

Ana Paula da Costa Marques

**INFECÇÃO PELO *Paracoccidioides brasiliensis* EM POPULAÇÃO
DE ASSENTAMENTOS RURAIS DE JARAGUARI, MATO
GROSSO DO SUL. ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO UTILIZANDO A
INTRADERMORREAÇÃO COM gp43 E RETESTAGEM PARA
AVALIAÇÃO DO FENÔMENO *BOOSTER*.**

Campo Grande - MS
2012

Ana Paula da Costa Marques

**INFECÇÃO PELO *Paracoccidioides brasiliensis* EM POPULAÇÃO
DE ASSENTAMENTOS RURAIS DE JARAGUARI, MATO
GROSSO DO SUL. ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO UTILIZANDO A
INTRADERMORREAÇÃO COM gp43 E RETESTAGEM PARA
AVALIAÇÃO DO FENÔMENO *BOOSTER*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Anamaria de Mello Miranda Paniago

Campo Grande – MS
2012

Ana Paula da Costa Marques

INFECÇÃO PELO *Paracoccidioides brasiliensis* EM POPULAÇÃO DE ASSENTAMENTOS RURAIS DE JARAGUARI, MATO GROSSO DO SUL. ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO UTILIZANDO A INTRADERMORREAÇÃO COM gp43 E RETESTAGEM PARA AVALIAÇÃO DO FENÔMENO *BOOSTER*.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Doutor.

Resultado _____

Campo Grande (MS), _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo / UNIFESP

Prof. Dr. Mauricio Antonio Pompilio / UFMS

Prof. Dra. Sonia Maria Fernandes / UFMS

Dra. Sandra Maria do Valle Leone de Oliveira / UFMS

Prof. Dra. Anamaria de Mello Miranda Paniago / UFMS

Ao meu marido André e minha filha Ana Clara pelo apoio e compreensão durante estes meses.

Aos meus pais e irmãos por todo amor e carinho durante todas as minhas conquistas.

À Deus, por esta família maravilhosa.

AGRADECIMENTOS

À todos que colaboraram de alguma forma na realização deste sonho.

Especialmente a Dra. Anamaria, não só pela orientação profissional, mas por todo companheirismo e amizade durante esta caminhada e que ficará para sempre. Admiro muito a senhora.

À todos os moradores de Furnas de Dionísio, Jaraguari Velho, Boa Vista, Bonfim, Vale Verde, Primavera e Estrela que confiaram em nós e nos receberam com carinho e amizade.

À equipe que esteve ao meu lado durante todas nossas visitas domiciliares, Grazielle, Dayane, Leandro, Viviane, Rogério e seu filho Antônio.

À Secretaria Municipal de Saúde do Município de Jaraguari e ao SESI por acreditar e apoiar a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Zoilo Pires de Camargo pela atenção e colaboração no decorrer deste trabalho.

À todos do Hospital-Dia Esterina Corsini da UFMS por me receber e colaborar com este projeto.

Ao Programa de Pós-graduação Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste, professor Ricardo Dutra Aydos e à secretária Vera.

As minhas amigas que sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado, em especial Sandra, Sonia e Monica.

À minha família pelos ensinamentos, apoio, amor e compreensão durante minhas viagens, meus estudos, meus momentos de irritação e nervosismo.

À Deus que me proporcionou estar ao lado de todas essas pessoas maravilhosas, que foram e continuarão sendo de extrema importância na minha vida.

Obrigada, muito obrigada!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

Estudos sobre a epidemiologia da infecção paracoccidióidica são baseados em inquéritos realizados com testes intradérmicos, sendo a paracoccidioidina o antígeno mais utilizado, contudo, reações cruzadas com outras infecções fúngicas têm sido relatadas. A glicoproteína de 43 - kDa (gp43) por ser o componente mais antigênico do *Paracoccidioides brasiliensis* e apresentar maior especificidade vem sendo utilizada em testes intradérmicos. A prevalência da infecção paracoccidióidica nas diferentes áreas da América Latina e Brasil não é totalmente conhecida. Em Mato Grosso do Sul (MS), estado com base econômica agropecuária e com a maior frequência relativa de mortes por paracoccidioidomicose, se desconhece a prevalência da infecção paracoccidióidica. Os objetivos deste estudo foram: estimar a prevalência da infecção paracoccidióidica em assentamentos rurais do município de Jaraguari (MS) e avaliar os fatores de riscos associados à infecção; bem como identificar a ocorrência e estimar a taxa de fenômeno *booster* na intradermorreação com a gp43. Um estudo seccional foi realizado em oito assentamentos rurais do município de Jaraguari (MS). Dos 4555 assentados, uma amostra de 721 foi selecionada por conveniência. Os sujeitos do estudo foram submetidos a uma entrevista com dados demográficos e hábitos de vida e ao teste cutâneo com a aplicação intradérmica de 0,1mL de gp43 (60 µg/mL) no antebraço esquerdo. A leitura do resultado foi realizada após 48 horas da aplicação, e o teste foi considerado positivo se a medida do maior diâmetro de induração fosse maior ou igual a 5mm. Nos indivíduos negativos, foi realizada a retestagem do teste intradérmico com a gp43 após 10 a 15 dias da primeira aplicação para observação da ocorrência do fenômeno *booster*. Foram incluídos 695 sujeitos. A prevalência estimada da infecção foi de 45,8% (CI 95% = 42,1% - 49,5%) considerando a primeira testagem. Houve variação de 23,3% a 70,3% nos diferentes assentamentos participantes. A prevalência aumentou significativamente com a idade. Não houve diferença entre os sexos e nenhum outro fator associado ao risco de infecção foi identificado. O fenômeno *booster* na intradermorreação para detecção de infecção por *P. brasiliensis* foi pela primeira vez estudado e a taxa estimada foi de 8,4% (CI 95% = 5,4% - 12,3%). Este valor corresponde ao percentual de resultados falso-negativos de um único teste intradérmico. Os resultados revelam a importância da infecção paracoccidióidica em alguns assentamentos rurais do Estado, evidenciando a exposição precoce das crianças ao fungo na região estudada, e, ajudam a compor o panorama da infecção na América Latina e Brasil. Para que os inquéritos epidemiológicos possam ser comparáveis e reflitam com mais exatidão a realidade da infecção paracoccidióidica nas áreas endêmicas é necessário que o antígeno utilizado seja padronizado para este fim.

Palavras-chave: gp-43, infecção paracoccidióidica, teste intradérmicos, efeito *booster*

ABSTRACT

Studies about the epidemiology of paracoccidioidomycosis are based on surveys achieved with intradermal tests and the paracoccidioidin is the antigen used in most cases. However, cross-reactions with other fungal infections have been reported. The glycoprotein of 43 - kDa (gp43) has been used in intradermal tests. It is the most antigenic component of *Paracoccidioides brasiliensis* and it provides greater specificity for this fungus. The prevalence of the paracoccidioidic infection in different areas of Latin America and Brazil is not fully known. Mato Grosso do Sul (MS), a state with an agricultural economic base, has the highest relative frequency of deaths from paracoccidioidomycosis, but the prevalence of paracoccidioidic infection never has been studied. The objectives of this study were to estimate the prevalence of paracoccidioidic infection in rural settlements of the municipality of Jaraguari (MS) and to assess the risk factors associated with infection, as well as identify and estimate the occurrence rate of the *booster* phenomenon in intradermal test with gp43. A cross sectional study was conducted in eight rural settlements in the municipality of Jaraguari (MS). Of the 4555 settlers, a sample of 721 was selected for convenience. The study subjects underwent an interview with demographics and lifestyle. A skin test was administered with intradermal application of 0.1 mL of gp43 (60 µg/mL) in the left forearm. The reading of the results was performed after 48 hours of application, and the test was considered positive if the measure of the maximum diameter of induration was greater than or equal to 5mm. Individuals who tested negative, were retested with gp43 between 10 and 15 days after the first test for observation of the occurrence of the *booster* phenomenon. The study included 695 subjects. The estimated prevalence of infection was 45.8% (95% CI = 42.1% - 49.5%) considering the first test and increased significantly with age. The prevalence ranged from 23.3% to 70.3% in the different settlements. There was no difference between the sexes and no other factor associated with risk of infection was identified. It was the first study that the *booster* phenomenon in intradermal test for infection by *P. brasiliensis* was performed and the estimated rate was 8.4% (95% CI = 5.4% - 12.3%). This would correspond to the percentage of false-negative results of a single intradermal test. The results reveal the importance of paracoccidioidic infection in some rural settlements in the state. It showed children's early exposure to the fungus in the study area, and describes a panorama of infection in Latin America and Brazil. For epidemiological surveys to be comparable and reflect more accurately the reality of *Paracoccidioides* infection in endemic areas, it is necessary for the antigen used to be standardized for this purpose.

Keywords: gp-43, paracoccidioidic infection, intradermal test, booster effect

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Inquéritos epidemiológicos realizados em diferentes regiões da América Latina por meio de testes intradérmicos de 1990 a 2012.....	27
Tabela 2 – Prevalência da infecção paracoccidióidica em diferentes assentamentos rurais de Jaraguari/MS – 2010	48
Tabela 3 – Número e porcentagem de moradores de assentamentos rurais segundo as variáveis de estudo e a intradermorreação a gp43 (infecção pelo <i>P. brasiliensis</i>), Jaraguari/MS – 2010 (n=695)	49
Tabela 4 – Análise multivariada da prevalência de infecção pelo <i>P. brasiliensis</i> de moradores de assentamentos rurais segundo as variáveis de estudo, Jaraguari/MS – 2010 (n=695).....	50
Tabela 5 – Indivíduos negativos retestados com gp43 de acordo com sexo e idade e presença/ausência do fenômeno <i>booster</i> , Jaraguari/MS – 2010 (n=275).....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PCM	Paracoccidiodomicose
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
Th1	Linfócito T <i>helper</i> tipo 1
Mb	Megabase
gp	Glicoproteína
H	Hidrogênio
Al	Alumínio metálico
pH	Potencial hidrogeniônico
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
IL	Interceulina
IFN- γ	Interferon gama
Th2	Linfócito T <i>helper</i> tipo 2
TGF- β	Fator de transformação de crescimento
MHC	Molécula de histocompatibilidade
RHT	Reação de hipersensibilidade do tipo tardia
IgG	Imunoglobulina G
IgE	Imunoglobulina E
ELISA	Ensaio de imunoadsorção enzimática
VHS	Velocidade de hemossedimentação
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
TC	Teste cutâneo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Agente etiológico	17
2.2 Imunopatolgenia	20
2.3 Epidemiologia	24
2.3.1 Da doença	24
2.3.2 Da infecção	25
2.4 Formas clínicas	27
2.5 Diagnóstico imunológico e tratamento	29
2.5.1 Diagnóstico da paracoccidiodomicose	29
2.5.1.1 Tratamento da paracoccidiodomicose	31
2.5.2 Diagnóstico da infecção paracoccidióidica	32
2.5.2.1 Glicoproteína 43 (gp43)	35
2.5.2.2 Efeito <i>booster</i>	36
2.5.2.3 Tratamento da infecção paracoccidióidica	38
3 OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo geral	40
3.2 Objetivo específico	40
4 MATERIAL E MÉTODO	41
4.1 Tipo de pesquisa	41
4.2 Local da pesquisa	41
4.3 Sujeitos da pesquisa	42
4.4 Procedimentos	43
4.4.1 Preparo do antígeno gp43 para teste cutâneo	43
4.4.2 Teste cutâneo com gp43	43
4.4.3 Teste cutâneo com candidina	45
4.5 Diagnóstico e acompanhamento	45
4.6 Análise estatística	46

4.7 Comitê de Ética	47
5 RESULTADOS	48
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
APÊNDICES	89
ANEXO	93

1 INTRODUÇÃO

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença que tem como agente etiológico o fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. A micose sistêmica resultante da infecção por este fungo é amplamente distribuída com áreas de alta e baixa endemicidade por toda América Latina (RESTREPO; McEWEN; CASTAÑEDA, 2001).

A PCM representa um grave problema de Saúde Pública pelo seu potencial incapacitante e mortes prematuras (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; SILVA et al., 2008), principalmente para segmentos sociais específicos, como trabalhadores rurais. Tal população é considerada vulnerável porque geralmente não dispõem de acesso fácil aos serviços de saúde o que resulta em um diagnóstico tardio (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; ALMEIDA SOARES et al.; 2008).

Os indivíduos acometidos pela PCM normalmente estão na fase mais produtiva da vida, ou seja, em torno dos 30 aos 50 anos de idade e 90% dos pacientes são do sexo masculino, o que gera um alto impacto econômico e social. O alcoolismo e o tabagismo normalmente estão associados à doença (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; LINDENBERG et al., 2008). Apesar das elevadas taxas de mortalidade e das sequelas da doença, a PCM faz parte das doenças consideradas negligenciadas para América Latina e Países Caribenhos. Dessa forma, o impacto sobre a saúde pública ainda não foi quantificado devido a falta de dados disponíveis (HOTEZ et al., 2008). Cerca de 100 anos após a descoberta da doença, ainda há necessidade da implantação de um programa efetivo e permanente para a prevenção e diagnóstico, para a disponibilização de agentes antifúngicos e assistência aos pacientes com complicações e sequelas (MARTINEZ, 2010).

Estima-se que nas regiões endêmicas, onde vivem aproximadamente 90 milhões de pessoas, cerca de 10 milhões estão infectadas pelo fungo (RESTREPO; McEWEN; CASTAÑEDA, 2001), das quais 2% irão desenvolver a doença (RESTREPO; TOBÓN, 2005).

O Brasil é o país com o maior número de casos da doença (RESTREPO 1985; RESTREPO, 1994; MENDES; SHIKANAI-YASUDA, 2003), sendo que nas regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste ocorrem a maioria dos casos (FORNAJEIRO et al., 2005). Coutinho et al. (2002) observaram uma taxa de mortalidade por PCM no

Brasil de 1,45/milhão de habitantes no período de 1980 ao ano de 1995. Neste mesmo período a PCM ocupava o oitavo lugar em casos de morte dentre as doenças crônicas, infecções recorrentes e parasitárias. Prado et al. (2009) observaram que a PCM era a principal causa de morte dentre as micoses sistêmicas no período de 1996-2006 sendo São Paulo e Paraná os estados com maiores taxas de mortalidade.

Considerando a frequência absoluta de mortes por PCM de acordo com as regiões geográficas brasileiras entre 1980 e 1995, o Centro-Oeste comporta 10% dos casos de morte, ocupando o terceiro lugar. Por outro lado, a maior frequência relativa de mortes por milhão de habitantes é no Mato Grosso do Sul sendo 4,39/milhão de habitantes (COUTINHO et al., 2002). Na capital do estado todo mês são diagnosticados pelo menos 2 casos novos da doença (PANIAGO et al., 2003), sendo que a cidade apresenta cerca de 787 mil habitantes (IBGE, 2011).

A PCM não faz parte da lista de doenças de notificação compulsória no Brasil, fato este que torna imprecisos os dados de prevalência e incidência da doença no país. Entretanto, em áreas classificadas como de alta endemicidade a incidência anual da micose é estimada em aproximadamente 3 casos para cem mil habitantes (LONDERO; RAMOS, 1990; MARTINEZ, 2010).

A prevalência da infecção paracoccidióidica varia conforme a região, e a quantidade de indivíduos infectados tende a aumentar devido a expansão das fronteiras agrícolas (WANKE; LONDERO, 1994). Na região Sul e Sudeste do Brasil foi observado uma prevalência de 43% e 49,5% respectivamente (FORNAJEIRO et al., 2005; SILVA-VERGARA, 1997). Na região Nordeste a prevalência observada foi 32,1% (DIÓGENES et al., 1990).

Na região Centro-Oeste, em Mato Grosso, Kalmar et al. (2004) avaliaram a infecção em crianças e observaram uma prevalência de 4% quando utilizado o antígeno gp43 e de 17% com a paracoccidioidina. Em estudo realizado entre indígenas, escolares e granjeiros em Mato Grosso do Sul a prevalência da infecção paracoccidióidica observada foi de 37,5% (AGUIAR, 2000).

A infecção paracoccidióidica pode ser adquirida por meio da inalação de propágulos fúngicos produzidos pelas formas filamentosas, as quais uma vez instaladas nos pulmões adquirem a forma de leveduras. O processo infeccioso induz a formação de lesão primária do tipo granulomatosa nos pulmões e podem disseminar para outros órgãos do corpo (ALMEIDA; LOPES, 2001). Apesar da

prevalência da infecção paracoccidióidica ser alta em algumas regiões do País, a incidência de casos clínicos, relativamente baixa, sugere que o fungo tenha baixa patogenicidade (SANTOS et al., 2003), contudo, alguns hábitos podem influenciar na aquisição da infecção e no desenvolvimento da doença.

Indivíduos que manejam o solo, como agricultores, estão mais sujeitos a adquirir a infecção pelo *P. brasiliensis* (BLOTTA et al., 1999). Em relação ao adoecimento, o tabagismo, alcoolismo e a desnutrição são fatores considerados importantes (BLOTTA et al., 1999; PANIAGO et al., 2003; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

Conhecer os reservatórios naturais do fungo contribui para mapear áreas endêmicas e para entender melhor seus recursos eco-epidemiológicos (RICHINI-PEREIRA et al., 2009). Evidências sugerem que o *P. brasiliensis* vive sob condições adequadas de clima, umidade e temperatura como um fungo saprofítico no solo. Contudo, quando o seu hábitat é invadido, humanos e outras espécies de mamíferos podem adquirir a infecção paracoccidióidica (BRUMMER; CASTANHEDA; RESTREPO, 1993).

O estudo da infecção paracoccidióidica no estado do Mato Grosso do Sul é de extrema importância, não só pelo fato de ser um estado com economia baseada em atividades agropecuárias no qual se destaca a existência de inúmeros assentamentos rurais, mas também por ser o estado com maior taxa de mortalidade por PCM (COUTINHO et al., 2002) e no qual não existe trabalhos publicados a respeito de tal infecção.

Além disso, a prevalência da infecção no estado e nas diferentes regiões do país e da América Latina pode ser subestimada e mostra a importância de se estabelecer a testagem intradérmica em dois tempos para a detecção de indivíduos falso-negativos. A realização do segundo teste cutâneo reforçaria o estímulo imunológico proveniente do primeiro teste e conseqüentemente poderia determinar um resultado verdadeiramente positivo (LIFSON et al., 1997). O aumento na induração do segundo teste em relação ao primeiro e na ausência de nova infecção é denominado fenômeno *booster* (THOMPSON et al., 1979; MENZIES et al., 1999). A detecção deste fenômeno é bem descrita na infecção tuberculosa (CDC, 1995).

Negligenciar a PCM, uma doença de tal magnitude, faz com que muitas pessoas adoçam, sejam diagnosticadas tardiamente e acabem desenvolvendo sequelas que irão prejudicar tanto suas atividades profissionais quanto seu convívio

social. Por estes motivos, a finalidade deste trabalho é estimar a prevalência da infecção paracoccidióidica em assentamentos rurais do município de Jaraguari (Mato Grosso do Sul) e avaliar os fatores de riscos associados à infecção, bem como identificar a ocorrência e estimar a taxa de fenômeno *booster* na detecção da infecção através de testes intradérmicos com a gp43.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Agente etiológico

O agente da PCM é o *Paracoccidioides brasiliensis*, fungo filogeneticamente classificado como pertencente ao Filo Ascomycota, Subfilo Pezizomycotina, Classe Eurotiomycetes, Ordem Onygenales e Família Onygenaceae (BAGAGLI et al., 2006). Possui um genoma de 26-35 megabases (Mb) distribuído em quatro ou cinco cromossomos (FEITOSA et al., 2003). Análises genéticas de vários isolados do fungo, revelaram variabilidade genética e cepas correlacionadas com a geografia (CALCAGNO et al., 1998; NIÑO-VEGA et al., 2000) ou virulência (MOLINARI-MADLUM et al., 1999; CARVALHO et al., 2005).

De acordo com análise filogenética de 65 isolados, foi proposto três espécies filogeneticamente distintas do *P. brasiliensis*: S1, formado por 38 isolados da Argentina, Brasil, Peru e Venezuela além de um isolado de pinguins da Antártica; PS2, com 6 isolados, cinco de origem Brasileira e um Venezuelano; e PS3 constituído por 21 isolados Colombianos (MAMUTE et al., 2006). Estudos mais recentes indicaram um grupo geneticamente distinto nomeado Pb01-like (TEIXEIRA et al., 2009), embora sejam considerados espécies filogeneticamente diferente, todos são capazes de induzir doença em humanos e animais (BATISTA et al., 2010).

É um fungo assexuado e termo-dimórfico que em seu habitat natural apresenta-se na forma de micélios, mas que ao penetrar no corpo de um hospedeiro susceptível se diferencia em leveduras em decorrência da alteração da temperatura (SAN BLAS; SAN BLAS, 1993).

Nos tecidos e secreções infectados as leveduras são esféricas, ovais ou elípticas com parede celular espessa e refringente, e o diâmetro variando de 5 a 30µm. Podem apresentar brotamentos únicos ou múltiplos de tamanhos variados que são blastoconídios dispostos ao redor da célula mãe, formando a característica “roda de leme” (MENDES; SHIKANAI-YASUDA, 2003; MARTINEZ, 2005).

O citoplasma contém vacúolos, retículo endoplasmático e ribossomos, porém lisossomos e complexo de Golgi não foram encontrados. Numerosas mitocôndrias são observadas nas células jovens e a quantidade de vacúolos aumenta com a

idade. A parede celular apresenta duas camadas. A camada externa é formada por α -1-3 glucana na fase leveduriforme e por β -1-3- glucana na fase micelial. A camada interna é composta de quitina e justaposta a membrana citoplasmática (ALMEIDA; JACKS; SCULLY, 2003).

A patogenicidade e a invasividade do *P. brasiliensis* parece estar associada a α -1-3 glucana e proteases como a gp43 (MENDES-GIANNINI; MORAES; RICCI, 1990). A quitina e a glucana da parede não são antigênicas, contudo a gp43, uma glicoproteína de 43-kDa encontrada na parede do fungo e secretada extracelularmente é o principal antígeno conhecido (PUCCIA et al., 1986).

Até recentemente o único hospedeiro considerado susceptível ao fungo era o homem, entretanto alguns animais já foram encontrados infectados pelo *P. brasiliensis*, principalmente o tatu (NAIFF et al., 1986; BAGAGLI et al., 1998; SILVA-VERGARA et al., 2000; SIMÕES; MARQUES; BAGAGLI, 2004). Apesar de não ser regularmente isolado de outros animais, há evidências de infecções em animais domésticos como cães (RICCI et al., 2004; SILVEIRA et al., 2006; FONTANA et al., 2010; CANTEROS et al., 2010), galinhas (OLIVEIRA et al., 2011), gado leiteiro (SILVEIRA et al., 2008), cavalos (CORTE et al., 2009) e silvestres como pinguins (GARCIA et al., 1993) e macacos (CORTE et al., 2007) por meio de reações intradérmicas ou de sorologia. Ricci et al. (2004) observaram e confirmaram com exames histopatológicos, imunohistoquímicos e de biologia molecular o primeiro caso de paracoccidiodomicose em cão.

Trejo-Chávez et al. (2011) observaram achados clínicos, microscópicos e ultraestruturais sugestivos de PCM em uma preguiça que morreu durante a quarentena no México após a sua importação da Guiana Francesa. Esse foi o primeiro caso da doença relatado nesses animais.

Apesar destas observações, o tatu do gênero *Dasypus*, apresenta uma importância fundamental na eco-epidemiologia do *P. brasiliensis*. A capacidade de escavar o solo a grandes profundidades, hábitos alimentares de destruição de colônias de formigas e coleta de folhas, provavelmente expõe estes animais com maior facilidade ao provável habitat do fungo (NEVES et al., 2006). Além disso, os tatus apresentam uma temperatura corpórea baixa, entre 32,7 a 35,3°C (BOILY, 2002) e um sistema imunológico fraco (ULRICH et al., 1976) que somado a exposição ao solo favorece a constante infecção pelo fungo (BAGAGLI et al., 2008).

O estudo da sequência do gene da glicoproteína 43 (gp43) demonstrou que múltiplas infecções podem ocorrer no mesmo animal (SANO et al., 1998a; SANO et al., 1998b), assim como o homem que pode estar infectado, simultaneamente, por diferentes cepas do fungo (BATISTA et al., 2010). A infecção natural dos tatus ocorrendo numa frequência elevada pode ser utilizada para mapear áreas de risco para a infecção paracoccidióidica (BAGAGLI et al., 2008). Estudo realizado com cepas de *P. brasiliensis* isoladas de tatus e de humanos mostrou similaridade entre os isolados, indicando que os humanos adquirem infecção paracoccidióidica pelo contato com o ambiente dos tatus (SANO et al., 1998b). Além dos tatus, os cães, devido aos altos índices de infecção e constatação de desenvolvimento da micose, também apresentam papel importante na eco-epidemiologia do fungo, podendo ser utilizados como marcadores epidemiológicos para auxiliar na busca do habitat do fungo (NEVES et al., 2006).

Conhecer os reservatórios naturais do fungo pode contribuir para mapear áreas endêmicas e para entender melhor seus recursos eco-epidemiológicos (RICHINI-PEREIRA et al., 2009). Algumas evidências sugerem que o *P. brasiliensis* vive sob condições adequadas de clima, umidade e temperatura como um fungo saprofítico no solo. Contudo, quando o seu hábitat é invadido, humanos e outras espécies de mamíferos adquirem a infecção através da inalação dos seus propágulos (BRUMMER; CASTANHEDA; RESTREPO, 1993). Silva-Vergara (1997) além de detectar infecção natural pelo *P. brasiliensis* em pulmão de tatu, também isolou o fungo em cultivo de café em Minas Gerais.

Os indivíduos que manejam o solo, como por exemplo, agricultores, jardineiros entre outros, estão mais sujeitos a infecção pelo *P. brasiliensis* (BLOTTA et al., 1999). No entanto, esse fungo não tem sido isolado do solo com frequência, e mesmo os experimentos que isolaram o *P. brasiliensis* do solo geralmente não podem ser repetidos com material proveniente do mesmo local (SIMÕES; MARQUES; BAGAGLI, 2004). Por outro lado, o uso de pesticidas inibem o desenvolvimento do *P. brasiliensis* sugerindo que estes produtos podem interferir no isolamento do fungo do solo, uma vez que são rotineiramente usados em plantações de diferentes culturas (ONO et al., 2002).

Terçarioli et al. (2007) observaram que o *P. brasiliensis* cresce tanto em solo argiloso quanto arenoso, desde que tenha umidade em excesso, confirmando que a umidade é fator ecológico fundamental para o desenvolvimento do fungo. Por outro

lado, os mesmos autores relataram que solos com elevada concentração de alumínio trocável (H + Al) inibe ou limita o crescimento do fungo.

Conti Díaz (2007) sugere que o fungo ocorre na natureza em ambientes com água fresca, como rios ou córregos alinhados por mata ciliar nativa, protegidos por animais aquáticos como anfíbios, moluscos, peixes e artrópodes. Outros, sugerem que o *P. brasiliensis* viva transitoriamente e por um período variável no solo (FRANCO et al., 2000). As variações regionais, como condições climáticas, tipo do solo, pH, temperatura e índices pluviométricos podem resultar num isolado fúngico com imunogenicidade distinta de uma região para outra, como observado por Batista Junior et al. (2010). Entretanto, para Bagagli et al. (2008), mais importante do que descobrir o local preciso onde o fungo vive seria determinar o seu nicho ecológico dentro do seu hábitat.

Todavia, em todas as casuísticas foi observado que os pacientes acometidos pela PCM tiveram contato com o solo durante as duas primeiras décadas da vida, momento em que, na maior parte dos casos, ocorreu a infecção. Coutinho et al. (2002), observaram que 55,83% dos paciente com PCM eram agricultores, seguido de 19,28% de trabalhadores de construções. A taxa de infecção varia de 6,0% a 60,6% entre a população rural e urbana de áreas endêmicas e não endêmicas (MENDES; SHINAKAI-YASUDA, 2003). Entretanto, quando as manifestações se iniciam o paciente já se encontra a partir da terceira década da vida e normalmente quando procuram a assistência médica não se encontram no mesmo local endêmico onde houve a contaminação (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

2.2 Imunopatogenia

Inquéritos epidemiológicos realizados com paracoccidioidina estimam que 50% da população residente em áreas endêmicas tenham sido expostos ao *P. brasiliensis* (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006), das quais 2% irão desenvolver a doença (RESTREPO; TOBÓN, 2005).

Mecanismos da resposta imunológica inata podem destruir fungos parasitas ou limitar uma infecção até que a resposta específica seja desenvolvida. Algumas moléculas como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 12 (IL-12) e

interferon gama (IFN- γ) podem ampliar a resposta inata, contudo a IL-4 e a IL-10 podem suprimir este tipo de resposta. A ativação da resposta imune específica é um passo fundamental no controle de uma infecção em um organismo hospedeiro (HUFFNAGLE; DEEPE JR, 2003).

O controle da infecção pelo *P. brasiliensis* depende de uma eficiente resposta imunológica específica do tipo celular (SINGER-VERMES et al., 1993). Os linfócitos T CD4⁺ humanos apresentam dicotomia quanto à produção de citocinas. Assim, as citocinas produzidas por linfócitos T CD4⁺ do tipo Th1 secretam IFN- γ , IL-2, IL-3, IL-12, TNF- α , e enquanto que linfócitos T CD4⁺ do tipo Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e fator de transformação de crescimento beta (TGF- β). As citocinas produzidas pelas células Th2 oferecem proteção contra infecções por helmintos, enquanto que as células Th1 são essenciais para a proteção contra microrganismos intracelulares (INFANTE-DUARTE; KAMRADT, 1999).

Segundo Chiarella et al. (2007), tanto linfócitos T CD4⁺ quanto CD8⁺ são protetores contra PCM pulmonar, contudo a subpopulação CD8⁺ apresenta um papel fundamental. A contribuição de cada subpopulação na resposta imunológica depende do perfil genético do hospedeiro, de um equilíbrio entre CD4⁺/CD8⁺, regulação da secreção de citocinas Th1 e Th2 e correlação da resistência do hospedeiro à infecção pelo *P. brasiliensis*. Além disso, não foi observada associação entre a gravidade da infecção em camundongos susceptíveis e a sua regulação pelas células CD4⁺, por outro lado, a relativa proteção dos animais susceptíveis parece ser mediada pelas células CD8⁺.

A propriedade de selecionar a ativação da população Th1 ou Th2 para cada processo infeccioso parece ser fundamental para o desenvolvimento de uma resposta imunológica protetora e isto é regulado por mecanismos bastante complexos. A manipulação do fenótipo Th pela alteração na concentração de IFN- γ , IL-2 ou IL-4 no momento da infecção tem demonstrado a função primordial dessas citocinas na modulação do fenótipo CD4⁺, conseqüentemente, na cura da doença (DIPIRO, 1997). Assim como observado por McLeod et al. (1995) para outras doenças infecciosas, vários mecanismos regulam a susceptibilidade ou resistência. A dose do antígeno, as células apresentadoras de antígenos, e fatores estimuladores do meio ambiente são alguns destes mecanismos que influenciam na determinação da resposta imune preferencialmente ativada (KUCHROO et al., 1995).

A atuação de cada uma destas citocinas resulta em diferentes espectros de ativação ou desativação celular. Foi demonstrado que IFN- γ é um potente ativador celular, com função primordial na resistência do hospedeiro contra vários patógenos (DENIS et al., 1991), mas é antagonizado por citocinas do tipo Th2, como a IL-10, que atua como um potente inibidor da atividade celular inflamatória. Estas citocinas não somente inibem a produção de óxido nítrico como inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, TNF- α), o *burst* respiratório e a expressão de receptores para IL-1 e para moléculas de histocompatibilidade (MHC) de classe II (WALLIS; AMIR-TAHMASSEB; ELLNER, 1990; OGAWA et al., 1991), além de recrutarem monócitos do sangue periférico para o sítio da lesão, neste caso, os pulmões (ORME et al., 1993).

Em estudo com camundongos realizado por Cano et al. (1998) foi observado que independente do *background* genético dos animais, o IFN- γ exerce função protetora contra a infecção pulmonar pelo *P. brasiliensis*, sendo considerado o maior mediador de resistência ao fungo. Por outro lado, o alto nível de IFN- γ pulmonar parece conferir uma proteção no controle do crescimento do fungo, mas que a presença concomitante de alto nível de citocinas do perfil Th2 parece ser suficiente para modular negativamente a ativação dos macrófagos e das respostas de hipersensibilidade do tipo tardia (RHT), resultando na disseminação do fungo para sítios extrapulmonares.

Corroborando com estes achados, Calich e Kashino (1998) e Almeida e Lopes (2001), observaram elevada produção de IFN- γ e IL-2 em camundongos resistentes ao *P. brasiliensis*, em contraste com os animais susceptíveis que secretam baixa quantidade destas citocinas, mas que secretam IL-10 e IL-4 ativamente. Concluindo com isso que a resistência a PCM é associada com uma precoce ativação dos mecanismos imunológicos com perfil Th1, enquanto que a susceptibilidade destes animais é associada à produção precoce de mediadores inibitórios que regulam negativamente a produção de IFN- γ e suprime o desenvolvimento da resposta imune celular. A IL-10 é capaz de reduzir a atividade fagocítica e fungicida dos macrófagos em indivíduos saudáveis contra o *P. brasiliensis* (SOARES et al., 2002), sendo assim, a IL-10 pode ser considerada como a principal citocina negativa em pacientes com PCM, bloqueando a expressão da imunidade mediada pelo IFN- γ e IL-12 (BENARD, 2008).

Quando o fungo penetra no organismo humano, geralmente encontra uma resposta imunológica capaz de impedir o desenvolvimento da doença. Tal resposta

resulta somente na infecção paracoccidióidica, sem manifestações clínicas, a qual pode ser espontaneamente resolvida, progredir para doença, ou permanecer latente dependendo da imunidade do indivíduo infectado (RIVITTI; AOKI, 1999).

Indivíduos com infecção paracoccidióidica, sem sinais ou sintomas da doença apresentam elevado nível de proliferação linfocitária quando estimulados por antígenos do fungo, mas baixo nível de IL-4, IL-5 e IL-10. Dessa forma, a infecção, é caracterizada pela presença de resposta celular Th1, enquanto a manifestação da forma clínica aguda da doença é caracterizada pela resposta Th2, com elevados níveis de IL-4 e IL-10, anticorpos específicos da classe IgG4 e IgE e eosinofilia. Pacientes com a forma crônica apresentam um modelo de resposta intermediária entre Th1 e Th2 (OLIVEIRA et al., 2002; BENARD, 2008) .

Além da resposta imune celular, os humanos, assim como outros animais, apresentam uma resposta imunológica humoral específica que vem sendo estudada em diversos modelos experimentais. Singer-Vermes et al. (1993) observaram que independente da rota de inoculação do *P. brasiliensis*, camundongos susceptíveis produzem precocemente uma maior quantidade de anticorpos específicos, quando comparados com linhagens de camundongos resistentes.

De acordo com estes resultados considera-se que a titulação elevada de anticorpos está associada a um prognóstico ruim, como observado por Miura et al. (2001) e por Ramos et al. (2005) em experimentos com camundongos susceptíveis, os quais apresentaram aumento na produção de anticorpos anti-gp43. Corroborando com estes achados, Tatibana et al. (2007) encontraram níveis elevados de anticorpos anti-gp43 nos camundongos suscetíveis pós infecção.

Sadahiro et al. (2007) observaram em pacientes curados uma reestruturação da resposta imune e uma produção elevada de IFN- γ e TNF- α após a estimulação com a proteína gp43. Os autores sugeriram que em alguns casos a imunossupressão é transitória e a reatividade imunológica à gp43 é recuperada após o tratamento assim como observado por Benard et al. (1996).

O conhecimento sobre os mecanismos imunológicos relacionados a patogenicidade da PCM e da proteção à infecção fúngica é ainda fragmentado. Contudo, os estudos sobre as citocinas têm dado novos *insights* na relação parasito-hospedeiro e abre novas perspectivas para o delineamento de medidas profiláticas e estratégias terapêuticas.

2.3 Epidemiologia

2.3.1 Da doença

A PCM é uma micose sistêmica que foi descrita por Adolfo Lutz em 1908, autóctone da América Latina (WANKE; AIDÊ, 2009), em regiões situadas aproximadamente entre 20° ao Norte e 35° ao Sul do Equador, estendendo-se do México à Argentina. A distribuição da doença não é uniforme, sendo a maioria dos casos clínicos relatados no Brasil, Colômbia e Venezuela (MARTINEZ, 2005). A PCM também tem sido reportada em áreas não endêmicas como na Espanha (BUITRAGO et al., 2011), Alemanha (HORRÉ et al., 2002) e Áustria (MAYR et al., 2004), contudo em todos os casos observados, os pacientes estiveram anteriormente em Países da América do Sul.

Os dados sobre a incidência da PCM são imprecisos no Brasil, uma vez que não é uma doença de notificação compulsória. Acredita-se que a incidência anual em zonas rurais endêmicas pode variar de 3-4 casos novos/milhão de habitantes até 1-3 casos novos/100 mil habitantes (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). Estima-se em 3.360 o número anual de casos novos da micose no Brasil, considerando para tal o número médio anual de mortes e a taxa de mortalidade de 5% (MARTINEZ, 2010).

A PCM é considerada a oitava causa de morte por doença infecciosa crônica no Brasil, resultando numa taxa de mortalidade de 1,45 casos/milhão de habitantes (COUTINHO et al., 2002). Os índices mais elevados de mortalidade foram encontrados nos estados da região Sudeste, Sul e Centro Oeste do Brasil (FORNAJEIRO et al., 2005).

A razão de acometimento da PCM entre adultos é de 10 a 15 homens para cada mulher (MENDES; SHINAKAI-YASUDA, 2003; PANIAGO et al., 2003; RESTREPO et al., 2008). Contudo em estudo realizado por Bicalho et al. (2001) em Minas Gerais a razão de acometimento da doença foi de 30 homens para cada mulher, o que contrasta com a infecção entre crianças onde não se observa essa relação. A razão masculino:feminino entre crianças com PCM menores de 15 anos de idade admitidas em hospital em Campinas foi de 1,3:1, quando se considerou as crianças na faixa etária de 12 a 15 anos a razão aumentou para 5,5:1 (PEREIRA et

al., 2004). Este fato pode ser explicado pela capacidade do estrógeno, em mulheres adultas, inibir a transformação do fungo da forma micelial para leveduriforme (RESTREPO et al., 1984).

Essa relação também é observada nas taxas de mortalidade como apresentado por Coutinho et al. (2002), sendo para os indivíduos adultos do sexo masculino de 2,42/milhão de habitantes e de 0,43/milhão de habitantes para as mulheres. Na forma juvenil da doença também não foi observado diferença entre as taxas de mortalidade dependente do sexo. Contudo, de acordo com Prado et al. (2009) essa diferença vem diminuindo. O grupo relata que mortes por PCM entre os homens decaiu de 75,3 para 70,5%, por outro lado se observa o oposto em relação às mulheres, houve um incremento na mortalidade de 24,6 para 29,5%.

A faixa etária mais acometida pela micose é de 30 a 50 anos de idade. A doença é infrequente abaixo dos 14 anos de idade (BICALHO et al., 2001; PANIAGO et al., 2003; CERMEÑO et al., 2009). Dados similares são observados em relação às mortes, ocorrendo principalmente na faixa etária dos 30 aos 59 anos (PRADO et al., 2009).

2.3.2 Da infecção

A prevalência da infecção paracoccidióidica é baseada em inquéritos epidemiológicos realizados com testes cutâneos intradérmicos (FAVA NETTO; GUERRA; COSTA, 1976) em diferentes regiões da América Latina. Nos países onde a doença é endêmica os casos não são distribuídos homogeneamente mas tendem a se concentrar em regiões de florestas úmidas (BRUMMER; CASTAÑEDA; RESTREPO, 1993). Na Colômbia a infecção pelo *P. brasiliensis* pode alcançar 77% da população de determinadas comunidades rurais (CADAVID; RESTREPO, 1993) enquanto que no estado de Bolívar, Venezuela, a prevalência da infecção nos últimos anos variou de 10,2% (CERMEÑO et al., 2009) a 19,7% (CERMEÑO et al., 2005).

Na Argentina a PCM não é tão frequente quanto nos outros países da América Latina, sendo encontrada principalmente na região nordeste do país (MANGIATERRA et al., 1996). Van Gelderen de Komaid et al. (1999) estudaram a

infecção pelo *P. brasiliensis* em três comunidades na região nordeste do Tucumán na Argentina e encontraram prevalência variando de 4,41% a 10,2%. Estudos realizados na mesma província, Tucumán, mas em outras comunidades detectou variação da prevalência de 1,7 a 9,2% (van GELDEREN de KOMAID; DÚRAN, 1995). Por sua vez, Mangiaterra et al. (1996) encontraram prevalência da infecção paracoccidióidica de 1,6% na província de Chaco, também localizada na região nordeste do país.

O Brasil, país com maior número de casos de PCM, (RESTREPO, 1985; RESTREPO, 1994; MENDES; SHIKANAI-YASUDA, 2003) a prevalência da infecção varia conforme a região. No Paraná, onde a doença ocorre em praticamente todo o estado, Fornajero et al. (2005) observaram 43% de prevalência da infecção paracoccidióidica entre trabalhadores da indústria de álcool. Resultados semelhantes foram observados por Silva-Vergara (1997) em Minas Gerais, o qual encontrou 49,5% de indivíduos positivos, dos quais 61% informaram envolvimento com lavoura de café no passado e/ou na atualidade. Apesar da região Sudeste ser considerada endêmica para a micose, em trabalho realizado em fazendas experimentais de Botucatu, a taxa de prevalência observada foi de 13% (CARANDINA; MAGALDI, 1974).

No Estado do Mato Grosso, Kalmar et al. (2004) avaliaram a infecção em crianças e adolescentes de 7 a 18 anos de idade e observaram uma prevalência de 4% quando utilizado o antígeno gp43 e de 17% com a paracoccidioidina. Inquérito epidemiológico realizado na Serra do Pereiro no Ceará demonstrou uma variação nos resultados de acordo com o momento da leitura. Quando a leitura dos resultados foi feita com 24h da aplicação a prevalência foi de 32,1%, entretanto quando realizada com 48h o índice caiu para 25,9%. Os autores consideraram a prevalência da infecção paracoccidióidica na região sendo 32,1% (DIÓGENES et al., 1990).

Em Mato Grosso do Sul, Aguiar (2000), estudou a infecção paracoccidióidica em três grupos populacionais diferentes. Foi observado uma taxa de prevalência da infecção de 32,5% entre os escolares, 43,5% entre os granjeiros e 36,7% entre os indígenas no município de Sidrolândia.

Na tabela 1 pode-se observar a prevalência da infecção paracoccidióidica encontrada em inquéritos epidemiológicos realizados com testes intradérmicos em diferentes regiões geográficas nos últimos 20 anos.

Tabela 1 – Inquéritos epidemiológicos realizados em diferentes regiões da América Latina por meio de testes intradérmicos de 1990 a 2012.

Local	Antígeno	Prevalência	Autor
Venezuela	Paracoccidioidina	19,7%	Cermeño et al., 2005
Venezuela	Paracoccidioidina	10,2%	Cermeño et al., 2009
Argentina	Paracoccidioidina	1,7 - 9,2%	Van Gelderen de Komaid; Dúran, 1995
Argentina	Paracoccidioidina	4,41 - 10,2%	Van Gelderen de Komaid et al., 1999
Argentina	Paracoccidioidina	1,6%	Mangiaterra et al., 1996
Brasil – PR	Paracoccidioidina	51%	Rebelatto, 1996
Brasil - SP	Paracoccidioidina	68,7%	Fava, 1996 [*]
Brasil – MS	Paracoccidioidina	37,5%	Aguiar, 2000
Brasil – CE	Paracoccidioidina	32,1%	Diógenes et al., 1990
Brasil	Paracoccidioidina	31,8%	Freitas, 1992 [*]
Brasil - MT	Paracoccidioidina	17%	Kalmar et al., 2004
Brasil - MG	Paracoccidioidina	13,43%	Rodrigues; Rezende, 1996 [*]
Brasil - AL	Paracoccidioidina	11,2%	Santos; Pedrosa, 1990 [*]
Brasil – PR	gp 43	50%	Somensí et al., 1997
Brasil – PR	gp 43	43%	Fornajeiro et al., 2005
Brasil - MS	gp43	12,2%	Sarti et al., 2011 ^{**}
Brasil – MT	gp 43	4%	Kalmar et al., 2004

^{*} Extraído de Fava e Fava Netto, 1998.

^{**} População portadora do vírus HIV.

2.4 Formas clínicas

As formas clínicas das manifestações oriundas da infecção pelo *P. brasilienses* são classificadas correlacionando os achados clínicos à história natural da doença, uma adaptação da classificação apresentada no *International Colloquium on Paracoccidioidomycosis* realizado em fevereiro de 1986 na Colômbia (FRANCO, et al., 1987). Sendo assim, esta micose é classificada em infecção paracoccidióidica e paracoccidioidomicose (doença) – esta subclassificada em forma aguda/subaguda e crônica, e forma residual ou sequelar (MENDES, 2005; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

A infecção paracoccidióidica ocorre sem que haja danos aparentes ao hospedeiro, uma vez que seu sistema imunológico impede o crescimento do fungo. Em tal circunstância, o foco primário desaparece e o fungo, normalmente, é destruído, contudo ocorre a geração de células de memória (BRUMMER; CASTAÑEDA; RESTREPO, 1993).

Entretanto, a evolução da infecção para doença e suas diferentes formas clínicas depende de muitos fatores, tais como fatores ambientais, resposta imunológica do hospedeiro e a virulência do parasita (SADAHIRO et al., 2007).

Na paracoccidioidomicose, a forma aguda/subaguda, também conhecida como forma juvenil, é responsável por 3 a 5% dos casos da doença, com predominância entre crianças e adolescentes, eventualmente ocorrendo entre adultos até os 35 anos de idade. A distribuição desta forma da doença é semelhante para ambos os sexos e caracteriza-se por uma evolução clínica mais rápida, onde normalmente o paciente procura os serviços de saúde entre o primeiro e terceiro mês após a instalação da doença. Frequentemente podemos observar nos pacientes com esta forma de doença linfadenomegalia, manifestações digestivas, hepatoesplenomegalia, envolvimento ósteo-articular e lesões cutâneas (PANIAGO et al., 2003; MENDES; SHINAKAI-YASUDA, 2003; PEREIRA et al., 2004).

Mais de 90% dos casos de PCM apresentam-se na forma crônica ou forma do adulto, pois ocorre principalmente entre indivíduos de 35 e 60 anos de idade. Nesta forma da doença, a progressão é lenta e silenciosa, podendo levar anos até que seja diagnosticada e reflete a reativação das lesões fúngicas nos pulmões ou qualquer outro órgão e tecido (MENDES; SHINAKAI-YASUDA, 2003). Caracteriza-se por sintomas de fraqueza, emagrecimento, febre, tosse e dispneia (WANKE; AIDÊ, 2009). As manifestações pulmonares estão presentes em 90% dos pacientes e pode ser o único órgão afetado em 25% dos casos (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

Quando um único órgão é afetado a forma da doença é denominada unifocal. Quando a doença compromete sítios extrapulmonares, tais como a pele, a mucosa oral, mucosas da faringe e/ou laringe e o ápice dos dentes é denominada multifocal (SHIKANAI-YASUDA, 2005; WANKE; AIDÊ, 2009). As lesões orais estão presentes em mais de 50% dos casos e 30% dos pacientes apresentam múltiplas lesões (BICALHO et al.; 2001). Suprarrenais, sistema nervoso central, linfonodos cervicais e submandibulares, intestinos, sistema osteoarticular, epidídimo, baço e fígado são

outros locais que podem ser envolvidos na PCM (FRANCO et al., 1987; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; RAMOS; SARAIVA, 2008).

Pacientes imunossuprimidos, incluindo aqueles coinfectados pelo HIV, apresentam risco de desenvolver infecção disseminada severa envolvendo principalmente linfonodos, pulmão, pele e a mucosa oral (PANIAGO et al., 2005). Além disso, 54% dos pacientes HIV⁺ parecem desenvolver uma forma clínica mista da PCM (BENARD; DUARTE, 2000).

Na forma sequelar podem ocorrer recaídas, complicações e sequelas anatômicas e funcionais em pelo menos 20% dos pacientes, entre eles a fibrose pulmonar com subsequente insuficiência respiratória o que causa incapacitação para o trabalho (MARTINEZ, 2010).

A avaliação do sistema imunológico do paciente deve ser realizada em todas as formas clínicas da doença e poderá trazer informações relevantes acerca do prognóstico e da atividade da doença. Esses dados são essenciais para o acompanhamento clínico, controle e cura da PCM que pode ser realizado através de testes sorológicos e intradérmicos para acompanhamento da resposta imune humoral e celular respectivamente (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

2.5 Diagnóstico Imunológico e Tratamento

2.5.1 Diagnóstico da paracoccidiodomicose

Por ser uma micose sistêmica, qualquer órgão pode ser acometido, por isso é muito importante uma avaliação detalhada do estado geral do paciente e dos órgãos e sistemas que normalmente são mais comprometidos quando há suspeita da doença (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). O diagnóstico diferencial de PCM, dependendo da apresentação clínica, inclui leishmaniose mucocutânea, histoplasmose, tuberculose, actinomicose, linfoma e carcinoma de células escamosas, inflamações não infecciosas como sarcoidose e doenças autoimunes (BLOTTA et al., 1999; AMEEN; TALHARI; TALHARI, 2009).

A confirmação diagnóstica da PCM é normalmente realizada através da detecção microscópica das características de múltiplos brotos das células leveduriformes e/ou pelo isolamento do fungo em culturas de espécimes clínicas, histopatologia do tecido biopsiado e testes sorológicos, especialmente utilizando a gp43 (RICHINI-PEREIRA et al., 2009). Os exames sorológicos geralmente apresentam resultados mais rápidos do que a cultura e a histopatologia (BLOTTA et al., 1999) e além da importância diagnóstica permite avaliar a resposta imunológica do hospedeiro, o tratamento e as recaídas da doença.

Atualmente são disponíveis os métodos de imunodifusão dupla, contraimuno eletroforese, imunofluorescência indireta, ensaio imunoenzimático e imunoblot (MENDES-GIANNINI et al., 1989; VALLE; COSTA; MONTEIRO, 2001; MENDES; SHINAKAI-YASUDA, 2003; DEL NEGRO; GONÇALVES, 2005; CAMARGO, 2008). A imunodifusão dupla é utilizada com maior frequência, alcançando especificidade e sensibilidade acima dos 85% quando o antígeno utilizado é a gp43 (CAMARGO et al., 1988; BLOTTA et al., 1999; CAMARGO, 2008).

A titulação de anticorpos específicos ao *P. brasilienses* tem correlação com a gravidade da doença, sendo por isso mais elevada nos casos agudos/subagudos. Reações falso-negativas têm acontecido quando os pacientes apresentam intensa imunossupressão (BLOTTA et al., 1999; CAMARGO; FRANCO, 2000; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006) e as reações falso-positivas podem resultar de reações cruzadas com outras infecções micóticas (WANKE et al., 2005; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

Outros exames são realizados de acordo com a forma clínica apresentada pelo paciente. Na forma aguda da doença os exames normalmente sugeridos são raio X de tórax, ultrassonografia abdominal, hemograma completo, velocidade de hemossedimentação (VHS), provas bioquímicas hepáticas, eletroforese de proteínas e avaliação renal e metabólica (creatinina, sódio e potássio). Na forma crônica, os exames habitualmente solicitados são raio X de tórax, hemograma completo, VHS, provas bioquímicas e avaliação adrenal e metabólica. Tanto na forma aguda quanto na crônica, exames mais complexos, tais como exames de imagem e provas funcionais são indicados, principalmente quando há suspeita clínica ou alterações nos exames laboratoriais que indiquem acometimento gastrointestinal, formas abdominais, envolvimento do sistema nervoso central, disfunção adrenal,

insuficiência respiratória crônica ou lesões ósteo-articulares (WANKE et al., 2005; SHIKANAI-YASUDA, et al., 2006).

2.5.1.1 Tratamento da paracoccidioidomicose

Além da terapêutica antifúngica deve-se incluir medidas de suporte as complicações clínicas associadas aos diferentes órgãos acometidos pela PCM. O acompanhamento dos pacientes deve ser periódico até apresentarem os critérios de cura.

A gravidade da doença determina a seleção de drogas e a duração do tratamento (AMEEN; TALHARI; TALHARI, 2009). Vários fármacos podem ser utilizados no combate ao *P. brasiliensis*, tais como anfotericina B, sulfamídicos e azólicos. Entretanto o itraconazol é sugerido como melhor opção terapêutica, pois permite o controle das formas leves e moderadas da doença em menor período de tempo. Contudo, este medicamento não é disponível na rede pública na maioria dos estados brasileiros, por este motivo a alternativa mais comum é a combinação sulfametoxazol-trimetoprim. Nos casos graves onde há necessidade de internação hospitalar, é indicado a utilização da anfotericina B ou associação sulfametoxazol-trimetoprim por via intravenosa (DEL NEGRO; GONÇALVES, 2005).

A duração do tratamento depende da droga utilizada e da gravidade da doença, entretanto, normalmente é longo, cerca de dois anos, a fim de evitar as recaídas (MENDES; SHINAKAI-YASUDA, 2003; PEREIRA et al., 2004). Crianças que abandonaram o tratamento durante os seis primeiros meses apresentaram recaída da doença, sugerindo que outros casos ocorram em decorrência do período insuficiente de tratamento (PEREIRA et al., 2004). Estudos *in vitro* demonstraram a necessidade de novos medicamentos devido a resistência do *P. brasiliensis* a sulfonamida, azoles e anfotericina B (SHIKANAI-YASUDA, 2005).

Além do tratamento antifúngico específico, o paciente deverá receber assistência para as condições gerais como desnutrição, tratamento odontológico, doença de Addison e comorbidades – tuberculose, Aids, enteroparasitoses e infecções pulmonares bacterianas (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). O custo global do tratamento é alto devido a necessidade de vários médicos especialistas e outros

profissionais da área de saúde, além da hospitalização para terapêuticas complementares (MARTINEZ, 2010).

Um dos principais desafios da PCM é estabelecer quando a terapia antifúngica pode ser interrompida, pois não há consenso a respeito das opções de tratamento ou sobre quando o paciente está realmente curado (CAMARGO, 2008).

Os critérios de cura são clínicos, micológicos, radiológicos e imunológicos. Sendo estes:

- a. Clínico: desaparecimento de sinais e sintomas da doença. É comum a permanência de sintomas residuais decorrentes das sequelas, especialmente as respiratórias, linfático-abdominais, cutâneas, adrenais e neurológicas.
- b. Micológico: exame micológico negativo.
- c. Radiológico: estabilização do padrão das imagens cicatriciais radiológicas pulmonares em intervalos de 3 meses.
- d. Imunológicos: negatização dos títulos de imunodifusão dupla ou estabilização do título em valores baixos, menores ou iguais a 1:2. Esses resultados devem ser observadas em duas amostras de soro com intervalo de seis meses após o período do tratamento recomendado (MENDES; SHINAKAI-YASUDA, 2003).

Entretanto, a palavra cura talvez nunca possa ser aplicada aos portadores desta micose pela impossibilidade de erradicação do *P. brasiliensis* e devido ao risco potencial de uma reativação tardia. Por esses motivos se emprega o termo “cura aparente” ou “cura clínica”. Dessa forma, os pacientes devem ser acompanhados ambulatorialmente, uma vez ao ano com exame clínico e sorológico após o fim do tratamento (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

2.5.2 Diagnóstico da infecção paracoccidióidica

A hipersensibilidade do tipo tardia envolve interações entre células TCD4⁺ e antígenos que causam ativação, secreção de linfocinas e potencial formação de granulomas. Esse tipo de hipersensibilidade necessita de linfócitos sensibilizados que respondem 24 a 48 horas após a exposição ao antígeno solúvel (ACTOR, 2007).

O estudo da hipersensibilidade do tipo tardia, através do teste de reação intradérmica, em pacientes com paracoccidioidomicose iniciou-se com os trabalhos de Fonseca e Area Leão em 1927. Esse teste é a melhor arma, e muitas vezes a única disponível, para descobrir aqueles indivíduos que foram infectados pelo *P. brasiliensis*, mas não ficaram doentes (FAVA NETTO, 1976; FRANCO et al., 1989).

Os testes intradérmicos também são usados para determinar a imunidade na PCM, como auxílio para o prognóstico em casos de doença e como mecanismo para se determinar o *status* imunológico dos pacientes. Pois sabe-se que os pacientes gravemente enfermos reagem negativamente ao teste intradérmico mas que o resultado pode se tornar positivo quando esses pacientes melhoram seu estado geral após o tratamento. Seus resultados somados aos achados clínicos permitem o acompanhamento e prognóstico dos pacientes (FAVA NETTO, 1976; FAVA; FAVA NETTO, 1998).

Após, aproximadamente, 4 horas da aplicação do antígeno no teste intradérmico, os neutrófilos acumulam-se ao redor da vênulas pós-capilares no local da injeção. Esse infiltrado desaparece rapidamente e cerca de 12 horas depois, o local fica repleto de linfócitos T e monócitos (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 1994), bem como neutrófilos, eosinófilos e basófilos (PARSLOW et al., 2004). Os vasos sanguíneos locais dilatam aumentando a migração celular. O sistema de coagulação e das cininas também tornam-se ativados o que leva a formação e deposição de fibrina no local. Essa deposição e em menor grau, o acúmulo de linfócitos T e monócitos ao redor do local da injeção é importante para manter a reação inflamatória localizada a uma determinada área e também para conferir a induração que é característica dos tecidos que sofrem a RHT (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 1994; PARSLOW et al., 2004).

O teste cutâneo para detecção da infecção paracoccidióidica é realizado por meio da aplicação intradérmica de 0,1mL do antígeno, na face anterior do antebraço, utilizando uma seringa descartável de tuberculina. A leitura do resultado é feita por meio da mensuração do maior diâmetro de induração usando uma régua milimetrada. Os resultados são considerados positivos se o diâmetro da induração for ≥ 5 mm. Geralmente a leitura de testes de sensibilidade do tipo tardia é realizado após 48 horas da inoculação, embora hajam trabalhos que relatam a leitura dos resultados realizados com 24 horas (CARANDINA; MAGALDI, 1974; DIÓGENES et

al., 1990; MANGIATERRA et al., 1996; KALMAR et al., 2004; CERMEÑO et al., 2005; CERMEÑO et al., 2009).

A paracoccidioidina, antígeno mais utilizado nos testes intradérmicos, é de natureza polissacarídea, obtido a partir de uma mistura de várias cepas do *P. brasiliensis*, (FAVA NETTO; RAPHAEL, 1961; FAVA NETTO; GUERRA; COSTA, 1976) e é conhecida como antígeno de Fava Netto (FAVA NETTO; RAPHAEL, 1961). É preparado a partir das células leveduriformes e contém somente determinantes antigênicos do fungo. O uso de diversas cepas faz com que o antígeno seja mais completo pois possui um maior número de epítomos diferentes (FAVA; FAVA NETTO, 1998).

A prevalência observada no Brasil em diferentes levantamentos epidemiológicos desde 1966 é bastante variada. Este fato pode ser devido ao antígeno e a diluição usada nos diferentes estudos (FAVA NETTO, 1976; FAVA; FAVA NETTO, 1998). Além disso, existe a possibilidade de ocorrência de reação cruzada com antígenos de outros fungos como o *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* e o *Sporothrix schenckii* (SARAIVA et al., 1996).

Para evitar possíveis erros, a realização simultânea de paracoccidioidina e histoplasmina intradérmicas, pode ser útil para a detecção de uma simples infecção pelo *H. capsulatum* ou *P. brasiliensis* e para interpretação da dupla infecção (CERMEÑO et al., 2005). Outros autores enfatizam a importância de se usar moléculas purificadas, como o antígeno glicoproteico gp43, como antígeno em testes cutâneos devido à possibilidade de se introduzir contaminantes como endotoxinas nos antígenos brutos (SARAIVA et al., 1996).

Restrepo e Schneidau (1967) postularam que as glicoproteínas são os principais componentes responsáveis pela reatividade cutânea na resposta de hipersensibilidade do tipo tardia (RHT). Estudando a avaliação histológica de testes cutâneos positivos em porcos da Índia foi demonstrado que a população celular da RHT foi idêntica para a paracoccidioidina de Fava Netto e a gp43, no entanto a intensidade da reação em pacientes foi significativamente maior entre aqueles testados com a glicoproteína (SARAIVA et al., 1996).

Partindo da premissa que a paracoccidioidomicose se manifesta, na maioria dos casos, como uma micose assintomática, os testes cutâneos são as melhores ferramentas para serem usadas em inquéritos epidemiológicos (FAVA; FAVA NETTO, 1998).

2.5.2.1 Glicoproteína 43 (gp43)

O componente mais antigênico do *P. brasiliensis* é uma glicoproteína secretada de 43-kDa (gp43) a qual é reconhecida por 100% dos anticorpos de pacientes (PUCCIA et al., 1986; CAMARGO et al., 1988; CAMARGO et al., 1991; BLOTTA; CAMARGO, 1993). Além de ser detectada no meio extracelular, também pode ser encontrada dentro do citoplasma e na parede celular do fungo (STRAUS et al., 1996).

A gp43 também é considerada um fator de virulência. Ela atua como adesina favorecendo a aderência do *P. brasiliensis* às células epiteliais do hospedeiro (MENDES-GIANNINI et al., 2008; HANNA; SILVA; MENDES-GIANNINI, 2000). Quando testado a ligação do fungo às células epiteliais na presença de anticorpo anti-gp43 foi observado uma inibição significativa no processo de aderência (HANNA; SILVA; MENDES-GIANINI, 2000). Foi demonstrado também, que a gp43 secretada se liga aos anticorpos do hospedeiro, deixando a gp43 ligada a célula fúngica livre para agir como receptor de laminina da matrix extracelular dos tecidos de mamíferos. A levedura revestida de laminina tem uma habilidade aumentada para invadir e destruir tecidos infectados (VICENTINI et al., 1994). Além disso, parece ter atividade proteolítica sobre o colágeno, elastina e caseína (MENDES-GIANNINI; MORAES; RICCI, 1990).

O gene que codifica a gp43 foi clonado e sequenciado revelando similaridade a exo-1,3- β -D-glucanase, porém a gp43 não apresenta nenhuma atividade de hidrolase (CISALPINO et al., 1996).

A gp43 secretada no ambiente do fungo ou na corrente sanguínea é processada e apresentada pelas células dendríticas ativando uma resposta Th1 ou pelas células B induzindo a ativação da resposta Th2 (ALMEIDA et al., 1998; FERREIRA; LOPES; ALMEIDA, 2003). Essa glicoproteína contém epítomos apresentado às células T (TRAVASSOS et al., 1995) e B sugerindo que a resposta imunológica à estes epítomos pode ser relevante para a progressão da doença (TABORDA et al., 1998). Além disso, ela é capaz de ativar a produção de anticorpos e de induzir resposta imune celular experimentalmente e em pacientes com a doença benigna (MENDES; SHINAKAI-YASUDA, 2003). De fato, a RHT não é observada em indivíduos infectados pelo fungo quando a gp43 é retirada do extrato fúngico (RODRIGUES; TRAVASSOS, 1994).

Devido ao fato da gp43 ser reconhecida pelos anticorpos da maioria dos pacientes com PCM, alguns pesquisadores desenvolveram testes diagnósticos para a doença utilizando esta glicoproteína como antígeno, o que proporcionou um aumento significativo na especificidade e sensibilidade dos testes (CAMARGO et al., 1988; CAMARGO et al., 1991, PUCCIA; TRAVASSOS, 1991, TABORDA et al., 1998, MENDES-GIANNINI et al., 1989). Entretanto, foi demonstrado que anticorpos do soro de pacientes com outras micoses sistêmicas também reagem com a gp43 em ensaios de imunoadsorção enzimática (ELISA). Porém anticorpos presentes no soro de pacientes com PCM reconhecem predominantemente epítomos com conformação peptídica da gp43 purificada, em contraste com os anticorpos do soro de pacientes com histoplasmose ou doença de Jorge Lobo que reagem preferencialmente com galactose contendo epítomos de carboidratos do antígeno (PUCCIA; TRAVASSOS, 1991).

Deve-se ressaltar o estudo realizado por Berzaghi et al. (2005) no qual observou-se que isolados diferentes do *P. brasiliensis* podem produzir exoantígenos com a presença ou não da gp43. Além disso, a quantidade secretada é variável, fato que pode levar a um resultado falso-negativo caso estas amostras sejam utilizadas para a sorologia. Além da gp43 ser encontrada no soro, também tem sido encontrada em fluido cérebro-espinhal, lavado bronco-alveolar e urina de pacientes com PCM (MENDES-GIANNINI; DEL NEGRO; SIQUEIRA, 1994; MARQUES et al., 2005; MARQUES et al., 2006; CAMARGO, 2008).

A gp43 também vem sendo utilizada como antígeno de testes intradérmicos (SOMENSI et al., 1997; KALMAR et al., 2004; FORNAJEIRO et al., 2005; SARTI et al., 2011). Sugere-se ainda que a sua utilização seja mais vantajosa do que o uso da paracoccidioidina bruta (KALMAR et al., 2004).

2.5.2.2 Efeito *booster*

A prova cutânea e o efeito *booster* são amplamente estudados na infecção tuberculosa. Sabe-se que as reações intradérmicas com a tuberculina podem diminuir (reversão) ou aumentar devido a diferentes fatores, tais como, variabilidade nas técnicas de inoculação do antígeno e leitura dos resultados; resposta biológica;

reativação da resposta de hipersensibilidade do tipo tardia (efeito *booster*); ou a infecção recente (conversão) (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 1990).

Alguns indivíduos quando submetidos a provas intradérmicas podem apresentar resultados falso-negativos devido a anergia cutânea e isto diminui a acurácia do teste (THOMPSON, 1979; DORKEN; GRZYBOWSKI; ALLEN, 1987; AMIN, 1994).

Alguns fatores podem ser responsáveis pela diminuição na RHT. Observado em estudos relacionados ao agente etiológico da tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, sabe-se que crianças podem ter a habilidade limitada para responder a um teste cutâneo após infecção por este agente (LINCOLN; GILBERT; MORALES, 1960; STEINER et al., 1980) e devido a desnutrição (LLOYD, 1968). Assim como, alguns indivíduos adultos também podem apresentar uma RHT diminuída com o passar do tempo o que resulta em um teste cutâneo considerado negativo.

O declínio da sensibilidade do tipo tardia e seu *recall* por estímulos menores de um teste cutâneo é o conceito atual do fenômeno *booster* (DE MARCH-AYUELA, 1990), ou seja, *booster* é um fenômeno de aumento da RHT e conseqüentemente na medida da induração do teste cutâneo após uma retestagem. O primeiro teste provê um estímulo imunológico que é reforçado quando um segundo teste é realizado, e conseqüentemente determina um resultado considerado positivo (LIFSON et al., 1997). Vale a pena ressaltar que no fenômeno *booster* há ausência de uma nova infecção (THOMPSON, 1979; MENZIES, 1999; AKCAY et al., 2003). Acredita-se que seja resultado das células de memória da imunidade celular, semelhante a resposta sorológica anamnésica (MENZIES, 1999).

Deve-se atentar para o fato de que, algumas vezes, este fenômeno pode falsamente identificar uma pessoa como recém-infectada, sendo por este motivo recomendado que o intervalo entre os testes seja de poucos dias (THOMPSON et al., 1979).

Em estudos já realizados com testes cutâneos utilizando tuberculina, a frequência desse fenômeno aumenta com a idade e é principalmente observado em populações vacinadas com o bacilo Calmette-Guerin (BCG) (DORKEN, GRZYBOWSKI, ALLEN, 1987; WANG, 2000). O fenômeno é máximo se o intervalo entre o primeiro e o segundo teste for entre uma a cinco semanas (FEREBEE, 1970; CAUTHEN; SNIDER JR; ONORATO, 1994), é menos frequente se o intervalo for de apenas 48 horas (THOMPSON, 1979) e é pouco provável de ocorrer se o intervalo

entre os testes for maior de 60 dias (CAUTHEN; SNIDER JR; ONORATO, 1994), embora ele possa persistir por anos (CAMACHO et al., 2009).

Na tuberculose o fenômeno *booster* é considerado positivo quando a induração do segundo teste cutâneo for igual ou maior a 10mm e a medida for de pelo menos 6mm a mais do que a obtida no primeiro teste (THOMPSON, 1979; American Thoracic Society, 1990). Na infecção paracoccidióidica estes valores são desconhecidos pois não existem estudos sobre a existência do fenômeno *booster* no teste cutâneo para detecção desta infecção.

De acordo com o CDC (1995), a detecção do fenômeno *booster* diminui o número de resultados falso-negativos no teste cutâneo com a tuberculina. Dessa forma, essa realidade pode ser aplicada para o teste intradérmico com antígenos do *P. brasiliensis*, uma vez que o princípio dos testes é o mesmo, apenas os antígenos utilizados que são diferentes.

Com a diminuição dos resultados falso-negativos as taxas de prevalência da infecção paracoccidióidica seriam mais realistas, evidenciando as áreas endêmicas, indivíduos com possibilidade de adoecer e auxiliaria nos estudos a respeito da presença do fungo em algumas regiões geográficas.

2.5.2.3 Tratamento da infecção paracoccidióidica

Como na infecção paracoccidióidica não há evidências clínicas da doença o tratamento não é instituído.

Para compor o panorama da infecção paracoccidióidica em áreas rurais de Mato Grosso do Sul, há necessidade de conhecermos melhor as micro regiões endêmicas e as verdadeiras taxas de prevalência. Tal necessidade se justifica pela economia do estado que é baseada em atividades agropecuárias e pela taxa de mortalidade da PCM que é a maior do país.

Para isso, é importante a introdução da retestagem cutânea para determinação dos indivíduos infectados e a eliminação de resultados falso-negativos. O conhecimento da magnitude da infecção paracoccidióidica na região

oferece subsídios para investimentos em ações voltadas para a minimização da doença e suas sequelas incapacitantes. Também torna possível o controle dos principais fatores associados ao adoecimento e a implantação de estratégias para diagnóstico e tratamento precoces.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Estudar a infecção paracoccidióidica em assentamentos rurais localizados no município de Jaraguari, Mato Grosso do Sul.

3.2 Objetivo específico

- a) Estimar a prevalência da infecção paracoccidióidica em assentamentos rurais localizados em Jaraguari, Mato Grosso do Sul.
- b) Analisar fatores de risco associados a infecção paracoccidióidica.
- c) Observar a ocorrência do fenômeno *booster* no teste intradérmico na detecção da infecção paracoccidióidica.
- d) Sugerir o ponto de corte para positividade no fenômeno *booster*.

4 Material e Método

4.1 Tipo da pesquisa

É um estudo epidemiológico analítico transversal e quantitativo em residentes de assentamentos rurais em Mato Grosso do Sul.

Os estudos transversais, algumas vezes, não são considerados como analíticos – que possam testar hipóteses sem causa/evento. Porém, quando for possível testar associações de frequências ou estatísticas entre dois eventos – exposição/não exposição, ele pode ser considerado como analítico (KLEIN; BLOCH, 2009).

4.2 Local da pesquisa

O trabalho foi realizado em oito assentamentos rurais do município de Jaraguari, sendo eles: Jaraguari Velho, Bonfim, Boa Vista, Primavera, Vale Verde, Estrela, Sete e Furnas do Dionísio.

O município de Jaraguari fica a 45 km da capital do estado do Mato Grosso do Sul, localizado na microrregião de Campo Grande. A superfície do município é de 2936 km² com latitude de -20°08'20" e longitude de -54° 23'58" situado numa altitude de 468m (Figura 1). A população total de Jaraguari é composta por 6341 pessoas, sendo 3405 homens e 2936 mulheres, destes 4555 vivem na área rural do município (IBGE, 2011; Prefeitura de Jaraguari, 2011). O município de Jaraguari contém nove assentamentos, sendo um deles, Furnas do Dionísio, um remanescente de quilombolas.

A principal atividade econômica é a agricultura, destacando as lavouras de soja, mandioca e milho. Muitos migrantes provenientes da região Sul e Sudeste do País trabalham com horticultura. Há ainda a pecuária de corte e subsistência além de gado leiteiro (Prefeitura de Jaraguari, 2011).

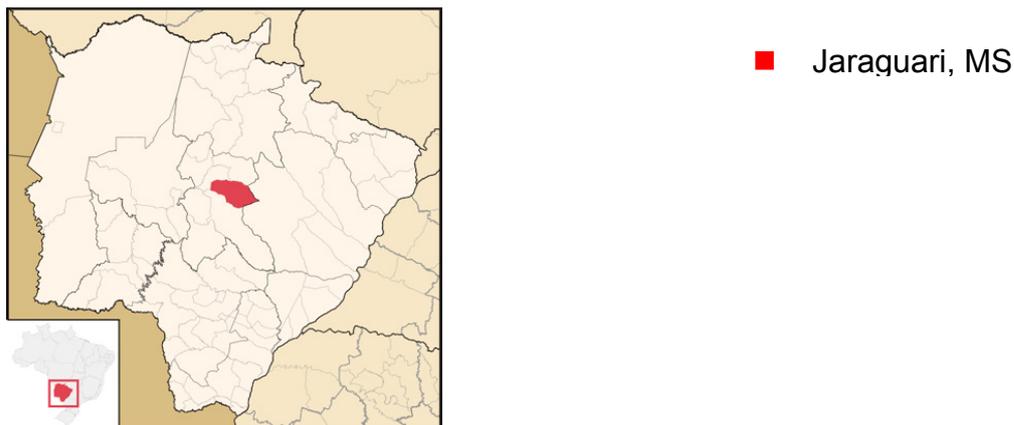


Figura 1 – Mapa do estado do Mato Grosso do Sul com a localização do município de Jaraguari (IBGE, 2011)

4.3 Sujeitos da pesquisa

O trabalho foi realizado no período de julho de 2009 a junho de 2010 entre os moradores dos assentamentos da área rural do município de Jaraguari.

Toda a população residente em oito assentamentos foi convidada para participar da pesquisa pelos agentes comunitários. Todos que compareceram ao local do estudo, após a leitura e assinatura do TCLE (APÊNDICE A), se concordassem em participar eram incluídos, exceto os que apresentavam algum dos critérios de exclusão citados abaixo.

Critérios de exclusão: gestantes; portadores de patologias graves como doenças autoimunes, diabetes e tuberculose; idade menor que 2 anos.

Ao total 727 indivíduos iniciaram o estudo, esta amostra, apesar de selecionada por conveniência (não aleatória), possui características comuns a toda população. É possível que esta forma de seleção possa apresentar o viés de não terem comparecido ao local de estudo pessoas com dificuldade de deambulação ou pertencentes a localidades mais distantes. Ainda assim considerou-se uma amostra representativa da população estudada.

Em relação ao tamanho amostral, para uma população de 4555 indivíduos, considerando uma prevalência esperada de 40%, com 5% de erro padrão e 95% de intervalo de confiança, 341 indivíduos seriam suficientes para dar precisão ao estudo. Com 99% de intervalo de confiança seriam necessários 559 sujeitos.

4.4 Procedimentos

Todos os participantes, que concordaram em participar, assinaram o TCLE e responderam a um questionário sobre seus dados demográficos e hábitos (APÊNDICE B). No caso de menores de idade, um responsável autorizou a sua devida participação.

4.4.1 Preparo do antígeno gp43 para teste cutâneo

Para a produção do antígeno foi utilizada a cepa B-339 do *P. brasiliensis*. O supernadante da cultura (fase leveduriforme) com 8 dias foi filtrado, concentrado e dializado de acordo com Camargo et al. (1988). A gp43 foi purificada por cromatografia de afinidade em uma coluna de Affi-gel (Bio-Rad) associada com anticorpo monoclonal de camundongo IgG anti-gp43. A gp43 foi eluída com tampão de ácido cítrico 0.1M, pH 2,8, neutralizada com Tris 1M, pH 9,0 e concentrada em uma célula Amicon 10K. O conteúdo de proteínas foi determinado através do método de Bradford. Todas as etapas da purificação foram monitoradas por SDS-Page.

Soluções da gp43 em salina contendo 60µg/ml foram esterilizadas por filtração em filtros descartáveis de 0,22µ (Sigma) e estocadas a -20°C (Saraiva et al. 1996).

4.4.2 Teste cutâneo com gp43

O teste cutâneo foi realizado nos assentamentos. Para tal a equipe foi, pelo menos, 4 dias consecutivos em cada, sendo dois dias para a aplicação do teste e dois para a leitura dos resultados. Apesar de haver um ponto específico em cada assentamento destinado a receber os moradores para a realização do teste, a busca

ativa em domicílios mais distantes, tanto para a aplicação do teste quanto para a leitura dos resultados, também foi feita.

As aplicações intradérmicas foram realizadas utilizando seringas de tuberculinas descartáveis da marca BD®. As leituras foram feitas por dois leitores criteriosamente treinados por um leitor padrão usando régua milimetrada cedida pelo Ministério da Saúde para o teste da tuberculina.

O teste cutâneo com a gp43 (60 µg/mL) do *P. brasiliensis* foi realizado em todos indivíduos que concordaram em participar da pesquisa. O antígeno proveniente da cepa Pb B-339, cedido pelo Dr. Zoilo Pires de Camargo da Escola Paulista de Medicina, foi aplicado (0,1 mL) via intradérmica no antebraço esquerdo. A leitura do teste foi realizada 48 horas após a aplicação medindo-se o maior diâmetro de induração e foi considerado positivo as medidas maiores ou iguais a 5mm.

Uma situação que pode justificar um teste cutâneo negativo é a diminuição dos linfócitos de memória naquele indivíduo previamente infectado. No diagnóstico da infecção tuberculosa tem sido proposto que se realize dois tempos de testagem da prova tuberculínica nos indivíduos não reatores após 1 a 3 semanas para se avaliar o fenômeno *booster*. Apesar de não haver recomendações ou padronizações para a realização da retestagem nos testes intradérmicos, é possível que o fenômeno *booster* também tenha importância na infecção paracoccidióidica. A identificação de indivíduos que são positivos somente após a retestagem revelaria uma prevalência de infecção mais próxima da realidade.

Naqueles indivíduos que apresentaram resultado negativo, o teste foi repetido (no antebraço direito) de 10 a 15 dias após a primeira aplicação para a observação do fenômeno *booster*. O retorno aos assentamentos foi feito da mesma forma que a primeira vez, ou seja, a equipe foi em cada assentamento 4 dias consecutivos novamente. O ponto de corte da positividade do *booster* neste teste intradérmico foi obtido pela média das diferenças entre as medidas do diâmetro de induração do primeiro e do segundo teste cutâneo acrescido de dois desvios-padrão.

4.4.3 Teste cutâneo com candidina

O teste cutâneo negativo a gp43, em geral significa que o indivíduo não foi previamente exposto ao fungo. Porém, pode ser falso-negativo nos indivíduos anérgicos, que são incapazes de responder com uma RHT a qualquer antígeno. Estes indivíduos podem ser identificados com o teste da candidina negativo. A inoculação do antígeno extraído da *Candida sp* resulta em teste positivo em 100% dos indivíduos não anérgicos.

Com a finalidade de evidenciar possíveis casos de anergia naqueles indivíduos que foram negativos no primeiro teste cutâneo, no momento da retestagem para a identificação do fenômeno *booster*, foi aplicado concomitantemente 0,1mL da candidina (100µg/mL [Anthigenus]) via intradérmica no antebraço esquerdo. A leitura foi realizada após 48 horas da aplicação medindo-se o maior diâmetro da induração. Os resultados foram considerados positivos quando a induração apresentava diâmetro ≥ 5 mm.

Os nove sujeitos que puderam ser identificados como anérgicos foram excluídos do total de sujeitos para o cálculo de prevalência.

Na figura 2 pode-se observar o esquema de aplicação e leitura dos testes cutâneos (TC).

4.5 Diagnóstico e acompanhamento

Os indivíduos que tiveram resultado do teste cutâneo positivo foram encaminhados ao Hospital Dia Professora Esterina Corsini do Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para serem atendidos por médico infectologista e para a realização de exames complementares quando necessário, com vistas a excluir doença em atividade.

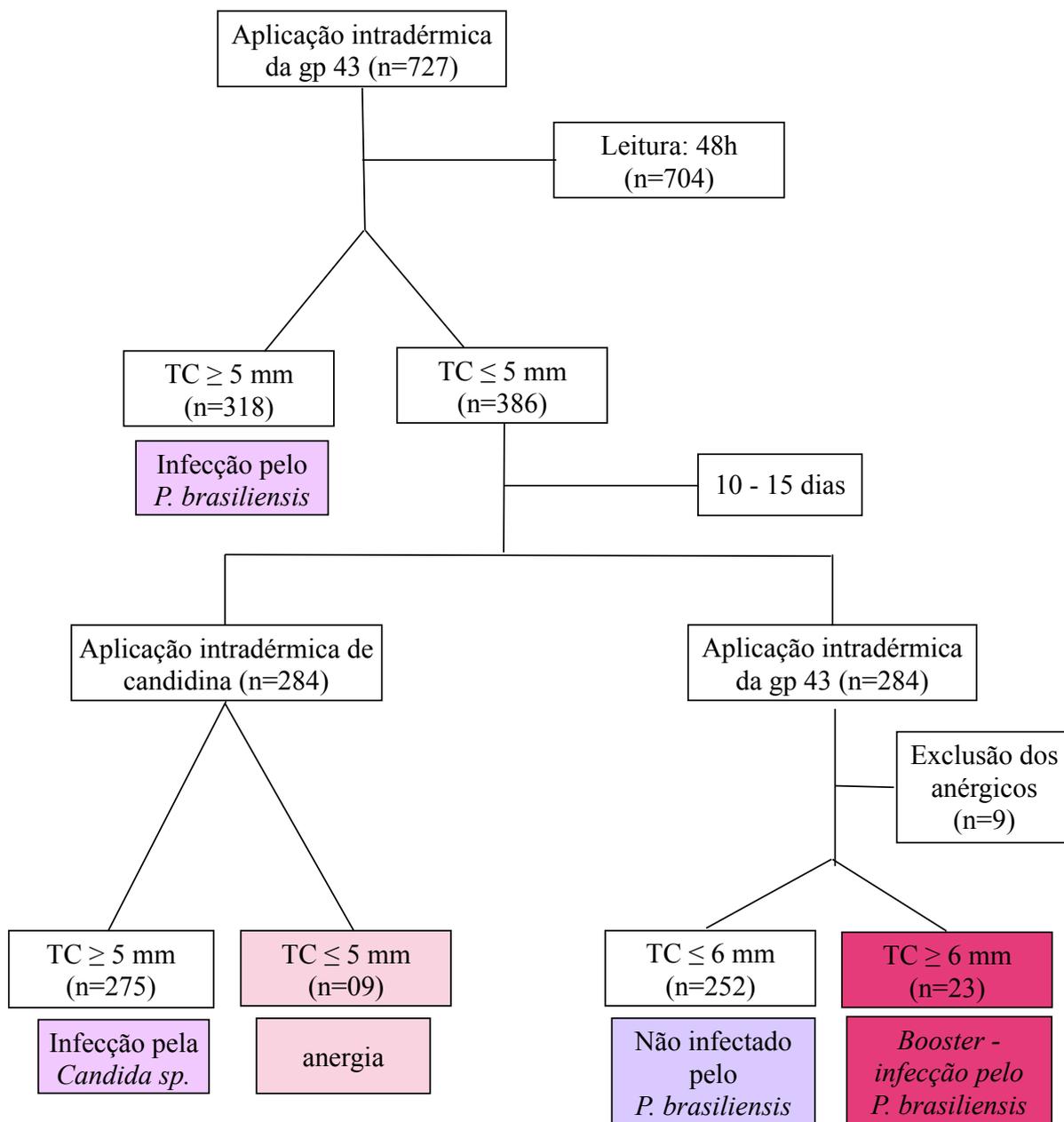


Figura 2. Esquema utilizado para a aplicação e leitura dos testes cutâneos (TC) na população de assentamentos rurais do município de Jaraguari, Mato Grosso do Sul.

4.6 Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando-se testes de Qui-quadrado e Qui-quadrado de tendência, para a comparação de proporções, ao nível de significância de 5%. Foram calculadas as Razões de Prevalência com os respectivos intervalos

de confiança de 95%. Para estimar as razões de prevalência ajustadas, foi utilizada a Regressão de Cox (com tempo igual a uma unidade). Os programas estatísticos utilizados foram Epi Info, versão 3.5.1 (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2007) e Bio Estat versão 5.0 (AYRES; AYRES; SANTOS, 2007).

4.7 Comitê de Ética

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas da UFMS sob protocolo número 1303 de 29 de Outubro de 2009 (ANEXO A).

5. RESULTADOS

Dos 727 indivíduos que fizeram o teste intradérmico com a gp43, 23 não retornaram para fazer a leitura do resultado e 9 foram negativos no teste cutâneo com a candidina e por este motivo foram excluídos das análises de prevalência e fatores de risco analisados. Dos 695 indivíduos, 387 (55,7%) eram homens e 308 (44,3%) mulheres e a idade variou de 2 a 90 anos. A grande maioria, 82,6% (574) referia atividade regular em agricultura. Nenhum dos participantes apresentou sinais clínicos da doença no momento da testagem.

A prevalência da infecção pelo *P. brasiliensis* nos assentamentos do município estudado foi de 45,8% (IC95% 42,1% – 49,5%). Analisando os oito assentamentos de forma individual observamos variação na taxa de prevalência de 23,4% no assentamento Jaraguari Velho à 70,3% no Vale Verde. Na tabela 2 pode-se observar a variação encontrada nas taxas de prevalências dos diferentes assentamentos.

Tabela 2 – Prevalência da infecção paracoccidióidica em diferentes assentamentos rurais de Jaraguari/MS – 2010 (n=695)

Assentamento	Prevalência %
Vale Verde	70,3 (64/91)
Bonfim	63,5 (47/74)
Estrela	61,3 (76/124)
Primavera	56,4 (22/39)
Furnas do Dionísio	37,6 (44/117)
Sete	32,6 (14/43)
Boa Vista	29,2 (14/48)
Jaraguari Velho	23,4 (37/159)

Dos homens que participaram do estudo, 48,8% (IC95% 43,9% – 53,8%) foram positivos à gp43 e entre as mulheres 41,9% (IC95% 36,4% – 47,4%) reagiram positivamente no teste. Não houve diferença significativa entre os sexos ($p=0,068$). A idade média dos indivíduos infectados foi $45,8 \pm 18,17$ anos com mediana de 48

anos, 58,4% (212/363) dos indivíduos acima dos 40 anos de idade pesquisados estão infectados pelo fungo. Em relação aos não infectados a idade média foi $33,9 \pm 20,59$ anos com mediana de 33 anos de idade. Entre as crianças de 2 a 10 anos a prevalência da infecção foi de 11,1%, já dentre aqueles com 11 a 20 anos foi de 31,6%, a prevalência continuou aumentando significativamente com a idade ($p < 0,001$) chegando a 62,1% entre os indivíduos acima dos 60 anos de idade (Tabela 3).

Hábitos individuais, como trabalho em lavoura ou horta, etilismo, uso de tabaco e caça ao tatu foram analisados. Observou-se associação estatisticamente significativa entre infecção com trabalho em lavoura e infecção e tabagismo ($p < 0,001$), contudo quando utilizamos a análise multivariada o tabagismo e o trabalho em lavoura deixam de ser significativo ($p < 0,761$ e $p < 0,077$ respectivamente).

Por meio da análise das razões de prevalência ajustadas, a infecção pelo *P. brasiliensis* foi 1,7 vezes mais prevalente na faixa etária acima de 40 anos, em relação à faixa etária até 40 anos. Não houve associação de frequência para as demais variáveis estudadas (Tabela 4).

Tabela 3 – Número e porcentagem de moradores de assentamentos rurais segundo as variáveis de estudo e a intradermorreação a gp43 (infecção pelo *P. brasiliensis*), Jaraguari/MS – 2010 (n=695)

Variável	Gp43 positivo		Gp43 negativo		Total		p	RP	IC 95%
	N	%	N	%	N	%			
	(318)		(377)		(695)				
Sexo									
Masculino	189	48,8	198	51,2	387	55,7	⁽¹⁾ 0,068	1,17	0,99 - 1,38
Feminino	129	41,9	179	58,1	308	44,3			
Lavoura									
Sim	284	49,5	290	50,5	574	82,6	⁽¹⁾ <0,001	1,76	1,31 – 2,37
Não	34	28,1	87	71,9	121	17,4			
Caça a tatus									
Sim	121	50,8	117	49,2	238	34,2	⁽¹⁾ 0,052	1,18	1,00 – 1,39
Não	197	43,1	260	56,9	457	65,8			

Tabela 3 – (Cont.)...

Variável	Gp43 positivo		Gp43 negativo		Total		p	RP	IC 95%
	N	%	N	%	N	%			
	(318)		(377)		(695)				
Tabagismo									
Sim	132	54,5	110	45,5	242	34,8	⁽¹⁾ <0,001	1,33	1
Não	186	41,1	267	58,9	453	65,2			
Etilismo									
Sim	111	50,7	108	49,3	219	31,5	⁽¹⁾ 0,077	1,17	1
Não	207	43,5	269	56,5	476	68,5			
Faixa etária									
Acima de 60	72	62,1	44	37,9	116	16,7	⁽²⁾ <0,001	1,53	1
51 a 60	67	55,4	54	44,6	121	17,4			
41 a 50	73	57,9	53	42,1	126	18,1			
31 a 40	32	40,5	47	59,5	79	11,4			
21 a 30	36	41,9	50	58,1	86	12,4			
11 a 20	30	31,6	65	68,4	95	13,7			
0 a 10	8	11,1	64	88,9	72	10,4			

Nota: se $p \leq 0,05$ – diferença estatisticamente significativa.

⁽¹⁾ Teste Qui-quadrado.

⁽²⁾ Teste Qui-quadrado de tendência.

Tabela 4 – Análise multivariada da prevalência de infecção pelo *P. brasiliensis* de moradores de assentamentos rurais segundo as variáveis de estudo, Jaraguari/MS – 2010 (n=695)

Variáveis	p	RP ajustada	IC 95%
Idade > 40 anos	< 0,001	1,71	1,33 – 2,21
Lavoura	0,077	1,41	0,96 - 2,06
Tabagismo	0,761	1,04	0,81 - 1,33
Caçar tatus	0,599	0,93	0,72 - 1,21
Sexo masculino	0,300	1,14	0,89 - 1,46
Etilismo	0,936	1,01	0,79 - 1,30

Nota: se $p \leq 0,05$ – diferença estatisticamente significativa. Regressão de Cox.

Em relação ao fenômeno *booster*, 386 (54,8%) indivíduos foram negativos no primeiro teste cutâneo e destes, 284 repetiram o teste entre o 10^o e 15^o dia após o

primeiro exame. Entretanto, nove indivíduos foram excluídos das análises, uma vez que foram negativos no teste intradérmico com a candidina, permanecendo para as análises 275 indivíduos.

Considerando 1,32 mm a média das diferenças entre o primeiro e o segundo teste cutâneo e dois desvios-padrão de 3,20mm, sugere-se como efeito *booster* positivo uma diferença de 6mm entre as leituras. Sendo assim, 8,4% dos indivíduos retestados foram positivos no teste cutâneo que somados aos 45,8% de positivos no primeiro teste podemos considerar a prevalência da infecção paracoccidióidica na região estudada de 54,2%.

Dos 23 indivíduos que apresentaram o fenômeno *booster* positivo, 13 (56,5%) eram homens e 10 (43,5%) mulheres. A idade média destes indivíduos foi $47,7 \pm 18,6$ anos de idade. As características dos indivíduos participantes do estudo estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5 – Indivíduos negativos retestados com gp43 de acordo com sexo e idade e presença/ausência do fenômeno *booster*, Jaraguari/MS – 2010 (n= 275)

	Presença do <i>booster</i>	Ausência do <i>booster</i>	P
Gênero (masculino/feminino)	13/10	132/120	0,7 ¹
Idade (média \pm DP ²)	47,7 \pm 18,6	31,6 \pm 20,8	<0,001 ³

¹ χ^2 .

²DP: desvio padrão.

³T-student.

Contudo, se considerar uma diferença de 5mm entre os dois testes devido ao fato de que esta é a medida para se considerar o primeiro teste cutâneo a gp43 positivo deveríamos acrescentar mais 6 indivíduos positivos. Cinco deles apresentaram 0mm no primeiro teste e 5 mm no segundo e um deles teve 2mm de induração no primeiro teste e 7 mm no segundo. Considerar a positividade ao fenômeno *booster* como uma diferença de 5mm entre os dois testes elevaria a prevalência do referido fenômeno para 10,5% e a prevalência total da infecção paracoccidióidica na região estudada para 55,8%.

6. DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo utilizando a gp43 em testes intradérmicos para a detecção da infecção paracoccidióidica entre moradores de assentamentos rurais da região Centro-Oeste. Além disso poucos são os trabalhos que utilizaram a gp43 em inquéritos epidemiológicos no Brasil, podendo ser citados os estudos de Somensi et al. (1997) em Londrina, Kalmar et al. (2004) no Sul da Bacia Amazônica e Fornajero et al. (2005) na região noroeste do estado do Paraná.

A prevalência da infecção paracoccidióidica é baseada em inquéritos realizados com testes cutâneos intradérmicos (FAVA NETTO; GUERRA; COSTA, 1976) em diferentes regiões da América Latina. Na Colômbia a infecção pelo *P. brasiliensis* tem variado entre as diversas comunidades. Cadavid e Restrepo (1993) observaram uma variação de 29 a 77% na prevalência da infecção em diferentes comunidades rurais, enquanto que na Venezuela a prevalência da infecção nos últimos anos variou de 10,2% (CERMEÑO et al., 2009) a 19,7% (CERMEÑO et al., 2005). Na Argentina os casos de PCM não são muito frequentes, ocorrendo na sua maioria na região nordeste do país, com a prevalência da infecção paracoccidióidica variando de 1,6% (MANGIATERRA et al., 1996) a 10,25% (VAN GELDEREN DE KOMAID; DURÁN; KESTELMAN, 1999).

Mesmo em uma área restrita a prevalência varia, como observado neste estudo entre os diferentes assentamentos do mesmo município. A variação observada de 23,4% a 70,3% pode ser devido a diferentes fatores, tais como, ao tipo de produção, presença do fungo no solo; composição química do solo; e também como observado por ONO et al. (2002) o uso de produtos químicos para eliminação de pragas inibem o crescimento do fungo. Neste estudo, nas áreas com as menores taxas de prevalência o cultivo principalmente observado era de hortaliças.

No Brasil, país com maior número de casos de paracoccidioidomicose na América Latina (RESTREPO, 1985; RESTREPO, 1994; MENDES, SHIKANAI-YASUDA, 2003), a prevalência da infecção varia conforme a região. Diferentes estudos epidemiológicos realizados desde 1966 demonstram uma variação de 2% em crianças na região urbana do Rio de Janeiro até 82% dentre soldados no Sul do Brasil (FAVA; FAVA NETTO, 1998).

Neste estudo a prevalência observada foi 45,8%, resultado semelhante aos 49,5% encontrados em área agrícola de café em Minas Gerais (SILVA-VERGARA; MARTÍNEZ, 1998). Corroborando com estes achados foi observada prevalência de 43% na região Noroeste do estado do Paraná (FORNAJEIRO et al., 2005), 50% em Londrina (SOMENSI et al., 1997) e 51% em Curitiba (REBELATTO, 1996).

Por outro lado, foi observado prevalência de 13% da infecção paracoccidióidica no interior do estado de São Paulo (CARANDINA; MAGALDI, 1974). Na região Norte e Nordeste do Brasil a prevalência da infecção pelo *P. brasiliensis* é menor. Inquérito epidemiológico realizado no Estado do Ceará encontrou 32,1% de positividade ao teste cutâneo (DIÓGENES et al., 1990), enquanto que na região sul da bacia Amazônica a prevalência entre crianças variou entre 4% e 17%, dependendo do antígeno utilizado (KALMAR et al., 2004).

Essas variações podem ser devido aos diferentes antígenos e diluições usados nos estudos. O antígeno, anteriormente, mais utilizado era a paracoccidioidina polissacarídica obtida de diferentes cepas do *P. brasiliensis* (FAVA; FAVA NETTO, 1998), porém este antígeno pode induzir uma reação cruzada com antígenos de outros fungos como o *H. capsulatum*, *C. immitis* e o *S. schenkii* (SARAIVA et al., 1996).

Cermeño et al. (2009) observaram 4,4% de copositividade em um estudo epidemiológico utilizando a histoplasmina e paracoccidioidina na Venezuela. No Brasil, estado do Ceará, um inquérito para determinar a prevalência da infecção pelo *P. brasiliensis* e pelo *H. capsulatum* encontrou 90,9% de copositividade em ambos os testes (DIÓGENES et al., 1990). Em Minas Gerais foi observado 33% de copositividade e um risco de ter o teste com a paracoccidioidina positivo 6 vezes maior para quem tem o teste histoplasmina positivo (SILVA-VERGARA; MARTÍNEZ, 1998).

Por ser específico do *P. brasiliensis* a gp43 passou a ser utilizada. Em um estudo comparando a gp43 com a paracoccidioidina foi observado que a proporção de indivíduos reatores a paracoccidioidina é significativamente maior entre aqueles reatores a histoplasmina (KALMAR et al., 2004). Com isso os autores sugerem vantagem no uso da gp43 em teste cutâneos em relação a paracoccidioidina bruta. Outros autores sugerem ainda a possibilidade de que a copositividade na histoplasmina e paracoccidioidina se deva à superposição dos dois fungos em algumas áreas (SILVA-VERGARA; MARTÍNEZ, 1998).

No presente estudo foi utilizado o antígeno purificado gp43 e a prevalência da infecção paracoccidióidica encontrada foi de 45,8%, resultados semelhantes a outros estudos que utilizaram a gp43 como antígeno do teste cutâneo no Estado do Paraná, onde foi encontrado uma prevalência de 43% a 50% (FORNAJEIRO et al., 2005; SOMENSI, 1997) e superior aos 4% observados em crianças e adolescentes da região sul da bacia Amazônica (KALMAR et al., 2004) e aos 12,2% entre indivíduos HIV⁺ no Estado do Mato Grosso do Sul (SARTI et al., 2011).

Dos homens participantes deste estudo, 48,8% foram positivos à gp43 e entre as mulheres 41,9% reagiram positivamente no teste indicando que a infecção paracoccidióidica ocorre igualmente entre homens e mulheres, assim como observado em uma comunidade rural do município de Botucatu onde 49% dos infectados eram mulheres (CARANDINA; MAGALDI, 1974).

A igualdade entre os sexos, no que se refere a infecção, é diferente do que é observado entre adultos com a paracoccidioidomicose, onde a proporção homens:mulheres é de 10-15:1 (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; PANIAGO et al., 2003). Em estudo realizado na Argentina 95,8% dos pacientes com PCM eram do sexo masculino (TICHELLIO; MANGIATERRA; GIUSIANO, 2008). É sugerido que fatores hormonais são fundamentais para a patogênese da doença. O estrógeno inibe a transformação da fase de micélio para levedura do *P. brasiliensis*, e essa inibição gera uma resistência das mulheres ao adoecimento (RESTREPO et al., 1984). Tichellio et al. (2008), observaram um único caso de PCM em mulher na província de Formosa na Argentina, sendo que a paciente apresentava transtornos hormonais. Entre crianças de 2 a 15 anos de idade com PCM a razão de prevalência entre o sexo masculino:feminino é de 1,3:1 (PEREIRA et al., 2004), mostrando a importância dos fatores hormonais na proteção ao adoecimento.

A infecção paracoccidióidica é prioritariamente adquirida nas duas primeiras décadas de vida, com um pico de incidência entre 10 e 20 anos de idade (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; MARTINEZ et al., 2002). Neste trabalho foi observado 31,6% de positividade na faixa etária citada. Adultos jovens e crianças são considerados importantes marcadores epidemiológicos pois apresentam menos chance de entrar em contato com o fungo (MANGIATERRA et al., 1996) e um perfil migratório restrito (BLOTTA et al., 1999) indicando a presença do fungo e a infecção no local da habitação. Este fato sugere que a infecção ocorre não só relacionada as atividades na lavoura. A observação de indivíduos abaixo dos 20 anos de idade com

teste intradérmico positivo pode indicar a presença do fungo no solo da área estudada (CERMEÑO et al., 2009).

Vários autores têm chamado a atenção sobre a importância de se valorizar epidemiologicamente as crianças que apresentam a fase aguda ou subaguda da doença, especialmente porque estas crianças na América Latina são envolvidas nas diversas atividades agropecuárias desde os primeiros anos de vida (WANKE 1976; RESTREPO, 1994). Este fato foi observado como sendo parte da realidade das crianças que participaram deste estudo. Grande parte das crianças estudadas relataram que mesmo sem realizar atividades na lavoura acompanhavam seus pais quando não estavam na escola. As crianças com idade inferior a idade escolar também acompanhavam os seus pais na lavoura. Isto poderia explicar a prevalência de 11,1% observada neste estudo entre as crianças de 2 a 10 anos de idade, o que sugere a exposição precoce das crianças à infecção pelo *P. brasiliensis* nas áreas rurais (WANKE, 1976; RESTREPO, 1994).

Levantamento epidemiológico realizado na região Sudeste do Brasil, com crianças de 5 a 9 anos de idade encontrou 16,5% de reatividade a paracoccidioidina (SILVA-VERGARA; MARTÍNEZ, 1998). Enquanto que em estudo utilizando a paracoccidioidina e a gp43 em crianças de 7 a 18 anos da região Sul da bacia Amazônica no estado do Mato Grosso encontrou taxa de prevalência de 17% e 4% respectivamente (KALMAR et al., 2004). Diógenes et al. (1990), utilizando a paracoccidioidina, observaram prevalência da infecção de 15 e 25% entre as crianças de 5 a 10 e 11 a 20 anos de idade respectivamente no Ceará. Em relação a doença, 12,7% dos casos de PCM diagnosticados em Belém do Pará eram em crianças entre 3 a 13 anos de idade (FONSECA; PARDAL; SEVERO, 1999).

A infecção pelo *P. brasiliensis* desde os primeiros anos de vida também é realidade para outros Países da América do Sul. Estudos epidemiológicos realizados dentro do Estado Bolívar mas em cidades diferentes da Venezuela mostram resultados bem variados. Em 2005, Cermeño et al., observaram prevalência de 14,8% entre crianças abaixo dos 10 anos de idade na cidade de Upata, posteriormente estudando a mesma faixa etária na cidade de San Félix a prevalência foi de 5,4% (CERMEÑO et al., 2009). Na Argentina 1,6% das crianças de 2 a 15 anos de idade residentes em área urbana da província de Chaco, região nordeste do país apresentaram positividade para paracoccidioidina (MANGIATERRA et al., 1996).

Qualquer indivíduo exposto ao *P. brasiliensis* é suscetível a infecção, contudo, a taxa de infecção aumenta com o passar dos anos. (FAVA; FAVA NETTO, 1998; CEMEÑO et al., 2009; SILVA-VERGARA, MARTÍNEZ, 1998). Na faixa etária de 2 a 10 anos a prevalência observada foi de 11,1% chegando a 62,1% entre os indivíduos acima dos 60 anos de idade, mostrando um aumento da exposição ao *P. brasiliensis* com a idade.

Considerando os elevados índices de testes intradérmicos positivos em algumas populações, a incidência relativamente baixa de casos clínicos da doença entre essas pessoas, sugere que o fungo seja de baixa patogenicidade (SANTOS et al., 2003). Entretanto, alguns hábitos podem influenciar tanto a aquisição da infecção quanto o desenvolvimento da doença. O grande fator de risco para infecção são as profissões ou atividades relacionadas ao manejo do solo (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; COUTINHO et al., 2002; CADAVID; RESTREPO, 1993; CARANDINA; MAGALDI, 1974), neste estudo, dos 318 reatores, 284 (89,3%) referiram trabalhar na lavoura ou horta. Estes resultados são semelhantes ao observado no Estado do Paraná, onde 80,4% dos indivíduos reatores a gp43 relataram residência rural (FORNAJEIRO et al., 2005), e do estudo realizado em Minas Gerais, onde 61% dos indivíduos com infecção paracoccidióidica desenvolviam atividade com lavoura de café (SILVA-VERGARA; MARTÍNEZ, 1998).

Em relação a doença, no Mato Grosso do Sul 45,5% dos pacientes atendidos no período de 1980 a 1999 eram trabalhadores da área rural no momento do diagnóstico (PANIAGO et al., 2003). Na Argentina, 98% dos pacientes com a doença ativa relataram ter vivido pelo menos duas décadas na área rural (TICHELLIO; MANGIATERRA; GIUSIANO, 2008).

Entre os fatores desencadeantes da doença têm sido citados o tabagismo, alcoolismo e a desnutrição (MARTINEZ; MOYA, 1992; BLOTTA et al., 1999; PANIAGO et al., 2003; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). O paciente tabagista tem um risco de 14 vezes de adoecimento (SANTOS et al., 2003). Martinez e Moya (1992) estimaram em 2,3 o risco relativo de aquisição da forma crônica da PCM para aqueles com consumo etílico superior a 60mL/dia. Neste estudo, 132 (41,5%) reatores relataram ser tabagistas e 111 (34,9%) relataram ingerir bebida alcoólica mais de 2 vezes por semana. Essas informações são importantes considerando-se o efeito potencializador sobre o risco de desenvolvimento da doença, uma vez que associa o fato da sensibilização prévia com o agente a fatores predisponentes

(SANTOS et al., 2003). Além de predispor ao adoecimento, Martinez e Moya (1992) sugerem que o álcool possa prejudicar a cura dos doentes com a forma crônica da doença.

Fornajeiro et al. (2005), observaram que 54,9% dos indivíduos infectados pelo *P. brasiliensis* eram tabagistas e 47,1% referiam que ingeriam bebidas alcoólicas mais de duas vezes na semana. Entre os infectados na Venezuela, 21,4% declararam ser tabagistas e 28,5% ex tabagistas (CERMEÑO et al., 2009). Na Colômbia os tabagistas são significativamente mais infectados pelo fungo do que os não fumantes (CADAVID; RESTREPO, 1993).

Na Argentina 83% dos pacientes eram tabagistas e 63% ingeriam bebidas alcoólicas com frequência (TICHELLIO; MANGIATERRA; GIUSIANO, 2008). Em estudo desenvolvido no Espírito Santo, 92,8% dos pacientes com PCM crônica fumavam no momento em que adoeceram e 78,6% relataram consumo de bebidas alcoólicas, além disso foi observado que os tabagistas por mais de 20 anos mostraram maiores chances de desenvolver a doença (SANTOS et al., 2003).

No Mato Grosso do Sul, 90,3% dos pacientes com PCM faziam uso de tabaco e 68,3% ingeriam bebidas alcoólicas com frequência (PANIAGO et al., 2003). Em São Paulo 50% dos pacientes com a forma crônica da doença ingeriam bebidas alcoólicas diariamente (MARTINEZ; MOYA, 1992). A quantidade de cigarros/dia também influencia no desenvolvimento da doença. Santos et al. (2003) observaram que indivíduos que fumavam vinte ou mais cigarros/dia desenvolveram a PCM em média oito anos antes dos demais.

O etilismo, além de ser fator de risco para adoecimento está associado ao óbito. De acordo com Ribeiro et al. (2009) entre os pacientes HIV⁺ com micose sistêmica que faziam uso de bebidas alcoólicas, 54,1% evoluíram para óbito durante o tratamento da micose. Entre aqueles pacientes que não referiram o uso de bebidas alcoólicas apenas 12,5% foram à óbito.

Acredita-se que o alcoolismo atue como um co-fator de risco para adoecimento associado ao tabagismo (SANTOS et al., 2003). Em relação a desnutrição, Pereira et al. (2004) acreditam que ela seja secundária a PCM uma vez que, em suas observações a frequência de crianças com PCM e desnutrição severa foi baixa e houve a completa reconstituição do *status* nutricional após o tratamento.

A prevalência de 45,8% da infecção paracoccidióidica observada neste estudo pode não refletir a realidade, pois quando repetimos o teste para verificar a

existência do fenômeno *booster* e assim estimar a taxa deste fenômeno nos resultados negativos encontramos um incremento de 8,4% na positividade, elevando a prevalência da infecção paracoccidióidica na região estudada para 54,2%.

Apesar de antígenos e agentes diferentes, vários autores relatam a existência do fenômeno *booster* no teste cutâneo com PPD para o diagnóstico da tuberculose latente. Oliveira et al., (2008) observaram uma taxa de 7,8% de positividade na retestagem entre profissionais da área saúde de um hospital universitário. Entre profissionais de laboratório foi observado taxa de 10% do mesmo fenômeno (OLIVEIRA, 2011). Corroborando com estes resultados, Teixeira et al., (2008) encontraram 8,4% de positividade no segundo teste entre os estudantes de medicina no Rio de Janeiro e Salles et al. (2007) observaram 6% de positividade na retestagem entre contactantes de pacientes com tuberculose pulmonar.

Estudos sobre o fenômeno *booster* no teste cutâneo a tuberculina também são realizados em outros países, e se observam as mesmas proporções de positividade (BASS; SERIO, 1981; KRAUT et al., 2004). Lifson et al. (1997) observaram 8% entre usuário de drogas injetáveis nos Estados Unidos. Contudo, em indivíduos com supressão do sistema imunológico, a taxa do fenômeno *booster* pode ser menor, tal qual 2,7% observada por Webster et al. (1995) entre indivíduos HIV⁺. Por outro lado, pacientes que recebem hemodiálise apresentaram taxas mais elevadas de positividade na retestagem do teste de tuberculina, 29,4% e 24,3% (AKCAY et al., 2003; CENGIZ; SEKER, 2006).

O teste intradérmico, usando antígenos purificados de *Leishmania chagasi* também é utilizado para o diagnóstico da forma assintomática de leishmaniose visceral em áreas endêmicas (NASCIMENTO et al., 2005). Estudos com testes cutâneos repetidos em população de área endêmica e não endêmica para leishmaniose visceral também demonstraram o fenômeno *booster* com aumento na positividade entre o primeiro teste e os posteriores (BORGES et al., 2003; CALDAS et al., 2010).

O aumento na induração entre o primeiro teste cutâneo para um segundo pode ser atribuído a uma conversão ou ao fenômeno *booster* (MENZIES, 1999; MANDALAKAS et al., 2008). Contudo, *booster* ocorre quando a induração do teste cutâneo após a retestagem existe na ausência de uma nova infecção (THOMPSON et al., 1979; MENZIES, 1999; AKCAY et al., 2003) . Neste trabalho, o segundo teste foi realizado após 10 a 15 dias da aplicação inicial, os participantes do estudo

mantiveram seus endereços, atividades profissionais e hábitos pessoais, o que sugere que não houve infecção após a primeira aplicação e que o fato observado é decorrente da presença fenômeno *booster*. O pequeno período de tempo entre os testes, também garante que qualquer fator do hospedeiro presente no primeiro teste continuará presente durante o último (THOMPSON et al., 1979).

A frequência do fenômeno *booster* para a tuberculina aumenta com a idade e é prevalente entre a população vacinada com o BCG (DORKEN; GRZYBOWSKI; ALLEN, 1987; WANG, 2000) contudo não existe vacina para paracoccidiodomicose, o que exclui uma possível interferência no desenvolvimento do fenômeno. Neste trabalho a média de idade dos indivíduos que apresentaram o fenômeno *booster* positivo foi de 47,7 anos, e 31,6 anos, a média de idade daqueles que não apresentaram este fenômeno.

Na tuberculose, a realização de dois testes cutâneos com tuberculina pode ser uma ferramenta eficaz para minimizar o efeito *booster* permitindo assim um acompanhamento preciso das taxas de conversão subsequentes (CENGIZ; SEKER, 2006). Da mesma forma, na infecção paracoccidíidica, a realização de dois testes cutâneos a gp43 também é útil para diminuir as chances de diagnosticar indivíduos falso-negativos.

A variação biológica na resposta cutânea a tuberculina, diferenças na administração e na leitura do teste, irá resultar em um desvio padrão de menos de 3mm (FURCOLOW et al., 1967; ERDTMANN; DIXON; LLEWELLYN, 1974; BEARMAN et al., 1964; CHAPARAS et al., 1985). Isto significa que quando testes tuberculínicos repetitivos são administrados, chance de variação pode resultar numa diferença menor do que 6mm (dois desvio-padrão) em 95% dos sujeitos (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 1990). Isto sustenta a adoção de 6mm como critério para distinguir aumento no tamanho da induração devido a variação do fenômeno biológico verdadeiro, o qual pode ser tanto conversão quanto *booster* (MENZIES, 1999).

Neste trabalho a média das diferenças entre as leituras do primeiro teste cutâneo para o segundo foi de 1,32mm com desvio padrão de 3,20mm. Adotando o critério utilizado para a tuberculina de dois desvio-padrão pode-se sugerir que o fenômeno *booster* no teste cutâneo com a gp43 deve ser considerado positivo quando a diferença nas leituras for superior a 6,0mm.

A detecção do fenômeno *booster* levará a uma diminuição no número de resultados falsos-negativos no teste cutâneo a tuberculina (CDC, 1995), sendo assim, é possível sugerir que essa realidade também se aplica a infecção paracoccidióidica.

Os resultados do presente estudo demonstram uma elevada prevalência da infecção paracoccidióidica em assentamentos rurais no estado do Mato Grosso do Sul. Evidencia a exposição precoce das crianças ao fungo na região estudada indicando a importância de se estabelecer mecanismos de diagnóstico precoce e seguro da doença para que o tratamento seja instituído com maior rapidez e eficiência.

Além disso, é possível observar a ocorrência do fenômeno *booster* no teste cutâneo a gp43 revelando indivíduos que são inicialmente identificados como negativos. Este fato mostra que a infecção paracoccidióidica na região estudada é subestimada, revelando taxas maiores de prevalência desta infecção.

Por este estudo, o primeiro que avaliou a ocorrência do fenômeno *booster* no teste intradérmico para detecção da infecção paracoccidióidica, sugere-se que a positividade seja considerada quando ocorrer um incremento de 6mm em relação ao primeiro teste.

7 CONCLUSÕES

Quase metade dos moradores dos assentamentos rurais do município de Jaraguari estão infectados pelo *P. brasiliensis* – 45,8%.

Existe diferença nas taxas de prevalência entre os assentamentos, com variação de 23,4% a 70,3%.

O risco de infecção paracoccidióidica aumenta com a idade.

Nenhum outro fator estudado esteve associado ao risco de infecção.

Este estudo identificou pela primeira vez a ocorrência do fenômeno *booster* na intradermorreação com gp43, em uma taxa estimada de 8,4%, o que amplifica a estimativa de prevalência da infecção para 54,2%.

Considerando a média das diferenças entre o primeiro e o segundo teste cutâneo e dois desvios-padrão de 3,20mm, sugere-se como efeito *booster* positivo uma diferença de 6mm entre as leituras.

A gp43, antígeno específico do *P. brasiliensis*, deveria ser considerada como antígeno padrão a ser utilizado nos testes cutâneos para diagnóstico de infecção paracoccidióidica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Mecanismos efetores das reações imunes mediadas por linfócitos T. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia Celular e Molecular*. 2 ed. Rio de Janeiro: Revinter; 1994. p.277-94.

Actor JK. Resposta imunológica adaptativa e hipersensibilidade. In: Actor JK. *Imunologia e Microbiologia*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007. p. 55-61.

Aguiar ESA. Prevalência da infecção pelo *Histoplasma capsulatum* e pelo *Paracoccidioides brasiliensis* em escolares, granjeiros e população indígenas da região de Sidrolândia – MS (tese). Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz; 2000.

Akcay A, Erdem Y, Altun B, Usalan C, Agca E, Yasavul U, et al. The booster phenomenon in 2-step tuberculin skin testing of patients receiving long-term hemodialysis. *Am J Infect Control*. 2003; 31(6):371-4.

Almeida SR, Moraes JZ, Camargo ZP, Gesztesi JL, Mariano M, Lopes JD. Pattern of immune response to gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* in susceptible and resistance mice is influenced by antigen-presenting cells. *Cell Immunol*. 1998; 190:68-76.

Almeida SR, Lopes JD. The low efficiency of dendritic cells and macrophages from mice susceptible to *Paracoccidioides brasiliensis* in inducing a Th1 response. *Braz J Med Biol Res*. 2001; 34(4):529-37.

Almeida Soares CM, Mendes-Giannini MJ, Felipe MS, Chaturvedi V. A centennial: Discovery of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia*. 2008; 165(4):179-81.

Almeida OP, Jacks JJr, Scully C. Paracoccidioidomycosis of the mouth: an emerging deep mycosis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003; 14(4):168-74.

Ameen M, Talhari C, Talhari S. Advances in paracoccidioidomycosis. *Clin and Exp Dermatol*. 2009; 35:576-80.

American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis*. 1990; 142(3):725-35.

Amin NM. Tuberculin skin testing. Can it contain the impending tuberculosis epidemic? *Postgrad Med*. 1994; 95(4):46-52.

Ayres MAJM, Ayres DL, Santos AAS. BioEstat. Aplicações estatísticas das Ciências Bio-Médicas (programa de computador). Versão 5.0. Belém (PA): Sociedade Mamirauá; 2007. 2007.

Bagagli E, Sano A, Coelho KI, Alquatis S, Miyaji M, Camargo ZP, et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Hyg*. 1998; 58(4):505-12.

Bagagli E, Bosco SMG, Theodoro RC, Franco M. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explains several biological features of the pathogen. *Infec Genet Evol*. 2006; 6:344-51.

Bagagli E, Theodoro RC, Bosco SMG, McEwen JG. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. *Mycopathologia*. 2008; 165:197-207.

Bass Jr JB, Serio RA. The use of repeat skin tests to eliminate the booster phenomenon in serial tuberculin testing. *Am Rev Respir Dis*. 1981; 123:394-6

Batista Junior J, Berzaghi R, Arnaud ADMM, Fontes CJF, Camargo ZP, Hahn RC. Simultaneous infection of human host with genetically distinct isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010; 105(1):62-5.

Bearman JE, Kleinman H, Glycer VV, Lacroix OM. A Study of Variability in Tuberculin Test Reading. *Am Rev Respir Dis*. 1964; 90:913-9.

Benard G, Hong MA, Del Negro GMB, Batista I, Shikanai-Yasuda MA, Duarte AJS. Antigen-specific immunosuppression in Paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg*. 1996; 54:7-12.

Benard G, Duarte AJS. 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):1032-39.

Benard G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 2008; 165:209-221.

Berzaghi R, Silva SHM, Camargo ZP. Variable gp43 secretion by *Paracoccidioides brasiliensis* clones obtained by two different culture methods. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(1):491-3.

Bicalho RN, Espírito Santo MF, Ferreira de Aguiar MC, Santos VR. Oral paracoccidioidomycosis: a retrospective study of 62 Brazilian patients. *Oral Dis.* 2001; 7:56-60.

Blotta MHSL, Camargo ZP. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 1993; 31(3):671-6.

Blotta MHSL, 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; 72:248-54.

Boily P. Individual variation in metabolic traits of wild nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*), and the aerobic capacity model for the evolution of endothermy. *J Exp Biol.* 2002; 205:3207-14.

Borges VC, Ruiz MC, Gomes PM, Colombo AR, Silva LA, Romero HD, et al. Montenegro intradermoreaction after the test sequential repetitions in Porteirinha, Minas Gerais State, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003; 36(2):249-51.

Brummer E, Castañeda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev.* 1993; 6(2):89-117.

Buitrago MJ, Bernal-Martínez I, Castelli MV, Rodríguez-Tudeka JI, Cuenca-Estrella M. Histoplasmosis and paracoccidioidomycosis in a non-endemic area: a review of cases and diagnosis. *J Travel Med.* 2011; 18(1):26-33.

Cadavid D, Restrepo A. Factors associated with *Paracoccidioides brasiliensis* infection among permanent residents of three endemic areas in Colombia. *Epidemiol Infect.* 1993; 111(1):121-33.

Calcagno AM, Niño-Vega G, San-Blas F. Geographic discrimination of *Paracoccidioides brasiliensis* strains by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(6):1733-6.

Caldas AJM, Aquino DMC, Ferreira NV, Silva MAP, Silva EL, Costa ASA, Barral AP. Avaliação imunológica da intradermoreação de Montenegro. *Rev Pesq Saúde.* 2010;11(2):9-13.

Calich VL, Kashino SS. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Braz J Med Biol Res.* 1998; 31(5):615-23.

Camacho GR, Perea-Milla E, González JR, Frías JP. Interpretation of a serial Mantoux test taking into account the annual risk of tuberculous infection. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2009; 13(2):196-200.

Camargo ZP, Unterkircher C, Campoy SP, Travassos LR. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. *J Clin Microbiol.* 1988; 26(10):2147-51.

Camargo ZP, Taborda CP, Rodrigues EG, Travassos LR. The use of cell free antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* serological tests. *J Med Vet Mycol.* 1991; 29:31-8.

Camargo ZP, Franco MF. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev Iberoam Micol.* 2000; 17:41-8.

Camargo ZP. Serology of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 2008; 165:289-302.

Cano LE, Kashino SS, Arruda C, Andre D, Xidieh CF, Singer-Vermes LM, et al. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect Immun.* 1998; 66(2):800-6.

Canteros CE, Madariaga MJ, Lee W, Rivas MC, Davel G, Iachini R. Agentes de micosis endémicas en un area de Argentina: estudio seroepidemiológico en perros. *Rev Iberoam Micol.* 2010; 27(1):14-9.

Carandina L, Magaldi C. Inquérito sobre blastomicose sul-americana pela intradermo reação em uma comunidade rural do município de Botucatu, SP (Brasil). *Rev Saúde Publ S Paulo.* 1974; 8(2):171-80.

Cauthen GM, Snider Jr DE, Onorato IM. Boosting of tuberculin sensitivity among Southeast Asian refugees. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994; 149(6):1597-600.

Carvalho KC, Ganiko L, Batista WL, Morais FV, Marques ER, Goldman GH, et al. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* and gp43 expression in isolates bearing known PbGp43 genotype. *Microbes Infect.* 2005; 7(1):55-65.

Cengiz K, Seker A. Boosted tuberculin skin testing in hemodialysis patients. *Am J Infect Control.* 2006; 34(6):383-7.

Centers for Disease Control and Prevention. Screening for tuberculosis and tuberculosis infection in high-risk population recommendations of the advisory council for the elimination of tuberculosis. *Morb Mortal Wkly Rep.* 1995; 44(RR-11):18-34.

Centers for Disease Control and Prevention. Division of Public Health Surveillance and Informatics. *Epi Info*, versão 3.5.1. 13 agosto 2007 acesso em 20 ago 2007. Disponível em <http://www.cdc.gov>

Cermeño JR, Cermeño JJ, Hernández I, Godoy G, Cermeño JJ, Cabello I, et al. Histoplasmine and paracoccidioidine epidemiological study in Upata, Bolívar state, Venezuela. *Trop Med Intern Health.* 2005; 10(3):216-9.

Cermeño J, Cermeño J, Godoy G, Hernández I, Orellán Y, Blanco Y, et al. Epidemiological study of paracoccidioidomycosis and histoplasmosis in a suburb of San Félix city, Bolívar state, Venezuela. *Invest Clin.* 2009; 50(2):213-20.

Chaparas SD, Vandiviere HM, Melvin I, Koch G, Becker C. Tuberculin test. Variability with the Mantoux procedure. *Am Rev Respir Dis.* 1985; 132(1):175-7.

Chiarella AP, Arruda C, Pina A, Costa TA, Ferreira RCV, Calich VLG. The relative importance of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in immunity to pulmonary paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect.* 2007; 9:1078-88.

Cisalpino PS, Puccia R, Yamauchi IM, Cano MIN, Silveira JF, Travassos LR. Cloning, characterization, and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Biol Chem.* 1996; 271(8):4553-60.

Conti Díaz IA. On the unknown ecological niche of *Paracoccidioides brasiliensis* our hypothesis of 1989: present status and perspectives. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2007; 49(2):131-4.

Corte AC, Svoboda WK, Navarro IT, Freire RL, Malanski LS, Shiozawa MM, et al. Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Paraná State, Brazil. Mycopathologia. 2007; 164:225-8.

Corte AC, Itano EN, Freire RL, Camargo ZP, Ono MA. Detecção de anticorpos para *Paracoccidioides brasiliensis* em cavalos da região norte do Estado do Paraná. Semina: Ciências Agrárias. 2009; 30(2):441-6.

Coutinho FZ, Silva D, Lázera M, Petri V, Oliveira RM, Sabroza PC, et al. Paracoccidioidomycosis mortality en Brazil (1980-1995). Cad Saúde Pública. 2002; 18(5):1441-54.

Del Negro GB, Gonçalves EG. Diagnóstico laboratorial e radiológico. In: Focaccia R. Veronesi Tratado de Infectologia. 3 ed. São Paulo: Atheneu; 2005. p. 1389-95.

De March-Ayuela P. Choosing an appropriate criterion for true or false conversion in serial tuberculin testing. Am Rev Respir Dis. 1990; 141(4):815-20.

Denis M. Interferon-gamma treated murine macrophages inhibit growth of tubercle bacilli via generation of reactive nitrogen intermediates. Cell Immunol. 1991; 132:150-7.

Diógenes MJN, Gonçalves HMG, Mapurunga ACP, Alencar NF, Andrade FB, Nogueira-Queiroz. Reações à histoplasmina e paracoccidioidina na Serra do Pereiro (Estado do Ceará – Brasil). *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 1990; 32(2):116-20.

Dipiro JT. Cytokine networks with infection: mycobacterial infections, leishmaniasis, human immunodeficiency virus infection, and sepsis. *Pharmacotherapy*. 1997; 17:205-10.

Dorken E, Grzybowski S, Allen EA. Significance of the tuberculin test in the elderly. *Chest*. 1987; 92(2):237-40.

Erdtmann FJ, Dixon KE, Llewellyn CH. Skin testing for tuberculosis. Antigen and observer variability. *JAMA*. 1974; 228(4):479-81.

Fava SDC, Fava Netto C. Epidemiologic surveys of histoplasmin and paracoccidioidin sensitivity in Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 1998; 40(3):155-64.

Fava Netto C, Raphael A. A reação intradérmica com polissacáride do *Paracoccidioides brasiliensis*, na blastomicose sul-americana. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 1961; 31:161-5.

Fava Netto C. Imunologia da paracoccidioidomicose. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 1976; 18(1):42-53.

Fava Netto C, Guerra MAG, Costa EO. Contribuição ao estudo imunológico da paracoccidioidomicose. Reações intradérmicas com dois antígenos homólogos e dois heterólogos. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 1976; 18:186-190.

Feitosa LS, Cisalpino PS, Santos MRM, Mortara RA, Barros TF, Morais FV, et al. Chromosomal polymorphism, syntenic relationships, and ploidy in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal, Genet Biol.* 2003; 39:60-9.

Ferebee SH. Controlled chemoprophylaxis trials in tuberculosis. A general review. *Bibl Tuberc.* 1970; 26:28-106.

Ferreira KS, Lopes JD, Almeida SR. Regulation of T helper cell differentiation in vivo by gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* provided by different antigen-presenting cells. *Scan J Immunol.* 2003; 58:290-7.

Fontana FF, Santos CTB, Esteves FM, Rocha A, Fernandes GF, Amaral CC, et al. Seroepidemiological survey of paracoccidioidomycosis infection among urban and rural dogs from Uberaba, Minas Gerais, Brasil. *Mycopathologia.* 2010; 169:159-65.

Fonseca ERS, Pardal PPO, Severo SC. Paracoccidioidomicose em crianças em Belém do Pará. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1999; 32(1):31-3.

Fornajeiro N, Maluf MLF, Takahachi G, Svidzinski TIE. Inquérito epidemiológico sobre a paracoccidioidomicose utilizando a gp43 em dois municípios do noroeste do Paraná, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005; 38(2):191-3.

Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Mota, NG. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1987; 20:129-32.

Franco M, Mendes RP, Moscardi-Bacchi M, Rezkallah-Iwasso MT, Montenegro MR. Paracoccidioidomycosis. *Baillieres Clin Trop Commun Dis* 1989; 4:185-220.

Franco M, Bagagli E, Scapolio S, da Silva Lacaz C. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. *Med Mycol.* 2000; 38(3):185-91.

Furcolow ML, Watson KA, Charron T, Lowe J. A comparison of the tine and Mono-Vacc tests with the intradermal tuberculin test. *Am Rev Respir Dis.* 1967; 96(5):1009-27.

Garcia NM, Del Negro GM, Heins-Vaccari EM, Melo NT, Assis CM, Lacaz CS. *Paracoccidioides brasiliensis*, a new sample isolated from feces of a penguin (*Pygoscelis adeliae*). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1993; 35(3):227-35.

Hanna SA, Silva JLM, Mendes-Giannini MJS. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. *Microbes Infect.* 2000; 2(8):877-84.

Hotez PJ, Bottazzi ME, Franco-Paredes C, Ault SK, Periago MR. The neglected tropical disease of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *Plos Negl Trop Dis.* 2008; 2(9):1-11.

Horré R, Schumacher G, Alpers K, Seitz HM, Adler S, Lemmer K, et al. A case of imported paracoccidioidomycosis in a German legionnaire. *Med Mycol.* 2002; 40(2): 213-16.

Huffnagle GB, Deepe Jr GS. Innate and adaptive determinants of host susceptibility to medically important fungi. *Curr Opin Microbiol.* 2003; 6:344-50.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades. Acesso em 05 fev 2011.
Disponível em <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm>

Infante-Duarte C, Kamradt T. TH1/TH2 infection. Springer Semin. Immunopathol. 1999; 21:317-38.

Kalmar EMN, Alencar FEC, Alves FP, Pang LW, Del Negro GMB, Camargo ZP, et al. Paracoccidioidomycosis: an epidemiologic survey in a pediatric population from the Brazilian amazon using skin tests. Am J Trop Med Hyg. 2004; 71(1): 82-6.

Klein CH, Bloch KV. Estudos seccionais. In: Medronho RA, Bloch KV, Luiz RR, Werneck GL. Epidemiologia. São Paulo: Atheneu; 2009; 2.ed. p. 193-213.

Kraut A, Coodin M, Plessis R, McLean D. Predictors of positive tuberculin skin test (TST) results after 2-step TST among health care workers in Manitoba, Canada. CID. 2004; 39:113-8.

Kuchroo VVK, Das MP, Brown JA, Ranger AM, Zamvil SS, Sobel RA, et al. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 development pathways: application to autoimmune disease therapy. Cell. 1995; 80:707-18.

Lifson AR, Grant SM, Lorvick J, Pinto FD, He H, Thompson S, et al. Two-step tuberculin skin testing of injection drug users recruited from community-based settings. Int J Tuberc Lung Dis. 1997; 1(2):128-34.

Lincoln EM, Gilbert LA, Morales SM. Chronic pulmonary tuberculosis in individuals with known previous primary tuberculosis. Dis Chest. 1960; 38:473-82.

Lindenberg AS, Chang MR, Paniago AMM, Lazera MS, Moncada PM, Bonfim GF, et al. Clinical and epidemiological features of 123 cases of cryptococcosis in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2008; 50(2):75-8.

Lloyd AV. Tuberculin test in children with malnutrition. *Br Med J*. 1968; 31;(5617):529-31.

Londero AT, Ramos CD. Estudo clínico e micológico de 260 casos observados no interior do estado do Rio Grande do Sul. *J Pneumol*. 1990; 16:129-32.

Mamoni RL, Blotta MH. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. *Cytokine*. 2005; 32:20-9.

Mandalakas AM, Kirchner HL, Zhu X, Yeo KT, Starke JR. Interpretation of repeat tuberculin skin testing in international adoptees: conversions or boosting. *Pediatr Infect Dis J*. 2008; 27(10):913-9.

Mangiaterra M, Alonso A, Galvan M, Giusiano G, Gorodner J. Histoplasmin and paracoccidioidin skin reactivity in infantile population of northern Argentina. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1996; 38(5): 349-53.

Marques da Silva SH, Colombo AL, Blotta MHSL, Queiroz-Telles F, Lopes JD, Camargo ZP. Diagnosis of neuroparacoccidioidomycosis by detection of circulating antigen and antibody in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(9):4680-3.

Marques da Silva SH, Colombo AL, Blotta MHSL, Queiroz-Telles F, Balthazar AB, Lopes JD, et al. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by detection of antigen and antibody in bronchoalveolar lavage fluid. *Clin Vaccine Immunol*. 2006; 13(12):1363-6.

Martinez R, Moya MJ. Associação entre paracoccidioidomicose e alcoolismo. *Rev Saude Publ S Paulo*. 1992; 26(1):12-6.

Martinez R, Vitali LH, Henriques JHS, Machado AA, Albernaz A, Lima AA. Inquérito soropidemiológico para infecções por fungos causadores de micoses sistêmicas na Reserva Indígena Xacriabá, Estado de Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; 35(4):347-50.

Martinez R. Etiopatologia e Ecologia. In Focaccia R. Veronesi Tratado de Infectologia. 3 ed. São Paulo: Atheneu. 2005. p. 1371-3.

Martinez, R. Paracoccidioidomycosis: the dimension of the problem of a neglected disease. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010; 43(4):480.

Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol*. 2006; 23(1):65-73.

Mayr A, Kirchmair M, Rainer J, Rossi R, Kreczy A, Tintelnot K, et al. Chronic paracoccidioidomycosis in a female patient in Austria. *Eur J Clin Microb Infect Dis*. 2004; 23(12):916-19.

McLeod R, Buschman E, Arbuckle LD, Skamene, E. Immunogenetics in the analysis of resistance to intracellular pathogens. *Curr Opin Immunol*. 1995; 7(4):539-52.

Mendes-Giannini MJS, Bueno JP, Shikanai-Yasuda MA, Ferreira AW, Masuda A. Detection of the 43,000-molecular-weight glycoprotein in sera of patients with paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol*. 1989; 27(12): 2842-5.

Mendes-Giannini MJS, Moraes RA, Ricci TA. Proteolytic activity of the 43,000 molecular weight antigen secreted by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 1990; 32(5):384-5.

Mendes-Giannini MJS, Del Negro GM, Siqueira AM. Serodiagnosis. In: Franco MF, Lacaz CS, Restrepo A, Del Negro G. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton: CRC Press; 1994. P. 345-63.

Mendes-Giannini MJS, Silva JLM, Silva JF, Donofrio FC, Miranda ET, Andreotti PF, Soares CP. Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: recent advances. *Mycopathologia*. 2008; 165:237-48.

Mendes RP, Shikanai-Yasuda MA. Paracoccidioidomycose. In: Cimerman S, Cimerman B. *Medicina Tropical*. São Paulo: Atheneu; 2003. p. 505-45.

Mendes RP. Quadro clínico. In: Focaccia R. *Veronesi Tratado de Infectologia*. 3 ed. São Paulo: Atheneu; 2005. p. 1381-88.

Menzies D. Interpretation of repeated tuberculin tests. Boosting, conversion, and reversion. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999; 159(1):15-21.

Miura CSN, Lopes JD, Estevão D, Itano EN. Levels of specific antigen (gp43), specific antibodies, and antigen-antibody complexes in saliva and serum of paracoccidioidomycosis patients. *Medical Mycology*. 2001; 39(5):423-8.

Molinari-Madlun EE, Felipe MS, Soares CM. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates can be correlated to groups defined by random amplified polymorphic DNA analysis. *Med Mycol*. 1999; 37(4):269-76.

Naiff RD, Ferreria LCL, Barret TV, Naiff MF, Arias JR. Paracoccidioidomicose enzoótica em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no estado do Pará. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 1986; 28:19-27.

Nascimento MDSB, Souza EC, Silva LM, Leal PC, Cantanhede KL, Bezerra GFB, et al. Prevalence of infection by *Leishmania chagasi* using ELISA (rK39 and CRUDE) and the Montenegro skin test in an endemic leishmaniasis area of Maranhão, Brazil. *Cad Saude Publica*. 2005; 21(6):1801-7.

Neves SL, Petroni TF, Fedatto PF, Ono MA. Paracoccidioidomicose em animais silvestres e domésticos. *Semina: Ciências Agrárias*. 2006; 27(3):481-8.

Niño-Vega GA, Calcagno AM, San-Blas G, San-Blas F, Gooday GW, Gow NA. RFLP analysis reveals marked geographic isolation between strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol*. 2000; 38(6):437-41.

Ogawa T, Uchida H, Kusomoto Y, Mori Y, Yamamura Y, Hamada S. Increase in tumor necrosis factor alpha-and interleukin-6-secreting cells in peripheral blood mononuclear cells from subjects infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun*. 1991; 59(9):3021-5.

Oliveira SMVL, Paniago AMM, Honner MH, Aguiar ES, Cunha RV. Booster effect on tuberculin skin tests at a university hospital in the Mato Grosso do Sul. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*. 2008; 33(1):72-6.

Oliveira SMVL. Tuberculose latente e prova tuberculínica: estudo epidemiológico em Mato Grosso do Sul (Tese). Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2011.

Oliveira GG, Silveira LH, Itano EN, Soares RM, Freire RL, Watanabe MAE, et al. Serological evidence of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in chickens from Paraná and Mato Grosso do Sul states, Brazil. *Mycopathologia*. 2011; 171:197-202.

Oliveira SJ, Mamoni EL, Musatti CC, Papaiordanou PM, Boltta MH. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparasion with infected and non-infected controls. *Microbes Infect*. 2002; 4:139-44.

Ono MA, Itano EN, Mizuno LT, Mizuno EH, Camargo ZP. Inhibition of *Paracoccidioides brasiliensis* by pesticides: is this a partial explanation for the difficulty in isolating this fungus from the soil? *Med Mycol*. 2002; 40(5):493-9.

Orme IM, Roberts AD, Griffin JP, Abrams JS. Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol*. 1993; 151(1): 518-25.

Paniago AMM, Aguiar JI, Aguiar ES, Cunha RV, Pereira GROL, Londero AT, et al. Paracoccidioidomycose: estudo clínico epidemiológico de 422 casos observados no Estado de Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003; 36(4):455-9.

Paniago AMM, de Freitas AC, Aguiar ES, Aguiar JI, da Cunha RV, Castro AR, et al. Paracoccidioidomycosis in patients with human immunodeficiency virus: review of 12 cases observed in an endemic region in Brazil. [J Infect.](#) 2005; 51(3):248-52.

Pereira RM, Bucarechi F, Barison EM, Hessel G, Tresoldi AT. Paracoccidioidomycosis in children: clinical presentation, follow-up and outcome. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 2004; 46(30):127-31.

Prado M, Silva MB, Laurenti R, Travassos LR, Tabora CP. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104(3):513-21.

Prefeitura Municipal de Jaraguari. (acesso em 10 mai 2011). Disponível em: http://www.jaraguari.ms.gov.br/index.php?pagina=jaraguari-cidade#ver_dados

Puccia R, Schenkman S, Gorin PAJ, Travassos LR. Exocellular componentes of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. *Infect Immun.* 1986; 53(1):199-206.

Puccia R, Travassos LR. 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo disease. *J Clin Microbiol.* 1991; 29(8):1610-5.

Ramos SP, Sano A, Ono MA, Camargo, Estevão D, Miyaji M, et al. Antigenuria and antigenemia in experimental murine paracoccidioidomycosis. *Med Mycol.* 2005; 43: 631-6.

Ramos-E-Silva M, Saraiva LE. Paracoccidioidomycosis. *Dermatol Clin.* 2008; 26:257-69.

Rebelatto CLK. Estudo da associação entre antígenos HLA-ABC, CD e DQ e a paracoccidioidomicose infecção. (Dissertação de Mestrado). Curitiba: Universidade Federal do Paraná.

Restrepo-Moreno A, Schneidau JD. Nature of the skin-reactive principle in culture filtrates prepared from *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bact.* 1967; 93(6):1741-8.

Restrepo A, Salazar ME, Cano IE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance off emales to paracoccidioidomycosis. *Infect Immun.* 1984; 46(2):346-53.

Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia.* 1985; 23(5):323-34.

Restrepo A. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo A, Del Negro G. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton: CRC Press; 1994. p. 121-30.

Restrepo A, McEwen JG, Castañeda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol.* 2001; 39(3):233-41.

Restrepo A, Tobón A. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and practice of infectious diseases. Philadelphia. 2005; p. 3062-8.

Restrepo A, Benard G, Castro CC, Agudelo CA, Tobón AM. Pulmonary paracoccidioidomycosis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2008; 29:182-97.

Ribeiro LC, Hahn RC, Favalessa OC, Tadano T, Fontes CJF. Micoses sistêmicas: fatores associados ao óbito em pacientes com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, Cuiabá, Estado de Mato Grosso, 2005-2008. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009; 42(6):698-705.

Ricci G, Mota FT, Wakamatsu A, Serafim RC, Borra RC, Franco M. Canine paracoccidioidomycosis. *Med Mycol*. 2004; 42(4):379-83.

Richini-Pereira VB, Bosco SMG, Theodoro RC, Macoris SAG, Bagagli E. Molecular approaches for eco-epidemiological studies of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104(4):636-43.

Rivitti EA, Aoki V. Deep fungal infections in tropical countries. *Clin Dermatol*. 1999; 17:171-90.

Rodrigues EG, Travassos LR. Nature of the reactive epitopes in *P. brasiliensis* polysaccharide antigen. *J Med Vet Mycol*. 1994; 32:77-81.

Sadahiro A, Diogo CL, Oshiro TM, Shikanai-Yasuda MA. Kinetics of IFN- γ , TNF- α , IL-10 and IL-4 production by mononuclear cells stimulated with gp43 peptides, in

patients cured of paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007; 40(2):156-62.

Salles CG, Rufino-Netto A, Lapa e Silva JR, Kritski AL, Cailleaux-Cesar M, Queiroz-Mello FC, et al. The presence of a booster phenomenon among contacts of active pulmonar tuberculosis cases: a retrospective cohort. *BCM Public Health.* 2007; 7:38.

San Blas G, San Blas F. Biochemistry of *P. brasiliensis* dimorphism. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo A, Del Negro G. *Paracoccidioidomycosis.* Boca Raton: CRC Press; 1993. p. 49- 66.

Sano A, Defaveri J, Tanaka R, Yokoyama K, Kurita N, Franco M, et al. Pathogenicities and gp43kDa gene of three *Paracoccidioides brasiliensis* isolates originated from a nine-banded armadillo (*Dasypus novemcintus*). *Mycopathologia.* 1998a; 144:61-5.

Sano A, Tanaka R, Yokoyama K, Franco M, Bagagli E, Montenegro MR, et al. Comparison between human and armadillo *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. *Mycopathologia.* 1998b; 143:165-9.

Santos WA, Silva BM, Passos ED, Zandonade E, Falqueto A. Associação entre tabagismo e paracoccidioidomicose: um estudo de caso-controle no Estado do Espírito Santo, Brasil. *Cad Saúde Pública* 2003; 19(1):245-53.

Saraiva ECO, Altemani A, Franco MF, Unterkircher CS, Camargo ZP. *Paracoccidioides brasiliensis*-gp43 used as paracoccidioidin. *J Med Vet Mycol.* 1996; 34(3):144-61.

Sarti ECFB, Oliveira SMVL, Santos LF, Camargo ZP, Paniago AMM. Paracoccidioidal Infection in HIV Patients at an Endemic Area of Paracoccidioidomycosis in Brazil. *Mycopathologia*. 2011. acesso em 12 jan 2012. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/b6018j8n6l735452/>

Shikanai-Yasuda MA. Pharmacological management of paracoccidioidomycosis. *Expert Opin Pharmacother*. 2005; 6:385-97.

Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho FQ, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. Guidelines in paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006; 39(3):297-310.

Silva SS, Paes HC, Soares CMA, Fernandes L, Felipe MSS. Insights into the pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis* from transcriptome analysis – advances and perspectives. *Mycopathologia*. 2008; 165:249-58.

Silva-Vergara ML. Contribuição ao estudo epidemiológico da paracoccidioidomicose: estudo em area de cultura de café. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1997; 30(1): 83-6.

Silva-Vergara ML, Martínez R. Inquérito epidemiológico com paracoccidioidina e histoplasmina em area agrícola de café em Ibiá, Minas Gerais, Brasil. *Rev Iberoam Micol*. 1998; 15:294-7.

Silva-Vergara ML, Martinez R, Camargo ZP, Malta MH, Maffei CM, Chadu, JB. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcintus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. *Med Mycol*. 2000; 38(3): 193-9.

Silveira LH, Domingos IH, Kouchi K, Itano EN, Silva EA, Landgraf VO, et al. Serological detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in dogs with leishmaniasis. *Mycopathologia*. 2006; 162: 325-9.

Silveira LH, Paes RCS, Medeiros EV, Itano EN, Camargo ZP, Ono MA. Occurrence of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in dairy cattle from Mato Grosso do Sul, Brasil. *Mycopathologia*. 2008; 165:367-71.

Simões IB, Marquez SA, Bagagli E. Distribution of paracoccidioidomycosis: determination of ecological correlates through spatial analyses. *Medical Mycology*. 2004; 42:517-23.

Singer-Vermes LM, Ciavaglia MC, Kashino SS, Burger E, Calich VLG. Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among dissemination of infection, humoral and cellular immune responses. *Clin Exp Immunol*. 1993; 94:75-9.

Soares AMVC, Silva WB, Rodrigues DR, Calvi SA, Peraçoli MTS, Kurokawa CS. IL-10 but not TGF-beta inhibits *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human activated monocytes. *Ann Rev Biomed Sci. Special Issue* 2002; 4:89.

Somensi DC, Somensi CC, Itano EN, Camargo ZP, Oliveira OLP. A utilização da gp43 de *Paracoccidioides brasiliensis* em testes intradérmicos na região de Londrina-PR. *Revista Farmácia Química*. 1997;29:14-8.

Steiner P, Rao M, Victoria MS, Jabbar H, Steiner M. Persistently negative tuberculin reactions: their presence among children with culture positive for *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculin-negative tuberculosis). *Am J Dis Child*. 1980; 134(8):747-50.

Straus AH, Freymüller E, Travassos LR, Takahashi HK. Immunochemical and subcellular localization of the 43kDa glycoprotein antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* with monoclonal antibodies. J Med Vet Mycol. 1996; 34(3):181-6.

Taborda CP, Juliano MA, Puccia R, Franco M, Travassos LR. Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th1-response protective against fungal infection in BALB/c mice. Infect Immun. 1998; 66(2):786-93.

Tatibana BT, Sano A, Uno J, Mikami Y, Miyaji M, Nishimura K, et al. Resposta imune humoral na paracoccidioidomicose experimental em camundongos ddY. Semina: Ciências Agrárias. 2007; 28(2):287-94.

Teixeira EG, Kritski A, Ruffino-Netto A, Steffen R, Lapa ESJR, Belo M, et al. Two-step tuberculin skin test and booster phenomenon prevalence among Brazilian medical students. Int J Tuberc Lung Dis. 2008; 12(12):1407-13.

Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJ, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. Mol Phylogenet Evol. 2009; 52(2):273-83

Terçarioli GR, Bagagli E, Reis GM, Theodoro RC, Bosco SMG, Macoris SAG, et al. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. BMC Microbiol. 2007; 7:92.

Thompson NJ, Glassroth JL, Snider Jr DE, Farer LS. The booster phenomenon in serial tuberculin testing. Am Rev Respir Dis. 1979; 119(4):587-97.

Terr IA. Inflamação. In: Parslow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB. *Imunologia Médica*. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanagara Koogan; 2004. p. 163-75.

Tichellio AG, Mangiaterra M, Giusiano G. Paracoccidioidomycosis en la provincia de Formosa, Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2008; 40(1):24-9.

Travassos LR, Puccia R, Cisalpino P, Taborda CP, Rodrigues EG, Rodrigues MM, et al. Biochemistry and molecular biology of the main diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch Med Res*. 1995; 26:297-307.

Trejo-Cháves A, Ramíres-Romero R, Ancer-Rodríguez J, Nevárez-Garza AM, Rodríguez-Tovar LE. Disseminated paracoccidioidomycosis in a southern two-toed sloth (*Choloepus didactylus*). *J. Comp Path*. 2011; 144:231-4.

Ulrich M, Convit J, Centeno M, Rapetti M. Immunological characteristics of the armadillo, *Dasypos sabanicola*. *Clin Exp Immunol*. 1976; 25:170-6.

Unterkircher CS, Leão MVP, Blotta MHSL, Camargo ZP. Natural antibodies in paracoccidioidomycosis. *Braz J Microbiol* 2004; 35:59-63.

Valle AC, Costa RL, Monteiro PC. Interpretation and clinical correction of serological tests in paracoccidioidomycosis. *Med Mycol*. 2001; 39:373-7.

Van Gelderen de Komaid A, Durán EL. Histoplasmosis in the northwestern Argentina II. Prevalence of histoplasmosis capsulati and paracoccidioidomycosis in the population South of Chuscha, Gonzalo and Potrero in yhe province of Tucumán. *Mycopathologia*. 1995; 129:17-23.

Van Gelderen de Komaid A, Durán EL, Kestelman LB. Histoplasmosis and paracoccidioidomycosis in northwestern Argentina III. Epidemiological survey in Vipos, La Toma, and Choromoro – Trancas, Tucumán, Argentina. *Eur J Epidemiol.* 1999; 15:383-8.

Vicentini AP, Gesztesi J, Franco MF, Souza W, Moraes JZ, Travassos LR, et al. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect Immun.* 1994; 62(4):1465-9.

Wallis RS, Amir-Tahmasseb M, Ellner JJ. Induction of interleukin 1 and tumor necrosis factor by mycobacterial proteins: The monocyte Western blot. *Proc Natl Acad Sci.* 1990; 87:3348-52.

Wang PD. Two-step tuberculin testing of passengers and crew on a commercial airplane. *Am J Infect Control.* 2000; 28(3):233-8.

Wanke B. Paracoccidioidomicose. Inquérito intradérmico com paracoccidioidina em zona urbana do município de Rio de Janeiro, 1976 (tese). Rio de Janeiro: Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro; 1976.

Wanke B, Londero AT. Epidemiology and a paracoccidioidomycosis infection. In Franco M, Lacaz CS, Restrepo A, Del Negro G. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton: CRC Press; 1994. p. 109-20.

Wanke B, Valle ACF, Zancopé-Oliveira RM, Costa RLB. Paracoccidioidomicose. In: Coura JR. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 1193-221.

Wanke B, Aidê MA. Paracoccidioidomycosis. *J Brasil Pneumol.* 2009; 35(12):1245-9.

Webster CT, Gordin FM, Matts JP, Korvick JA, Miller C, Muth K, et al. Two-stage tuberculin skin testing in individuals with human immunodeficiency virus infection. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995; 151:805-8.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você esta sendo convidado a participar da pesquisa: **Prevalência de infecção pelo *Paracoccidioides brasiliensis* em população de assentamentos rurais em Mato Grosso do Sul e análise do polimorfismo genético para interferon gama em doentes e infectados.**

Você precisa decidir se quer participar ou não. Por favor, não se apresse em tomar a decisão. Ouça com atenção o que será lido e pergunte ao responsável pelo estudo qualquer dúvida que você tiver.

Este estudo está sendo conduzido pelas pesquisadoras Ana Paula da Costa Marques e Anamaria M. M. Paniago da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

A Paracoccidioidomicose, também conhecida por Pbmicosose é doença causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. É mais comum em lavradores, pois ao trabalhar a terra respira o fungo que chega aos pulmões e de lá, pelo sangue, pode alcançar qualquer parte do corpo, principalmente os boca, garganta, pele e gânglios. Os órgãos mais afetados são os pulmões, e isso pode levar a morte ou incapacidade permanente para o trabalho forçado. Nem todos que respiram este fungo vão adoecer. A maioria das pessoas nem percebe que se infectou, pois o seu organismo consegue impedir a progressão para a doença. Por que motivo alguns adoecem? Já sabemos que o fato de ser homem, fumante e alcoólatra são fatores que favorecem o adoecimento. Não sabemos quantas pessoas infectadas existem em Mato Grosso do Sul, acreditamos que cerca de 40% dos lavradores de nosso estado se infectam durante a vida. Também não se sabe se diferença no gene do interferon gama (uma substância que ajuda no combate a doença) pode facilitar ou impedir o adoecimento.

A finalidade deste estudo é estimar quantas pessoas se infectaram pelo fungo nos assentamentos rurais de Jaraguari. Um outro propósito é descobrir se o gene do interferon gama do indivíduo que ficou doente é diferente do gene daqueles que respiraram o fungo mas não adoeceram.

Poderão participar deste estudo as pessoas moradoras dos assentamentos rurais de Jaraguari, com idade maior de 2 anos. Esperamos cerca de 700 participantes. Os menores de idade só poderão participar com este termo assinado pelos pais ou responsáveis.

Outro grupo de participantes será de pessoas que já tiveram a doença Pbmicosose confirmada, que freqüentam o ambulatório de micoses sistêmicas do Hospital Universitário da UFMS.

O que será feito?

- **preenchimento de formulário:** o pesquisador lhe fará algumas perguntas referentes a idade, cidades onde morou e seus hábitos e condições de vida, as respostas serão assinaladas em papel impresso. O nome não será registrado. Caso fique constrangido com as perguntas pode deixar de responder a qualquer momento.

- **teste de pele:** será aplicado uma (injeção) na pele de pedaços do fungo causador da Pbmicose (0,1ml da proteína gp43) e será solicitado que retorne após 48hs para que os pesquisadores observem e meçam se houve uma reação indurecida no local da aplicação. Se a reação for positiva (induração maior do que 5mm) você será avaliado por um médico, caso ele ache necessário, você será encaminhado ao ambulatório de micoses sistêmicas do Hospital Universitário da UFMS. O mais provável é que pessoas com o teste positivo não apresentem a doença, pois isto significa que já respirou o fungo, mas não adoeceu. Se a reação for negativa será repetida após 2 semanas (para saber se alguns precisam de 2 testes para se tornarem positivos) e também será aplicado no outro antebraço um teste controle com pedaços do fungo *Candida* (um fungo muito comum que praticamente todas as pessoas já tiveram contato com ele), para saber se a pessoa é realmente negativo ou se ele não consegue apresentar esse tipo de reação na pele. Este exame pode causar, em algumas pessoas, coceira ou ardência no local da aplicação, mas com o passar de algumas horas esse incômodo desaparece. A leitura destes testes também é realizada após 48 horas através da medida do nódulo formado (ou não) na pele.

- **exame de sangue:** serão retirados 5ml de sangue (aproximadamente duas colheres de sopa cheias) para o estudo sobre o polimorfismo do gene de interferon gama. Em nenhum momento será feito estudo de outros genes que possam identificar e/ou constranger o participante deste estudo. Este exame pode causar dor e uma mancha roxa no local da picada da agulha.

- **banco de amostra biológica:** Será montado um banco de amostras biológicas para armazenar o DNA (conteúdo genético que fornece as características de cada pessoa) das minhas células. As amostras contidas neste banco poderão ser utilizadas em pesquisas posteriores pelo grupo de pesquisadores responsáveis por esta pesquisa atual. Você será comunicado se isto ocorrer.

O tempo de participação será de cerca de 30 minutos. A leitura do teste de pele levará 5 minutos. O benefício de participar do estudo é que você saberá se algum dia foi infectado pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis* e será orientado de como evitar a doença.

A sua participação é voluntária, você pode não aceitar participar ou desistir a qualquer momento. Os resultados serão confidenciais e aplicados somente à pesquisa, podendo ser publicados em revistas e congressos científicos. Todos os participantes deste estudo serão mantidos no anonimato e você será informado dos resultados dos exames. Se você concordar será feita fotografias das lesões para documentação científica, preservando seu anonimato.

Se tiver qualquer dúvida sobre sua participação neste estudo, favor telefone para 3345-7393 ou 3345-3135 (Prof. Ana Paula da Costa Marques e Anamaria M. M. Paniago) Para perguntas sobre seus direitos como participante no estudo chame o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFMS, no telefone 3345-7187.

Declaro que li e entendi este formulário de consentimento e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas e que sou voluntário a participar do estudo.

Grupo: “assentados” () “pacientes” ()

Assinatura do Voluntário ou do responsável:

_____data_____

Testemunha, caso de analfabeto_____

Assinatura do pesquisador_____data_____

() Autorizo a utilização de minha imagem para propósitos científicos

APÊNDICE B – Questionário

Formulário de coleta de dados

Prevalência de infecção pelo *Paracoccidioides brasiliensis* em população de assentamentos rurais em Mato Grosso do Sul e análise do polimorfismo genético para interferon gama em doentes e infectados.

Data: ____/____/____

Registro: _____ Iniciais: _____

Sexo: F () M ()

Idade: _____

Profissão atual: _____

Naturalidade: _____ UF: _____

Procedência: _____ UF: _____

História

migratória: _____

Raça: branca () Negro () Pardo () Amarelo ()

Fuma: Sim () Não () Ex ()

Ingere bebia alcoólica: Sim () Não () Ex ()

Caso ingira, qual a frequência (dias na semana): _____

Trabalha ou trabalhou na lavoura Sim () Não ()

Caça ou já caçou tatu: Sim () Não ()

RHT gp43: _____mm

RHT Candidina _____mm

2. teste – RHT gp43 _____mm

Grupo “Assentamentos” () qual assentamento _____

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comitê de Ética em Pesquisa /CEP/UFMS

*Carta de Aprovação*

A minha assinatura neste documento, atesta que o protocolo nº 1303 da Pesquisadora Ana Paula da Costa Marques “Perfil imunológico de pacientes com paracoccidiodomicose : antes, durante e após o tratamento, e o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram revisados por este comitê e aprovados em reunião ordinária no dia 19 de março de 2009, e seu título emendado para “ Prevalência da infecção pelo Paracoccidíoides brasiliensis em população de assentados rurais em Mato Grosso do Sul e análise do polimorfismo genético para interferon gama em doentes e infectados” em 29 de outubro de 2009, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.

Prof. Paulo Roberto Haidamus de Oliveira Bastos

Coordenador em exercício do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS

Campo Grande, 29 de outubro de 2009.