



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

Karina Andressa Tomazini

**“Efeito da estocagem de diferentes amostras clinicas de pacientes
com paracoccidioidomicose na reprodutibilidade de testes
diagnósticos. ”**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Poncio Mendes

Co-orientadora: Prof.^a. Dra. Tatiane Femanda Sylvestre

Botucatu

2022

Karina Andressa Tomazini

**“Efeito da estocagem de diferentes amostras clinicas de pacientes
com paracoccidioidomicose na reprodutibilidade de testes
diagnósticos. ”**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Poncio Mendes

Co-orientador: Prof.^a. Dra. Tatiane Fernanda Sylvestre

Botucatu

2022

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

Tomazini, Karina Andressa.

Efeito da estocagem de diferentes amostras clinicas de
pacientes com paracoccidiodomicose na reprodutibilidade de
testes diagnósticos / Karina Andressa Tomazini. - Botucatu,
2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Rinaldo Poncio Mendes
Coorientador: Tatiane Fernanda Sylvestre
Capes: 40101096

1. Paracoccidiodomicose. 2. Testes sorológicos.
3. Plasma. 4. Soro. 5. Imunodifusão.

Palavras-chave: Diagnóstico sorologico; Estocagem;
Paracoccidiodomicose; Plasma e soro.

Dedicatória

Dedico este trabalho de pesquisa aplicável à saúde humana às pessoas que contribuíram com minha formação individual e me ensinaram princípios fundamentais para enfrentar os desafios da vida.

À minha mãe Elaine Ramos e meu pai Jorge Tomazini que me concederam o dom da vida e fizeram com que isso fosse possível, à minha irmã Bruna Tomazini e minha afilhada Giulia Tomazini dos Santos, que me proporcionaram força e coragem, a meu irmão Anderson Tomazini por todo companheirismo, a minha vó Leonilda Sierra (in memoriam) que sempre acreditou em meus estudos, a minha vó Lucia Ramos que na pregação do evangelho mostrou-me de forma brilhante e inspiradora a importância dos valores e boa conduta; à meu querido orientador e amigo Dr. Rinaldo Poncio Mendes 'Tiete', por inspirar-me na carreira acadêmica.

Agradecimentos

A Deus sobre todas as coisas.

Ao professor **Dr. Rinaldo Poncio Mendes ‘Tietê’** pela generosa disposição em orientar-me neste projeto.

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

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

Aos colaboradores desse trabalho, **Me. Beatriz Ap. Pereira, Dr. Ricardo de Souza Cavalcante, Prof^a Lídia Raquel de Carvalho, Prof^a Tatiane Sylvestre** pela ajuda, paciência e apoio.

As mestras e atuais doutorandas **Beatriz Ap. Pereira e Camila Marçon**, do laboratório de micologia médica pelo apoio técnico deste trabalho.

Aos funcionários da Pós-Graduação e do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, em especial **Júlio**, pelo auxílio e atenção em todos os momentos.

A colega de especialização e também companheira de laboratório **Luiza Ikeda** pelo apoio técnico durante a realização dos experimentos.

Ao professor **Dr. Ricardo Cavalcante**, responsável pelo ambulatório de micologia clínica, que concedeu o local de realização das coletas de sangue e também todo auxílio relacionado a dados de prontuários dos nossos pacientes.

Ao responsável pelo Laboratório de Moléstias Infecciosas “Sueli Aparecida Calvi” **Rodrigo Mattos dos Santos**, pelo auxílio nos momentos em que precisei.

Aos funcionários da Unidade de Pesquisa Experimental – Unipex pelo apoio e amizade de vocês.

À **Dra. Tatiane Sylvestre**, que além de grande amiga, é uma grande professora, que contribuiu imensuravelmente em toda minha construção acadêmica.

Aos colegas **Anna Carolina Nunes** e **Danilo Souza** do laboratório da Imunologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, que realizaram especialização na mesma época que eu, e sempre estiveram comigo.

Ao **Luís Carlos Marques** pelo estímulo tão importante durante todo percurso deste trabalho.

Aos inesquecíveis **colegas do laboratório de parasitologia (LAPAS)** do Instituto de Biociências-UNESP, lugar onde os meus primeiros passos científicos começaram há 7 anos.

Aos queridos amigos de graduação **Alan Andrew** e **Bruna Oliveira**, que fizeram parte de toda minha jornada de graduação e estiveram comigo durante muitos desafios.

As minhas amigas **Giovanna Marolla** e **Daniele Oliveira**, que estiveram acompanhando de perto todo esse meu trabalho e sempre me apoiaram.

A minha família por sempre acreditar em mim e estimularem a persistir em meus sonhos, a **família Lulo Galitesi** por todo apoio nessa longa jornada, em especial a **Dra. Célia Lulo Galitesi**. Ao meu namorado **Pedro Rossi** e **toda sua família** pelo aconchego e carinho ofertados. Á todos aqueles que, direta ou indiretamente, cooperaram para o progresso deste trabalho.

Epígrafe

A persistência é o caminho do êxito.
(Charles Chaplin)

Resumo

Introdução. O teste de imunodifusão dupla em gel de ágar (IDD) é utilizado no diagnóstico sorológico, na avaliação de gravidade e no seguimento de pacientes com paracoccidiodomicose (PCM). Um banco de amostras biológicas, associado ao registro de dados clínicos, permite o desenvolvimento de pesquisas em menor tempo, principalmente de doenças com baixa incidência anual. Este estudo teve dois objetivos: 1) comparar os títulos de anticorpos séricos determinados por ocasião de sua coleta (teste) e após descongelamento (reteste), avaliando a influência da estocagem a -80°C por diferentes períodos; 2) comparar os títulos obtidos em soro e plasma e avaliar a influência da estocagem por até 6 meses em freezer a -20°C . **Métodos.** O estudo foi realizado em pacientes com PCM confirmada, utilizando-se a IDD realizada com antígeno filtrado de cultura do *P. brasiliensis* B339. No primeiro experimento, os níveis de anticorpos foram determinados em 160 amostras de soro de pacientes com a forma crônica (FC) e 20 com a forma aguda/subaguda (FA), estocadas há mais de seis meses; no reteste, o executor não foi o mesmo e o antígeno foi preparado com a mesma cepa, mas não provinha do mesmo lote utilizado no teste. No segundo experimento, foram avaliadas 81 amostras de soro e plasma com EDTA ou com heparina de 27 pacientes, para comparação das diferentes matrizes sanguíneas e avaliação do efeito da estocagem por 6 meses; neste estudo, o executor e lote do antígeno foram os mesmos. Foram consideradas discordantes as diferenças de títulos maiores que uma diluição. Utilizaram-se os testes de Kruskal-Wallis, Friedman, Marascuilo, qui-quadrado e de Goodman e o coeficiente de correlação de Spearman, admitindo-se $p \leq 0,05$ para indicar diferença significativa. **Resultados.** No primeiro experimento, a comparação dos títulos iniciais com os obtidos após descongelamento revelou medianas com diferença de uma diluição. Na discordância de títulos observou-se: a) presente em 30% das amostras da FA e 18% da FC ($p=0,13$); b) ausente em soros estocados por até 3 anos e presente em frequência crescente com o tempo de estocagem – 3 a 6 anos e ≥ 7 anos ($p=0,003$). No segundo experimento, os títulos observados em soro, plasma-EDTA e plasma-heparina não diferiram entre si e apresentavam correlação positiva. Além disso, a estocagem por até 6 meses não interferiu nas titulações em nenhuma das três matrizes sanguíneas avaliadas. **Conclusões.** A estocagem a -80°C por até seis anos pouco influenciou na dosagem de anticorpos séricos por IDD, permitindo sua utilização segura em estudos que dependam de sua avaliação. A concordância entre titulações realizadas em soro e plasma sugere que se mantenha o biorrepositório em amostras de soro, matriz que vem sendo utilizada há muitos anos. Porém, estudos sobre

estocagem por pelo menos sete anos em matrizes sanguíneas de plasma são necessárias para avaliar se os títulos são mais preservados do que se observou no soro.

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose, estocagem, diagnóstico sorológico, plasma e soro.

Abstract

Introduction. The serological evaluation performed by the double agar gel immunodiffusion test (DID) is used for diagnosis, evaluation of severity, and management of paracoccidioidomycosis (PCM) patients. A bank with biological samples, associated to clinical data, permit the development of research in shorter time, mainly when the disease presents lower annual incidence. This study was performed with two objectives: 1) to compare titration of serum antibodies determined in the day it was drawn (test) and after a long-term storage at -80°C (retest), evaluating its influence; 2) to compare the titration determined in serum and plasma and to evaluate the influence of the storage during up to six months at -20°C . **Methods.** The study was performed in patients with confirmed PCM, and DID was performed with culture filtrate from *Paracoccidioides brasiliensis* B339 as antigen. In the first experiment, the antibody levels were determined in serum samples from 160 patients with the chronic form (CF) and 20 with the acute/subacute form (AF); the storage was frozen for more than six months; the retest (Rt) was carried out by another operator; and the antigen, which did not belong to the same batch, was prepared with the same strain and method. In the second experiment, 81 samples of serum and plasma with ethylenediaminetetracetic acid (EDTA) or heparin, from 27 patients, were tested to evaluate the reproducibility of the antibody levels among the three blood matrices, as well as the effect of the storage up to six months at -20°C . This study was performed by the same operator, using antigen from a single batch number. Differences of titration higher than one dilution were considered discordant. The statistical analyses were performed by the tests of Kruskal-Wallis, Friedman, Marascuilo, chi-square and Goodman, and the correlation coefficient of Spearman; significance was set up at $p \leq 0.05$. **Results.** The first experiment showed that the test (T) and retest (Rt) presented no difference in titration; however, $\text{Rt} < \text{T}$ in the AF, and $\text{Rt} > \text{T}$ in the CF, both with one dilution of difference. The discordance of titration was (a) present in 30.0% of the samples from the AF, and in 18% of those from the CF ($p=0.13$); (b) absent in serum samples under storage up to 3 years, and present in increasing incidence in serum samples frozen for ≥ 4 years: 4 – 6 years and ≥ 7 years ($p=0.003$). The second experiment demonstrated that the titration observed in samples of serum, plasma-EDTA and plasma-heparin samples did not differ from each other, and presented direct correlation. In addition, the storage for up to 6 months did not interfere on the titration in any of the three blood matrices evaluated. **Conclusions.** The storage at -80°C for up to six years has little influence on the dosage of antibody serum levels determined by DID, permitting its safe use in studies that depend on this parameter. The concordance among the titration performed in serum, plasma-EDTA, and plasma-heparin suggest the maintenance of the biobank in the matrix serum, which has been used for many years. However, studies on storage for at least seven years in plasma matrices are mandatory to evaluate if the titration will be preserved.

