



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE - UFAC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA –
CITA**

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *Paracoccidioides* sp. EM
AMOSTRAS DE ESCARRO EM PACIENTES DO MUNICÍPIO
DE RIO BRANCO - ACRE**

LEANDRO CAVALCANTE SANTOS

**RIO BRANCO - AC
Abril - 2020**

LEANDRO CAVALCANTE SANTOS

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *Paracoccidioides* sp. EM
AMOSTRAS DE ESCARRO EM PACIENTES DO MUNICÍPIO
DE RIO BRANCO - ACRE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, da Universidade Federal do Acre, como requisito para obtenção do grau de **Mestre em Ciências e Inovação Tecnológica**.

Orientadora: Profa. Dra. Leila Priscila Peters

Co-orientadora: Profa. Dra. Clarice Maia Carvalho

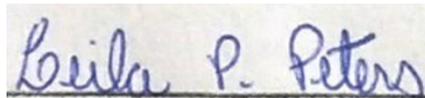
**RIO BRANCO - AC
Abril - 2020**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, INOVAÇÃO E TECNOLOGIA
PARA A AMAZÔNIA – CITA

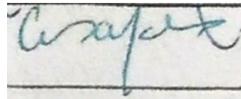
**DETECÇÃO MOLECULAR DE *Paracoccidioides* sp. EM
AMOSTRAS DE ESCARRO EM PACIENTES DO MUNICÍPIO
DE RIO BRANCO – ACRE**

LEANDRO CAVALCANTE SANTOS

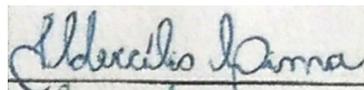
DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 30/04/20



Prof. Dra. Leila Priscila Peters
(Orientadora – UFAC)



Prof. Dr. Eduardo Bagagli
(Membro da Banca – UNESP)



Ildercilio Lima
(Membro da Banca – EMBRAPA)

AGRADECIMENTOS

Extremamente grato por toda essa jornada e conseguir finalizar mais uma etapa na construção de conhecimento intelectual. Mas antes de agradecer a todas as pessoas que fizeram parte dessa construção, quero agradecer a **Deus** por me conceder saúde e sabedoria para continuar a caminhada.

Agradeço a minha família, **Mário Cesar, Francisca Cavalcante e Janaira Cavalcante** por nunca medir esforços a ajudar e sempre confiar e crer na minha capacidade, até mesmo quando nem eu acreditava.

Sou grandemente grato a Deus por me conceder orientadoras extremamente dedicadas em prol da pesquisa, muito obrigado a **Profa. Dra. Leila Priscila** pela dedicação, paciência e sempre disponível a me ouvir nos momentos difíceis e principalmente acreditar quando nada dava certo, sem a senhora provavelmente não teria conseguido chegar no final dessa jornada.

Da mesma forma, sou grato a **Profa. Dra. Clarice Maia Carvalho** por me conceder este projeto e acreditar em meu potencial. Obrigado pelos “puxões de orelha”, pelas reuniões, as ligações e mensagens no WhatsApp, pois tudo isso de certa maneira me amadureceu e contribuiu para a construção de um ser muito melhor, a ti sou extremamente grato.

De coração, agradeço a todos meus amigos do LABMICRO, **Fernanda Viana, Franciarli Paz, Laura Nadyne, Geyse Santos e Yara Magalhães** pelas conversas, apoio, incentivo, risadas e choros, pois sem vocês tudo ficaria mais árduo. Vocês fizeram parte desta jornada e levarei meus agradecimentos para sempre.

Muito obrigado a professora **Dra. Tatiana Campos**, por sempre se disponibilizar a sanar dúvidas e contribuir para o desenvolvimento deste projeto.

À Universidade Federal do Acre (UFAC), ao Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia (PPG-CITA) pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto “Estudo clínico, epidemiológico, sorológico e molecular da Paracoccidiodomicose Pulmonar em Rio Branco, Acre, Brasil.”

RESUMO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica, causada pelos fungos do gênero *Paracoccidioides*. Endêmica nos países da América Latina, com maiores relatos no Brasil, em especial nas regiões sudeste, sul e centro-oeste. Possui o solo como habitat natural, podendo infectar o homem a partir da inalação de seus conídios, sendo relatado o maior número de casos em homens com atividade ligados a agricultura. O diagnóstico pode ser através dos métodos clássicos microbiológicos, imunodiagnósticos ou moleculares de amostras clínicas. Assim, o objetivo do trabalho foi realizar a detecção molecular de *Paracoccidioides* spp. em amostras de escarro de pacientes do município de Rio Branco-Acre. Primeiramente foi realizado uma revisão sistemática acerca das aplicações das técnicas de diagnóstico de PCM no Brasil, entre os anos de 1956 a 2019, consultando os artigos anexados nas plataformas Google Acadêmico, Sciente Direct, Pubmed, Scopus e Scielo. No total, cinco métodos de diagnóstico são empregues, histopatológico (47,2%), exame direto (18,4%), reação em cadeia da polimerase – PCR (12,7%), sorológico (11,49%) e cultura (10,34%), de uma ampla variedade de material biológico, sendo os mais utilizados biópsia, soro e escarro. No tocante a dados epidemiológicos, os maiores números de relatos de PCM estão concentrados no sul do Brasil, nos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro, além de afetar prioritariamente homens entre 51-60 anos de idade. Para detecção molecular, foram obtidas 59 amostras de escarro de pacientes sintomáticos respiratórios que procuraram as Unidade de Saúde do município de Rio Branco, AC,. Essas amostras foram submetidas à extração de DNA utilizando kit comercial e posteriormente a técnica de *nested*-PCR para amplificação, com *primers* externos ITS 5 e ITS 4 e *primers* internos PbITSE e PbITSR. Das 59 amostras, apenas uma (1,69%) apresentou positividade para *Paracoccidioides brasiliensis*, demonstrando ser uma técnica pouco sensível (54,5%), entretanto, alta especificidade (100%) para diagnóstico de PCM, visto que não houve a amplificação de demais fungos testados. A análise do sequenciamento desta amostra positiva apresentou 97% de similaridade com *Paracoccidioides brasiliensis*.

