuído e, portanto, seu nível sérico elevado, achado não observado em nenhum dos casos que revelaram hipocalcemia. Além disso, não se tem conhecimento de comprometimento de glândulas paratireoides na PCM.

25-32

Por representar aproximadamente 50% das proteínas circulantes, a albumina tem sido adotada como indicador de estado nutricional em relação às proteínas. Porém, cabe

ressaltar que se trata de uma proteína de fase aguda negativa, tendo sua concentração diminuída não só pela subnutrição, como também por processos inflamatórios.⁴⁹

A redução da albuminemia nas inflamações tem sido justificada pela prioridade estabelecida pelo organismo humano - diante de um balanço nitrogenado negativo, estabelecido pela menor ingestão alimentar (anorexia induzida por citocinas inflamatórias) e pela maior degradação protéica induzida por citocinas pró-inflamatórias, a utilização de aminoácidos provenientes da dieta e da degradação de proteínas endógenas é destinada prioritariamente à síntese de proteínas positivas de fase aguda, como proteína C reativa (PCR), α -1-glicoproteína ácida (α -1-GA), ceruloplasmina (CER), α -1-antitripsina (α -1-AT).⁵⁰

Marquez et al.,³⁸ avaliaram concentrações séricas de albumina e quatro globulinas pela eletroforese de proteínas em pacientes com as forma aguda e crônica da PCM, encontrando redução da albuminemia, que apresentava correlação inversa com os níveis séricos de γ -globulina, achado confirmado no presente estudo.

A elevação da concentração de proteínas positivas de fase aguda, como γ -globulina, mucoproteínas e de α -1-glicoproteína-ácida (α -1-GA) tem sido observada com frequência em pacientes com PCM⁵¹⁻⁵³. Níveis séricos de γ -globulina superiores a 2.0g/dL foram mais frequentes na FA que na FC, sugerindo maior gravidade da PCM em pacientes que apresentam γ -globulinemia superior a este valor.³⁸

No presente estudo observou-se correlação inversa entre os níveis séricos de γ -globulina e os de albumina e colesterol, sugerindo que os pacientes com maiores concentrações de γ -globulina apresentavam sinais sugestivos de subnutrição, caracterizados pela reduzida albuminemia e colesterolemia, confirmando a sugestão de Marquez et al..³⁸

O presente estudo revelou que são muito complexas as alterações metabólicas observadas na PCM, devido às profundas alterações induzidas por antígenos do *P. brasiliensis*, que devem ser avaliadas e monitorizadas durante o tratamento.

5. Referências bibliográficas

1. Marcelo M, Peraçoli MT, Soares A, Montenegro R, Mendes RP, Meira DA. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. J Med Vet Mycol 1987; 25: 05-18.
2. Matute DR, McEwen JG, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, Rauscher JT. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. Mol Biol Evol 2006; 23(1):65-73.
3. Thedoro RC, Teixeira MM, Felipe MSS, Paduan KS. Genus *Paracoccidioides*: species recognition and biographic aspects. PLoS One 2012; 7(5): 1-15.
4. Coutinho ZF, Silva D, Lazera M, Petri V, Oliveira RM, Sabroza PC, Wanke B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). Cad Saúde Pública 2002; 18 (5): 1441-54.
5. Santo AH. Tendência de mortalidade relacionada à paracoccidioidomicose, Estado de São Paulo, Brasil 1985 a 2005: estudo usando causas múltiplas de mortalidade. Rev. Panam. Salud Publica 2008; 23 (5): 313-24.
6. Azevedo PZ, Moris DV, Sylvestre TF, Levorato AD, Andrade JCBM, Cavalcante RS, Carvalho LR, Mendes RP. Incidência da admissão de pacientes com paracoccidioidomicose no período de 1988-2012 em serviço universitário da região de Botucatu – São Paulo/Brasil. XLIX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; Agost 2013; Centro de Convenções Arquiteto Rubens Gil de Camilo; Campo Grande – Mato Grosso do Sul; 2013.