Key words: paracoccidioidomycosis, serum, plasma, storage, serological diagnosis, blood matrices.

Sumário

I). Capítulo I – Introdução.....	1
1.1 Aspectos gerais da paracoccidiodomicose e de seus agentes etiológicos	1
2. Aspectos da constituição sanguínea	5
3.Objetivos.....	6
3.1. Objetivo geral.....	6
3.2. Objetivos específicos.....	6
II) Capítulo II- Casuística e Métodos.....	7
1. Casuística	7
2. Métodos	7
2.1. Desenho do estudo.....	8
2.2. Cálculo amostral	8
2.3. Experimento I.....	9
2.4. Experimento II.....	9
3. Amostras Clínicas.....	9
4. Avaliação níveis séricos e plasmáticos	10
5. Avaliação estatística dos resultados	10
6. Comitê de ética em pesquisa.....	11
III) Capítulo III- Resultados.....	11
1. Experimento I.....	11
2 Experimento II.....	17
IV) Capítulo IV- Discussão.....	21
V) Capítulo V- Conclusões.....	25
VI) Capítulo VI- Referências bibliográficas.....	26
VII) Capítulo VII- Apêndice.....	31

Capítulo I- Introdução

Na introdução serão abordados aspectos gerais da paracoccidioidomicose e de seus agentes etiológicos e da constituição sanguínea, aplicabilidade de estudos em materiais estocados e objetivos.

1. Aspectos gerais da paracoccidioidomicose e de seus agentes etiológicos

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada por fungos termodimórficos do gênero *Paracoccidioides*¹. Confinada à América Latina, é endêmica em área que se estende do México à Argentina² e, apesar de incompletos, os dados indicam maior incidência no Brasil, onde é diagnosticada com maior frequência no Estado de São Paulo. ³

Foi descrita pela primeira vez por Adolpho Lutz ⁴ em 1908, que encontrou, em lesões bucais de dois pacientes de São Paulo, 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, células gigantes, células epitelióides e fungos com exo-esporulação. Ele 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.

Essa micose foi inicialmente chamada de Blastomicose Sul-Americana (BSA) ou Doença de Lutz, Splendore e Almeida, entre outras denominações.⁵ Del Negro et al. (1954)⁶ já utilizava o termo paracoccidioidomicose, mas sua oficialização se deu em 1972, 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.⁷

Matute et al. (2006)⁸ avaliaram a variação genética do *Paracoccidioides brasiliensis* através de um estudo filogenético por genealogia *multi loci*, identificando três espécies crípticas, S1, PS2 e PS3, sugerindo a criação do complexo *Paracoccidioides brasiliensis*.

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 solo ^{9,10}, ao longo período de latência da doença ¹¹ e ao pequeno número de relatos da doença em animais domésticos, como em cães.¹² Costa et al. (1995)¹³ realizaram teste intradérmico utilizando a paracoccidioidina como antígeno em animais :domésticos e selvagens e obtiveram taxas de positividade de 64% em eqüinos, 41% em ovelhas e 40% em bovinos. Em animais selvagens, a positividade foi de 95% em quatis e 45,4% em felinos. Outro estudo demonstrou maiores taxas de positividade em animais com hábitos terrestres (83%), do que em animais arbóreos (22,5%).¹⁴ Em animais selvagens já ocorreram relatos da doença em morcegos frugívoros (*Artibeus lituratus*), preguiças (*Choloepus didactylus*) e primatas.¹⁴⁻¹⁶

Em 1986, Naiff et al.¹⁷ relataram o isolamento de *P. brasiliensis* de tatus (*Dasypus novemcinctus*) capturados em Tucuruí (PA), sugerindo tratar-se de reservatório deste fungo. Esse isolamento também foi feito de outra espécie de tatu - *Cabassous centralis*.¹⁸ A influência de fatores ambientais foi demonstrada por estudo que revelou aumento da incidência da forma aguda/subaguda após o fenômeno El Niño, por elevação do índice pluviométrico e, como consequência, da umidade do solo, favorecendo o crescimento fúngico, sua esporulação e a infecção humana.¹⁹

Os fungos do gênero *Paracoccidioides* são imperfeitos, pois ainda não foi descrita sua forma sexuada. Apresentam dimorfismo térmico: na natureza e em meio de cultura em temperatura ambiente (25°C) apresenta-se na fase filamentosa, sua forma infectante, com parede rica em β -glucana; em tecidos humanos e em cultura a 37°C, apresenta-se na fase leveduriforme, sua forma patogênica, com parede rica em α -glucana.²

Ao ser inalado, *P. brasiliensis* pode ser destruído imediatamente ou multiplicar-se, produzindo uma lesão de inoculação e se disseminando para linfonodos regionais, constituindo o complexo primário, formado pelo polo parenquimatoso, pela linfangite ascendente e pelo polo ganglionar satélite. A infecção paracoccidióidica pode progredir ou regredir, dependendo de fatores ligados ao fungo e ao hospedeiro. A progressão da infecção determina o aparecimento de sinais e sintomas, caracterizando doença ativa, na forma aguda/subaguda. A regressão pode ser acompanhada de destruição de todos os fungos, formando-se cicatriz local estéril ou da persistência de focos quiescentes, com células fúngicas viáveis²⁰. Os focos latentes podem se

reativar posteriormente, fenômeno denominado reinfecção endógena, levando à doença ativa, na forma crônica.

A PCM se apresenta sob três formas clínicas principais: forma aguda/subaguda (FA), forma crônica (FC) e forma residual (FR). A FA, também denominada 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 de órgãos ricos no sistema fagocítico mononuclear, isto é, baço fígado, linfonodos e medula óssea; as manifestações pulmonares são raras e a presença de lesões de mucosa das vias aerodigestivas superiores é pouco frequente. Os pacientes com a FA são classificados em formas moderadas e graves, com maior prevalência destas últimas. 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 pacientes com idade superior a 30 anos e que apresentam história clínica de longa duração - acima de quatro e com frequência 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 decorrentes das cicatrizes observadas após tratamento, entre as quais se destacam fibrose e enfisema pulmonares e síndrome de Addison.²¹

A PCM é observada em pacientes que tiveram ou se encontram em contato direto e prolongado com o solo, como os trabalhadores rurais³. Predomina em indivíduos do sexo masculino, com razão de masculinidade de 1,7:1,0 na forma aguda/subaguda e de 22,0:1,0 na forma crônica, e é mais prevalente na faixa etária entre 30 e 59.²²

Os doentes com PCM revelam comprometimento imune celular específico, isto é, resposta deficiente a antígenos de *Paracoccidioides* spp., mas não a de outros agentes infecciosos²³. Os pacientes apresentam comprometimento do braço 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 caracterizam a exacerbação do braço Th2.²⁴

A produção de anticorpos específicos se encontra em geral aumentada em pacientes com as formas aguda/subaguda e crônica da PCM²⁵, facilitando a opsonização de células fúngicas, e guarda relação direta com a gravidade da doença e inversa com a resposta imune celular.^{26,27} Os níveis séricos são mais elevados em pacientes com a FA do que naqueles com a FC ²².

O diagnóstico da PCM é feito pela demonstração das formas típicas da fase leveduriforme de fungos do gênero *Paracoccidioides* em materiais clínicos, tais como escarro, lavado bronco-alveolar, material de linfonodos, raspado de lesões cutâneas e mucosas e fragmentos de tecidos, porém excepcionalmente em líquido cefalorraquidiano (LCR) e raramente no sangue. Sua visualização ao microscópio óptico possibilita a identificação de formas típicas da fase leveduriforme, com fungos em brotamento por exo-esporulação, com as formas sugestivas de *mickey mouse* ou típicas de “roda de leme”.²⁸

O exame histopatológico, com coloração pela hematoxilina-eosina (H&E), revela a presença de uma resposta inflamatória granulomatosa, com células gigantes multinucleadas e demonstra o agente etiológico, que se mostra mais evidente na coloração pela prata (Gomori-Grocott). Além disso, o exame histopatológico com coloração pela H&E também permite avaliar a gravidade do quadro clínico pelo padrão da resposta granulomatosa – granulomas epitelióides compactos, com poucos fungos, nos quadros leves e granulomas frouxos, com extensas áreas de necrose e muitos fungos nos casos graves, com grande comprometimento imune celular²⁰.

A citoinclusão do escarro em parafina também é utilizada com coloração pela hematoxilina-eosina (HE), pelo Giemsa e pela prata (Gomori-Grocott), com elevada sensibilidade.²⁹ Apresenta a vantagem de se poder conservar a amostra clínica por muito tempo, e permitir a preparação de novas lâminas com colorações específicas para diagnóstico de tuberculose ou de doença neoplásica.

Os fungos do gênero *Paracoccidioides* também podem ser identificados através do seu cultivo em meios como o Mycosel (BBL) ou Mycobiotic ágar (Difco), BHI (Difco), ágar-Sabouraud ou ágar extrato de levedura.

Métodos sorológicos também são utilizados para o diagnóstico da PCM. Os primeiros, reação de fixação do complemento (RFC) e reação de precipitação em tubos (Pp) deixaram de ser utilizados pela dificuldade de sua execução, baixa especificidade e elevada frequência de soros anti-complementares [RFC], ou pela intensidade avaliada pela visualização do precipitado e porque resultados de + ou de ++ podiam ocorrer com soro fisiológico (controle). O teste ainda mais utilizado é a reação de imunodifusão dupla em gel de ágar (IDD), uma prova semi-quantitativa.³⁰ Apresenta sensibilidade de 90% e especificidade de 100%, empregando-se um preparado antigênico rico em gp43, como o obtido da cepa B339. Poucos são os casos de reação cruzada, que predomina com soros de pacientes com histoplasmose clássica. Este

método também permite avaliar a gravidade dos casos, pois títulos elevados são observados em pacientes mais graves. A IDD também é muito útil no seguimento dos pacientes com PCM, verificando-se diminuição gradual dos títulos de anticorpos durante a terapia antifúngica, até sua negatificação. A contra-imunoeletroforese (CIE), outro método sorológico baseado em precipitação em gel, utiliza os mesmos preparados antigênicos que a IDD e também é semi-quantitativo. A IDD apresenta menor sensibilidade e títulos um pouco inferiores que a CIE, porém a mesma especificidade. A reação de imunofluorescência indireta^{31,32}, introduzida a seguir, apresentava boa repetibilidade, mas exigia um microscópio de imunofluorescência para sua realização e utilização dos fungos em fase adequada, mas sua titulação não se correlacionava com a evolução clínica favorável. A detecção de anticorpos específicos também foi feita pelo método de lise mediada por complemento que, no entanto, não chegou a ser introduzido na rotina laboratorial³³. Os métodos imunoenzimáticos também foram introduzidos no diagnóstico da PCM, apresentam maior sensibilidade, porém menor especificidade que a IDD^{22,34}, motivo pelo qual têm sido utilizados como teste de triagem em laboratórios com grande número de avaliações a serem realizadas em que os soros reagentes são submetidos à IDD. O ensaio imunoenzimático é indicado para diagnóstico de comprometimento paracoccidióidico de sistema nervoso central, por sua positividade no líquido céfalo-raquidiano³⁵ e em casos de recaída, em que sua sensibilidade supera a da IDD (Sylvestre et al.,2014)³⁶. O *immunoblotting* (IB) é muito sensível e específico, porém de execução mais complexa, sendo em geral reservado para casos específicos, em laboratórios de referência³⁷.