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose. Micose Sistêmica. Diagnóstico Molecular. *Paracoccidioides brasiliensis*.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by fungi of the genus *Paracoccidioides*. It is endemic in Latin American countries, with greater relations in Brazil, especially in the southeast, south and central-west regions. The soil is natural habitat. It can infect man by inhalation of its conidia, and the greatest number of cases occurs in agriculture workers men. The diagnosis can be made by the classic methods of microbiology, immunodiagnosis or molecule of clinical samples. Thus, the objective of this study was to perform molecular detection of *Paracoccidioides* spp. in sputum samples from patients in the municipality of Rio Branco-Acre. First, a systematic review was carried out on the applications of PCM diagnostic techniques in Brazil, between the years 1956 to 2019, consulting the articles attached on the Google Scholar, Sciente Direct, Pubmed, Scopus and Scielo platforms. In total, diagnostic methods are used, histopathological (47.2%), direct examination (18.4%), polymerase chain reaction –PCR (12.7%), serological (11.49%) and culture (10.34%), from a wide variety of biological material, the most used being biopsy, serum and sputum. Regarding epidemiological data, the largest number of PCM reports are concentrated in the south of Brazil, in the states of São Paulo and Rio de Janeiro, in addition to affecting primarily men between 51-60 years of age. For molecular detection, 59 sputum samples were obtained from symptomatic respiratory patients who sought out the Health Units in the municipality of Rio Branco, Ac who were submitted to DNA extraction using a commercial kit and then the nested-PCR technique for amplification, with primers external ITS 5 and ITS 4 and internal primers PbITSE and PbITSR. Of the 59 samples, only one (1.69%) was positive for *Paracoccidioides brasiliensis*, demonstrating to be an insensitive technique (54.5%), however, high specificity (100%) for PCM diagnosis, since there was no amplification other tested fungi. The analysis of the sequencing of this positive sample showed 97% similarity with *Paracoccidioides brasiliensis*.

Keywords: Paracoccidioidomycosis. Systemic ringworm. Molecular Diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Capítulo I	
Figura 1. Fluxograma da seleção de artigos para Revisão Sistemática sobre aplicação das técnicas de diagnóstico da Paracoccidioidomicose no Brasil.....	39
Figura 2. Métodos de diagnóstico e material clínico utilizados para detectar a paracoccidioidomicose no Brasil.	40
Figura 3. Distribuição de casos de Paracoccidioidomicose (PCM) por Estados no Brasil.	41
Figura 4. Distribuição de casos de Paracoccidioidomicose por sexo e faixa etária no Brasil.	41
Capítulo II	
Figura 1. Figura 1. Análise em gel de agarose a 2% de extração de DNA de amostras de escarro de pacientes sintomáticos respiratórios do município de Rio Branco-Acre utilizando o Kit comercial <i>DNeasy UltraClean Microbial Kit</i> (Qiagen). A presença de fragmento indica positividade na extração de DNA. Amostras com extração positiva de DNA. BB03, BB04, BB05, BB06, BB07, BB13, BB14, BB15, BB16, BB18, BB19, BB22, BB31, BB25, BB23, BB27, BB24, AR207, AR206, CL310, CL200, CL308, CL309, HL311, AR205, HL302, BB28, AR202, F201, F305, BB33, BB34, BB35, BB26, BB02, HL303, HL304, CL306, AR209, AR203, HL300, HL301, AR208, AR201, CL203 e CL 204.....	59
Figura 2. Região gênica do rDNA dos fungos e dos <i>primers</i> universais para fungos (ITS 1, ITS 2, ITS 5, ITS 4) e específicos para <i>P. brasiliensis</i> (PbITSE e PbITSR).....	59
Figura 3. Amplificação de nested-PCR com <i>primers</i> PbITSE e PbITSR de DNA extraído das amostras de escarro e culturas puras de fungos. M. marcador de peso molecular 80-1031pb (Mass Ruler DNA Ladders); BB 06, BB 07, BB 08, BB09, BB10, BB 11, BB12, BB 13, BB14, BB15, BB 16, BB17, BB18, BB19, BB20, BB21, BB 22, BB 23, BB 24, BB 25, BB 26, BB 27, BB 28, BB 30, BB 31, BB, 33, BB 34, BB 35, AR 201, AR 203, AR 204, AR 205, AR 206, AR 207, AR 208, AR 209, HL 302, HL 303, HL 304, HL 311, CL 200, CL 203, CL 306, CL 307, CL 308, CL 309, CL 310, F 201, F 305. amostras de escarro de pacientes; PCM. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (controle positivo), CA. DNA do fungo <i>Candida albicans</i> ; CY. DNA do fungo <i>Cryptococcus</i> sp.; B. controle negativo.....	61
Figura 4. Representação geográfica da moradia anterior e atual do paciente positivo para <i>P. brasiliensis</i> por PCR.....	62
Figura 5. Árvore filogenética construída a partir de sequências da região ITS do rDNA de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> . <i>Cryptococcus albidus</i> e <i>C. gattii</i> foram utilizados como grupos externos. Valores de <i>Bootstrap</i> foram de 3000 repetições. A barra indica o número de etapas evolutivas com sequências divergentes. O isolado F305 está destacado em verde.	64

