

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS E  
PARASITÁRIAS**

**ELIANA DA COSTA ALVARENGA DE BRITO**

**ASPECTOS HEMATOLÓGICOS E REGULAÇÃO DO METABOLISMO DO FERRO  
NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

**CAMPO GRANDE  
2022**

**ELIANA DA COSTA ALVARENGA DE BRITO**

**ASPECTOS HEMATOLÓGICOS E REGULAÇÃO DO METABOLISMO DO FERRO  
NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

Tese apresentada como requisito para a obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob orientação da Prof. Dra. Anamaria Mello Miranda Paniago e coorientação da Prof. Dra. Simone Schneider Weber.

**CAMPO GRANDE  
2022**

# FOLHA DE APROVAÇÃO



Ministério da Educação  
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Coordenadoria de Pós-Graduação (CPG/PROPP)

UFMS

## Ata de Defesa de Tese Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias Doutorado

Aos vinte e oito dias do mês de setembro do ano de dois mil e vinte e dois, às catorze horas, no Anfiteatro 2 - FAMED/UFMS, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Anamaria Mello Miranda Paniago (UFMS), Claudia Elizabeth Volpe Chaves (HRMS), Eduardo Benedetti Parisotto (UFMS), Eliane Borges de Almeida (HRMS) e Rinaldo Poncio Mendes (UNESP), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho da aluna: **ELIANA DA COSTA ALVARENGA DE BRITO**, CPF 30228340802, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Curso de Doutorado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "**ASPECTOS HEMATOLÓGICOS E REGULAÇÃO DO METABOLISMO DO FERRO NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE**" e orientação de Anamaria Mello Miranda Paniago. A presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua Tese. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, a presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR	ASSINATURA	AValiaÇÃO
Dra. Anamaria Mello Miranda Paniago (Interno)		aprovada
Dra. Adriana de Oliveira Franca (Interno) (Suplente)		
Dra. Claudia Elizabeth Volpe Chaves (Externo)		Completamente aprovada
Dr. Eduardo Benedetti Parisotto (Externo)		APROVADA
Dra. Eliane Borges de Almeida (Externo)		Aprovada
Jeniffer Michelline de Oliveira (Externo) (Suplente)		
Dr. Rinaldo Poncio Mendes (Externo)		Aprovada

### RESULTADO FINAL:

Aprovação

Aprovação com revisão

Reprovação

### OBSERVAÇÕES:

---

---

---

---

Nada mais havendo a ser tratado, a Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Assinaturas:

Presidente da Banca Examinadora

Aluna

## **AGRADECIMENTOS**

Gratidão primeiramente a Deus e a Nossa Senhora Aparecida, por tudo que sou, por tudo que tenho, por me abençoar, por me dar forças e por sempre iluminar o meu caminho.

Obrigada aos meus pais Antonio e Lourdes e a minha irmã Adriana, pelos ensinamentos, pelas palavras de motivação, pelo carinho, pela dedicação e cuidado que sempre tiveram por mim. Vocês são a minha base. Obrigada por tudo!!!

Gratidão em especial ao meu esposo, Moacyr, pelo amor, carinho, pelas palavras de conforto e pela paciência, pela compreensão, por sempre estar comigo em todos os momentos, por sempre me incentivar. Obrigada meu amor, te amo muito!!!

Obrigada a minha sogra Alice e ao meu sogro Moacyr (in-memoria), pelas palavras de apoio, e incentivo que me motivaram sempre.

Gratidão ao meu filho Matheus, presente de Deus em minha vida, minha riqueza, minha alegria, minha razão por lutar e querer sempre ser uma pessoa melhor. Te amo muito filho.

Aos meus sobrinhos, Thalita, Gabriel Henrique e Maria Eduarda, apesar da distância, vocês deixam a minha vida mais colorida e alegre. Obrigada pela existência de vocês na minha vida e pela oportunidade de ser tia.

Gratidão muito especial a minha orientadora, prof. Dra Anamaria, que me deu a oportunidade de voltar a pós-graduação e que me acolheu de braços abertos. Obrigada prof. Ana, pelo seu carinho, pelos seus ensinamentos, pela sua dedicação, pela sua paciência e pelo exemplo de professora, pesquisadora, médica e ser humano.

Gratidão especial a minha coorientadora, prof. Simone Weber, pelas parcerias, pelos ensinamentos, pela dedicação, pela paciência e pelas orientações.

Obrigada a todos os professores e pesquisadores do programa de pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias PPGDIP/UFMS, pelo ensinamento, pelas orientações, pela dedicação, pela garra e pela luta pela ciência.

Obrigada a todos os colegas pós-graduandos, em especial a todos da turma 2017/1, pelas risadas, companheirismo, ensinamentos e pela amizade. Vou lembrar sempre desta turma.

Obrigada a todas as alunas da pós-graduação orientadas da prof. Anamaria, Alana, Ana Carulina, Bruna, Elisangela, Evelin, Karine, Leilane, Jackeline, Maria e Ursulla, pelas parcerias, pelos conhecimentos, aprendizados e pela amizade.

Obrigada aos alunos de medicina e PIBIC, Igor Valadares, Leonardo Ribeiro, Amanda Rezende, Vinicius Félix, Guilherme Banck, Larissa Kayano e Matheus Félix, que tive a oportunidade de coorientar e aprender junto. Muito agradecida por vocês fazerem parte desta trajetória, e, sucesso a todos.

Minha gratidão a todos os funcionários do Hospital-Dia Esterina Corsini, que ajudam, colaboram com as pesquisas científicas e, o mais importante, pelo carinho e dedicação com os pacientes.

Meu agradecimento especial a todos os pacientes que aceitaram participar do estudo, e aceitam a ajudar nas pesquisas científicas. A participação de todos é muito importante para a ciência. Muito Obrigada!!

Obrigada a todos os funcionários e responsáveis dos laboratórios do LAC-HUMAP, em especial aos funcionários dos laboratórios de hematologia e bioquímica que colaboraram com este trabalho, em especial ao Tom Zé pela ajuda no exame hemogdip.

Obrigada a todos os alunos que participaram e que participam como equipe do LabDip, em especial Amanda, Camila Oyama, Sarah, Babi, Matheus e prof. James Venturini que fizeram parte da minha trajetória, obrigada pelo apoio e ensinamento.

Agradeço também as técnicas Taynara e Kassia que hoje auxiliam imensamente as pesquisas científicas no LabDip.

Obrigada à UFMS pela oportunidade de fazer parte do Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias e por todo o apoio oferecido pela CAPES.

Obrigada a todos os membros da banca que aceitaram participar, que colaboraram e que se dedicaram nas correções.

Obrigada a todos que direta ou indiretamente, colaboraram com esta pesquisa e que fizeram ou fazem parte da minha trajetória.

Muito obrigada!!!!

## RESUMO

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica, causada por fungos do gênero *Paracoccidioides* spp., que pode provocar alterações hematológicas e no metabolismo do ferro e está relacionada à resposta inflamatória do hospedeiro. Assim, anemia, leucocitose, eosinofilia e linfocitose têm sido descritas, principalmente na forma aguda/subaguda da doença. As alterações hematológicas e no metabolismo do ferro na forma crônica da PCM são pouco conhecidas. O objetivo deste estudo foi analisar e interpretar os aspectos hematológicos, bem como o metabolismo do ferro em diferentes compartimentos e avaliar a hepcidina sérica em pacientes com a forma crônica da PCM durante o processo de cura. Foram realizados três estudos, desenvolvidos no Hospital Dia Professora Esterina Corsini na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Com indivíduos diagnosticados com a forma crônica da PCM nos anos de 2013 a 2021. No primeiro estudo, com o propósito de contribuir com o conhecimento sobre as alterações das células hematológicas na forma crônica da PCM e no monitoramento do tratamento, avaliou-se o hemograma de pacientes com PCM crônica antes do início e durante diferentes estágios do tratamento. Os 62 pacientes incluídos tinham média de idade de 54,3 (DP 6,9) anos, sendo predominantemente homens (96,8%) e trabalhadores rurais (88,7%). Notou-se que na PCM crônica, as alterações no hemograma foram principalmente anemia e monocitose, no entanto, as alterações não são exuberantes. Após o tratamento, principalmente ao atingir a cura clínica, a maioria dos índices hematológicos alteram-se significativamente refletindo a interferência da infecção nestes parâmetros. No segundo estudo, com o intuito de compreender quais e quão intensos são os distúrbios no metabolismo do ferro em pacientes com forma crônica de PCM analisou-se os diferentes compartimentos de ferro, antes do tratamento e após a cura clínica. Notou-se que a PCM altera os compartimentos de estoque e funcional do ferro, sem alterar o compartimento de transporte. Apesar de que antes do tratamento as medidas centrais (média ou mediana) de ferritina, hemoglobina, eritrócitos, hematócrito e ferro sérico estavam normais, notou-se uma redução dos níveis de ferritina e aumento dos outros parâmetros entre o início do tratamento e a cura clínica. Além disso, observou-se que as alterações dos compartimentos de estoque e funcional do ferro apresentaram uma associação com a gravidade do quadro da doença. Os parâmetros do compartimento funcional apresentaram correlação negativa com a proteína C reativa, deste modo, foi possível inferir que a PCM interfere no metabolismo do ferro por transferir ferro do compartimento funcional para o de estoque, caracterizando uma anemia de inflamação. O terceiro estudo analisou os níveis de hepcidina sérica em pacientes com a forma crônica da PCM antes e durante o tratamento. Correlacionou-se a hepcidina com parâmetros do metabolismo do ferro e com as células sanguíneas. Apesar do aumento de hemoglobina e ferro e redução de ferritina observados entre antes do tratamento e em cura clínica, não houve redução nos níveis de hepcidina, como era esperado. No entanto, observou-se correlação direta com células leucocitárias ( $r = 0,483$ ;  $p = 0,001$ ), neutrófilos ( $r = 0,418$ ;  $p = 0,006$ ), monócitos ( $r = 0,396$ ;  $p = 0,009$ ) - duas células fagocitárias que atuam na primeira linha de defesa da PCM e são sabidamente produtoras de hepcidina. Em síntese, a forma crônica da PCM cursa com alterações no metabolismo do ferro e nas células hematológicas, que de modo geral, estão associadas com a gravidade da doença e melhoram após o tratamento.

**Palavras-chave.** Anemia. Contagem de células sanguíneas. Distúrbios do metabolismo do ferro. Hpcidina. Monocitos. Paracoccidioidomicose.

## ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by fungi of the genus *Paracoccidioides* spp. that can cause hematological and iron metabolism changes and are related to the inflammatory response of the host. Thus, anemia, leukocytosis, eosinophilia, and lymphocytosis have been described, mainly in the acute/subacute form of the disease. The hematological and iron metabolism changes in the chronic form of PCM are poorly understood. This study aimed to analyze and interpret hematological aspects and iron metabolism in different compartments and evaluate serum hepcidin in patients with chronic PCM during the curing process. The study was carried out at the Hospital Dia Professora Esterina Corsini at the Federal University of Mato Grosso do Sul. Individuals of both sexes, diagnosed with chronic PCM between 2013 and 2021, participated in the study. Three studies were carried out. The first study, to contribute to the knowledge about changes in hematological cells in the chronic form of PCM and monitoring of treatment, it was evaluated the blood count of patients with chronic PCM before initiation and during different stages of treatment. The 62 patients included had a mean age of 54.3 years (SD 6.9) and were predominantly men (96.8%) and rural workers (88.7%). The changes in the blood count were mainly anemia and monocytosis, however, the changes are not exuberant. After treatment, especially when a clinical cure is achieved, most hematological indices change significantly, reflecting the interference of infection in these parameters. The second study, to understand which and how intense the disturbances in iron metabolism in patients with the chronic form of PCM, it was analyzed the different iron compartments before treatment and after clinical cure. It was noted that PCM changes the storage and functional compartments of the iron, without changing the transport compartment. Although, before treatment the central measurements (mean or median) of ferritin, hemoglobin, erythrocytes, hematocrit, and serum iron were normal, there was a reduction in ferritin levels and an increase in other parameters between the start of treatment and clinic cure. In addition, it was observed that changes in iron storage and functional compartments were associated with the severity of the disease. A negative correlation between C-reactive protein and functional compartment parameters was observed. Thus, it was possible to infer that PCM interferes with iron metabolism by transferring iron from the functional compartment to the storage compartment, characterizing anemia or inflammation. The third study analyzed the serum hepcidin levels of patients with the chronic form of PCM before and during treatment and correlated hepcidin with parameters of iron metabolism and with blood cells. Despite the increase in hemoglobin and iron and decrease in ferritin observed between pretreatment and clinical cure, there was no reduction in hepcidin levels, as expected. However, a direct correlation was observed with leukocyte cells ( $r = 0.483$ ;  $p = 0.001$ ), neutrophils ( $r = 0.418$ ;  $p = 0.006$ ), and monocytes ( $r = 0.396$ ;  $p = 0.009$ ) two phagocytic cells that act in first-line defense of PCM and are known to produce hepcidin. In summary, the chronic form of PCM is associated with changes in iron metabolism and in hematological cells, which are generally associated with the severity of the disease and improve after treatment.

**Keywords:** Anemia. Blood cell count. Iron metabolism disorders. Heparidins. Monocytes. Paracoccidioidomycosis.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADC	Anemia de doença crônica
ADF	Anemia por deficiência de ferro
AI	Anemia da inflamação
Dcytb	Citocromo B
DMT-1	Transportador de metal divalente 1
ELISA	Teste imunoenzimático
EPO	Eritropoietina
Fe <sup>+2</sup>	Íons ferroso/ ferro heme
Fe <sup>+3</sup>	Íons férrico / ferro não heme
Hb	Hemoglobina
HCP1	Proteína transportadora do heme
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida humana
HMG	Hemograma completo
IDD	Imunodifusão em gel de ágar duplo
IG	Granulócitos imaturos
IL-1	Interleucina 1
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corporal
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IPF	Fração de plaquetas imaturas
LEAP-1	Proteína antimicrobiana 1 expressa no fígado
MS	Mato Grosso do Sul
MTP1	Proteína transportadora de metal 1
Nramp 1	Proteína 1 de macrófago associada a resistência
Pb	<i>Paracoccidioides</i> spp.
PCM	Paracoccidioidomicose
PCR	Proteína C reativa
Pl	<i>Paracoccidioides lutzii</i>
Ret-He	Conteúdo de hemoglobina nos reticulócitos
TB	Tuberculose
TIBC	Capacidade de ligação total do ferro a transferrina
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa

ST	Saturação da transferrina
sTfR	Receptor solúvel da transferrina
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
VHS	Velocidade de hemossedimentação

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>12</b>
<b>1 FUNDAMENTAÇÃO DA PESQUISA.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 Paracoccidioidomicose (PCM) .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1.1 Epidemiologia e etiologia .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1.2 Interação parasita - hospedeiro.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1.3 Manifestações clínicas .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1.4 Diagnóstico .....</b>	<b>16</b>
<b>1.1.5 Tratamento e controle de cura .....</b>	<b>16</b>
<b>1.2 Hemograma.....</b>	<b>17</b>
<b>1.2.1 Importância do hemograma no manejo das doenças infecciosas.....</b>	<b>17</b>
<b>1.2.2 Hemograma na PCM .....</b>	<b>18</b>
<b>1.2.3 Anemia na PCM .....</b>	<b>19</b>
<b>1.3 Ferro e sua homeostase .....</b>	<b>20</b>
<b>1.4 Hecpidina.....</b>	<b>23</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
<b>2.1 Geral .....</b>	<b>26</b>
<b>2.2 Específicos .....</b>	<b>26</b>
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>27</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>32</b>
<b>Artigo 1 – Análise e interpretação do hemograma no tratamento da paracoccidioidomicose crônica.....</b>	<b>33</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>33</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>34</b>
<b>Pacientes e métodos .....</b>	<b>34</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>39</b>
<b>Discussão .....</b>	<b>51</b>
<b>Referências: .....</b>	<b>55</b>
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>60</b>
<b>Artigo 02 – Iron metabolism disorders in patients with chronic form of paracoccidioidomycosis.....</b>	<b>61</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>61</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>62</b>

<b>Materials and methods.....</b>	<b>63</b>
<b>Results.....</b>	<b>67</b>
<b>Discussion .....</b>	<b>74</b>
<b>References.....</b>	<b>77</b>
<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>81</b>
<b>Artigo 3 – Análise da hepcidina sérica em pacientes com paracoccidiodomicose crônica</b> <b>.....</b>	<b>82</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>82</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>83</b>
<b>Pacientes e método.....</b>	<b>84</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>86</b>
<b>Discussão .....</b>	<b>91</b>
<b>Referências: .....</b>	<b>93</b>
<b>CAPÍTULO V .....</b>	<b>96</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>97</b>

**CAPÍTULO I**

---

---

## 1 FUNDAMENTAÇÃO DA PESQUISA

### 1.1 Paracoccidioidomicose (PCM)

#### 1.1.1 Epidemiologia e etiologia

A PCM é uma micose sistêmica endêmica na América Latina, relatada com maior frequência no Brasil, Colômbia, Venezuela e Argentina (MENDES et al., 2017).

O Brasil é considerado o centro endêmico dessa doença, sendo esta apontada como a oitava causa de mortalidade por doença infecciosa crônica no país (COUTINHO et al., 2002). As maiores casuísticas foram relatadas nas regiões sul, sudeste e centro-oeste (BLOTTA et al., 1999; PANIAGO et al., 2003; SUGUIURA; ONO, 2022). Informações registradas no Ministério da Saúde nos períodos entre 1980 a 1995 mostram que 3.181 pessoas vieram a óbito por PCM (COUTINHO et al., 2002). O fato de a doença não ser de notificação obrigatória em muitas regiões do nosso país, possivelmente é a razão pela qual a PCM é negligenciada no planejamento da saúde pública no Brasil. Ainda hoje a PCM representa um importante problema de saúde pública devido ao seu alto potencial incapacitante, além de provocar mortes prematuras (MARTINEZ, 2010).

A PCM foi descrita primeiramente em 1908 pelo pesquisador Adolfo Lutz, que demonstrou ser a doença causada por um fungo termo-dimórfico, posteriormente denominado *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb). Todavia, recentemente várias espécies envolvidas na etiologia da PCM têm sido identificadas, tais como *Paracoccidioides brasiliensis*, *Paracoccidioides americana*, *Paracoccidioides restrepiensis* e *Paracoccidioides venezuelensis*, que juntas constituem o complexo de espécies *P. brasiliensis*. *Paracoccidioides lutzii* (Pl), que não pertence a este complexo, também foi identificado como um agente etiológico de PCM e tem sido descrito em áreas endêmicas envolvendo as regiões Centro-Oeste e Norte do Brasil (TURISSINI et al., 2017).

O fungo é termo-dimórfico, ou seja, pode ser encontrado em duas morfologias, a micelial, em temperatura ambiente, e a leveduriforme, em temperatura de 35 °C — 37 °C. Durante a forma micelial, este sintetiza esporos infectantes ou conídios, os quais, uma vez inalados pelos hospedeiros susceptíveis e em condições ideais como temperatura entre 35 a 37 °C e nutrientes adequados, dão origem a forma leveduriforme do fungo, que são capazes de disseminar-se por diversos tecidos do hospedeiro causando diversas lesões (MENDES et al., 2017).

### 1.1.2 Interação parasita - hospedeiro

A princípio, a infecção pelo *Paracoccidioides* spp. acomete primariamente os pulmões e a partir deste sítio pode atingir por via linfática e, ou hematogênica, quaisquer órgãos ou sistemas. Entretanto, a PCM, assim como outras doenças fúngicas, para acometer o hospedeiro dependerá do tamanho do inóculo, da patogenicidade e da virulência do fungo, assim como da integridade do sistema imunológico e de fatores genéticos. Na maioria dos hospedeiros que entram em contato com o fungo, a resposta imunológica é satisfatória e a evolução da infecção é contida. Mas, o fungo pode permanecer em estado latente nas lesões fibróticas e em qualquer período, até mesmo décadas após a infecção, reativar, induzindo a doença no hospedeiro (LONDERO, 1986).

Os indivíduos mais suscetíveis à inalação e à infecção por *Paracoccidioides* spp. são aqueles que realizam atividades na zona rural ou aqueles que têm profissões associadas ao manejo do solo contaminado com o fungo por um período prolongado, como, por exemplo, preparo de solo para atividades agrícolas, terraplanagem, práticas de jardinagens, transporte de produtos vegetais, entre outros. O período de incubação pode ocorrer em semanas ou até anos, dependendo da forma clínica. Sendo assim, quando os indivíduos procuram atendimento médico, podem não se encontrar mais nas regiões endêmicas onde se infectaram, residindo em centros urbanos e realizando outras atividades, não ligadas ao manejo do solo (BUITRAGO et al., 2011). Apesar de ocorrer elevadas variações entre as regiões, estima-se que apenas 10% dos casos acometem indivíduos até os 20 anos. Calcula-se que a PCM em pessoas adultas varia entre 10 e 15 homens para 1 mulher acometida. No entanto, estes dados não são observados nos casos infantis, nos quais a doença atinge igualmente ambos os sexos (MARTINEZ, 2015).

Uma explicação para o baixo acometimento da PCM em mulheres estaria relacionada com a interação do fungo com o hormônio feminino  $\beta$ -estradiol. Estudos com isolados de *Paracoccidioides* spp. mostraram que na presença do hormônio feminino  $\beta$ -estradiol o número de células que se transformaram em levedura é relativamente baixo (RESTREPO et al., 1984). Outras pesquisas revelaram que no citoplasma das células do fungo, tanto em micélio como em levedura, encontra-se uma proteína de ligação ao estradiol (ARISTIZÁBAL et al., 2002; LOOSE et al., 1983). E esta proteína teria o papel de receptor para o hormônio e, sendo assim, ocorreria uma inibição da transição do fungo de micélio para levedura, dificultando desta maneira a instalação da doença (SHANKAR et al., 2011).

### 1.1.3 Manifestações clínicas

Conforme as manifestações clínicas, a PCM pode ser classificada em duas principais formas: forma aguda/subaguda (tipo juvenil) e a forma crônica (tipo adulto) (MENDES et al., 2017).

A forma tipo juvenil da PCM, por ter uma evolução mais rápida e intensa é também chamada aguda/subaguda e acomete crianças, adolescentes e adultos jovens (com idade menor do que 30 anos) de ambos os sexos. Representa 3 a 20% dos casos da doença, podem cursar como uma reticuloendoteliose, comprometendo o sistema fagocítico mononuclear e eventualmente, pode até mimetizar uma doença linfoproliferativa sistêmica de origem neoplásica, metabólica ou até mesmo infecciosa de outra etiologia. Nessa circunstância, pode apresentar alterações nas células circulantes do sangue periférico e da medula óssea. No entanto, a presença do fungo na medula óssea foi raramente descrita (OZAKI et al., 1996a; PANIAGO et al., 2005). Conforme sua gravidade, a forma aguda/subaguda é classificada em moderada e grave.

A forma crônica da PCM representa até 90% dos casos e normalmente ocorre em adultos do sexo masculino entre 30 e 60 anos. A doença afeta principalmente os pulmões, mucosas aerodigestivas altas, linfonodos e pele, porém quaisquer outros órgãos podem ser acometidos (MENDES et al., 2017).

Classificação das formas clínicas quanto a sua gravidade são necessárias para que os clínicos tomem a decisão sobre o tratamento e avaliação prognóstica. Sendo assim, na forma crônica, a gravidade é classificada em leve, moderada e grave segundo Mendes et al., (2017).

Pacientes com a forma crônica leve são aqueles que apresentam diminuição de índice de massa corporal (IMC) abaixo de 5% do habitual, envolvimento de um único órgão ou o envolvimento discreto de poucos órgãos, ou tecidos, mas sem alterações em suas funções (MENDES et al., 2017).

Pacientes com a forma crônica grave, são aqueles que envolvem três ou mais dos seguintes critérios: a) perda de IMC igual ou superior a 10%; b) envolvimento pulmonar intenso; c) comprometimento de outros órgãos, tais como sistema nervoso central, glândulas adrenais e ossos; d) presença de linfadenopatia em múltiplas cadeias na forma pseudotumoral superficial ou profunda (> 2,0 cm de diâmetro, sem supuração) ou na forma supurativa; e) presença de níveis elevados de anticorpos.

Pacientes da forma crônica moderada, são aqueles casos intermediários entre leves e graves, com perda de IMC 5 – 10% e níveis de anticorpos moderadamente elevados (MENDES et al., 2017).

### 1.1.4 Diagnóstico

Vários métodos de diagnóstico têm sido descritos e utilizados na PCM, tais como, os microbiológicos, imunológicos, histopatológicos e moleculares. Essas metodologias são de suma importância para o diagnóstico preciso desta micose e, desta forma, possibilitam aos clínicos iniciar uma terapia específica para evitar maiores danos pulmonares, disseminação do fungo para outros órgãos, bem como reduzir o desenvolvimento de fibrose.

O método mais eficiente no diagnóstico definitivo da PCM é o exame micológico direto que revela a presença de formas típicas de *Paracoccidioides* spp. em amostras biológicas tais como escarro, raspado de lesão ou aspirado de linfonodos e/ou fragmentos. O exame histopatológico com colorações para fungos, mais caro e menos acessível, tem excelente sensibilidade além de informar a densidade do granuloma que representa a intensidade da resposta imune do hospedeiro (MENDES et al., 2017).

*Paracoccidioides* spp. crescem lentamente em meio de cultura e estes são frequentemente contaminados com outros microrganismos, principalmente *Candida* spp.

Os testes sorológicos no diagnóstico da PCM têm sido utilizados desde o início da década de 1970, sendo uma forma eficaz para o diagnóstico da doença (DEL NEGRO et al., 1991). A detecção de anticorpos no soro pode auxiliar os clínicos durante o tratamento, avaliando a resposta do hospedeiro a um tratamento específico (MENDES et al., 2017). Entre os métodos sorológicos, com uma sensibilidade de 80 a 95%, a imunodifusão em gel de ágar duplo (IDD) é a técnica mais utilizada no auxílio da evolução clínica na PCM (DE CAMARGO, 2008).