Soros de pacientes infectados por *P. lutzii* em geral não reagem com antígenos isolados de cepas de *P. brasiliensis*, como o B339, sendo uma causa de resultados falso-negativos na Região Centro-Oeste do Brasil³⁸. No entanto, observou-se positividade à IDD quando antígenos isolados de *P. lutzii* foram utilizados. Os métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), têm sido utilizados no diagnóstico da PCM, embora ainda não tenham sido incorporados à rotina dos laboratórios clínicos.³⁹ Estudos comparando sua acurácia com a da IDD e a dos métodos imunoenzimáticos são necessários para que se estabeleça sua indicação na prática clínica. É importante registrar que todos os métodos apresentados tiveram o soro como matriz sanguínea.

O tratamento da PCM contempla duas fases – tratamento inicial ou de ataque e tratamento complementar. O tratamento inicial deve ser mantido até que se observe cura clínica e normalização da velocidade de hemossedimentação. O tratamento de consolidação deve ser

feito até um ano após a negatificação dos testes sorológicos por IDD, que caracteriza a cura sorológica³⁶. Diversos fármacos demonstraram ser eficazes no tratamento da PCM, incluindo os derivados sulfamídicos, a associação sulfametoxazol-trimetoprim, também denominada cotrimoxazol (CMX), anfotericina B (AmB) e derivados azólicos, tais como cetoconazol (CTC) e itraconazol (ITC). Atualmente, os fármacos mais utilizados no tratamento são o itraconazol e o cotrimoxazol⁴⁰⁻⁴².

2. Aspectos da constituição sanguínea

O sangue é um tecido líquido complexo, com elevada viscosidade e grande teor de água, composto por elementos celulares e plasma. Eritrócitos, plaquetas e leucócitos constituem os elementos celulares, enquanto água, proteínas, eletrólitos, lipídios, glicose e hormônios compõem o plasma.⁴³

Os produtos extraídos do sangue, considerados derivados sanguíneos, são fundamentais pelo apoio ao diagnóstico e à avaliação de diferentes estágios da cadeia de saúde - prevenção, diagnóstico, prognóstico e seguimento terapêutico.⁴⁴

O soro e o plasma sanguíneo são matrizes adquiridas por punção venosa e, a seguir, submetidos a diferentes processos bioquímicos. Para obtenção do soro, o sangue deve ser centrifugado por tempo e em rotação padronizados em função da centrifuga que será utilizada. Esse procedimento leva à fragmentação das proteínas, com formação de aminoácidos, que têm menor peso molecular⁴³

O plasma também é adquirido pelo processo de coleta venosa e centrifugação, porém o sangue é colocado em tubos contendo biomoléculas anticoagulantes, tais como heparina, ácido etilenodiaminotetracético – EDTA e citrato de sódio. Assim, a amostra de plasma em geral contém fatores de coagulação, proteínas preservadas, hormônios e eletrólitos, entre outras moléculas.^{43,44}

A utilização da matriz inadequada pode prejudicar a determinação da substância investigada, motivo pelo qual ela deve ser bem caracterizada.

As diferenças mais relevantes entre soro e plasma, caracterizadas por metabolômica, se relacionam à desproteinização do soro, causada pela coagulação, com formação de aminoácidos, que são constituintes de menor peso molecular e provocam maior concentração de metabólitos nessa matriz, quando comparada ao plasma⁴⁵. No entanto, o plasma se caracteriza por revelar maior reprodutibilidade que o soro, em análise de analitos ⁴⁶, como demonstram os coeficientes de correlação médios (r) de 122 metabólitos analisados em soro e plasma no estudo de Yu Z et al.(2011)⁴⁵, sendo 0,83 e 0,80 para plasma e soro, respectivamente.⁴⁴

Salvo melhor juízo, não há estudos que tenham avaliado qual seria a melhor matriz sanguínea para o teste IDD ou para melhor preservação de anticorpos, de pacientes com PCM, para a realização da reação de imunodifusão dupla em gel de ágar e para sua reprodutibilidade após estocagem e descongelamento.

3. Estudos em materiais estocados

A pesquisa clínica pede um grande espectro de domínios que, com frequência, dependem da participação de especialistas de áreas muito diferentes. Determinados estudos só podem ser realizados durante o contato com o paciente, porém outros podem ser desenvolvidos posteriormente, desde que se conte com bancos de amostras biológicas adequadamente armazenadas, principalmente quando também se dispõe de dados clínicos bem organizados, constituindo o biobanco [Resolução CNS nº 441/2011; Portaria nº 2201/2011 do Ministério da Saúde].

Essas condições permitem que sejam realizados tanto estudos transversais quanto longitudinais, reduzindo-se o tempo necessário para compor a amostra calculada e os custos da pesquisa. Além disso, essas amostras biológicas estocadas podem ser submetidas a novos testes, contribuindo para com o conhecimento dos mais diversos aspectos da doença em estudo.^{47,48}

No entanto, é de fundamental importância que a coleta e o armazenamento das amostras sejam adequados, de forma a preservar sua qualidade para utilização posterior. Além disso, a coleta dos dados clínicos deve focalizar aqueles que são relevantes, de forma a reduzir o tempo e os custos para sua execução. A coleta de muitos dados pode cansar os pacientes e sobrecarregar o grupo de pesquisa, comprometendo a qualidade do estudo. Assim, em estudos prospectivos, deve-se preservar amostras biológicas durante muitos anos, tomando-se o cuidado

de reservar material biológico para avaliações periódicas, que possam confirmar sua estabilidade ao longo do tempo. O armazenamento desse material em alíquotas permite a avaliação de sua estabilidade, processando-se cada uma delas uma única vez.^{47,48}

O estudo de doenças pouco frequentes, como a PCM, se beneficia muito do armazenamento de amostras biológicas.

4. Objetivos

O presente estudo teve como objetivos geral e específicos os que se seguem.

4.1. Objetivo geral

O objetivo geral foi analisar o impacto do processo de congelamento-descongelamento sobre os níveis de anticorpos circulantes, em pacientes com paracoccidiodomicose.

4.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram os seguintes:

- A. Avaliar o impacto do processo de congelamento-descongelamento sobre os títulos de anticorpos séricos determinados por IDD
 - a) sobre a titulação de soros estocados a -80° C;
 - b) sobre a titulação de soro e plasma estocados a -20°C;
 - c) em função do tempo de congelamento;
 - d) em função do anticoagulante utilizado;
- B. Avaliar o impacto da matriz sanguínea utilizada – soro, plasma obtido com o uso de EDTA (plasma-EDTA) ou de heparina (plasma-heparina).sobre a titulação de anticorpos.

Capítulo II- Casuística e Métodos

1. Casuística

Foram estudadas 207 amostras de sangue de pacientes com PCM em atividade, atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp (HCFMB), hospital universitário de nível terciário, com 490 leitos distribuídos entre todas as especialidades, que recebe pacientes de 68 municípios da Diretoria Regional de Saúde VI, Estado de São Paulo (Brasil), atendidos em 51 Serviços Médicos. O Serviço de Infectologia conta com o Serviço de Ambulatórios Especiais, que oferece atendimento multidisciplinar a infectados pelo vírus da imunodeficiência humana e com outros seis ambulatórios, entre eles o Ambulatório de Micologia Clínica, onde são atendidos os pacientes com PCM.

Foram incluídos no estudo casos confirmados pela identificação do agente etiológico em materiais clínicos e casos prováveis, caracterizados pela demonstração de anticorpos séricos específicos, determinados pela reação de imunodifusão dupla em gel de agar (IDD), em pacientes sem identificação do agente etiológico. Pacientes com comorbidade de origem infecciosa, inflamatória não infecciosa ou neoplásica, exceto tabagismo e etilismo, foram excluídos do estudo.

A forma clínica desses pacientes foi classificada segundo as especificações de Mendes (1994)²¹. De cada paciente, apenas uma amostra foi avaliada no presente estudo.

2. Métodos

2.1 - Desenho do estudo

O estudo foi constituído por dois experimentos – o primeiro, para avaliação do efeito da estocagem a -80°C sobre os níveis séricos de anticorpos específicos e o segundo, para avaliação do efeito da matriz sanguínea nessas determinações e da estocagem a -20°C (Figura 1).