LISTA DE QUADROS E TABELAS

	Pág.
Capítulo II	
Tabela 1. <i>Primers</i> utilizados para realização de PCR e nested-PCR para detectar a presença de <i>Paracoccidioides</i> sp. em amostras de escarro de pacientes sintomáticos respiratórios.	55
Tabela 2. Espécie, número de acesso de GenBank e estado e/ou país das sequências utilizadas para construção de árvore filogenética.....	56
Tabela 3 Variáveis do questionário aplicado de paciente positivo para <i>P. brasiliensis</i>	62

LISTA DE ABREVIATURAS

IFD	Doenças Fúngicas Invasivas
PCM	Paracoccidioidomicose
kDa	Quilodaltons
ITS	Espaçadores Internos Transcritos
Gp43	Gene que codifica a glicoproteína de 43kDa
Gp27	Gene que codifica a glicoproteína de 27KDa
arf	Gene que codifica a proteína
ADP	ribosylation factor (fator de ribosilação do ADP)
HSP 70	Gene que codifica a proteína de choque térmico HSP 70
rDNA	DNA ribossomal
HLA	Antígeno leucocitário humano
CD4	Células T auxiliar
IFN- γ	Interferon-gama
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
KOH	Hidróxido de potássio
BSA	Albumina sérica bovina
S1	Espécie 1 do complexo de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PS2	Espécie filogenética 2 do complexo <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PS3	Espécie filogenética 3 do complexo <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
DI	Imunodifusão dupla
28S	RNA ribossômico
5.8S	RNA ribossômico
18S	RNA ribossômico
oC	Graus Celsius
μ L	Microlitros
μ g	Microgramas
mg	Miligrama ^[1] _[500]
Kg	Quilograma

mL	Mililitro
M	Molar
mM	Milimolar
μ M	Micromola
ng	Nanograma
pmol	Picomol
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Nested-PCR	nested polymerase chain reaction
q(PCR)	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos
DNA	Ácido desoxirribonucléico (<i>Desoxyribonucleic Acid</i>)
RNA	Ácido ribonucléico (<i>Ribonucleic Acid</i>)
Rpm	Rotações por minuto.
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
ELISA	Enzimaimunoensaio (<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>)
Hab	Habitantes
URAP	Unidades de Referência de Atenção Primária
FUNDACRE	Hospital das Clínicas do Acre
TBE	Tris/Borato/EDTA
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

SUMÁRIO

	Pag.
INTRODUÇÃO	12
GERAL.....	15
2.	15
REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Paracoccidioidomicose.....	15
2.2 Formas Clínicas.....	16
2.3 Ecoepidemiologia.....	18
2.4 Epidemiologia.....	19
2.5 Fatores associados com a Paracoccidioidomicose.....	21
2.6 Imunopatogenia.....	22
2.7 Diagnóstico.....	24
2.8 Tratamento.....	26
2.9 Referências.....	28
3. Objetivos.....	33
3.1 Objetivo Geral.....	33
CAPÍTULO	35
I.....	35
Introdução.....	35
Material E	37
Métodos.....	38
Resultados.....	38
Discussão.....	38
Conclusão.....	44
Referências.....	44
	50

CAPÍTULO	
II.....	
Introdução.....	51
Material E	53
Métodos.....	
Resultados.....	58
Discussão.....	65
Conclusão.....	69
Referências.....	70
4 CONCLUSÕES GERAIS	74
.....	
Apêndice	75
1.....	
Anexo	77
1.....	

1. INTRODUÇÃO GERAL

As doenças fúngicas invasivas (IFD) continuam sendo as principais causas de mortes e morbidade em pacientes imunocomprometidos, mesmo com os avanços clínicos e diagnósticos recentes (KUMAR et al., 2019). Os três gêneros fúngicos mais importantes do grupo das IFD são *Candida* sp., *Cryptococcus* sp. e *Paracoccidioides* sp. (CAPOCI et al., 2019).

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica, profunda, de maior incidência em países da América Latina, sendo causada por fungos do gênero *Paracoccidioides*, possuindo as espécies: *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*, e suas espécies crípticas: *Paracoccidioides americana*, *Paracoccidioides restrepiensis*, *Paracoccidioides venezuelensis* (TURISSINE et al., 2017).

Esse fungo apresenta crescimento dimórfico, pois à temperatura de 28 °C no solo é encontrado em sua forma micelial, e a 37 °C é encontrado como células de levedura (OLIVEIRA et al., 2018). A infecção ocorre devido a inalação de fragmentos do micélio e/ou conídios de *Paracoccidioides* sp. que, dentro do hospedeiro, transicionam para uma morfologia leveduriforme, processo dimórfico essencial para a patogênese (MACEDO et al., 2019).

A PCM pode ser encontrada nos países da América Latina, como Colômbia, Venezuela, Paraguai, México, Argentina e Equador (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017; SANTOS et al., 2019). No Brasil, é a mais importante e frequente micose, com áreas endêmicas no Sudeste, Sul, Centro-Oeste, e na Amazônia Ocidental (TATAGIBA et al., 2018).

De acordo com a *International Colloquium on Paracoccidioidomycosis* de 1986 em Medellín, Colômbia, a PCM possui as seguintes formas clínicas: i) paracoccidioidomicose infecção e ii) paracoccidioidomicose doença em suas formas aguda/subaguda e crônica, sendo unifocal ou multifocal (SANCHES; FARIA, 2014).

Vários métodos são descritos para o diagnóstico da PCM como: microbiológicos, imunológicos e moleculares (FERREIRA et al., 2016). O diagnóstico padrão ouro de PCM é por meio da visualização das características fúngicas sugestivas de *Paracoccidioides* sp. em amostras a fresco de escarro, raspado de lesão, aspirado de linfonodos ou de fragmento de tecidos de órgãos acometidos, além de cultura do material clínico (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

Entretanto, a dificuldade encontrada na visualização das estruturas fúngicas de PCM nas diferentes amostras clínicas, em especial na demora da conversão da fase micelial para levedura do fungo, faz com que o uso das técnicas sorológicas seja útil no diagnóstico de PCM (DA-SILVA et al., 2016).