### 1.1.5 Tratamento e controle de cura

O tratamento normalmente realizado em indivíduos com PCM envolve medidas de suporte às complicações clínicas associadas ao envolvimento de diferentes órgãos pela micose, além das terapêuticas antifúngicas específicas. Estudos mostram que o fungo é sensível à maioria das drogas antifúngicas empregadas no tratamento. Sendo assim, diversas drogas podem ser utilizadas no tratamento desses pacientes como anfotericina B, sulfamídicos (sulfadiazina, associados sulfametoxazol/trimetoprim) e azólicos (itraconazol, fluconazol, cetoconazol). No tratamento das formas clínicas leve à moderadas a opção terapêutica utilizada é o itraconazol. Para as formas mais graves e disseminadas a anfotericina B, associação de sulfametoxazol/trimetoprim ou fluconazol por via intravenosa são opções que podem ser utilizadas. Geralmente, esses pacientes devem permanecer em tratamento e acompanhamento

por muito tempo, para permitir o controle das manifestações clínicas da micose, evitar uma recaída e até obter a cura aparente, baseados nos parâmetros clínicos e exames específicos (MENDES et al., 2017).

O tempo do tratamento depende da droga utilizada, do tamanho do inóculo e da resposta imune do hospedeiro. O tratamento é mantido até que a imunidade mediada por células esteja totalmente recuperada para evitar a reativação fúngica, a qual pode permanecer em latência, monitorada pela imunodifusão que deve resultar em soro não reagente por pelo menos doze meses, sendo aferida a cada três meses (MENDES et al., 2017).

A duração do tratamento e o controle de cura são baseados em quatro critérios, cura clínica, micológica, radiológica e imunológica, até que os pacientes alcancem a cura aparente. A cura clínica ocorre quando os sinais e sintomas da PCM ativa desaparecem. Cura micológica ocorre quando não há mais detecção do fungo no mesmo material onde havia sido detectado. Cura radiológica é obtida quando, após o tratamento, o exame radiológico encontra-se inalterado, durante um ano. Cura imunológica é alcançada quando após o início do antifúngico, os anticorpos específicos se tornem indetectáveis no método IDD por pelo menos doze meses (MENDES et al., 2017).

## **1.2 Hemograma**

### **1.2.1 Importância do hemograma no manejo das doenças infecciosas**

Disponível na maioria das unidades de saúde, de fácil execução e com baixo custo, o hemograma é provavelmente o exame laboratorial mais utilizado na prática clínica e se consolidou como importante ferramenta de propedêutica complementar para direcionar o diagnóstico e avaliar o prognóstico de muitas doenças. Alterações no hemograma refletem desequilíbrio entre produção e destruição de células sanguíneas e, na prática clínica das doenças infecciosas, proporciona informações importantes da resposta do hospedeiro às infecções, auxiliando nas tomadas de decisão no manejo clínico.

Quadros de neutrofilia apontam para infecções agudas causadas por bactérias Gram positivas, e quando observado desvio escalonado à esquerda, a estafilococcia se impõe como uma forte hipótese diagnóstica (SPAAN et al., 2013).

Linfocitose com atipia linfocitária é característica da mononucleose infecciosa, em especial a causada por vírus Epstein Baar (ISHII et al., 2019).

Eosinofilia ocorre principalmente nas manifestações alérgicas a agentes infecciosos, como aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) (AGARWAL et al., 2011), e nas verminoses, em especial por helmintos que fazem o ciclo de Loss (LEDER; WELLER, 2000).

Já a eosinopenia ocorre nos quadros bacterianos agudos graves (LAVOIGNET et al., 2019) incluindo a febre tifoide (ISHAQ et al., 2020).

As alterações da série vermelha nas infecções vão desde a elevação do hematócrito por hemoconcentração observada na dengue às anemias, que podem ser ferropriva, por espoliação do ferro como na ancilostomíase (CALDRER et al., 2022), ou por perda sanguínea. Nesta última, além da própria ancilostomíase que induz a perda sanguínea intestinal, estão as doenças infecciosas como a tuberculose e aspergilose pulmonar crônica em decorrência de quadros de hemoptise. Além disso, a anemia em decorrência do processo inflamatório, chamada de anemia inflamatória (AI) também ocorre nas doenças infecciosas crônicas o que será discorrido mais adiante.

As alterações de plaquetas também são vistas em infecções. A plaquetopenia pode ocorrer na dengue, na malária vivax (COELHO et al., 2013) e em infecções bacterianas agudas graves com tendência à sepse (AYDEMIR et al., 2015), enquanto quadros de plaquetose têm sido descritos na tuberculose (RENSHAW; GOULD, 2013).

### **1.2.2 Hemograma na PCM**

A análise sanguínea é fundamental para esclarecer questões como verificar se a medula óssea está desempenhando corretamente suas funções e se o crescimento e diferenciação celular estão adequados. Qualquer alteração hematológica pode estar relacionada a condições patológicas e a análise do hemograma (HMG) é de suma importância para auxiliar e acompanhar a clínica e a evolução do tratamento dos pacientes (GROTTO, 2009).

Muitos equipamentos de hemograma automatizado informam a imaturidade celular pelos índices denominados de conteúdo de hemoglobina nos reticulócitos (Ret-He), granulócitos imaturos (IG) e fração de plaquetas imaturas (IPF), que poderiam ser úteis na avaliação da gravidade e prognóstico de muitas doenças, pois estes parâmetros indicam a ativação da medula óssea, o grau de imaturidade das células, o que representa a atividade medular em “tempo real”(ANSARI-LARI; KICKLER; BOROWITZ, 2003; PEERSCHKE; PESSIN; MASLAK, 2014).

As interações parasita-hospedeiro e as consequentes respostas inflamatórias que o organismo apresenta levam a alterações nas células hematológicas na PCM, doença com componente inflamatório sistêmico e de tratamento prolongado (BENARD, 2008).

As alterações hematológicas mais frequentes e mais graves ocorrem na forma aguda/subaguda da PCM, dentre essas são relatados a diminuição de hemoglobina (anemia), aumento de leucócitos (leucocitose), aumento de eosinófilos (eosinofilia) e aumento de

subconjuntos de linfócitos (MOTA et al., 1988; NOGUEIRA et al., 2006; NOGUEIRA; ANDRADE, 2015; OZAKI et al., 1996; PEREIRA et al., 2004).

Na forma crônica, os poucos estudos que mostram alterações nas células sanguíneas relatam a redução nos níveis de hemoglobina (DE OLIVEIRA CUSTÓDIO et al., 2019), aumento de monócitos ou de subconjuntos de monócitos (MOTA et al., 1988; VENTURINI et al., 2014) e aumento ou diminuição de subconjuntos de linfócitos (DOEDENS et al., 2013; XU et al., 2016).

### **1.2.3 Anemia na PCM**

Na PCM, a anemia de maneira geral é descrita como leve a moderada, e é mais relatada na forma aguda/subaguda, a qual ocorre em mais de 80% dos casos com valores de hemoglobina (Hb) entre 8g/dL e 12g/dL (NOGUEIRA et al., 2006; ROMANELI et al., 2019).

A anemia da inflamação (AI) também conhecida como anemia de doença crônica (ADC) (WEISS; GANZ; GOODNOUGH, 2019) é considerada a segunda anemia mais prevalente, após a anemia por deficiência de ferro (ADF) e muito recorrente em pacientes hospitalizados (KASSEBAUM et al., 2014).

Durante os processos inflamatórios e, ou infecciosos, a ativação do sistema imunológico leva ao surgimento da AI, devido à intensificação e liberação de diversas citocinas e proteínas de fase aguda. Esta produção exacerbada de citocinas e proteínas levam a alterações no metabolismo do ferro e diminuição do ferro circulante, resultado da aquisição e retenção deste mineral no interior dos macrófagos do sistema reticuloendotelial. Ocorre diminuição da absorção do ferro pelos enterócitos, que conseqüentemente reduz a disponibilidade deste mineral para a eritropoiese. Além disso, citocinas como Il-1 $\beta$  e TNF, também prejudicam a eritropoiese, afetando a síntese de eritropoietina (EPO) levando a produção e diferenciação inadequada das células progenitoras eritroides, além de causar danos nos eritrócitos senescentes e diminuir o tempo de sobrevivência dos eritrócitos (JELKMANN, 1998; WEISS; GANZ; GOODNOUGH, 2019).

Clinicamente os indivíduos com AI geralmente apresentam sintomas referentes à doença de base e não à anemia propriamente dita. Quando há anemia instalada, a intensidade dos sintomas se correlaciona com o grau da anemia, que tende a regredir com a normalização dos valores da hemoglobina após o início do tratamento realizado para a doença de base. Deste modo, a existência e/ou a intensidade da anemia estabelece uma medida laboratorial que pode ser usada para acompanhar o curso clínico da doença de base assim como avaliar se o tratamento administrado é eficaz (LEE, 1983).

Dados laboratoriais de indivíduos com AI são caracterizados por apresentar uma anemia leve a moderada, sendo que esta anemia é classificada normalmente em normocrômica e normocítica. Mas, uma microcitose leve também pode ser encontrada em poucos casos. No entanto, quando ocorrer uma microcitose acentuada, deve-se considerar a co-existência de uma anemia por deficiência de ferro (ADF) ou talassemia concomitante com a AI (NEMETH; GANZ, 2014).

Outras características laboratoriais presentes na AI, além da anemia, é a deficiência funcional de ferro, a qual é caracterizada por valores de ferritina normal ou levemente aumentada; por valores normais ou reduzidos de ferro sérico, da capacidade de ligação total do ferro à transferrina (TIBC) e da saturação da transferrina (ST); e por valores normais do receptor solúvel da transferrina (sTfR) (CANÇADO; CHIATTONE, 2002; NEMETH; GANZ, 2014).

O tratamento da AI consiste em detectar e tratar a doença de base, em que normalmente leva a resolução da AI com a normalização dos níveis de hemoglobina durante o curso da doença, exceto se outras doenças, como deficiências de vitaminas, insuficiência renal, hemólise, sangramento ou até mesmo uma deficiência de ferro esteja presente (THEURL et al., 2009; WEISS; GANZ; GOODNOUGH, 2019).

Diferenciar AI da AI associada a ADF é fundamental já que uma suplementação férrica pode ser nociva aos pacientes com infecção concomitante; no entanto, após o tratamento da infecção para os que possuem a AI associada a ADF, a suplementação de ferro pode ser oferecida (WEISS; GANZ; GOODNOUGH, 2019).

### **1.3 Ferro e sua homeostase**

O ferro é um dos micronutrientes mais estudados, sendo um componente essencial da molécula de hemoglobina (Hb), da mioglobina e de diversas enzimas. Tem papel fundamental no transporte de oxigênio, na transferência de elétrons e atua como cofator em muitos processos enzimáticos, incluindo a síntese de DNA (PAIVA; RONDÓ; GUERRA-SHINOHARA, 2000).

O balanço de ferro corpóreo é, em sua grande maioria, mantido pela absorção do mesmo através da dieta, sendo um importante processo no controle dos níveis de ferro corporal, com mecanismos limitados de excreção. A eliminação do ferro pode ocorrer pela renovação de tecidos que não são reutilizados tais como as células da epiderme e mucosa gastrointestinal, pela menstruação e também através de perdas sanguíneas (KRAUSE et al., 2000; PARK et al., 2001).

As dietas normais apresentam cerca de 10 a 20 mg de ferro diário, presente nos alimentos na forma de hidróxido férrico (ferro não heme), complexos proteicos férricos e

complexos heme-proteínas. O conteúdo de ferro e a proporção absorvida pelo corpo variam de um alimento para outro; em geral carnes, particularmente fígado, são melhores fontes do que vegetais, ovos e laticínios (HOFFBRAND et al., 2006; ROBBINS et al., 2005).

Ao mesmo tempo em que o ferro é fundamental para diversos organismos, ele também pode causar grandes danos aos indivíduos. Neste sentido, a concentração deste micronutriente deve ser minuciosamente controlada em nível sistêmico e celular.

Três processos principais envolvem o metabolismo do ferro em ambos os níveis: captação, utilização e armazenamento (HENTZE; MUCKENTHALER; ANDREWS, 2004).

No metabolismo do ferro, os enterócitos são células especializadas na absorção e transporte de ferro intestinal, sendo capazes de modular sua absorção através das membranas apical e basolateral. A membrana apical é especializada captar o ferro contido no grupamento heme e os íons inorgânicos para o interior dos enterócitos, enquanto a membrana basolateral transfere o ferro absorvido, do interior do enterócito para a circulação sanguínea (ROY; ENNS, 2000).

As células intestinais possuem formas alternativas para transportar o ferro, havendo vias distintas para os íons ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ , ferro heme) e férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ , ferro não-heme). Para o ferro heme ( $\text{Fe}^{+2}$ ), a via é através da proteína transportadora do heme (HCP1) e para o ferro não-heme ( $\text{Fe}^{+3}$ ) o transporte ocorre via proteína transmembrana, conhecida como transportador de metal divalente 1 (DMT-1), sendo que o transportador é a via para a passagem de outros metais divalentes, como cobalto, zinco, manganês, cobre, níquel e cádmio para o interior das células (CONRAD; UMBREIT; MOORE, 1999; LIEU et al., 2001).

O  $\text{Fe}^{+3}$  atravessa a membrana apical e basolateral das vilosidades dos enterócitos através de dois transportadores distintos, proteína transportadora de metal divalente 1 (DMT1) e ferroportina respectivamente. Para que ocorra a absorção do  $\text{Fe}^{+3}$ , é necessário que ocorra redução a íon ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ) pela ação do citocromo B (Dcytb) associado à membrana. Após esta redução, o  $\text{Fe}^{+2}$  é captado pela proteína DMT1, que movimenta o ferro não-heme através da membrana apical. Pelo menos duas proteínas são necessárias para a transferência basolateral do ferro para a transferrina no plasma: ferroportina, uma glicoproteína transmembrana; e hefaestina, uma ferro-oxidase (ANDREWS, 2005; KRISHNAMURTHY; XIE; SCHUETZ, 2007). Após a oxidação do ferro, rapidamente este mineral é ligado a proteína de transporte plasmática, a transferrina, a qual carrega o ferro até as células que expressam receptores da transferrina, evitando lesões endoteliais (ANNIBALE; CAPURSO; DELLE FAVE, 2003).

Dentro do enterócito, o ferro pode ser estocado como ferritina ou ser transportado para a corrente sanguínea através da membrana basolateral. Este processo é determinado conforme a requisição absorptiva dos enterócitos. Em condições onde há uma deficiência de ferro ou quando ocorre um aumento na produção de eritrócitos, as células da mucosa sintetizam pouca ferritina e o ferro absorvido pela célula fica disponível para o transporte através da membrana basolateral (SRAI; BOMFORD; MCARDLE, 2002).

No organismo humano o ferro é distribuído conforme necessidade local; assim, este mineral pode ocupar diferentes compartimentos em quantidades diferentes, mas estes locais sempre permanecem interligados para que tenha uma homeostase corporal de ferro adequada (GROTTO, 2010).

O compartimento funcional é o que contém a maior quantidade de ferro corporal com cerca de 69% do ferro corpóreo total encontrado principalmente nas moléculas de hemoglobina. O segundo maior compartimento é o de estoque, composto por cerca de 30% do ferro corporal, armazenado em forma de ferritina e/ou hemossiderina. Interligado a estes compartimentos encontra-se o terceiro compartimento - o de transporte, responsável por transportar o ferro corporal presente no plasma. Neste compartimento o ferro é encontrado ligado à transferrina ou a receptores presentes nas membranas das células (SRAI; BOMFORD; MCARDLE, 2002).

Estes compartimentos podem ser avaliados separadamente através de exames laboratoriais, muitos dos quais são disponíveis e acessíveis na rotina laboratorial. Estes testes são capazes de avaliar se existe algum distúrbio no metabolismo do ferro e qual compartimento está sendo afetado: a) compartimento de estoque, avaliando a quantidade de ferro estocado no organismo; b) compartimento transporte, avaliando a capacidade de transporte do ferro; e c) compartimento funcional de ferro, avaliando síntese de eritrócitos conforme a disponibilidade de ferro para a eritropoiese.

Quando ocorre uma deficiência de ferro corporal, os compartimentos são em geral afetados na sequência, primeiramente ocorre uma diminuição nos níveis de ferro no compartimento de estoque, seguida de uma deficiência no compartimento de transporte e por fim uma redução no compartimento funcional (GROTTO, 2010).

Manter o controle da homeostase de ferro no hospedeiro é fundamental principalmente quando ocorre uma interação entre patógeno-hospedeiro, devido à competição por este micronutriente. Durante os processos infecciosos, alguns mecanismos da imunidade inata do hospedeiro limitam a disponibilidade de ferro aos microrganismos invasores, estratégia que atua limitando a multiplicação de microrganismo patogênicos (HENTZE; MUCKENTHALER; ANDREWS, 2004).

Em resposta imunológica contra os patógenos, as células do sistema imunitário sintetizam diversas citocinas tais como interferon gama (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 1 (IL-1) que atuam na eliminação do patógeno (APPELBERG, 2006) e influenciam na disponibilidade de ferro circulante.

Além disso, o reconhecimento de agentes agressores pelo hospedeiro leva à ativação das células fagocitárias, tais como macrófagos e neutrófilos. Ao serem fagocitados por estas células, os microrganismos podem encontrar níveis baixos de ferro no citosol, mecanismo de defesa do hospedeiro que é o resultado da produção de citocinas pró-inflamatórias que atuam na superfície das células fagocitárias, inibindo o receptor da transferrina presente na membrana das células e estimulando a expressão da proteína transportadora, conhecida como proteína 1 de macrófago associada a resistência (Nramp 1) (APPELBERG, 2006). Este transportador está presente nas membranas de vesículas lisossomiais de macrófagos e em grânulos terciários de neutrófilos. Durante o processo de fagocitose a Nramp 1 é recrutada para a membrana do fagossomo e, devido a sua alta afinidade com o ferro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), esta proteína transporta o ferro do fagossomo para o citosol da célula, onde é armazenado pela ferritina (GRUENHEID et al., 1997).

Também em resposta do organismo frente às infecções, há liberação de algumas citocinas, tais como interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6) que estimulam as células hepáticas a sintetizarem um importante peptídeo, a hepcidina, responsável pela regulação do ferro no hospedeiro, inibindo a absorção e a liberação de ferro pelas células, levando à redução do ferro circulante (LEE et al., 2005; NEMETH, 2004).

Na PCM, apesar de todos os mecanismos de defesa do organismo hospedeiro na privação de ferro para inibir o crescimento do fungo, ele consegue criar estratégias de evasão da defesa imunitária do hospedeiro e consegue captar o ferro para seu crescimento e sua disseminação. Dentre estas estratégias incluem a produção e captação de sideróforos, a utilização da via redutiva e a captação do ferro através do grupo heme (SILVA-BAILÃO et al., 2014).

#### **1.4 Hecpidina**

A hepcidina, primeiramente denominada como proteína antimicrobiana 1, expressa no fígado (LEAP-1), é um peptídeo composto por 20 a 25 aminoácidos, com predomínio de cisteína, sintetizado principalmente pelos hepatócitos. Foi demonstrada a sua atividade em inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas como *Bacillus megaterium*, bactérias Gram-

negativas como *Neisseria cinerea* e de levedura como *Saccharomyces cerevisiae* (KRAUSE et al., 2000).

Posteriormente, este mesmo peptídeo foi detectado na urina humana, também com ação antimicrobiana e devido a sua síntese ser predominantemente nas células hepáticas, os pesquisadores denominaram este peptídeo de hepcidina. Além da atividade inibitória contra bactérias, os autores mostram que este peptídeo também apresenta atividade antifúngica contra *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus niger* (PARK et al., 2001).

Além da atividade antimicrobiana, outros estudos demonstram que a hepcidina circulante também atua na regulação das concentrações plasmáticas do ferro no organismo hospedeiro em várias condições fisiopatológicas, podendo aumentar ou diminuir a liberação de ferro das células do sistema mononuclear fagocitário (GANZ, 2003; NICOLAS et al., 2002).

A regulação da hepcidina pode ocorrer em situações em que há excesso de ferro no organismo ou durante processos inflamatórios/infecciosos, que estimulam a resposta inume a liberar interleucinas como a interleucina-6 (IL-6) e a interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). Estudos mostraram que IL-6 age diretamente nos hepatócitos estimulando a síntese de hepcidina (LEE et al., 2005; NEMETH et al., 2004). Níveis elevados de hepcidina inibem a liberação de ferro pelos macrófagos e pelos enterócitos e a absorção de ferro pelas células intestinais. Isso leva a uma diminuição de ferro ligado à proteína de transporte, transferrina, que conseqüentemente diminui a eritropoiese induzindo a anemia da inflamação (NICOLAS et al., 2002; PIGEON et al., 2001). Este processo ocorre quando a hepcidina liga-se à ferroportina, formando um complexo e inativando a ferroportina com a sua degradação. Conseqüentemente, os níveis séricos de ferro diminuem no organismo. O ferro que não é exportado dos enterócitos e, ou dos macrófagos para o plasma, ficará armazenado no citosol em forma de ferritina, podendo levar a uma sobrecarga de ferro nestas células. Em contraste, quando no organismo há uma diminuição de ferro, seja devido a uma anemia ou hipoxemia, a síntese de hepcidina é inibida, favorecendo a absorção de ferro pelos enterócitos e, ou a reciclagem de ferro pelos macrófagos e a saída do ferro destas células. Portanto, a ferroportina é o receptor da hepcidina e a interação hepcidina-ferroportina controla os níveis de ferro nos enterócitos, hepatócitos e macrófagos, sendo elemento chave para a regulação de ferro corpóreo (NEMETH, 2004; NICOLAS et al., 2002).

Sabe-se que, na PCM, diversas alterações sistêmicas ocorrem no organismo dos pacientes, que podem se refletir na celularidade sanguínea e no metabolismo do ferro. Neste contexto, hemograma, ferritina e ferrograma, são exames simples, acessíveis e de baixo custo que auxiliam no manejo clínico de diversas doenças infecciosas, na avaliação diagnóstica e, ou

de gravidade. No entanto, pouco se conhece sobre as alterações nesses exames na forma crônica da PCM e para contribuir com o conhecimento da dinâmica das células hematológicas, bem como das alterações do metabolismo do ferro, apresentamos três estudos com pacientes na forma crônica da PCM antes do tratamento e no processo de cura. Esses estudos poderão contribuir para o melhor monitoramento e seguimento terapêutico de pacientes com esta micose sistêmica.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Analisar e interpretar os aspectos hematológicos, bem como o metabolismo do ferro em diferentes compartimentos e o papel da hepcidina em pacientes com PCM crônica durante o processo de cura.

### **2.2 Específicos**

Para atender o objetivo geral foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- a) Avaliar a dinâmica das células do sangue periférico através do hemograma e analisar parâmetros de imaturidade celular em pacientes com PCM crônica, antes e durante o tratamento;
- b) Analisar os diferentes compartimentos de ferro em pacientes com PCM crônica e correlacionar com a atividade inflamatória sistêmica;
- c) Analisar os níveis de hepcidina sérica em pacientes com PCM crônica antes e depois do tratamento e correlacionar com a atividade inflamatória.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, R. et al. Clinical relevance of peripheral blood eosinophil count in allergic bronchopulmonary aspergillosis. **Journal of Infection and Public Health**, v. 4, n. 5–6, p. 235–243, nov. 2011.
- ANDREWS, N. Molecular control of iron metabolism. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 18, n. 2, p. 159–169, jun. 2005.
- ANNIBALE, B.; CAPURSO, G.; DELLE FAVE, G. The stomach and iron deficiency anaemia: a forgotten link. **Digestive and Liver Disease**, v. 35, n. 4, p. 288–295, abr. 2003.
- ANSARI-LARI, M. A.; KICKLER, T. S.; BOROWITZ, M. J. Immature Granulocyte Measurement Using the Sysmex XE-2100: Relationship to Infection and Sepsis. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 120, n. 5, p. 795–799, nov. 2003.
- APPELBERG, R. Macrophage nutritive antimicrobial mechanisms. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 79, n. 6, p. 1117–1128, 30 mar. 2006.
- ARISTIZÁBAL, B. H. et al. Experimental paracoccidioides brasiliensis infection in mice: influence of the hormonal status of the host on tissue responses. **Medical Mycology**, v. 40, n. 2, p. 169–178, abr. 2002.
- AYDEMIR, H. et al. Platelet and mean platelet volume kinetics in adult patients with sepsis. **Platelets**, v. 26, n. 4, p. 331–335, 2015.
- BENARD, G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4–5, p. 209–221, maio 2008.
- BLOTTA, M. H. et al. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 3, p. 390–394, set. 1999.
- BUITRAGO, M. J. et al. Histoplasmosis and Paracoccidioidomycosis in a Non-Endemic Area: A Review of Cases and Diagnosis. **Journal of Travel Medicine**, v. 18, n. 1, p. 26–33, 1 jan. 2011.
- CALDRER, S. et al. Soil-Transmitted Helminths and Anaemia: A Neglected Association Outside the Tropics. **Microorganisms**, v. 10, n. 5, p. 1027, 13 maio 2022.
- CANÇADO, R. D.; CHIATTONE, C. S. Anemia de Doença Crônica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 24, n. 2, abr. 2002.
- COELHO, H. C. C. et al. Thrombocytopenia in Plasmodium vivax malaria is related to platelets phagocytosis. **PloS One**, v. 8, n. 5, p. e63410, 2013.
- CONRAD, M. E.; UMBREIT, J. N.; MOORE, E. G. Iron Absorption and Transport: **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 318, n. 4, p. 213, out. 1999.
- COUTINHO, Z. F. et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 5, p. 1441–1454, out. 2002.