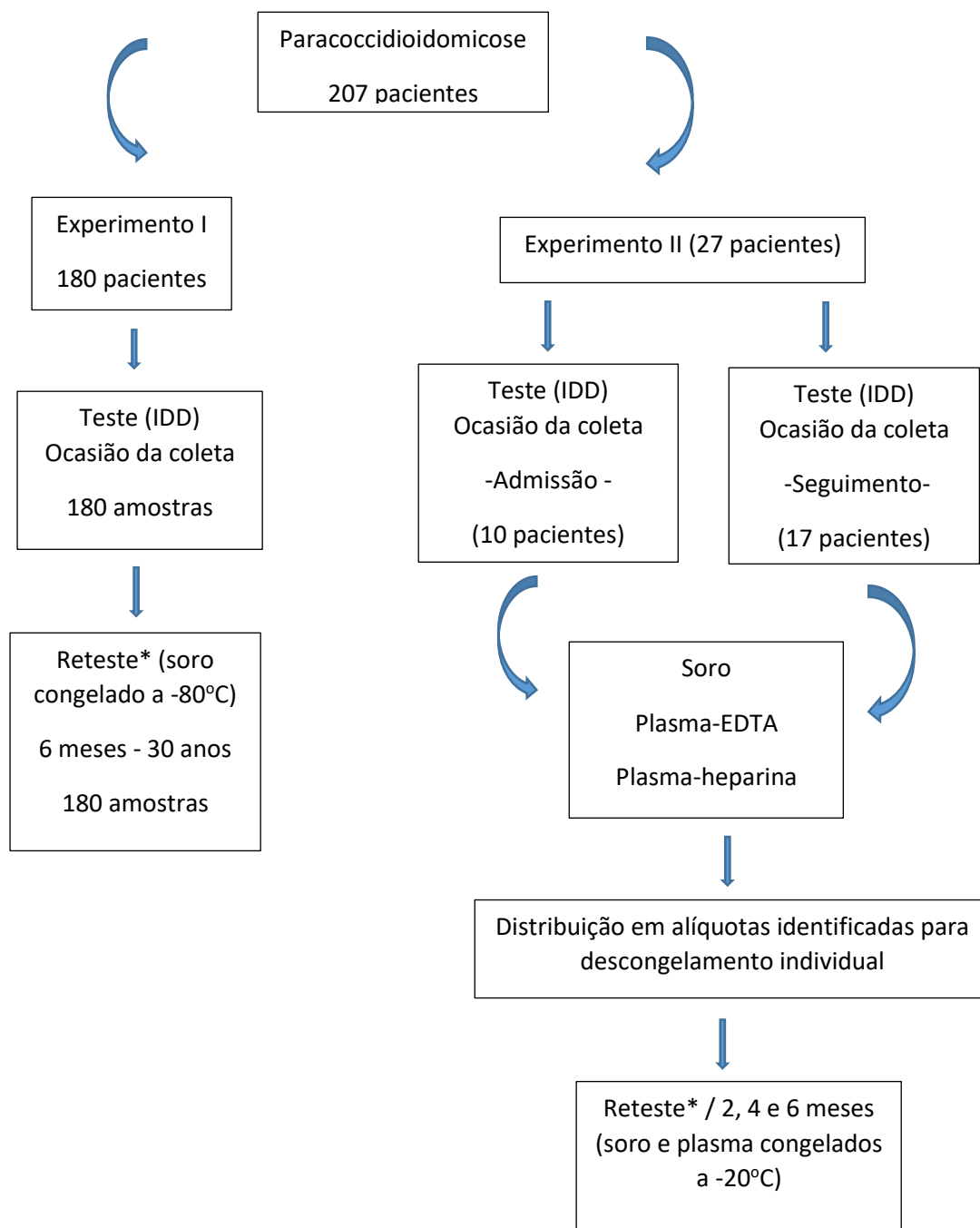


Figura 1. Desenho da pesquisa para avaliação da titulação de anticorpos anti-*Paracoccidioides brasiliensis* pela reação de imunodifusão dupla em gel de ágar em amostras de soro e de plasma obtido com o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ou heparina. Influência do congelamento de diferentes matrizes sanguíneas, divididas em alíquotas para descongelamento individual correspondente ao tempo de estocagem. *Reteste realizado nas mesmas amostras utilizadas no teste.

2.2 – Cálculo do tamanho amostral

A estimativa do tamanho amostral para o experimento I foi feita considerando-se a utilização do teste *t* para amostras pareadas, antes e após estocagem, o erro tipo I igual a 0,05 e uma diferença de pelo menos duas diluições entre as titulações, segundo as especificações de Jekel et al. (2005).⁴⁹ O número de pacientes estudados deverá ser igual a pelo menos nove. O tamanho amostral para o experimento II foi feito utilizando-se os mesmos critérios e, como consequência, também pelo menos nove pacientes teriam que ser estudados.

2.3 - Experimento I

Foram avaliados 180 pacientes com PCM em atividade, 20 dos quais com a forma aguda/subaguda (FA) e 160 com forma crônica (FC).

As amostras de sangue desses pacientes foram colhidas à admissão e os níveis séricos específicos foram determinados por IDD. A seguir, os soros foram congelados e mantidos em freezer a -80°C, por tempos variáveis entre seis meses e 30 anos, no biorrepositório da Unidade de Pesquisa Experimental – Unipex, da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp. O armazenamento foi feito em pequenas alíquotas de soro que, após descongelamento e utilização, foram desprezadas. A escolha dos soros desses pacientes no biorrepositório foi feita com base nas alíquotas com maior volume de soro, independentemente do tempo de armazenamento.

O experimento I constou da comparação dos níveis séricos de anticorpos específicos determinados à admissão, identificados como **teste** com os obtidos após estocagem e descongelamento, denominados **reteste**.

2.4 - Experimento II

Foram estudados 27 pacientes com PCM em atividade, 22,2% dos quais com a FA e 71,8% com a FC; 10 pacientes foram avaliados à admissão no Serviço e 17 durante o seguimento do tratamento instituído. Este experimento comparou os níveis séricos e plasmáticos de anticorpos específicos determinados por IDD e o efeito da estocagem a -20°C por dois (estágio 1 – E₁), quatro (estágio 2 – E₂) e seis meses (Estágio 3 – E₃). Os níveis circulantes de anticorpos específicos determinados no momento da inclusão do estudo foram identificados como estágio 0 (E₀).

3. Amostras clínicas

As amostras clínicas utilizadas no presente estudo foram soro e plasma obtido com ácido etilenodiaminatetracético (EDTA) ou com heparina. As amostras de soro foram coletadas em tubo com ativador de coagulo, sílica e gel separador (5-ml vacuplast) e as de plasma em tubos com EDTA (4-ml vacuplast) ou com heparina (4-ml vacuplast). Todas as amostras foram divididas em alíquotas e, a seguir, estocadas a -20°C. Após utilização, foram desprezadas, de forma que apenas uma titulação foi feita na amostra descongelada.

4. Avaliação níveis séricos e plasmáticos

Os níveis séricos e plasmáticos de anticorpos anti-*P. brasiliensis* foram determinados pela reação de imunodifusão dupla em gel de ágar (IDD), segundo as especificações de Restrepo², no Laboratório de Doenças Tropicais – Micologia, da Unipex (FMB-Unesp).

O antígeno utilizado foi o filtrado de cultura da fase leveduriforme da cepa B339 de *P. brasiliensis*. No experimento I, o antígeno utilizado no teste foi preparado no Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Serviço da Profa. Maria José Soares Mendes Giannini e o usado no reteste foi isolado da mesma cepa e produzido segundo as mesmas especificações, porém no Laboratório de Doenças Tropicais – Micologia, da Unipex (FMB-Unesp). Portanto, no experimento I as amostras do antígeno e o executor do teste não foram os mesmos. No experimento II, no entanto, as amostras do antígeno e o executor dos testes foram os mesmos. Em cada titulação, um soro reagente e um não reagente foram utilizados como controle da reação.

As amostras de soro e plasma foram testadas inicialmente não diluídos e, a seguir, diluídos a partir de 1/2, com razão igual a 2,0. Diferenças de títulos séricos entre teste e reteste, assim como diferenças entre títulos observados em diferentes matrizes sanguíneas, foram consideradas significativas quando superiores a uma diluição. Assim, os títulos foram classificados em concordantes, quando idênticos ou diferiam em uma diluição e discordantes, quando apresentavam diferença de pelo menos duas diluições. Os títulos também foram classificados segundo intensidade – leves de 1 a 8, moderados quando iguais a 16 ou 32 e intensos quando acima de 32.

5. Avaliação estatística dos resultados

Para a análise estatística dos resultados, os títulos de anticorpos anti-*P. brasiliensis*, caracterizados como o denominador da diluição, foram transformadas em escores (Quadro 1).

Quadro 1. Conversão dos resultados dos níveis de anticorpos determinados como não-reagentes e reagentes, e estes segundo a diluição, em escores.

Título	Escore	Título	Escore	Título	Escore
Não reagente	0	8	4	128	8
Reagente não diluído (1)	1	16	5	256	9
2	2	32	6	512	10
4	3	64	7	1024	11

Os resultados foram apresentados como medianas, 1º e 3º quartis. A comparação de variáveis contínuas dependentes foi feita pelo teste de Wilcoxon ou pelo teste de Friedman, e as independentes pelo teste de Kruskal-Wallis. As variáveis categóricas foram comparadas pelo teste do qui-quadrado ou de Fisher ou pela binomial, pelo teste de Goodman ou pelo procedimento de Marascuilo. As correlações foram avaliadas segundo as especificações de Spearman. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Statistical Analyses System- SAS, versão 9.2.

6. Comitê de Ética em Pesquisa

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu (Unesp) - parecer de avaliação número 51849721.7.0000.5411.

Capítulo III- Resultados

Os resultados dos experimentos I e II, que constituem o presente estudo, serão apresentados separadamente.

1. Experimento I

A distribuição dos títulos de anticorpos séricos específicos determinados à admissão (teste) não variou em pacientes com a FA e foi praticamente constante naqueles com a FC. Achado semelhante foi observado após estocagem (reteste), como revela a tabela 1.

Tabela 1 – Títulos de anticorpos séricos específicos, determinados pela reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, em amostras de 20 pacientes com a forma aguda/subaguda e 160 com a forma crônica da paracoccidiodomicose. Distribuição dos títulos determinados no momento da coleta (teste) e após pelo menos seis meses de estocagem a -80°C (reteste), segundo forma clínica. Comparação de frequências pelo teste do qui-quadrado, seguido pelo teste de Goodman.

Resultado	Forma aguda		Forma crônica	
	TESTE	RETESTE	TESTE	RETESTE
Títulos	Número (%)		Número (%)	
Não reagente	- (0,0)	4 (20,0)	05 (3,1)A	30 (18,8)A
Reagente				
Não diluído (1)	- (0,0)	- (0,0)	17 (10,6)A	9 (5,6)AB
2	1 (5,0)	- (0,0)	14 (08,8)A	2 (1,3)B
4	2 (10,0)	4 (20,0)	24 (15,0)A	2 (1,3)B
8	- (0,0)	- (0,0)	16 (10,0)A	13 (8,10)AB
16	2 (10,0)	1 (5,0)	22 (13,8)A	19 (11,9)AB
32	1 (05,0)	- (0,0)	20 (12,5)A	18 (11,3)AB
64	2 (10,0)	1 (5,0)	22 (13,8)A	8 (5,0)AB
128	3 (15,0)	3 (15,0)	14 (8,8)A	23 (14,4)AB
256	4 (20,0)	- (0,0)	04 (2,5)A	11 (6,9)AB
512	5 (25,0)	3 (15,0)	- (0,0)B	17 (10,6)AB
1024	- (0,0)	4 (20,0)	02 (1,3)A	8 (5,0)AB
Total	20 (100,0)		160 (100,0)	

Letras maiúsculas comparam frequências na mesma coluna. Frequências não seguidas de letras ou seguidas da mesma letra não diferem entre si ($p>0,05$), enquanto as seguidas de letras diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa ($p\leq 0,05$).