O diagnóstico sorológico é baseado na detecção de anticorpos do paciente ou antígenos do fungo, com uso de glicoproteínas antigênicas 43-kDa, 70-kDa e 27-kDa, conhecidas por serem específicas no diagnóstico de PCM. No entanto, caso a expressão destes antígenos seja baixa ou nenhuma, pode levar a imprecisão no diagnóstico, além de possuir resultados cruzados com outros fungos e falso-negativo em pacientes imunosuprimidos (GAVIRIA et al., 2015; DA-SILVA et al., 2016; ROCHA-SILVA et al., 2018). Como alternativa, pode-se optar pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR, *polymerase chain reaction*) na detecção de doenças fúngicas que apresentam sorologia negativa por possuir baixa titulação de antígenos e/ou anticorpos (FERREIRA et al., 2016).

Apesar da PCM possuir grande impacto na saúde pública brasileira, não há estimativas de incidência regional ou nacional, e conseqüentemente, não possui notificação compulsória na maioria dos Estados brasileiros (COITINHO et al., 2011). Além disso, PCM pode estar associada a outras doenças infecciosas que podem interferir diretamente no tratamento e diagnóstico dessa doença (BERTONI et al., 2010).

Dentre os métodos moleculares, a PCR, tem sido útil na identificação do DNA de *Paracoccidioides* e diagnóstico de PCM, apresentando boas taxas de sensibilidade e especificidade, por meio da identificação de genes do DNA genômico e DNA ribossomal (GAVIRIA et al., 2015; ROCHA-SILVA et al., 2018). Assim, este trabalho tem como objetivo verificar a detecção de *Paracoccidioides* sp. por PCR em amostras de escarro em pacientes sintomáticos respiratórios do município de Rio Branco, Acre.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Paracoccidioidomicose

A PCM é uma micose profunda, de evolução crônica, causada por fungos do gênero *Paracoccidioides*, restrita aos países de clima tropical da América Latina, desde o Sul do México ao norte da Argentina, apresentando elevada prevalência no Brasil, Colômbia, Venezuela e Argentina (TEIXEIRA et al., 2013). Apresenta taxa de incidência anual de 1-3 novos casos por 100.000 hab. (DA-SILVA et al., 2016), sendo aceita como a terceira maior causa de morte entre as doenças infecciosas crônicas, com taxa de mortalidade de 1,65 casos por 1.000.000 hab. nas áreas endêmicas (COMPARATO-FILHO et al., 2019).

Há um grande obstáculo não somente no conhecimento da PCM, mas também no emprego de seus métodos de diagnóstico e tratamento, o que agrava a evolução da doença, a tornando um grande problema de saúde pública (MILLIGTON et al., 2018).

A infecção ocorre por meio da inalação dos conídios e/ou fragmentos de *Paracoccidioides* sp. presentes no solo pelo homem. Nos pulmões, o fungo assume sua forma leveduriforme, sendo crucial para se instalar a infecção. Esse processo pode ocasionar uma infecção assintomática ou disseminar-se pelo organismo, atingindo outros órgãos via corrente sanguínea e linfática (TATAGIBA et al., 2018).

A PCM não controlada pelo sistema imunológico pode progredir para a doença disseminada em sua forma aguda/subaguda (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). Em crianças e adultos jovens, a forma aguda/subaguda é considerada mais prevalente, podendo afetar os nódulos linfáticos, baço, fígado, ossos, intestino e meninges (MACEDO et al., 2019). A forma crônica, afeta preferencialmente adultos, como doença pulmonar crônica e longo período de sintomatologia, tais como tosse e dispnéia, a qual pode ser incapacitante, devido a possibilidade de fibrose pulmonar (TATAGIBA et al., 2018).

2.2 Formas Clínicas

A PCM pode ser classificada clinicamente de acordo com sua história natural e condições clínicas do paciente nas formas aguda ou subaguda e crônica, sendo que suas manifestações clínicas dependem da virulência da cepa, do grau de infecção, o tipo de resposta imunológica desenvolvida pelo paciente, o tecido infectado, e das características intrínsecas do hospedeiro (FORTES et al., 2011).

A fase primária da infecção envolve normalmente indivíduos jovens, com doença pulmonar limitada, a qual dificilmente progride para o estado agudo/subagudo da doença, que apresenta rápida evolução e elevada taxa de mortalidade (AMBRÓSIO et al., 2014).

Nos casos crônicos, o indivíduo apresenta longo período de latência e durante sua reativação é observado a forma crônica com acometimento pulmonar e/ou de outros órgãos (MASSI et al., 2016), mas tanto sua forma aguda/subaguda e crônico possuem em comum sua forma inicial de infecção, por meio da inalação das partículas do fungo que aderem ao epitélio pulmonar, podendo este se disseminar para demais órgãos do corpo, originando lesões secundárias em outras mucosas, como pele, nódulos linfáticos, fígado, baço e glândulas suprarrenais, com presença de sequelas fibróticas no tecido em sua grande maioria (TEIXEIRA et al., 2009).