7. Shikanai-Yasuda MA, Telles FQ, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. Consenso da Paracoccidioidomicose. *Ver Soc Bras Med Trop* 2006; 39: 297-310.
8. Restrepo A, Gomez I, Robledo J, Patiño MM, Cano LE. Itraconazole in the treatment of paracoccidioidomycosis: a preliminar report. *Rev Infect Dis* 1987; 9:51-56.
9. Negroni R, Palmieri O, Koren F, Tiraboschi N, Galimberti RL. Oral treatment of paracoccidioidomycosis and histoplasmosis with itraconazole in humans. *Rev Infect Dis* 1987; 9 (Suppl I): 47-50.
10. Naranjo MS, TrujilloM, Munera MI, Restrepo P, Gomez I, Restrepo A. Treatment of paracoccidioidomycosis with itraconazole. *J Med Mycol* 1990; 28: 67-76.
11. Shikanai-Yasuda MA, Bernard G, Higaki Y, Del Negro GMB, Hoo S, Vaccari EH, Gryschek RCB, Segurado AAC, Barone AA, Andrade DR. Randomized trial with itraconazole, ketoconazole and sulfadiazine in paracoccidioidomycosis. *Med Mycol* 2002; 40: 411-17.
12. Queiroz-Telles F, Goldani LZ, Schlamm HT, Goodrich JM, Espinel-Ingroff, Shikanai-Yasuda MA. An open-label comparative pilot study of oral voriconazole and itraconazole for long-term treatment of paracoccidioidomycosis. *Clin Infect Dis* 2007; 45: 1462-69.
13. Barbosa W, Vasconcellos WMP. Ação da sulfametoxazol associada ao trimethoprim na terapêutica da blastomicose sul-americana. *Ver Patol Trop* 1973; 3(2): 329-39.
14. Furtado T, Marcos AR, Maia FAA. Terapêutica da blastomicose sul-americana pela associação trimetoprim-sulfametoxazol. *Folha Med.* 1975; 71 (3): 275-279.

15. Pedrosa PN, Wanke B, Coura J. Emprego da associação sulfametoxazol-trimetoprim no tratamento da paracoccidiodomicose (Blastomicose sul-americana). *Ver Soc Bras Med Trop* 1974; 8(3): 160-65.
16. Mendes RP, Meira DA, Marcondes-Machado J, Pereira PCM, Barraviera B, Souza LR, Nagem VD, Reis BAR, Mattos MCI, Morceli J. Sulfamethoxazole-trimethoprim combination (SMZ-TPM) in the treatment of paracoccidiodomycosis (PBM). XXXII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 1996; Goiânia, GO. 112.
17. Queiroz-Telles F, Ribeiro CE, Cuevas IB, Carvalho M. Terapêutica da paracoccidiodomicose (PCM) com a associação trimetoprim-sulfametoxazol (TMSZ). XXXII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Goiânia, GO; 1996.
18. Mendes RP. The gamut of clinical manifestations. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo Moreno A, Del Negro G. *Paracoccidiodomycosis*. CRC, Boca Raton. 1994. 233-258.
19. Secretaria de Estado de Saúde. Coordenadoria de controle de doenças. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Manual de vigilância e controle da paracoccidiodomicose. São Paulo: Secretaria de Estado de Saúde; 2008.
20. Bottiger LE, Svedberg CA. Normal erythrocyte sedimentation rate and age. *Br Med J* 1967; 2: 85-87.
21. Zauber NP, Zauber AG. Hematologic data for healthy very old people. *Am M Assoc* 1987; 257(16): 2181-84.
22. Meloni-Bruneri LH, Picina C, Burger E, Friedrich M, Sanazzaro TCA, Campa A. Changes in plasmatic biochemical parameters during experimental murine paracoccidiodomycosis. *J Med Vet Mycol* 1997; 35:237-41.

23. Corvino CL, Mammoni RL, Fagundes GZ, Blotta MH. Serum interleukin 18 and soluble tumor necrosis factor receptor 2 are associated with disease severity in patients with paracoccidioidomycosis. *Clin Exp Immunol* 2007; 47:90-483.
24. Aldriss HT, Naishmith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Micros Res Tech* 2000; 50:184-95.
25. Benain-Pinto H, La paracoccidioidosis como enfermedad sistêmica. *Mycopatologia* 1961; 5: 90-114.
26. Del Negro G. Localização supra-renal da blastomicose sul-americana. [Tese de Doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1961
27. Brass K. Observaciones sobre la anatomia patológica, patogénesis y evolución de La paracoccidioidomicosis. *Mycopathol Mycol Applic* 1969; 37:119-38.
28. Dillon NL. Tratamento da paracoccidioidomicose pela Anfó B. Avaliação de 119 doentes num período de 14 anos. [Tese de Doutorado] São Paulo: Universidade de São Paulo, 1972.
29. Salfelder K, Doehnert G, Doehnert HR. Paracoccidioidomycosis: anatomic studies with complete autopsies. *Virchows Arch Abt A Path Anat* 1969; 348: 51-76.
30. Araujo SA. Contribuição ao estudo anatomo-clínico da paracoccidioidomicose em Minas Gerais. Meio século de experiência – avaliação das necrópsias realizadas no período compreendido entre 1944 até 1999, no Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da FMU/FMG. [Dissertação de Mestrado] Uberaba: Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.
31. Defaveri J, Joaquim A. Acute form of paracoccidioidomycosis: analysis of thirteen autopsies with emphasis on the pulmonary involvement. *Ann Rev Biomed Sci* 2002; 111.