DE CAMARGO, Z. P. Serology of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4–5, p. 289–302, abr. 2008.

DE OLIVEIRA CUSTÓDIO, J. M. et al. Dynamics of plasma micronutrient concentrations and their correlation with serum proteins and thyroid hormones in patients with paracoccidioidomycosis. **PLOS ONE**, v. 14, n. 12, p. e0226609, 26 dez. 2019.

DEL NEGRO, G. M. B. et al. The sensitivity, specificity and efficiency values of some serological tests used in the diagnosis of paracoccidioidomycosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, n. 4, p. 277–280, ago. 1991.

DOEDENS, A. L. et al. Hypoxia-inducible factors enhance the effector responses of CD8+ T cells to persistent antigen. **Nature Immunology**, v. 14, n. 11, p. 1173–1182, nov. 2013.

GANZ, T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. **Blood**, v. 102, n. 3, p. 783–788, 1 ago. 2003.

GROTTO, H. Z. W. Diagnóstico laboratorial da deficiência de ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, p. 22–28, jun. 2010.

GRUENHEID, S. et al. Natural Resistance to Infection with Intracellular Pathogens: The Nramp1 Protein Is Recruited to the Membrane of the Phagosome. **Journal of Experimental Medicine**, v. 185, n. 4, p. 717–730, 17 fev. 1997.

HENTZE, M. W.; MUCKENTHALER, M. U.; ANDREWS, N. C. Balancing Acts. **Cell**, v. 117, n. 3, p. 285–297, abr. 2004.

HOFFBRAND, A. V. et al. **Fundamentos em hematologia**. Porto Alegre: Artmed, 2006.

ISHAQ, U. et al. Eosinopenia in Patients With Typhoid Fever: A Case-Control Study. **Cureus**, v. 12, n. 9, p. e10359, 10 set. 2020.

ISHII, T. et al. Clinical differentiation of infectious mononucleosis that is caused by Epstein-Barr virus or cytomegalovirus: A single-center case-control study in Japan. **Journal of Infection and Chemotherapy: Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy**, v. 25, n. 6, p. 431–436, jun. 2019.

JELKMANN, W. Proinflammatory Cytokines Lowering Erythropoietin Production. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 18, n. 8, p. 555–559, ago. 1998.

KASSEBAUM, N. J. et al. A systematic analysis of global anemia burden from 1990 to 2010. **Blood**, v. 123, n. 5, p. 615–624, 30 jan. 2014.

KRAUSE, A. et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. **FEBS Letters**, v. 480, n. 2–3, p. 147–150, 1 set. 2000.

KRISHNAMURTHY, P.; XIE, T.; SCHUETZ, J. The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 114, n. 3, p. 345–358, jun. 2007.

LAVOIGNET, C.-E. et al. White blood cell count and eosinopenia as valuable tools for the diagnosis of bacterial infections in the ED. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology**,

v. 38, n. 8, p. 1523–1532, ago. 2019.

LEDER, K.; WELLER, P. F. Eosinophilia and helminthic infections. **Bailliere's Best Practice & Research. Clinical Haematology**, v. 13, n. 2, p. 301–317, jun. 2000.

LEE, G. R. The anemia of chronic disease. **Seminars in Hematology**, v. 20, n. 2, p. 61–80, abr. 1983.

LEE, P. et al. Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 6, p. 1906–1910, 8 fev. 2005.

LIEU, P. T. et al. The roles of iron in health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 22, n. 1–2, p. 1–87, fev. 2001.

LONDERO, A. T. Paracoccidioidomicose: patogenia, formas clínicas, manifestações pulmonares e diagnóstico. **Jornal de Pneumologia**. v. 2, p. 41–57, mar. 1986.

LOOSE, D. S. et al. Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 80, n. 24, p. 7659–7663, 1 dez. 1983.

MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycosis: the dimension of the problem of a neglected disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 480–480, ago. 2010.

MARTINEZ, R. EPIDEMIOLOGY OF PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. suppl 19, p. 11–20, set. 2015.

MENDES, R. P. et al. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. **The Open Microbiology Journal**, v. 11, n. 1, p. 224–282, 31 out. 2017.

MOTA, N. G. S. et al. Mononuclear cell subsets in patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. **Medical Mycology**, v. 26, n. 2, p. 105–111, jan. 1988.

NEMETH, E. et al. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 9, p. 1271–1276, maio 2004.

NEMETH, E. Hepcidin Regulates Cellular Iron Efflux by Binding to Ferroportin and Inducing Its Internalization. **Science**, v. 306, n. 5704, p. 2090–2093, 17 dez. 2004.

NEMETH, E.; GANZ, T. Anemia of Inflammation. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 28, n. 4, p. 671–681, ago. 2014.

NICOLAS, G. et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 7, p. 1037–1044, 1 out. 2002.

NOGUEIRA, M. G. DOS S. et al. Aspectos laboratoriais evolutivos de crianças em tratamento da paracoccidioidomicose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 5, p. 478–483, out. 2006.

NOGUEIRA, M. G. DOS S.; ANDRADE, G. M. Q. Paracoccidioidomycosis in children and

adolescents. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 25, n. 2, 2015.

OZAKI, K. S. et al. Diagnóstico de paracoccidiodomicose disseminada grave em aspirado de medula óssea: relato de caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, n. 4, p. 363–366, ago. 1996.

PAIVA, A. A.; RONDÓ, P. H.; GUERRA-SHINOHARA, E. M. Parâmetros para avaliação do estado nutricional de ferro. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 4, p. 421–426, ago. 2000.

PANIAGO, A. M. M. et al. Paracoccidiodomicose: estudo clínico e epidemiológico de 422 casos observados no Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 4, p. 455–459, jul. 2003.

PARK, C. H. et al. Hepcidin, a Urinary Antimicrobial Peptide Synthesized in the Liver. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 11, p. 7806–7810, mar. 2001.

PEERSCHKE, E. I. B.; PESSIN, M. S.; MASLAK, P. Using the hemoglobin content of reticulocytes (RET-He) to evaluate anemia in patients with cancer. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 142, n. 4, p. 506–512, out. 2014.

PEREIRA, R. M. et al. Paracoccidiodomycosis in children: clinical presentation, follow-up and outcome. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 3, p. 127–131, jun. 2004.

PIGEON, C. et al. A New Mouse Liver-specific Gene, Encoding a Protein Homologous to Human Antimicrobial Peptide Hepcidin, Is Overexpressed during Iron Overload. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 11, p. 7811–7819, mar. 2001.

RENSHAW, A. A.; GOULD, E. W. Thrombocytosis is associated with Mycobacterium tuberculosis infection and positive acid-fast stains in granulomas. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 139, n. 5, p. 584–586, maio 2013.

RESTREPO, A. et al. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidiodomycosis. **Infection and Immunity**, v. 46, n. 2, p. 346–353, 1984.

ROBBINS, S. L. (STANLEY L. et al. **Patologia [de] Robbins e Cotran: bases patológicas das doenças**. Rio de Janeiro (RJ): Elsevier, 2005.

ROMANELI, M. T. DAS N. et al. Acute-subacute paracoccidiodomycosis: A paediatric cohort of 141 patients, exploring clinical characteristics, laboratorial analysis and developing a non-survival predictor. **Mycoses**, v. 62, n. 11, p. 999–1005, nov. 2019.

ROY, C. N.; ENNS, C. A. Iron homeostasis: new tales from the crypt. **Blood**, v. 96, n. 13, p. 4020–4027, 15 dez. 2000.

SHANKAR, J. et al. Influence of 17 $\beta$ -Estradiol on Gene Expression of *Paracoccidioides* during Mycelia-to-Yeast Transition. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, p. e28402, 14 dez. 2011.

SILVA-BAILÃO, M. G. et al. Hydroxamate Production as a High Affinity Iron Acquisition Mechanism in *Paracoccidioides* spp. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e105805, 26 ago. 2014.

SPAAN, A. N. et al. Neutrophils versus Staphylococcus aureus: a biological tug of war. **Annual Review of Microbiology**, v. 67, p. 629–650, 2013.

SRAI, S. K. S.; BOMFORD, A.; MCARDLE, H. J. Iron transport across cell membranes: molecular understanding of duodenal and placental iron uptake. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 15, n. 2, p. 243–259, jun. 2002.

SUGUIURA, I. M. S.; ONO, M. A. Compulsory notification of paracoccidioidomycosis: A 14-year retrospective study of the disease in the state of Paraná, Brazil. **Mycoses**, v. 65, n. 3, p. 354–361, mar. 2022.

THEURL, I. et al. Regulation of iron homeostasis in anemia of chronic disease and iron deficiency anemia: diagnostic and therapeutic implications. **Blood**, v. 113, n. 21, p. 5277–5286, 21 maio 2009.

TURISSINI, D. A. et al. Species boundaries in the human pathogen Paracoccidioides. **Fungal Genetics and Biology**, v. 106, p. 9–25, set. 2017.

VENTURINI, J. et al. Phenotypic and functional evaluations of peripheral blood monocytes from chronic-form paracoccidioidomycosis patients before and after treatment. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 552, dez. 2014.

WEISS, G.; GANZ, T.; GOODNOUGH, L. T. Anemia of inflammation. **Blood**, v. 133, n. 1, p. 40–50, 03 2019.

XU, Y. et al. Glycolysis determines dichotomous regulation of T cell subsets in hypoxia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 126, n. 7, p. 2678–2688, 13 jun. 2016.

**CAPÍTULO II**

---

---

## **Artigo 1 – Análise e interpretação do hemograma no tratamento da paracoccidioidomicose crônica**

### **Resumo**

Micose sistêmica prevalente no Brasil, a paracoccidioidomicose (PCM) leva a alterações hematológicas que ocorrem como uma resposta do organismo hospedeiro frente ao agente infeccioso durante o processo inflamatório. Anemia, leucocitose, eosinofilia e linfocitose, tem sido relatado principalmente na forma aguda/subaguda da PCM. Com o objetivo de avaliar o hemograma de pacientes com PCM crônica antes do início e durante diferentes estágios do tratamento, realizou-se um estudo com pacientes de um hospital universitário atendidos no período de 2013 a 2021. Foram incluídos pacientes com o diagnóstico confirmado da forma crônica da PCM. Durante o seguimento ambulatorial de rotina, hemograma completo e proteína C reativa (PCR) foram realizados em diferentes estágios do tratamento: antes do tratamento (E0), entre o início do tratamento e após a melhora clínica (E1), em cura clínica (E2) e cura sorológica (E3). Na análise estatística, o teste t pareado ou teste Wilcoxon e o teste ANOVA ou Friedman foram utilizados para a comparação de dois ou mais estágios, respectivamente. Para as variáveis categóricas, o teste Q de Cochran e teste McNemar foram usados para a associação entre todos os estágios ou entre dois estágios, respectivamente. O nível de significância estabelecido foi de  $p < 0,05$ . Participaram do estudo 62 pacientes, com média de idade de 54,3 (DP 6,9) anos e a maioria dos participantes eram homens (96,8%). Na análise hematológica, antes do tratamento, as principais alterações observadas foram anemia (45,2%), classificada em normocítica e normocrômica (33,9%), monocitose (38,7%) e leucocitose (17,7%). Entre o início do tratamento e desaparecimento dos sinais e sintomas, verificou-se uma redução no número de pacientes com anemia, monocitose e neutrofilia. Também foi observado aumento significativo da hemoglobina (Hb) e redução de leucócitos, monócitos, neutrófilos e plaquetas. Das variáveis analisadas, anemia e PCR elevada foram mais frequentes nos casos graves da PCM do que nos casos leves ou moderados. Conclui-se que a PCM crônica induz alterações hematológicas, principalmente na série vermelha, porém estas alterações não são tão intensas. Ressalta-se a monocitose como uma alteração frequente, o que reflete o papel dos monócitos na resposta imunológica inata quanto na adquirida frente a PCM.

**Palavras-chave:** Anemia; Hemograma; Leucocitose; Monocitose; Paracoccidioidomicose.

## Introdução

Paracoccidiodomicose (PCM) é uma micose sistêmica endêmica na América Latina e seu agente etiológico são fungos do gênero *Paracoccidioides* (MENDES et al., 2017). O Brasil é considerado o centro endêmico dessa doença, sendo esta apontada como a oitava causa de óbito por doença infecciosa crônica no país (COUTINHO et al., 2002).

A infecção acomete primariamente os pulmões e a partir deste sítio pode se disseminar por via linfática e hematogênica para quaisquer outros órgãos. Na maioria dos indivíduos que inalam o fungo, a evolução da infecção é contida e o adoecimento dependerá do tamanho do inóculo, da patogenicidade e da virulência do fungo, assim como da resposta imunológica e de possíveis fatores genéticos (LONDERO, 1986).

A PCM pode ser classificada nas formas aguda/subaguda (FA) e crônica (FC). A FA é conhecida como a forma juvenil, pois acomete crianças, jovens e adultos de ambos os sexos com menos de 30 anos. A FC ou do adulto, afeta indivíduos adultos maiores de 30 anos, geralmente do sexo masculino e com quadro clínico prolongado (MENDES et al., 2017), sendo considerada a forma mais comum na prática clínica, responsável por 75% a 90% dos casos (BELLISSIMO-RODRIGUES et al., 2013; MATOS et al., 2012; PANIAGO et al., 2003).

As interações parasita-hospedeiro na PCM e as consequentes respostas inflamatórias do organismo podem levar a alterações das células hematológicas, tais como anemia, leucocitose e eosinofilia (PEREIRA et al., 2004). Achados são mais relatados na forma aguda e subaguda da doença.

Poucos estudos sobre células sanguíneas na PCM crônica, têm sido descritos e revelam alterações no número de eritrócitos, hemoglobina (DE OLIVEIRA CUSTÓDIO et al., 2019) bem como alterações das subpopulações de monócitos e linfócitos em pacientes não tratados (DOEDENS et al., 2013; VENTURINI et al., 2014; XU et al., 2016).

O hemograma é um exame simples, realizado na rotina da maioria das unidades de saúde e importante no manejo clínico das doenças infecciosas. É fundamental para elucidar se a medula óssea está desempenhando corretamente suas funções com produção e diferenciação celular adequadas, a gravidade do quadro, e a resposta ao tratamento.

Com vistas a contribuir com o conhecimento sobre as alterações das células hematológicas na forma crônica da PCM e no monitoramento do tratamento, o estudo avaliou o hemograma desses pacientes antes do início e durante diferentes estágios do tratamento.

## Pacientes e métodos

### **Aspectos éticos**

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (CEP - UFMS) (número CAAE 21534919.2.0000.0021). Todos os participantes assinaram consentimento informado.

### **Desenho, local e período de estudo**

Este foi um estudo prospectivos, quantitativo, epidemiológico, observacional, avaliando parâmetros hematológicos de pacientes com PCM crônica antes do início do tratamento e durante o processo de cura.

Este estudo foi desenvolvido no ambulatório de micoses sistêmicas da Unidade de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian (UNIDIP-HUMAP), da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (HU-UFMS), em Campo Grande/MS, com pacientes diagnosticados entre os anos de 2013 a 2021.

### **Pacientes**

#### **Crítérios de Inclusão e Exclusão**

Foram incluídos indivíduos de ambos os sexos, com PCM na forma crônica, e excluídos os que não tinham exames hematológicos antes do início do tratamento, os que não tinham nenhum outro exame hematológico de seguimento e os que tinham outras condições médicas que pudessem anemia tais comoinfecção pelo HIV, tuberculose neoplasia, doença autoimune ou doença renal crônica.

#### **Definição de caso**

Foi considerado caso de PCM, pacientes com manifestações clínicas sugestivas e um dos seguintes: a) identificação de formas típicas de leveduras do gênero *Paracoccidioides* spp. em amostras clínicas no exame micológico direto, cultura ou histopatológico; b) detecção de anticorpos específicos no soro pelo teste de imunodifusão em gel de ágar duplo (IDD).

#### **Dados clínicos e demográficos**

Dados clínicos foram obtidos de um protocolo padronizado preenchido no primeiro atendimento de cada paciente e em seu seguimento. Dados relacionados a sexo, idade, histórico da ocupação profissional, hábitos de vida e as informações clínicas como a gravidade da doença e o tratamento antifúngico instituído foram sistematicamente coletadas durante o atendimento.

A PCM foi classificada em leve, moderada ou grave, conforme descrito abaixo.

Forma leve: foram aqueles que apresentavam uma diminuição de índice de massa corporal (IMC) menor que 5% do habitual e o acometimento de um ou poucos órgãos, ou tecidos sem alterações funcionais.

Forma grave: foram aqueles que envolveram três ou mais dos seguintes critérios: a) perda de IMC igual ou superior a 10%; b) comprometimento pulmonar intenso; c) comprometimento de outros órgãos, tais como glândulas adrenais, sistema nervoso central e ossos; d) presença de aumento de linfonodos em múltiplas cadeias na forma pseudotumoral superficial ou profunda (> 2,0 cm de diâmetro, sem supuração) ou na forma supurativa; e) presença de anticorpos com títulos elevados.

Forma moderada: Foram aqueles casos intermediários entre formas leves e graves (MENDES et al., 2017).

Os dados laboratoriais foram obtidos em quatro diferentes estágios do tratamento no seguimento ambulatorial de rotina:

**E0** – antes do tratamento;

**E1** –após melhora clínica;

**E2** – cura clínica (desaparecimento de sinais e sintomas);

**E3** – cura sorológica (sorologia negativa pelo método de imunodifusão dupla, sustentada por 6 meses); ou pelo menos seis meses de cura clínica nos pacientes com soro não reagente.

Os critérios de cura clínica e sorológica utilizados foram os definidos previamente por (MENDES et al., 2017).

## **Procedimentos**

Durante os estágios da doença os pacientes foram submetidos aos seguintes exames.

1) Hemograma, determinado pelo equipamento hematológico da Série-XN 3000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan);

Parâmetros de imaturidade celular do hemograma foram realizados apenas nos pacientes incluídos após 2017, ano em que o software foi incluído no equipamento hematológico e estava disponível para ser utilizado.

Dentre estas células imaturas quantificadas estão os granulócitos imaturos (IG) que englobam a contagem de mielócitos, metamielócitos e promielócitos; o conteúdo de hemoglobina de reticulócitos (Ret-He) o qual é utilizado para avaliar a deficiência funcional de ferro, ou seja, avalia a incorporação de ferro na produção da

hemoglobina; a fração de reticulócitos imaturos (IRF) que avalia a produção de reticulócitos e o índice de plaquetas reticuladas (IPF) que auxilia na avaliação da trombopoiese.

- 2) Proteína C-Reativa (PC-R) pelo método imunoturbidimétrico (Cobas 600 Analyzer E501) do HUMAP/UFMS. Valores de referência: 0 a 5,0 mg/L.

Os parâmetros analisados e os valores considerados normais pelo fabricante estão descritos no **Quadro 1**.

**Quadro 1** –Parâmetros hematológicos analisados e valores de normalidade fornecidos pelo fabricante.

<b>Parâmetros hematológicos analisados</b>	<b>Valores de referência fornecido pelo fabricante</b>
<b>Parâmetros da série vermelha</b>	
Contagem total de eritrócitos	4,5 a 5,9 milhões/mm <sup>3</sup>
Hemoglobina (Hb)	13,5 to 17 g/dL
Hematócrito (Ht)	41 a 53%
Volume corpuscular médio da hemoglobina (VCM)	82 a 97 fL
Concentração média de hemoglobina (HCM)	25 a 34 Pg
RDW- CV	11,5 a 15,0 %
RDW -SD	42,5±3,5 fL
<b>Parâmetros da série branca</b>	
Contagem total de leucócitos	4500 a 11000/mm <sup>3</sup>
Neutrófilos	1845 a 8470/mm <sup>3</sup>
Linfócitos	990 a 4840/mm <sup>3</sup>
Monócitos	45 a 880/mm <sup>3</sup>
Eosinófilos	45 a 880/mm <sup>3</sup>
Basófilos	0 a 220/mm <sup>3</sup>
<b>Parâmetro Plaquetário</b>	
Plaquetas	150 a 450 mil/mm <sup>3</sup>
<b>Parâmetros de imaturidade celular</b>	
Granulócitos imaturos (IG)%; (IG)#	0 a 0,6%; 0 a 0,06 x10 <sup>3</sup> /uL
Reticulócitos (Ret)%	0,5 a 2,5%
Conteúdo de hemoglobina de reticulócitos (Ret-He)	28 a 36 Pg
Fração de reticulócitos imaturos (IRF)	1,6 a 10,5%

Fonte: (PEKELHARING et al., 2010).

### **Análise estatística**

A análise estatística foi realizada no software Jamovi (Version 1.6) para Windows (THE JAMOVI PROJECT, 2021). Para determinar se as variáveis contínuas estavam distribuídas de acordo com a distribuição normal, utilizou-se o teste Shapiro-Wilk. Os dados que seguiram uma

distribuição normal foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (DP). Os dados que não seguiram distribuição normal foram apresentados como mediana e primeiro e terceiro quartis [Q1;Q3]. Utilizou-se do teste ANOVA e/ou Friedman para comparação das variáveis contínuas entre os diferentes estágios (E0, E1, E2 e E3). Foi aplicado o teste t de student ou Wilcoxon W para a comparação das variáveis contínuas em dois estágios (E0 vs. E2) quando houve distribuição normal ou não normal, respectivamente. Nas variáveis categóricas utilizou o teste Q de Cochran entre os diferentes estágios e teste McNemar para a associação entre dois estágios E0 e E2.

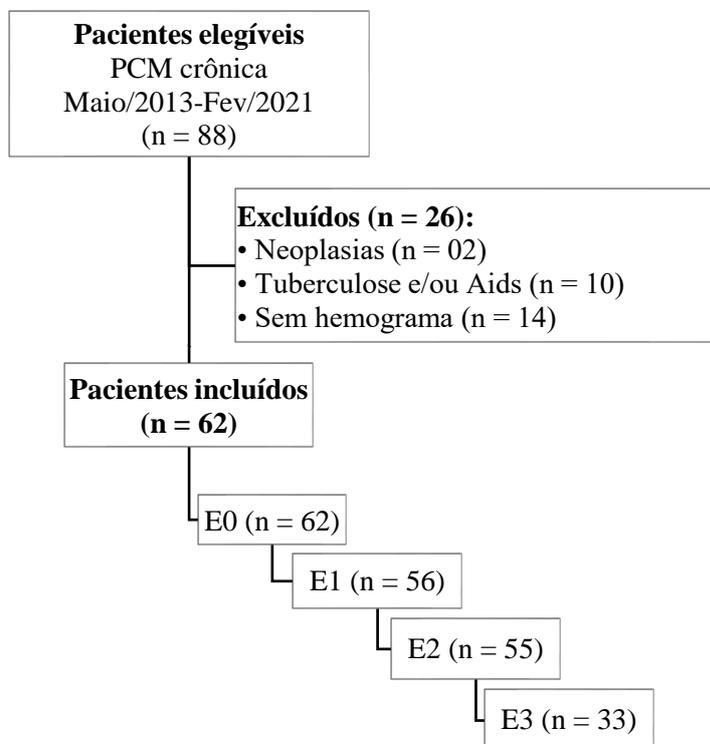
Para análise de variáveis categóricas e numéricas em uma única amostra, utilizou-se o teste de proporção e teste t para uma amostra, respectivamente. O valor esperado para as variáveis categóricas eram iguais para cada subtipo.

Para todos os testes foi adotado como nível de significância valores de  $p < 0,05$ .

## **Resultados**

Foram diagnosticados 88 pacientes com a forma crônica da PCM entre o período de maio de 2013 a fevereiro de 2021, com uma média de 7,8 casos novos por ano. Desse total, 26 pacientes foram excluídos conforme os critérios já citados e 62 pacientes participaram do estudo (**Figura 1**).

**Figura 1** – Fluxograma da seleção de participantes com paracoccidioidomicose na forma crônica no período de 2013 a 2021.



Quase todos os pacientes eram homens ( $n = 60$ ; 96,8%), com média de idade de 54,3 (DP 6,9) anos, lavradores ou ex-lavradores ( $n = 55$ ; 90,2%), tabagistas ou ex-tabagistas ( $n = 58$ ; 93,5%), e com gravidade moderada ( $n = 37$ ; 59,7%) (**Tabela 01**).

**Tabela 1** – Pacientes com forma crônica da paracoccidiodomicose segundo as variáveis sócio-demográficas atendidos no Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian entre 2013 e 2021 (n = 62)

<b>Variáveis</b>	<b>n (%)</b>	<b>IC 95%</b>		<b>p</b>
<b>Sexo</b>				<0,001
Masculino	60 (96,8)	88,8	99,6	
Feminino	02 (3,2)	0,4	11,2	
<b>Idade *</b>	54,3 (6,9)	52,6	56,1	<0,001
<b>Atividade Rural</b>				<0,001
Sim <sup>‡</sup>	55 (88,7)	78,1	95,3	
Nunca	06 (9,7)	3,6	19,8	
Ignorada <sup>‡</sup>	01 (1,6)	0,0	8,6	
<b>Uso de Tabaco</b>				<0,001
Regular	51 (82,3)	70,5	90,8	
Ex-tabagista	07 (11,3)	4,6	21,9	
Nunca	04 (6,5)	1,8	15,7	
<b>Gravidade da PCM</b>				<0,001
Moderada	37 (59,7)	46,5	72,0	
Grave	17 (27,4)	16,8	40,2	
Leve	08 (12,9)	5,7	23,8	
<b>Antifúngico</b>				0,042
Itraconazol	39 (62,9)	49,7	74,8	
Cotrimoxazol	23 (37,1)	25,2	50,3	

IC: intervalo de confiança; n: número de pacientes; \*média (desvio padrão -DP); Atividade rural: Sim<sup>‡</sup>: indivíduos que realizassem trabalho rural no presente, ou no passado; Ignorada: não entrou na análise estatística; teste estatístico: Teste de proporção; Teste t para uma amostra

O hemograma dos pacientes foi acompanhado durante o processo de cura da doença, ou seja, em quatro diferentes estágios. No entanto, nem todos os pacientes conseguiram atingir todos os estágios. Notou-se que o tempo mediano para que os pacientes atingissem o estágio 1 foi de dois meses [Q1; Q3: 1; 3]. Para aqueles que alcançaram o estágio 2, o tempo mediano foi de 5 meses [Q1; Q3: 4; 8,5], e, para aqueles que atingiram o estágio 3, a mediana de tempo foi de 16 meses [Q1; Q3: 13; 25].

Os resultados mostraram que 84,0% dos indivíduos com PCM em E0 (n = 62) (antes do tratamento) apresentaram algum tipo de alteração nos índices hematológicos.

### **Série vermelha**

Ao analisar os parâmetros da série vermelha antes do tratamento (E0; n = 62), 58,1% dos pacientes apresentaram pelo menos uma alteração nessa série.

A anemia foi observada antes do tratamento (E0; n = 62) em 28 (45,2%) pacientes (**Tabela 2**) e destes, 21 (75,0%) apresentaram anemia classificada como normocítica e normocrômica.

Ao acompanhar o processo de cura em pacientes avaliados em todos os estágios, E0 a E3, n = 29, notou-se que a quantidade de indivíduos com anemia apresentou uma tendência a reduzir (**Tabela 3**). No entanto uma redução significativa pode ser observada entre E0 e E2 (**Tabela 4**).

Os valores das medidas centrais da maioria dos parâmetros da série vermelha aumentaram após a administração de antifúngico (**Tabela 5 e Tabela 6**).

Em relação aos parâmetros de imaturidade celular incluídos ao hemograma, que avaliam as células imaturas, na série vermelha foram analisados: reticulócitos (RET); fração de reticulócitos imaturos (IRF) e conteúdo de hemoglobina de reticulócitos (RET-He). Em doze pacientes e em apenas dois estágios da doença essas variáveis foram analisadas e notou-se que os valores médios do RET-HE antes do tratamento foram mais baixos em relação ao E2 (**Tabela 7**).

### **Série branca e índice plaquetário**

Ao analisar os parâmetros da série branca na fase E0 (n = 62) da doença, 80,6% dos pacientes apresentaram pelo menos uma alteração neste parâmetro. Observou-se a presença de leucocitose, monocitose, eosinofilia, neutrofilia e uma linfopenia em alguns pacientes antes do tratamento (**Tabela 2**).

No decorrer do processo de cura da PCM, incluindo 29 pacientes avaliados de E0 a E3, as frequências das alterações em células brancas não se modificam significativamente (**Tabela 3**). No entanto, entre o início do tratamento e desaparecimento dos sinais e sintomas (E0 vs E2, n = 55), verificou-se redução no número de pacientes com neutrofilia e monocitose (**Tabela 4**). Entre estes dois estágios, observa-se também, redução de leucócitos, monócitos e neutrófilos (**Tabela 6**).

Na análise das células imaturas observou-se uma redução significativa no percentual de IG entre os estágios antes do tratamento (E0) e na cura clínica (E2) em 12 pacientes (**Tabela 7**).

Plaquetose esteve presente em 9,7% dos pacientes antes do tratamento (E0, n = 62). Ao acompanhar o processo de cura em pacientes avaliados em todos dos estágios, E0 a E3, n = 29, notou-se que a quantidade de indivíduos com plaquetose teve uma tendência a reduzir (**Tabela 3**).

Observou-se uma diminuição significativa no número de plaquetas após iniciar o tratamento, ainda que tenham permanecido dentro a faixa de valores de normalidade. (**Tabela 5 e Tabela 6**).

**Tabela 2** - Número e percentual de indivíduos com alterações hematológicas antes do tratamento (n=62) paracoccidiodomicose crônica.

<b>Variáveis</b>	<b>n (%)</b>
Anemia*	28 (45,2)
Leucopenia #	03 (4,8)
Leucocitose #	11 (17,7)
Neutropenia #	02 (3,2)
Neutrofilia #	08 (12,9)
Monocitose #	24 (38,7)
Eosinofilia #	06 (9,7)
Linfopenia #	06 (9,7)
Linfocitose #	-
Plaquetose #	06 (9,7)

E0 – antes do tratamento; \* Anemia: valores de hemoglobina <13,5 g/dL; (#) valores absolutos; (%) valores relativos; (-) não houve alteração.

**Tabela 3** – Número e percentual de pacientes com alterações hematológicas nos diferentes estágios da paracoccidioidomicose crônica.

<b>Variáveis</b>	<b>E0 (n = 29) n (%)</b>	<b>E1(n = 29) n (%)</b>	<b>E2(n = 29) n (%)</b>	<b>E3(n = 29) n (%)</b>	<b>p</b>
Anemia*	08 (27,6)	06 (20,7)	06(20,7)	03 (10,3)	0,063
Leucopenia #	01 (3,4)	01 (3,4)	01 (3,4)	02 (6,9)	0,845
Leucocitose #	06 (20,7)	05 (17,2)	06 (20,7)	05 (17,2)	0,940
Neutropenia #	01 (3,4)	02 (6,9)	02 (6,9)	03 (10,3)	0,261
Neutrofilia #	03 (10,3)	01 (3,4)	01 (3,4)	04 (13,8)	0,234
Monocitose #	11 (37,9)	06(20,7)	04 (13,8)	07 (24,1)	0,059
Eosinofilia #	03 (10,3)	05 (17,2)	04 (13,8)	04 (13,8)	0,634
Linfopenia #	01 (3,4)	-	03 (5,4)	01(3,0)	0,392
Linfocitose #	-	-	-	-	-
Plaquetose #	03 (10,3)	01 (3,4)	-	-	<b>0,066</b>

E0 – antes do tratamento; E1- entre o início do tratamento e após a melhora clínica; E2 – cura clínica; E3 – cura sorológica; \* Anemia: valores de hemoglobina <13,5g/dL; # valores absolutos; n: número de indivíduos; %: porcentagem; (-) não houve alteração; teste estatístico: teste Q de Cochran.

**Tabela 4** – Número e percentual de pacientes com alterações hematológicas antes do tratamento e em cura clínica da paracoccidioidomicose crônica.

<b>Variáveis</b>	<b>E0 (n = 55) n (%)</b>	<b>E2(n = 55) n (%)</b>	<b>p</b>
Anemia*	21 (39,2)	11(20,0)	<b>0,008</b>
Leucopenia #	03 (5,5)	04 (7,3)	0,564
Leucocitose #	11 (20,0)	08 (14,5)	0,366
Neutropenia #	02 (3,6)	03 (5,5)	0,317
Neutrofilia #	08 (14,5)	01 (1,8)	<b>0,020</b>
Monocitose #	22 (40,0)	09 (16,4)	<b>0,003</b>
Eosinofilia #	05 (9,1)	05 (9,1)	1,000
Linfopenia #	05 (9,1)	03 (5,5)	0,414
Plaquetose	05 (9,1)	-	-

E0 – antes do tratamento; E2 – cura clínica; \*Anemia: valores de hemoglobina <13,5 g/dL # valores absolutos; n: número de indivíduos; %: porcentagem; teste estatístico: Teste McNemar.

**Tabela 5** – Dinâmica dos parâmetros hematológicos de pacientes com a forma crônica da paracoccidiodomicose durante o processo de cura.

Variáveis	E0 (n = 29) média (DP) ou mediana [Q1;Q3]	E1(n = 29) média (DP) ou mediana [Q1;Q3]	E2(n = 29) média (DP) ou mediana [Q1;Q3]	E3(n = 29) média (DP) ou mediana [Q1-Q3]	p
<b>Série vermelha</b>					
Eritrócitos milhões/mm <sup>3</sup>	4,7 (0,5)	4,8 (0,5)	4,8 (0,5)	4,9 (0,6)	0,101
Hb g/dL	13,9 (1,6) <sup>a</sup>	14,2 (1,3) <sup>ab</sup>	14,5 (1,5) <sup>bc</sup>	15,0 (1,5) <sup>c</sup>	< <b>0,001</b>
Ht %	41,8 (4,2) <sup>a</sup>	42,5 (3,8) <sup>ab</sup>	43,5 (4,3) <sup>bc</sup>	44,6 (4,9) <sup>c</sup>	< <b>0,001</b>
VCM fL	89,3 (4,9) <sup>a</sup>	89,5 (4,8) <sup>ab</sup>	90,7 (4,4) <sup>bc</sup>	91,6 (4,2) <sup>c</sup>	< <b>0,001</b>
HCM pg	29,6 (2,1) <sup>a</sup>	29,8 (1,8) <sup>ab</sup>	30,3 (1,7) <sup>bc</sup>	31,0 (2,0) <sup>c</sup>	< <b>0,001</b>
CHCM g/dL	33,2 (1,2)	33,3 (1,0)	33,4 (1,1)	33,8 (1,4)	0,109
RDWsd* fL	47,5 (6,1)	49,9 (5,6)	48,4 (4,8)	46,7 (5,1)	0,352
RDWcv* %	14,1(1,3)	14,7 (1,3)	14,0 (1,4)	13,5 (1,3)	0,147
<b>Série Branca</b>					
Leucócitos/mm <sup>3</sup>	8694 (2626)	88098 (2701)	7830 (2253)	8526 (3785)	0,200
Neutrófilos/mm <sup>3</sup>	5299 (2082)	4566(1838)	4486(1750)]	4496(3238)	0.194
Linfócitos/mm <sup>3</sup>	1956 [1582;2548]	2135[1648;2630]	2113[1654;2653]	1995[1544;2554]	0.338
Monócitos/mm <sup>3</sup>	718[565;953] <sup>a</sup>	717[367;829] <sup>ac</sup>	549[420;771] <sup>bc</sup>	550 [515;813] <sup>c</sup>	<b>0,004</b>
Eosinófilos/mm <sup>3</sup>	229 [72,7;681]	357 [143;565]	196 [147;622]	234 [102;455]	0,661
Basófilos/mm <sup>3</sup>	0,0 [0,0;63,7]	0,0 [0,0;63,0]	44,4[0,0;76,0]	0,0 [0,0;64,0]	0,761
NLR	2,5[1,6;3,2]	2,1 [1,6;2,6]	2,1[1,5;3,2]	2,1 [1,5;3,0]	0,392
MLR	0,4(0,3) <sup>a</sup>	0,3(0,1) <sup>b</sup>	0,3 (0,1) <sup>b</sup>	0,3(0,1) <sup>b</sup>	<b>0,003</b>
<b>Índice plaquetário</b>					
Plaquetas mil/mm <sup>3</sup>	337 (150) <sup>a</sup>	270 (70,9) <sup>bcd</sup>	257 (65,5) <sup>cd</sup>	250 (61,0) <sup>d</sup>	< <b>0,001</b>
PLR	0,2 [0,1;0,2] <sup>a</sup>	0,1 [0,1-0,2] <sup>bcd</sup>	0,1 [0,1;0,1] <sup>cd</sup>	0,1 [0,1;0,1] <sup>d</sup>	<b>0,002</b>

\*Avaliado em 07 pacientes; DP: desvio padrão; Q1: primeiro quartil; Q3: terceiro quartil Hb: hemoglobina; Ht: hematócrito; VCM: volume corpuscular médio da hemoglobina; HCM: concentração média de hemoglobina; CHCM: concentração da hemoglobina corpuscular média; RDWsd: amplitude de distribuição dos eritrócitos-expresso como desvio padrão ; RDWcv: amplitude de distribuição dos eritrócitos – expresso como coeficiente de variação; NLR: razão neutrófilo/linfócito; MLR: razão de monócito/linfócito; PLR: razão de plaqueta/linfócitos; **E0** – antes do tratamento; **E1**- entre o início do tratamento e após a melhora clínica; **E2** – cura clínica; **E3** – cura sorológica. Testes estatísticos: teste Anova – post hoc (Tukey), teste Friedman – post hoc (Durbin-conover). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os estágios; entando letras iguais ou ausência de letras indicam ausência de diferenças.

**Tabela 6-** Comparação das variáveis hematológicas de pacientes com a forma crônica da paracoccidiodomicose antes do tratamento e em cura clínica.

Variáveis	E0		E2		p
	Média Mediana	(DP) [Q1;Q3]	Média Mediana	(DP) [Q1;Q3]	
<b>Série vermelha</b>					
Eritrócitos milhões/mm <sup>3</sup>	4,6	(0,6)	4,8	(0,5)	<b>&lt;0,001</b>
Hb g/dL	13,7	[12,1;14,9]	14,6	[13,6;15,6]	<b>&lt;0,001</b>
Ht %	42,1	[36,8;45,6]	44,2	[40,5;47,2]	<b>&lt;0,001</b>
VCM fL	89,2	(5,1)	90,8	(4,7)	<b>0,003</b>
HCM pg	29,4	(2,1)	30,3	(2,0)	<b>&lt;0,001</b>
CHCM g/dL	33,0	(1,1)	33,4	(1,1)	<b>0,007</b>
RDWsd fL*	47,0	(5,4)	47,3	(4,6)	0,770
RDWcv %*	14,2	[13,6;15,5]	14,0	[13,1;14,8]	0,465
<b>Série Branca</b>					
Leucócitos/mm <sup>3</sup>	8200	[7000;10230]	7460	[6380;8885]	<b>0,007</b>
Neutrófilos /mm <sup>3</sup>	5062	[4199;6337]	4422	[3350;5491]	<b>0,002</b>
Linfócitos /mm <sup>3</sup>	2091	(832)	2225	(766)	0,146
Monócitos /mm <sup>3</sup>	718	[525;990]	548	[423;787]	<b>&lt;0,001</b>
Eosinófilos /mm <sup>3</sup>	222	[79,5;448]	224	[130;430]	0,897
Basófilos /mm <sup>3</sup>	0,00	[0,0;59,1]	0,0	[0,0;72,3]	0,071
NLR	2,6	[1,8;3,5]	2,0	[1,5;3,2]	<b>0,004</b>
MLR	0,4	[0,2;0,5]	0,3	[0,2;0,4]	<b>&lt;0,001</b>
<b>Índice plaquetário</b>					
Plaquetas mil/mm <sup>3</sup>	322	[259;403]	263	[220;303]	<b>&lt;0,001</b>
PLR	0,2	[0,1;0,3]	0,1	[0,1;0,2]	<b>&lt;0,001</b>

DP: desvio padrão; Q1: primeiro quartil; Q3: terceiro quartil Hb: hemoglobina; Ht: hematócrito; VCM: volume corpuscular médio da hemoglobina; HCM: concentração média de hemoglobina; CHCM: concentração da hemoglobina corpuscular média; RDWsd: amplitude de distribuição dos eritrócitos- expresso como desvio padrão; RDWcv: amplitude de distribuição dos eritrócitos – expresso como coeficiente de variação; NLR: razão neutrófilo/linfócito; MLR: razão de monócito/linfócito; PLR: razão de plaqueta/linfócitos; **E0** – antes do tratamento; **E2** – cura clínica. Teste estatístico: teste Wilcoxon W, ou T student pareado. \*Estudo de 22 pacientes

**Tabela 7** – Comparação dos parâmetros de imaturidade celular do hemograma antes do tratamento (E0) e na cura clínica (E2), em 12 pacientes com a forma crônica da paracoccidiodomicose.

<b>Variáveis</b>	<b>E0 (n = 12) média (DP) mediana [Q1;Q3]</b>	<b>E2(n = 12) média (DP) mediana [Q1;Q3]</b>	<b>p</b>
IG ( $\times 10^3 \mu\text{L}$ )	0,0 [0,0;0,1]	0,0 [0,0;0,1]	0,756
IG (%)	0,5 [0,3;0,7]	0,2 [0,0;0,3]	<b>0,037</b>
RET (%)	1,3 (0,6)	3,3 (8,1)	0,942
IRF (%)	6,8 (2,8)	7,0 (4,0)	0,441
RET-HE (Pg)	31,4 (3,0)	33,5 (1,7)	<b>0,016</b>
IPF (%)	31,6 [29,5;33,9]	33,7 [32,8;34,3]	0,056

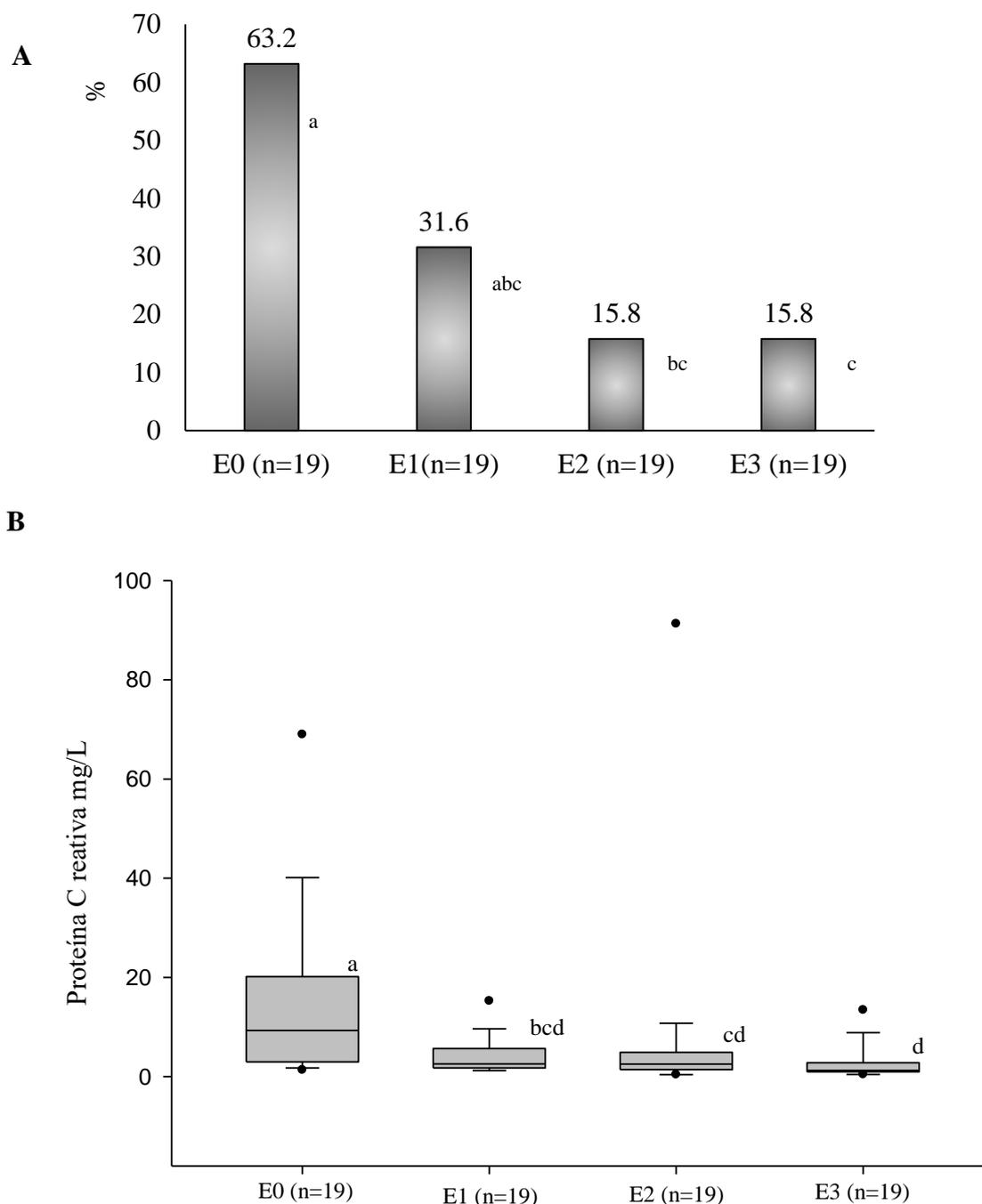
DP: desvio padrão; Q1: primeiro quartil; Q3: terceiro quartil IG: granulócitos imaturos; RET: Reticulócitos; IRF: fração de reticulócitos imaturos; RET-He: conteúdo de hemoglobina de reticulócitos; IPF: Contagem de Plaquetas Reticuladas; Teste estatístico para amostras pareadas: t Student; Wilcoxon W.

### **Proteína C reativa (PCR)**

Para avaliar o processo inflamatório e sua evolução durante o tratamento na PCM, avaliou-se a PCR nos diferentes estágios da doença em 19 pacientes que fizeram este exame em todos os estágios. Observou-se que a frequência de indivíduos com elevação desta proteína diminuiu no processo de cura (**Figura 2A**).

Notou-se que os valores medianos antes do tratamento estavam acima dos valores de referência. Com o início do tratamento antifúngico estes valores rapidamente voltaram a normalidade permanecendo dentro dos padrões no processo de cura (**Figura 2B**).

**Figura 2** – Análise da frequência de proteína C reativa maior que 5mg/L (A) e dos valores medianos (B) de 19 pacientes com a forma crônica da paracoccidioidomicose no decorrer do processo de cura.



Mediana	9,3	2,6	2,5	1,2	p
[Q1;Q3]	[3,0; 19,4]	[1,7 ; 5,5]	[1,4 ;4,8]	[1,0 ; 2,6]	<0,001

n = número de indivíduos; E0 – antes do tratamento; E1- entre o início do tratamento e após a melhora clínica; E2 – cura clínica; E3 – cura sorológica. **Gráfico A.** Frequência de indivíduos que apresentaram alterações nos valores da proteína C reativa nas diferentes fases da doença,  $p < 0,001$  \*teste Q de Cochran. **Gráfico B.** Boxplot dos valores medianos de PCR nos diferentes estágios da PCM,  $p < 0,001$  \*teste Friedman – post hoc (Durbin-conover). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os estágios. Q1: primeiro quartil; Q3: terceiro quartil.

Ao analisar a gravidade da PCM com as alterações encontradas, notou-se que anemia e PCR aumentada estão associadas com a gravidade da PCM (**Tabela 8**).

**Tabela 8** – Análise das alterações hematológicas e da proteína C reativa associadas com a gravidade da paracoccidioidomicose crônica antes do tratamento (n = 62).

Variáveis	Gravidade da PCM		p
	Grave (n = 17) n (%)	Leve+Moderada(n = 45) n (%)	
Anemia <sup>‡</sup>	12 (70,6)	16 (35,6)	<b>0,013</b>
Leucopenia #	0 (0,0)	03 (6,7)	0,555*
Leucocitose #	02 (11,8)	09 (20,0)	0,712
Neutropenia #	0 (0,0)	02 (4,4)	1,000*
Neutrofilia #	02 (11,8)	06 (13,3)	1,000*
Monocitose #	07 (41,2)	17 (37,8)	0,806
Eosinofilia #	02 (11,8)	04 (8,9)	0,662
Linfopenia #	02 (11,8)	04 (8,9)	0,662
Linfocitose #	02 (11,8)	09 (20,0)	0,712
Plaquetose #	03 (17,6)	03 (6,7)	0,333*
PCR aumentada	17 (100,0)	22 (57,9)	<b>&lt;0,001</b>

n = número de indivíduos; %: porcentagem; † Anemia: hemoglobina < 13,5 g/dL; #: valores absolutos; estatística: teste Qui quadrado; \*Teste exato de Fisher.

Devido à variabilidade das células leucocitárias, foram realizados cálculos usando a combinação de algumas células, tais como a combinação neutrófilos e linfócitos (NLR) através do cálculo da razão de neutrófilos sobre os linfócitos; combinação de monócitos e linfócitos (MLR) - cálculo da razão de monócitos sobre os linfócitos e a combinação de plaquetas e linfócitos (PLR) - cálculo da razão de plaquetas sobre os linfócitos. Todas as relações foram analisadas durante o processo de cura da PCM e observou-se uma diminuição significativa estatisticamente apenas em MLR e PLR (**Tabela 6**).

Não foi observada associação de NLR, MLR e PLR com a gravidade nos pacientes estudados antes do tratamento (**Tabela 9**).

**Tabela 9** – Análise das razões de neutrófilos/linfócitos (NLR), monócitos/linfócitos (MLR) e plaquetas/linfócitos (PLR) com a gravidade na paracoccidiodomicose crônica antes do tratamento (n = 62).

Variáveis	Gravidade da PCM		p
	Grave (n = 17) Mediana[Q1;Q3]	Leve+Moderada (n = 45) Mediana [Q1;Q3]	
NLR	3,2 [2,1 ; 4,0]	2,8 [1,8 ; 3,5]	0,242
MLR	0,4 [0,3 ; 0,6]	0,4 [0,3 ; 0,5]	0,345
PLR	0,2 [0,1 ; 0,3]	0,2 [0,1 ; 0,3]	0,549

Q1: primeiro quartil; Q3: terceiro quartil; NLR: razão de neutrófilo/linfócitos; MLR: razão de monócitos/linfócitos; PLR: razão de plaquetas/linfócitos; estatística usada: teste Mann-Whitney U.

## Discussão

Entre os exames laboratoriais complementares, o hemograma é um dos mais solicitados na prática clínica e é indispensável no diagnóstico e no controle de cura das doenças infecciosas. Alterações na celularidade sanguínea antes do tratamento são consequências da ação do fungo e, ou da resposta inflamatória do hospedeiro, e, espera-se que com o tratamento, retornem à normalidade. Entendendo que esse exame auxilia no manejo clínico da PCM, procedeu-se a análise e interpretação do hemograma de pacientes com a forma crônica da doença, antes da instituição do tratamento e durante o seguimento.

As características demográficas, epidemiológicas e clínicas dos participantes foram semelhantes às observadas nas grandes casuísticas de PCM da área endêmica (BELLISSIMO-RODRIGUES et al., 2013; MATOS et al., 2012), a saber: a grande maioria dos participantes era do sexo masculino, com média de idade de 54,3 anos, lavradores ou ex-lavradores e tabagistas e com PCM classificada como leve/moderada (72,6%), o que permite a generalização dos resultados.

Para o controle de cura da PCM utilizam-se critérios biológicos, desta forma, neste estudo foram considerados os diferentes estágios do tratamento da PCM em vez de tempo pré-estabelecido. Melhora dos sintomas foi observada cerca de dois meses atingindo a cura clínica em torno de cinco meses após o tratamento. Intervalo de tempo similar também foi observado em outro estudo (CAVALCANTE et al., 2014).

Na análise do hemograma antes do tratamento, notam-se valores de eritrócitos, Hb e Ht abaixo dos valores de referência fornecidos pelo fabricante em boa parte dos pacientes, o que pode estar relacionado à ativação do sistema imune pelo processo infeccioso, com liberação de citocinas como TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-6 e IL-1. Essas citocinas inibem a eritropoietina levando à produção inadequada de células da medula óssea, ativando células fagocitárias que removem eritrócitos circulantes, diminuindo a sua vida útil, e, podem induzir a produção de hepcidina e

lactoferrina que promovem a retenção de ferro no sistema mononuclear dos fagócitos (WEISS; GANZ; GOODNOUGH, 2019).

Processos infecciosos e inflamatórios de curso mais arrastado, na maioria das vezes cursam com anemia, conhecida como anemia da inflamação (AI), que em geral é leve a moderada, com Hb variando de 7 a 12 g/dl (CARTWRIGHT, 1966). Além disso, também pode cursar com níveis normais ou baixos de ferro sérico, ferritina normal ou ligeiramente aumentada, ST >15% (GURALNIK et al., 2004), valores baixos de eritropoietina e valores elevados de PCR (VAN IPEREN et al., 2000).

Diversas infecções sistêmicas, sejam elas causadas por vírus, bactérias, protozoários ou fungos podem levar ao surgimento de AI (GANZ; NEMETH, 2009). Estudos de pacientes com tuberculose (Tb) mostraram que a maioria apresenta perfis hematológicos e inflamatórios consistentes com AI, predominantemente normocrômica e normocítica (LEE et al., 2006; MINCHELLA et al., 2015). O presente estudo revela anemia em quase metade dos participantes (45,2%) no momento do diagnóstico e, nestes, predomínio de anemia normocítica normocrômica (75%). Com o tratamento antifúngico, observou-se elevação da Hb e Ht e redução da frequência de anemia. Considerando-se que a anemia na PCM é, em geral, uma AI, recomenda-se a análise da ferritina e ST antes de indicar a suplementação de ferro, uma vez que pode ser nocivo para o paciente por favorecer o crescimento fúngico (BAILÃO et al., 2014).

Nos equipamentos automatizados, o parâmetro RET-He é um índice que mostra precocemente a falta de ferro no organismo. Este parâmetro avalia diretamente a incorporação de ferro nos reticulócitos e contribui na análise do estado do ferro. Em condições em que a síntese de Hb está comprometida, como na AI, os valores de RET-He podem apresentar uma diminuição. Ao avaliar este parâmetro, no presente estudo, notou-se que os valores médios aumentaram com o tratamento.

Na análise da série branca antes do tratamento, observaram alterações leucocitárias, principalmente monocitose. A leucocitose e a neutrofilia foram encontradas em um pequeno percentual de pacientes (17,7% e 12,9% respectivamente).

Sabe-se que o mecanismo de defesa contra a infecção não é simples e requer o envolvimento de muitas células do sistema imunitário, tais como células fagocitárias - monócitos e neutrófilos, que são a primeira linha de defesa do organismo contra a infecção pelo fungo (BENARD, 2008; LOURES et al., 2010).

A função dos neutrófilos na PCM ainda não é totalmente clara, mas já foi relatado que essas células na corrente sanguínea desempenharam o papel importante de fagocitar células leveduriformes do fungo, sem, no entanto, lisar a célula fúngica (GOIHMAN-YAHR et al.,

1989). Apesar destas células serem as primeiras no processo de diapedese até o local da infecção, na PCM é observada uma persistência dos neutrófilos nas lesões teciduais causada pelo fungo, nos estágios mais tardios da doença, achado confirmando com infecção murina (XIDIEH et al., 1999). Além da fagocitose e de serem uma das primeiras células da resposta imune inata do hospedeiro contra o fungo, os neutrófilos também possuem papel fundamental na resposta imune adquirida, através da síntese de citocinas pró-inflamatórias, as quais auxiliam a construir uma imunidade adaptativa mais eficiente (ISHIKAWA; MIYAZAKI, 2005).

Equipamentos automatizados vêm substituindo a contagem manual das células sanguíneas. IGs, um dos parâmetros de avaliação automatizada que corresponde ao compartimento de células precursoras de neutrófilos, embora se encontrassem na faixa de normalidade antes do tratamento, reduziram-se na cura clínica. Assim como os neutrófilos, os IGs estão relacionados com a atividade inflamatória e infecciosa.

Além do neutrófilo, outra célula com uma importante ação contra *Paracoccidioides* spp. é o monócito. Já foi descrito que na PCM, o monócito ou macrófago (célula derivada do monócito) também tem papel fundamental na fagocitose, tanto na resposta imunológica inata quanto na adquirida e ativadas por citocinas, podem controlar a multiplicação do fungo (MOSCARDI-BACCHI; BRUMMER; STEVENS, 1994). Um estudo também demonstrou que pacientes com PCM na forma crônica apresentaram número de monócitos circulantes elevados (VENTURINI et al., 2014). Com o tratamento, observou-se redução na frequência de pacientes com monocitose, bem como diminuição de significativa de monócitos circulantes com a cura clínica.

Outra alteração observada no presente estudo foi o aumento de linfócitos entre antes do início do tratamento e no desaparecimento dos sinais e sintomas. Há relatos de linfopenia na PCM crônica, sendo comum nas formas graves e está relacionada à redução da subpopulação CD4<sup>+</sup> no sangue e elevada concentração destas células nos granulomas teciduais (BAVA et al., 1991; BENARD, 2008).

Eosinofilia foi observada em um pequeno percentual dos casos deste estudo. Na PCM a ocorrência de eosinofilia está relacionada com a produção elevada de interleucinas IL-5 decorrente da ativação da subpopulação Th2 (BENARD, 2008) e tem sido relatada, principalmente, na forma aguda/subaguda (BRAGA et al., 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 1992). Cabe destacar que neste estudo analisaram-se casos com a forma crônica e predominantemente leves ou moderados, o que difere dos estudos citados acima.

As parasitoses intestinais são causas conhecidas de eosinofilia, em especial as que fazem o ciclo de Loss principalmente a *estrongiloidíase*, que tem sido relatada frequentemente

associada à PCM (PANIAGO et al., 2003). Portanto, nestes casos, a causa mais provável de eosinofilia poderia ser uma parasitose intestinal associada.

Plaquetose foi observada em menos de 10% dos pacientes antes da instituição do tratamento. No entanto, a redução do número de plaquetas com o tratamento sugere uma interferência da PCM nessas células hematológicas. GORELIK et al., (2017) observaram que o aumento da síntese das citocinas, IL-3, IL-6, IL-11 e IFN- $\gamma$ , podem levar ao incremento da produção de plaquetas na medula óssea devido ao estímulo da trombopoietina. Além deste fato, como as plaquetas também são encontradas na lesão tecidual, e são ativadas, e desempenham papel de células imunes na interação parasita-hospedeiro. Esta ativação induz a liberação de diversas moléculas, tais como quimiocinas, citocinas (SEMPLE; FREEDMAN, 2010) e proteínas com ação antimicrobiana (COX; KERRIGAN; WATSON, 2011). Além disso, a ativação plaquetária leva ao aumento da resposta imune adaptativa, pelo recrutamento e ativação das células fagocitárias até o local da infecção (PITCHFORD; PAN; WELCH, 2017; SEMPLE; FREEDMAN, 2010).

Devido à instabilidade das células leucocitárias em infecção/ inflamação, a relação entre células tais como neutrófilos/linfócitos (NLR), monócitos/linfócitos (MLR) e plaquetas/linfócitos têm sido usadas como biomarcadores de prognósticos em neoplasias (XU et al., 2021) e em inflamações sistêmicas (ABAKAY et al., 2015). Estudo recente mostrou a associação da NLR com a gravidade da PCM causada por *P. lutzii*, sugerindo que esta variável poderia ser utilizada como biomarcador de gravidade na PCM (NERY et al., 2021). No presente estudo, avaliou-se as razões NLR, MLR e PLR, mas nenhuma associação entre as razões celulares e a gravidade da PCM crônica foram observadas. Como há um predomínio da PCM causada por fungos do complexo *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*) em Mato Grosso do Sul (PEREIRA et al., 2014), talvez a diferenças entre os fungos possam justificar essa ausência de associação. Além disso, outros estudos com pacientes com PCM causados por *P. lutzii* ou do complexo *P. brasiliensis* precisam ser realizados para avaliar essa associação. No entanto, observou-se uma redução significativa no processo de cura em MLR e PLR, que refletem, respectivamente, a redução de monócitos e de plaquetas após início do tratamento.

Ainda que não faça parte do hemograma, a PCR dos pacientes foi analisada, já que as alterações das células sanguíneas são consequências da resposta inflamatória sistêmica do hospedeiro. Grande parte dos pacientes (70,9%) apresentaram PCR acima dos valores normais antes do tratamento. No entanto, a mediana de PCR dos pacientes estudados foi inferior a 50 mg/dL refletindo um processo inflamatório não tão intenso quanto o observado em outras infecções tais como tuberculose (WILSON et al., 2018). É possível que isso tenha ocorrido pelo

predomínio de casos leves e moderados no presente estudo. Alteração de PCR na PCM tem sido reportada em outros estudos (BRITO et al., 2021; NERY et al., 2021) e, por ser um exame que vem substituindo a velocidade de hemossedimentação (VHS) como um marcador inespecífico de resposta inflamatória, deveria ser utilizada para a classificação da gravidade e para a avaliação da resposta terapêutica (MENDES et al., 2017). Há evidências de que a PCR não é apenas um indicador da inflamação, mas também pode cursar como uma reguladora da imunidade inata (YAO; ZHANG; WU, 2019).

A principal limitação deste estudo foi a perda de seguimento de mais da metade dos pacientes até o estágio de cura sorológica, o principal critério de descontinuação do tratamento antifúngico.

Em conclusão, na PCM crônica observaram-se alterações no hemograma da maioria dos pacientes, principalmente anemia normocítica normocrômica e monocitose, no entanto, não foram exuberantes. Após tratamento, principalmente ao atingir a cura clínica, a maioria das variáveis hematológicas retornaram a seus valores normais.

A avaliação hematológica revelou ser um exame complementar útil no seguimento de paciente com a forma crônica da PCM. Além disso, a dinâmica celular hematológica refletiu a interação parasita-hospedeiro nos diferentes estágios do estudo.

### Referências:

- ABAKAY, O. et al. The Relationship Between Inflammatory Marker Levels and Pulmonary Tuberculosis Severity. **Inflammation**, v. 38, n. 2, p. 691–696, abr. 2015.
- BAILÃO, E. F. L. C. et al. Hemoglobin Uptake by *Paracoccidioides* spp. Is Receptor-Mediated. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 5, p. e2856, 15 maio 2014.
- BAVA, A. J. et al. Lymphocyte Subpopulations and Cytokine Production in Paracoccidioidomycosis Patients. **Microbiology and Immunology**, v. 35, n. 3, p. 167–174, mar. 1991.
- BELLISSIMO-RODRIGUES, F. et al. Endemic paracoccidioidomycosis: relationship between clinical presentation and patients' demographic features. **Medical Mycology**, v. 51, n. 3, p. 313–318, abr. 2013.
- BENARD, G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4–5, p. 209–221, maio 2008.
- BENITES-ZAPATA, V. A. et al. Usefulness of neutrophil-to-lymphocyte ratio in risk stratification of patients with advanced heart failure. **The American Journal of Cardiology**, v. 115, n. 1, p. 57–61, 1 jan. 2015.
- BLOTTA, M. H. et al. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. **The American Journal of Tropical**

**Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 3, p. 390–394, set. 1999.

BRAGA, F. G. et al. Functional and phenotypic evaluation of eosinophils from patients with the acute form of paracoccidioidomycosis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 5, p. e0005601, maio 2017.

BRITO, T. G. N. DE et al. A Case-Control Study of Paracoccidioidomycosis in Women: The Hormonal Protection Revisited. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 8, p. 655, 13 ago. 2021.

BRUMMER, E. et al. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 8, p. 2289–2294, ago. 1989.

CANÇADO, R. D.; CHIATTONE, C. S. Anemia de Doença Crônica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 24, n. 2, abr. 2002.

CARTWRIGHT, G. E. The anemia of chronic disorders. **Seminars in Hematology**, v. 3, n. 4, p. 351–375, out. 1966.

CAVALCANTE, R. DE S. et al. Comparison between Itraconazole and Cotrimoxazole in the Treatment of Paracoccidioidomycosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, p. e2793, 17 abr. 2014.

COUTINHO, Z. F. et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 5, p. 1441–1454, out. 2002.

COUTINHO, Z. F. et al. Hospital morbidity due to paracoccidioidomycosis in Brazil (1998-2006). **Tropical Medicine & International Health**, v. 20, n. 5, p. 673–680, maio 2015.

COX, D.; KERRIGAN, S. W.; WATSON, S. P. Platelets and the innate immune system: mechanisms of bacterial-induced platelet activation. **Journal of thrombosis and haemostasis: JTH**, v. 9, n. 6, p. 1097–1107, jun. 2011.

DE OLIVEIRA CUSTÓDIO, J. M. et al. Dynamics of plasma micronutrient concentrations and their correlation with serum proteins and thyroid hormones in patients with paracoccidioidomycosis. **PLOS ONE**, v. 14, n. 12, p. e0226609, 26 dez. 2019.

DOEDENS, A. L. et al. Hypoxia-inducible factors enhance the effector responses of CD8+ T cells to persistent antigen. **Nature Immunology**, v. 14, n. 11, p. 1173–1182, nov. 2013.

DOS SANTOS, W. A. et al. [Association between smoking and paracoccidioidomycosis: a case-control study in the State of Espírito Santo, Brazil]. **Cadernos De Saude Publica**, v. 19, n. 1, p. 245–253, fev. 2003.

FRAENKEL, P. G. Anemia of Inflammation. **Medical Clinics of North America**, v. 101, n. 2, p. 285–296, mar. 2017.

GANZ, T.; NEMETH, E. Iron Sequestration and Anemia of Inflammation. **Seminars in Hematology**, v. 46, n. 4, p. 387–393, out. 2009.

GOIHMAN-YAHR, M. et al. Digestion of killed *Paracoccidioides brasiliensis* by neutrophils. **Mycopathologia**, v. 106, n. 1, p. 53–58, abr. 1989.

GORELIK, O. et al. Prognostic significance of platelet count changes during hospitalization for community-acquired pneumonia. **Platelets**, v. 28, n. 4, p. 380–386, 19 maio 2017.

GURALNIK, J. M. et al. Prevalence of anemia in persons 65 years and older in the United States: evidence for a high rate of unexplained anemia. **Blood**, v. 104, n. 8, p. 2263–2268, 15 out. 2004.

HELLA, J. et al. Anemia in tuberculosis cases and household controls from Tanzania: Contribution of disease, coinfections, and the role of hepcidin. **PLOS ONE**, v. 13, n. 4, p. e0195985, 20 abr. 2018.

ISHIKAWA, F.; MIYAZAKI, S. New biodefense strategies by neutrophils. **Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis**, v. 53, n. 3, p. 226–233, jun. 2005.

LEE, S. W. et al. The Prevalence and Evolution of Anemia Associated with Tuberculosis. **Journal of Korean Medical Science**, v. 21, n. 6, p. 1028, 2006.

LONDERO, A. T. Paracoccidioidomicose: patogenia, formas clínicas, manifestações pulmonares e diagnóstico. *Jornal de Pneumologia*. v. 2, p. 41–57, mar. 1986.

LOURES, F. V. et al. Toll-like receptor 4 signaling leads to severe fungal infection associated with enhanced proinflammatory immunity and impaired expansion of regulatory T cells. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 3, p. 1078–1088, mar. 2010.

MARQUES, S. A. et al. Paracoccidioidomicose: frequência, morfologia e patogênese de lesões tegumentares. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 5, p. 411–417, out. 2007.

MATOS, W. B. DE et al. Paracoccidioidomycosis in the state of Maranhão, Brazil: geographical and clinical aspects. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 3, p. 385–389, jun. 2012.

MENDES, R. P. et al. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. **The Open Microbiology Journal**, v. 11, n. 1, p. 224–282, 31 out. 2017.

MINCHELLA, P. A. et al. Complex Anemia in Tuberculosis: The Need to Consider Causes and Timing When Designing Interventions. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 5, p. 764–772, 1 mar. 2015.

MOSCARDI-BACCHI, M.; BRUMMER, E.; STEVENS, D. A. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. **Journal of Medical Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 159–164, 1 mar. 1994.

NERY, A. F. et al. Puzzling paracoccidioidomycosis: Factors associated with the severity of *Paracoccidioides lutzii* infections. **International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 107, p. 284–290, jun. 2021.

NOGUEIRA, M. G. DOS S.; ANDRADE, G. M. Q. Paracoccidioidomycosis in children and adolescents. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 25, n. 2, 2015.

OZAKI, K. S. et al. Diagnóstico de paracoccidioidomicose disseminada grave em aspirado de medula óssea: relato de caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29,

n. 4, p. 363–366, ago. 1996.

PANIAGO, A. M. M. et al. Paracoccidiodomicose: estudo clínico e epidemiológico de 422 casos observados no Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 4, p. 455–459, jul. 2003.

PEKELHARING, J. M. et al. Haematology reference intervals for established and novel parameters in healthy adults. **Sysmex Journal International**, v. 20, p. 01–11, 2010.

PEREIRA, R. M. et al. Paracoccidiodomycosis in children: clinical presentation, follow-up and outcome. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 3, p. 127–131, jun. 2004.

PITCHFORD, S.; PAN, D.; WELCH, H. C. E. Platelets in neutrophil recruitment to sites of inflammation. **Current Opinion in Hematology**, v. 24, n. 1, p. 23–31, jan. 2017.

SEMPLE, J. W.; FREEDMAN, J. Platelets and innate immunity. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 67, n. 4, p. 499–511, fev. 2010.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Comprometimento da medula óssea e eosinofilia na paracoccidiodomicose. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, n. 2, p. 85–90, abr. 1992.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Consenso em paracoccidiodomicose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 297–310, jun. 2006.

THE JAMOVI PROJECT. **Jamovi**. [s.l: s.n.].

VAN IPEREN, C. E. et al. Response of erythropoiesis and iron metabolism to recombinant human erythropoietin in intensive care unit patients: **Critical Care Medicine**, v. 28, n. 8, p. 2773–2778, ago. 2000.

VENTURINI, J. et al. Phenotypic and functional evaluations of peripheral blood monocytes from chronic-form paracoccidiodomycosis patients before and after treatment. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 552, dez. 2014.

WEISS, G.; GANZ, T.; GOODNOUGH, L. T. Anemia of inflammation. **Blood**, v. 133, n. 1, p. 40–50, 03 2019.

WILSON, D. et al. Evaluation of Tuberculosis Treatment Response With Serial C-Reactive Protein Measurements. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 5, n. 11, p. ofy253, nov. 2018.

XIDIEH, C. F. et al. Influence of the genetic background on the pattern of lesions developed by resistant and susceptible mice infected with *Paracoccidiodes brasiliensis*. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 188, n. 1, p. 41–49, 23 ago. 1999.

XU, Y. et al. Glycolysis determines dichotomous regulation of T cell subsets in hypoxia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 126, n. 7, p. 2678–2688, 13 jun. 2016.

XU, Z. et al. Predictive value of the monocyte-to-lymphocyte ratio in the diagnosis of prostate cancer. **Medicine**, v. 100, n. 38, p. e27244, 24 set. 2021.

YAO, Z.; ZHANG, Y.; WU, H. Regulation of C-reactive protein conformation in inflammation. **Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]**, v. 68, n. 10, p. 815–823, out. 2019.

**CAPÍTULO III**

---

---

## Artigo 02 – Iron metabolism disorders in patients with chronic form of paracoccidioidomycosis

### Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by fungi of the genus *Paracoccidioides* spp.. During infection, some host's immune mechanisms limit the availability of iron to the fungus, reducing its reproduction. However *Paracoccidioides* spp. can evade the immune defense and, even in limited iron conditions, it manages to use this mineral for its growth and dissemination. Therefore, hematological and iron metabolism changes can be observed in some patients with PCM. The objective of this study was to evaluate the iron metabolism in different iron compartments in patients with chronic PCM, before treatment and after clinical cure. Thirty-nine patients with chronic PCM diagnosed from 2013 to 2021 treated at a University Hospital in Midwest Brazil were studied. Three iron compartments (storage, transport and functional) were analyzed at two moments, before treatment (BT) and at clinical cure (CC). Patients had mean age of 54.5 (SD 6.7) years, and most of them were men (97.4%), rural workers (92.1%), smokers (84.6%) and with moderate severity disease (66.7%). The storage compartment was evaluated by serum ferritin. Although before treatment ferritin levels were within the normal range, the median levels reduced after treatment at the clinical cure. The transport compartment was evaluated by total iron binding capacity (TIBC) and transferrin saturation (TSAT). Before treatment, patients had median values of both parameters slightly below normal, but no change after treatment was observed. The functional compartment was analyzed by the following parameters: red blood cells (RBC), hemoglobin (Hb), hematocrit (HCT), soluble transferrin receptor (sTfR) and sTfR/logFerritin index. Central measures of these parameters were little or not changed before treatment. Even so, it is possible to infer that PCM interferes in the functional compartment since there was an improvement in the parameters after treatment as well as an association with the severity of the disease. Furthermore, a moderate correlation was found between Hb, RBC, HCT and iron with C-reactive protein (CRP). In conclusion, PCM interferes with iron metabolism by transferring iron from the functional to the storage compartment revealed by anemia, low iron levels with normal levels of TSAT, TIBC, sTfR and sTfR/logFerritin index and normal or slightly increased ferritin levels. Alterations in iron metabolism in PCM can lead to anemia of inflammation, that it would be differentiated of the iron deficiency anemia by a careful investigation of the parameters of the iron compartments.

**Keywords:** Anemia of inflammation; Iron; Iron metabolism; Paracoccidioidomycosis; *Paracoccidioides* spp.

## Introduction

Paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic mycosis endemic in Latin America, is caused by dimorphic fungi of the genus *Paracoccidioides* spp. (1). Infection occurs through inhalation of infective conidia present in the soil, which settle in the lungs and from this stage can reach the lymphatic and hematogenous pathways and spread to other organs (2). Brazil is the endemic center of this disease, which is considered the eighth most common cause of death from predominantly chronic or recurrent types of infectious and parasitic diseases in the country. The highest incidences are concentrated in the South, Southeast, and Midwest regions (3). The chronic or adult form is the more frequent form of this disease. It affects patients over 30 years of age and predominantly affects the lungs and mucous membranes of the upper digestive tract and airways (1).

As in other fungal diseases, some factors are determinant to PCM, such as the inoculum size, the pathogenicity, and virulence of the fungus, the integrity of the defense system, as well as possibly genetic factors (2). The host organism has strategies or barriers that prevent fungal diseases, such as inhibiting vital fungal functions by blocking its iron uptake, considering that iron is an essential mineral for many pathogens' proliferation, including *Paracoccidioides* spp. (4).

Iron is an essential component for hemoglobin (Hb), myoglobin, and several enzymes and plays a fundamental role in oxygen transport and electron transfer. In addition, it acts as a cofactor in many enzymatic processes, including DNA synthesis (5–7).

Maintaining control of iron homeostasis is essential in the host-pathogen interaction since both compete for this micronutrient. During the infection, some host immunity mechanisms limit the availability of iron to the invading microorganism, reducing its proliferation (8). However, many microorganisms, such as *Paracoccidioides* spp. can evade the immune defense, and even under limited iron conditions they manage to use this mineral for growth and dissemination (9). Thus, hematological and iron metabolism alterations can be observed during the PCM infectious process (10).

In the human body, iron is distributed in different interconnected compartments so that there is bodily homeostasis. These compartments can be evaluated separately by laboratory tests, many of which are available and accessible in the routine laboratory. These tests can assess whether there is any disturbance in the iron metabolism, and which compartment is being affected (11). Generally, when there is a deficit of body iron, these compartments are affected in sequence. Firstly, there is a fall in the iron levels in the storage compartment, followed by a

deficiency in the transport compartment and then a reduction in the functional compartment (12,13).

The host-parasite interaction and the consequent inflammatory response lead to changes in the dynamics of iron metabolism. These alterations can be observed in some patients with PCM (14), which is a disease with a chronic systemic inflammatory component and long-term treatment. Understanding the frequency and intensity of the iron metabolism disturbances in patients with the chronic form of PCM will help clinicians in therapeutic management. Thus, we aim to analyze the iron metabolism in different iron compartments in patients with chronic PCM before start treatment and after clinical cure.

## **Materials and methods**

### **Ethical aspects**

This project was approved by the Human Research Ethics Committee of the Federal University of Mato Grosso do Sul (CAAE number 62726016.2.0000.0021). All participants signed informed consent.

### **Location, period and design of the study**

This study was carried out in Campo Grande-MS, between 2013 and 2021, at the outpatient clinic for systemic mycoses of the Infectious and Parasitic Diseases Unit of the University Hospital Maria Aparecida Pedrossian (UNIDIP-HUMAP), at the Federal University of Mato Grosso do Sul (HU-UFMS) - a reference center for infectious diseases.

This is an analytical study with prospective data collection, evaluating iron metabolism parameters of patients with the chronic form of PCM before treatment at clinical cure.

### **Patients**

#### **Inclusion and exclusion criteria**

Patients of both sexes, diagnosed with PCM during the period between September 2013 and February 2021 and classified as chronic form, were included.

Patients with chronic PCM who died and/or who did not have laboratory tests at admission, such as serum iron and blood count (HMG), were excluded patients with any other medical conditions that can cause anemia, such as, malignancy, AIDS, autoimmune disease, chronic renal disease and tuberculosis.

### **Case definition**

Confirmed cases of PCM were those that presented suggestive clinical manifestations and when typical *Paracoccidioides* spp. yeasts forms were identified in clinical materials. And probable cases were those without identification of typical yeast but presented serum-specific antibodies detected by the double agar gel immunodiffusion (DID), characterized by its high specificity [1].

### **Demographic and clinical variables**

Demographic, clinical, and laboratory data were retrieved from a prospective database, which were filled out during the medical routine at the time of diagnosis and at the patients follow-up of the disease.

Demographic data such as sex, age, occupational history, smoking, and clinical disease severity data were collected before starting the treatment.

Regarding severity, the chronic form of PCM was subdivided into mild, moderate, or severe. Mild cases were those with a decrease in body mass index (BMI) of less than 5% of the patient's usual BMI and involvement of one or a few organs without functional changes. Severe cases were those involving three or more criteria such as: a) loss of BMI equal to or greater than 10%; b) severe pulmonary impairment; c) involvement of other organs, such as adrenal glands, central nervous system, and bones; d) presentation of multi-chain lymph node enlargement in the superficial or deep chains of the tumoral form (> 2.0 cm in diameter, without suppuration) or in the suppurative form; e) presence of antibodies with high titers. Moderate cases were those intermediate between mild and severe forms (1).

### **Laboratory analysis procedures**

Blood samples were obtained during the medical routine at the time of diagnosis and follow-up.

Laboratory data and complementary laboratory tests were obtained at two different stages of routine outpatient follow-up: - before treatment (BT); - clinical cure (CC) (disappearance of signs and symptoms) (1).

To investigate iron metabolism in patients with the chronic form of PCM, three different iron compartments were evaluated,

**Stock compartment**: comprises the amount of iron stored in the body. Thus, the serum ferritin dosage was analyzed by the electrochemiluminescence immunoassay method (Roche).

**Transport compartment**: includes measures that assess the ability to transport iron circulating in the body. Thus, the measurement of the total iron binding capacity (TIBC) by the colorimetric

assay (Roche) and through the transferrin saturation (TSAT) which is calculated by the formula [TSAT = serum iron/TIBC X (100)] and was expressed as a percentage (%).

**Functional compartment:** involves measures related to the synthesis of erythrocytes according to the availability of iron for erythropoiesis. Therefore, to evaluate this compartment, the blood count (HMG) was used with the measurement of hemoglobin (Hb), red blood cells (RBC), mean corpuscular hemoglobin volume (MCV), mean hemoglobin concentration (MHC), determined by XN 3000-Series hematology equipment (Sysmex Corporation, Kobe, Japan). Serum iron was determined by colorimetric assay (Roche) and the soluble transferrin receptor (sTfR) by immunoenzymatic method (ELISA) (Human sTfR (Soluble Transferrin Receptor) ELISA Kit/ Elabscience). As this test is not routinely performed, the serum stored from the PCM biobank was used.

The inflammatory process was assessed by high-sensitivity serum C-reactive protein (CRP), measured by the immunoturbidimetric method. All analyzed parameters and the values considered normal by the manufacturer were described in **Table 01**.

Table 01 – Analyzed parameters in different compartments and normality values provided by the manufacturer.

<b>Analyzed parameters</b>	<b>Reference values provided by the manufacturer</b>
<b>Stock compartment</b>	
Serum ferritin	M - 30 to 400 ng/mL F- 13to 150 ng/mL
<b>Transport compartment</b>	
Transferrin saturation (TSAT)	30 to 50 %
Total iron binding capacity (TIBC)	250 to 410 µg/dL
<b>Functional compartment</b>	
Total erythrocyte count (RBC)	4.5 to 5.9 million/mm <sup>3</sup>
Hemoglobin (Hb)	13.5 to 17 g/dL
Hematocrit (HCT)	41 to 53 %
Mean corpuscular volume (MCV)	82 to 97 fL
Mean hemoglobin concentration (MHC)	25 to 34 pg
Serum iron	61 to 157 µg/dL
Soluble transferrin receptor (sTfR)	16.79 to 172.63 ng/mL
<b>Inflammatory process</b>	
C-reactive protein (CRP)	0 to 5.0 mg/L

### Statistical analysis

Statistical data analysis was performed using Jamovi software (Version 1.6) for Windows (15). Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) or median with first and third quartile [Q1;Q3]. The comparison between the two stages (BT and CC) was performed using the student's T test and or Wilcoxon W test. To determine the relationship between the variables, the Pearson correlation coefficient (r) was used, and values below  $\pm 0.29$ , between  $\pm 0.30$  and  $\pm 0.49$ , between  $\pm 0.50$  and  $\pm 1.0$  were considered as weak, moderate and strong correlation, respectively.

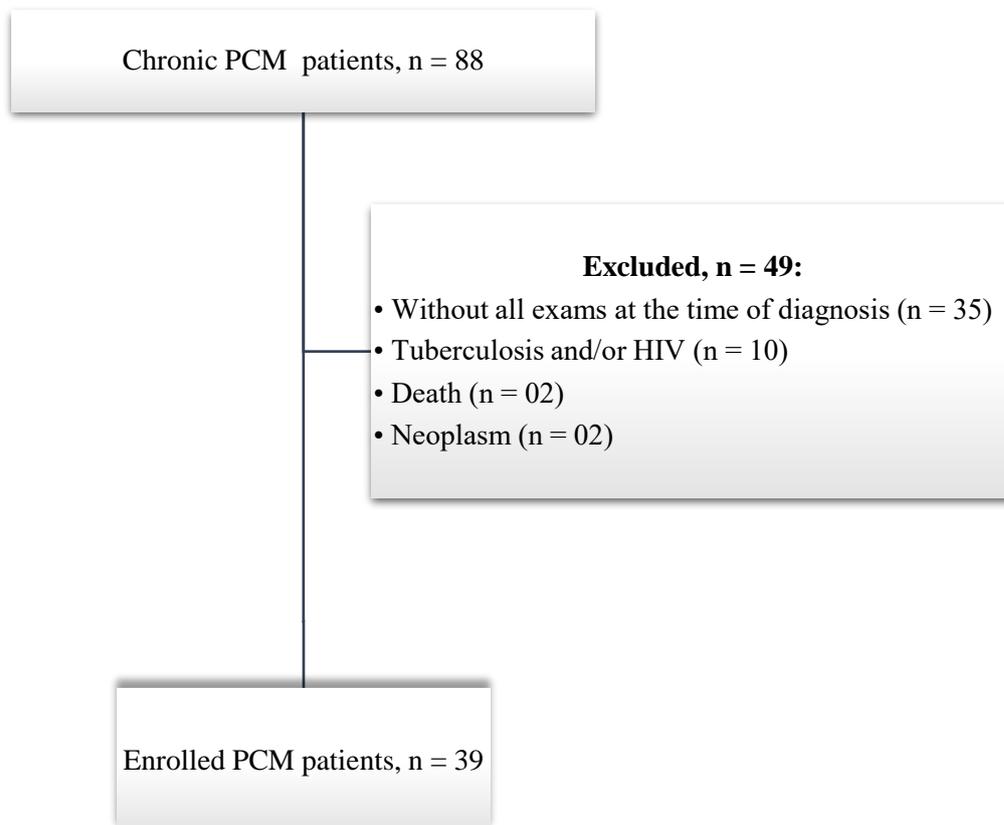
The McNemar test was used for associations between qualitative variables. The Shapiro-Wilk test was used to determine if the variables were normally distributed.

For the analysis of categorical and numerical variables in a single sample, the proportion test and t test for one sample were used, respectively. The expected values were considered equals for each subtyp.

For all tests, values of  $p \leq 0.05$  were adopted as significance level.

## Results

A total of 88 patients were diagnosed with the chronic form of PCM during the period of the study. Of this total, 49 patients were excluded according to the criteria and 39 patients participated of the study (**Figure 01**). The mean age of these patients was 54.5 years (SD 6.70), 38 (97.4%) were men and 35 (92.1%) have been or are rural workers. At the time of diagnosis, 33 (84.6%) of these individuals were smokers. Regarding disease severity, 66.7% of patients had moderate severity, followed by severe (20.5%) and mild (12.8%) (**Table 02**).



**Figure 01.** Flowchart of the selection of participants with chronic form paracoccidioidomycosis from 2013 to 2021.

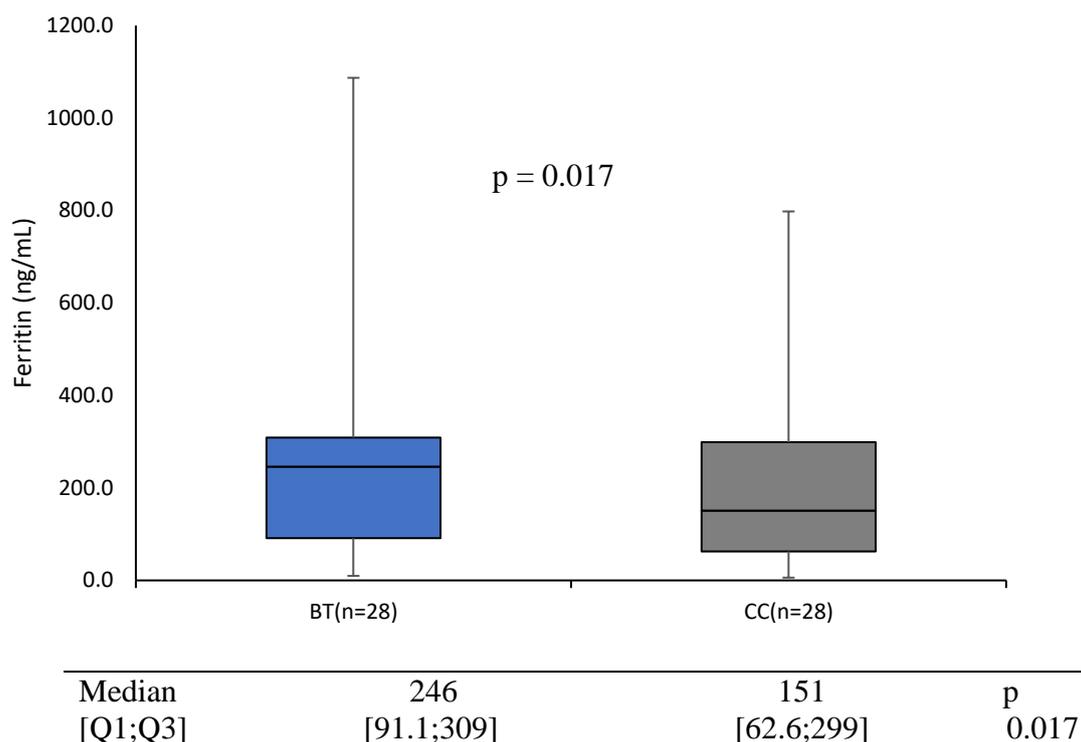
**Table 02.** Demographic, clinical and lifestyle baseline data of 39 patients with chronic form of paracoccidioidomycosis.

<b>Variables</b>	<b>n (%)</b>	<b>95%CI</b>		<b>p</b>
<b>Sex</b>				<0.001
male	38 (97.4)	86.5	99.9	
female	01 (2.6)	0.06	13.5	
<b>Age*</b>	54.5 (6.70)	52.3	56.6	<0.001 <sup>‡</sup>
<b>Rural worker (n = 38)</b>				<0.001
Previous/ current	35 (92.1)	78.6	98.3	
Never	03 (7.9)	1.6	21.4	
<b>Cigarette smoking</b>				<0.001
Current	33 (84.6)	69.5	94.1	
Previous	04 (10.3)	2.9	24.2	
Never	02 (5.1)	0.6	17.3	
<b>Severity</b>				<0.001
Moderate	26 (66.7)	49.8	80.9	
Severe	08 (20.5)	9.3	36.5	
Mild	05 (12.8)	4.3	27.4	
<b>Initial treatment</b>				0.002
Itraconazole	29 (74.4)	57.9	87.0	
CMX	10 (25.6)	13.0	42.1	

\*Mean (standard deviation – SD); CMX: cotrimoxazole or thrimetoprim/sulfametoxazole; 95%CI: 95% of confidence interval; Proportion Test:  $\chi^2$  Goodness of Fit; <sup>‡</sup> One Sample T-Test.

### Stock compartment

Nine (26.5%) patients had elevated serum ferritin levels and two (5.8%) patients had lower than normal ferritin levels before treatment (BT n = 34). When analyzing the group of patients at both moments (BT and CC; n = 28), it was noted that the frequency of individuals with high ferritin decreased (BT: 21.4% vs CC: 17.9%; p = 0.008). When analyzing the median values, a reduction between BT and CC was noticed (p = 0.017) (**Figure 02**).



**Figure 02.** Comparison of median serum ferritin values between before treatment (BT) and at clinical cure (CC), in patients with chronic form of paracoccidioidomycosis. Q1: first quartile; Q3: third quartile; Wilcoxon W test.

### Transport compartment

In the transport compartment evaluated by TSAT and TIBC, it was observed that before treatment (n = 39), 27 (69.2%) and 08 (20.5%) patients had a TSAT index <30% and <16%, respectively. After starting the treatment, at CC, no decrease in the frequency of patients with TSAT <30% (n = 12; 42.9%) was observed (BT vs CC: n = 28, p = 0.071). Likewise, when analyzing the median values of this parameter, no statistical differences were noted between the periods studied (**Table 03**).

In the TIBC analysis, it was possible to observe that 22 (56.4%) individuals had this index below normal values in BT (n = 39). After starting the treatment, at CC, the frequency of individuals with a TIBC below the reference didn't decrease (n = 10; 35.7%) (p = 0.439). When analyzing the BT mean values, it was noticed that they were slightly below the normal values, and at CC these values didn't increase (**Table 03**).

**Table 03.** Comparison of mean or median values of the parameters that assess the iron transport compartment, between before treatment (BT) and at clinical cure (CC), in 30 patients with chronic form of paracoccidioidomycosis.

Variables	BT		CC		p
	Mean or Median	(SD) or [Q1;Q3]	Mean or Median	(SD) or [Q1;Q3]	
TSAT (%)	26	[18.0 ;36.8]	32.5	[24.3;40.0]	0.076
TIBC (µg/dL)	245	(100.9)	265	(85.7)	0.398

Q1: first quartile; Q3: third quartile; SD: standard deviation; TIBC: total iron binding capacity; TSAT: transferrin saturation; Wilcoxon W test; Student's t test paired.

### Functional compartment

Some parameters provided by HMG evaluated this compartment, such as Hb, RBC, HCT, and the hematimetric indices: mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin (MCH). In addition to these, to complement the evaluation, the serum iron and sTfR values and the calculation of the soluble transferrin receptor/log ferritin (sTfR/logFerr) ratio were used.

In the HMG, before treatment (n = 39), 36% (n = 14) of individuals had reduced levels of Hb, RBC and HCT. Considering anemia with Hb lower than 13.5 g/dL, it was noted that 46.1% (n = 18) were anemic, and among these, 72.2% (n = 13) the anemia was classified as normocytic and normochromic. Among the 18 anemic patients the Hb mean was 11.2 g/dL (1.21 SD).

During the healing process of these patients, between BT and CC, it was noted that the frequency of anemia and Ht was significantly reduced (**Table 04**). The improvement of this index with treatment was also observed in the mean values, which increased significantly between BT and CC (**Table 05**).

Before treatment, more than half of the patients (n =22, 56.4%) had serum iron levels below normal value and at the CC the percentage of patients with this alteration was significantly reduced (**Table 04, Figure 03**). Regarding the antifungal, it was also noted that the mean values of these patients increased significantly (**Table 05**).

No significant difference between BT and CC in the sTfR levels and sTfR/logFerritin index was found (**Table 05**).

**Table 04.** Comparison of frequency of altered iron functional compartment parameters between before treatment (BT) and clinical cure (CC) in 35 patients with chronic form of paracoccidioidomycosis.

Variables	BT n (%)	CC n (%)	p
Anemia <sup>‡</sup>	14 (40.0)	06 (17.1)	0.011
Reduced RBC	16 (45.7)	11 (31.4)	0.132
Reduced HCT	18 (51.4)	11 (31.4)	0.035
Reduced Iron *	15 (51.7)	04 (12.5)	<0.001

\*Iron evaluation in =32 patients; McNemar test; BT: before treatment; CC: clinical cure; <sup>‡</sup>Anemia: hemoglobin < 13.5 g/dL; RBC: Total erythrocytes count; HCT: hematocrit

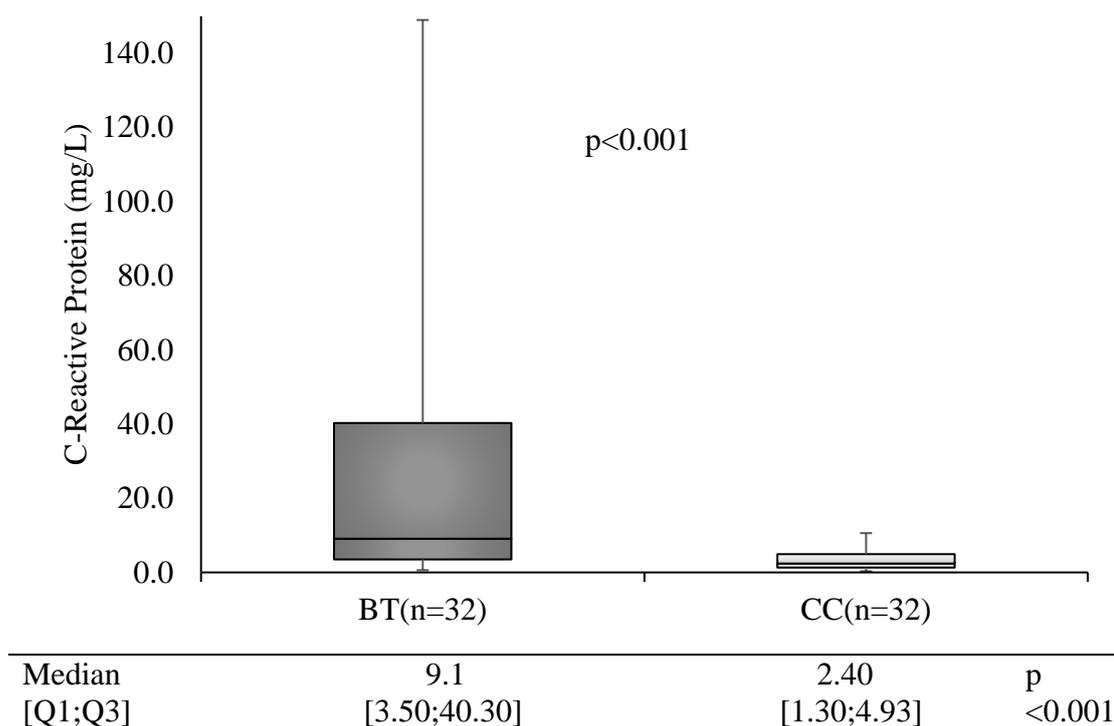
**Table 05.** Comparison of central measures of iron functional compartment parameters between before treatment and clinical cure in patients with (a) chronic form of paracoccidioidomycosis.

Variables	BT			CC			p
	n	Mean or Median	(SD) or [Q1;Q3]	n	Mean or Median	(SD) or [Q1;Q3]	
Hb g/dL	35	13.1	(2.2)	35	14.5	(1.8)	<0.001
RBC million/mm <sup>3</sup>	35	4.5	(0.6)	35	4.8	(0.6)	0.002
HCT %	35	39.9	(6.1)	35	43.6	(5.2)	<0.001
MCV fL	35	89.0	(5.7)	35	91.0	(5.3)	0.093
MCH pg	35	29.3	(2.3)	35	30.4	(2.2)	0.008
Iron µg/dL	32	64.0	[37.0 ; 88.5]	32	85.5	[69.0;109.0]	0.004
sTfR ng/mL	18	21.5	[17.4;7.6]	18	16.2	[6.3;20.2]	0.099
sTfR/logFerr	11	8.1	(2.8)	11	7.6	(3.9)	0.660

SD: standard deviation; Q1: first interquartile; Q3: third interquartile; BT: before treatment; CC: clinical cure; Hb: hemoglobin; RBC: Total erythrocytes count; HCT: hematocrit; MCV: mean corpuscular volume, MCH: mean hemoglobin concentration; sTfR: soluble transferrin receptor; sTfR/logFerr index: transferrin soluble receptor index/ferritin logarithm; Wilcoxon W test; Paired Student's t test.

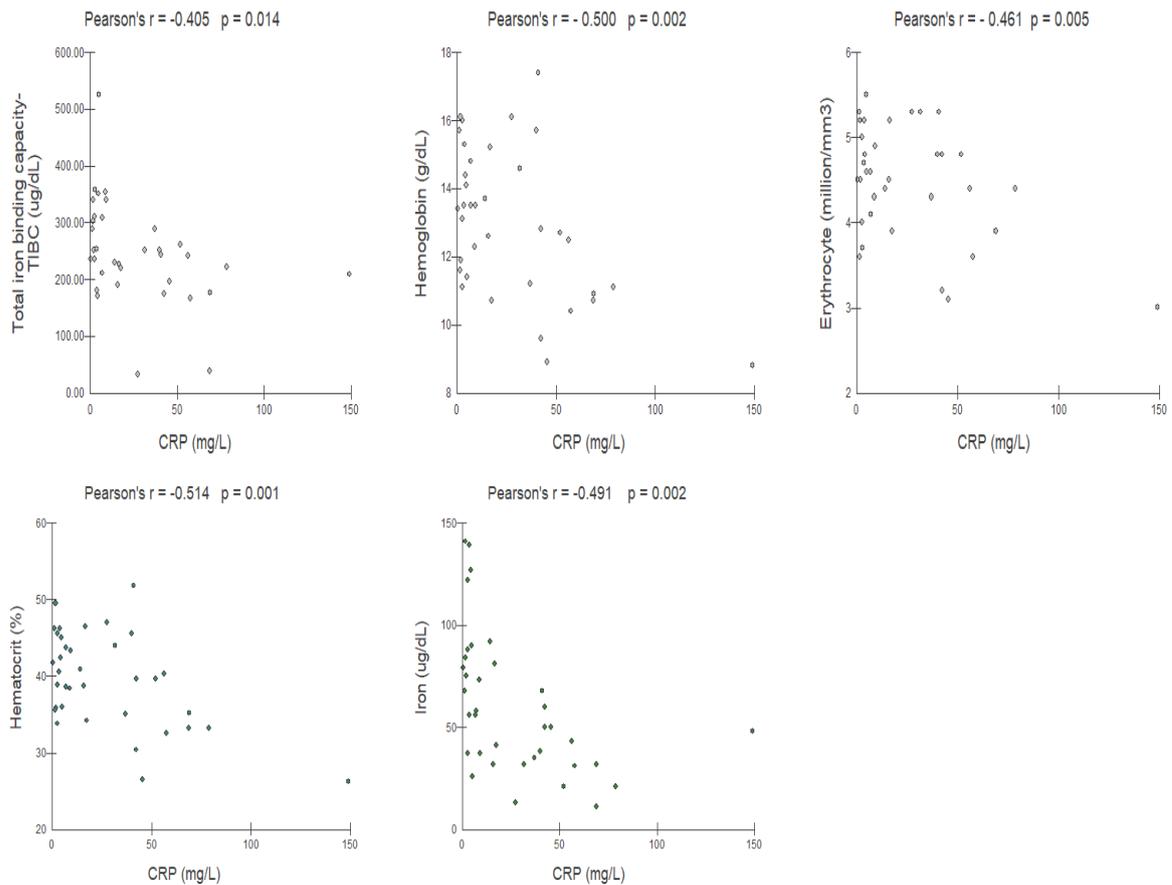
### Inflammatory Process

More than half of the patients, 20 (62.5%) individuals, had C-reactive protein (CRP) values above the normal range before treatment (n = 32). At clinical cure, the percentage of patients with values outside the normal range didn't decrease significantly (n = 7, 21.9% p = 0.225). However, when analyzing the median values in each disease process, there was a significant reduction between BT and CC (**Figure 04**).



**Figure 04.** Boxplot referring to the evaluation of the inflammatory process, through CRP in the different stages of PCM. Q1: first quartile; Q3: third quartile; BT: before treatment; CC: clinical cure; Wilcoxon W test.

When correlating the protein of the inflammatory process, CRP, in active disease (BT), with variables that assess the iron compartments, weak to moderate indirect correlations were observed with TIBC ( $r = -0.405$ ;  $p = 0.014$ ), Hb ( $r = -0.500$ ;  $p = 0.002$ ), RBC ( $r = -0.461$ ;  $p = 0.005$ ), HCT ( $r = -0.514$ ;  $p = 0.001$ ) and iron ( $r = -0.491$ ;  $p = 0.002$ ) (**Figure 05 a - e**). In CC, no correlation was found between CRP and the variables studied.



**Figure 05.** Pearson's correlation graphs of the C-reactive protein (CRP) with the variables that evaluate the iron compartments in patients with chronic form of paracoccidioidomycosis, before treatment ( $n = 36$ ). a) CRP with the TIBC: total iron binding capacity; b) CRP with the Hb: hemoglobin; c) CRP with the RBC: total erythrocyte count; d) CRP with the HCT: hematocrit.

When analyzing the central measures of the iron compartment parameters before treatment according to the severity of the disease, it was observed that there was a significant difference between the severe and mild/moderate form in the storage compartments and in the functional compartment, as well as in CRP (**Table 06**).

Table 06. Analysis of central measures of iron parameters and reactive C protein according to disease severity in patients with chronic form of paracoccidioidomycosis, before treatment.

Variables	Severe (n = 08) Mean (Sd) or Median [Q1;Q3]	Mild/moderate (n = 31) Mean (Sd) or Median [Q1;Q3]	p
<b>Stock compartment</b>			
Ferritin ng/mL	448 [308; 514]	199 [90.4; 290]	0.007
<b>Transport compartment</b>			
TSAT %	18 [14.3; 22.8]	27 [18; 38.2]	0.051
TIBC µg/dL	215 [191;245]	241 [201;310]	0.258
<b>Functional compartment</b>			
RBC million/mm <sup>3</sup>	4.05 (0.81)	4.60 (0.57)	0.031
Hb g/dL	11.8 (3.1)	13.5 (1.8)	0.050
HCT %	35.8 (8.8)	41.0 (4.8)	0.029
Iron µg/dL	40.4 (14.5)	68.1 (35.5)	0.039
CRP mg/L	51.7 [40.8 ;71.4]	7.06 [2.90 ;20.1]	<0.001

Q1: first quartile; Q3: third quartile; TSAT: Transferrin saturation; TIBC: total iron binding capacity; RBC: total erythrocyte count; Hb: hemoglobin; HCT: hematocrit; CRP: C-reactive protein; Mann-Whitney U test; Independent Student's t test.

## Discussion

The acquisition of iron by a microorganism is an important virulence mechanism (16) and it has been reported in *Paracoccidioides* spp. (9,17). Beside this, the human organism actively controls intracellular and systemic iron levels in a way that can prevent an infection and/or microbial persistence. Therefore, this study compares iron metabolism parameters before treatment and at clinical cure, analyzes them with PCM severity, and correlates them with the intensity of inflammatory process in patients with the chronic form of PCM.

The demographic and clinical characteristics of the included patients correspond as observed in other case series studies of chronic PCM, in which most patients were male adults, older than 40 years, smokers, rural workers, and with moderate severity PCM (14,18–23).

The storage compartment evaluated in this study through serum ferritin showed higher median levels before treatment, but within the normal range. Although ferritin is found stored in large amounts in liver tissues and spleen, only a small amount is detected in the circulation. But even so, its serum quantification is a common and non-invasive method that shows an accurate measure of iron in stock (24). However, the increase in serum ferritin may be related not only to increased storage but also to inflammatory activity. Because it is an acute-phase

protein in inflammatory and infectious processes and in cancer, there is an increase in the production of apoferritin due to the stimulation of interleukins such as IL-1 and IL-6 (25). Increases in these interleukins in patients with PCM have been reported (26).

In the present study it was possible to observe that in some patients, serum ferritin levels were elevated although the median values were within the normal range before treatment. However, after clinical cure these median values were significantly reduced, suggesting interference of PCM in this parameter. In addition, we observed that severe cases had higher ferritin levels probably related to the production of IL-6 caused by the fungal infection. A previous study carried out by our group showed similar results (14).

To assess the transport compartment, we used TIBC and TSAT, which is the ratio of serum iron/TIBC reported in percentage. Before treatment, the patients in this study had median values a little below the lower limit of the normal for both parameters, indicating a non-significant iron deficit in this compartment. Beside this, the antifungal therapy did not interfere with these parameters. A weak negative correlation was observed between TIBC and CRP, while no correlation was observed between TSAT and CRP levels. TIBC is an indirect measure of circulating transferrin and, in inflammatory processes, it can be found reduced (11). So, in the chronic form of PCM, the iron transport compartment parameters are less affected than stock and functional compartments.

Some authors report that TSAT below 16% is indicative of iron deficiency for erythropoiesis, but this methodology has its limitations since both iron and TIBC have lower values in inflammatory processes (12,24). In our study, TSAT values below 16% were found in eight (20.5%) patients before treatment. Even so, in only one of them iron deficiency anemia was confirmed, characterized by low Hb, ferritin, and TSAT (27). A study on the effect of PCM treatment on iron metabolism parameters showed that the specific treatment quickly leads to a return to normal values or an improvement in iron metabolism parameters, as described with the TIBC, which was lower and soon normalized after the administration of antifungal compound (28).

In clinical routine, the hemogram and serum iron level are the first indicators change in the iron status. Although our study showed that the central measurements of the parameters were little or not altered before treatment, it was possible to infer that PCM interferes in the functional iron compartment, since there was an improvement in the parameters after treatment and an association with PCM severity. In addition, a moderate correlation between Hb, RBC, HCT, and iron with CRP was found. Similar results were also observed in tuberculosis (Tb), where the mean values of these variables were lower in active disease (29).

It is known that in the human organism about 65% of the total body iron in circulation is linked to Hb (6) and that reduced Hb in chronic infectious diseases is due to a limitation of erythropoiesis caused by regulators such as IL-1 and tumor necrosis factor alpha (30). This protein is a source of iron to *Paracoccidioides* spp., which removes iron by hemolytic activity and internalizes the protoporphyrin rings through receptor-mediated pathways (31). Other fungi are also capable of removing iron from Hb, such as *Candida albicans*, through a similar mechanism (32).

During infections, the competition between the pathogen and the host for iron uptake involves strategic mechanisms for both. Thus, in response to the infectious process, the human organism activates the immune system which induces changes in circulating iron, leading to iron storage in macrophages and a decrease in the absorption of iron from the diet by enterocytes (33). Furthermore, several inflammatory cytokines are released by the cells of the immune system and also contribute to the alteration of iron metabolism (34). Despite all this host-generated deprivation of iron, all fungi, including *Paracoccidioides* spp. elaborate specific mechanisms for iron uptake through the production of molecules with high affinity for iron, the siderophores, through iron uptake pathways through reductive iron assimilation (RIA) or even through Hb receptors (9,35,36). Therefore, an inflammatory response associated with the infection alters the availability of circulating iron, increasing its intracellular storage, leading to hypoferrremia and iron-restricted erythropoiesis, as observed in our study, as all these changes can contribute to anemia of inflammation (37).

As a good indicator of iron status for not suffering systemic influence, we analyzed sTfR at BT and CC. Our results showed that the median values before treatment were normal and they didn't decrease after treatment, suggesting that body iron is normal, although it is distributed from functional to the stock compartment. High sTfR can indicate iron deficiency (38,39), and during the phase of reduction of iron stocks the levels of sTfR do not change. But when there is a decrease in functional iron, there is a stimulus for the synthesis of transferrin receptor (TfR), and consequently the sTfR increase. This parameter is mainly recommended for differentiating iron-deficiency anemia (IDA) from anemia of inflammation/chronic disease anemia (IA/ADC), as in IDA the sTfR is elevated and in IA it is normal (40–42). Studies analyzing pulmonary TB patients suggest that high sTfR levels in anemic patients indicate a probable iron deficiency and recommend examining the sTfR concentration in anemic patients who have an infectious/inflammatory process (29).

Another good indicator of iron deficiency in differential anemia is the sTfR/logFerritin ratio (43). In our study, sTfR/logFerritin index, as well as sTfR, were normal before treatment

and had no significant changes after treatment, reinforcing that anemia in the chronic PCM is inflammation anemia.

The main limitation of this study is that not all patients had all exams in the two stages evaluated, particularly the sTfR, which could be performed on only 22 patients.

In conclusion, PCM interferes with iron metabolism by shifting iron from the functional to the storage compartment, revealed by anemia, and low iron levels, with normal levels of TSAT, TIBC, sTfR, and sTfR/logFerritin index. Ferritin can be normal or slightly increased, characterizing inflammatory anemia. It should be noted, however, that a few patients did have IDA, and a careful investigation of iron compartment parameters is important for the clinical management of PCM.

## References

1. Mendes RP, Cavalcante R de S, Marques SA, Marques MEA, Venturini J, Sylvestre TF, et al. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. *TOMICROJ*. 31 de outubro de 2017;11(1):224–82.
2. Londero AT. Paracoccidioidomicose: patogenia, formas clínicas, manifestações pulmonares e diagnóstico. março de 1986;2:41–57.
3. Coutinho ZF, Silva D da, Lazéra M, Petri V, Oliveira RM de, Sabroza PC, et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saúde Pública*. outubro de 2002;18(5):1441–54.
4. Bailão EFLC, Lima P de S, Silva-Bailão MG, Bailão AM, Fernandes G da R, Kosman DJ, et al. *Paracoccidioides* spp. ferrous and ferric iron assimilation pathways. *Front Microbiol* [Internet]. 12 de agosto de 2015 [citado 18 de fevereiro de 2021];6. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2015.00821/abstract>
5. DuBois S, Kearney DJ. Iron-Deficiency Anemia and *Helicobacter pylori* Infection: A Review of the Evidence. *Am J Gastroenterology*. fevereiro de 2005;100(2):453–9.
6. Hoffbrand AV, Pettit JE, Moss PAH, Carlquist I. Fundamentos em hematologia. Porto Alegre: Artmed; 2006.
7. Paiva AA, Rondó PH, Guerra-Shinohara EM. Parâmetros para avaliação do estado nutricional de ferro. *Rev Saúde Pública*. agosto de 2000;34(4):421–6.
8. Appelberg R. Macrophage nutriptive antimicrobial mechanisms. *Journal of Leukocyte Biology*. 30 de março de 2006;79(6):1117–28.
9. Silva-Bailão MG, Bailão EFLC, Lechner BE, Gauthier GM, Lindner H, Bailão AM, et al. Hydroxamate Production as a High Affinity Iron Acquisition Mechanism in *Paracoccidioides* spp. Roop RM, organizador. *PLoS ONE*. 26 de agosto de 2014;9(8):e105805.
10. Ozaki KS, Munhoz Júnior S, Pinheiro EK, Tadano T, Fontes CJF. Diagnóstico de

paracoccidioidomicose disseminada grave em aspirado de medula óssea: relato de caso. *Rev Soc Bras Med Trop.* agosto de 1996;29(4):363–6.

11. Wians FH, Urban JE, Keffer JH, Kroft SH. Discriminating Between Iron Deficiency Anemia and Anemia of Chronic Disease Using Traditional Indices of Iron Status vs Transferrin Receptor Concentration. *Am J Clin Pathol.* janeiro de 2001;115(1):112–8.

12. Cook JD. Clinical evaluation of iron deficiency. *Semin Hematol.* janeiro de 1982;19(1):6–18.

13. Cook J. Diagnosis and management of iron-deficiency anaemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology.* junho de 2005;18(2):319–32.

14. de Oliveira Custódio JM, Enokida IM, Gonçalves DA, Leone de Oliveira SM do V, Venturini J, Carvalho LR, et al. Dynamics of plasma micronutrient concentrations and their correlation with serum proteins and thyroid hormones in patients with paracoccidioidomycosis. Vicente CR, organizador. *PLoS ONE.* 26 de dezembro de 2019;14(12):e0226609.

15. The jamovi project. Jamovi [Internet]. 2021. Disponível em: <https://www.jamovi.org>

16. Nevitt T. War-Fe-re: iron at the core of fungal virulence and host immunity. *Biometals.* junho de 2011;24(3):547–58.

17. Parente AFA, Bailão AM, Borges CL, Parente JA, Magalhães AD, Ricart CAO, et al. Proteomic analysis reveals that iron availability alters the metabolic status of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *PLoS One.* 2011;6(7):e22810.

18. Paniago AMM, Aguiar JIA, Aguiar ES, Cunha RV da, Pereira GR de OL, Londero AT, et al. Paracoccidioidomicose: estudo clínico e epidemiológico de 422 casos observados no Estado de Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop.* julho de 2003;36(4):455–9.

19. Queiroz-Telles F, Escuissato DL. Pulmonary paracoccidioidomycosis. *Semin Respir Crit Care Med.* dezembro de 2011;32(6):764–74.

20. Matos WB de, Santos GMC dos, Silva VEB da, Gonçalves E da G do R, Silva AR da. Paracoccidioidomycosis in the state of Maranhão, Brazil: geographical and clinical aspects. *Rev Soc Bras Med Trop.* junho de 2012;45(3):385–9.

21. Fabris LR, Andrade ÚV, Santos AFD, Marques AP da C, Oliveira SM do VL de, Mendes RP, et al. Decreasing prevalence of the acute/subacute clinical form of paracoccidioidomycosis in Mato Grosso do Sul State, BRAZIL. *Rev Inst Med trop S Paulo.* abril de 2014;56(2):121–5.

22. Peçanha PM, Batista Ferreira ME, Massaroni Peçanha MA, Schmidt EB, Lamas de Araújo M, Zanotti RL, et al. Paracoccidioidomycosis: Epidemiological and Clinical Aspects in 546 Cases Studied in the State of Espírito Santo, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* setembro de 2017;97(3):836–44.

23. dos Santos WA, da Silva BM, Passos ED, Zandonade E, Falqueto A. [Association between smoking and paracoccidioidomycosis: a case-control study in the State of Espírito Santo, Brazil]. *Cad Saude Publica.* fevereiro de 2003;19(1):245–53.

24. Cook JD, Baynes RD, Skikne BS. Iron deficiency and the measurement of iron status. *Nutr Res Rev.* janeiro de 1992;5(1):198–202.
25. Baynes RD. Assessment of iron status. *Clinical Biochemistry.* junho de 1996;29(3):209–15.
26. Leal AMO, Magalhães PKR, Martinez R, Moreira AC. Adrenocortical hormones and interleukin patterns in paracoccidioidomycosis. *J Infect Dis.* 1º de janeiro de 2003;187(1):124–7.
27. Camaschella C, Nai A, Silvestri L. Iron metabolism and iron disorders revisited in the hepcidin era. *Haematologica.* 2020;105(2):260–72.
28. Martinez R, Fiorillo AM. [Effect of treatment of South American blastomycosis (paracoccidioidomycosis) on parameters of iron metabolism]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* agosto de 1978;20(4):190–4.
29. Ratnaningsih T, Sukirto NW, Wahyuningsih AT. Soluble Transferrin Receptor (sTfR) Identifies Iron Deficiency Anemia (IDA) in Pulmonary Tuberculosis Patients. *Acta Med Indones.* outubro de 2020;52(4):334–43.
30. Means RT. Advances in the anemia of chronic disease. *Int J Hematol.* julho de 1999;70(1):7–12.
31. Bailão EFLC, Parente JA, Pigosso LL, Castro KP de, Fonseca FL, Silva-Bailão MG, et al. Hemoglobin Uptake by *Paracoccidioides* spp. Is Receptor-Mediated. *Vinetz JM, organizador. PLoS Negl Trop Dis.* 15 de maio de 2014;8(5):e2856.
32. Kuznets G, Vigonsky E, Weissman Z, Lalli D, Gildor T, Kauffman SJ, et al. A relay network of extracellular heme-binding proteins drives *C. albicans* iron acquisition from hemoglobin. *PLoS Pathog.* outubro de 2014;10(10):e1004407.
33. Muckenthaler MU, Rivella S, Hentze MW, Galy B. A Red Carpet for Iron Metabolism. *Cell.* 26 de janeiro de 2017;168(3):344–61.
34. Symeonidis AS. The role of iron and iron chelators in zygomycosis. *Clin Microbiol Infect.* outubro de 2009;15 Suppl 5:26–32.
35. Stanford FA, Voigt K. Iron Assimilation during Emerging Infections Caused by Opportunistic Fungi with emphasis on Mucorales and the Development of Antifungal Resistance. *Genes (Basel).* 30 de outubro de 2020;11(11):E1296.
36. Misslinger M, Hortschansky P, Brakhage AA, Haas H. Fungal iron homeostasis with a focus on *Aspergillus fumigatus*. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* janeiro de 2021;1868(1):118885.
37. Weiss G, Ganz T, Goodnough LT. Anemia of inflammation. *Blood.* 03 de 2019;133(1):40–50.
38. Baillie FJ, Morrison AE, Fergus I. Soluble transferrin receptor: a discriminating assay for iron deficiency. *Clin Lab Haematol.* dezembro de 2003;25(6):353–7.

39. Punnonen K, Irjala K, Rajamäki A. Iron-deficiency anemia is associated with high concentrations of transferrin receptor in serum. *Clin Chem.* maio de 1994;40(5):774–6.
40. Worwood M. Serum transferrin receptor assays and their application. *Ann Clin Biochem.* 1º de maio de 2002;39(3):221–30.
41. Peng YY, Uprichard J. Ferritin and iron studies in anaemia and chronic disease. *Ann Clin Biochem.* janeiro de 2017;54(1):43–8.
42. Infusino I, Braga F, Dolci A, Panteghini M. Soluble transferrin receptor (sTfR) and sTfR/log ferritin index for the diagnosis of iron-deficiency anemia. A meta-analysis. *Am J Clin Pathol.* novembro de 2012;138(5):642–9.
43. Skikne BS, Punnonen K, Caldron PH, Bennett MT, Rehu M, Gasior GH, et al. Improved differential diagnosis of anemia of chronic disease and iron deficiency anemia: A prospective multicenter evaluation of soluble transferrin receptor and the sTfR/log ferritin index. *Am J Hematol.* novembro de 2011;86(11):923–7.



### Artigo 3 – Análise da hepcidina sérica em pacientes com paracoccidioidomicose crônica

#### Resumo

Na paracoccidioidomicose (PCM) as manifestações clínicas dependerão da patogenicidade e virulência do fungo, assim como da integridade do sistema de defesa e da resposta imunológica gerada. Mecanismo de defesa do hospedeiro tal como limitar a captação do ferro (Fe) pelo microrganismo, impede a progressão da infecção fúngica. A regulação sistêmica do ferro sérico no organismo hospedeiro é realizada pela hepcidina. Além deste papel essencial, a hepcidina também possui ação antimicrobiana e antifúngica sem ocasionar efeitos tóxicos sobre as células do hospedeiro. Com o objetivo de analisar os níveis de hepcidina sérica em pacientes com a forma crônica da PCM, antes e durante o tratamento, e correlacionar a hepcidina com parâmetros do metabolismo do ferro e com as células sanguíneas, realizou-se um estudo com pacientes atendidos em um hospital universitário no período de 2013 a 2021. A hepcidina sérica, células hematológicas, ferro, ferritina e proteína C reativa (PCR) foram analisadas antes do tratamento (AT) e em cura clínica (CC). Na análise estatística, o teste Wilcoxon e o teste U-Mann-Whitney foram utilizados para a comparação de variáveis contínuas e em amostras pareadas e independentes, respectivamente. Para determinar a relação entre a hepcidina e as variáveis estudadas o teste de correlação de Pearson foi utilizado. O nível de significância estabelecido foi de  $p < 0,05$ . Participaram do estudo 42 pacientes, a maioria homem (97,6%) e a média de idade foi de 54,2 (DP 6,6) anos. Apesar do aumento de hemoglobina e ferro e redução de ferritina observados entre AT e CC, não houve redução nos níveis de hepcidina. Observou-se correlação positiva com células leucocitárias ( $r = 0,483$ ;  $p = 0,001$ ), neutrófilos ( $r = 0,418$ ;  $p = 0,006$ ), monócitos ( $r = 0,396$ ;  $p = 0,009$ ) e com a ferritina ( $r = 0,528$ ;  $p = 0,002$ ). Entretanto, não foi encontrada correlação com o ferro ( $r = 0,306$ ;  $p = 0,070$ ). Em síntese, na forma crônica da PCM, não se observou queda da hepcidina com o tratamento, tampouco correlação com níveis séricos de ferro e hemoglobina. No entanto, houve correlação positiva com neutrófilos e monócitos, duas células fagocitárias que atuam na primeira linha de defesa da PCM e são sabidamente produtoras de hepcidina.

**Palavras-chave:** Ferro; Hemograma; Hpcidina; Metabolismo do ferro; Paracoccidioidomicose

## Introdução

Causada por fungos termodimórficos do gênero *Paracoccidioides*, a paracoccidioomicose (PCM) é uma micose sistêmica endêmica na América Latina. No Brasil, as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste são consideradas como as regiões de maior incidência (COUTINHO et al., 2002;). A infecção ocorre após a inalação de conídios, presentes no solo, que ao se instalarem nos pulmões se transformam em leveduras, as quais podem se disseminar para outros tecidos através do sistema linfático ou hematogênico (FRANCO et al., 1984). De acordo com as manifestações clínicas, a PCM pode ser classificada, principalmente, em forma aguda/subaguda (forma juvenil) e crônica (forma adulta). A forma crônica é observada em indivíduos adultos com mais de 30 anos e afeta os pulmões e as membranas mucosas do aparelho digestivo superior e das vias aéreas (MENDES et al., 2017).

Assim como em outras doenças fúngicas, na PCM, a infecção paracoccidioica é autolimitada em grande parte dos indivíduos que são expostos ao fungo, mas naqueles onde a doença se instala, as manifestações clínicas dependerão da patogenicidade e virulência do fungo, assim como da integridade do sistema de defesa e da resposta imunológica gerada (BENARD, 2008).

Alguns mecanismos de defesa do organismo hospedeiro são estratégias que impedem a progressão da infecção fúngica, como limitar as funções vitais dos fungos, por exemplo impedindo a captação do ferro, essencial para a proliferação de muitos patógenos, assim como *Paracoccidioides* spp. (BAILÃO et al., 2015).

A regulação sistêmica dos níveis de ferro circulante no organismo hospedeiro, seja proveniente da dieta ou da reciclagem por macrófagos ou dos hepatócitos, é realizada por um hormônio sintetizado principalmente pelos hepatócitos, a hepcidina. A síntese de hepcidina ocorre quando há um estímulo através de citocinas, como a IL-6, durante processos inflamatórios ou infecciosos e/ou quando os níveis de ferro no organismo estão elevados. Por outro lado, quando a concentração deste mineral circulante está com níveis mais baixos, a síntese de hepcidina é inibida. Sendo assim, esta regulação do ferro ocorre quando a hepcidina liga-se à ferroportina, uma proteína exportadora de ferro do meio intracelular para o meio extracelular, formando um complexo. Após a formação deste complexo, a ferroportina é internalizada e degradada. Desta maneira, ocorre a diminuição de ferro circulante no organismo e este mineral é acumulado no citosol, sendo armazenado pela ferritina (NEMETH, 2004; NEMETH et al., 2003).

Na PCM crônica, durante a fase ativa da doença, foi observado que há uma diminuição nos níveis séricos de ferro e nos níveis de hemoglobina (DE OLIVEIRA CUSTÓDIO et al., 2019), no entanto, o papel da hepcidina nessas alterações não foi estudado. Assim, o presente estudo objetivou analisar os níveis de hepcidina sérica em pacientes com a forma crônica da PCM antes e durante o tratamento e correlacionar a hepcidina com parâmetros do metabolismo do ferro e células sanguíneas de defesa.

## **Pacientes e método**

### **Localização, período de estudo e aspectos éticos**

Este estudo foi desenvolvido no ambulatório de micoses sistêmicas da Unidade de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian (UNIDIP-HUMAP), da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (HU-UFMS), um centro de referência para doenças infecciosas. Os participantes deste estudo foram atendidos entre maio de 2013 e fevereiro de 2021.

Foi realizado com o consentimento informado e assinado pelos participantes, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (CEP - UFMS) (número CAAE 21534919.2.0000.0021).

## **Pacientes**

### **Definição de caso**

Foram considerados casos de PCM aqueles que apresentaram manifestações clínicas sugestivas e quando houve a identificação das formas típicas do gênero *Paracoccidioides* spp. por método de diagnóstico direto, micológico, cultura ou histopatológico direto e/ou quando anticorpos específicos ao soro foram detectados pelo método de imunodifusão em gel de ágar duplo (IDD).

### **Critérios de Inclusão e Exclusão**

Foram incluídos pacientes de ambos os sexos com a forma crônica da PCM.

Foram excluídos pacientes que não tinham soro armazenado no biorrepositório, e os e os que tinham outras condições médicas que pudessem anemia tais como infecção pelo HIV, tuberculose neoplasia, doença autoimune ou doença renal crônica.

## **Dados clínicos e laboratoriais**

Dados sociodemográficos tais como sexo, idade, histórico da ocupação profissional, uso de tabaco, bem como os dados clínicos foram coletados antes do início do tratamento.

Os dados laboratoriais, como hemograma e ferrograma foram obtidos do sistema eletrônico do hospital HUMAP/ UFMS, e foram realizados na mesma metodologia durante todo o período do estudo. Já a hepcidina sérica foi dosada em soro estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

A gravidade da forma crônica de PCM foi classificada em leve, moderada ou grave (MENDES et al., 2017).

- a) Leve: pacientes com uma redução no índice de massa corporal (IMC) inferior que 5% do habitual e o acometimento de um ou poucos órgãos ou tecidos, sem alterações funcionais.
- b) Grave: pacientes aqueles que apresentavam três ou mais critérios como: i) perda de  $\text{IMC} \leq 10\%$ ; ii) envolvimento pulmonar intenso; iii) comprometimento de outros órgãos, tais como sistema nervoso central, glândulas adrenais e ossos; iv) aumento de linfonodos em múltiplas cadeias na forma pseudotumoral superficial ou profunda ( $> 2,0$  cm de diâmetro, sem supuração) ou na forma supurativa; v) presença de títulos de anticorpos elevados.
- c) Moderado: pacientes intermediários entre formas leve e grave.

### **Desenho do estudo**

Este foi um estudo quantitativo analítico com coleta de dados prospectivos, avaliando pacientes antes do tratamento e no estágio de cura clínica.

Os resultados laboratoriais dos pacientes com PCM, foram obtidos em dois estágios do seguimento ambulatorial de rotina:

- a) **AT** – Antes do tratamento;
- b) **CC** – Cura clínica (desaparecimento de sinais e sintomas) (MENDES et al., 2017).

### **Procedimento de análise**

O perfil hematológico dos pacientes foi avaliado usando o hemograma completo determinado pelo equipamento hematológico da Série-XN 3000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) do HUMAP/UFMS. Os parâmetros analisados e seus respectivos valores de referência foram: Hemoglobina (13,5 a 17 g/dL), leucócitos totais ( $4500$  a  $11000/\text{mm}^3$ ), diferencial leucocitário: neutrófilos ( $1845$  a  $8470/\text{mm}^3$ ), linfócitos ( $990$  a  $4840/\text{mm}^3$ ), monócitos ( $45$  a  $880/\text{mm}^3$ ) e eosinófilos ( $45$  a  $880/\text{mm}^3$ ).

Para avaliar a intensidade do processo inflamatório utilizaram-se os valores séricos de PCR de alta sensibilidade medidos através do método imunoturbidimétrico (Cobas 600 Analyzer E501). Valores de referência: 0 a 5,0 mg/L.

O estado do ferro foi analisado através da análise da ferritina sérica dosada pelo teste de imunoensaio de eletroquimioluminescência (Roche) e pelos níveis séricos de ferro pelo ensaio colorimétrico (Roche). Valores de referência de acordo com o fabricante: ferritina masculino: 30 - 400 ng/mL e feminino: 13 -150 ng/mL; ferro: 61 - 157 ug/dL.

A hepcidina sérica foi analisada pelo método imunoenzimático (ELISA) (Human Hcpidin Quantikine ELISA Kit/ Bio-Techne - R&D Systems) seguindo as orientações do fabricante. A faixa de detecção da hepcidina foi de 0,08 a 45,97 ng/mL.

### **Análise estatística**

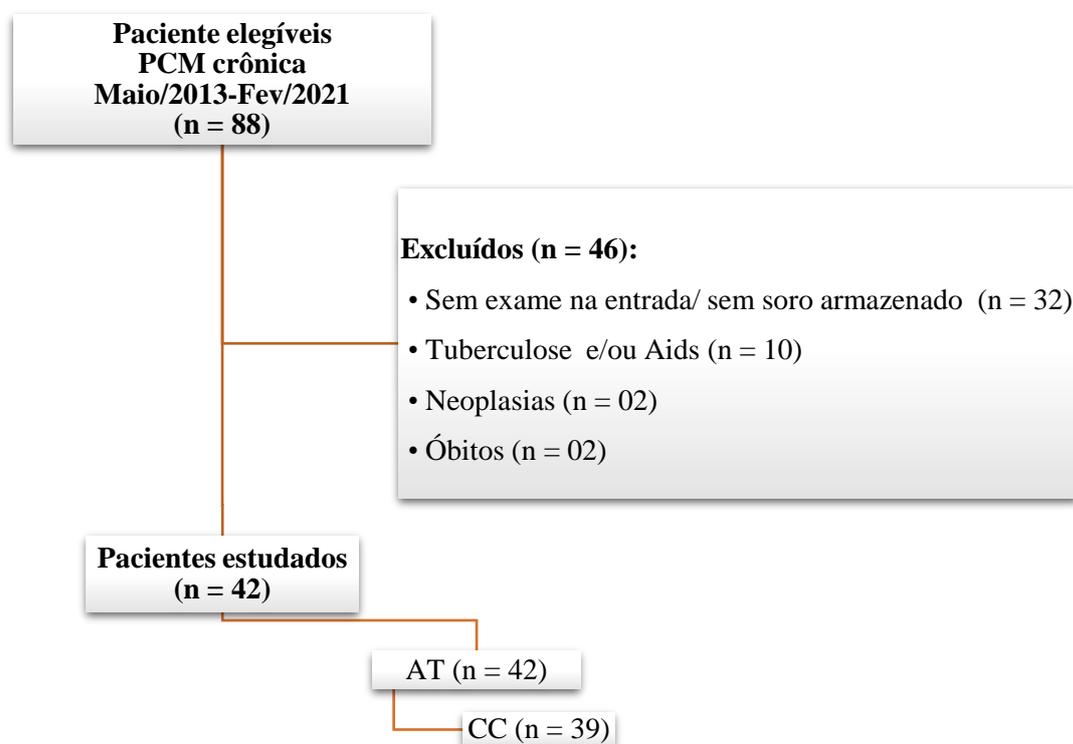
As análises estatísticas foram realizadas no software Jamovi (Version 1.6) para Windows (THE JAMOVI PROJECT, 2021).

A comparação das variáveis contínuas em dois estágios da doença foi realizada utilizando o teste Wilcoxon W. Para amostras independentes utilizou o teste U- Mann-Whitney. Para determinar a relação entre a hepcidina e as variáveis estudadas utilizou-se a correlação de Pearson (r). Para análise de variáveis categóricas em uma única amostra utilizou-se o teste de proporção. Os valores esperados eram iguais para cada categoria. Para todos os testes foi adotado como nível de significância valores de  $p < 0,05$ .

### **Resultados**

Oitenta e oito indivíduos foram diagnosticados com PCM crônica no ambulatório de micoses sistêmicas da UNIDIP-HUMAP/ UFMS, entre o período de maio de 2013 a fevereiro de 2021. Desse total, 46 pacientes foram excluídos de acordo com os critérios estabelecidos e 42 pacientes foram elegíveis para participar do estudo (Figura 1).

Figura 01. Fluxograma da população do estudo entre o período de maio de 2013 a fevereiro 2021.



A maioria dos pacientes eram do sexo masculino ( $n = 41$ ; 97,6%), com média de idade de 54,2 (DP 6,6) anos, tabagista ( $n = 35$ ; 83,3%), trabalhadores rurais ( $n = 38$ ; 92,7%) e com moderada gravidade da doença ( $n = 25$ ; 59,5%) (Tabela 1).

Tabela 1. Variáveis sócio-demográficas e clínica de pacientes com a forma crônica da paracoccidiodomicose atendidos no hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian entre 2013 e 2021 (n = 42).

<b>Variáveis</b>	<b>n</b>	<b>(%)</b>	<b>IC95%</b>		<b>p</b>
<b>Sexo</b>					<0,001
Masculino	41	(97,6)	87,4	99,9	
Feminino	01	(2,4)	0,06	12,6	
<b>Atividade Rural (n = 41)</b>					<0,001
Prévio	23	(56,1)	39,7	71,5	
Regular	15	(36,6)	22,1	53,1	
Nunca	03	(7,3)	1,5	19,9	
<b>Uso de Tabaco</b>					<0,001
Regular	35	(83,3)	68,6	93,0	
Ex-tabagista	05	(11,9)	4,0	25,6	
Nunca	02	(4,8)	0,6	16,2	
<b>Gravidade da PCM</b>					<0,001
Moderada	25	(59,5)	43,3	74,4	
Grave	11	(26,2)	13,9	42,0	
Leve	06	(14,3)	5,4	28,5	

n: número de paciente; %: porcentagem; IC: intervalo de confiança; Teste de proporção do qui quadrado para uma amostra, com valores esperados para cada subtipo.

Não houve diferença significativa nos valores de hepcidina sérica entre AT e CC. No entanto, foi notado que entre estes dois estágios, houve aumento significativo de hemoglobina e ferro e redução de monócitos, neutrófilos, ferritina e PCR (Tabela2).

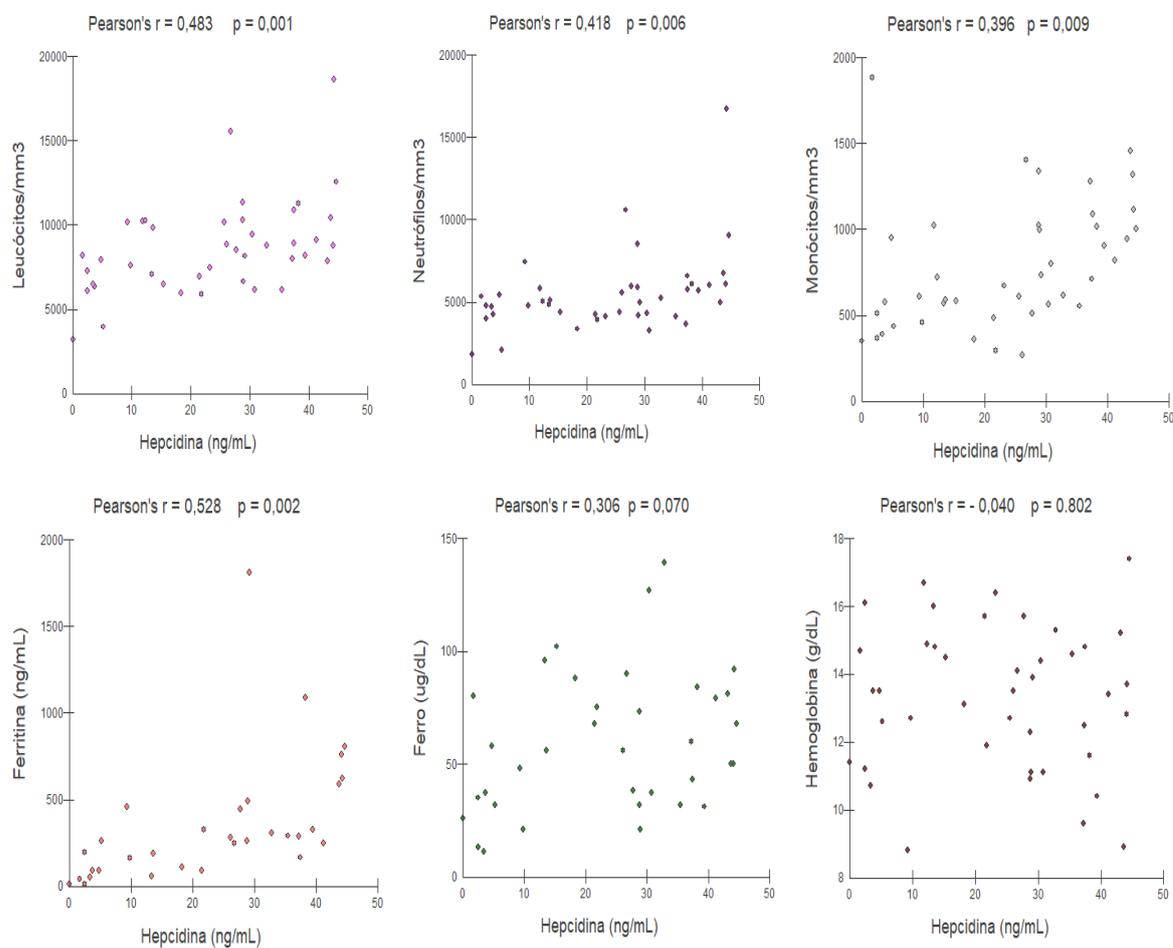
Tabela 2. Níveis de hepcidina sérica e variáveis estudadas de pacientes com a forma crônica da paracoccidiodomicose durante o processo de cura.

Variáveis	AT			CC			p
	n	Média Mediana	(DP) [Q1;Q3]	n	Média Mediana	(DP) [Q1;Q3]	
Hepcidina ng/mL	39	23,7	(13,4)	39	20,2	(14)	0,125
Ferro µg/dL	31	60,0	[37-86]	31	85,0	[69-109,5]	<b>0,003</b>
Ferritina ng/mL	28	252,0	[91,1;324,4]	28	157,0	[69,4;328,5]	<b>0,015</b>
PCR mg/L	36	11,0	[3,5;39,7]	36	2,6	[1,2-5,3]	<b>&lt;0,001</b>
Hemoglobina g/dL	39	13,6	(2,1)	39	14,7	(1,8)	<b>&lt;0,001</b>
Leucócitos/mm <sup>3</sup>	39	8200,0	[6775;10185]	39	7640,0	[6490;8885]	0,042
Neutrófilos/mm <sup>3</sup>	39	5027,0	[4242;5918]	39	4422,0	[3400;5472]	<b>0,009</b>
Monócitos/mm <sup>3</sup>	39	710,0	[558;100]	39	533,0	[423;777]	<b>0,002</b>
Linfócitos/mm <sup>3</sup>	39	2129,3	(87,5)	39	2160,1	(765,1)	0,780
Eosinófilos/mm <sup>3</sup>	39	170,0	[64,2;356]	39	171,0	[106;359]	0,361

AT: antes do tratamento; CC: cura clínica; PCR: proteína C reativa; Q1: primeiro quartil; Q3: terceiro quartil; teste Wilcoxon W; teste t Student pareado.

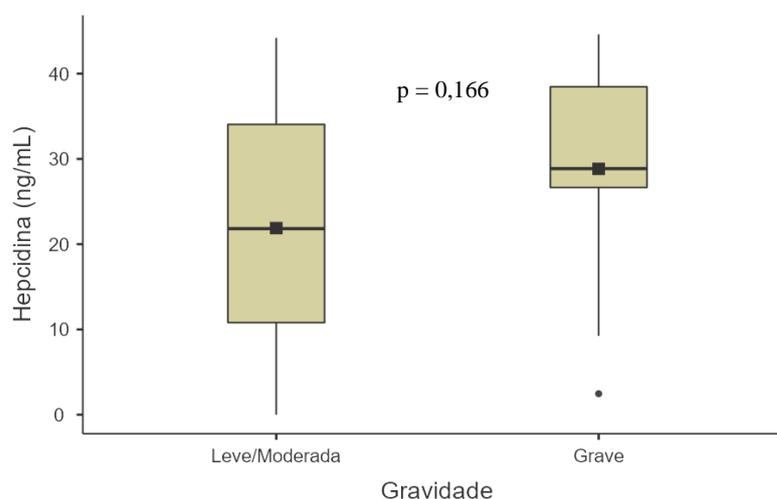
A correlação entre a hepcidina e as variáveis estudadas a admissão (AT) revelaram correlação direta com leucócitos ( $r = 0,483$ ;  $p = 0,001$ ), neutrófilos ( $r = 0,418$ ;  $p = 0,006$ ), monócitos ( $r = 0,396$ ;  $p = 0,009$ ) e com a ferritina ( $r = 0,528$ ;  $p = 0,002$ ). Não foi encontrada correlação com o ferro ( $r = 0,306$ ;  $p = 0,070$ ) nem com hemoglobina ( $r = -0,040$ ,  $p = 0,802$ ) (Figura 2). Entretanto, observou-se uma correlação indireta dos valores de ferro com os de PCR antes do tratamento ( $r = -0,473$ ;  $p = 0,005$ ).

Figura 2. Gráfico de correlação de Pearson da hepcidina com as variáveis leucócitos, neutrófilos, monócitos, ferritina e ferro em pacientes com a forma crônica da paracoccidiodomicose antes do tratamento.



Os resultados mostram que os valores séricos de hepcidina não foram associadas com a gravidade da PCM antes do tratamento (Figura 3).

Figura 3. Influência da gravidade dos pacientes com a forma crônica paracoccidioidomicose sobre os níveis séricos da hepcidina (teste t student – amostra independente).



## Discussão

As características demográficas e clínicas dos participantes do presente estudo são semelhantes às reportadas em outras casuísticas de PCM crônica, com importante predomínio em adultos do sexo masculino, com mais de 40 anos, tabagistas, trabalhadores rurais que tiveram contato intenso e contínuo com o solo, e com moderada gravidade da PCM (FABRIS et al., 2014; PEÇANHA et al., 2017).

Apesar do aumento dos níveis de ferro e da hemoglobina observado entre os estágios AT e CC, não foi possível observar redução da hepcidina entre os dois estágios, como era esperado. Estudos com outros patógenos puderam confirmar os baixos valores de hepcidina antes do tratamento e subsequente elevação após o tratamento, como com hepatite C crônica (ALI et al., 2020), influenza H1N1 (ARMITAGE et al., 2011) e tuberculose (MINCHELLA et al., 2015).

Além de não ser possível observar a redução dos valores de hepcidina após resposta terapêutica na PCM, também não observamos associação com a gravidade nem correlação da hepcidina com os níveis de ferro, hemoglobina e proteína C reativa. Corroborando com estes achados, em um estudo com indivíduos com tuberculose e hipoferremia também não se observou correlação do ferro sérico com hepcidina, indicando que em infecções por

*Mycobacterium tuberculosis*, a síntese de hepcidina pode ser regulada por outros fatores além do ferro.

A diminuição nas concentrações de ferro sérico em resposta ao processo inflamatório, está relacionada com a liberação de citocinas pelo sistema imune. Estas citocinas, como interferon gama (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 1 (IL-1) atuam no metabolismo do ferro e auxiliam o organismo hospedeiro a eliminar o agente agressor (JELKMANN, 1998; LUDWICZEK et al., 2003).

Uma correlação direta entre hepcidina e ferritina foi encontrada na PCM crônica antes do tratamento, sendo reportados resultados semelhantes em indivíduos infectados por *Mycobacterium tuberculosis* (TASHIRO et al., 2019). Durante uma infecção/inflamação aguda ou crônica, a ferritina atua como uma proteína de fase aguda (NAMASTE et al., 2017), o que explicaria os níveis aumentados tanto na tuberculose quanto na PCM crônica.

A hepcidina foi correlacionada diretamente com os leucócitos, monócitos e neutrófilos. A hepcidina além de ser sintetizada pelas células do fígado, também é sintetizado por neutrófilos e monócitos/macrófagos (HENTZE et al., 2010; LIU et al., 2005; PEYSSONNAUX et al., 2006). Nessas células, a síntese ocorre através de mecanismo autócrino, em resposta às interleucinas, independentemente dos níveis de ferro sérico (PEYSSONNAUX et al., 2006; THEURL et al., 2008), atuando a nível local, em resposta à infecção, que conseqüentemente diminui o ferro circulante (THEURL et al., 2008), contribuindo para a defesa do hospedeiro (ZHANG; ROVIN, 2013).

Alem disso, a hepcidina foi relatada primeiramente como um peptídeo de ação antimicrobiana direta contra bactérias Gram positivas e negativas tais como *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, e com ação antifúngica contra alguns fungos tais como *Saccharomyces cerevisiate*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* e *Candida albicans*, sem ocasionar efeitos tóxicos sobre as células do hospedeiro (KRAUSE et al., 2000; MAISETTA et al., 2010; PARK et al., 2001; PIGEON et al., 2001).

Como limitação deste estudo, podemos citar o pequeno número de pacientes incluídos e que de fato nem todos os participantes tiveram os níveis de hepcidina dosados nos dois estágios da doença. Além disso, interleucinas tais como IL-6 não foram analisadas.

Ao comparar os dois momentos, antes do tratamento e após cura clínica, observar-se aumento dos níveis séricos e redução do estoque de ferro, refletindo no aumento da hemoglobina. Corroborando, os valores de PCR, um biomarcador de inflamação, tiveram uma redução importante sugerindo uma atenuação do processo inflamatório causado pela PCM, e,

foi acompanhada pelo aumento do ferro sérico, indicando que a melhora no processo inflamatório pode estar promovendo uma recuperação do aporte de ferro para a eritropoiese. Apesar de não se ter observado queda dos níveis de hepcidina com o tratamento, tampouco correlação entre hepcidina e ferro sérico e hemoglobina, a correlação da hepcidina com os estoques intracelulares de ferro no organismo (ferritina) sugerem a sua importância no metabolismo do ferro na PCM crônica.

### Referências:

ALI, M. et al. Serum Heparin In Patients With Chronic Hepatitis C And Its Relation To Treatment With Antiviral Drugs. **Al-Azhar International Medical Journal**, v. 0, n. 0, p. 0–0, 30 jun. 2020.

ARMITAGE, A. E. et al. Heparin regulation by innate immune and infectious stimuli. **Blood**, v. 118, n. 15, p. 4129–4139, 13 out. 2011.

BAILÃO, E. F. L. C. et al. *Paracoccidioides* spp. ferrous and ferric iron assimilation pathways. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 12 ago. 2015.

BENARD, G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4–5, p. 209–221, abr. 2008.

COUTINHO, Z. F. et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 5, p. 1441–1454, out. 2002.

DE OLIVEIRA CUSTÓDIO, J. M. et al. Dynamics of plasma micronutrient concentrations and their correlation with serum proteins and thyroid hormones in patients with paracoccidioidomycosis. **PLOS ONE**, v. 14, n. 12, p. e0226609, 26 dez. 2019.

FABRIS, L. R. et al. DECREASING PREVALENCE OF THE ACUTE/SUBACUTE CLINICAL FORM OF PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS IN MATO GROSSO DO SUL STATE, BRAZIL. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 2, p. 121–125, abr. 2014.

HENTZE, M. W. et al. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. **Cell**, v. 142, n. 1, p. 24–38, 9 jul. 2010.

JELKMANN, W. Proinflammatory Cytokines Lowering Erythropoietin Production. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 18, n. 8, p. 555–559, ago. 1998.

KRAUSE, A. et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. **FEBS Letters**, v. 480, n. 2–3, p. 147–150, 1 set. 2000.

LIU, X.-B. et al. Regulation of hepcidin and ferroportin expression by lipopolysaccharide in splenic macrophages. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 35, n. 1, p. 47–56, jul. 2005.

LONDERO, A. T. Paracoccidioidomicose: patogenia, formas clínicas, manifestações pulmonares e diagnóstico. **Jornal de Pneumologia**. v. 2, p. 41–57, mar. 1986.

LUDWICZEK, S. et al. Cytokine-mediated regulation of iron transport in human monocytic cells. **Blood**, v. 101, n. 10, p. 4148–4154, 15 maio 2003.

MAISETTA, G. et al. Antimicrobial activity of human hepcidin 20 and 25 against clinically relevant bacterial strains: Effect of copper and acidic pH. **Peptides**, v. 31, n. 11, p. 1995–2002, nov. 2010.

MENDES, R. P. et al. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. **The Open Microbiology Journal**, v. 11, n. 1, p. 224–282, 31 out. 2017.

MENDES-GIANNINI, M. J. S. et al. Interaction of pathogenic fungi with host cells: Molecular and cellular approaches. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 383–394, set. 2005.

MINCHELLA, P. A. et al. Complex Anemia in Tuberculosis: The Need to Consider Causes and Timing When Designing Interventions. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 5, p. 764–772, 1 mar. 2015.

MOTA, N. G. S. et al. Mononuclear cell subsets in patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. **Medical Mycology**, v. 26, n. 2, p. 105–111, jan. 1988.

NAMASTE, S. M. et al. Biomarkers Reflecting Inflammation and Nutritional Determinants of Anemia (BRINDA). **The American Journal of Clinical Nutrition**, 2017.

NEMETH, E. et al. Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. **Blood**, v. 101, n. 7, p. 2461–2463, 1 abr. 2003.

NEMETH, E. Hepcidin Regulates Cellular Iron Efflux by Binding to Ferroportin and Inducing Its Internalization. **Science**, v. 306, n. 5704, p. 2090–2093, 17 dez. 2004.

PANIAGO, A. M. M. et al. Paracoccidioidomycose: estudo clínico e epidemiológico de 422 casos observados no Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 4, p. 455–459, jul. 2003.

PARK, C. H. et al. Hepcidin, a Urinary Antimicrobial Peptide Synthesized in the Liver. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 11, p. 7806–7810, mar. 2001.

PEÇANHA, P. M. et al. Paracoccidioidomycosis: Epidemiological and Clinical Aspects in 546 Cases Studied in the State of Espírito Santo, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 3, p. 836–844, set. 2017.

PEYSSONNAUX, C. et al. TLR4-dependent hepcidin expression by myeloid cells in response to bacterial pathogens. **Blood**, v. 107, n. 9, p. 3727–3732, 1 maio 2006.

PIGEON, C. et al. A New Mouse Liver-specific Gene, Encoding a Protein Homologous to Human Antimicrobial Peptide Hepcidin, Is Overexpressed during Iron Overload. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 11, p. 7811–7819, mar. 2001.

QUEIROZ-TELLES, F.; ESCUISSATO, D. L. Pulmonary paracoccidioidomycosis. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 32, n. 6, p. 764–774, dez. 2011.

RESTREPO, A. et al. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus

Paracoccidioides brasiliensis: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infection and Immunity**, v. 46, n. 2, p. 346–353, 1984.

RIVERA, S. et al. Synthetic hepcidin causes rapid dose-dependent hypoferremia and is concentrated in ferroportin-containing organs. **Blood**, v. 106, n. 6, p. 2196–2199, 15 set. 2005.

TASHIRO, K. et al. Heparin exerts a negative immunological effect in pulmonary tuberculosis without HIV co-infection, prolonging the time to culture-negative. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 86, p. 47–54, set. 2019.

THE JAMOVI PROJECT. **Jamovi**. [s.l: s.n.].

THEURL, I. et al. Autocrine formation of hepcidin induces iron retention in human monocytes. **Blood**, v. 111, n. 4, p. 2392–2399, 15 fev. 2008.

VENTURINI, J. et al. Phenotypic and functional evaluations of peripheral blood monocytes from chronic-form paracoccidioidomycosis patients before and after treatment. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 552, dez. 2014.

ZHANG, X.; ROVIN, B. H. Beyond anemia: hepcidin, monocytes and inflammation. **Biological Chemistry**, v. 394, n. 2, p. 231–238, fev. 2013.

**CAPÍTULO V**

---

---

## Conclusões

O presente estudo, apresentado em três artigos, permite as seguintes conclusões:

- Na forma crônica da PCM observam-se alterações no hemograma da maioria dos pacientes, principalmente anemia e monocitose. No entanto, essas alterações não são exuberantes.
- Houve melhora nos parâmetros hematológicos, após a cura clínica, sugerindo interferência da atividade inflamatória sistêmica da PCM nesses índices
- Mostrou-se que a anemia da PCM caracteriza-se como anemia da inflamação, com baixos valores de ferro sérico, ferritina normal ou ligeiramente aumentada, e valores normais de TSAT, TIBC, sTfR e índice sTfR/logFerritina.
- A correlação indireta entre PCR e níveis séricos de ferro indica que a redução do processo inflamatório, com o tratamento, pode recuperar o aporte de ferro para a eritropoiese.
- Correlação direta da hepcidina com neutrófilos e monócitos, duas células fagocitárias que atuam na primeira linha de defesa da PCM e são sabidamente produtoras de hepcidina, foi observada no estudo.
- Apesar de não se ter observado queda dos níveis de hepcidina com o tratamento, tampouco correlação entre hepcidina e ferro sérico e hemoglobina, a correlação da hepcidina com os estoques intracelulares de ferro no organismo (ferritina) corroboram para sua importância no metabolismo do ferro na PCM crônica.