A comparação de intensidade das titulações entre teste e reteste revelou diferença de apenas um título, com diminuição após estocagem na FA e aumento na FC. A avaliação de todas as amostras, em seu conjunto, revelou não haver diferença entre teste e reteste (Tabela 2).

Tabela 2 - Títulos de anticorpos séricos específicos, determinados pela reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, em amostras de 20 pacientes com a forma aguda/subaguda e 160 com a forma crônica da paracoccidiodomicose. Comparação dos títulos determinados no momento da coleta (teste) e após pelo menos seis meses de estocagem a -80°C (reteste), apresentados como mediana, 1º e 3º quartis. Teste de Wilcoxon.

Forma clínica	Pacientes (número)	Teste (Título)	Reteste (Título)	<i>p</i> value
Aguda/subaguda	20	128 (32; 512)	64 (4; 512)	0,01
Crônica	160	16 (4; 64)	32 (2; 128)	<0,001
Total	180	16 (4; 64)	8 (2; 64)	0,14

A distribuição dos soros segundo a titulação de anticorpos específicos nas amostras de teste revelou maior prevalência de níveis intensos na FA e que, na FC, a frequência de níveis leves era maior que a de intensos, cabendo aos moderados uma posição intermediária. Essa distribuição se altera na titulação após estocagem, em que as prevalências apresentam apenas uma tendência de serem diferentes, tanto na FA quanto na FC (tabela 3).

Tabela 3 - Distribuição de 20 pacientes com a forma aguda/subaguda e 160 com a forma crônica da paracoccidiodomicose segundo intensidade dos níveis séricos de anticorpos específicos, determinados pela reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, forma clínica e momento de avaliação sorológica – na coleta (teste) e após pelo menos seis meses de estocagem a -80°C (reteste). Comparação pelo procedimento de Marascuilo.

Avaliação	Forma clínica	Leve 79	Moderado 45	Intenso 56	Valor de <i>p</i>	Interpretação
Teste	Aguda/subaguda n=20 (100)	03 (15,0)	03 (15,0)	14 (70,0)	< 0,001	I > (L=M)
	Crônica n=160 (100)	76 (47,5)	42 (26,25)	42 (26,25)		L > I; M intermediário
Reteste	Aguda/subaguda (n=20) (100)	8 (40,0)	1 (5,0)	11 (55,0)	0,05<p<0,10 (tendência)	...
	Crônica (100)	56 (35,0)	37 (23,1)	67 (41,9)		...

L – Leve: títulos até 8; M – Moderado: títulos iguais a 16 e 32; I – Intenso: títulos ≥ 64

() – porcentagem ... ausência de dado

A comparação das formas clínicas revelou que não há diferenças segundo título mais elevado – teste ou reteste e prevalência de discordância baseada em diferença de pelo menos duas diluições (tabela 4 e figura 2). A análise de discordância com base em pelo menos três diluições revelou tendência a ser maior na FA que na FC ($p=0,07$).

Tabela 4– Distribuição de 20 pacientes com a forma aguda/subaguda e 160 com a forma crônica da paracoccidioidomicose segundo forma clínica e comparação dos títulos de anticorpos séricos determinadas pela reação de imunodifusão dupla em gel de agar, no momento da coleta (teste – T) e após pelo menos seis meses de estocagem a -80°C (reteste-Rt). Comparações feitas pelo teste do qui-quadrado ou pela prova exata de Fisher.

	FA [n=20]			FC [n=160]		
	T=Rt	T>Rt	Rt>T	T=Rt	T>Rt	Rt>T
Títulos iguais	2	-	-	30	-	-
Títulos diferentes						
Uma diluição		5	4		21	50
Duas diluições		-	4		15	19
Três diluições		1	-		4	-
Quatro diluições		1	-		8	1
Cinco diluições		1	-		5	-
Seis diluições		1	-		-	-
Sete diluições		-	-		3	-
Oito diluições		1	-		4	-
Total	2 (10,0)	10 (50,0)	8 (40,0)	30 (18,75)	60 (37,50)	70 (43,75)

FA – Forma aguda/subaguda

FC – Forma crônica

Comparação entre formas clínicas

- em função do título mais elevado (T ou Rt): teste do qui quadrado
 $p > 0,05$ FA=FC
- em função da prevalência de discordâncias (≥ 2 diluições)
FA=45% FC=37% $p = 0,48$ FA=FC
- em função da prevalência de discordâncias (≥ 3 diluições)
FA=25,0% FC=15,6 % $p=0,07$ FA=FC

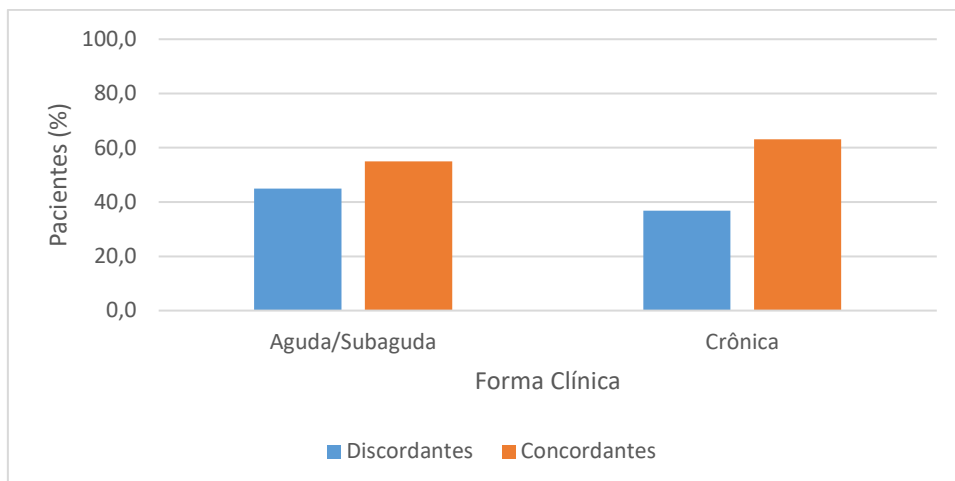


Figura 2 - Percentual de concordância* dos níveis séricos de anti-corpos anti-*Paracoccidioides brasiliensis* determinados pela reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, em 180 pacientes com paracoccidioidomicose. Comparação da prevalência de concordância segundo forma clínica. Teste do qui-quadrado ($p=0,13$). *Considerou-se concordância entre os títulos de teste e reteste a diferença de no máximo uma diluição.

Por fim, a avaliação da prevalência de concordância segundo tempo de estocagem revelou que ela diminui em soros estocados por mais de seis anos (Figura 3)

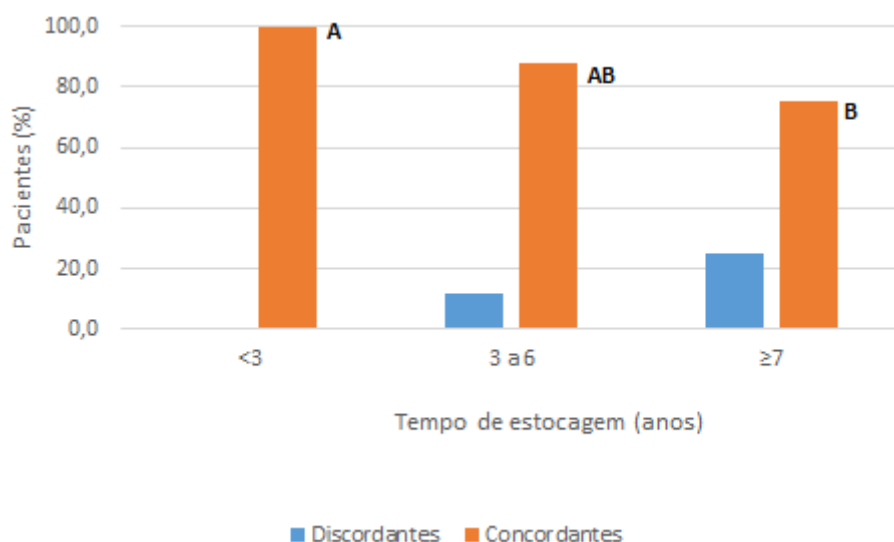


Figura 3 - Avaliação de 180 pacientes com paracoccidioidomicose segundo o percentual de concordância* dos níveis séricos de anti-corpos anti-*P. brasiliensis* determinados pela reação de imunodifusão dupla em gel de ágar e tempo de estocagem. Teste de Goodman ($p=0,003$). *Considerou-se concordância entre os títulos de teste e reteste a diferença de no máximo uma

diluição. Frequências seguidas da mesma letra não diferem entre si ($p>0,05$), enquanto as seguidas de letras diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa ($p\leq 0,05$).

A análise dos 45 soros estocados por três a seis anos revelou que 14 (31,1%) apresentavam a mesma titulação, 18 (40,0%) diferiam em uma diluição, 12 (26,7%) em duas e apenas 1 (2,2%) em três diluições. Portanto, nessa amostra houve concordância em 32 (71,1%) e discordância em 13 (28,9%) dos soros. A distribuição dos tempos, em anos, decorridos entre teste e reteste, apresentados como mediana, 1º e 3º quartis não foi diferente ($p=0,85$) entre os grupos em que as titulações foram iguais [4,4 (3,5; 5,8)], diferentes em uma diluição [4,9 (3,7; 5,5)], ou em duas diluições [4,5 (3,4; 5,5)].

Finalmente, a avaliação qualitativa revelou que após 6 anos os soros de 20,0% dos casos com a FA passaram de reagentes para não reagentes ($p=0,03$), incidência que foi igual a 16,3% dos casos com a FC ($p<0.001$). Essas taxas de conversão não diferiram segundo forma clínica (FA=FC; $p=0,14$).

1.2. Experimento II

Não se observou diferença entre os níveis séricos de anticorpos anti-*P. brasiliensis* determinados em diferentes matrizes sanguíneas, tanto nas avaliações pré- quanto pós-tratamento, assim como após dois a seis meses de estocagem a -20°C (tabela 5).