Geralmente, os pacientes da forma aguda/subaguda são diagnosticados logo nas primeiras semanas de sintomatologia, e apresentam em sua maior parte envolvimento do sistema monocítico-macrofágico, com acometimento de vários órgãos (DUARTE, BENARD, 2000). Além disso, podem apresentar linfadenomegalia localizada ou generalizada, com supuração, fistulização e hepatoesplenomegalia, manifestações digestivas, lesões cutâneas e mucosas, envolvimento osteoarticular, com frequente quadro clínico de febre, perda de peso e

anorexia, mas que dificilmente ocorre o envolvimento pulmonar (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

Os sítios das lesões de PCM podem ser unifocal ou disseminados, como os casos multifocais (FORTES et al., 2011). A forma crônica é responsável por 74 a 96% dos casos de PCM e 90% envolve acometimento pulmonar, afetando em sua grande maioria, adultos entre 30 a 60 anos de idade, com predomínio no sexo masculino, apresentando lenta evolução e sintomas com duração de quatro a seis meses (AMBRÓSIO et al., 2014). Além dos pulmões, as mucosas das vias aerodigestivas superiores e pele são os sítios mais acometidos por esta forma (COSTA et al., 2013; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

A forma crônica ainda pode ser classificada quanto à sua gravidade em leve, moderada e grave, sendo os casos leves classificados devido à perda de 5% do peso habitual, com acometimento unifocal. Os casos graves podem apresentar fragilidade clínica, com disfunção adrenal, síndromes neurológicas, insuficiência respiratória, ou abdome agudo, sendo definido através do encontro de três ou mais dos critérios a seguir: i) perda de 10% do peso habitual, ii) envolvimento pulmonar, iii) comprometimento de demais órgãos, iv) acometimento de linfonodos, e v) titulação elevada de anticorpos (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

Em alguns casos, podem ocorrer manifestações clínicas compatíveis com aguda/subaguda associadas às da forma crônica, sendo esta classificada como PCM forma mista (COLOMBRO et al., 2003). Pode-se observar a forma sequelar de PCM, devido alterações anatômicas e funcionais, com desenvolvimento de cicatrizes fibróticas mesmo após tratamento bem sucedido, ocasionando alterações respiratórias e incapacitantes ao paciente (WANKE, AIDÊ, 2009; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

2.3 Ecoepidemiologia

Paracoccidioides sp. é um ascomiceto da família *Ajellomycetaceae*, encontrado à temperatura ambiente em sua forma micelial e a 35-37 °C na forma leveduriforme. A infecção do hospedeiro mamífero ocorre a partir da inalação de conídios ou artrósporos infecciosos aerossolizados durante a fase micelial (ARANTES et al., 2013).

Poucos relatos estão disponíveis na literatura acerca do isolamento do gênero *Paracoccidioides* a partir de amostras ambientais, pois em comparação com outros fungos ambientais, *Paracoccidioides* sp. cresce lentamente em meio de cultura, o que dificulta seu isolamento (ARANTES et al., 2013). Utilizando métodos moleculares, sabe-se que o fungo pode ser encontrado no solo (HAHN et al., 2019), entretanto, pouco se conhece a respeito de aspectos ecoepidemiológicos, suas interações com outros microrganismos, seus fatores bióticos e abióticos, exigindo assim, maiores estudos ambientais (BAGAGLI et al., 2003; ARANTES et al., 2016).

A maior parte dos isolados utilizados para tipagem molecular tem sido oriunda de amostras clínicas, as quais sofrem interferência de fatores como o longo período assintomático dos pacientes e a migração geográfica da população, os quais dificultam que se conheça o local exato da infecção e seus aspectos ecoepidemiológicos (MENDES et al., 2017; HAHN et al., 2019).

A identificação da área de risco e o conhecimento das espécies e seu genótipo, podem contribuir no conhecimento da biogeografia do fungo, auxiliando assim nos aspectos clínicos, como diagnóstico e tratamento de PCM (BAGAGLI et al., 2003).

Com a dificuldade no isolamento do fungo em seu habitat natural e seus poucos relatos de isolados de solo, vegetação, fezes de pinguins, alimentos para cães e morcegos, tem-se optado por realizar o isolamento a partir de animais silvestres, em especial tatus, tornando uma excelente fonte ambiental para mapeamento e distribuição geográfica de *Paracoccidioides* sp.

(BAGAGLI et al., 2003; ARANTES et al., 2016). Com isso, é possível estabelecer melhor o conhecimento sobre a ecologia deste fungo (TERÇARIOLI et al., 2007).

Sabe-se que umidade do solo decorrente das estações chuvosas e temperaturas na faixa de 18-28 °C, aliada as características bióticas e abióticas próximo as tocas de tatus, vem favorecendo sua fase micelial, com esporulação e dispersão no ambiente (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

Embora a umidade aumente o crescimento do fungo no seu habitat natural, um período de seca na camada mais superficial do solo faz com que a dispersão de aerossóis seja mais fácil e intensa, demonstrando assim, seu potencial infeccioso e extremamente importante no estudo epidemiológico (ARANTES et al., 2016).

Indícios mostram que diferentes espécies de *Paracoccidioides* sp. possuem diferenças geográficas, pois *P. lutzii* é detectado apenas mediante amostras de aerossóis nas regiões centrais do Brasil (MENDES et al., 2017). Enquanto, as demais espécies do gênero *Paracoccidioides* ocorrem por quase toda extensão geográfica, sugerindo que exista uma regionalização das espécies, mas que não se conhece nenhuma barreira geográfica entre as espécies *P. lutzii* e demais espécies de *Paracoccidioides* (THEODORO et al., 2012).

2.4 Epidemiologia

A PCM e demais micoses sistêmicas podem ocorrer, preferencialmente, em regiões de climas úmidos e quente, apresentando maiores números de casos na América Central e do Sul (SANTOS et al., 2019). A PCM é a infecção fúngica sistêmica mais recorrente na América Latina, com maiores incidências no Brasil, Argentina, Colômbia e Venezuela, sendo o Brasil considerado área endêmica, com maiores relatos na região Sudeste, Sul e Centro-Oeste (DUTRA et al., 2018).