32. Defaveri J, Joaquim A. Chronic form of paracoccidioidomycosis: analysis of forty autopsies with emphasis on the pulmonary pathogeny. *Ann Rev Biomed Sci* 2002; 111.
33. Sant'ana LS. Biodisponibilidade de lipídeos. In: Cozzolino, SMF. Biodisponibilidade de Nutrientes. - 4a edição. Editora Manole. 2011, cap. 8, p. 227-250.
34. Daumerie CM, Woollett LA, Dietschy JM. Fatty acids regulate hepatic low density lipoprotein receptor activity through redistribution of intracellular cholesterol pools. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89(22):10797-801.
35. Spritz N, Mishkel MA. Effects of dietary fats on plasma lipids and lipoproteins: and hypothesis for the lipid-lowering effect of unsaturated fatty acids. *J Clin Invest* 1969; 48(1): 78-86.
36. Basso R. Bioquímica e metabolismo dos lipídeos. In: Sandra M. Chemin S. da Silva; Joana D'Arc Pereira Mura (Org.). Tratado de alimentação, nutrição & dietoterapia. 2ed. São Paulo: Roca Ltda, 2011, cap. 3, p. 55-74.
37. Xavier HT, Izar MC, Faria Neto JR, Assad MH, Rocha VZ, Sposito AC, et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arq Bras Cardiol* 2013; 101(4Supl.3):1-22.
38. Marquez AS, Moreira APV, Leonello PC, Nakanishi FA, Itano EN. Serum proteins and fractions, HDL-cholesterol and total IgG and IgE levels in cases of acute and chronic paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009; 42(3):245-49.
39. Hardardóttir I, Grunfeld C, Feingold KR. Effects of endotoxin on lipid metabolism. *Biochem Soc Trans* 1995; 23:1013-18.

40. Feingold KR, Soued M, Serio MK, Moser AH, Dinarello CA, Grunfeld C. Multiple cytokines stimulate hepatic lipid synthesis in vivo. *Endocrinology* 1989; 125: 267-74.
41. Rosenzweig IB, Wiebe DA, Hank JA, Albers JJ, Adolphson JL, Borden E, et al. Effects of interleukin-2 (IL-2) on human plasma lipid, lipoprotein, and C-reactive protein. *Biotherapy* 1990; 2:193-8.
42. Tucker RM, Haq Y, Denning DW, Stevens DA. Adverse effects associated with itraconazole in 189 patients on chronic therapy. *J Antimicro Chemother* 1990; 26:561-6.
43. Pauli JR, Cintra DE, Souza CT, Ropelle ER. Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência à insulina no músculo esquelético. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2009; 53(4): 399-408
44. Kavanagh BP, McCowen KC. Glycemic Control in the ICU. *N Engl J Med* 2010; 363:2540-6.
45. Pedrosa RG, Donato JrJ, Rogero MM, Rossi L, Tirapegui J. Avaliação de atletas. In: Tirapegui J, Ribeiro SML Avaliação nutricional: teoria e prática. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009, Cap. 25, p.299-314.
46. Steele M, Des Prez R. The role of pyrazinamide in tuberculosis chemotherapy. *Chest* 1988; 94: 845-50.
47. Cullen JH, Farly LJ, Fione JM. The occurrence of hyperuricemia during pyrazinamide-isoniazid therapy. *Am Ver Tuberc* 1956; 74: 289-292
48. Arioli EL, Correa PHS. Hipocalcemia. *Arq Bras Endocrinol Metab* 1999; 43(6): 467-71.

49. Rogero MM, Ribeiro SML, Tirapegui J. Avaliação do estado nutricional em proteínas. In: Tirapegui J, Ribeiro SML Avaliação nutricional: teoria e prática. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009, Cap. 10, p.85-99.
50. Correa CR, Angeleli YOA, Camargo NR, Barbosa L, Burini RC. Comparação entre a relação PCR/albumina e o índice prognóstico inflamatório nutricional (IPIN). J Bras Patol Med Lab 2002; 38(3): 183-90.
51. Amando Neto V, Del Negro G. Prova da proteína C reativa na blastomicose sul-americana. Primeiros resultados obtidos. Hospital 1958; 54: 863.
52. Mirnda JL, Machado Filho J, Monteiro E. Considerações relativas à blastomicose sul-americana. Do comportamento da proteína C reativa. Hospital 1960; 58: 251.
53. Schimitd BJ, Hoxter G. Estudo electroforético do soro em 16 casos de blastomicose sul americana. Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo 1960; 15: 64-74.