Tabela 5 - Títulos séricos e plasmáticos de anticorpos anti-*Paracoccidioides brasiliensis*, determinados pela reação de imunodifusão dupla em gel de ágar em amostras coletadas de 27 pacientes com paracoccidioidomicose, em tubos específicos. Comparação dos títulos observados nas diferentes matrizes sanguíneas, em 10 pacientes virgens de tratamento - VT e em 17 sob tratamento antifúngico (T), no momento da coleta e após diferentes períodos de estocagem a -20°C: no momento da coleta, com material a fresco (estágio E₀); após dois meses de estocagem (estágio E₁); após 4 meses de estocagem (estágio E₂); após seis meses de estocagem (estágio E₃). Dados apresentados como mediana, 1º e 3º quartis. Teste de Kruskal-Wallis.

Estágio E₀	VT (n=10)	T (n=17)	Estágio E₁	VT (n=10)	T (n=17)
Silica-soro	4 (NR;64)	2 (NR;4)		4 (2;128)	2 (1;4)
EDTA-plasma	8 (ND;128)	2 (ND;4)		16 (2;128)	2 (1;4)
Heparina-plasma	8 (4;128)	2 (ND;2)		16 (2; 256)	2 (1;4)
P	0,75	0,97		0,93	0,98
Estágio E₂	VT (n=10)	T (n=17)	Estágio E₃	VT (n=10)	T (n=17)
Silica-soro	16 (4;128)	4 (1;8)		16 (2; 128)	2 (1; 4)
EDTA-plasma	8 (0;32)	2 (1;8)		32 (2; 128)	2 (1; 4)
Heparina-plasma	16 (0;64)	2 (1;8)		32 (1; 128)	2 (1; 4)
P	0,88	0,77		0,95	0,98

A titulações não se alteraram em função do tempo de estocagem a -20°C, tanto em amostras avaliadas à admissão quanto após introdução de tratamento antifúngico, nas diferentes matrizes sanguíneas utilizadas (Tabela 6).

Tabela 6 – Títulos de anticorpos anti-*Paracoccidioides brasiliensis*, determinados pela reação de imunodifusão dupla em gel de ágar em amostras de soro obtido com sílica, plasma obtido com EDTA e com heparina, coletadas de 27 pacientes com paracoccidioidomicose – 10 virgens de tratamento (VT) e 17 em tratamento antifúngico (T). Análise da variação dos títulos em função do tempo de estocagem a -20°C. Dados apresentados como mediana, 1^o e 3^o quartis. Teste de Friedman.

	Soro (sílica)	VT n=10	T n=17	Plasma (EDTA)	VT n=10	T n=17	Plasma (heparina)	VT n=10	T n=17
E ₀		4 (0; 64)	2 (0; 4)		8 (1; 128)	2 (1; 4)		8 (4; 128)	2 (1; 2)
E ₁		4 (2; 128)	2 (1; 4)		16 (2; 128)	2 (1; 4)		16 (2; 256)	2 (1; 4)
E ₂		16 (4; 128)	4 (1; 8)		8 (0; 32)	2 (1; 8)		16 (0; 64)	2 (1; 8)
E ₃		16 (2; 128)	2 (1; 4)		32 (2; 128)	2 (1; 4)		32 (1; 128)	2 (1; 4)
p		0,94	0,51		0,59	0,92		0,48	0,32
Pré-estocagem: E ₀ Pós-estocagem: E ₁ – 2 meses; E ₂ – 4 meses; E ₃ – 6 meses									

As titulações determinadas nas três matrizes sanguíneas utilizadas revelaram correlação direta em todos os estágios avaliados – no momento da coleta (E₀) e após dois (E₁), quatro (E₂) e seis meses (E₃) de estocagem a -20°C (Quadro 2).

Quadro 2- Avaliação da correlação observada entre os níveis séricos e plasmáticos de anticorpos anti-*Paracoccidioides brasiliensis* determinados pela reação de imunodifusão dupla em gel de agar em 27 pacientes com paracoccidioidomicose, em diferentes tempos de estocagem a -20°C. Coeficiente de correlação de Spearman ($p < 0,0001$) para cada uma das análises).

Estágio E ₀	Plasma EDTA	Plasma Heparina	Estágio E ₁	Plasma EDTA	Plasma Heparina
Soro	0,775	0,747	Soro	0,925	0,923
Plasma EDTA		0,960	Plasma EDTA		0,961
Estágio E ₂	Plasma EDTA	Plasma Heparina	Estágio E ₃	Plasma EDTA	Plasma Heparina
Soro	0,913	0,933	Soro	0,775	0,747
Plasma EDTA		0,967	Plasma EDTA		0,960

Pré-estocagem: E₀ Pós-estocagem: E₁ – 2 meses; E₂ – 4 meses; E₃ – 6 meses
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

Capítulo IV- Discussão .

O armazenamento do soro de pacientes com PCM em tratamento tem como objetivo básico a repetição da determinação dos níveis séricos caso seu resultado não seja compatível com a avaliação clínica e, ou, de outros exames complementares – bioquímicos, hematológicos ou radiológicos. Como essas reavaliações são inicialmente mensais, a seguir trimestrais e, por fim, semestrais (Mendes et al., 1994; Mendes et al., 2017)^{21,34}, a reprodutibilidade das titulações precisaria ser mantida por até seis meses. Os resultados do presente estudo demonstram total concordância das titulações, em todos os casos, por até três anos e, na quase totalidade deles, por até seis anos, permitindo a utilização segura desse procedimento.

A outra indicação da utilização de soros armazenados em bancos de amostras biológicas é o estudo de novos aspectos da PCM, como por exemplo critérios de cura ou de recidiva, ou mesmo de recaída, esta última observada em 5% dos casos (Sylvestre et al., 2018)⁵⁰. Esses estudos exigem a avaliação de uma casuística em geral bem maior que o número de casos novos admitidos a cada ano que, neste Serviço, é igual a 15 (Azevedo et al., 2015)⁵¹. Assim, a manutenção de um banco de dados clínicos, da admissão à alta, associada ao armazenamento de amostras de soro congeladas a -80°C, permitiria a avaliação de novos parâmetros em prazo

mais curto e, como consequência, a um custo operacional menor, cujos resultados podem ser aplicados aos pacientes em seguimento. Como a avaliação sorológica evolutiva é um dos principais critérios de cura da PCM, seus resultados são com frequência utilizados nesses estudos (Mendes et al., 1994; Benard et al., 1996; Mendes et al., 2017)^{37,24,34}. Portanto, é de grande importância a avaliação do efeito do armazenamento a -80°C sobre os níveis séricos de anticorpos específicos anti-*P. brasiliensis*, objetivo do presente estudo.

Poucos são os estudos que abordaram o efeito da estocagem de soro na reprodutibilidade das titulações de anticorpos ou antígenos.

A detecção de galactomanana no soro de pacientes com risco de desenvolver aspergilose invasiva (AI) tem sido avaliada utilizando-se o ensaio imunoenzimático *Aspergillus* imunoenzimático galactomanano (GM EIA)^{52,53}. Um destes estudos . avaliou amostras de soro e de plasma-EDTA estocados a 4°C até serem titulados, em cerca de 72 horas, e após armazenamento por cerca de um ano, à mesma temperatura⁵³. O efeito do ciclo congelamento-descongelamento sobre a reprodutibilidade dos resultados foi avaliado em amostras de plasma estocadas a -80°C por uma semana. O reteste demonstrou um declínio da positividade em 17% das amostras de **soro**, com predomínio nas provenientes de casos prováveis ou possíveis de AI, cujos resultados foram considerados falso-positivos. Apenas duas amostras testaram negativas na avaliação inicial (teste) e positivas no reteste. A correlação inversa entre concentração de albumina e ensaio imunoenzimático poderia explicar este achado. O estudo das amostras de **plasma** revelou que não houve influência na positividade após estocagem a 4°C, nem após congelamento a -80°C.⁵³ Os autores chamaram a atenção para a estabilidade das amostras de plasma, provavelmente devido à inibição de enzimas presentes no, sangue, causadas pelo EDTA⁵³.

Em estudo recente, foram comparadas as titulações de antígenos de espécies de *Cryptococcus* determinadas pelo método semi-quantitativo do ensaio de fluxo lateral (*lateral flow assay* – LFA), utilizando soros estocados, cujos níveis séricos tinham sido avaliados no momento da coleta pelo método L FA tradicional – teste qualitativo, com múltiplas repetições em soros com diluição progressiva (Skipper et al., 2020)⁵⁴. Na discussão dos resultados, os autores registraram como limitação do estudo a utilização de soros estocados, referindo que o ciclo congelamento-descongelamento poderia ter causado alguma discrepância no título ou na leitura de traços de positividade. Não houve citação de nenhum estudo que tenha avaliado a influência da estocagem sobre os resultados da pesquisa de antígenos criptocócicos.

As pesquisas acima apresentadas se referem às titulações de antígenos e não de anticorpos, objeto da presente avaliação. No presente estudo, os níveis séricos de anticorpos foram mais elevados em pacientes com a FA do que naqueles com a FC, confirmando achados de Moreto et al. (2011)²². A avaliação da distribuição de títulos entre teste e reteste revela que a estocagem pode levar a algumas alterações de título. No entanto, a persistência da titulação até seis anos em amostras de soro sob estocagem em freezer -80°C respalda sua utilização em avaliações realizadas nesse período.

Este estudo também revela que, tanto em soros de pacientes com a FA quanto da FC, as diferenças entre teste e reteste eram predominantemente de uma diluição que, na prática clínica, é considerada titulação concordante. Este nível de diferença pode ser observado em avaliações da mesma amostra de soro, realizadas por pesquisadores experientes de dois laboratórios, utilizando o mesmo antígeno (Moreto et al., 2010)⁵⁵. No entanto, foram detectados alguns casos em que a diferença foi igual ou maior que duas diluições, passando a ser clinicamente relevante. Por outro lado, não se observou predomínio de titulação de nenhum deles, teste sobre reteste ou vice-versa, o que impede que se correlacione esses achados com o ciclo congelamento-descongelamento.

A conversão de soro reagente no teste a soro não-reagente no reteste, observada em 20% dos casos da FA e 16% da FC, merece destaque por alterar completamente a interpretação clínica. Este achado reforça a sugestão de se utilizar soros armazenados por no máximo seis anos..

Estudos com metodologia proteômica, como os realizados por Sylvestre et al. (2018)⁵⁶, podem trazer alguma luz ao se compararem os achados em amostras de soro avaliadas logo após a coleta com os observados após estocagem. No entanto, a baixa incidência da PCM torna difícil ou mesmo impossível a realização deste desenho de pesquisa.

Além disso, também é de grande importância selecionar as condições mais adequadas de armazenamento de espécimes clínicos, de forma a preservar a qualidade das amostras, permitindo sua utilização em estudos subsequentes. Por esse motivo, foram comparados os níveis de anticorpos determinados em diferentes matrizes sanguíneas.

O presente estudo revelou que os níveis de anticorpos anti-*P. brasiliensis* não diferiam segundo a matriz sanguínea utilizada – soro, plasma obtido com EDTA ou com heparina, em nenhum dos estágios avaliados, isto é, à coleta e após dois, quatro e seis meses de

estocagem a -20°C. Essas titulações também mostraram correlação direta quando foram avaliadas as matrizes sanguíneas, duas a duas, em todos os estágios avaliados.

A composição bioquímica de plasma e soro apresenta diferenças: o plasma contém albumina, IgG, α 1-antitripsina, IgA, IgM, transferrina, haptoglobina, α 1-glicoproteína ácida, α 2-macroglobulina, apolipoproteína A-I, apolipoproteína A-II e fibrinogênio, enquanto no soro a albumina constitui 55% do teor de proteínas, além de possuir IgG, IgA, haptoglobina, transferrina e α -1-antitripsina, que constituem cerca de 85% do proteoma total.⁵⁶ Apesar dessas diferenças, soro e plasma são preservados de forma semelhante por até seis meses.⁵⁷⁻⁵⁹ Esse foi o tempo de estocagem avaliado no presente estudo, para as diferentes matrizes sanguíneas. Estudos futuros deverão avaliar maiores períodos de estocagem.

Outro aspecto que precisa ser investigado é a eventual influência da presença de diferentes compostos antifúngicos nas matrizes sanguíneas. Fields et al. (1970)⁶⁰ identificaram a presença de anfotericina B em amostras de soro armazenados em freezer a -10°C por até nove meses, colhidos de pacientes com micoses sistêmicas.

A escolha da matriz sanguínea está vinculada ao tipo de molécula que se deseja identificar. Wang et al. (2012)⁶¹ avaliaram soro e plasma para busca de microRNAs como marcadores biológicos e observaram maior quantidade de miRNA no primeiro. Mas, ao avaliar a formação de soro e de plasma, observaram que o processo de coagulação propiciava um ambiente estressante, que levava à estimulação da liberação de miRNA, alterando a real quantificação do marcador de interesse. Assim, o plasma foi considerado o melhor material clínico para estudo de miRNA.

Estes achados permitem sugerir que o soro deve ser a matriz de escolha, pela maior disponibilidade e por ser esta a matriz do biobanco de que se dispõe. No entanto, em casos de recaída, o diagnóstico sorológico revela baixa sensibilidade (Sylvestre et al., 2014)³⁶ e a detecção de anticorpos plasmáticos poderia ser investigada quando esta hipótese for aventada.

O presente estudo tem a limitação do tempo de estocagem de amostras de plasma, que deveria ser de mais de três anos e, se possível, superior a seis anos, pois é a partir desse período que as diferenças entre teste e reteste são mais frequentes. No entanto, a abordagem desse aspecto exigiria pelo menos outros três anos de pesquisa e será investigada posteriormente. Além disso, a identificação de anticorpos em casos de recaída precisa ser

avaliada em amostras de plasma, pela importância de seu diagnóstico precoce e baixa sensibilidade da identificação de anticorpos séricos por IDD.

Capítulo V- Conclusões

A determinação dos títulos de anticorpos anti-*Paracoccidioides brasiliensis*, realizada em 207 pacientes com paracoccidioidomicose em atividade, permitiu as conclusões abaixo relacionadas.

I. Em relação à estocagem do soro a -80°C por tempo prolongado

1. A estocagem de soro a -80°C por tempo prolongado levou à alteração dos títulos em uma diluição, quando as amostras foram analisadas em seu conjunto.
2. A análise da variação dos títulos em função do tempo revelou que resultados discordantes não foram encontrados em soros estocados por até três anos e que era pequena a incidência nos que permaneceram congelados entre quatro e seis anos, distribuída igualmente entre os períodos de um ano.
3. Cerca de 20% dos soros reagentes no teste mostraram-se não reagentes no reteste após sete na os ou mais de estocagem.

II. Em relação à utilização de diferentes matrizes sanguíneas e estocagem a -20°C

4. Não houve diferença entre os títulos de anticorpos determinados em soro, plasma-EDTA e plasma-heparina.
5. Os títulos de anticorpos não se alteraram após o ciclo de congelamento-descongelamento quando estocadas por até seis meses, em nenhuma das matrizes utilizadas.

Capítulo VI- 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: Journal of Medical and Veterinary Mycology.* 1985; 23: 323-34.
- 3- Marques SA, Franco MF, Mendes RP, Silva NCA, Baccili C, 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 localizada na boca e observada no Brazil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas. *Brazil-Med.* 1908; 13: 121-24, 15:141-4.
- 5- Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. Micologia Médica. In: *Paracoccidioidomicose.* 8ª ed. São Paulo, Brasil: Editora Sarvier, 1991; p. 248-61.
- 6- Del Negro, G., & Faria, J. L. (1954). Reação à paracoccidioidina em cobaias. *Rev. Assoc. med. brasil., 1*, 156-165.
- 7- Ajello L. Paracoccidioidomycosis: a historical review. In: *Paracoccidioidomycosis.* PAHO Sci. Publ.; 1972. p.254.
- 8- Matute DR, Mcewen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol. Biol. Evol.* 2006; 23: 65-73
- 9- Alborno MB. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Sabouraudia.* 1971; 9: 248-53.
- 10- Franco M, Bagagli E, Scapolio S, Lacaz CS. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. *Med Mycol* 2000; 38: 185 – 91.
- 11- Restrepo A. Morphological aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* in lymph nodes: implications for the prolonged latency of Paracoccidioidomycosis? *Med Mycol.* 2000; 38: 317-22.
- 12- Ricci G, Mota FT, Wakamatsu A, Serafim RC, Borra RC, Franco M. Canine Paracoccidioidomycosis. *Med Mycol.* 2004; 42: 379-83.
- 13- Costa EO, Diniz LS, Netto CF. The prevalence of positive intradermal reactions to paracoccidioidin in domestic and wild animals in São Paulo, Brazil. *Vet Res Commun.* 1995; 19(2): 127-30.

- 14- Costa EO, Diniz LS, Netto CF, Arruda C, Dagli ML. Delayed hypersensitivity test with paracoccidioidin in captive Latin American wild mammals. *J Med Vet Mycol* 1995; 33(1): 39-42.
- 15- 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.
- 16- Trejo-Cháves A, Ramírez-Romero R, Ancer-Rodríguez J, Nevárez-Garza AM, Rodríguez-Tovar LE. Disseminated paracoccidioidomycosis in a southern two-toed sloth (*Choloepus didactylus*). *J Comp Pathol* 2011; 144: 231-234.
- 17- Naiff RD, Ferreira LCL, Barrett TV, Naiff MF, Arias JR. Paracoccidioidomicose enzoótica em tatus (*Dasyus novemcinctus*) no estado do Pará. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1986; 28(1): 19-27.
- 18- Corredor GG, Peralta LA, Castaño JH, Zuluaga JS, Henao B, Arango M, et al. The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. *Med Mycol* 2005; 43(3): 275-80.
- 19- Barrozo LV, Mendes RP, Marques SA, Benard G, Silva ME, Bagagli E. Climate and acute/subacute paracoccidioidomycosis in a hyperendemic area in Brazil. *Int J Epidemiol*. 2009; 38: 1642–1649.
- 20- Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, et al. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1987; 20(2): 129-32.
- 21- 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.
- 22- Moreto TC, Marques MEA, Oliveira MLSC, Moris DV, Carvalho LR, et al. Accuracy of routine diagnostic tests used in paracoccidioidomycosis patients at a university hospital. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2011; 105: 473– 478
- 23- Benard G, Hong MA, Del Negro GMB, Batista L, Shikanai-Yasuda MA, et al. Antigen-specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg*. 1996; 54(1): 7-12.
- 24- Benard G, Romano CC, Cacere CR, Juvenale M, Mendes-Giannini MJS, et al. Imbalance of IL-2, IFN- γ and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine*. 2001; 13(4): 248-52.

- 25- Bueno JP, Mendes-Giannini MJS, Del Negro GMB, Assis CM, Takiguti CK, et al. IgG, IgM and IgA antibody response for the diagnosis and follow-up of paracoccidioidomycosis: comparison of counterimmunoelectrophoresis and complement fixation. *J Med Vet Mycol.* 1997; 35: 213-217.
- 26- Mota NGS, Rezkallah-Iwasso MT, Peraçoli MTS, Audi RC, Mendes RP, et al. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1985; 79: 765-772.
- 27- Biagioni L, Souza MJ, Chamma LG, Mendes RP, Marques SA, et al. Serology of paracoccidioidomycosis. II. Correlation between class-specific antibodies and clinical forms of the disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1984; 78: 617–621.
- 28- Lauand F. Contribuição para o estudo da morfologia do *Paracoccidioides brasiliensis* nos tecidos orais. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1966; 8: 69-78.
- 29- Iwama de Mattos MCF, Mendes RP, Marcondes-Machado J, et al. Sputum cytology in the diagnosis of pulmonary paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 1991; 114:187-191.
- 30- Restrepo A. La prueba de inmunodiffusion en el diagnostico de la paracoccidioidomicosis. *Sabouraudia* 1966; 4:223-230.
- 31- Restrepo A, Moncada LH. Indirect fluorescent antibody and quantitative agar-gel immunodifusion tests for the serological diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Appl Microbiol* 1972; 24: 132 – 137.
- 32- Franco MF, Fava Neto C, Chamma LG. Reação de imunofluorescência indireta para o diagnóstico sorológico da blastomicose sul-americana. Padronização da reação e comparação dos resultados com a reação de fixação do complemento. *Rev Inst Med trop São Paulo* 1973; 15: 193 -198.
- 33- Nogueira MÊS, Mendes RP, Marques SA, Franco M. Complement-mediated-lysis detection of antibodies in paracoccidioidomycosis: a preliminar study. *Braz J Med Biol Res* 1986; 19: 241 – 247.
- 34- Mendes et al. Paracoccidioidomycosis : Current perspectives from Brazil. *Rev. The Open Microbiology jornal.* 2017, 11, 224-282.

- 35- de Almeida, Sérgio M., et al. "Anti-gp43 antibodies in the cerebrospinal fluid of patients with central nervous system involvement by paracoccidioidomycosis." *American journal of clinical pathology* 118.6 (2002): 864-868
- 36- Sylvestre TF, Silva LR, Cavalcante RD, Moris DV, Venturini J, Vicentini AP, Carvalho LR, Mendes RP. Prevalence and serological diagnosis of relapse in paracoccidioidomycosis patients. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014 May 1;8(5): e2834.
- 37- Mendes-Giannini MJS, Del Negro GB, Siqueira AM. Serodiagnosis. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moereno, Del Negro G. eds. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton: CRC Press. 1994.345-363
- 38- Machado GC, Moris DV, Arantes TD, Silva LR, Theodoro RC, Mendes RP, et al. Cryptic species of *Paracoccidioides brasiliensis*: impact on paracoccidioidomycosis immunodiagnosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013; 108(5):637-643.
- 39- Gomes GM, Cisalpino OS, Taborda CP, De Camargo ZP. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol*. 2000 38(9): 3478-80.
- 40- Cavalcante RS, Sylvestre TF, Levorato AD, de Carvalho LR, Mendes RP. Comparison between Itraconazole and Cotrimoxazole in the Treatment of Paracoccidioidomycosis. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8(4): e2793. doi: 10.1371/journal.pntd.0002793.
- 41- Marcondes J, Meira DA, Mendes RP, Pereira PCM, Barraviera B, Mota NGS, et al. Avaliação do tratamento da paracoccidioidomicose com o cetoconazole. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1984; 26:113-121.
- 42- Del Negro G. Ketoconazole in paracoccidioidomycosis. A long-term therapy study with prolonged follow-up. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1982; 24:27-39.
- 43- Câmara B, Hematologia, Apostila digital, biomedicina padrão (2020)
- 44- Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial para coleta de sangue venoso – 2. ed. Barueri, SP : Minha Editora, 2010 Vários autores. ISBN 978-85-98416-94-6.
- 45- Yu Z, Kastenmuller G, He Y, Belcredi P, Moller G, et al.(2011) Differences between Human Plasma and Serum Metabolite Profiles. *PLoS ONE* 6(7): e21230. doi:10.1371/journal.pone.0021230
- 46- Mannello, Ferdinando. "Serum or plasma samples? The “Cinderella” role of blood collection procedures preanalytical methodological issues influence the release and activity of circulating matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors, hampering diagnostic trueness and leading to misinterpretation." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 28.4 (2008): 611-614.

- 47- Hulley SB, Martin JN, Cummings SR. Planejando as aferições: precisão e acurácia. In: Hulley SB, Cummings SR, Browner WS, Grady DG, Newman TB. Delineando a pesquisa clínica: uma abordagem epidemiológica. Artmed 3ed, Porto Alegre: 2008: 55 – 67.
- 48- Cummings SR, Newman TB, Hulley SB. Delineando estudos de coorte. In: Hulley SB, Cummings SR, Browner WS, Grady DG, Newman TB. Delineando a pesquisa clínica: uma abordagem epidemiológica. Artmed 3ed, Porto Alegre: 2008: 115 – 125.
- 49- Jekel JF, Katz DL, Elmore JG. Tamanho da amostra, randomização e teoria da probabilidade. In: _____. Epidemiologia, bioestatística e medicina preventiva. Artmed 2ed,, Porto Alegre; 2005: 205 – 219.
- 50- Sylvestre TF, Cavalcante RD, Da Silva JD, Paniago AM, Weber SS, Pauletti BA, Carvalho LR, Dos Santos LD, Mendes RP. Serological proteomic biomarkers to identify *Paracoccidioides* species and risk of relapse. Plos one. 2018 Aug 29;13(8):e0202804.
- 51- Azevedo PZ, Cavalcante RS, Mendes RP. Paracoccidioidomycosis. Incidence of new cases in the period 1988 – 2014. Distribution as to clinical form. Proceedings of the International Congress, International Society for Human and Animal Mycology, Melbourne (Australia), 2015.
- 52- Guitard J, Sendid B, Thorez S, Gits M, Hennequin C. Evaluation of a recombinant antigen-based enzyme immunoassay for the diagnosis of noninvasive aspergillosis. J Clin Microbiol 2012; 50(3): 762 – 765.
- 53- Kimpton G, White PL, Barnes RA. The effect of sample storage on the performance and reproducibility of the galactomannan EIA test. Med Mycol. 2014;52(6):618-26.
- 54- Skipper C, Tadeo K, Martyn E, Nalintya E, Rajasingham R, Mehta DB, Kafufu B, Rhein J, Boulware DR. Evaluation of serum cryptococcal antigen testing using two novel semiquantitative lateral flow assays in persons with cryptococcal antigenemia. J Clin Microbiol 58:e02046-19. <https://10.1128/JCM02046-19>.
- 55- Moreto T.C. Diagnóstico da paracoccidioidomicose em pacientes atendidos em Serviços de rotina de hospital universitário. 2010. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.
- 56- Sylvestre TF, Cavalcante RD, Da Silva JD, Paniago AM, Weber SS, Pauletti BA, Carvalho LR, Dos Santos LD, Mendes RP. Serological proteomic biomarkers to identify *Paracoccidioides* species and risk of relapse. Plos one. 2018 Aug 29;13(8):e0202804.

- 57- Lee PY, Osman J, Low TY, Jamal R. Plasma/serum proteomics: depletion strategies for reducing high-abundance proteins for biomarker discovery. *Bioanalysis*. 2019 Aug;11(19):1799-812.
- 58- Keshishian H, Burgess MW, Specht H, Wallace L, Clauser KR, Gillette MA, Carr SA. Quantitative, multiplexed workflow for deep analysis of human blood plasma and biomarker discovery by mass spectrometry. *Nature protocols*. 2017 Aug;12(8):1683-701.
- 59- Qian WJ, Kaleta DT, Petritis BO, Jiang H, Liu T, Zhang X, Mottaz HM, Varnum SM, Camp DG, Huang L, Fang X. Enhanced detection of low abundance human plasma proteins using a tandem IgY12-SuperMix immunoaffinity separation strategy. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2008 Oct 1;7(10):1963-73.
- 60- Fields Jr BT, Bates JH, Abernathy RS. Amphotericin B serum concentrations during therapy. *Applied microbiology*. 1970 Jun;19(6):955-9.
- 61- Wang K, Yuan Y, Cho JH, McClarty S, Baxter D, Galas DJ. Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ζ Efeito da estocagem de diferentes amostras clínicas de pacientes com paracoccidiodomicose na reprodutibilidade de testes diagnósticos. ζ

Pesquisador: KARINA ANDRESSA TOMAZINI

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 51849721.7.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.019.791

Apresentação do Projeto:

As informações apresentadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa.

Trata-se de um projeto de pesquisa para obtenção do título de mestre.

A paracoccidiodomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada por fungos do gênero *Paracoccidídeos*. Atualmente, a imunodifusão dupla em gel de agar (IDD) é o método sorológico utilizado com maior frequência na detecção de anticorpos anti-*P. brasiliensis*.

O objetivo do presente estudo será comparar os resultados do teste de IDD realizado por ocasião da coleta de sangue de pacientes com PCM e, na mesma amostra, após período de estocagem.

Nesse sentido, será avaliado as possíveis alterações bioquímicas das amostras e a influência dos tubos de coleta no material analisado.

Será realizado estudo constituído de dois experimentos, um com a utilização de soros estocados e outro com a avaliação de amostras de sangue recém-coletadas e reavaliadas seis meses após congelamento. Experimento 1 – Comparação dos níveis séricos de anticorpos anti-*P. brasiliensis* determinados no momento da coleta do sangue e após o processo congelamento-descongelamento, utilizando-se o bio-repositório da Disciplina; serão avaliados 200 amostras de soro.

Endereço: Chácara Butignoli, s/n	CEP: 18.618-970
Bairro: Rubião Junior	
UF: SP	Município: BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1609	E-mail: cep@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 5.019.791

FMB/UNESP, realizada em 04/10/2021, do PROJETO de Pesquisa apresentado encontra-se APROVADO.

O projeto de pesquisa deverá ter início somente após aprovação deste CEP.

Ao final da execução da pesquisa, o Pesquisador deverá enviar o Relatório Final de Atividades, na forma de Notificação, via Plataforma Brasil.

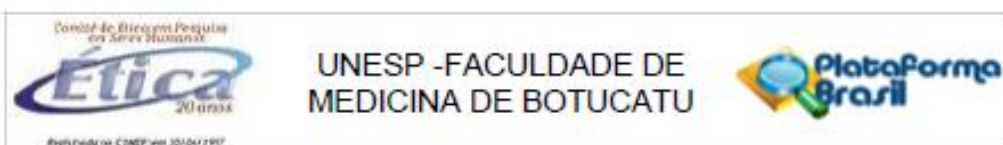
Atenciosamente,

Comitê de Ética em Pesquisa FMB/UNESP

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1705585.pdf	03/09/2021 14:51:53		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_final_.pdf	03/09/2021 14:51:13	KARINA ANDRESSA TOMAZINI	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_mestrado_finalizado.pdf	05/08/2021 20:53:56	KARINA ANDRESSA TOMAZINI	Aceito
Outros	anuencia_hcfmb_sipe.pdf	05/08/2021 20:46:12	KARINA ANDRESSA TOMAZINI	Aceito
Outros	termo_de_anuencia_institucional.pdf	05/08/2021 20:45:09	KARINA ANDRESSA TOMAZINI	Aceito
Declaração de concordância	responsavel_gestao_amb_carlos_magnolo.pdf	05/08/2021 20:43:32	KARINA ANDRESSA TOMAZINI	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	aceite_unipex.pdf	05/08/2021 20:35:19	KARINA ANDRESSA TOMAZINI	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biorepositorio_orientado_orientador.pdf	05/08/2021 20:33:10	KARINA ANDRESSA TOMAZINI	Aceito
Folha de Rosto	Folha_De_Rosto_Assinada_N.pdf	05/08/2021 20:22:35	KARINA ANDRESSA TOMAZINI	Aceito
Brochura Pesquisa	projeto_mestrado_karina.pdf	19/02/2021 13:05:47	KARINA ANDRESSA TOMAZINI	Aceito

Endereço: Chácara Butignoli, s/n
 Bairro: Rubião Junior CEP: 13.618-970
 UF: SP Município: BOTUCATU
 Telefone: (14)3880-1609 E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 5.019.791

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BOTUCATU, 05 de Outubro de 2021

Assinado por:
Trajano Sardenberg
(Coordenador(a))

Endereço: Chácara Butignoli, s/n
Bairro: Rubião Junior
UF: SP Município: BOTUCATU CEP: 18.518-970
Telefone: (14)3880-1609 E-mail: cep@fmb.unesp.br

Página 05 de 05