No Brasil, micoses sistêmicas não fazem parte da lista nacional de doenças de

notificação compulsória, apenas nos Estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Rondônia e Paraná, nos quais foram implementados a vigilância epidemiológica de PCM (MILLINGTON et al., 2018). Com isto, seus dados epidemiológicos são restritos, com suas estimativas provenientes de inquéritos epidemiológicos, registro de casos, hospitalização e dados de mortalidade (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

Com o passar dos anos houve alterações no perfil epidemiológico de PCM, tanto em sua frequência, quanto como em sua distribuição geográfica e demográfica (MILLINGTON et al., 2018). Isto se deve ao aumento da urbanização, a aplicabilidade de métodos de diagnóstico, presença de comorbidades, além de mudanças ambientais decorrentes das novas aberturas nas fronteiras agrícolas, como a derrubada de florestas (ARANTE et al., 2016). Agregado a estes fatores, a grande variedade de espécies de *Paracoccidioides* sp. também tem contribuído com esse novo cenário (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

A PCM é mais importante micose sistêmica da América Latina, com maiores relatos no Brasil, apresentando incidência de 1-3 novos casos por 100.000 hab., sendo classificada como a terceira causa de morte entre as doenças infecciosas crônicas (COMPARATO-FILHO et al., 2019). Sua elevada incidência no Brasil possivelmente seja a junção de diversos fatores, como favorecimento das condições climáticas e de solo, além da existência de práticas intensas de agricultura e agropecuária (BELLISSIMO-RODRIGUES et al., 2011).

As espécies *P. restrepiensis* e *P. venezuelensis* podem ser encontradas na Colômbia e Venezuela, *P. brasiliensis*, *P. americana* e *P. lutzii* possui ampla distribuição na América Latina (TURISSINI et al., 2017). *P. brasiliensis* possui ainda duas populações crípticas, sendo S1a e S1b, predominantes no Brasil e América do Sul, já *P. americana* tem sido identificada no leste do Brasil e uma ocorrência na Venezuela, enquanto *P. lutzii* é encontrado na região norte do Brasil e Equador (MACEDO et al., 2019). Estas espécies apresentam diferenças nos aspectos de cultura, morfologia, virulência e resposta imune do hospedeiro (COITINHO et al., 2011).

Na América Latina, cerca de 80% dos casos de PCM são registrados no Brasil, com maior incidência no Sudeste, entre os estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Minas Gerais (MACEDO et al., 2019). No Brasil, entre os anos de 1980 a 1995, PCM apresentou 3.181 casos de óbitos, com taxa de mortalidade de 1,45 casos por 1.000.000 de hab., com maiores taxas regionais no Sul 2,59 e 2,35 para Centro-Oeste (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

Há registro de incidências de 9,4 casos por 100.000 hab. em Rondônia, no qual os municípios Pimenteiras do Oeste e Espigão do Oeste obtiveram índices de 39.1 casos por 100.000 habitantes/ano (SOUSA et al., 2014). Entre os anos de 1980-1999 foram registrados 422 casos de PCM no estado de Mato Grosso do Sul e entre os anos de 2005 a 2011 foi observado a presença de PCM em 53 (37,58%) dos 141 municípios do Estado (HRYCYK, 2018).

2.5 Fatores associados à Paracoccidioidomicose

A prevalência de PCM é mais elevada durante a vida adulta, possivelmente por estar relacionada a maior exposição ao fungo com suas atividades diárias, e está fortemente associada ao tipo de forma clínica de PCM (BELLISSIMO-RODRIGUES et al., 2011). A forma aguda/subaguda é mais prevalente até os 30 anos de vida, sendo única forma clínica que afeta crianças até os 15 anos, já a forma crônica ocorre entre 30 a 60 anos de idade (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

Com relação ao sexo, as crianças são igualmente afetadas pela PCM, mas que depois da puberdade, predomina entre os homens em relação às mulheres, pois as mulheres podem inibir a reversão da forma micelial para leveduriforme, por meio da ação inibitória de β -estradiol, além de possuírem menos atividade relacionada à agricultura (SIFUENTES-OSORNIO et al., 2012).

A grande quantidade de casos de PCM não demonstra predisposição racial, pois a distribuição ocorre tanto em pacientes negros como em caucasianos, mas têm-se observado que negros e pardos possuem tropismo pela forma aguda/subaguda, enquanto em pacientes caucasianos há predomínio para forma crônica (BELLISSIMO-RODRIGUES et al., 2011). Estas diferenças possivelmente estão relacionadas ao tipo de resposta imunológica e à variabilidade genética (MARTINEZ, 2015).

As condições de vida também podem estar associadas ao desenvolvimento de PCM, pois o fumo e o consumo de bebidas destiladas superior a 60 mL por dia está fortemente associado ao desenvolvimento das formas crônicas de PCM, além das alterações nutricionais, pois a subnutrição possui forte impacto nas crianças (MOYA, MARTINEZ, 1992; FABRIS et al., 2014; MARTINEZ, 2015).

Esses fatores podem ser considerados como condições de riscos pré-existentes aos pacientes, pois desempenha função importante no processo de transformação de infecção ao estado doença, ocasionando interferência nos mecanismos de defesa do indivíduo (FORTES et al., 2011).

2.6 Imunopatogenia

Isolados de diferentes linhagens filogenéticas de *Paracoccidioides* sp. podem infectar e desencadear PCM em seres humanos, mas apresentam diferenças na virulência e induzem diferentes respostas imunológicas no hospedeiro (MACORIS et al., 2006; THEODORO et al., 2012).

O poder de infecção difere entre as espécies, pois a espécie críptica S1 produz mais conídios que isolados de PS2, e possivelmente esta característica está relacionado à elevada taxa de infecção de 9:1 de S1 a PS2 em humanos e tatus (THEODORO et al., 2012).

O processo de infecção é complexo, envolvendo a interação de diversos mecanismos reguladores da homeostase celular e expressão de diferentes fatores de virulência, permitindo a aderência e invasão do fungo nas barreiras do hospedeiro, com expressão de substâncias intimamente ligadas nesta interação parasita-hospedeiro (BERNARDES-FILHO et al., 2018).

Durante o processo de infecção, é evidente no granuloma epitelióide de células HLA-DR, macrófagos e linfócitos T do tipo CD4 envolvidos no processo de formação do granuloma, mediante produção de citocinas IFN- γ e TNF- α e mediadores no sítio inflamatório (FORTES et al., 2011).

Indivíduos de áreas endêmicas que não desenvolvem PCM doença possuem um padrão de resposta de linfócitos T tipo 1, com formação de granuloma compacto e controle do fungo (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). Pacientes que desenvolvem a doença possuem resposta imunológica do tipo Th-1 deficiente, e aqueles que apresentam a forma aguda/subaguda e crônica grave, evoluem para resposta do tipo Th-2 e Th-9, com ativação de linfócitos B, hipergamaglobulinemia, eosinofilia, no intuito de formar um granuloma compacto (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

A morfologia do granuloma é embasada no padrão da resposta imunológica, pois em pacientes com sistema imune celular preservado, pode-se observar um granuloma epidelóide compacto, confluyente, com poucos fungos e localizado, diferente do que é observado em pacientes com comprometimento imunológico, pois o granuloma é desorganizado e frouxo, possui elevado número de fungos, mal definido, com exudação supurativa e necrose, podendo ocorrer à proliferação do fungo e doença generalizada (FORTES et al., 2011).

2.7 Diagnóstico

O diagnóstico rápido e eficiente de PCM é indispensável para o início efetivo e específico da terapia, com prevenção de danos aos pulmões e demais órgãos do corpo. Assim, as técnicas de diagnóstico são indispensáveis e também muito utilizadas no monitoramento da eficácia do tratamento (FERREIRA et al., 2016).

O padrão ouro no diagnóstico de PCM é a visualização dos elementos fúngicos do agente etiológico em exame a fresco com KOH a 10%, entre lâmina e lamínula, apresentando ser altamente eficaz e de baixo custo, sendo utilizadas diferentes amostras, como escarro, lesões cutâneas e de mucosas, aspirado ganglionar e outros espécimes clínicos (BERNARDES-FILHOS et al., 2018).

Na microscopia, o agente etiológico é visualizado como leveduras esféricas de tamanho variado – de 4 a 60 μm , em brotamento característico em torno da célula mãe, como roda de leme, possuindo birrefringência em sua parede celular, isoladas ou formando cadeias (FERREIRA et al., 2016).

A cultura micológica possui elevada sensibilidade, mas necessidade de laboratorista qualificado, pois o agente etiológico pode ser confundido com outros fungos, além da demora no crescimento da amostra em meio de cultura (TELES, MARTINS, 2011; SANCHES, FARIA, 2014).

Os métodos histológicos podem ser empregados no diagnóstico de PCM, baseados na identificação morfológica de estruturas fúngicas. Entretanto, necessita de cautela, pois podem ser confundidas com *Histoplasma* sp., *Blastomyces dermatitidis* e *Coccidioides immitis*, principalmente em áreas não endêmicas (TELES, MARTINS, 2011). Histologicamente, é evidente um denso e difuso infiltrado inflamatório, com micro abscessos e várias células gigantes multinucleadas (ROCHA-SILVA et al., 2018).

O diagnóstico de certeza de PCM consiste em avaliar microscopicamente amostras clínicas e sua cultura, obtendo as observações macroscópicas e microscópicas para identificação de *Paracoccidoides* sp. Entretanto, as técnicas sorológicas têm sido úteis no diagnóstico precoce e monitoramento de sua evolução e resposta ao tratamento (DA-SILVA et al., 2016). É utilizado como método padrão a imunodifusão dupla (DI), com elevada especificidade e sensibilidade que varia entre 65% a 100%, dependendo da preparação antigênica usada (KAMIKAWA et al., 2017).

A partir do isolamento de antígenos e implementação na sorologia, tem ocorrido um aumento na procura de metodologias mais rápidas, versáteis, simples e baratas. O teste de ELISA tem sido amplamente aceito, sem grandes diferenças na sensibilidade e especificidade (KAMIKAWA et al., 2017). Entretanto, além da possibilidade de reações cruzadas com outros fungos, níveis baixos ou a ausência de expressão de glicoproteínas podem ocasionar imprecisões no diagnóstico (DA-SILVA et al., 2016; ROCHA-SILVA et al., 2018).

Métodos moleculares têm sido utilizados no diagnóstico de PCM, especialmente quando há falha nos métodos tido como padrão ouro, e na ausência de títulos antigênicos suficientes para o imunodiagnóstico, com realização de amplificação de DNA via PCR, podendo assim, distinguir e identificar os genótipos circulantes (TELES, MARTINS, 2011).

O DNA ribossomal (rDNA) pode ser útil para identificação de patógenos via PCR, pois possuem regiões constantes ou não-constantes que estão presentes em todos os fungos e regiões variáveis, exclusivas de algumas espécies, possibilitando com isso, o desenho de *primers* para regiões universais e específicos para determinados fungos, seguindo os princípios de *nested-PCR* (WHITE et al., 1990).

A amplificação de sequências de genes do fungo de *Paracoccidoides* sp. por reação em cadeia da polimerase (PCR) pode ser aplicada no diagnóstico de PCM, sendo um método rápido e preciso (COSTA et al., 2018). Estes ensaios baseiam-se na amplificação de genes específicos

do RNA ribossômico 28S, 5.8S e 18S (rRNA), dos espaçadores internos transcritos (ITS) 1 e 2, e os genes *gp 43*, *gp 27*, *ARF*, e *HSP 70*. Os genes alvos *gp43*, *gp27* e ITS 1 e 2 são utilizados para identificar a espécie *P. brasiliensis*, *ARF* para *P. americana* e *HSP 70* para *P. lutzii* (SANO et al., 2001; ENDO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2013; MACEDO et al., 2019). Contudo, os métodos moleculares possuem a desvantagem da ausência na padronização dos ensaios baseados em PCR para as doenças fúngicas (TELES, MARTINS, 2011).