IV. Conclusões

IV) CONCLUSÕES

Os achados desta dissertação de mestrado, nas condições em que o estudo foi desenvolvido, permitem concluir o que se segue, cuja apresentação se encontra vinculada a cada artigo redigido

Artigo 1. Evaluation of hepatobiliary system in patients with paracoccidioidomycosis treated with trimethoprim-sulfamethoxazole or itraconazole.

O estudo laboratorial do sistema hepatobiliar em pacientes com PCM tratados com CMX ou com ITC, demonstrou:

1. À admissão do paciente

1.1. Elevação de todas as variáveis, com maior prevalência de ALT, F $\bar{A}$ e γ -GT;

1.2. Maior intensidade de ALT, F $\bar{A}$ e γ -GT foram observadas em pacientes com a FA que em doentes com a FC;

2. Após introdução do tratamento

2.1. Alteração de todas as variáveis, com diferentes frequências;

2.2. A elevação dos níveis séricos de BT e BC foram mais frequentes em pacientes tratados com ITC que com CMX;

2.3. Predominaram as alterações do tipo hepatocelular em pacientes tratados com CMX e do tipo colestático leve em doentes que receberam ITC;

2.4. No decurso do tratamento os pacientes que receberam CMX tiveram normalizados os níveis séricos de ALT, BC, FA e γ -GT e reduzidos os de AST e BT, enquanto os doentes que receberam ITC mantiveram elevados os níveis séricos de ALT, BT, BC, FA e γ -GT, e reduzidos apenas os de AST;

2.5. As lesões intensas foram as menos frequentes.

Artigo 2. Evolução de reações de fase aguda e de variáveis metabólicas em pacientes com paracoccidioidomicose tratados com cotrimoxazol ou itraconazol.

O estudo laboratorial de reações de fase aguda e de variáveis metabólicas, em pacientes PCM tratados com CMX ou com ITC, demonstrou:

1. À admissão do paciente

1.1. Todas as variáveis estudadas apresentaram alterações, com maior prevalência de colesterol total, albumina e γ -globulina;

1.2. Os pacientes com a FA apresentaram maior prevalência de níveis diminuídos de colesterol total, lípides totais, globulinas totais - dosadas por precipitação e albumina - determinada por eletroforese, que os doentes com a FC;

1.3. Os pacientes com a FC revelaram maior prevalência de níveis elevados de colesterol total e tendência à maior frequência de concentrações elevadas de ácido úrico.

2. Após a introdução do tratamento

2.1. Evolução das variáveis alteradas à admissão

2.1.1. As variáveis inicialmente alteradas se normalizaram ao longo do tratamento antifúngico, no entanto, os pacientes tratados com ITC apresentaram uma recuperação mais acentuada dos níveis séricos de colesterol total e γ -globulina.

2.2. Variáveis alteradas após introdução de antifúngicos

2.2.1. A incidência de níveis séricos elevados de triglicérides foi maior em pacientes com a FC;

2.2.3. Em pacientes tratados com ITC observaram-se níveis séricos elevados de cálcio e ácido úrico;

2.2.4. Os pacientes tratados com ITC revelaram níveis séricos diminuídos de cálcio e ácido úrico do que os tratados com CMX;

V. Anexo



Botucatu, 03 de Dezembro de 2012

Of. 581/2012

Ilustríssimo Senhor

Prof. Titular Rinaldo Pôncio Mendes

Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem da
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezado Dr. Rinaldo,

De ordem do Senhor Coordenador, informo que o Projeto de Pesquisa (Protocolo CEP 4438-2012) "**Avaliação da bioquímica sanguínea de pacientes com paracoccidioidomicose, tratados com cotrimoxazol ou itraconazol**", a ser conduzido por Adriele Dandara Levorato, orientada por Vossa Senhoria, com a colaboração de Daniela Vanessa Moris, Lídia Raquel de Carvalho, Priscila Zacarias de Azevedo, Ricardo de Souza Cavalcante e Tatiane Fernanda Sylvestre, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 03/12/2012.

Situação do Projeto: APROVADO. Os pesquisadores deverão apresentar ao CEP ao final da execução do Projeto o "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,


Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP