



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO DE PESQUISA CLINICA EVANDRO CHAGAS  
DOUTORADO

REGINA LANA BRAGA COSTA

**PARACOCCIDIOIDOMICOSE: FATORES  
PROGNÓSTICOS ASSOCIADOS À EVOLUÇÃO DA  
DOENÇA E AO ABANDONO DO TRATAMENTO.**

**RIO DE JANEIRO**

2008

**TESE DPCDI – IPEC**

**R.L.B.COSTA**

**2008**

PARACOCCIDIOIDOMICOSE: FATORES PROGNÓSTICOS  
ASSOCIADOS À EVOLUÇÃO DA DOENÇA E AO  
ABANDONO DO TRATAMENTO.

REGINA LANA BRAGA COSTA

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação de Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas para obtenção do grau de doutor em Ciências da Saúde.

Orientadores: Dr. Antonio Carlos Francesconi do Valle e Dra. Valéria Cavalcanti Rolla

Rio de Janeiro

2008

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

C837 Costa, Regina Lana Braga

Paracoccidioomicose: fatores prognósticos associados à evolução da doença e ao abandono do tratamento / Regina Lana Braga Costa. – Rio de Janeiro, 2008.  
xiv, 111 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2008.  
Bibliografia: f. 90-99

1. Paracoccidioomicose. 2. Paracoccidioomicose - terapia. 3. Comorbidades. 4. Citocinas. I. Título.

CDD 616.969

REGINA LANA BRAGA COSTA

**PARACOCCIDIOIDOMICOSE: FATORES  
PROGNÓSTICOS ASSOCIADOS À EVOLUÇÃO DA  
DOENÇA E AO ABANDONO DO TRATAMENTO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação de Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas para obtenção do grau de doutor em Ciências da Saúde.

Orientadores: Dr. Antonio Carlos Francesconi do Valle  
Dra. Valéria Cavalcanti Rolla

Aprovada em 24/10/2008

BANCA EXAMINADORA

---

**Profª Dra. Lea Camillo-Coura (presidente)**  
Livre Docência em Ciências da Saúde – Clínica Médica  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

**Prof Dr. Armando de Oliveira Schubach**  
Doutor em Ciências da Saúde – Biologia Parasitária  
Instituto Oswaldo Cruz

---

**Prof Dr. Antonio Macedo D’Acri**  
Doutor em Dermatologia  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

**Prof Dr. José Augusto da Costa Nery**

Doutor em Dermatologia  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

**Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Clara Gutierrez Galhardo**

Doutora em Dermatologia  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

**Prof<sup>a</sup> Dra. Danuza Esquenazi (suplente)**

Doutora em Ciências Médicas – Imunologia Celular  
Universidade Estadual do Rio de Janeiro

*Aos pacientes portadores de  
paracoccidiodomicose  
e seus familiares*

## AGRADECIMENTOS

1. Ao Prof. Dr. Armando de Oliveira Schubach pela gentileza, pelo estímulo contínuo e por todas as oportunidades concedidas.
2. À Coordenação do Curso de Pós-graduação pelo empenho realizado para a conclusão deste trabalho.
3. À Secretaria do Curso de Pós-graduação pelo “pronto atendimento” em todos os auxílios solicitados.
4. Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Francesconi do Valle pela orientação e pela competência e dedicação com que conduz as linhas de pesquisa em paracoccidioidomycose.
5. À Prof<sup>ª</sup> Dra. Valéria Cavalcanti Rolla por sua disponibilidade, amabilidade e perspicácia na orientação deste trabalho.
6. À Prof<sup>ª</sup> Lea Camillo-Coura pela presteza e cuidadosa revisão da tese.
7. Ao Prof. Luiz Antonio Bastos Camacho pela inestimável colaboração e pelas sugestões sempre pertinentes.
8. À Prof<sup>ª</sup> Dra Maria Clara Gutierrez Galhardo pelo apoio e estímulo contínuos e pelas sugestões.
9. À Prof<sup>ª</sup> Dra. Beatriz Grinszteijn e à Dra. Valdiléa Gonçalves Veloso pelo apoio irrestrito e pelo empenho em nossa liberação das atividades clínicas para a conclusão deste trabalho.
10. À Dra. Marli Jane da Costa Martins pela amizade, companheirismo e pelas sugestões.
11. Ao Dr Bodo Wanke, à Dra Márcia Lazéra e a todos os integrantes do Laboratório de Micologia Médica, pelo apoio e estímulo, e pelo trabalho que desenvolvem junto ao Programa de Micoses do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC).
12. Às equipes médicas, de enfermagem, de nutrição, de psicologia, de farmácia e de assistência social do IPEC pela atenção especial dispensada aos pacientes portadores desta micose e seus familiares, nos seus anseios e necessidades.
13. Ao Serviço de Estatística e Documentação (SED), pelo auxílio no levantamento de prontuários e arquivo nosológico.
14. À Raquel de Vasconcellos C. de Oliveira pela análise estatística e pela disponibilidade e paciência durante este trabalho.
15. À Dra. Carla M. Vorsatz pela revisão dos textos em inglês.



16. À Prof<sup>a</sup> Danuza Esquenazi pelo companheirismo e auxílio nas discussões imunológicas.
17. Ao Dr. Pedro Emmanuel Alvarenga Americano do Brasil pelo auxílio junto às ferramentas de manuseio de bibliografia.
18. Ao Davi e ao Gabriel, meus filhos, pelo amor e pela compreensão.
19. Ao João Braga e à Gilda, meus pais, pelo incentivo à busca do conhecimento científico, desde a infância, por sua presença e carinho permanentes.
20. À Giselle Correa dos Santos pela inestimável ajuda nos prolongados períodos de ausência em casa.
21. À Débora, Cláudia Lucia, Raquel, Andréa, Nilza, Mariângela, Sueli, Glória, Beth e Simone pela torcida organizada e constante.
22. A todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho, e que por um lapso de memória não foram aqui citados, meu mais sincero ***muito obrigada!***

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ACTH - Hormônio Adrenocorticotrófico
- BRA – Baixa resposta adrenal ao teste de estímulo rápido com ACTH
- CPC – *Cor pulmonale Crônico*
- DPOC - Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
- DP - Desvio padrão
- FCA – Forma crônica do adulto
- gp43 - Glicoproteína de 43000 Daltons
- HIV – vírus da imunodeficiência humana
- IC - Intervalo de confiança
- IL - interleucina
- IDD – imunodifusão dupla em gel de ágar
- IPEC – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
- OR - *Odds ratio* (Razão de chance)
- PCM – Paracoccidiodomicose
- FJ – forma aguda/subaguda do tipo juvenil
- NPCM - neuroparacoccidiodomicose
- Th – linfócito T auxiliador
- TNF - Tumor necrosis factor
- VADS - Vias Aéreas e Digestivas Superiores
- SIDA - Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
- SMZ/TMP – sulfametoxazol associado ao trimetoprim

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
CAPÍTULO 1 .....	1
1.1 INTRODUÇÃO .....	1
CAPÍTULO 2 .....	2
2.1 REVISÃO DA LITERATURA .....	2
2.1.1 Etiologia.....	2
2.1.2. Ecologia .....	3
2.1.3. Epidemiologia .....	3
2.1.4. Patogênese.....	5
2.1.5. Aspectos imunológicos .....	6
2.1.6. Manifestações e Classificação Clínicas .....	7
2.1.7. Complicações e seqüelas.....	10
2.1.8. Co-morbidades .....	10
2.1.9. Diagnóstico .....	12
2.1.10. Tratamento e controle de cura.....	13
CAPÍTULO 3 .....	16
3.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
CAPÍTULO 4 .....	20
Factors of influence in the outcome of paracoccidioidomycosis treatment .....	20
CAPÍTULO 5 .....	46
Paracoccidioidomycosis: factors associated with treatment abandonment .....	46
CAPÍTULO 6 .....	63
Immune hyporesponsiveness in the chronic form of paracoccidioidomycosis and its reversal following treatment .....	63
CONCLUSÕES GERAIS .....	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
ANEXOS.....	100

Costa, RLB. **Paracoccidioidomicose: fatores prognósticos associados à evolução da doença e ao abandono do tratamento.** Rio de Janeiro 2008. Tese [doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas]. Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

## RESUMO

A PCM é a micose sistêmica mais frequente na América Latina. Ocorrem complicações graves, frequentes co-morbidades e seqüelas raramente reversíveis. Os esquemas de tratamento disponíveis são prolongados e existe alta taxa de abandono de tratamento e perda de seguimento pós-terapêutico.

Esta tese constitui-se em três artigos, gerados a partir de um estudo de coorte retrospectivo conduzido no IPEC, que incluiu pacientes com início de tratamento entre janeiro de 1987 e dezembro de 2004, submetidos a um protocolo uniformizado de investigação clínica e abordagem terapêutica. Através de um modelo logístico aplicado aos pacientes que completaram o primeiro tratamento preconizado pelo IPEC, foram evidenciados, no primeiro estudo, fatores preditores da evolução (favorável/desfavorável). O mesmo modelo foi aplicado ao segundo estudo que verificou os fatores associados ao abandono do tratamento. Para o terceiro estudo foi verificada a resposta linfoproliferativa *in vitro* de pacientes antes e após o tratamento com itraconazol.

O estudo incluiu 436 pacientes, 392 com a forma crônica do adulto (FCA) e 44 com a forma juvenil (FJ). As co-morbidades mais frequentes foram o tabagismo (90,2%), o etilismo (66,9%), a estrongiloidíase (42,3%), a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC – 20,3%) e a tuberculose (12,7%).

No modelo logístico do primeiro estudo (N=213) foi verificado que os pacientes com FCA apresentaram 63,9 vezes mais chances de terem uma evolução favorável (cura) do que os com forma juvenil; os pacientes sem estrongiloidíase apresentaram 64.53 vezes mais chances de terem uma evolução favorável do que os parasitados; pacientes que fizeram tratamento regular tiveram 39 vezes mais chances de evoluírem para cura.

Quanto aos fatores implicados no abandono do tratamento, segundo estudo, pacientes etilistas moderados apresentaram 98% mais chance (OR=1.98) do que não etilistas de

interromper a terapia. A taxa de abandono foi de 43,5% e os pacientes tratados com itraconazol mostraram 51% menos chance de descontinuar o tratamento do que os que utilizaram outras drogas.

O terceiro estudo incluiu 20 pacientes, todos tabagistas, e 60% com desnutrição uma disfunção na produção de IL2, em resposta a estímulo com Concanavalina A (mas não à PMA+Ionomicina), antes do tratamento com itraconazol. Após o tratamento, houve uma reversão da disfunção imune além de um aumento na proporção de células produtoras de  $\gamma$ -interferon/IL4, sugerindo que um possível mecanismo para a evolução da infecção latente pelo *P. brasiliensis* para doença ativa seja uma imunodeficiência secundária aos efeitos combinados de tabagismo, alcoolismo e desnutrição na imunidade celular do paciente com a FCA da PCM.

Uma abordagem clínica e terapêutica adequada para os pacientes com PCM deve incluir o reconhecimento precoce e tratamento das co-morbidades, conferindo destaque à estrogiloidíase e ao etilismo, além de atenção diferenciada aos pacientes com a FJ e vigilância constante e multidisciplinar da regularidade do tratamento.

**Paravras-chave:** 1. Paracoccidioomicose. 2- Co-morbidades. 3- Tratamento. 4-Abandono. 5- Citocinas

Costa, RLB. **Paracoccidioidomycosis: prognostic factors associated with disease progression and treatment abandonment.** Rio de Janeiro 2008. Thesis [PhD degree in Clinical Research in Infectious Diseases]. Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

## ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is the most frequent systemic mycosis in Latin America. Severe complications, frequent comorbidities and rarely reversible sequelae occur. Treatment regimens available are for long term time periods and there is high rate of treatment abandonment and loss of post-treatment follow-up.

This paper is composed of three articles, developed from a retrospective cohort study conducted at IPEC that included patients initiating treatment between January 1987 and December 2004, submitted to a standard clinical investigation and treatment approach protocol. Through a logistic model applied to patients that completed the first treatment advocated at IPEC, predictive factors of progression (favorable/unfavorable) became evident. The same model was applied to the second study that verified the factors associated with treatment abandonment. In the third study, in vitro lymphoproliferative response from the patients before and after treatment with itraconazole was observed.

The study included 436 patients, 392 presenting Chronic Adult Form (CF) and 44 presenting Juvenile Form (JF). Most frequent comorbidities were smoking (90.2%), alcohol abuse (66.9%), strongyloidiasis (42.3), chronic obstructive pulmonary disease (COPD - 20.3%) and tuberculosis (12.7%).

In the logistic model of the first study (N=213) we observed that CF patients had 63.9 times more chances of favorable outcome (cure) than those with the JF; patients not presenting strongyloidiasis had 64.53 times more chances of favorable outcome than those with the parasite; patients with regular treatment had 39 times more chances of cure.

Regarding the factors implicated in treatment abandonment, according to the study, alcohol abusers had 98% more chance of therapy discontinuation (OR=1.98) than other patients. Abandonment rate was 43.5% and itraconazole treated patients showed 51% less chance of treatment discontinuing than those who received other drugs.

The third study included 20 patients, all smokers, and 60% presenting malnutrition and an IL2 production dysfunction in response to Concanavalin A stimulation (but not to PMC+Ionomycin) before itraconazole treatment. After treatment, there was reversion of the immune dysfunction, in addition to an increase of the proportion of  $\gamma$ -interferon/IL4 producing cells, suggesting a possible mechanism of *P. brasiliensis* progression from latent infection to active disease through a secondary immunodeficiency due to the combined effects of smoking, alcohol abuse and malnutrition in the cellular immunity of patients presenting CF of PCM.

Adequate clinical and therapeutic approach to PCM patients should include early recognition and treatment of comorbidities, highlighting strongyloidiasis and alcohol abuse, in addition to a differentiated attention to JF patients, as well as continued and multidisciplinary surveillance of treatment regularity.

**Key-words:** 1. Paracoccidioidomycosis: 2. Comorbidities. 3. Treatment. 4. Abandonment. 5. Cytokines

## CAPÍTULO 1

### 1.1 INTRODUÇÃO

A paracoccidioomicose é uma micose sistêmica causada por um fungo dimórfico, o *Paracoccidioides brasiliensis*. Apresenta quadros clínicos variados, acompanhados de complicações graves, frequentes co-morbidades e seqüelas raramente reversíveis. Os esquemas de tratamento disponíveis são prolongados e existe alta taxa de abandono de tratamento e perda de seguimento pós-terapêutico.

É uma doença que afasta do trabalho homens em sua idade produtiva, por sofrerem com lesões importantes, muitas vezes não diagnosticadas em tempo hábil devido ao difícil acesso aos serviços de saúde especializados para diagnóstico micológico. Apesar de já estarem bem estabelecidos os esquemas terapêuticos e critérios de cura da PCM, ainda não há estudos sobre quais fatores estão implicados na evolução favorável ou desfavorável dos pacientes com o tratamento, nem qual o perfil dos pacientes que abandonam o tratamento.

No Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) é desenvolvida uma linha de pesquisa em PCM. A partir dos dados coletados através de um protocolo de abordagem clínica e terapêutica, implantado em janeiro de 1987, pretendemos analisar as variáveis de influência nos desfechos favoráveis (cura) ou desfavoráveis (recaída, resistência, óbito) da PCM. Outros objetivos incluem a análise das variáveis de influência no abandono de tratamento.

Os pacientes com PCM apresentam também disfunções da imunidade celular, um fator que tem relação direta com a gravidade da doença. No intuito de verificar a presença de disfunção imune celular em pacientes de nossa casuística, pretendemos examinar a resposta linfoproliferativa *in vitro* dos pacientes antes e após o tratamento com itraconazol.

Não existe até o momento no Rio de Janeiro um estudo sobre a PCM que tenha avaliado sistematicamente os pacientes em suas diversas formas clínicas, co-morbidades e tipos de tratamento. A condução deste estudo em uma área endêmica para esta micose, poderá contribuir para melhor compreensão dessas interações e formulação de novas condutas baseadas nas evidências encontradas.



## CAPÍTULO 2

### 2.1 REVISÃO DA LITERATURA

#### 2.1.1 Etiologia

A paracoccidiodomicose (PCM) é doença endêmica que tem amplo espectro clínico, fácil diagnóstico e evolução letal se não tratada.

Descrita pela primeira vez em 1908 por Adolpho Lutz (1), a PCM é a micose sistêmica mais frequente da América Latina. A infecção é adquirida pela inalação de esporos do *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*), um fungo dimórfico, conhecido apenas na sua forma assexuada, que vive saprofiticamente na natureza, já tendo sido isolado no solo de áreas endêmicas (2-4). Ainda são pouco conhecidos seu habitat natural e suas relações.

No laboratório, em cultivo a 25 ° C o *P. brasiliensis* cresce lentamente. As colônias são brancas algodonosas, e o micélio é composto por um emaranhado de hifas finas, ramificadas e de paredes hialinas. A 35° C o *P. brasiliensis* cresce mais rapidamente, forma colônias cerebriformes compostas de elementos esféricos de 2 a 30 µm de diâmetro, com paredes birrefringentes, apresentando um ou mais brotamentos que se ligam à célula mãe por istmo citoplasmático estreito. Estes elementos em forma de leveduras são semelhantes aos observados em amostras de material biológico (pus, exsudato, fluidos orgânicos ou tecidos de pacientes), onde o fungo se apresenta com número e tamanho variados. Todas essas características são inerentes à morfologia do *P. brasiliensis* porém apenas as imagens de gemulações múltiplas denominadas “brotamento em roda-de-leme” são patognomônicas do fungo (5).

O dimorfismo do fungo parece estar diretamente ligado à sua virulência devido à presença de carboidratos específicos, como  $\alpha$ -glucans, abundantes na fase leveduriforme, ao contrário da fase miceliana, onde predominam os  $\beta$ -glucans (5).

### 2.1.2. Ecologia

As áreas onde o fungo vive na natureza, nas quais os pacientes adquirem a infecção, são regiões com florestas tropicais ou subtropicais, com abundantes cursos d'água, temperatura entre 10° e 28° C, precipitações pluviométricas entre 500 a 2500 mm, solos ácidos e férteis (2-4, 6). Estas condições são semelhantes às das regiões onde o fungo já foi isolado, como na Venezuela, em São Paulo e Minas Gerais. O *P. brasiliensis* também foi isolado em tatus (7-9), que segundo Bagagli (7) não são apenas portadores do fungo, já que muitos desenvolvem a doença. A confirmação dos tatus como um reservatório natural da PCM mostra evidências valiosas sobre o hábitat do *P. brasiliensis*, e conseqüentemente sobre a cadeia epidemiológica da PCM, uma vez que esses animais vivem em condições geográficas semelhantes às do fungo e têm contato profundo com o solo através de seus hábitos de sobrevivência, constantemente revolvendo a terra.

### 2.1.3. Epidemiologia

Esta micose sistêmica ocorre com maior freqüência no Brasil, Argentina, Colômbia e Venezuela. O Brasil conta com aproximadamente 80% dos casos relatados e está situado no centro da área endêmica, onde a doença ocorre com maior freqüência nas regiões sudeste, sul e centro-oeste (4). Ultimamente vêm ocorrendo casos de PCM de forma mais frequente na Amazônia, principalmente em áreas onde têm havido modificações sócio-econômicas, desmatamento e substituição das atividades tradicionais por agricultura de larga escala (10-12).

A infecção pelo *P. brasiliensis* é adquirida nas duas primeiras décadas de vida, com um pico de incidência entre 10 e 20 anos de idade, quando sua prevalência se mostra semelhante entre os sexos. Contudo a doença é mais comum nos adultos do sexo masculino. A relação de acometimento da PCM doença em adultos é de nove homens para uma mulher, o que não ocorre na infância, onde a infecção e a doença se distribuem uniformemente entre ambos os sexos, com ligeiro predomínio do sexo masculino em adultos jovens (13).

A PCM é rara na infância. Em uma das áreas de maior endemicidade foi encontrada freqüência de 3,68 % de crianças abaixo de 14 anos em 1899 casos estudados (14).

Até o momento não há relatos de epidemia da micose nem foi confirmada sua transmissão inter-humana. Quando à susceptibilidade de raças ao fungo, sabe-se que a presença de certos

antígenos de histocompatibilidade pode estar associada à PCM, como HLA-A9, B-13 quando em comparação com indivíduos normais (15). O risco de desenvolver PCM em indivíduos portadores de antígeno B-40 foi 4,3 a 29 vezes maior que os controles em um estudo realizado por Goldani et al. (16). Os antígenos de histocompatibilidade também estão implicados na interação parasita-hospedeiro regulando a resposta imune aos antígenos do fungo (17).

Não se conhece o número exato de casos de doença por não ser de notificação compulsória. As estimativas de prevalência, incidência e morbidade da micose se baseiam em relatos de inquéritos epidemiológicos e casuísticas registradas. No Brasil existem áreas de alta endemicidade situadas entre áreas de níveis endêmicos mais baixos. Fava & Netto (18) relacionaram 88 inquéritos epidemiológicos realizados no Brasil mostrando que a prevalência de positividade em testes cutâneos com paracoccidiodina varia de 2 % entre crianças de uma população de baixa renda no Rio de Janeiro a 82 % em Cachoeira do Sul (RS). A incidência anual de PCM doença em áreas altamente endêmicas foi estimada entre 1 e 3 por 100.000 habitantes. Uma análise dos casos registrados, com base em estatísticas dos diversos serviços mostra uma freqüência alta, variando entre 5,6 e 139,6 casos novos por ano (4).

A letalidade da PCM, assim como a incidência, também é avaliada com base em análise de casuísticas dos serviços, apesar do fato de que estimativas de letalidade com parte do espectro clínico de pacientes hospitalares pode superestimar a gravidade da doença. Valle (19) verificou 24 óbitos em análise de 500 casos (4,8%). Machado Filho & Miranda (20) encontraram 12,2 % de taxa de óbitos em 394 casos analisados e Del Negro (21) encontrou 22% entre os doentes internados no Hospital das Clínicas em São Paulo. Costa verificou em pacientes acompanhados no IPEC de 1987 a 1998, apenas 7 óbitos atribuídos à PCM (22).

Coutinho et al. (23) apresentaram, num estudo de 3.181 óbitos de pacientes portadores de PCM no Brasil num período de 16 anos, a taxa de mortalidade média anual de 1,487 por milhão de habitantes. O autor apontou a PCM como oitava causa de mortalidade predominantemente crônica ou repetitiva, entre as doenças infecciosas e parasitárias e a mais alta taxa entre as micoses sistêmicas. Chamou também atenção pelo fato de a região centro-oeste apresentar o segundo coeficiente mais alto do país (2,333/milhão de habitantes) com tendência à ascensão, depois da região sul.

Dentre as maiores casuísticas estudadas encontramos a de Blotta e cols. (24) com 584 casos em São Paulo, Valle e cols. Com 500 casos (13) no Rio de Janeiro, Paniago et al. (25) com

422 casos no Mato Grosso do Sul, Machado Filho & Miranda com 394 casos No Rio de Janeiro (20) e Londero & Ramos com 260 casos no Rio Grande do Sul (26).

#### 2.1.4. Patogênese

Na PCM a infecção é adquirida através da inalação de propágulos infectantes, fato já demonstrado experimentalmente (27). Em áreas endêmicas, esta infecção ocorre geralmente nas duas primeiras décadas de vida (28). Há casos descritos de PCM causada por provável inoculação traumática, nos quais não houve detecção de doença em sítio diferente do acometido nem história epidemiológica característica (29, 30).

Ao atingir o tecido pulmonar o fungo é fagocitado, provoca uma lesão primária acompanhada de acometimento linfático satélite, formando assim o complexo primário, que geralmente é assintomático ou oligossintomático. Neste momento pode ocorrer disseminação hematogênica para outros órgãos e tecidos, dando origem a focos metastáticos de fungos. Após infecção primária, as resoluções possíveis são: (i) desenvolvimento de resposta imune celular competente com resolução do complexo primário e formação de cicatrizes estéreis ou com fungos viáveis (focos quiescentes pulmonares); (ii) disseminação linfo-hematogênica transitória com a instalação de focos em diversos órgãos e sistemas que se resolvem com permanência de fungos viáveis (focos quiescentes disseminados) ou se resolvem formando cicatrizes estéreis; (iii) evolução progressiva aguda para doença, a partir da não resolução do complexo primário ou do foco “metastático” (31, 32). A maioria dos indivíduos infectados permanece com infecção assintomática e expressa reação de hipersensibilidade retardada a um antígeno polissacáride do *P. brasiliensis*, a paracoccidioidina (4). A reativação de focos quiescentes pulmonares ou extrapulmonares, pode ocorrer após um período variável de latência (reinfecção endógena) ou por reinfecção exógena (33). A progressão de infecção para doença também pode ser desencadeada por estados de imunossupressão (34-36).

Após a instalação da doença e tratamento adequado ocorre geralmente remissão clínica e formação de cicatrizes estéreis ou com fungos viáveis no interior. As últimas podem evoluir para focos ativos e são as responsáveis pelas possíveis recidivas e as primeiras podem se apresentar como seqüelas.

### 2.1.5. Aspectos imunológicos

A PCM, assim como as outras micoses profundas, depende da interação entre o fungo e a resposta imune do hospedeiro para evoluir para a cura espontânea ou disseminar-se pelo organismo causando granulomatose crônica. Os mecanismos relacionados à resistência ou susceptibilidade do homem ao *P. brasiliensis* ainda não são bem conhecidos.

Nos pacientes com PCM existe uma correlação entre níveis séricos altos de anticorpos circulantes e gravidade da doença. Seu sistema humoral está hiperativo, principalmente às custas de IgG, IgA e IgE (37, 38). Entretanto não está estabelecido ainda um papel protetor dos anticorpos na PCM.

Alguns autores têm demonstrado que existe uma disfunção da resposta imune timo-dependente na paracoccidiodomicose, que pode ocorrer durante qualquer fase da doença, que está relacionada à evolução para formas mais graves, e que geralmente se recupera com o tratamento (31, 39-41). As alterações nos parâmetros de imunidade celular que ocorrem nos pacientes com PCM se correlacionam à heterogeneidade clínica da micose, mostrando que a PCM se enquadra no modelo bipolar traçado para outras doenças como a hanseníase, onde os pacientes com doença disseminada e disfunção grave da imunidade celular estariam classificados no polo dito “anérgico” enquanto os com doença localizada e imunidade celular preservada estariam no polo “hiperérgico” (42). Mota et al. (41) estudaram a correlação entre a imunidade celular e as diversas formas clínicas da doença e demonstraram que há uma tendência progressiva à piora da resposta imune celular a partir da FCA unifocal, até a FJ, passando pelas formas intermediárias. A capacidade de formação de granulomas acompanha esse modelo bipolar, onde pacientes com as formas mais graves da doença apresentam lesões com poucos granulomas mal formados e cheios de fungo em seu interior, enquanto pacientes com formas crônicas elaboram granulomas bem formados, epitelióides com poucos fungos (31, 43).

A baixa resposta dos pacientes aos testes intra-dérmicos se correlaciona em paralelo à gravidade da doença e, inversamente à quantidade de anticorpos anti-*P. brasiliensis* circulantes (41). Muitos estudos demonstraram que um desequilíbrio no padrão de produção de citocinas está por trás deste quadro: baixa produção de citocinas tipo Th1 (IL2, IL12,  $\gamma$ -interferon) associada a uma produção normal ou aumentada de citocinas tipo Th2 (IL10, IL5, IL4) (44-46). Estudos *in situ* de lesões de pacientes com PCM demonstraram uma expressão aumentada de TNF  $\alpha$ , uma

citocina com atividade ativadora de macrófagos, mas que em altas concentrações está associada à dano tissular (47).

Pacientes com FCA com doença grave e disseminada e os com FJ apresentam também níveis elevados de anticorpos dependentes de IL4, como IgE e subtipo IgG4, demonstrando o controle de citocinas do tipo Th2 na resposta imune humoral destes pacientes (37, 38). Outro aspecto em favor do controle Th2 nesses pacientes é a presença de eosinofilia periférica e de medula óssea em casos graves, uma anormalidade relacionada ao aumento da produção de IL5 (46).

Pacientes com cura aparente apresentam uma resposta linfocitária proliferativa aumentada, assim como testes de paracoccidiodina reativos, provavelmente em consequência da recuperação da resposta tipo Th1 induzida por antígenos (45).

#### 2.1.6. Manifestações e Classificação Clínicas

A PCM infecção se caracteriza por ausência de sinais e sintomas da doença e teste intradérmico com paracoccidiodina positivo. O polimorfismo clínico da PCM doença, assim como em outras doenças infecciosas, pode ser influenciado pelo meio ambiente, patogenicidade do parasita e resposta imune do hospedeiro. A PCM doença pode se apresentar de várias formas, devendo o clínico procurar todos os possíveis sítios de acometimento a fim de detectar estados sub-clínicos de envolvimento dos órgãos. Segundo Franco et al. (48) e Mendes(42), a PCM se classifica clinicamente em:

1. paracoccidiodomicose infecção
2. paracoccidiodomicose doença
  - ❖ *forma aguda ou subaguda (tipo juvenil)*
    - moderada ou grave
  - ❖ *forma crônica tipo adulto - unifocal*
    - leve ou moderada
  - ❖ *forma crônica tipo adulto - multifocal*
    - leve, moderada ou grave.
3. formas residuais ou seqüelas.

A forma aguda/subaguda ou juvenil (FJ) representa progressão da infecção primária para doença disseminada e grave, geralmente após disseminação hematogênica, devido à incapacidade do hospedeiro susceptível em controlar a proliferação do fungo. Acomete conseqüentemente os órgãos do sistema fagocítico-mononuclear (baço, linfonodos, fígado, medula óssea), porém qualquer órgão pode ser acometido, compondo quadros clínicos polimórficos. Na primeira década de vida as manifestações mais frequentes são síndrome do abdome agudo - devido ao acometimento dos linfonodos intra-abdominais (49), ou quadros clínicos simulando linfomas - devido a exuberantes linfadenomegalias superficiais generalizadas (50). Os sintomas e sinais mais expressivos são febre, emagrecimento, diarréia, distensão abdominal, linfadenites superficiais e anemia (51, 52). Os gânglios tumefeitos muitas vezes dão origem a fístulas, drenando material purulento rico em fungos. Podem se confluir e levar a síndromes obstrutivas diversas, linfáticas, intestinais e de vias biliares (53), causando linfedema, ascite, ou derrame pleural (54). São frequentes hepato-esplenomegalia, e o espessamento hilar detectado ao exame radiológico de tórax. Há relatos de casos comprometimento osteo-articular simulando quadro de osteomielite ou septicemia (55). As lesões cutâneas usualmente múltiplas não são raras (52, 56). Enfim, a PCM na infância, por ser polimórfica pode ser facilmente confundida com outras doenças comuns da criança, o que retarda e dificulta o diagnóstico e tratamento.

A forma crônica do adulto (FCA) é a mais comum das formas clínicas. É conseqüente à reativação endógena de focos quiescentes ou à reinfeção exógena. Caracteriza-se pela duração prolongada, instalação lenta e gradual com alteração progressiva do estado geral. Pode ser unifocal, a mais comum é a doença isolada pulmonar, mas pode ser de qualquer outro sítio (57). A FCA multifocal se caracteriza por acometimento conjunto dos órgãos, mais comumente pulmões, mucosa das vias aéreas e digestivas superiores (VADS), gânglios, adrenais e pele. As manifestações clínicas são aquelas decorrentes dos órgãos acometidos; conseqüentemente, o quadro clínico variado desta forma da micose implica em sua inclusão no arsenal diagnóstico das mais variadas doenças sistêmicas. A freqüência de acometimento dos órgãos varia com as regiões endêmicas e com as facilidades dos serviços de saúde em obter o diagnóstico adequado.

As lesões das mucosas das vias aéreas e digestivas superiores (VADS) são frequentes e têm sido observadas tanto na FCA (58, 59) quanto na FJ, esta última com freqüência bem menor. Muitas vezes dolorosas, há sialorréia, intensa interferência na mastigação, odinofagia, disfagia e

disfonia. A morfologia de ulceração finamente granulosa, salpicada por pontilhado hemorrágico é o aspecto mais comumente encontrado, podendo ocorrer lesões vegetantes, ulcerovegetantes, acompanhadas ou não de edema. Na cavidade oral as lesões podem invadir por contigüidade os lábios provocando queilite. Na laringe, encontram-se lesões principalmente das estruturas do glote, como ulcerações com fundo granulomatoso ou infiltrados difusos (57). Podem levar a quadros de obstrução respiratória alta que, em muitos casos, culminam com a necessidade de realização de traqueostomia (60).

Os pulmões, na PCM, podem estar acometidos de maneira isolada, como forma pulmonar progressiva (61) ou em conjunto com outros órgãos. São acometidos em mais de 70% dos casos (13, 26, 62), e as lesões evoluem frequentemente para fibrose residual. Seu acometimento é pouco frequente nos pacientes com FJ (54). Os sintomas mais comuns são a dispnéia e a tosse persistente com ou sem expectoração. Dos aspectos radiológicos o padrão de lesão intersticial infiltrativo (bilateral, simétrico) é o mais comumente encontrado, podendo ocorrer o padrão misto, de lesões intersticiais e alveolares, ou padrão pneumônico com lesões do tipo alveolares (63). Lesões fibróticas ou imagens cavitárias são também encontradas. O envolvimento pulmonar pode ser silencioso (dos Santos et al. 2004) e existe uma dissociação clínico-laboratorial, sendo comuns a riqueza de alterações radiológicas e a baixa freqüência de sintomas respiratórios (64).

O comprometimento cutâneo na PCM pode ser decorrente de propagação das lesões mucosas ou de processo ganglionar para pele, de disseminação hematogênica. São bastante polimorfas, inicialmente papulosas evoluindo para lesões ulceradas com fundo pontilhado hemorrágico, úlcero-vegetantes, vegetantes, sarcoídicas, nodulares, úlcero-descamativas ou mistas (65). O polimorfismo clínico das manifestações cutâneas na PCM às vezes é simples resultado da própria evolução das lesões que inicialmente se apresentam sob um determinado aspecto e se modificam com o transcorrer da doença.

As lesões ganglionares são comumente associadas às orofaríngeas, envolvendo principalmente linfonodos submandibulares e cervicais. Observa-se tendência à supuração com drenagem de pus amarelado, espesso e rico em parasitos. Praticamente todos os pacientes apresentam acometimento ganglionar, mesmo sob forma de infecções subclínicas. As adenomegalias podem ser de qualquer sítio e quando intra-abdominais, dão origem a massas abdominais (coalescência de gânglios) que podem levar a diversos graus de obstrução e peritonite por fistulização para a cavidade abdominal, entre outras complicações (55, 66).



As adrenais são as glândulas mais frequentemente acometidas na PCM e, segundo Del Negro (67), o terceiro órgão mais atingido. As lesões podem ser identificadas tanto por exames radiológicos (68) como em provas funcionais (69, 70). Há relatos de comprometimento isolado das adrenais na PCM (67), e de recuperação da função adrenal pós-terapia antifúngica específica (71, 72). Outras glândulas também podem ser acometidas pelo *P. brasiliensis* como a tireóide (73).

O envolvimento do sistema nervoso central (SNC) é pouco comum porém com o avanço dos recursos radiológicos, tem sido diagnosticado cada vez mais. Em uma casuística de 173 casos de PCM ele esteve presente em 13.9% dos pacientes (74). Apresenta-se como granulomas intraparenquimatosos, únicos ou múltiplos, de localização habitualmente supratentorial. A lesão tumoral é mais frequente e pode ser encontrada no cérebro, cerebelo, tronco cerebral e medula espinhal (75-77). O cérebro é a localização mais frequente e a medula a mais rara, com poucos casos registrados na literatura (78, 79).

O acometimento de ossos e articulações (80, 81), do trato gastrintestinal (82-84), dos olhos e seus anexos (85, 86), do trato urogenital (87, 88) e até da circulação arterial (89) pelo *P. brasiliensis* já foram descritos em relatos de casos e análise de casuísticas.

### **2.1.7. Complicações e seqüelas**

As lesões seqüelares são resultantes da reparação cicatricial induzidas pelo tratamento. Dentre as complicações e seqüelas mais frequentes da PCM estão: as síndromes obstrutivas diversas causadas por adenomegalias (53); lesões intestinais e das VADS que podem evoluir para fibrose estenosante (60); lesões pulmonares que podem levar à insuficiência respiratória e, agravadas pelo DPOC, culminar em *cor pulmonale* crônico, além das seqüelas neurológicas e das lesões das adrenais levando à Síndrome de Addison.

### **2.1.8. Co-morbidades**

O alcoolismo (90) e o tabagismo são hábitos frequentes dos pacientes com PCM, sendo que o tabagismo tem sido citado como fator de risco para o desenvolvimento da micose (91). Segundo os autores o alcoolismo poderia atuar como um co-fator, associado ao tabagismo. Estes autores investigaram, por meio de um estudo caso-controle, a influência do tabagismo e do

alcoolismo no desenvolvimento da forma crônica da PCM. Dados sobre a ocupação, moradia e hábitos de vida foram obtidos de 70 doentes e 180 controles. A chance de adoecer foi 14 vezes maior entre os fumantes e 3,6 vezes maior entre os que bebiam acima de 50g/dia de álcool. Na regressão logística, foram significativas as variáveis consumo de tabaco por mais de 20 anos, consumo de cigarros industrializados e consumo de álcool acima de 50g/dia. Os doentes que fumavam 20 ou mais cigarros/dia adoeceram em média oito anos antes que os demais.

Dentre 264 pacientes avaliados no IPEC, 97,7% dos pacientes com forma crônica do adulto (FCA) e 41% dos pacientes com a forma juvenil (FJ) eram tabagistas de longa data. O etilismo era hábito comum em 76,2% com uma frequência de 51 % destes como etilistas pesados (22). Deve ser ressaltado que nesta casuística os pacientes com FJ eram, na sua maioria, adultos jovens porém com menos de 30 anos.

A associação de PCM com outros processos mórbidos, infecciosos ou não, algumas vezes parece escapar ao acaso. Tem sido relatada na literatura, a concomitância da PCM com strongiloidíase (13, 92), tuberculose (13, 93-95), criptococose (96), hanseníase (97, 98); LTA (20, 99) e outras.

Geralmente é difícil diagnosticar a doença primária; entretanto as alterações fisiopatológicas produzidas pela PCM poderiam facilitar o aparecimento da doença associada e vice-versa. Torna-se importante detectar a presença dessas associações e sua repercussão na evolução dos pacientes com PCM.

As disfunções da imunidade celular adquiridas através de uso de drogas imunossupressoras ou infecção pelo HIV podem resultar em reativação de focos quiescentes de *P. brasiliensis* (34). Embora a PCM não seja uma infecção usualmente associada à imunossupressão, como outras micoses (100) há evidências de uma correlação entre PCM e neoplasias (99, 101). Marques & Shikanai-Yasuda (100), através de revisão da literatura verificaram uma incidência de 5,2 % de neoplasias nas séries estudadas sendo mais frequentes os carcinomas. Os autores sugerem que as disfunções da imunidade celular, próprias da PCM, associadas a fatores locais (como inflamação crônica) e co-fatores tais como tabagismo, possam ter algum papel na transformação maligna.

Quanto à frequência de pacientes portadores de HIV e PCM, a incidência é pequena em comparação com as outras micoses sistêmicas associadas à SIDA, como candidíase, criptococose, histoplasmoze e coccidioomicose (102, 103). Existem mais de 77 casos descritos no Brasil, a

maioria no estado de São Paulo. Acredita-se que o uso profilático de SMZ/TMP na prevenção de pneumocistose e toxoplasmose em pacientes HIV+ seja uma das causas, já que a maioria dos pacientes com HIV e PCM associadas não fazia uso de SMZ/TMP profilático no momento do diagnóstico (104) da micose. A PCM nos pacientes com SIDA se apresenta como doença grave e disseminada semelhante à forma juvenil (105). Os pulmões são também frequentemente envolvidos (63 %) seguidos da pele (48,1 %) e linfonodos (37 %). A hepato-esplenomegalia é comum e há relatos de envolvimento do SNC (34). A histopatologia das lesões mostra granulomas mal formados ricos em fungos no interior (106). A letalidade é mais alta e gira em torno de 30 % (34).

### 2.1.9. Diagnóstico

O diagnóstico de PCM se baseia em aspectos clínicos, epidemiológicos, radiológicos e imunológicos. A confirmação deve ser feita pela identificação do agente etiológico em exame direto ou cultura de amostra de material biológico. Nas preparações para exame microscópico direto, o *P. brasiliensis* é facilmente visualizado e identificado por sua morfologia peculiar, com elementos arredondados de tamanhos diferentes, brotamentos múltiplos e parede birrefringente.

Os antígenos de *P. brasiliensis* utilizados nos testes intradérmicos para verificação de reação de hipersensibilidade retardada são denominados paracoccidioidinas, obtidos de diversas preparações e contendo antígenos somáticos e metabólicos de micélios e leveduras de *P. brasiliensis*. A paracoccidioidina mais amplamente utilizada é a de Fava Netto & Raphael (107) e o teste intradérmico é realizado para verificar infecção pelo *P. brasiliensis*. A utilidade destes testes para diagnóstico é pouca, já que indicam apenas que o paciente foi infectado e as preparações antigênicas de paracoccidioidina não permitem discriminação entre PCM e outras micoses devido à ocorrência de reações cruzadas. Têm valor prognóstico, uma vez que refletem o estado imunológico do paciente. Posteriormente, a gp43 foi introduzida em testes intradérmicos (108). Mesmo induzindo a reações de hipersensibilidade retardada, um teste negativo com gp43 não afasta o diagnóstico da micose, uma vez que os pacientes podem apresentar anergia específica aos antígenos de *P. brasiliensis* (55).

O diagnóstico sorológico é importante, principalmente em vigência de lesões de difícil acesso à obtenção de amostra para exame. Vários testes são utilizados, com base na pesquisa de

anticorpos específicos contra o *P. brasiliensis*. A sensibilidade e a especificidade estão na dependência do teste empregado e do antígeno utilizado. A imunodifusão dupla - Ouchterlony (IDD) é o teste mais utilizado na rotina, devido à facilidade de execução, à alta especificidade (100%) e sensibilidade (89 %), o que lhe confere um valor preditivo positivo próximo de 100 % (109, 110).

O exame histopatológico da PCM usualmente apresenta numerosos granulomas com células gigantes do tipo Langhans com elementos parasitários de diversos tamanhos, brotamentos simples ou múltiplos. A figura de gemulação múltipla, em roda de leme é considerada o único elemento específico para caracterização da lesão por *P. brasiliensis*, que é melhor evidenciado nas colorações com o PAS e, principalmente com impregnação argêntica.

Outros exames rotineiramente realizados incluem hemograma, que mostra, em geral, discreta anemia e com certa frequência, eosinofilia. Há uma inversão da relação albumina/globulina às custas do aumento da fração  $\gamma$ , e acompanham a atividade da doença. A velocidade de hemossedimentação (VHS) e as mucoproteínas séricas estão elevadas.

As alterações radiológicas pulmonares, encontradas no estudo de radiografias simples de tórax, geralmente são intersticiais ou alveolares (111) ou mistas, mas podem apresentar diferentes padrões, simulando outras doenças (64) e, algumas vezes, podem ser superponíveis com as da tuberculose (93). O reconhecimento destes aspectos é muito importante para o diagnóstico e acompanhamento dos pacientes com PCM. Da mesma forma raros são os casos de comprometimento pulmonar com comprovação radiológica que evoluem sem seqüelas, após o tratamento específico, tornando-se o estudo evolutivo, seqüencial e comparativo obrigatório para determinar a regressão do processo pulmonar. A tomografia computadorizada de tórax (TCT) de alta resolução, utilizada em casos de PCM pulmonar, tem sido apontada como de grande valor, demonstrando alterações em áreas aparentemente normais no método convencional (112). Outros exames de imagem como a ressonância magnética são muito úteis no diagnóstico, e principalmente no acompanhamento pós terapêutico de lesões do SNC (113).

#### **2.1.10. Tratamento e controle de cura**

A PCM era uma doença inexoravelmente fatal até 1940 quando foi introduzida a sulfapiridina por Ribeiro (114), mostrando seu valor no tratamento da micose e alterando assim o

prognóstico da doença. A obtenção da cura ainda é difícil mesmo nos dias de hoje, devido ao acesso restrito dos pacientes a todas as drogas disponíveis, à instituição terapêutica tardia em doença avançada, ao término precoce do tratamento por abandono, às recaídas frequentes e por último à resistência do *P. brasiliensis* a agentes terapêuticos (115).

O tratamento atualmente recomendado começa pela supressão dos hábitos associados, como alcoolismo e tabagismo, além do tratamento de doenças associadas e principalmente da desnutrição, com dieta adequada, suplementação vitamínica e, nos casos indicados, nutrição enteral ou parenteral (116). O tratamento específico se baseia na associação de sulfametoxazol e trimetoprim (SMZ/TMP), que têm ação fungistática e compõem o fármaco mais utilizado na prática, por oferecer bons resultados terapêuticos e por sua obtenção gratuita no sistema público de saúde. Geralmente bem toleradas, as sulfas podem ocasionar poucos efeitos colaterais, destacando-se, pela frequência, as manifestações de hipersensibilidade e a cristalúria. Existe certa resistência de alguns autores em se utilizar SMZ/TMP para o tratamento dos pacientes infanto-juvenis, mas Pereira et al. (51) utilizaram essa associação como primeira escolha em 50 episódios de PCM de 63 crianças menores que 15 anos melhora significativa dos parâmetros de cura.

A anfotericina B, antifúngico de largo espectro, tem ação fungistática, atua bem na maioria dos casos de PCM e está indicada nos pacientes com resistência ou intolerância às sulfas, nos casos muito graves, dos quais se espera resposta terapêutica mais rápida e nos casos onde haja comprometimento da absorção intestinal. Muito tóxica, a anfotericina B é responsável por numerosos efeitos colaterais, como febre, calafrios, náuseas, vômitos, retenção de escórias nitrogenadas, arritmias cardíacas, hipocalemia e, frequentemente, anemia (117), sendo reservada para casos mais graves.

Os derivados azólicos (cetoconazol, fluconazol e itraconazol) em geral são bem tolerados, porém a monitorização da função hepática é especialmente indicada nos primeiros meses de tratamento, devido à hepatotoxicidade do cetoconazol (118). O metabolismo do cetoconazol é acelerado pela rifampicina (119), uma droga utilizada com frequência nos pacientes com PCM devido à associação com tuberculose. O fluconazol, por atingir nível terapêutico no sistema nervoso central, é atualmente a opção ideal para o tratamento da neuroparacoccidiodomicose. Sua concentração tissular é menor que a do itraconazol por não ser uma droga lipofílica (118, 120). O voriconazol tem sido utilizado com sucesso porém seu custo é alto e os estudos comparativos ainda estão sendo realizados (121).

Outras alternativas terapêuticas têm sido estudadas focando especialmente a imunestimulação como coadjuvante do tratamento clássico (122), e até associação de drogas para casos isolados de pacientes com alta frequência de recaídas (22, 123).

A adesão dos pacientes ao tratamento da PCM é baixa. Paniago et al. verificaram uma taxa de abandono de 69,9% (25) em seus pacientes, enquanto Valle et al. encontraram 30,8% (124). A moradia longínqua, os baixos níveis sócio-culturais e co-morbidades como o alcoolismo podem estar contribuindo para a baixa adesão (19).

Costa (22) verificou uma frequência de abandono de 45,1%, embora 193 (77,8%) pacientes tenham evoluído para cura total aparente ao final do estudo, com períodos de seguimento pós-terapêutico variando entre seis meses e 11 anos. Apenas 68,1% dos pacientes evoluíram para cura total aparente com o primeiro tratamento, havendo recaída em 18,8 %, resistência em 1,1 %. Neste estudo foi demonstrado que a maior parte dos tratamentos ineficazes foi realizada de maneira irregular (77,3 %).

Existem muitos estudos comparando os esquemas de tratamento utilizados nesta micose, porém são apenas relatos de séries de casos com pouca uniformidade entre as metodologias, esquemas terapêuticos usados e dosagens (125). Existe apenas um estudo recente randomizado, com 42 pacientes que comparou itraconazol, cetoconazol e sulfadiazina, para tratamento da PCM. Os autores não encontraram superioridade de nenhum regime sobre outro quanto à resposta clínica e sorológica ao tratamento (126).

Recentemente um grupo de consultores se reuniu e elaborou um consenso de abordagem clínica e terapêutica da PCM, no qual são indicados o itraconazol e a associação SMX/TMP para tratamento ambulatorial das formas leves a moderadas, sendo que os últimos são preferenciais nos ambulatórios da rede pública devido à sua distribuição gratuita (127). O tempo de tratamento preconizado varia de 6 a 24 meses.

Quanto à avaliação de cura, costuma-se usar o termo “cura total aparente”, devido à impossibilidade de confirmação da erradicação do fungo do organismo. Esta é alcançada na maioria das vezes após 2 anos de tratamento completo e regular, mediante **cura clínica micológica, radiológica e imunológica** (118).

## CAPÍTULO 3

### 3.1 MATERIAL E MÉTODOS

*Local de estudo e recrutamento:* o IPEC é um centro de referência para micoses e recebe anualmente em média 23 a 25 pacientes novos, portadores de PCM, para acompanhamento. Está localizado em uma área endêmica para PCM. A maioria dos pacientes é referenciada de áreas rurais dos Estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais e São Paulo. A abordagem clínica dos pacientes inclui uma equipe multiprofissional, que inclui atendimento médico, farmacêutico, psicológico, nutricional e de assistência social. Além disso, outros especialistas além dos infectologistas participam da abordagem clínica e terapêutica dos pacientes.

*Desenho do estudo:* estudo de coorte retrospectivo de revisão dos prontuários dos pacientes acompanhados longitudinalmente, com início a partir da utilização do protocolo de investigação clínica e abordagem terapêutica (anexo 1).

*Critérios de inclusão:* pacientes com diagnóstico de PCM confirmado no IPEC através da evidência do *P. brasiliensis* em material biológico (secreções ou fragmentos de biópsias) e com tratamentos iniciados entre janeiro de 1987 a dezembro de 2004.

*Critérios de exclusão:* pacientes cujos registros não apresentassem as informações requeridas para os estudos. Para o primeiro estudo, pacientes que não completaram o tratamento preconizado pelo serviço. Para o segundo estudo pacientes cujos registros não continham informações sobre as datas de início e final de tratamento.

*Coleta de dados:* os dados coletados a partir do prontuário foram registrados em ficha própria (anexo 2) e armazenados em um banco de dados através do pacote estatístico SPSS v. 11.0.

*Definição das variáveis:*

O grau de acometimento foi categorizado em leve, moderado e grave, de acordo com Mendes (42). Pacientes com doença grave apresentam três ou mais sinais como febre, altos títulos de anticorpos, desnutrição, envolvimento de outros sítios como as adrenais ou o SNC, lesões cutâneas múltiplas, fistulização ganglionar e hepatoesplenomegalia (na FJ). Os pacientes com doença leve não apresentam os sinais citados acima e os com doença moderada apresentam grau intermediário entre os dois pólos.

Os critérios de desnutrição foram baseados na perda de mais de 10% do peso corporal com retorno ao normal após o tratamento, alterações de parâmetros antropométricos (IMC) além de parâmetros laboratoriais (transferrina, albumina e hemoglobina séricas).

Os pacientes com baixa reserva adrenal foram assim classificados por apresentarem menos de 20 $\mu$ g/dl de cortisol sérico aos 30 minutos após teste de estímulo rápido com ACTH.

Foram considerados tabagistas pacientes que fumavam pelo menos um cigarro por dia e não tabagistas os que não fumavam ou tinham deixado de fumar há pelo menos seis meses. Etilistas se auto-referiam como tendo o hábito de ingerir bebidas alcoólicas regularmente, e foram subdivididos em: (1) etilistas pesados – que faziam uso regular de bebidas destiladas; (2) etilistas moderados os que faziam uso bebidas de menor teor alcoólico.

A definição de DPOC foi baseada em observação clínica e/ou alteração nos parâmetros espirométricos (volume expiratório forçado em um segundo).

A regularidade do tratamento foi definida como uso contínuo da medicação sem interrupções acima de uma semana.

A cura clínica foi definida como: desaparecimento dos sinais e sintomas presentes antes do tratamento, com retorno do peso a níveis habituais e normalização das alterações em exames complementares inespecíficos. A cura micológica: desaparecimento do *P. brasiliensis* dos exames nos quais foi identificado. A cura imunológica: diminuição dos títulos de imunodifusão a zero ou sua manutenção em níveis baixos estáveis ( $\leq$  1:4). A radiológica: desaparecimento ou melhora (evolução para padrão de fibrose) das alterações radiológicas presentes antes do tratamento. A cura total aparente (CTA): estado de cura clínica, micológica, imunológica e radiológica.



A recaída clínica foi definida como reaparecimento das manifestações clínicas e/ou radiológicas (após início de tratamento) com confirmação micológica e/ou imunológica de atividade da doença, após um período variável de cura clínica, mediante tratamento incompleto ou irregular.

A recaída imunológica foi definida como: aumento de pelo menos quatro vezes a titulação da sorologia, associado à recaída clínica. A resistência como persistência de sinais de micose ativa durante mais de 2 meses de tratamento regular, ou reaparecimento (após remissão) dos mesmos em vigência de tratamento regular nas doses preconizadas pelo serviço. A intolerância foi definida como impedimento na continuação do tratamento por efeitos colaterais.

A cura total aparente foi considerada como desfecho favorável, enquanto as recaídas, a resistência e os óbitos foram atribuídos aos desfechos desfavoráveis.

O abandono de tratamento foi definido como o não cumprimento do tempo de tratamento preconizado pelo serviço, ou seja, 12 meses para o tratamento com itraconazol e cetoconazol e 24 meses para o tratamento com SMZ/TMP e fluconazol.

*Casuística:* foram analisados os dados de todos os pacientes elegíveis (436 pacientes).

*Estatística:* Um modelo logístico preditor da evolução (favorável/desfavorável) foi construído a partir de variáveis de risco/proteção ao desfecho de acordo com a relevância teórica e/ou alcance de relação estatística significativa nas análises bivariadas. Primeiramente, para as variáveis categorizadas, utilizou-se os testes qui-quadrado de Pearson ou Exato de Fisher segundo o desfecho e teste não-paramétrico de Mann-Whitney nas variáveis contínuas (idade e tempo de tratamento), considerando significantes aquelas variáveis com p-valores abaixo de 0,2.

As variáveis testadas foram agrupadas de acordo com o grupo de pertencimento: *sócio-demográfico, co-morbidades, tratamento*. Esses grupos foram construídos para permitir a análise hierárquica através dos blocos de importância, sendo o nível mais distal “sócio-demográfico” e o mais proximal “tratamento”. O software utilizado para o modelo logístico foi o R 2.5.1 através dos packages *stat* e *MASS*. A análise da significância da entrada das variáveis no modelo foi efetuada através da comparação da qualidade de ajuste pelo critério de Akaike (AIC) através do método *stepwise*. Quanto menor o valor de AIC, melhor a indicação de ajuste do modelo.

*Ética:* Os estudos fizeram parte de um projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas sob o número 0026.0.009.000-06. O terceiro estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz e os pacientes foram incluídos no estudo após assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

## CAPÍTULO 4

### **Factors of influence in the outcome of paracoccidioidomycosis treatment**

Manuscrito submetido à revista Clinical Infectious Diseases:

CID-08-006-50

Costa RLB, Costa MJM, Boia MN, Oliveira RVC, Cardoso CSA, Camacho LAB, Rolla, VC and Valle, ACF. Factors of influence in the outcome of paracoccidioidomycosis treatment. Clin Infect Dis 2008.

Os pacientes portadores de PCM apresentam, no momento do diagnóstico e ao longo dos períodos de tratamento, diferentes graus de acometimento e grande variedade de co-morbidades, como alcoolismo, tabagismo, parasitoses, DPOC e até neoplasias.

Até o momento, não existem no Rio de Janeiro estudos que tenham analisado a frequência destes fatores e sua influência nas respostas terapêuticas dos pacientes.

Este trabalho teve como objetivo avaliar, através de abordagem diagnóstica específica e padronizada, o impacto de fatores sócio-demográficos, clínicos, de co-morbidades e relacionados ao tratamento nos desfechos comuns da paracoccidioidomicose.

O estudo faz parte de uma linha de pesquisa em PCM existente no IPEC da qual os autores participam, desde a implantação do protocolo de abordagem clínica e terapêutica.

*Running title: Factors of outcome in paracoccidioidomycosis*

FACTORS OF INFLUENCE IN THE OUTCOME OF PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS  
TREATMENT.

Regina L. B. Costa<sup>1</sup>, Marli J. M. Costa<sup>1</sup>, Marcio N. Bóia<sup>2,4</sup>, Raquel V.C. de Oliveira<sup>1</sup>, Claudia S. A. Cardoso<sup>1</sup>, Luiz A. B. Camacho<sup>3</sup>, Valeria C. Rolla<sup>1</sup>, Antonio C. F. do Valle<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Instituto de Pesquisa Clinica Evandro Chagas – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratório de Doenças Parasitárias – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil;

<sup>3</sup>Escola Nacional de Saúde Pública – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>4</sup>Serviço de Doenças Infecciosas – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

Correspondence to:

Regina Lana Braga Costa, MD. MsC.

Instituto de Pesquisa Clinica Evandro Chagas – Fundação Oswaldo Cruz.

Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ CEP 21040-900, Brazil.

Phone + 55 (21) 38659601. Fax: + 55 (21) 38659607

E-mail: [regina.lana@ipec.fiocruz.br](mailto:regina.lana@ipec.fiocruz.br)

Keywords: Paracoccidiodomycosis, strongyloidiasis, adherence, treatment outcomes.

## ABSTRACT

### ***Background***

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a neglected endemic disease of Latin America. There are no studies evaluating the influence of features such as demographic and socioeconomic profiles, comorbidities, and drug regimens in the therapeutic response of PCM patients. The main purpose of this work is to evaluate the impact of such covariates in the outcome of PCM treatment.

### ***Methods***

We performed a retrospective cohort study at an Infectious Disease Research Center in Rio de Janeiro, Brazil, from January 1987 to December 2007, including patients with diagnosis of PCM. A hierarchical logistic model was developed to identify variables associated to treatment outcomes after a series description, with a confidence interval of 95% for the final model.

### ***Results***

We included 436 patients for the exploratory analysis and 213 who completed treatment for the logistic regression. The majority of patients were male (89.4 %), of white race (54.3%). Mean age was 47 (S.D.:12.4) years and the chronic form was predominant (92.9%). Age, ethnicity, professional activities, clinical form, severity of disease, strongyloidiasis and regularity of treatment achieved a p-value <0.2 and were selected for the final model. In logistic regression, the acute form (AF), strongyloidiasis and treatment irregularity were predictors of unfavorable outcomes.

### ***Conclusions***

Our results suggests that patients should be managed closely to avoid treatment failure; PCM patients should be routinely screened and treated for strongyloidiasis and, in case of lack of Bearman-Moraes techniques for larvae detection, they should receive empirical treatment; shorter therapeutic regimens could contribute to a better adherence to therapy.

## INTRODUCTION

Paracoccidioidomycosis (PCM) is one of the most common systemic mycosis of Latin America and is caused by *Paracoccidioides brasiliensis*, a dimorphic fungus which probably lives saprophytically in soil [1]. There are evidences that the infection takes place through the inhalation of airborne propagules of the fungus and that the lungs are the primary focus of the lesions [2].

Brazil is situated at the endemic area and most patients live especially in the Southern and Southeastern regions [3, 4], although at the Amazonian region PCM may be considered an emerging disease as long as more than 800 cases have been notified over the last 6 years [5]. The disease is not of mandatory reporting and its frequency has been estimated as an annual incidence of one to three cases per 100.000 habitants in highly endemic areas [6]. This mycosis is relevant as a common cause of death among the chronic/recurrent infectious and parasitic diseases. Moreover, is one of the most important causes of mortality as systemic mycosis in Brazil [7].

Clinical manifestations range from asymptomatic pulmonary lesions to generalized systemic infections [8]. The acute or subacute form (AF) is characterized by systemic lymphadenopathy, hepatosplenomegaly, bone marrow dysfunction, and a great impairment of patient's general condition, especially in young individuals. It usually affects children, adolescents and young adults. The chronic form (CF) presents progressive pulmonary or extra pulmonary manifestations (mucocutaneous, lymph nodes, adrenal glands, upper respiratory and digestive tract, bone, central nervous system and others). It usually affects adults older than 30 years [9]. High serum antibody titers, tumoral or suppurative lymph node hypertrophy, intense impaired general condition and fever are commonly seen in the severe forms of the disease [9, 10].

The association between PCM and comorbidities has been reported [11-15] and may affect the clinical presentation and response to treatment. Alcohol abuse and smoking were shown as predisposing factors to PCM and account for a worse prognosis for this infection [16, 17], at least due to the poor compliance to treatment of such patients.

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) may be present before treatment as a sequel of a previous PCM or as a result of smoking [18, 19]. Malignant neoplasms [11], strongyloidiasis [20, 21], tuberculosis [11, 22], as well as leprosy [23] are described as comorbidities in PCM patients.

To the best of our knowledge, there are no studies evaluating the influence of features such as demographic and socioeconomic profiles, comorbidities, and drug regimens in the therapeutic response of PCM patients

The main purpose of this work is to evaluate the impact of such variables in the outcome of PCM with the aim of contributing to better conceptions of the clinical approach and treatment of this mycosis.

## **METHODS**

### ***Study design***

This is a retrospective cohort study in PCM patients followed up from January 1987 to January 2007. The association of treatment outcomes to sociodemographic and clinical variables were explored.

### ***Place and recruitment***

The study group was made up of patients from Instituto de Pesquisa Clinica Evandro Chagas (IPEC), which is a Reference Center for diagnosis and treatment of infectious diseases, including systemic mycosis. It is located in Rio de Janeiro, and provides ambulatory care and hospitalization to selected infectious diseases. The clinical approach of patients involves a multidisciplinary health care team, with specialists in infectious diseases and other professionals participating in diagnosis process and specific treatment of comorbidities.

### ***Inclusion criteria***

The study included patients that had evidences of *P. brasiliensis* in direct examination, histopathology and/or culture of clinical specimen, with treatment regimens initiated between January 1987 and December 2004.

### ***Exclusion criteria***

Patients' records without the informations required, and patients who abandoned the treatment recommended by our protocol.



### ***Data collection and follow up***

All patients included were submitted to the Protocol for Clinical Approach and Treatment of Paracoccidioidomycosis, implemented in January of 1987 [24]. Data collected from records included demographic and social variables (age, sex, race, education and profession), comorbidities, as well clinical forms, therapeutic regimens and outcomes. The follow up period varied from 16 months to 20 years.

Besides clinical examination, patients were submitted to: complete blood count, blood biochemistry, immunodiffusion test (Ochterlony), urine and stool studies (including Baermann-Moraes technique), sputum smear microscopy and culture for *Mycobacteria*, mycological approach for *P. brasiliensis*, plasma cortisol dosages (basal and post adrenal corticotropin test), systematic examination of the upper respiratory and digestive tract (URDT) and image studies. Anti-HIV tests were performed in patients with signs and symptoms suggesting acquired immunodeficiency syndrome (AIDS).

### ***Variable definitions***

Severe disease was characterized by three or more of the following elements: fever, high titers of antibodies, malnutrition, involvement of adrenals or central nervous system (CNS) and lymph node fistulization. Patients with moderate disease showed less than three of those signs and those with mild disease did not show those complications [9].

The protein-energy malnutrition was based on weigh loss of more than 10% associated to lower indices of at least three anthropometrical and two laboratorial parameters (BMI, mid-arm muscle circumference, triceps skinfold thickness, serum albumin, hemoglobin and transferrin).

The “smokers” categories included: (1) current smokers, who had been smoking daily for at least one month prior to diagnosis; and (2) non smokers, who never smoked or had quit smoking for more than six months.

Alcohol consumption was defined as: heavy drinkers, those who made regular use of distilled beverages, and mild to moderate drinkers those who made regular ingestion of beverages of lower alcohol concentration.

The criteria used to define COPD were clinical alterations and/or abnormal spirometry.

PCM treatment consisted in two steps: an initial phase of two months using higher doses of medication followed by a maintenance period which lasted for at least 12 months (in the case of itraconazole and ketoconazole) and 24 months for cotrimoxazole and fluconazole.

Adherence to treatment was defined as continuous use of medication with no discontinuations greater than one week.

A favorable outcome was defined as the development of apparent cure [25]. Unfavorable outcomes were defined as relapse (reappearance of signs and symptoms after a period of clinical remission), resistance (persistent lesions after at least 2 months of regular and continued therapy) and death.

### ***Statistical analysis.***

In bivariate analyses with categorical data, Pearson Chi-square or Fisher exact test was used. In continuous variables (age and duration of treatment), Mann-Whitney non-parametric test was used. A logistic model was used to predict favorable outcome using risk and protection variables according to theoretical relevance and/or statistical significance in bivariate analyses. In keeping with the proposal of the study to explore the favorable evolution, only completed advocated treatment data was used for the multivariate analysis (n=213 patients).

The variables were grouped in three levels: *Demographic and socio-economic*, *Comorbidity*, *Treatment*. These levels were constructed to allow hierarchical analyses related to the levels. The level “Demographic and socio-economic” was the most distal level and “Treatment” was the most proximal. All the variables reaching a p-value  $<0.2$  at the bivariate analysis were included in the hierarchical logistic model, enclosing two other variables due to their clinical relevance: cotrimoxazole and itraconazole use.

Thus, three logistic models were performed according to the level in three steps:

**Model 1:** “Demographic and socio-economic” variables

**Model 2:** Variables with statistical significance at model 1 + “Comorbidity” variables

**Model 3:** Variables with statistical significance at model 2 + “Treatment” variables

The software R 2.5.1 was used for to statistical analysis with packages *stat* and *MASS*. Inclusion criteria involved *stepwise* method through *Akaike criterion* (AIC). The goodness of fit was reached when AIC was the least.

**Ethics.** This study was approved by the Ethics Committee of the Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas by the protocol number 0026.0.009.000-06 .

**Financial support:** This study had no financial support

## RESULTS

### *Exploratory analysis*

This study included 436 patients, 390 (89.4%) males and 46 (10.6%) females. Most patients (227) referred themselves as white race (54.3%) and 191 (45.7%) as mulattos or black. Age varied from 4 to 77 years, with a mean age of 47 (S.D.: 12.4) years and predominance between fourth and fifth decades of life.

Education data showed that 192 (47.5%) patients had not yet completed elementary school and 84 (20.8%) were illiterate. Elementary school was complete in 127 (31.4 %) patients and only one (0.2%) had gone to University.

At the time of diagnosis, only 175 (44.2%) of patients reported occupations requiring some exposure to the soil, such as farm laborers and gardeners, masons, house-keepers or woodcutters; 221 (55.8%) had no activities related to this type of exposure. Regarding previous occupations, 266 (72.4%) patients had had activities with exposure to the soil while 101 (27.5%) had not.

Ninety percent of the patients had chronic forms (Table I). The disease was moderately severe in 216 (49.8%). Severe cases were more frequent among the AF (61.4%).

Regarding the severity of the disease, 216 patients presented moderate disease (49.8%) and the severe cases were more frequent among the patients with AF (61.4%).

Smoking and alcohol abuse were the most common comorbidities but a high prevalence of parasitosis was also seen. CF and AF differed only in frequency of tuberculosis and other helminthiasis. The frequency strongyloidiasis was significantly higher in patients with the chronic form (Table II). In 93.6% cases of strongyloidiasis, the parasite was detected during active PCM while in 6.4% of cases strongyloidiasis was present during follow up period.

A significant difference of the frequencies between clinical forms of PCM also occurred with alcohol abuse, smoking and COPD. Tobacco use and alcohol abuse were observed in the majority of patients with CF contrasting with the AF. Tuberculosis was frequent among these patients even in AF.

Less frequently found comorbidities were hypertension (6.0%), giardiasis (3.2%), amebiasis (3.0%), malignancies (2.3%), dyslipidemia (2.1%), diabetes mellitus (1.8%) and leprosy (1.8%). We report only three cases associated with AIDS (0.7%).

The most common drug regimens used were cotrimoxazole (75.5%), itraconazole (20.6%), fluconazole (1.4%) and, less frequently, ketoconazole (4.8%) and amphotericin B (1.6%).

After the first treatment, outcomes were unfavorable in 25.6% of cases of PCM, whereas in 74.4% cases treatment was successful.

### ***Logistic Regression***

Two hundred twenty three patients who did not complete the treatment recommended by our protocol were excluded from logistic regression as they lacked outcome data. Bivariate analyses were created to identify variables of impact in the PCM outcome and are shown. Statistically significant variables (p-value <0.2) in Chi-square or Mann-Whitney were marked with \*.

- **Level 1 “Demographic and socio-economic”:** Age\*, gender, ethnicity\*, education, professional activities\*, clinical form\*, severity of disease\*, duration of the disease before treatment

- **Level 2 “Comorbidity”:** Tuberculosis, strongyloidiasis\*, other geo-helminthiasis, malignancies, emphysema, COPD, *cor pulmonale*, other diseases, smoking, alcohol abuse\*
- **Level 3 “Treatment”:** Previous treatment, regularity of treatment\*, cotrimoxazole, Itraconazole, Amphotericin B, ketoconazole, fluconazole, intravenous cotrimoxazole use.

Through the AIC analysis, only two significant variables were found (clinical form and severity of the disease) in Model 1; in Model 2, the variables strongyloidiasis and alcohol abuse were added; at last, in Model 3, statistical significance was found with the entry of the variables regularity of treatment and itraconazole use.

Table III shows the final model selected by stepwise method (AIC) with their respective odds ratio.

The model which better explains the variability of these data is composed by clinical form, the severity of disease, strongyloidiasis, alcohol abuse, regularity of treatment and itraconazole use. Nevertheless, only three of them present significant coefficients at 5% level in relation to the reference category: clinical form, strongyloidiasis and regularity of treatment. Patients with chronic form have 64 times more chances of presenting a favorable outcome. Patients with no strongyloidiasis presented 65 times more chances of a favorable outcome than those with this helminthiasis.

One of the most important factors about PCM treatment is its regularity, and patients with regular treatment have 39 times more chances of a favorable outcome than those with poor adherence.

Even though the remaining categories have not presented a significant p-value, chances of a favorable outcome are increased at least six times.

## DISCUSSION

Middle age males, with low degree of education, and self referred white race characterized the socio-demographic profile of this series. Those characteristics are well documented in other series [6, 15]. Nevertheless in the AF we found a predominance of young adults and few children, that could be explained both by the rarity of PCM in childhood [9] and by the absence of a pediatric unit at our Center.

Although PCM frequently occurs in rural workers, most patients did not report activities with soil exposure at the time of diagnosis, but reported contact with the soil in previous activities, as described also by Blotta et al. [3].

In this series either smoking or alcohol abuse occurred predominantly in CF, probably because they were on average, older than AF patients although most of our AF patients were young adults. Paniago et al. [15] observed 68.3% of alcohol abuse among their patients, while Veras [26] observed solely 31.6% in a series of high incidence of AF patients (38%). Surprisingly tobacco use and COPD were not predictors of unfavorable outcomes, although tobacco use showed a high OR. This finding could be explained by the fact that 90% of patients smoked, which could impair the effect of non smokers in the analysis.

Tuberculosis frequency in this study was much higher than the general incidence rates in the state of Rio de Janeiro (approximately 100 per 100,000). Other studies showed different frequencies, ranging from 5.8 to 19.0% [11, 21, 27]. Several of the risk factors for poor prognosis of PCM are known risk factors for tuberculosis, such as, ethanol and tobacco abuse and low socioeconomic status. Besides, in our opinion the protocol used since 1987 by our group, that routinely included screening for *M. tuberculosis*, may have contributed to a higher detection of tuberculosis in PCM patients.



The high prevalence of strongyloidiasis in CF patients and its low prevalence in patients with AF, found in our study, is previously reported by other authors [28]. The prevalence of strongyloidiasis found in our CF patients was higher than those found in many clinical and epidemiological surveys performed in Brazil [15, 29-32]. Studies which reveal values higher than 30% utilized modified Baerman-Moraes technique [33]. It is hard to estimate the real prevalence of *S. stercoralis* in Brazilian population due to: lack of use of more sensitive techniques, which probably underestimated some of the results [34]; surveys performed in areas with different degrees of urbanization; lack of screening protocols to proper detection of larvae in asymptomatic patients.

The most likely hypothesis for the association between PCM and strongyloidiasis is a deregulation of the immune system, induced by both etiologic agents that could result in failure in controlling both infections, with consequent appearance of active PCM and the perpetuation of *S. stercoralis* auto infection.

It is well-known that the protective immunity in PCM is effected by a Th1 profile, which is defective in the patients with the active mycosis, whose T lymphocytes produce low levels of IL-2, IL-12 and IFN- $\gamma$  [35]. The high number of patients with strongyloidiasis suggests that the role of Th2 lymphocytes in PCM with CF patients can be also compromised, in view of the role of Th2-memory cells in the control of intestinal parasitosis. The relevance of Th2 cytokines in controlling *S. stercoralis* infection has also been demonstrated by the preferential production of IL-4 and IL13 [36].

In our study, in 93.6% of the cases of strongyloidiasis the worm was detected during the active PCM, suggesting that the roles Th1 and Th2 would be compromised in these patients. It is probable that a defect in a basic mechanism at the induction of cellular immune response such as,

for instance, at the expression of Toll-like receptor (TLR) in dendritic cells could occur, being likely to lead into infection by *P. brasiliensis* as well as by *S. stercoralis*. A down-regulation of dendritic cell activation induced by *P. brasiliensis* was already reported [37]. Besides, a failure in TLR4 has also been shown to be important for the induction of human Th2-mediated responses, and more recently it was demonstrated that TLR4 is required for protective immunity to larval *S. stercoralis* in mice [38, 39].

In this context, the already mentioned chronic alcohol habits in our patients could contribute to such defect, since there are evidences of a negative regulation of TLR by alcohol, compromising the differentiation and maturation of dendritic cells [40]. We believe that the higher prevalence of strongyloidiasis in relation to other nematodes in PCM patients could also be explained by the behavior of autoinfection, characteristic of *S. stercoralis*.

In logistic regression, the AF of PCM, the irregularity of treatment and the presence of strongyloidiasis were the factors associated to unfavorable treatment outcomes.

Patients with AF are characterized by multiple organ involvement, which lead to higher severity and difficulty in treatment management [2, 10]. Malnourishment, which is usually present in AF patients [10], probably influenced the outcome of specific therapy.

Treatment adherence is a well known factor associated to poor outcomes, mainly in long term treatments. To support this observation, our study showed a trend to a favorable outcome in patients treated with shorter therapeutic regimens (itraconazole), although it was not significant in the final model. The sample size was probably insufficient to detect association of small magnitude and to assess interaction among covariates. Moreover, the magnitude of association with major risk factors may have been underestimated as a substantial proportion of patients with incomplete treatment were disregarded in multivariate analysis

Our results suggests that AF patients should be managed closely to avoid treatment failure; PCM patients should be routinely screened and treated for Strongyloidiasis and, in case of lack of Baerman-Moraes techniques for larvae detection, they should receive empirical treatment. A shorter therapeutic regimen may contribute to a better adherence to therapy.

***Acknowledgments:*** We thank Dr. Carla M. Vorsatz for the English review of the manuscript and Prof. Danuza Esquenazi for the contribution at the discussion.

***Conflicts of interest:*** The authors do not have an association that might pose a conflict of interest.

## TABLES

**Table I - Clinical Forms According to Gender of PCM patients followed at IPEC from  
January 1987 to January 2007  
(n=436)**

<b>Clinical Forms</b>	<b>Male</b>	<b>Female</b>	<b>Total</b>
	<b>N/%</b>	<b>N/%</b>	<b>N/%</b>
Chronic	364 (92.9)	28 (7.1)	392 (100)
Acute	26 (59.1)	18 (40.9)	44 (100)
Total	390 (89.4)	46 (10.6)	436 (100)

*N= number of patients*

**Table II – Frequency of Comorbidities According to Clinical Form of PCM.****Patients followed at IPEC from January 1987 to January 2007****(N=436)**

<b>Comorbidity</b>				<b>Total</b>	<b>p-value</b>
	<b>N</b>	<b>Chronic</b> <b>(N/%)</b>	<b>Acute</b> <b>(N/%)</b>		
Strongyloidiasis	418	175 (46.5)	2 (4.8)	177 (42.3)	<b>0.001</b>
Other helminthiasis	428	111 (28.8)	15 (34.9)	126 (29.4)	0.480
Tuberculosis	418	49 (13.1)	4 (9.3)	53 (12.7)	0.63
Alcohol abuse	405	262 (72.2)	9 (21.4)	271 (66.9)	<b>0.0001</b>
Smoking	419	361 (95.5)	18 (42.9)	379 (90.2)	<b>0.0001</b>
COPD	428	87 (22.7)	0	87 (20.3)	<b>0.0001</b>

*N = number of patients; % = proportion of cases; p-value of  $\chi^2$*

**Table III: Logistic Model Analyzing Factors of influence in the outcome of PCM in Patients****Followed at IPEC - January 1987 to January 2007****(N= 213)**

<b>OUTCOME (FAVORABLE X UNFAVORABLE)</b>		<b>Crude OR</b>	<b>CI (OR) 95%</b>		<b>Adjusted OR</b>	<b>CI (OR) 95%</b>	
Clinical Form	Chronic	2.75	0.82	9.30	64.90	<b>1.23</b>	<b>3421.94</b>
	Acute	1.00	-	-	1.00	-	-
Severity of the Disease	Mild or moderate	2.73	0.99	7.49	7.79	0.85	71.63
	Severe	1.00	-	-	1.00	-	-
Strongyloidiasis	No	3.36	1.12	10.06	65.53	<b>1.37</b>	<b>3138.69</b>
	Yes	1.00	-	-	1.00	-	-
Alcohol abuse	No	2.80	0.71	11.04	8.12	0.59	112.02
	Yes	1.00	-	-	1.00	-	-
Regularity of treatment	Regular	16.40	5.45	49.37	40.05	<b>4.41</b>	<b>363.96</b>
	Irregular	1.00	-	-	1.00	-	-
Itraconazole use	Yes	2.92	0.65	13.22	7.10	0.35	145.22
	No	1.00	-	-	1.00	-	-

*CI = confidence interval; OR = Odds ratio*

**REFERENCES**

1. Silva-Vergara ML, Martinez R, Chadu A, Madeira M, Freitas-Silva G, Leite Maffei CM. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibia, State of Minas Gerais, Brazil. *Med Mycol* 1998;36(1):37-42.
2. Benard G, Franco M. Paracoccidioidomycosis. In: William G, Roderick J, eds. *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections: Medical Mycology*. 10th ed. London: Hodder Arnold; 2005: 541-59.
3. Blotta MH, Mamoni RL, Oliveira SJ, et al. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. *Am J Trop Med Hyg* 1999;61(3):390-94.
4. Wanke B, Londero AT. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, eds. *Paracoccidioidomycosis*. 1st ed. Boca Ratón: CRC Press; 1994: 109-20.
5. Lima S, Durlacher R. Situação da paracoccidioidomicose em Rondônia. In: *Anais do XXXIX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*; Belém, Pará, Brazil; 2003: 30.
6. Londero AT, Ramos DD. Paracoccidioidomicose. Estudo clínico e micológico de 260 casos observados no interior do Rio Grande do Sul. *Jornal de Pneumologia* 1990;16:129-32.
7. Coutinho ZF, Silva D, Lazera M, et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saude Publica* 2002;18(5):1441-54.
8. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* 1993;6(2):89-117.



9. Mendes RP. The Gamut of Clinical Manifestations. In: Franco MF, Lacaz CS, Restrepo Moreno A, Del Negro G, eds. *Paracoccidioidomycosis*. 1st ed. Boca Raton: CRC Press; 1994: 233-58.
10. Pereira RM, Bucaretychi F, Barison Ede M, Hessel G, Tresoldi AT. Paracoccidioidomycosis in children: clinical presentation, follow-up and outcome. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2004;46(3):127-31.
11. Leao RC, Mendes E. Paracoccidioidomycosis, neoplasia and associated infections. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1980;8(3):185-88.
12. Shikanai-Yasuda MA, Segurado AA, Pinto WP, et al. Immunodeficiency secondary to juvenile paracoccidioidomycosis: associated infections. *Mycopathologia* 1992;120(1):23-28.
13. Marques SA, Conterno LO, Sgarbi LP, et al. Paracoccidioidomycosis associated with acquired immunodeficiency syndrome. Report of seven cases. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1995;37(3):261-65.
14. Silva-Vergara ML, Teixeira AC, Curi VG, et al. Paracoccidioidomycosis associated with human immunodeficiency virus infection. Report of 10 cases. *Med Mycol* 2003;41(3):259-63.
15. Paniago AM, Aguiar JI, Aguiar ES, et al. Paracoccidioidomycosis: a clinical and epidemiological study of 422 cases observed in Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003;36(4):455-59.
16. Martinez R, Moya MJ. The relationship between paracoccidioidomycosis and alcoholism. *Rev Saude Publica* 1992;26(1):12-16.
17. dos Santos WA, da Silva BM, Passos ED, Zandonade E, Falqueto A. Association between smoking and paracoccidioidomycosis: a case-control study in the State of Espirito Santo, Brazil. *Cad Saude Publica* 2003;19(1):245-53.

18. Lemle A, Wanke B, Miranda JL, Kropf GL, Mandel MB, Mandel S. Pulmonary function in paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis). An analysis of the obstructive defect. *Chest* 1983;83(5):827-28.
19. Valle AC, Guimaraes RR, Lopes DJ, Capone D. Thoracic radiologic aspects in paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1992;34(2):107-15.
20. Bóia MN, Do Valle ACF, Moura H, et al. Estudo da associacao da paracoccidioidomycose à estrongiloidíase. In: IIº Congresso Brasileiro de Micologia; Rio de Janeiro, Brazil: Sociedade Brasileira de Micologia; 1998: 93.
21. Valle ACF, Wanke B, Wanke N, Peixoto TC, Perez M. Tratamento da paracoccidioidomycose: estudo retrospectivo de 500 casos I. Análise clínica, laboratorial e epidemiológica. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 1992;67(5):251-54.
22. Oliveira E, Gramacho K, Severo L, Porto NS. Association between paracoccidioidomycosis and tuberculosis: study of 21 cases. *Pesquisa Médica (Porto Alegre)* 1993;27(1):18-23.
23. Vargas FJ, Amonzabel AR. Association of paracoccidioidomycosis with lepromatous leprosy. *Boletim Científico CENETROP* 1997;16(1):56.
24. Valle A, Costa R. Protocolo clínico para diagnóstico, tratamento e seguimento de pacientes portadores de Paracoccidioidomycose. Available at: <http://www.ipecc.fiocruz.br/pepes/micologia/mico.html>. Accessed 20/08/2007.
25. Mendes RP, Negroni R, Arechavala A. Treatment and control of cure. In: Franco MF, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, eds. *Paracoccidioidomycosis*. 1st ed. Boca Raton, FLA: CRC Press, Inc.; 1994: 267-69.
26. Veras K. Paracoccidioidomycose. Estudo epidemiológico e clínico de pacientes internados no Hospital de Doenças Infecto-contagiosas (HDIC) em Teresina, Piauí. Identificação de

reserváreas nos estados do Pará e Maranhão. [Masters]. Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ; Rio de Janeiro: 1995.

27. Machado Filho J, Miranda JL. Considerações relativas à blastomicose sul Americana. Evolução, resultados terapêuticos e moléstias associadas em 394 casos consecutivos. *O Hospital* 1961;375-412.
28. Nogueira SA, Potsch DF, Rapparini C, Nunes EP, Perissè ARS. Comparação da apresentação clínica da forma linfoganglionar (juvenil) da paracoccidioomicose. *Rev Soc Bras Med Trop* 1995;28 (Suppl):97.
29. Pereira A. Parasitose intestinal em Vassouras. *O Hospital* 1970;78:295-302.
30. Tavares-Dias M, Grandini AA. Prevalence and epidemiological aspects of enteroparasites in the population of Sao Jose da Bela Vista, Sao Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop* 1999;32(1):63-65.
31. Graeff-Teixeira C, Leite CS, Sperhacke CL, et al. Prospective study of strongyloidosis in patients with hematologic malignancies. *Rev Soc Bras Med Trop* 1997;30(5):355-57.
32. Zago-Gomes MP, Aikawa KF, Perazzio SF, Goncalves CS, Pereira FE. Prevalence of intestinal nematodes in alcoholic patients. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002;35(6):571-74.
33. Moraes R. Contribuição para o estudo do Strongyloides stercoralis e da estrongiloidíase no Brasil. *Revista do Serviço Especial de Saúde Pública* 1948;1:507-623.
34. Camillo-Coura L, Conceição M, Lanfredi R. Geo-helminthíases-enterobíase. In: Coura JR, editor. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005: 1026-56.
35. Benard G, Romano CC, Cacere CR, Juvenale M, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioomycosis. *Cytokine* 2001;13(4):248-52.

36. Finkelman FD, Wynn TA, Donaldson DD, Urban JF. The role of IL-13 in helminth-induced inflammation and protective immunity against nematode infections. *Curr Opin Immunol* 1999;11(4):420-26.
37. Ferreira KS, Lopes JD, Almeida SR. Down-regulation of dendritic cell activation induced by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunol Lett* 2004;94(1-2):107-14.
38. Dabbagh K, Dahl ME, Stepick-Biek P, Lewis DB. Toll-like receptor 4 is required for optimal development of Th2 immune responses: role of dendritic cells. *J Immunol* 2002;168(9):4524-30.
39. Kerepesi LA, Hess JA, Leon O, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D. Toll-like receptor 4 (TLR4) is required for protective immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *Microbes Infect* 2007;9(1):28-34.
40. Lau AH, Abe M, Thomson AW. Ethanol affects the generation, cosignaling molecule expression, and function of plasmacytoid and myeloid dendritic cell subsets in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol* 2006;79(5):941-53.

## CAPÍTULO 5

### **Paracoccidioidomycosis: factors associated with treatment abandonment**

Manuscrito submetido à revista International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases:

IJTLID-02-08-0133

Costa RLB, Vieira, IF, Oliveira RVC, Camacho LAB, Rolla, VC and Valle, ACF. Paracoccidioidomycosis: factors associated with treatment abandonment. Int J Tuberc Lung Dis 2008.

O abandono de tratamento é um fato descrito por alguns autores (25, 124), porém poucos relatam os motivos pelos quais os pacientes interrompem a terapia. Co-morbidades como alcoolismo provavelmente estão implicadas no absenteísmo destes pacientes.

Até o momento não identificamos estudos, no Rio de Janeiro, correlacionando os diversos fatores com possibilidades de influenciar no abandono do tratamento dos pacientes com PCM. Pretendemos então, através de análise de dados sistematicamente coletados, verificar quais os fatores que têm influência no abandono.

Considerando que há uma escassez de políticas públicas para o controle da PCM nos países onde é endêmica e, que, o consenso brasileiro sobre tratamento desta micose não menciona os fatos que estão implicados no abandono da terapia, acreditamos que a identificação de tais fatores contribuiria para o conhecimento do manejo clínico e terapêutico desta micose.

PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS: FACTORS ASSOCIATED WITH TREATMENT  
ABANDONMENT.

Regina L. B. Costa<sup>1</sup>, Iracema F. Vieira<sup>1</sup>, Luiz Antonio Bastos Camacho<sup>2</sup>, Raquel de V.C. de Oliveira<sup>1</sup>, Valeria Cavalcanti Rolla<sup>1</sup> and Antonio C. F. do Valle<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Instituto de Pesquisa Clinica Evandro Chagas, – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>3</sup> Escola Nacional de Saude Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.

Correspondence to:

Regina Lana Braga Costa, MD.

Instituto de Pesquisa Clinica Evandro Chagas – Fundação Oswaldo Cruz.

Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ CEP 21040-900, Brazil.

Phone + 55 (21) 38659578. Fax: + 55 (21) 38659544

E-mail: [regina.lana@ipecc.fiocruz.br](mailto:regina.lana@ipecc.fiocruz.br);

*Keywords:* Paracoccidiodomycosis; treatment; abandonment; alcohol abuse.

## ABSTRACT

### *Setting*

Paracoccidioidomycosis is a neglected disease characterized by a high prevalence of treatment abandonment.

### *Objective*

The aim of this study is to identify the impact of demographic, social, educational, clinical, comorbidities and treatment data in the abandonment of paracoccidioidomycosis treatment.

### *Design*

A retrospective cohort study was conducted from January 1987 to January 2007, at a Research Center in Rio de Janeiro, Brazil, including patients with paracoccidioidomycosis. Abandonment was defined as non compliance to the treatment regimens adopted in our Center. A logistic regression analysis was performed to predict abandonment and the covariates with a p-value <0.05 at the bivariate analysis were included in the model.

### *Results*

This study included 416 patients with predominant chronic forms (90.1%). Mean age was 47 years ( $\pm 12.9$ ). Education data showed 47.4% of patients without elementary school and 19.0% of illiterates. Frequent comorbidities identified were: smoking (90.3%), alcohol abuse (68.6%), strongyloidiasis (42.9%), COPD (20.8%) and tuberculosis (13.0%). Alcohol consumption, Addisonian crisis, and cotrimoxazole or itraconazole use, all reached statistic significance in bivariate analysis, although only alcohol consumption represented a risk factor for abandonment.

### *Conclusion*

This study suggests that treatment regimens with shorter duration and close supervision of alcohol consumption are important measures to prevent abandonment.

## INTRODUCTION

Paracoccidioidomycosis (PCM) is one of the most common systemic mycosis of Latin America and is caused by *Paracoccidioides brasiliensis*, a dimorphic fungus which lives saprophytically in soil <sup>1,2</sup>.

Brazil is situated at the endemic area and the majority of patients live especially in the Southern and Southeastern regions <sup>3,4</sup>.

Clinical manifestations range from asymptomatic pulmonary lesions to generalized systemic manifestation <sup>5</sup>. The acute or subacute form (AF) is characterized by systemic lymphadenopathy, hepatosplenomegaly, bone marrow dysfunction, and a great impairment of the patient's general condition. It usually affects children, adolescents and young adults. The chronic form (CF) is characterized by progressive pulmonary or extra pulmonary manifestations (mucocutaneous, lymph nodes, adrenal glands, digestive tract, bone, and other sites) and occurs mostly in adults older than 30 years <sup>6</sup>.

Usually, the treatment is for a long period (6 to 24 months), to allow the control of the clinical manifestations of the mycosis and to prevent the relapses. The patient must remain in treatment and follow up until the attainment of the criteria of cure, on the basis of clinical, radiological, mycological and immunological parameters <sup>7</sup>.

Abusive alcohol use and smoking were demonstrated as predisposing factors to PCM on a recent study <sup>8</sup>, and account for a worse prognosis for this disease, at least due to the poor compliance to treatment of such patients <sup>9</sup>.

Therapy interruptions are a common fact in the treatment of PCM <sup>10</sup>. Nevertheless, there is scant information about the factors associated to treatment discontinuation. Some authors argue that low cultural and socioeconomic levels of the patients could be one of these factors <sup>11</sup>. Two reviews of pharmacological management of PCM highlighted the role of alcohol consumption and also socioeconomic and cultural factors in treatment discontinuation <sup>12,13</sup>.

Considering the fact that in most PCM endemic countries there are few public health policies aimed at controlling and treating this disease, and considering that Brazilian's guidelines for management this mycosis does not mention the risk factors for treatment abandonment, we believe that the identification of those factors could contribute to a better understanding of treatment management and abandonment control.



The aim of this study is to identify the impact of demographical, social, educational, clinical, comorbidities and treatment data in the abandonment of PCM treatment.

## STUDY POPULATION AND METHODS

### *Study design*

This is a retrospective cohort study in PCM patients conducted from January 1987 through January 2007.

### *Place and recruitment*

The Instituto de Pesquisa Clinica Evandro Chagas (IPEC) is a Reference Center for diagnosis and treatment of infectious diseases, including systemic mycosis. It is located in Rio de Janeiro, an endemic area for PCM. The majority of the patients are referred from rural areas of the States of the Southeast region, mainly Rio de Janeiro, Espirito Santo, Minas Gerais and São Paulo. The clinical approach of patients includes a multidisciplinary health care team. However, during the study period, it was not possible to contact absent patients by methods other than telegrams or letters.

### **Inclusion criteria**

The study included patients that had evidence of *P. brasiliensis* in direct examination and/or culture of clinical specimen with treatment regimens initiated between January 1987 and December 2004.

### **Exclusion criteria**

Patients' records with lack of information regarding the start and end date of therapy.

### *Data collection and follow up*

All patients included were submitted to the Protocol for Clinical Approach and Treatment of Paracoccidioidomycosis, implemented in January 1987<sup>14</sup>. Data collected from records included demographic and social variables (age, sex, race, education and profession), comorbidities, as well as clinical forms and complications, therapeutic regimens and abandonment. The follow up period ranged from 16 months to 20 years.

Besides clinical examination, patients were submitted to: complete blood count, blood biochemistry, immunodiffusion test (Ochterlony), urine and stool studies (including Baermann-

Moraes technique), sputum smear microscopy and culture for mycobacteria (3 samples), mycological approach for *P. brasiliensis* (including direct examination and culture), plasma cortisol dosages (basal and post adrenal corticotropin test), systematic examination of the upper respiratory and digestive tract (URDT) and image studies. Anti-HIV tests were performed in the presence of signs and symptoms of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS).

### **Covariate definitions**

Disease severity was defined as mild, moderate and severe according to Mendes <sup>6</sup>. Patients with severe disease presented three or more signs, i.e.: fever, high titers of antibodies, malnutrition, involvement of adrenals or central nervous system (CNS), or lymph node fistulization.

The protein-energy malnutrition criteria used was based on loss of more than 10% of habitual weight associated to lower indices of at least three anthropometrical and two laboratorial parameters (BMI, mid-arm muscle circumference, triceps skinfold thickness, albumin, hemoglobin and transferrin).

The clear-cut criterion for a normal adrenal response was a cortisol level higher than 18 to 20 µg/dL after rapid ACTH stimulation test. In relation to adrenal involvement, asymptomatic patients with abnormal response to corticotrophin test were classified as having low adrenal reserve; patients with also clinical evidences of adrenal failure were classified as Addison disease;

The “smokers” categories included: (1) current smokers, who had been smoking daily for at least one month prior to diagnosis; and (2) non smokers, who never smoked or had quit smoking for more than six months.

Alcohol consumption was defined as: heavy drinkers, who made regular use of distilled beverages, and mild to moderate drinkers those who made regular ingestion of beverages of lower alcohol concentration.

The criteria utilized for definition of COPD were clinical alterations and/or abnormal spirometry.

Different drug regimens were used according disease severity, adherence and tolerance. The most common drugs were cotrimoxazole, itraconazole, fluconazole and less frequently ketoconazole and amphotericin B. Treatment of PCM consisted in two steps: an initial phase of two months using higher doses of medication followed by a maintenance period which lasted for at

least 12 months (in the case of itraconazole and ketoconazole) and 24 months for cotrimoxazole and fluconazole. This last one was used for CNS involvement.

Regularity of treatment was defined as continuous use of medication without period interruptions greater than one week.

Abandonment was defined as non compliance to any treatment regimen recommended by our protocol, regardless of treatment duration. Changes in treatment schemes for medical reasons including drug intolerance or toxicity constituted a distinct category of analysis.

### ***Statistical analysis.***

A bivariate analysis was performed using Pearson Chi-square or Fisher's exact test for categorical data and Mann-Whitney non-parametric test for continuous covariates (age and duration of treatment). In all tests, *p-values* less than 0.05 were considered as statistically significant.

A logistic model was used to predict outcome (abandonment) using risk and protect covariates according to statistical significance in bivariate analyses. All the covariates that reached a significant a  $p\text{-value} < 0.05$  at the bivariate analysis were maintained in the logistic model.

The software SPSS 11.0 was used for statistical analysis. Selection of variables involved stepwise method through inclusion criteria (covariates with  $p < 0.05$ ) and exclusion criteria (covariates with  $p > 0.10$ ) in Wald tests. The software SPSS 11.0 was used for statistical analysis. Selection of variables involved stepwise method including covariates with  $p < 0.05$  and excluding those with  $p > 0.10$  in Wald test.

### ***Ethics***

This study was approved by the Ethic Committee of the Instituto de Pesquisa Clinica Evandro Chagas, protocol 0026.0.009.000-06.

## RESULTS

### Exploratory analysis

This study included 416 patients, 372 (89.4%) males and 44 (10.6%) females. Most patients reported themselves as white (212/51.0%), with 129 (32.4%) of mulattos and 57 (14.3%) black.

Education data showed that 183 (47.4%) patients had not yet completed elementary school, and 79 (19.0%) were illiterate. Age ranged from 4 to 77 years, with a mean age of 47 ( $\pm 12.9$ ) years.

At the time of diagnosis, only 170 (44.9%) of patients had occupations requiring some exposure to the soil, as farm laborers and gardeners, masons, house-keepers or woodcutters; 209 (55.1%) had no activities related to that exposure. When asked about previous occupations (at the first two decades of life), 252 (72.0%) patients have had activities with exposure to the soil while 98 (28.0%) had not.

The chronic forms occurred in 375 (90.1%) patients, while the acute form occurred in 41 (9.9%). The majority of our patients presented moderate disease (49.0%) and the severe cases were more frequent at the AF.

The most frequent comorbidities associated to PCM were smoking (90.3%), alcohol abuse (68.6%), strongyloidiasis (42.9%), other helminthiasis (30.1%), COPD (20.8%) and tuberculosis (13.0%).

Cotrimoxazole was the most frequent drug used for PCM treatment. Some patients received other drug combinations (Table 1). Changes in drug regimens at the first treatment were conducted in 99 (25.1%) patients because of adherence and tolerance.

After all attempts of treatment, 235 (56.5%) patients completed therapy and 181 (43.5%) abandoned. In 20 cases data were missing (4.6%).

### *Logistic Regression*

The association between the abandonment of therapy and covariates such as socio-demographic, education, clinical complications, comorbidities and the regimens used for treatment of PCM and are shown in Table II.

The covariates that achieved statistical significance at the bivariate model were: comorbidities (alcohol consumption, Addisonian crisis) and treatment regimens used in first treatment (use of cotrimoxazole or itraconazole).

Among the covariates analyzed, the statistically significant (p-value<0.05) in Chi-square or Mann-Whitney were marked with \* and are listed below.

- **“Demographic and socio-economic”**: age, gender, ethnic, education, professional activities, clinical form, disease severity, duration of disease before treatment
- **“Comorbidity”**: tuberculosis, strongyloidiasis, other geo-helminthiasis, malignancy, emphysema, COPD, *cor pulmonale*, limited adrenal reserve, malnutrition, Addison’s disease, Addisonian crisis\*, other diseases, smoking, alcohol consumption\*
- **“Treatment”**: previous treatment, regularity of treatment, cotrimoxazole use\*, itraconazole use\*, amphotericin B use, ketoconazole use, fluconazole use, intravenous cotrimoxazole use

The covariate distribution and the OR found in bivariate analysis are shown in Table 2. Mild or moderate alcohol consumers were 98% more likely to abandon therapy than non consumers. A patient with Addisonian crisis had 8.33 times more chance than patients without this comorbidity in discontinuing therapy. Patients initially treated with cotrimoxazole had 90% more chance of abandonment than those treated with other regimens. Besides, initial use of itraconazol reduced the chance of abandonment in 48%.

In logistic model with the four significant covariates at 5% level (N=416), only alcohol consumption represented a risk factor for abandonment, although Addisonian crisis showed a high OR (7.50). Once again, mild or moderate alcohol consumers had 98% more chances (OR=1.98) than non consumers to abandon treatment.

## DISCUSSION

Abandonment of PCM therapy is a poorly studied issue in the literature. Most of the studies about PCM treatment are clinical trials with small series in which abandonment is better controlled<sup>15-18</sup>.

The 43.5% prevalence of treatment abandonment in our series was higher than that reported by Valle et al. in Rio de Janeiro<sup>12</sup> and lower than those reported by Paniago et al.<sup>19</sup> and<sup>20</sup>. Many are the factors reported in literature that can contribute to treatment abandonment: long term therapy, distant habitation, and low socioeconomic and cultural levels<sup>11, 21</sup>. We did not include all those variables in our study. However, none of the sociodemographic or education covariates presented in this analysis showed to be a risk factor for therapy discontinuation. This fact could be explained by the diversity of methods used by each one of those studies to analyze the association of those covariates with abandonment.

Tobacco addiction has been reported as a predisposing factor for PCM by Santos and coworkers<sup>8</sup>. Lack of association between tobacco use and abandonment in our study group was probably due to relative homogeneity (90% of smokers), and association of smoking to alcohol, which prevailed in the model.

Alcohol consumption has also been described as risk factor for the development of PCM<sup>8</sup> and relapse of the disease<sup>9</sup>. However, there are no previous studies evaluating the association of this condition with the abandonment of PCM therapy. Our results showed that alcohol consumption was the sole independent risk factor for discontinuing therapy. It is important to highlight that heavy drinkers were not the category with the higher risk of abandonment, what could be explained by the fact that those patients were usually accompanied by family members during the outpatient clinic appointments and were closely supervised at home due to alcohol addiction. Alcohol addiction is also reported as a factor associated with treatment discontinuation in other chronic granulomatous diseases like tuberculosis<sup>22</sup>

Other aspect that should be considered is that many alcoholic patients usually stop PCM therapy because they believe that alcohol and the therapeutic drugs should not be taken together, so they wont take medicines while drinking.

We did not find influence of other covariates like clinical forms, length and severity of the disease or comorbidities in abandonment. However factors associated to the clinical complications of the disease, such as malnutrition and adrenal involvement, negatively affected the outcome in the bivariate analysis. Nevertheless in the logistic regression, those covariate lost their significance, but Addisonian crisis sustained a high OR. We figured that maybe the lack of significance of Addisonian crisis in logistic regression could be biased by the low number of patients with this condition (N=8).

In endemic areas, PCM is the most frequent etiology of Addison's disease, probably because of the well-known predilection of *P. brasiliensis* for invading and destroying the adrenal glands <sup>23-25</sup>.

In our assessment, patients with Addisonian crisis could present signs and symptoms like hypotension and weakness, which could impair their coming to follow up and treatment control.

Many regimens are used to treat PCM and different lengths of therapy are adopted according to each center <sup>13</sup>. In our series there is a higher abandonment rate among patients treated with cotrimoxazole than in those treated with itraconazole. Other authors also found lower rates of abandonment in patients treated with itraconazole therapy <sup>10, 26</sup>, and higher rates with cotrimoxazole use <sup>26</sup>. We believe that this fact is associated to the length of each treatment (24 months for cotrimoxazole and 12 months for itraconazole) and the feasibility of less pill burden in itraconazole use. Other regimens did not show statistical significance on adherence probably due to low number of individuals included in these categories.

Treatment of PCM is complex due to the patients' characteristics and length of therapy. A multidisciplinary approach is the key for a successful treatment and some measures could be implemented to decrease the high prevalence of abandonment. These measures include a decentralization of PCM approach, the use of treatment regimens with shorter duration and close supervision at home, in specialized units or hospitalization to avoid alcohol consumption. Another important measure that should be mentioned is the implementation of clinical and therapeutic protocols for early detection and treatment of PCM complications.

The external validity of our findings may be limited by factors influencing compliance, which may vary across settings. Nevertheless, studies seem to converge on the need to monitor closely these patients to avert noncompliance and improve prognosis.



## REFERENCES

1. Albornoz MB. Isolation of Paracoccidioides brasiliensis from rural soil in Venezuela. In: Panamerican Symposium on Paracoccidioidomycosis; Medellin; 1971: p. 71-75.
2. Silva-Vergara ML, Martinez R, Chadu A, Madeira M, Freitas-Silva G, Leite Maffei CM. Isolation of a Paracoccidioides brasiliensis strain from the soil of a coffee plantation in Ibia, State of Minas Gerais, Brazil. *Med Mycol* 1998;36(1):37-42.
3. Blotta MH, Mamoni RL, Oliveira SJ, et al. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. *Am J Trop Med Hyg* 1999;61(3):390-394.
4. Wanke B, Londero AT. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, eds. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton: CRC Press, 1994: pp. 109-120.
5. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* 1993;6(2):89-117.
6. Mendes RP. The Gamut of Clinical Manifestations. In: Franco MF, Lacaz CS, Restrepo Moreno A, Del Negro G, eds. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton: CRC Press, 1994: pp. 233-258.
7. Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho F, Mendes R, Colombo AL, Moretti M. Consenso em paracoccidioidomicose. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006;39(3):297-310.
8. dos Santos WA, da Silva BM, Passos ED, Zandonade E, Falqueto A. Association between smoking and paracoccidioidomycosis: a case-control study in the State of Espirito Santo, Brazil. *Cad Saude Publica* 2003;19(1):245-253.
9. Martinez R, Moya MJ. The relationship between paracoccidioidomycosis and alcoholism. *Rev Saude Publica* 1992;26(1):12-16.
10. Negroni R, Tabares AM, Arechavala A, Robles AM. Experiência con itraconazol en el tratamiento de la paracoccidioidomicosis. In: V<sup>o</sup> Encuentro Internacional sobre paracoccidioidomicosis; Buenos Aires, Argentina; 1992. p.47.
11. Mendes RP, Negroni R, Arechavala A. Treatment and control of cure. In: Franco MF, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, eds. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, FLA: CRC Press, Inc., 1994: pp. 267-269.

12. Valle ACF, Wanke B, Wanke N, Lima NS, Perez M. Tratamento da paracoccidioomicose: estudo retrospectivo de 500 casos II. Avaliação dos resultados terapêuticos com sulfanilâmídeos, anfotericina B, associação sulfametoxazol/trimetoprim, cetoconazol e miconazol. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 1993;68(1):65-70.
13. Yasuda MA. Pharmacological management of paracoccidioomycosis. *Expert Opin Pharmacother* 2005;6(3):385-397.
14. Valle A, Costa R. Protocolo clínico para diagnóstico, tratamento e seguimento de pacientes portadores de Paracoccidioomicose. [monograph at internet], [cited 20/08/2007] 2007; Available from: <http://www.ipec.fiocruz.br/pepes/micologia/mico.html>
15. Shikanai-Yasuda MA, Benard G, Higaki Y, et al. Randomized trial with itraconazole, ketoconazole and sulfadiazine in paracoccidioomycosis. *Med Mycol* 2002;40(4):411-417.
16. Restrepo A, Gomez I, Cano LE, et al. Treatment of paracoccidioomycosis with ketoconazole: a three-year experience. *Am-J-Med* 1983a;74(1b):48-52.
17. Naranjo MS, Trujillo M, Munera MI, Restrepo P, Gomez I, Restrepo A. Treatment of paracoccidioomycosis with itraconazole. *J Med Vet Mycol* 1990;28(1):67-76.
18. Queiroz-Telles F, Goldani LZ, Schlamm HT, Goodrich JM, Espinel-Ingroff A, Shikanai-Yasuda MA. An open-label comparative pilot study of oral voriconazole and itraconazole for long-term treatment of paracoccidioomycosis. *Clin Infect Dis* 2007;45(11):1462-1469.
19. Paniago AM, Aguiar JI, Aguiar ES, et al. Paracoccidioomycosis: a clinical and epidemiological study of 422 cases observed in Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003;36(4):455-459.
20. Potsch D, Nogueira S, Rapparini C, Nunes E, Perissé A. Paracoccidioomicose: aspectos clínicos-epidemiológicos de 144 casos. *Rev Soc Bras Med Trop* 1995;28(Suppl):97.
21. Wanke B, Valle A, Zancopé-Oliveira R, Costa RLB. Paracoccidioomicose. In: Coura J, editor. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005: pp. 1193-1206.
22. Oliveira HB, Moreira Filho DC. Treatment abandonment and tuberculosis recurrence: aspects of previous episodes, Brazil, 1993-1994. *Rev Saude Publica* 2000;34(5):437-443.

23. Salfelder K, Doehnert G, Doehnert HR. Paracoccidioidomycosis. Anatomic study with complete autopsies. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med* 1969;348(1):51-76.
24. Tendrich M, Wanke B, Del Negro G, Wajchenberg BL. Adrenocortical involvement. In: Franco M, Lacas CdS, Moreno AR, Del Negro G, eds. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Ratón: CRC Press, 1994: pp. 306-312.
25. Onate JM, Tobon AM, Restrepo A. Adrenal gland insufficiency secondary to paracoccidioidomycosis. *Biomedica* 2002;22(3):280-286.
26. Queiroz-Telles F, Colombo AL, Nucci M. Comparative efficacy of cotrimoxazole and itraconazole in the treatment of paracoccidioidomycosis. In: 38th ICAAC; 24-27-1998; San Diego: The American Society for microbiology; 1998: p. J-142.

**Table 1. Frequency of Drugs Used for the First PCM Treatment According to Clinical Form. Patients followed at IPEC from January 1987 to January 2007.**

**N = 416**

Drugs	CF (n/%)	AF (n/%)	Total
Cotrimoxazole	286 (76.3)	27 (65.9)	313 (100)
Itraconazole	70 (18.7)	16 (39.0)	86 (100)
Ketoconazole	19 (5.1)	2 (4.9)	21 (100)
Fluconazole	5 (1.3)	-	5 (100)
Amphotericin B	1 (0.3)	6 (14.6)	7 (100)

CF = chronic form; AF acute form

N= number of patients

**Table 2: Crude Odds Ratio for significant covariates from bivariate analysis. Patients followed at IPEC from January 1987 to January 2007.**

**N = 416**

COVARIATES		ABANDONMENT (%)	O R	CI (OR)* (95%)
ALCOHOL CONSUMPTION	Absent (n=121)	33.1	1,000	-
	Mild or moderate (n=121)	49.6	1,984	<b>1,182-3,360</b>
	Heavy (n=35)	42.9	1,517	0,691-3,286
ADDISONIAN CRISIS	Presence (n=8)	87.5	9,333	<b>1,138-76,560</b>
	Absence (n=406)	42.9	1,000	-
USE OF COTRIMOXAZOLE	Presence (n=313)	47.3	1,903	<b>1,190-3,043</b>
	Absence (n=103)	32.0	1,000	-
USE OF ITRACONAZOLE	Presence (n=86)	31.4	0,523	<b>0,316-0,866</b>
	Absence (n=330)	46.7	1,000	-

\* OR = Odds ratio; CI = confidence interval

## CAPÍTULO 6

### **Immune hyporesponsiveness in the chronic form of paracoccidioidomycosis and its reversal following treatment**

Manuscrito submetido à revista Scandinavian Journal of Immunology:

SJI-07-310 - 2007

Os pacientes com PCM apresentam, na sua forma ativa, disfunções imunes que podem contribuir para a coexistência de co-morbidades, fato observado em muitos dos nossos pacientes. Este estudo teve como objetivo avaliar o perfil de produção de citocinas associadas à resposta imune celular dos tipos Th1 e Th2 e verificar associação com as co-morbidades comuns da paracoccidioidomicose. O projeto de pesquisa foi financiado pelo PAPES II e os pacientes que foram incluídos fazem parte do estudo de coorte retrospectivo iniciado em 1987.

## IMMUNE HYPORESPONSIVENESS IN THE CHRONIC FORM OF PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS AND ITS REVERSAL FOLLOWING TREATMENT

Short title: PCM treatment and immune hyporesponsiveness

Danuza de Almeida Esquenazi<sup>1,2\*</sup>, Regina Lana Braga Costa<sup>3\*</sup>, Antonio Carlos Francesconi do Valle<sup>3</sup>, Iris Maria Peixoto Alvim<sup>1,2</sup>, Márcio Neves Bóia<sup>4</sup> and Geraldo Moura Batista Pereira<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Immunopathology, School of Medical Sciences, State University of Rio de Janeiro - UERJ; <sup>2</sup>Laboratory of Cellular Microbiology, and <sup>4</sup>Parasitic Diseases Laboratory, Oswaldo Cruz Institute and <sup>3</sup>Evandro Chagas Research Institute, Oswaldo Cruz Foundation – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

\*These authors contributed equally to this work

Correspondence to:

Geraldo M. B. Pereira, Lab of Cellular Microbiology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation - FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ CEP 21040-900, Brazil. Phone and Fax: 55 (21) 2270-9997. E-mail: [geraldo@fiocruz.br](mailto:geraldo@fiocruz.br)

Word counts: abstract 248

article text 3093

CLINICAL IMMUNOLOGY

**ABSTRACT**

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis prevalent in the areas of Latin America where *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) is present. Only a small proportion of the individuals exposed to Pb develop disease. Functional impairment of T cells has the potential to increase susceptibility to this mycosis, but can also represent adaptative and reversible change in the course of the disease. In order to address this problem, we performed an evaluation of the *in vitro* response to polyclonal and antigenic stimuli in patients with the adult chronic form of paracoccidioidomycosis (PCM-A; n=20, male, 35-57 years old) before and after treatment with itraconazole. All the patients were smokers. Protein-energy malnutrition (60%), strongyloidiasis (50%) and moderate to heavy use of alcohol (90%) were also observed in the PCM-A patients. Low to absent IL-2 bioactivity was observed prior to treatment, in response to Concanavalin-A (Con-A) but not to PMA+Ionomycin. Following treatment there was reversal of the unresponsiveness to Con-A, and data suggestive of increase in the IFN- $\gamma$  /IL-4 producing T cell ratio in blood leukocytes. Pb-specific IFN- $\gamma$  levels were seen only in treated patients. Smoking, alcoholism and malnutrition are frequently observed in PCM-A patients. These conditions may have contributed to the impairment of T cell function detected before treatment, and perhaps to the evolution of the infection to active disease. Taken together our observations suggest that at least some aspects of the T cell hyporesponsiveness seen in PCM are secondary to the disease onset, non-antigen-specific and reversible by treatment of this chronic mycosis.



## INTRODUCTION

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis, endemic in Latin America, caused by *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb). The infection occurs by the inhalation of Pb spores, usually during the first two decades of life. Positive skin tests in response to a Pb antigenic preparation (PbAg) were initially observed in PCM patients and asymptomatic individuals from Colombia [1]. Brazil accounts for 80% of the cases reported worldwide [2, 3]. It is estimated that throughout the endemic region as many as ten million individuals could be the infected by Pb, but only 2% of them will develop the disseminated forms of the disease [4, 5]. This low frequency of clinical disease following infection is also observed with other mycoses [6].

The majority of patients with adult chronic form of paracoccidioidomycosis (PCM-A) are male, 30 to 50 years old, active or retired farm workers [3]. The spectrum of PCM clinical forms also includes the subacute or juvenile form (PCM-J).

The clinical manifestations vary from oligosymptomatic to severe and disseminated disease. Patients with the PCM-A present mainly mucosal and lung involvement, while PCM-J patients develop a severe disseminated disease, with diffuse lymph node enlargement and hepatosplenomegaly. Treatment of PCM includes long courses of itraconazole or sulfamethoxazole/trimetoprim for outpatients, while amphotericin B is used for severe cases under inpatient care [7].

Musatti and cols. evaluated cellular immunity parameters in Brazilian PCM patients. The skin tests (PbAg, 2,4-dinitrochlorobenzene; DNCB) detected impaired responses to the stimuli in almost half of the PCM patients (n=19). The *in vitro* responses (PbAg, phytohemagglutinin, and *Candida albicans*) were comparable. Relative frequencies of T cells were reduced in the patients [8]. In a group of Colombian PCM patients, defective skin test

responses to DNCB and *Candida albicans* were observed. The presence of Pb-specific antibodies was associated to *in vitro* unresponsiveness to PbAg in a T cell proliferation assay, and absence of Pb-specific antibodies to good proliferation in response to PbAg. A progressive impairment of the cellular immunity parameters was observed during the evolution of the disease. The skin test and *in vitro* responses to PbAg and PPD in clinically cured patients suggested that reduced responsiveness to PbAg and other antigens in PCM patients was reversible with treatment. A preliminary longitudinal investigation with 6 PCM patients supported this conclusion [9]. The negative DNCB skin tests suggest a defective priming of T cells in the group of patients [10]. The reduced responses to PHA, PPD and *Candida albicans* indicate that the changes in immunity seen in PCM may affect the immune response to other antigens and pathogens.

The pathogenesis of fungal diseases is usually connected to therapeutic immunosuppression, innate or acquired immunodeficiencies such as AIDS [6]. However, other conditions associated to defective cellular immunity or deviation of immune response to a T helper type 2 (Th2) pattern could compromise the T helper type 1 (Th1) pattern of response linked to protection, and also trigger the onset of clinical manifestations of PCM [11]. Alcoholism and malnutrition are commonly observed in PCM patients [12]. These health problems can affect antigen-presenting cells and priming of T cells [13, 14]. And alcoholism increases the probability of strongyloidiasis detection, adding one more condition that can be related to the changes in cellular immune response seen in PCM [15-17].

Substantial levels of IFN- $\gamma$ , interleukin (IL)-2 and low levels of IL-10 were observed in asymptomatic, infected individuals, reflecting an effective immune response against Pb [18]. By contrast, low levels of IL-2 and IFN- $\gamma$  and substantial amounts of IL-10, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , and transforming growth factor (TGF- $\beta$ ) were described in PCM-A patients [19-21].

An increase in IFN- $\gamma$  levels in response to PHA and Pb antigens was observed in paracoccidioidomycosis patients following clinical remission [22]. A pathogen-specific Th1 immunosuppression was also proposed as a defect present in PCM, possibly by inhibition of the IL-12 pathway. This defect was partially reversed in treated individuals, or, *in vitro*, by adding a neutralizing anti-IL-10 monoclonal antibody to the cultures of PBL (peripheral blood leukocytes) from PCM patients [23].

In order to evaluate possible changes in T-lymphocyte responsiveness present in PCM-A and their reversibility after treatment, we have done a prospective investigation in PCM-A patients. The group of patients was submitted to evaluation of T-lymphocyte *in vitro* response to polyclonal stimuli and antigens at the onset of treatment and after its completion. The relative frequencies of PBL subsets and the ratios of IFN- $\gamma$ /IL4-producing T cells were also analyzed at the same time points.

In this work we have found a defective *in vitro* activation of T lymphocytes in PCM-A patients and the reversal of this defective activation after itraconazole treatment. Reduced IL-2/TCGF levels and proliferation were seen in response to Con-A, but not to PMA+ION. This observation suggests that the defects in T cell function seen in PCM-A are not pathogen-specific and may be related to T-cell tolerance or anergy, requiring the presence of Pb in the organism.

## MATERIALS AND METHODS

*Study population.* Twenty male patients, 35-57 years old, with the adult chronic form of PCM (PCM-A) were evaluated. Diagnosis was made by the detection of *Pb* in direct examination and/or culture of clinical specimen [7]. All patients were submitted to treatment (200 mg/ day, Itraconazole, Jansen Pharm., NY, USA) at the Evandro Chagas Research Institute of the Oswaldo Cruz Foundation, State of Rio de Janeiro, Brazil. Strongyloidiasis was investigated by using the Baermann-Moraes method as previously described [17]. Smoking habit was defined as moderate or heavy. The categories for alcohol intake were: light, for weekly, and moderate for daily ingestion of low alcohol concentration beverages; heavy, daily made use of distilled beverages. Moderate smokers used less, and heavy smokers more than 20 cigarette packages/year. Protein-energy malnutrition was defined as loss of more than 10 % of habitual weight and body mass index lower than 20 Kg/m<sup>2</sup>. Ten healthy volunteers (male, 35-41 years old) were included as endemic area healthy controls for PCM, and their cellular immunity parameters were evaluated in parallel with the PCM-A patients.

*Antigens and mitogens.* *P. brasiliensis*-derived glycoprotein gp43 (kindly provided by Dr. Luiz R. Travassos, São Paulo Medicine School, UNIFESP, SP, Brazil) and Purified Protein Derivative (PPD; Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark) were used at 20 µg/ml. Staphylococcal Enterotoxin B (SEB; Sigma Chemical Co., MO, USA) was used at 1 µg/ml. Concanavalin-A (Con-A; Sigma) was used at 10 µg/ml. Phorbol Myristate Acetate (PMA; Sigma) plus Ionomycin (ION; Sigma) were used at 10ng/ml and 1 µg/ml respectively.

*Lymphocyte proliferation assay.* Peripheral blood leukocytes (PBLs) were isolated from heparinized venous blood by Ficoll-Hypaque density gradient (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). PBLs were incubated in RPMI 1640 (GIBCO Laboratories, NY, USA)

supplemented with 10% pooled AB normal human serum, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2mM L-glutamine and  $5 \times 10^{-5}$  M 2-Mercaptoethanol (all from GIBCO), named complete medium. Results were expressed as mean counts per minute obtained from stimulated and unstimulated cells.

*Quantification of cytokine levels.* PBLs were incubated at 37°C in complete medium (0.2 ml/well,  $10^6$  cells/ml, 96-well microplates; Corning, USA). The cells were stimulated with mitogens (3 days) and antigens (5 days) cultures, and the supernatants were harvested and stored at – 70°C for the determination of the levels of cytokines.

*CBA cytokine assay.* In order to quantify the levels of Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) and Th2-cytokines (IL-4, IL-5, IL-10), PBL supernatants of polyclonally (Con-A, SEB and PMA+ION) and antigen-stimulated (gp43 and PPD) cultures were analyzed by flow cytometry, with the Cytometric Bead Array Kit and the BD CBA Analysis software (Becton Dickinson, CA, USA).

*IL-2/TCGF bioassay.* IL-2/TCGF bioactivity was evaluated by culturing CTLL-2 cells ( $5 \times 10^3$ /well; ATCC, MD, USA) in the presence of the 18-hour supernatants of Con-A- or PMA+Ion-stimulated PBLs, and detecting the IL-2 bioactivity by quantification of CTLL-2 proliferation, as previously described [24].

*Flow cytometry.* For phenotypic characterization freshly obtained PBLs were resuspended in cytometry buffer and directly labeled with monoclonal antibodies (anti-CD3 FITC, anti-CD4 Cy, anti-CD8 Cy, anti-CD14 PE, anti-CD16 FITC, anti-CD19 PE; BD-Biosciences, San Jose, CA, USA). After fixation the cells were analyzed in a 4-color flow cytometer FACSCalibur (BD-Biosciences). The assessment of the frequencies of IL-4- and IFN- $\gamma$ -producing T cells was done

in 6-hour cultures stimulated with Con-A or PMA+ION. Intracellular detection of the cytokines was performed as previously described [25], and the cells were analyzed in a FACSCalibur cytometer, using the CellQuest Pro v4.0.2 software (BD-Biosciences).

*Statistical analysis.* Significance of the difference between values was evaluated by the ANOVA and Student's t-test. Results were considered significant when  $p \leq 0.05$ .

*Ethics.* This study was approved by the Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Foundation. The patients and controls were included in the study only after their informed consent. The Brazilian and institutional guidelines for experiments involving human subjects were followed.

## RESULTS

### *Clinical profile of the studied patients*

All the patients were diagnosed with PCM-A, by using standard clinical, radiological and laboratorial parameters [7]. At the moment of the diagnosis of PCM-A, and before treatment, 50% of patients presented intestinal strongyloidiasis, all the patients were chronic smokers, 90% were moderate to heavy consumers of alcohol and 60% presented some degree of protein-energy malnutrition (Table 1). When patients positive and negative for strongyloidiasis were compared, no differences were observed in cytokine levels, relative frequencies of PBL subsets or the other functional parameters investigated in this work (data not shown).

### *Relative frequencies of T-lymphocytes and other leukocyte subsets in PCM patients and healthy volunteers were comparable*

Reduced relative frequencies of T-lymphocytes were observed in previous works on PCM [8, 9]. In order to evaluate if changes in the frequencies of T-lymphocytes or other leukocytes could be a cause for functional changes in the PCM patients, the phenotypic analysis of peripheral blood leukocytes (PBLs) was performed before and after the treatment. No differences were observed in the leukocyte subsets when the frequencies of PBLs expressing CD3, CD4, CD8, CD14, CD16 and CD19 were analyzed in patients before and after the treatment, or when the patients were compared to healthy volunteers (Figure 1).

### ***The relative proportion of IFN- $\gamma$ over IL-4-producing T-lymphocytes increases after PCM-A treatment***

The assessment of the frequencies of IFN- $\gamma$ - or IL-4-producing T lymphocytes was done in PBLs of 17 patients, after short-term stimulation with PMA+ION. The results have shown an increase in the relative proportion of T lymphocytes which produce IFN- $\gamma$ , in comparison with those producing IL-4, when values before and after the treatment were compared. The IFN- $\gamma$ /IL-4 ratio was  $6.4 \pm 4.8\%$  for untreated patients, and  $17.1 \pm 12\%$  in treated patients (Figure 2). The IFN- $\gamma$ /IL-4 ratio for the healthy controls (n=10) was  $15.2 \pm 3.2\%$  (data not shown).

***IL-2/TCGF bioactivity and proliferative response increase in Con-A stimulated PBLs of PCM-A patients and reaches levels comparable to the healthy control group***

The PBLs of the patients and healthy controls were stimulated *in vitro* with Con-A and PMA+ION for evaluation of the functional activation of T cells. The IL-2/TCGF bioactivity was markedly reduced in the Con-A-activated cells of untreated patients (UN). However, the response to PMA+ION was not affected in the same patients. The proliferative responses of the PBLs presented the same functional pattern, low or even absent in response to Con-A, but in parallel with IL-2 bioactivity, proliferation following PMA+ION was preserved. After treatment the T cell defective responsiveness was reversed, in terms of proliferation and IL-2/TCGF bioactivity in response to Con-A (Figure 3).

***Reduced Th-1 and Th-2 cytokine levels were seen in PCM-A in response to Con-A and PB antigen, but not to PMA+ION***

Four patients (two untreated, UN; and two post-treatment, TR) were submitted to simultaneous analysis for Th1- and Th2-cytokines, for determination of the cytokine levels in culture supernatants. Reduced levels of cytokines were seen in the cultures of the untreated patients, for gp43 and Con-A. The results show an inhibition of the production of Th1- (IL-2, IFN- $\gamma$ ) and Th2-



cytokines (IL-4, IL-5; Table 2). IL-10 levels were similar in untreated and post-treatment patients.

## DISCUSSION

The infection by *P. brasiliensis* (*Pb*) and the evolution of this infection to the chronic form of PCM are limited by several preconditions. The infectious agent, and as a consequence the disease, are present only in Latin America. There is no evidence of person to person transmission, but only infection as a consequence of exposition to environmental *Pb*. The differentiation of *Pb* to its infectious form does not occur in the presence of female hormones, almost limiting PCM-A to male individuals [12]. The vast majority of the exposed individuals do not evolve to clinical disease.

There are aspects linked to the pathogen and to the host which can affect the evolution of *Pb* infection to disease. Three different phylogenetic species of *Pb* presenting differences in virulence and expression of antigenic proteins have been characterized and two of them can be distinguished by microsatellite analysis. [26]. Very frequently patients presenting PCM are heavy smokers, alcoholic and undernourished (Table 1). These three conditions precede clinical disease, and are associated to systemic as well as localized defects of immune function [15, 27-30].

Interestingly enough, smoking and alcohol consumption compromise functions of the alveolar macrophages and dendritic cells, affecting the level of expression of toll-like receptors (TLR) molecules and their function. The effect is selective for some TLR (TLR-2, TLR-4). In consequence, the expression of the genes and release of inflammatory cytokines is reduced (IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ ), but the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1 receptor antagonist are not affected. The functional changes induced by smoking were restricted to the respiratory system. The simultaneous evaluation of alveolar macrophages and blood monocytes did not detect differences between smokers and non-smokers in the blood [31]. The targeting of the respiratory

system by smoking and alcoholism may be an important element in the pathogenesis of PCM. The relatively frequent association of pulmonary tuberculosis and PCM-A may be a consequence of these immunocompromising conditions [32].

Dendritic cells (DC) are a fundamental link between innate and acquired immunity. Different TLR are triggered according to the nature of the pathogen interacting with a DC, and, as consequence, different groups of genes are expressed in the DC, leading to a pathogen-specific DC functional profile [33]. DCs are initially immature cells negative or with reduced expression of MHC and costimulatory molecules. The contact of immature DCs with pathogens induces maturation of these cells, a necessary step for surface expression of the molecules required for antigen presentation and production of cytokines such as IL-6, IL-12, IL-1 $\beta$  [34]. Antigen presentation by immature DCs fails to deliver strong activation signals, or the cytokines required for T cell differentiation, and induces tolerance or anergy instead of immunity. In the course of some systemic mycoses, molecules derived from the pathogen can regulate the host response, inhibiting IL-12 production by dendritic cells, an important requirement for the induction of the Th-1 pattern of differentiation for T cells [6], and control of the fungal infection.

The maturation of murine bone marrow-derived CD<sub>80</sub> is induced by LPS is inhibited by Pb or gp43, a Pb protein present in large amounts during PCM. This inhibition affects MHC and B7 expression [35]. If it happens *in vivo*, during human infections, priming of T cells and their programming for differentiation can be compromised. It is conceivable that the resulting T cell anergy or tolerance will be more pronounced as the fungal load and time of exposure of the immune system to the fungus increase. And the removal of Pb by treatment would be expected to reverse the T cell hyporesponsiveness observed in the untreated individuals. Anergy or tolerance can provide the functional profile observed in our untreated patients, with unresponsiveness to

antigen and ConA, but proliferative response and IL2/TCGF production in cultures stimulated with PMA+ION [36]. The effects of *Pb* and gp43 on T cell stimulation by DCs could be initially restricted to the response to *Pb*, but DCs with immature phenotype would also tolerize T cells specific for other antigens.

These defects of immune response defects may affect effector function and facilitate the evolution of latent infections to disease. The very low incidence of PCM suggests that besides smoking, malnutrition, alcoholism and some genetic profiles could be associated to the pathogenesis of PCM-A.

A murine experimental model for PCM reproduces several basic aspects of the human disease. There are susceptible and resistant mouse strains, supporting the hypothesis of a genetic component in the pathogenesis of the disease [37]. The disease can be induced by intratracheal inoculation, reproducing basic aspects of the human disease such as Th1 pattern of response and low antibody levels in resistant mice, and the opposite situation in the susceptible mice [38]. The cutaneous anergy seen in the human disease can also be observed in the murine model for paracoccidiodomycosis. Interestingly enough, a previous subcutaneous infection with *Pb* protects the susceptible B10.A mouse strain, and reverses the cutaneous anergy. The protected mouse is able to mount an immune response against *Pb* that includes production of IFN- $\gamma$  and IL-12 [39].

A recent review of the concept of primary immunodeficiency suggests that genotypes causing immunodeficiency are more common in humans than previously assumed [40].

Taken together these observations allow the following model for the pathogenesis of PCM: the combination of genetic background, alcoholism, smoking and malnutrition induces an immune deficiency, more pronounced in the respiratory system because of the targeting of this

area in smokers. Genetic variations of the pathogen are also an element to be taken into consideration [26].

The reversal of the T cell functional impairment seen with treatment suggests, as previously pointed, that the T cell function impairment observed in our patients is at least partially secondary to the disease onset, and may represent an adaptation of the host to the persistent inflammatory stimulation by this infectious agent, and/or the inhibitory effects of components of the pathogen in immune/inflammatory response [6].

Previous observations linked the hyporesponsiveness of T cells in PCM-A to the action of IL-10 [20]. The number of individuals tested for IL-10 in this investigation was small, but PBLs of PCM patients evaluated for IL-10 levels in cultures stimulated with a *Pb* antigen or mitogens did not show reduction in IL-10 levels in association to the post-treatment reversal of T cell hyporesponsiveness.

The reversal of the T lymphocyte functional impairment after the treatment suggests as a possible explanation for this T cell hyporesponsiveness, the action of a *Pb*-derived signal/molecule inducing a reversible inhibition of T cell responsiveness to antigen or co-stimulation-dependent mitogen (Con-A). The reversal of cutaneous anergy and susceptibility to *Pb* in the murine model raises the possibility of modification of the susceptible status in the human infection, by vaccination. Further investigation on the roles of smoking, alcoholism and malnutrition in the pathogenesis of PCM-A may provide more tools for controlling this severe and frequently lethal disease.

**Acknowledgments:** This work was supported by the Oswaldo Cruz Foundation - PAPES grant 250.250.331 and the Brazilian Council for Scientific Development - CNPq grant 469502/00-2.

## REFERENCES

- 1 Restrepo A, Robledo MV, Ospino SC, Restrepo MI, Correa AL. *Distribution of Paracoccidioidin Sensitivity in Colombia*. Am J Trop Med Hyg. 1968 January;17:25-37.
- 2 Blotta MH, Mamoni RL, Oliveira SJ *et al*. *Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region*. Am J Trop Med Hyg. 1999 Sep;61:390-4.
- 3 Wanke B, Londero AT. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, eds. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton: CRC Press 1994:109-20.
- 4 Restrepo A, McEwen JG, Castaneda E. *The habitat of Paracoccidioides brasiliensis: how far from solving the riddle?* Med Mycol. 2001 Jun;39:233-41.
- 5 McEwen JG, Garcia AM, Ortiz BL, Botero S, Restrepo A. *In search of the natural habitat of Paracoccidioides brasiliensis*. Arch Med Res. 1995;26:305-6.
- 6 Romani L. *Immunity to fungal infections*. Nat Rev Immunol. 2004 Jan;4:1-23.
- 7 Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho Fde Q, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. *[Guidelines in paracoccidioidomycosis]*. Rev Soc Bras Med Trop. 2006 May-Jun;39:297-310.
- 8 Musatti C, Rezkallah MT, Mendes E, Mendes NF. *In vivo and in vitro evaluation of cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis*. Cellular Immunology. 1976;24:365-78.
- 9 Mok PW, Greer DL. *Cell-mediated immune responses in patients with paracoccidioidomycosis*. Clin Exp Immunol. 1977 Apr;28:89-98.
- 10 Pickard C, Smith AM, Cooper H *et al*. *Investigation of Mechanisms Underlying the T-Cell Response to the Hapten 2,4-Dinitrochlorobenzene*. J Invest Dermatol. 2006;127:630-7.
- 11 Rocken M, Urban J, Shevach EM. *Antigen-specific activation, tolerization, and reactivation of the interleukin 4 pathway in vivo*. J Exp Med. 1994 Jun 1;179:1885-93.
- 12 Benard G, Franco M. Paracoccidioidomycosis. In: William G, Roderick J, eds. *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections: Medical Mycology* 10 ed. London: Hodder Arnold 2005:541-59.
- 13 Conzen SD, Janeway CA. *Defective antigen presentation in chronically protein-deprived mice*. Immunology. 1988 Apr;63:683-9.
- 14 Niiya T, Akbar SM, Yoshida O *et al*. *Impaired dendritic cell function resulting from chronic undernutrition disrupts the antigen-specific immune response in mice*. J Nutr. 2007 Mar;137:671-5.

- 15 Waltenbaugh C, Vasquez K, Peterson JD. *Alcohol consumption alters antigen-specific Th1 responses: mechanisms of deficit and repair.* Alcohol Clin Exp Res. 1998 Aug;22:220S-3S.
- 16 Neva FA, Filho JO, Gam AA *et al.* *Interferon-gamma and interleukin-4 responses in relation to serum IgE levels in persons infected with human T lymphotropic virus type I and Strongyloides stercoralis.* J Infect Dis. 1998 Dec;178:1856-9.
- 17 de Oliveira LC, Ribeiro CT, Mendes Dde M, Oliveira TC, Costa-Cruz JM. *Frequency of Strongyloides stercoralis infection in alcoholics.* Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002 Jan;97:119-21.
- 18 Bava AJ, Mistchenko AS, Palacios MF *et al.* *Lymphocyte subpopulations and cytokine production in paracoccidioidomycosis patients.* Microbiol Immunol. 1991;35:167-74.
- 19 Tapia FJ, Goihman-Yahr M, Caceres-Dittmar G *et al.* *Leukocyte immunophenotypes in bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood of paracoccidioidomycosis, sarcoidosis and silicosis.* Histol Histopathol. 1991;6:395-402.
- 20 Benard G, Romano CC, Cacere CR, Juvenale M, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ. *Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis.* Cytokine. 2001 Feb 21;13:248-52.
- 21 Peracoli MT, Kurokawa CS, Calvi SA *et al.* *Production of pro- and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis.* Microbes Infect. 2003 Apr;5:413-8.
- 22 Karhawi AS, Colombo AL, Salomao R. *Production of IFN-gamma is impaired in patients with paracoccidioidomycosis during active disease and is restored after clinical remission.* Med Mycol. 2000 Jun;38:225-9.
- 23 Romano CC, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ, Benard G. *The role of interleukin-10 in the differential expression of interleukin-12p70 and its beta2 receptor on patients with active or treated paracoccidioidomycosis and healthy infected subjects.* Clin Immunol. 2005 Jan;114:86-94.
- 24 Pereira GM, Miller JF, Shevach EM. *Mechanism of action of cyclosporine A in vivo. II. T cell priming in vivo to alloantigen can be mediated by an IL-2-independent cyclosporine A-resistant pathway.* J Immunol. 1990 Mar 15;144:2109-16.
- 25 Spencer JS, Dockrell HM, Kim HJ *et al.* *Identification of specific proteins and peptides in mycobacterium leprae suitable for the selective diagnosis of leprosy.* J Immunol. 2005 Dec 15;175:7930-8.
- 26 Matute DR, Sepulveda VE, Quesada LM *et al.* *Microsatellite analysis of three phylogenetic species of Paracoccidioides brasiliensis.* J Clin Microbiol. 2006 Jun;44:2153-7.
- 27 McCue JM, Link KL, Eaton SS, Freed BM. *Exposure to cigarette tar inhibits ribonucleotide reductase and blocks lymphocyte proliferation.* J Immunol. 2000 Dec 15;165:6771-5.

- 28 Schaible UE, Kaufmann SH. *Malnutrition and infection: complex mechanisms and global impacts*. PLoS Med. 2007 May;4:e115.
- 29 Aloman C, Gehring S, Wintermeyer P, Kuzushita N, Wands JR. *Chronic ethanol consumption impairs cellular immune responses against HCV NS5 protein due to dendritic cell dysfunction*. Gastroenterology. 2007 Feb;132:698-708.
- 30 Joshi PC, Applewhite L, Ritzenthaler JD *et al*. *Chronic ethanol ingestion in rats decreases granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor expression and downstream signaling in the alveolar macrophage*. J Immunol. 2005 Nov 15;175:6837-45.
- 31 Chen H, Cowan MJ, Hasday JD, Vogel SN, Medvedev AE. *Tobacco Smoking Inhibits Expression of Proinflammatory Cytokines and Activation of IL-1R-Associated Kinase, p38, and NF- $\kappa$ B in Alveolar Macrophages Stimulated with TLR2 and TLR4 Agonists*. J Immunol. 2007 Nov 1;179:6097-106.
- 32 Quagliato Júnior R, Grangeia TdAG, Massucio RAdC, De Capitani EM, Rezende SdM, Balthazar AB. *Association between paracoccidioidomycosis and tuberculosis: reality and misdiagnosis*. J Bras Pneumol 2007;33:295-300.
- 33 Huang Q, Liu D, Majewski P *et al*. *The Plasticity of Dendritic Cell Responses to Pathogens and Their Components*. Science. 2001 October 26, 2001;294:870-5.
- 34 Lutz MB, Schuler G. *Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?* Trends Immunol. 2002 Sep;23:445-9.
- 35 Ferreira KS, Lopes JD, Almeida SR. *Down-regulation of dendritic cell activation induced by Paracoccidioides brasiliensis*. Immunol Lett. 2004 Jun 15;94:107-14.
- 36 Schwartz RH. *T cell anergy*. Annu Rev Immunol. 2003;21:305-34.
- 37 Calich VL, Singer-Vermes LM, Siqueira AM, Burger E. *Susceptibility and resistance of inbred mice to Paracoccidioides brasiliensis*. Br J Exp Pathol. 1985 Oct;66:585-94.
- 38 Cano LE, Singer-Vermes LM, Vaz CA, Russo M, Calich VL. *Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns*. Infect Immun. 1995 May;63:1777-83.
- 39 Arruda C, Vaz CA, Calich VL. *Aseptic cure of pulmonary paracoccidioidomycosis can be achieved after a previous subcutaneous immunization of susceptible but not resistant mice*. Microbes Infect. 2007 May;9:704-13.
- 40 Casanova JL, Abel L. *Primary immunodeficiencies: a field in its infancy*. Science. 2007 Aug 3;317:617-9.



Patients	<b>Strongyloidiasis</b>	<b>Smoking habit</b>	<b>Alcohol intake</b>	<b>PROTEIN-ENERGY malnutrition</b>
Pat 1	No	Heavy	Heavy	No
Pat 2	No	Heavy	Moderate	Yes
Pat 3	No	Heavy	Heavy	Yes
Pat 4	Yes	Heavy	Moderate	No
Pat 5	No	Heavy	Heavy	No
Pat 6	No	Heavy	Heavy	Yes
Pat 7	Yes	Heavy	Heavy	No
Pat 8	Yes	Heavy	Moderate	No
Pat 9	Yes	Heavy	Moderate	Yes
Pat 10	Yes	Heavy	Moderate	No
Pat 11	Yes	Heavy	Heavy	Yes
Pat 12	Yes	Heavy	Light	Yes
Pat 13	Yes	Heavy	Heavy	Yes
Pat 14	No	Heavy	Moderate	No
Pat 15	No	Heavy	Light	Yes
Pat 16	Yes	Heavy	Moderate	Yes
Pat 17	Yes	Moderate	Moderate	Yes
Pat 18	No	Heavy	Heavy	No
Pat 19	No	Heavy	Heavy	Yes
Pat 20	No	Heavy	Heavy	Yes

**Table 1 Presence of conditions frequently observed in PCM patients and potentially related to impairment of the immune response**

**Table 2** Cytokine levels in response to antigen-specific and polyclonal stimuli, before and after treatment for PCM

<b>IFN-<math>\gamma</math></b>							
<b>Individuals</b>	<b>UNS</b>	<b>CON-A</b>	<b>PMA+ION</b>	<b>SEB</b>	<b>UNS</b>	<b>GP43</b>	<b>PPD</b>
P11 (UN)	0	ND	>2500	1570	34	0	900
P3 (UN)	0	71	>2500	189	0	0	45
P9 (TR)	28	253	>2500	ND	33	85	379
P8 (TR)	29	>2500	>2500	>2500	83	1483	1866

<b>TNF-<math>\alpha</math></b>							
<b>Individuals</b>	<b>UNS</b>	<b>CON-A</b>	<b>PMA+ION</b>	<b>SEB</b>	<b>UNS</b>	<b>GP43</b>	<b>PPD</b>
P11 (UN)	ND	ND	1187	>2500	171	313	686
P3 (UN)	1200	1968	764	1137	114	260	275
P9 (TR)	>2500	>2500	>2500	ND	571	640	772
P8 (TR)	1639	1905	>2500	>2500	93	396	201

<b>IL-2</b>							
<b>Individuals</b>	<b>UNS</b>	<b>CON-A</b>	<b>PMA+ION</b>	<b>SEB</b>	<b>UNS</b>	<b>GP43</b>	<b>PPD</b>
P11 (UN)	0	ND	1961	412	0	0	0
P3 (UN)	0	0	1853	65	0	0	0
P9 (TR)	0	24	1853	ND	0	0	0
P8 (TR)	0	710	>2500	944	0	0	0

<b>IL-4</b>							
<b>Individuals</b>	<b>UNS</b>	<b>CON-A</b>	<b>PMA+ION</b>	<b>SEB</b>	<b>UNS</b>	<b>GP43</b>	<b>PPD</b>
P11 (UN)	0	ND	0	0	0	0	0
P3 (UN)	0	0	35	0	0	0	0
P9 (TR)	0	0	77	ND	0	0	0
P8 (TR)	0	29	20	24	0	0	0

<b>IL-5</b>							
<b>Individuals</b>	<b>UNS</b>	<b>CON-A</b>	<b>PMA+ION</b>	<b>SEB</b>	<b>UNS</b>	<b>GP43</b>	<b>PPD</b>
P11 (UN)	0	ND	104	0	0	0	0
P3 (UN)	0	0	152	0	0	0	0
P9 (TR)	0	0	129	ND	0	0	0
P8 (TR)	0	49	50	23	0	0	0

<b>IL-10</b>							
<b>Individuals</b>	<b>UNS</b>	<b>CON-A</b>	<b>PMA+ION</b>	<b>SEB</b>	<b>UNS</b>	<b>GP43</b>	<b>PPD</b>
P11 (UN)	32	ND	0	28	0	0	0
P3 (UN)	37	49	0	55	0	0	0
P9 (TR)	0	0	0	ND	0	0	0
P8 (TR)	0	39	0	49	0	0	0

Supernatants of PBL cultures from 4 patients (2 UN, untreated and 2 TR, post-treatment) were stimulated for 3 days with Con-A (1 $\mu$ g/ml), SEB (1 $\mu$ g/ml), PMA+ION (10ng/ml and 1 $\mu$ g/ml respectively) and 5 days with GP43 (10 $\mu$ g/ml) or PPD (20 $\mu$ g/ml). The assessment of the cytokine levels in the supernatants was done by flow cytometry, using the Cytometric Bead Array (CBA) kit. The BD CBA analysis software was used for quantification of cytokines. The cytokine levels are expressed in pg/mL (UNS=unstimulated; ND=not detectable).

**Figure 1** Evaluation of blood leukocyte subsets in PCM patients and healthy volunteers. PBL from untreated (UN) and post-treatment (TR) patients (n=18), as well as from healthy volunteers (HV, n=10) were stained with monoclonal antibodies specific for the different PBL subsets and analyzed by flow cytometry. Each bar represents the mean value for the frequency of cells in a given leukocyte subset and the standard error is drawn for each mean shown.

**Figure 2** IFN- $\gamma$ /IL-4 producing T cells ratio increased following treatment for PCM. (A) The IFN- $\gamma$  /IL-4 producing T cells ratio is shown for 17 untreated (UN) and post-treated (TR) patients. Value for each patient is represented by a different numbers (Pat1, Pat2, ...). The horizontal thick lines correspond to the mean values for the two groups (p=0.07; ANOVA). (B) The experiment shown is representative of the PBLs from one patient before (*top*, UN) and after treatment (*bottom*, TR).

**Figure 3** IL-2/TCGF bioactivity and proliferation in response to stimulation by Con-A is impaired in untreated patients. (A) For the IL-2/TCGF evaluation PBL were stimulated with Con-A and PMA+ION. The IL-2 bioactivity in the supernatants was assessed in the CTLL-2 bioassay and was expressed as cpm. (B) For the proliferative assay PBL were stimulated as previously described and the proliferative response was expressed as cpm. In both figures, the bars correspond to the mean values for the groups of untreated (UN), post-treated (TR) patients (n=18), and healthy volunteers (HV; n=10). The standard errors bars are shown for each group (p<0.05).

Figure 1

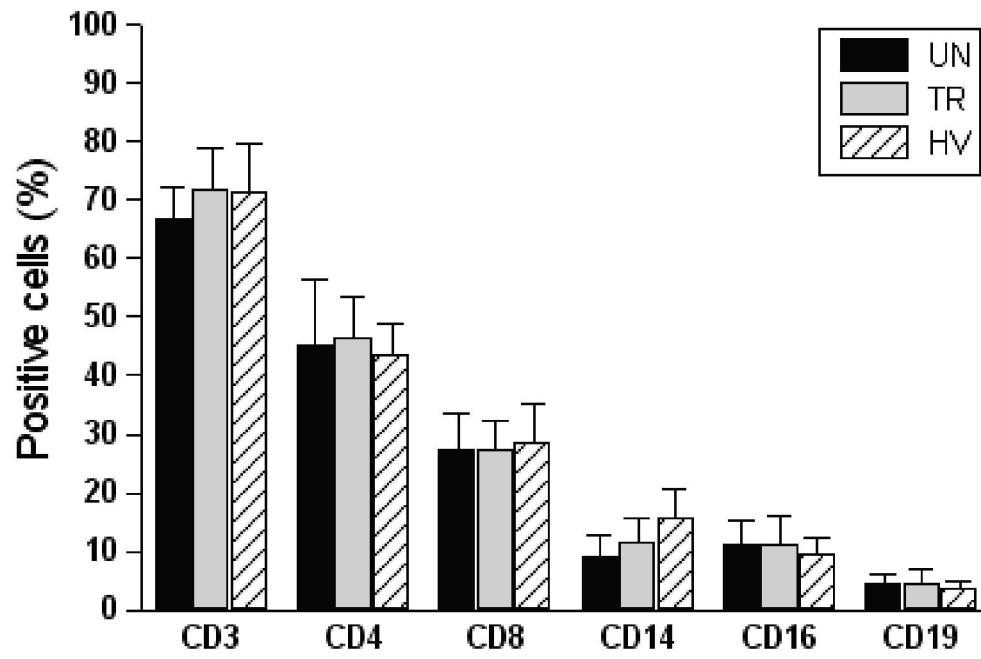
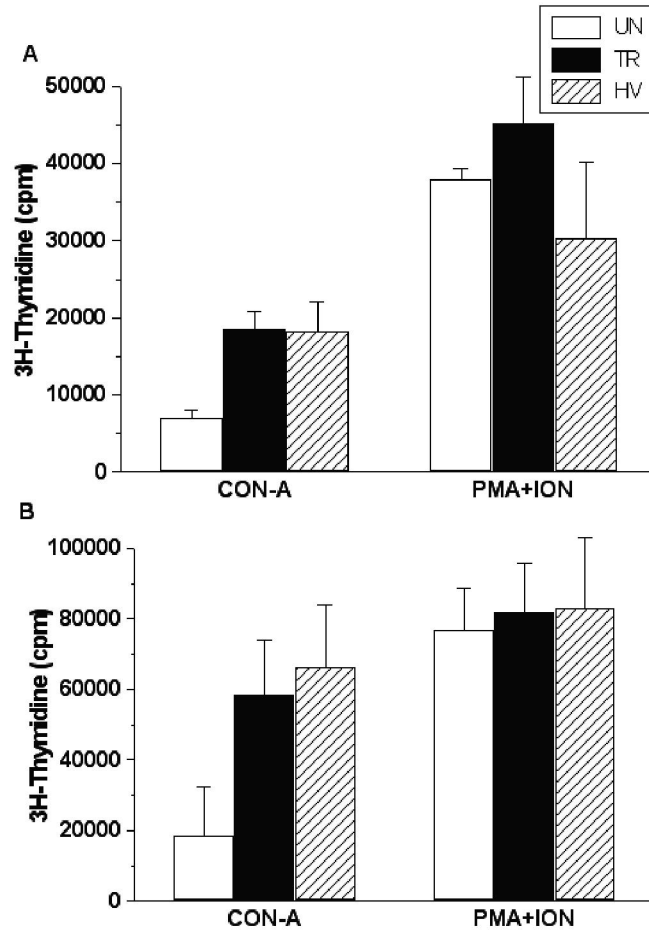




Figure 3



## CONCLUSÕES GERAIS

1. Esta casuística constou de 436 pacientes com predomínio de homens com a forma crônica do adulto e que na maioria das vezes já não exercia mais atividades profissionais com contato com o solo.
2. Os pacientes com PCM apresentam co-morbidades frequentes, destacando-se o tabagismo, o alcoolismo, a DPOC, a tuberculose e as parasitoses intestinais.
3. Pacientes com a forma crônica da micose têm maior propensão à evolução para cura com o tratamento específico. Atenção especial deve ser dispensada aos com a forma juvenil devido à gravidade desta apresentação clínica.
4. A estrongiloidíase é a parasitose mais frequente na PCM e predomina nos pacientes com FCA.
5. Os pacientes com estrongiloidíase tem mais chances de evoluírem para recaída, resistência ou óbito do que os não parasitados. A propedêutica da PCM deve incluir rotineiramente exame parasitológico de fezes com técnicas específicas para *Strongiloides stercoralis* e, na sua impossibilidade, deve ser oferecido tratamento empírico para esta parasitose em vigência da micose ativa.
6. O tratamento regular está implicado diretamente no sucesso terapêutico da PCM.
7. Pacientes em uso de itraconazol apresentam menor chance de abandono de tratamento. O uso de esquemas de menor duração e com menor número de comprimidos pode contribuir para a evolução para cura devido à sua maior adesão.

8. O alcoolismo é um fator de risco para o abandono do tratamento, conseqüentemente para o sucesso terapêutico. Pacientes alcoolistas devem ser encorajados a abandonar o vício e encaminhados aos serviços de combate à dependência alcoólica.
9. Os pacientes com a micose ativa apresentam uma disfunção na produção de citocinas por linfócitos Th1, como a produção de IL2. A proporção de células produtoras de IF  $\gamma$ /IL4 está diminuída e a disfunção na produção de citocinas é reversível após o tratamento.
10. A abordagem terapêutica da PCM é complexa devido às características desta micose sistêmica crônica e aos longos cursos de tratamento necessários. Protocolos de abordagem clínica e terapêutica devem ser implementados nos diversos serviços que prestam atendimento aos pacientes com esta micose, de forma descentralizada, visando à detecção e tratamento precoce das complicações e co-morbidades e à prevenção do abandono.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lutz A. Uma mycose pseudococcidica localizada na bocca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas. *Brasil-Médico*. 1908;22:121.
2. Albornoz MB. Isolation of Paracoccidioides brasiliensis from rural soil in Venezuela. In: Panamerican Symposium on Paracoccidioidomycosis. Medellin; 1971. p. 71-5.
3. Montenegro MR, Miyaji M, Franco M, Nishimura K, Coelho KI, Horie Y, et al. Isolation of fungi from nature in the region of Botucatu, state of Sao Paulo, Brazil, an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1996;91(6):665-70.
4. Wanke B, Londero AT. Paracoccidioides brasiliensis. In: Collier C, Balows A, Sussman M, editors. *Microbiology and Microbial Infections*. 9<sup>th</sup> ed. New York: Oxford University Press Inc.; 1998. p. 395-407.
5. San-Blas G. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent Paracoccidioides brasiliensis. *J Med Vet Mycol*. 1993;31(2):99-113.
6. Restrepo A. The ecology of Paracoccidioides brasiliensis: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia*. 1985;23(5):323-34.
7. Bagagli E, Bosco SMG, Martins R, Fonseca S, Montenegro MR. Pesquisa do Paracoccidioides brasiliensis em tatus e outros animais silvestres. In: VII<sup>o</sup> Encontro Internacional sobre paracoccidioidomicose. Campos do Jordão; 1999.
8. Naiff RD, Ferreira LC, Barrett TV, Naiff MF, Arias JR. Enzootic paracoccidioidomycosis in armadillos (Dasypus novemcinctus) in the State of Para. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1986;28(1):19-27.
9. Vidal MS, de Melo NT, Garcia NM, Del Negro GM, de Assis CM, Heins-Vaccari EM, et al. Paracoccidioides brasiliensis. A mycologic and immunochemical study of a sample isolated from an armadillo (Dasipus novencinctus). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1995;37(1):43-9.
10. Coimbra Jr CEA, Wanke B, Santos RV, Do Valle ACF, Costa RLB, Zancope Oliveira RM. Paracoccidioidin and histoplasmin sensitivity in Tupi-Monde Amerindian populations from Brazilian Amazonia. *Ann Trop Med Parasitol*. 1994;88(2):197-207.
11. Naiff RD, Barrett TV, Arias JR, Naiff MF. Epidemiologic survey of histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and leishmaniasis using skin tests. *Bol Oficina Sanit Panam*. 1988;104(1):35-50.

12. Wanke B, Londero AT. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, editores. Paracoccidioidomycosis. 1ª ed. Boca Ratón: CRC Press; 1994. p. 109-20.
13. Valle ACF, Wanke B, Wanke N, Peixoto TC, Perez M. Tratamento da paracoccidioidomicose: estudo retrospectivo de 500 casos I. Análise clínica, laboratorial e epidemiológica. Anais Brasileiros de Dermatologia. 1992;67(5):251-4.
14. Castro RM, Del Negro G. Clinical characteristics of paracoccidioidomycosis in children. Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo. 1976;31(3):194-8.
15. Restrepo FM, Restrepo M, Restrepo A. Blood groups and HLA antigens in paracoccidioidomycosis. Sabouraudia. 1983;21(1):35-9.
16. Goldani LZ, Monteiro CM, Donadi EA, Martinez R, Voltarelli JC. HLA antigens in Brazilian patients with paracoccidioidomycosis. Mycopathologia. 1991;114(2):89-91.
17. Sadahiro A, Roque AC, Shikanai-Yasuda MA. Generic human leukocyte antigen class II (DRB1 and DQB1) alleles in patients with paracoccidioidomycosis. Med Mycol. 2007;45(1):35-40.
18. Fava SdC, Netto CF. Epidemiologic surveys of histoplasmin and paracoccidioidin sensitivity in Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1998;40(3):155-64.
19. Valle ACF. Tratamento da paracoccidioidomicose. Análise de 500 casos observados no Hospital Evandro Chagas. Fundação Oswaldo Cruz, no período de 1960 a 1986. [Mestrado]. Rio de Janeiro: UFRJ; 1988.
20. Machado Filho J, Miranda JL. Considerações relativas à blastomicose sul Americana. Evolução, resultados terapêuticos e moléstias associadas em 394 casos consecutivos. O Hospital. 1961:375-412.
21. Del Negro G. Treatment of paracoccidioidomycosis. AMB Rev Assoc Med Bras. 1974;20(6):231-4.
22. Costa RLB. Paracoccidioidomicose: aspectos epidemiológicos, clínicos e terapêuticos de 276 pacientes acompanhados no Centro de Pesquisa Hospital Evandro Chagas. [Mestrado]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2000.
23. Coutinho ZF, Silva D, Lazera M, Petri V, Oliveira RM, Sabroza PC, et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). Cad Saude Publica. 2002;18(5):1441-54.
24. Blotta MH, Mamoni RL, Oliveira SJ, Nouer SA, Papaiordanou PM, Goveia A, et al. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. Am J Trop Med Hyg. 1999;61(3):390-4.
25. Paniago AM, Aguiar JI, Aguiar ES, da Cunha RV, Pereira GR, Londero AT, et al. Paracoccidioidomycosis: a clinical and epidemiological study of 422 cases observed in Mato Grosso do Sul. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36(4):455-9.

26. Londero AT, Ramos DD. Paracoccidioidomicose. Estudo clínico e micológico de 260 casos observados no interior do Rio Grande do Sul. *Jornal de Pneumologia*. 1990;16:129-32.
27. Restrepo A, Espinosa GG. Paracoccidioidomycosis experimental del ratón inducida por vía aerogena. *Sabouraudia*. 1976;14:299-304.
28. Londero AT, Melo IS. Doenças infecto-parasitárias (DIP). Paracoccidioidomicose (blastomicose sul-americana; doença de Lutz- Splendore-Almeida). *J. Bras. Med.* 1988;55:96-115.
29. Castro RM, Cuce LC, Netto CF. Paracoccidioidomycosis. Accidental inoculation "in anima nobile." Report of a case. *Med Cutan Ibero Lat Am*. 1975;3(4):289-92.
30. Valle ACF, Costa RLB, Zancopé-Oliveira RM, Pizzini C, Muniz MM, Serapião M, et al. Lesão isolada de paracoccidioidomicose (PCM) por provável inoculação traumática. In: VIIº Encontro Internacional sobre paracoccidioidomicose. Campos do Jordão; 1999. p. 109.
31. Franco M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol*. 1987;25(1):5-18.
32. Marques SA. Paracoccidioidomicose. *An. Bras. Dermatol*. 1998;73(5):455-69.
33. Montenegro MR, Franco M. Pathology. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, editores. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Ratón; 1994. p. 131-50.
34. Goldani LZ, Sugar AM. Paracoccidioidomycosis and AIDS: an overview. *Clin Infect Dis*. 1995;21(5):1275-81.
35. Severo LC, Geyer GR, Londero AT, Porto NS, Rizzon CF. The primary pulmonary lymph node complex in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*. 1979;67(2):115-8.
36. Severo LC, Palombini B, Utz E. Paracoccidioidomicose pulmonar resultante de reativação de lesão quiescente em paciente imunossuprimido. *J. Pneumol*. 1980;6:21-2.
37. Biselli PJ, Juvenale M, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ, Benardi G. IgE antibody response to the main antigenic component of *Paracoccidioides brasiliensis* in patients with paracoccidioidomycosis. *Med Mycol*. 2001;39(6):475-8.
38. Mamoni RL, Nouer SA, Oliveira SJ, Musatti CC, Rossi CL, Camargo ZP, et al. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. *Med Mycol*. 2002;40(2):153-9.
39. Esquenazi D, Costa RLB, Lima MCBS, Santos SLC, Valle ACF, Bóia MN, et al. Recuperação da atividade funcional de linfócitos T em pacientes com a forma crônica da

- paracoccidioidomicose tratados com itraconazol. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2000; 33(Supl): 233.
40. Mok PW, Greer DL. Cell-mediated immune responses in patients with paracoccidioidomycosis. *Clin Exp Immunol.* 1977;28(1):89-98.
  41. Mota NG, Rezkallah-Iwasso MT, Peracoli MT, 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(6):765-72.
  42. Mendes RP. The Gamut of Clinical Manifestations. In: Franco MF, Lacaz CS, Restrepo Moreno A, Del Negro G, editores. *Paracoccidioidomycosis*. 1ª ed. Boca Raton: CRC Press; 1994. p. 233-58.
  43. Franco MV, Goes AM, Koury MC. Model of in vitro granulomatous hypersensitivity in human paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* 1997;137(3):129-36.
  44. Benard G, Romano CC, Cacere CR, Juvenale M, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine.* 2001;13(4):248-52.
  45. Karhawi AS, Colombo AL, Salomao R. Production of IFN-gamma is impaired in patients with paracoccidioidomycosis during active disease and is restored after clinical remission. *Med Mycol.* 2000;38(3):225-9.
  46. Oliveira SJ, Mamoni RL, Musatti CC, Papaiordanou PM, Blotta MH. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes Infect.* 2002;4(2):139-44.
  47. Parise-Fortes MR, Marques SA, Soares AM, Kurokawa CS, Marques ME, Peracoli MT. Cytokines released from blood monocytes and expressed in mucocutaneous lesions of patients with paracoccidioidomycosis evaluated before and during trimethoprim-sulfamethoxazole treatment. *Br J Dermatol.* 2006;154(4):643-50.
  48. Franco MF, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Mota NGS. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1987b;20(2):129-32.
  49. Barbosa W, Daher R, Oliveira AR. Forma linfático-abdominal da blastomicose Sul-Americana. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1968;10(1):16-27.
  50. Bittencourt AL, de Andrade JA, Carvalho EM, Badaro FS, Miranda JS. Uncommon aspects of infantile paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1987;20(4):223-4.
  51. Pereira RM, Bucarechi F, Barison Ede M, Hessel G, Tresoldi AT. Paracoccidioidomycosis in children: clinical presentation, follow-up and outcome. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2004;46(3):127-31.

52. Terra GMF, Gonçalves AJR, Londero AT, Braga MP, Ouricuri AL, Mesquita CC, et al. Paracoccidioomicose em crianças. Apresentação de casos. *Arq. Bras. Med.* 1991;65(1):8-15.
53. Chaib E, de Oliveira CM, Prado PS, Santana LL, Tolo Junior N, de Mello JB. Obstructive jaundice caused by blastomycosis of the lymph nodes around the common bile duct. *Arq Gastroenterol.* 1988;25(4):198-202.
54. Ferreira MS. Contribuição para o estudo clínico-laboratorial e terapêutico da forma juvenil da paracoccidioomicose. *Rev. Pat. Trop.* 1993;22(2):267-406.
55. Benard G, Orii NM, Marques HH, Mendonca M, Aquino MZ, Campeas AE, et al. Severe acute paracoccidioomycosis in children. *Pediatr Infect Dis J.* 1994;13(6):510-5.
56. Marques SA, Dillon NL, Camargo RMP, Habermann MC, Lastória JC, Barraviera SRCS, et al. Paracoccidioomycosis: survey and clinical aspects from the Department of Dermatology of the School of Medicine of Botucatu (São Paulo-Brazil). *Anais Brasileiros de Dermatologia* 1998 b;73(5):411-7.
57. Negroni R. Paracoccidioomycosis (South American blastomycosis, Lutz's mycosis). *Int J Dermatol.* 1993;32(12):847-59.
58. Machado Filho J, Rego AP, Chaves ALF, Miranda JL, Silva CC. Considerações relativas à blastomicose sul-americana. Da participação laringéica e brônquica em 104 casos - resultados endoscópicos. *O Hospital.* 1960;58(4):19-35.
59. Sposto MR, Scully C, de Almeida OP, Jorge J, Graner E, Bozzo L. Oral paracoccidioomycosis. A study of 36 South American patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1993;75(4):461-5.
60. Valle AC, Aprigliano Filho F, Moreira JS, Wanke B. Clinical and endoscopic findings in the mucosae of the upper respiratory and digestive tracts in post-treatment follow-up of paracoccidioomycosis patients. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1995;37(5):407-13.
61. Londero AT, Ramos CD, Lopes JO. Progressive pulmonary paracoccidioomycosis a study of 34 cases observed in Rio Grande do Sul (Brazil). *Mycopathologia.* 1978;63(1):53-6.
62. Machado-Filho J, Miranda JL. Considerações relativas à blastomicose sul-americana. Da participação pulmonar entre 338 casos consecutivos. *O Hospital.* 1960;58(3):23-43.
63. Valle AC, Guimaraes RR, Lopes DJ, Capone D. Thoracic radiologic aspects in paracoccidioomycosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1992;34(2):107-15.
64. Londero AT, Severo LC. The gamut of progressive pulmonary paracoccidioomycosis. *Mycopathologia.* 1981;75(2):65-74.

65. Marques SA. Cutaneous lesions. In: Franco MF, Lacaz CS, Restrepo Moreno A, Del Negro G, editores. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton: CRC Press; 1994. p. 259-69.
66. Andrade ALSS. Paracoccidioidomycose linfático-abdominal. Contribuição ao seu estudo. *Revista de Patologia Tropical*. 1983;12(2):165-256.
67. Del Negro G. Lesões das supra-renais. In: Del Negro G, Lacaz CS, Fiorillo AM, editors. *Paracoccidioidomycose*. São Paulo: Sarvier-Endusp; 1982. p. 196-210.
68. Tendrich M, De Luca V, Tourinho EK, Wanke B, Cuba J, Buescu A, et al. Computed tomography and ultrasonography of the adrenal glands in paracoccidioidomycosis. Comparison with cortisol and aldosterone responses to ACTH stimulation. *Am J Trop Med Hyg*. 1991;44(1):83-92.
69. Tendrich M, Wanke B, Vaisman M, Pedrosa PL, Santos M, Guimaraes M, et al. Funcao da cortex adrenal em pacientes com paracoccidioidomycose. *Arq Bras Med*. 1987;61(4):223-7.
70. Colombo AL, Faical S, Kater CE. Systematic evaluation of the adrenocortical function in patients with paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*. 1994;127(2):89-93.
71. Osa SR, Peterson RE, Roberts RB. Recovery of adrenal reserve following treatment of disseminated South American blastomycosis. *Am J Med*. 1981;71(2):298-301.
72. Valle AC, Guimaraes MR, Cuba J, Wanke B, Tendrich M. Recovery of adrenal function after treatment of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg*. 1993;48(5):626-9.
73. Brandão CDG. Tireóide na paracoccidioidomycose [Mestrado]. Rio de Janeiro: UFRJ; 1993.
74. de Almeida SM, Queiroz-Telles F, Teive HA, Ribeiro CE, Werneck LC. Central nervous system paracoccidioidomycosis: clinical features and laboratorial findings. *J Infect*. 2004;48(2):193-8.
75. Morato-Fernandez RN, Beraldo PS, Masini M, Costa PH. Paracoccidioidomycosis of intramedullar and cerebral localization. *Arq Neuropsiquiatr*. 1991;49(2):192-7.
76. Pla MP, Hartung C, Mendoza P, Stukanoff A, Moreno MJ. Neuroparacoccidioidomycosis: case reports and review. *Mycopathologia*. 1994;127(3):139-44.
77. Colli BO, Assirati Junior JA, Machado HR, Figueiredo JF, Chimelli L, Salvarani CP, et al. Intramedullary spinal cord paracoccidioidomycosis. Report of two cases. *Arq Neuropsiquiatr*. 1996;54(3):466-73.

78. Valle ACF, Costa RLB, Ribeiro CT, Montagna NAA, Cruz LCHd. A case report of intraspinal paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1998;40(3):203-7.
79. de Moura LP, Raffin CN, del Negro GM, Ferreira MS. Paracoccidioidomycosis evidencing spinal cord involvement treated with success by fluconazole. *Arq Neuropsiquiatr*. 1994;52(1):82-6.
80. Amstalden EM, Xavier R, Kattapuram SV, Bertolo MB, Swartz MN, Rosenberg AE. Paracoccidioidomycosis of bones and joints. A clinical, radiologic, and pathologic study of 9 cases. *Medicine (Baltimore)*. 1996;75(4):213-25.
81. Doria AS, Taylor GA. Bony involvement in paracoccidioidomycosis. *Pediatr Radiol*. 1997;27(1):67-9.
82. Fonseca LC, Mignone C. Paracoccidioidomycosis of the small intestine. Radiologic and anatomic clinical aspects of 125 cases. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 1976;31(3):199-207.
83. Gabellini GdC, Martinez R, Ejima FH, Saldanha JC, Modena JL, Velludo MA, et al. Gastric paracoccidioidomycosis. A case report and considerations on the pathogenesis of this disease. *Arq Gastroenterol*. 1992;29(4):147-52.
84. Martinez R, Modena JL, Barbieri-Neto J, Fiorillo AM. Endoscopic evaluation of the involvement of the esophagus, stomach and duodenum in human paracoccidioidomycosis. *Arq Gastroenterol*. 1986;23(1):21-5.
85. Silva MR, Mendes RP, Lastoria JC, Barraviera B, Marques SA, Kamegasawa A. Paracoccidioidomycosis: study of six cases with ocular involvement. *Mycopathologia*. 1988;102(2):87-96.
86. Costa PS, Hollanda BV, Assis RV, Costa SM, Valle LM. Parinaud's oculoglandular syndrome associated with paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2002;44(1):49-52.
87. Cechella MS, Melo CR, Melo IS, Londero AT, Barreto SM, Gaiger AM. Male genital paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1982;24(4):240-5.
88. Severo LC, Kauer CL, Oliveira F, Rigatti RA, Hartmann AA, Londero AT. Paracoccidioidomycosis of the male genital tract. Report of eleven cases and a review of Brazilian literature. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2000;42(1):38-40.
89. Cherri J, Freitas MA, Llorach-Velludo MA, Piccinato CE. Paracoccidioidomycotic aortitis with embolization to the lower limbs. Report of a case and review of the literature. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 1998;39(5):573-6.
90. Martinez R, Moya MJ. The relationship between paracoccidioidomycosis and alcoholism. *Rev Saude Publica*. 1992;26(1):12-6.

91. dos Santos WA, da Silva BM, Passos ED, Zandonade E, Falqueto A. Association between smoking and paracoccidioidomycosis: a case-control study in the State of Espírito Santo, Brazil. *Cad Saude Publica*. 2003;19(1):245-53.
92. Bóia MN, Do Valle ACF, Moura H, Costa RLB, Melo KV, Pereira MA, et al. Estudo da associação da paracoccidioidomicose à estrogiloidíase. In: IIº Congresso Brasileiro de Micologia; 17 a 21 de abril. Rio de Janeiro, Brazil: Sociedade Brasileira de Micologia; 1998. p. 93.
93. Gómez I. Asociación paracoccidioidomycosis tuberculosis. Estudio de 13 casos. *Antiqua Medica Medellín*. 1979;28(3-4):63-70.
94. Nogueira SA, Caiuby MJ, Vasconcelos V, Halpern M, Gouveia C, Thorpe B, et al. Paracoccidioidomycosis and tuberculosis in AIDS patients: report of two cases in Brazil. *Int J Infect Dis*. 1998;2(3):168-72.
95. Oliveira E, Gramacho K, Severo L, Porto NS. Association between paracoccidioidomycosis and tuberculosis: study of 21 cases. *Pesquisa Médica (Porto Alegre)*. 1993;27(1):18-23.
96. Benard G, Gryscek RC, Duarte AJ, Shikanai-Yasuda MA. Cryptococcosis as an opportunistic infection in immunodeficiency secondary to paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*. 1996;133(2):65-9.
97. Kalili-Friedman R, Costa RLB, Gomes MK, Nery JAC, Valle ACF. Paracoccidioidomicose associada à reação hansênica tipo II - relato de um caso. In: IIº Congresso Brasileiro de Micologia. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Micologia; 1998. p. 115.
98. Vargas FJ, Amonzabel AR. Association of paracoccidioidomycosis with lepromatous leprosy. *Boletín Científico CENETROP*. 1997;16(1):56.
99. Leao RC, Mendes E. Paracoccidioidomycosis, neoplasia and associated infections. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 1980;8(3):185-8.
100. Marques SA, Shikanai-Yasuda. Paracoccidioidomycosis associated with immunosuppression, AIDS and cancer. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, editors. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Ratón: CRC Press; 1994. p. 393-405.
101. Conceição YTM. Paracoccidioidomicose e câncer. Frequência da associação em estudo de necropsias. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 1998;31(6):563-7
102. Diamond RD. The growing problem of mycosis in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Rev. Inf. Dis*. 1991;13:480-6.



103. Nobre V, Braga E, Rayes A, Serufo JC, Godoy P, Nunes N, et al. Opportunistic infections in patients with AIDS admitted to an university hospital of the Southeast of Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2003;45(2):69-74.
104. Goldani LZ, Sugar AM. Paracoccidioidomycosis and AIDS: an overview . *Clin Infect Dis*. 1995;21(5):1275-81.
105. Benard G, Duarte AJ. Paracoccidioidomycosis: a model for evaluation of the effects of human immunodeficiency virus infection on the natural history of endemic tropical diseases. *Clin Infect Dis*. 2000;31(4):1032-9.
106. Marques SA, Conterno LO, Sgarbi LP, Villagra AM, Sabongi VP, Bagatin E, et al. Paracoccidioidomycosis associated with acquired immunodeficiency syndrome. Report of seven cases. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1995;37(3):261-5.
107. Fava-Netto C, Raphael A. A reação intradérmica com polissacáride de Paracoccidioides brasiliensis na blastomicose sul-americana. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 1961;3:161.
108. Saraiva EC, Altemani A, Franco MF, Unterkircher CS, Camargo ZP. Paracoccidioides brasiliensis-gp43 used as paracoccidioidin. *J Med Vet Mycol*. 1996;34(3):155-61.
109. Cano LE, Restrepo A. Predictive value of serologic tests in the diagnosis and follow-up of patients with paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1987;29(5):276-83.
110. Del Negro GM, Garcia NM, Rodrigues EG, Cano MI, de Aguiar MS, Lirio VdS, et al. The sensitivity, specificity and efficiency values of some serological tests used in the diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1991;33(4):277-80.
111. Magalhaes A. Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis). Radiological aspects. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 1980;35(3):147-55.
112. Magalhães AEA, Guerrini R. Roentgenographic patterns of chest lesions. The use of Computerized Tomography in Paracoccidioidomycosis. In: Franco M, Lacaz C, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, editors. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, FLA: CRC Press, Inc.; 1994. p. 281-8.
113. Elias J, Jr., dos Santos AC, Carlotti CG, Jr., Colli BO, Canheu A, Matias C, et al. Central nervous system paracoccidioidomycosis: diagnosis and treatment. *Surg Neurol*. 2005;63 Suppl 1:S13-21; discussion S.
114. Ribeiro DO. Nova terapêutica para blastomicose. *Publ. Med. São Paulo*. 1940;12:36-54.
115. Hahn RC, Morato Conceicao YT, Santos NL, Ferreira JF, Hamdan JS. Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and in vitro resistance to ketoconazole and trimethoprim sulphamethoxazole. *Mycoses*. 2003;46(8):342-7.

116. Pereira PC, Barraviera B, Marcondes J, Leite CV, Meira DA, Inoue T, et al. Progressive subacute paracoccidioidomycosis. Treatment of a patient with amphotericin B and parenteral feeding. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1985;27(5):268-73.
117. Pathak A, Pien FD, Carvalho L. Amphotericin B use in a community hospital, with special emphasis on side effects. *Clin Infect Dis*. 1998;26(2):334-8.
118. Mendes RP, Negroni R, Arechavala A. Treatment and control of cure. In: Franco MF, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, editors. *Paracoccidioidomycosis*. 1ª ed. Boca Raton, FLA: CRC Press, Inc.; 1994. p. 267-9
119. Walsh T, Pizzo A. Treatment of systemic fungal infections: recent progress and current problems. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1988;7(4):460-75.
120. Yasuda MA. Pharmacological management of paracoccidioidomycosis. *Expert Opin Pharmacother*. 2005;6(3):385-97.
121. Queiroz-Telles F, Goldani LZ, Schlamm HT, Goodrich JM, Espinel-Ingroff A, 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(11):1462-9.
122. Meira DA, Pereira PC, Marcondes-Machado J, Mendes RP, Barraviera B, Pellegrino Junior J, et al. The use of glucan as immunostimulant in the treatment of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg*. 1996;55(5):496-503.
123. Wanke B, Pedrosa PN, Bretas GS, Setubal S. Combination of rifampicin with amphotericin B in the treatment of paracoccidioidomycosis. Results in 3 treated patients. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1984;26(4):205-11.
124. Valle ACF, Wanke B, Wanke N, Lima NS, Perez M. Tratamento da paracoccidioidomicose: estudo retrospectivo de 500 casos II. Avaliação dos resultados terapêuticos com sulfanilamídicos, anfotericina B, associação sulfametoxazol/trimetoprim, cetoconazol e miconazol. *Anais brasileiros de Dermatologia*. 1993;68(1):65-70.
125. Menezes VM, Soares BG, Fontes CJ. Drugs for treating paracoccidioidomycosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006(2):CD004967.
126. Shikanai-Yasuda MA, Benard G, Higaki Y, Del Negro GM, Hoo S, Vaccari EH, et al. Randomized trial with itraconazole, ketoconazole and sulfadiazine in paracoccidioidomycosis. *Med Mycol*. 2002;40(4):411-7.
127. Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho F, Mendes R, Colombo AL, Moretti M. Consenso em paracoccidioidomicose. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39(3):297-310.

## ANEXOS

### *Anexo 1*

#### PROTOCOLO CLÍNICO PARA DIAGNÓSTICO, TRATAMENTO E SEGUIMENTO DE PACIENTES PORTADORES DE PARACOCCIDIOIDOMICOSE

*Prof. Antonio Carlos Francesconi do Valle*  
*Dra. Regina Lana Braga Costa*

#### CRITÉRIOS DE INTERNAÇÃO:

1. pacientes matriculados no IPEC que não tenham condições de serem acompanhados no ambulatório:

- ✘ por intercorrências clínicas
- ✘ por recaída da doença
- ✘ para avaliações clínico-laboratoriais pertinentes aos projetos de pesquisa em andamento

#### PROCEDIMENTOS NO ATO DA INTERNAÇÃO:

1. **Anamnese e exame físico completos** no prontuário (no ato de 1ª internação) ou resumo de internação (nas re-internações)

2. **Exames inespecíficos:**

- ✘ hemograma com VHS e plaquetas, glicemia, uréia, creatinina, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> bilirrubinas totais e frações, TGO, TGP, fosfatase alcalina,  $\gamma$ GT, lipidograma completo (pré, durante e pós tratamento com itraconazol), TAP e PTT.
- ✘ Rx de tórax (PA e perfil) e TC de tórax
- ✘ E.P.F (3 amostras de fezes), E.C.G., E.A.S.
- ✘ pesquisa de BAAR em escarro (3 amostras)
- ✘ anti-HIV após aconselhamento
- ✘ ultra-sonografia abdominal nos pacientes com as formas juvenis

✘ teste de estímulo rápido com ACTH – realizado às sextas-feiras pela manhã no Hospital-Dia. Nos pacientes que fizeram teste pelo *método com repouso prévio* e que precisam de teste pós-terapêutico deverá ser feito pedido por escrito para realização de exame com técnica semelhante, no IPEC ou Hospital de Ipanema.

### 3. Exames *específicos*:

- ✘ pareceres da otorrinolaringologia e neurologia (nas internações de 1ª vez e recaídas)
- ✘ TC de crânio segundo indicação da Neurologia
- ✘ sorologia para fungos – imunodifusão dupla (Ouchterlony)
- ✘ exame **micológico** do material colhido de **escarro** (3 amostras em dias diferentes), **biópsias ou de secreções**: enviar o material imediatamente ao laboratório de micologia em frasco com solução salina estéril.
- ✘ exame histopatológico das lesões: colocar o fragmento em frasco com formol a 10% e enviar ao Laboratório de Anatomia Patológica.

### 4. Outros procedimentos

- ✘ avaliação pelo Serviço de Nutrição
- ✘ pedir aos familiares os blocos ou lâminas em branco de lesões que tenham sido biopsiadas em outros serviços
- ✘ inserção do paciente nos projetos de pesquisa adequados após esclarecimento e assinatura dos termos de consentimento.

### TRATAMENTO

Usualmente o tratamento é de longa duração para permitir o controle das manifestações clínicas e prevenção das recaídas. O tempo de tratamento é de 12 meses nas formas leves e de 18 a 24 meses nas formas moderadas a graves.

Além do tratamento antifúngico específico (tabela 1) o paciente deverá receber assistência para as condições gerais, como tratamento odontológico e reposição protéico-calórica adequada. Fazem parte do tratamento coadjuvante: a corticoterapia nos casos com baixa reserva adrenal ou doença de Addison, e o tratamento das outras co-morbidades (enteroparasitoses, tuberculose, DPOC, infecções bacterianas pulmonares, aids).

### MEDICAMENTOS:

1ª. opção - SMX/TMP - primeira escolha para adultos, com base na facilidade de administração, melhor tolerabilidade e distribuição gratuita pela rede pública.

**Tabela 1 – Esquemas de tratamento da PCM – formas leves a moderadas**

Medicamentos	Dose	Duração do tratamento
Itraconazol	<p><b>Adultos:</b> 200mg por dia, logo após uma das refeições principais (almoço ou jantar), em uma única tomada.</p> <p><b>Crianças</b> com &gt; 30kg e &gt; 5 anos, 5 a 10mg/kg/dia, ajustar a dose não abrindo a cápsula*</p>	9 a 18 meses meses
Sulfametoxazol / trimetoprim	<p><b>Adultos:</b> trimetoprim:160 a 240mg sulfametoxazol 800mg a 1.200mg. VO12/12hs</p> <p><b>Crianças</b> – trimetoprim, 8 a 10mg/kg sulfametoxazol, 40 a 50 mg/kg, VO 12/12h</p>	<p>12 meses nas formas leves</p> <p>18 a 24 meses nas formas moderadas.</p>

\* Maior experiência em crianças é com sulfametoxazol/trimetoprim.

*Tabela adaptada do Consenso em Paracoccidioomicose. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 39(3): 297-310, mai-jun, 2006.*

2ª. opção - itraconazol: indicado nos pacientes com baixa adesão ao tratamento (ingesta irregular do SMX/TMP), devido ao alto custo.

3ª opção: Anfotericina B (**dose total** de 50 mg/kg ou 2 a 3 g para adultos), iniciando com 0,25 mg/kg/dia e, dependendo da tolerância, aumentando progressivamente em infusão diária por 6 h até atingir 1mg/kg/dia (máx. 50 mg/dia). Posteriormente aplicar em dias alternados.

#### Neuroparacoccidioomicose:

**1ª opção:** SMZ/TMP durante um período mínimo de 2 anos, tendo acompanhamento radiológico, clínico e laboratorial conforme rotina (abaixo descrita). Nos casos graves, iniciar com medicação endovenosa e monitorizar os para-efeitos tóxicos com hemograma completo semanal.

**2ª opção:** Fluconazol 200 a 400 mg /dia, EV ou VO de acordo com a gravidade do caso pelo tempo necessário para o desaparecimento ou cicatrização das lesões (mínimo de um ano). Em casos refratários considerar uso de voriconazol.

OBS.: O tratamento cirúrgico é restrito aos casos com indicação específica.

**\* em todos os pacientes tabagistas e etilistas deve ser aconselhado o abandono da dependência química e oferecido acompanhamento pelo Serviço de Psicologia do IPEC.**

Os pacientes com formas graves de PCM, com perda de peso > 10%, dificuldade de deglutição, comprometimento do estado geral, insuficiência respiratória, sinais ou sintomas neurológicos ou evidências de comprometimento de adrenais, devem preferencialmente realizar o tratamento em regime hospitalar.

Os pacientes devem ser acompanhados após a alta em regime ambulatorial (*Tabela II*) e o tratamento deve ser mantido até o alcance da **cura total aparente** (cura clínica, radiológica, micológica e sorológica).

As dúvidas e particularidades do tratamento devem ser analisadas **com o grupo** de pesquisadores do PEPES Micoses.

OBS:

✘ O itraconazol **não** pode ser utilizado conjuntamente com: *astemizol, antiácidos e bloqueadores de receptor H2, barbitúricos, ciclosporina, didanosina, digoxina, fentanil, fenitoína, rifampicina, cisaprida e terfenadina.*

✘ O itraconazol não causa efeitos nefrotóxicos, já os sulfamídicos e a anfotericina B devem ser evitados nos pacientes com PCM e insuficiência renal.

✘ Evitar os azólicos em pacientes com alterações funcionais hepáticas - enzimas hepatocelulares > 4 vezes o limite máximo normal. O fluconazol é o de menor hepatotoxicidade.

✘ As sulfas devem ser utilizadas com cautela pois, *raramente*, podem causar hepatotoxicidade.

- ✘ A anfotericina B pode ser indicada com menos restrições, mas as preparações lipídicas revelam certo grau de hepatotoxicidade.
- ✘ O medicamento mais usado em crianças é SMZ/TMP pela eficácia conhecida, boa tolerabilidade e pela facilidade de administração. Tem apresentação na forma de xarope, facilitando a adequação de doses, é palatável para as crianças e é fornecido pela rede pública de saúde.

### **Paracoccidioidomicose e gravidez**

As alterações imunológicas próprias da gestação podem agravar a história natural de micoses sistêmicas e doenças causadas por patógenos intracelulares. A literatura registra o aumento de ocorrência de abortos e natimortos em gestantes com PCM. Além disso, foram observadas placentite e intervilosite com trombose nos vasos da placenta de gestantes com PCM, podendo resultar em imaturidade e óbito fetal. O alto risco de óbito materno e fetal sugere um manejo mais agressivo nesses casos. As opções terapêuticas são a Anfotericina B, com a qual não há relatos de efeito teratogênico e a associação SMZ/TMP, seguro após as 4 primeiras semanas da gestação, devendo ser suspensa pelo menos uma semana antes do parto para evitar a ocorrência de kernicterus. Os azólicos não devem ser utilizados pela conhecida ação teratogênica.

### **Paracoccidioidomicose e aids**

Pouco mais de uma centena de casos de PCM associada à aids já foram relatados, a maioria deles com características de forma aguda disseminada concomitantes às características da forma crônica da doença. A maior parte dos pacientes com co-infecção PCM-aids apresenta-se com níveis de linfócitos CD4 inferiores a 200 céls/ml e os anticorpos anti-*P. brasiliensis* estão presentes em apenas 60% dos casos.

Devido à limitação de dados disponíveis, não é possível fazer qualquer recomendação com base em evidências científicas sobre a duração da terapêutica antifúngica nesses pacientes. Entretanto sugere-se que em pacientes com estado avançado da aids e manutenção da contagem de células CD4 abaixo de 200/ml a droga antifúngica seja mantida indefinidamente. Nos pacientes com controle da infecção pelo HIV, negatização da carga viral, recuperação de linfócitos CD4  $\geq$  200/ml, pode-se considerar a possibilidade de suspensão da profilaxia secundária, uma vez atingidos os critérios de cura da PCM.

**TABELA 2: ACOMPANHAMENTO AMBULATORIAL:**

PERÍODO	TIPO DE CONSULTA	AValiaÇÃO/EXAMES
15 dias após a alta ou 21 dias após início do tratamento	Primeiro retorno	Hemograma, eletroforese de proteínas, hepatograma, Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Exame de ORL e avaliação pela neurologia*.
30 dias	Avaliação clínica	Hemograma, hepatograma, Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , ex. micológico.
60 dias	Avaliação clínica	Hemograma, hepatograma, Na <sup>+</sup> ; K <sup>+</sup> ; ex. micológico, RX de tórax e sorologia.
90 dias	Avaliação clínica	Hemograma, hepatograma, Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> .
4 meses	Avaliação clínica	Hemograma, hepatograma, Na <sup>+</sup> ; K <sup>+</sup> ; RX de tórax e sorologia.
6 meses	Avaliação clínica	Hemograma, hepatograma, Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , sorologia e TC de tórax ou crânio.
9 meses	Avaliação clínica	Hemograma, hepatograma, Na <sup>+</sup> ; K <sup>+</sup> ; RX de tórax e sorologia.
12 meses	Avaliação clínica	Hemograma, hepatograma, Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , sorologia e TC de tórax ou crânio.
A cada 6 meses por 2 anos	Avaliação clínica	Sorologia e RX de tórax.
A cada ano por mais 5 anos de follow up**	Avaliação clínica	Sorologia e RX de tórax.

\* caso haja lesão local.

\*\* alta definitiva com encaminhamentos pertinentes às co-morbidades para assistência na rede pública.

*OBS: nos pacientes em uso de itraconazol, deve ser avaliado lipidograma (colesterol e triglicerídeos) a cada 2 meses de tratamento.*

#### **4. Critérios para corticoterapia - insuficiência adrenal \síndrome Addisoniana:**

- perda ponderal ou não recuperação do peso em pacientes após resposta clínica à terapêutica específica.
- hipotensão arterial e/ou hipotensão ortostática (afastadas outras causas e conforme dados relacionados com idade, área cardíaca, ECG, etc.).
- astenia, hiporexia não relacionadas à doença (PCM e DPOC ou intolerância medicamentosa).
- hiperpigmentação: pele bronzeada e vitiligo; hiperpigmentação das cicatrizes, dobras de pele, aréolas, gengiva e pontos de pressão.



- sódio plasmático baixo e potássio plasmático alto.
- baixa reserva adrenal verificada no teste da cortrosina (dosagem de cortisol sérico basal e após estímulo com 250 µg de ACTH EV aos 30 min e 60 min), ou seja, *ausência de aumento acima de 20ng/ml aos 30 min pós-estímulo, independente do valor basal de cortisol sérico.*
- A corticoterapia é feita com doses que variam de 7,5 mg a 15 mg/dia de prednisona ou equivalente, divididas em 2 tomadas.

## 5. Acompanhamento da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

A fibrose pulmonar foi descrita por imagem em cerca de 50% dos pacientes com PCM crônica pulmonar, 23% evoluindo com DPOC e suas complicações. As alterações radiológicas moderadas e graves estão presentes nos pacientes com quadros funcionais obstrutivos. Nas gasometrias, alguns pacientes mantêm níveis de hipoxemia e hipercapnia; nas avaliações hemodinâmicas pode haver hipertensão pulmonar em decorrência da hipóxia.

Os pacientes com DPOC detectada deverão ser encaminhados, desde o início do tratamento ao ambulatório de pneumologia do IPEC.

### CRITÉRIOS DE CURA DA PCM:

- ♦ **cura clínica:** desaparecimento de sinais e sintomas presentes antes do tratamento, com retorno do peso a níveis habituais.
- ♦ **cura micológica:** negatificação dos exames nos quais foi identificado o fungo.
- ♦ **cura imunológica:** negatificação da reação de imunodifusão ou sua manutenção em níveis baixos estáveis (<1:2).
- ♦ **cura radiológica:** desaparecimento ou melhora (evolução para padrão de fibrose) das alterações radiológicas.
- ♦ normalização das alterações em exames complementares inespecíficos como: retorno do VHS a níveis normais, normalização da eletroforese de proteínas, ausência de adenomegalias intra-abdominais e/ou visceromegalias à ultrassonografia, desaparecimento das lesões cranianas à TC ou sua evolução para calcificação.

**Anexo2****QUESTIONÁRIO PARA A COLETA DE DADOS DOS PACIENTES COM PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

NOME: \_\_\_\_\_ REGISTRO: \_\_\_\_\_  
 DATA CADASTRO: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ DATA NASC. \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
 SEXO: 1. ( ) masculino 2. ( ) feminino NATURALIDADE: \_\_\_  
 RAÇA: 1. ( ) branco 2. ( ) pardo 3. ( ) preto 4. ( ) ignorado 5. ( ) amarelo 6. ( ) indígena  
 END. ATUAL \_\_\_\_\_.

ESCOLARIDADE: 1. ( ) analfabeto  
 2. ( ) ensino fundamental incompleto  
 3. ( ) ensino fundamental completo  
 4. ( ) ensino médio incompleto  
 5. ( ) ensino médio completo  
 6. ( ) ensino superior  
 9. ( ) ignorado/não sabe

PROFISSÃO ATUAL: \_\_\_\_\_

ATIVIDADE PROFISSIONAL ATUAL:

1. ( ) diretamente ligada ao solo
2. ( ) indiretamente ligada ao solo
3. ( ) contato com o solo indeterminado
4. ( ) não ligada ao solo

PROFISSÃO ANTERIOR (primeiros vinte anos): \_\_\_\_\_

ATIVIDADE PROFISSIONAL ANTERIOR:

1. ( ) diretamente ligada ao solo
2. ( ) indiretamente ligada ao solo
3. ( ) contato com o solo indeterminado
4. ( ) não ligada ao solo

\*\*\*\*\*ABORDAGEM CLÍNICA\*\*\*\*\*

FORMA CLÍNICA: 1. ( ) forma crônica do adulto 2. ( ) forma juvenil

GRAU: 1. ( ) leve 2. ( ) moderado 3. ( ) grave

PCM unifocal? 1. ( ) sim 2. ( ) não

ACOMETIMENTO: **laringe supra-glótica** 1. ( ) sim 2. ( ) não 3. ( ) ign

**glótica** 1. ( ) sim 2. ( ) não 3. ( ) ign; **subglótica** 1. ( ) sim 2. ( ) não 3. ( ) ign

**pulmão** 1. ( ) sim 2. ( ) não 3. ( ) ign **traquéia** 1. ( ) sim 2. ( ) não 3. ( ) ign

**mucosa oral** 1. ( ) sim 2. ( ) não 3. ( ) ign **m. nasal** 1. ( ) sim 2. ( ) não 3. ( ) ign

**gânglios** 1. ( ) sim 2. ( ) não 3. ( ) ign **pele** 1. ( ) sim 2. ( ) não 3. ( ) ign  
**SNC** 1. ( ) sim 2. ( ) não 3. ( ) ign **ósseo** 1. ( ) sim 2. ( ) não 3. ( ) ign **hepatomegalia** 1. ( ) sim 2. ( ) não 3. ( ) ign **esplenomegalia** 1. ( ) sim 2. ( ) não 3. ( ) ign **TGI** 1. ( ) sim 2. ( ) não 3. ( ) ign

\*\*\*\*\*CO-MORBIDADES\*\*\*\*\*

**tuberculose** 1. ( ) sim 2. ( ) não 3. ( ) ign **quando ?** 1. ( ) com a micose ativa  
 2. ( ) com a micose inativa  
 3. ( ) ignorado

**estrongiloidíase** 1. ( ) sim 2. ( ) não 3. ( ) ign **quando ?** 1. ( ) com a micose ativa  
 2. ( ) com a micose inativa  
 3. ( ) mais de dois episódios  
 4. ( ) ignorado

**ancilostomíase** 1. ( ) sim 2. ( ) não 3. ( ) ign

**outras geo-helminthíases** 1. ( ) sim 2. ( ) não 3. ( ) ign

**neoplasia** 1. ( ) sim 2. ( ) não 3. ( ) ign **quando ?** 1. ( ) com a micose ativa  
 2. ( ) com a micose inativa  
 3. ( ) ignorado

**desnutrição.** 1. ( ) sim 2. ( ) não 3. ( ) ign

**enfisema** 1. ( ) sim 2. ( ) não 3. ( ) ign **DPOC** 1. ( ) sim 2. ( ) não 3. ( ) ign

**baixa reserva adrenal** 1. ( ) sim 2. ( ) não 3. ( ) ign

**Addison** 1. ( ) sim 2. ( ) não 3. ( ) ign **crise Addisoniana** 1. ( ) sim 2. ( ) não 3. ( ) ign

**cor pulmonale.** 1. ( ) sim 2. ( ) não 3. ( ) ign **outras** 1. ( ) sim 2. ( ) não

Quais outras \_\_\_\_\_

**tabagismo:** 1. ( ) sim 2. ( ) não 3. ( ) ign

**tipo tabagismo** 1. ( ) leve 2. ( ) moderado 3. ( ) intenso 4. ( ) ign **tempo:** \_\_\_\_\_ anos

**etilismo** 1. ( ) sim 2. ( ) não 3. ( ) ign

**tipo etilismo** 1. ( ) leve 2. ( ) moderado 3. ( ) intenso 4. ( ) ign **tempo:** \_\_\_\_\_ anos

outros hábitos 1. ( ) sim 2. ( ) não

quais outros hábitos? \_\_\_\_\_

TEMPO DE DOENÇA (EM MESES): \_\_\_\_\_

\*\*\*\*\*TRATAMENTO\*\*\*\*\*

TRATAMENTO PRÉVIO: 1. sim ( ) 2. não ( ) data início: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ quantos?\_\_

data fim: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

DROGAS: Bactrim 1. ( ) sim 2. ( ) não Itraconazol 1. ( ) sim 2. ( ) não

Anfot.B 1. ( ) sim 2. ( ) não Cetoconazol 1. ( ) sim 2. ( ) não

Fluconazol 1. ( ) sim 2. ( ) não Outras 1. ( ) sim 2. ( ) não;

Quais? \_\_\_\_\_

**PRIMEIRO TRATAMENTO:** data início: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ data fim: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

DROGAS: Bactrim 1. ( ) sim 2. ( ) não Itraconazol 1. ( ) sim 2. ( ) não

Anfot.B 1. ( ) sim 2. ( ) não Cetoconazol 1. ( ) sim 2. ( ) não

Fluconazol 1. ( ) sim 2. ( ) não Outras 1. ( ) sim 2. ( ) não;

Quais? \_\_\_\_\_

sorologia do início:1: \_\_\_ ; sorologia do final: 1: \_\_\_

MODO DE TRATAMENTO 1. ( ) regular 2. ( ) irregular;

ABANDONO TRATAMENTO? 1.( ) sim 2. ( ) não 3. ( ) ign

EVOLUÇÃO CLÍNICA APÓS *PRIMEIRO TRATAMENTO*

1. ( ) cura 2.( ) recaída 3.( ) em tratamento 4.( ) recidiva 5.( ) resistência 6.( ) intolerância

7. ( ) ign data 1ª recaída: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**SEGUNDO TRATAMENTO:** data início: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ data fim: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

DROGAS: Bactrim 1. ( ) sim 2. ( ) não Itraconazol 1. ( ) sim 2. ( ) não

Anfot.B 1. ( ) sim 2. ( ) não Cetoconazol 1. ( ) sim 2. ( ) não

Fluconazol 1. ( ) sim 2. ( ) não Outras 1. ( ) sim 2. ( ) não;

Quais? \_\_\_\_\_

sorologia do início:1: \_\_\_ ; sorologia do final: 1: \_\_\_

MODO DE TRATAMENTO 1. ( ) regular 2. ( ) irregular;

ABANDONO TRATAMENTO? 1.( ) sim 2. ( ) não 3. ( ) ign

EVOLUÇÃO CLÍNICA APÓS *SEGUNDO TRATAMENTO*

1. ( ) cura 2.( ) recaída 3.( ) em tratamento 4.( ) recidiva 5.( ) resistência 6.( ) intolerância

7. ign data 1ª recaída: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**TERCEIRO TRATAMENTO:** data início: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ data fim: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

DROGAS: Bactrim 1. ( ) sim 2. ( ) não; Itraconazol 1. ( ) sim 2. ( ) não

Anfot.B 1. ( ) sim 2. ( ) não; Cetoconazol 1. ( ) sim 2. ( ) não

Fluconazol 1. ( ) sim 2. ( ) não; Bactrim venoso 1. ( ) sim 2. ( ) não;

Outras 1. ( ) sim 2. ( ) não; quais? \_\_\_\_\_

sorologia do início:1: \_\_\_ ; sorologia do final: 1: \_\_\_

MODO DE TRATAMENTO 1. ( ) regular 2. ( ) irregular;

ABANDONO TRATAMENTO? 1.( ) sim 2. ( ) não 3. ( ) ign

EVOLUÇÃO CLÍNICA APÓS *TERCEIRO TRATAMENTO*

1. ( ) cura 2.( ) recaída 3.( ) em tratamento 4.( ) recidiva 5.( ) resistência 6.( ) intolerância

7. ign data 1ª recaída: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

HOUVE RECIDIVA? 1. ( ) sim 2. ( ) não 3. ( ) ign

HOUVE RESISTÊNCIA? 1. ( ) sim 2. ( ) não

ÚLTIMA SOROLOGIA: 1: \_\_\_\_\_

DATA DA NEGATIVAÇÃO: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

data final dos tratamentos: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

TEMPO DE CICATRIZAÇÃO DAS LESÕES: \_\_\_\_ meses

**Recuperou a função adrenal?** 1. ( ) sim 2. ( ) não 3. ( ) ign

OBS: \_\_\_\_\_

\*\*\*\*\*COMPLICAÇÕES\*\*\*\*\*

Obstrução das VADS 1. ( ) sim 2. ( ) não; DPOC reagudizado 1. ( ) sim 2. ( ) não

Colestase hepática 1. ( ) sim 2. ( ) não; gastrite/duodenite 1. ( ) sim 2. ( ) não

Outras 1. ( ) sim 2. ( ) não; quais outras \_\_\_\_\_

\*\*\*\*\*SEQÜELAS\*\*\*\*\*

Cicatriz retrátil de mucosa 1. ( ) sim 2. ( ) não; baixa reserva adrenal 1. ( ) sim 2. ( ) não

Estenose laringe 1. ( ) sim 2. ( ) não; adenopatia residual 1. ( ) sim 2. ( ) não;

Microstomia 1. ( ) sim 2. ( ) não; outras 1. ( ) sim 2. ( ) não;

quais outras \_\_\_\_\_

ABANDONO DE SEGUIMENTO 1. ( ) sim 2. ( ) não

SEGUIMENTO IRREGULAR 1. ( ) sim 2. ( ) não

RX INICIAL

data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ padrão: 1. ( ) normal; 2. ( ) fibrose; 3. ( ) infiltrado micronodular ;

4. ( ) infiltrado reticulonodular 5. ( ) misto ; 6. ( ) pneumônico ;

7. ( ) outro: \_\_\_\_\_

RX FINAL

data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ padrão: 1. ( ) normal; 2. ( ) fibrose; 3. ( ) infiltrado micronodular ;

4. ( ) infiltrado reticulonodular 5. ( ) misto ; 6. ( ) pneumônico ;

7. ( ) outro: \_\_\_\_\_

TC INICIAL

data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ padrão: 1.( ) normal ; 2.( ) bolhas de enfisema; 3.( ) opacidade em vidro fosco; 4.( )

espessamento do interstício; 5.( ) fibrose; 6.( ) cavitações; 7.( ) distorção da arquitetura pulmonar; 8.( )

nódulos; 9.( ) bronquiectasias; 10.( ) linfadenomegalia no mediastino; 11.( ) envolvimento pleural.

TC FINAL

data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ padrão: 1.( ) normal ; 2.( ) bolhas de enfisema; 3.( ) opacidade em vidro fosco; 4.( ) espessamento do interstício; 5.( ) fibrose; 6.( ) cavitações; 7.( ) distorção da arquitetura pulmonar; 8.( ) nódulos; 9.( ) bronquiectasias; 10.( ) linfadenomegalia no mediastino; 11.( ) envolvimento pleural.

*Projeto registrado no CEP sob nº 0026.0.009.000-06.*

*“Abordagem Clínica e Terapêutica da Paracoccidioidomicose e Fatores Prognósticos Associados à Evolução da Doença”.*

*Pesquisador responsável: Dra. Regina Lana Braga Costa*