Os genes do DNA ribossômicos (rDNA) podem ser encontrados em todos os microrganismos, que possuem tanto regiões com baixas taxas mutacionais (28S, 5.8S e 18S) quanto com elevadas taxas (ITS 1 e ITS2). Esta primeira região fornece informações para construção de análises filogenéticas entre os níveis taxonômicos acima de gênero, já as regiões de elevadas taxas mutacionais fornecem informações para separar gênero e espécies (PEREIRA, 2009) e como possui elevado número de cópias por genoma, proporciona maior sensibilidade a PCR (IWEN et al., 2002).

A utilização de *nested-PCR* com *primers* desenhados para regiões de iniciadores internos específicos para as espécies de *Paracoccidioides* sp. a partir de uma PCR do DNA ribossômico (5.8S) fornecem maior sensibilidade e especificidade a reação (PEREIRA, 2009). Usando esta metodologia Theodoro et al., (2005) e Terçarioli et al., (2007) realizaram uma PCR a partir da região do DNA 5.8S e uma *Nested-PCR* utilizando iniciadores internos específicos *PbITSE* e *PbITSR* para detecção de *P. brasiliensis* no solo.

2.8 Tratamento

Diferente das demais micoses, PCM demonstra ser sensível a maioria das drogas antifúngicas, mesmo nas suas diversas formas clínicas, que incluem os derivados azólicos (cetoconazol, fluconazol, itraconazol, posaconazol e isavuconazol), os derivados sulfamídicos (cotrimoxazol, sulfamidiazina), e a anfotericina B para as formas graves (formulações em

deoxicolato, complexo lipídico e lipossomal). No entanto, mesmo com essa gama de opções terapêuticas, na prática clínica são mais utilizados o itraconazol, o cotrimoxazol (sulfametoxazol/trimetoprim) e a anfotericina B (SANCHES, FARIA, 2014; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

Considerando a escolha do medicamento e duração, alguns parâmetros devem ser observados e considerados, como: local da lesão, gravidade da doença, contra-indicação devido aos casos de hipersensibilidade e falhas terapêuticas anteriores (SHIKANAI-YASUDA, 2015).

O itraconazol com dose de 200mg/dia tem obtidos bons resultados no tratamento de formas leves e moderadas de PCM, com duração de 9 á 18 meses, com cicatrização das lesões tegumentares em 30 dias e linfadenopatias entre 45 e 90 dias após início do tratamento. As formas graves e disseminadas são tratadas com a anfotericina B em desoxicolato ou em formulação lipídica, com dose de 0,5-0,7 mg/kg/dia, com uso em menor tempo possível, em média de duas a quatro semanas (SHIKANAI-YASUDA, 2016; SHIKANAI-YASUDA, 2017).

A PCM possui como principal desafio terapêutico a longa duração do tratamento, as elevadas frequências de recidivas, sequelas e comorbidades com tuberculose (ANDRADE et al., 2019).

O período do tratamento é sujeito a imunidade do hospedeiro, a virulência de *Paracoccidioides* sp. e a droga utilizada (ANDRADE et al., 2019). Após seu diagnóstico, o esquema terapêutico de PCM envolve um longo período de duração, com acompanhamento periódico, sempre acompanhada dos critérios de cura, embasados em parâmetros clínicos, micológicos, radiológicos e sorológicos (SHIKANAI-YASUDA, 2015; BERNARDES-FILHO et al., 2018).

Referência

AMBRÓSIO, A. V. A.; CAMELO, C. C. S.; BARBOSA, C. V.; TOMAZATTI, F. G.; BRAZÕES, F. A. S.; VELOSO, J. M.; RODRIGUES, G. V.; RODRIGUES, L. F.; OLIVEIRA, P. I. D.; AGUIAR, R. A.; SIQUEIRA, V. S.; JARDIM, V. B.; GONTIJO, V. A. C.; CRUZ, S. G.; SIQUEIRA, W. C.; PEDROSO, E. R. P. Paracoccidioidomicose (doença de Lutz-Splendore-Almeira) - manifestações clínicas. **Revista de Medicina de Minas Gerais**, v. 24, n. 1, p.67-73, 2014.

ANDRADE, U. V.; OLIVEIRA, S. M. V. L.; CHANG, M. R.; PEREIRA, E. F.; MARQUES, A. P. C.; CARVALHO, L. R.; MENDES, R. P.; PANIAGO, A. M. M. Adesão ao tratamento de pacientes com paracoccidioidomicose na Região Centro-Oeste do Brasil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 42, n. 2, p. e20180167, 2019.

ARANTES, T. D.; THEODORO, R. C.; MACORIS, S. A. G.; BAGAGLI, E. Detection of *Paracoccidioides* spp. In environmental aerosol samples. **Medical Mycology**, v. 51, n. 1, p. 83-92, 2013.

ARANTES, T. D.; THEODORO, R. C.; TEIXEIRA, M. D. M.; BOSCO, S. D. M. G.; BAGAGLI, E. Environmental mapping of *Paracoccidioides* spp. in Brazil reveals new clues into genetic diversity, biogeography and wild host association. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. e0004692, 2016.

BAGAGLI, E.; FRANCO, M.; BOSCO, S. M. G.; HEBELLER-BARBOSA, F.; TRINCA, L. A.; MONTENEGRO, M. R. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. **Medical Mycology**, v. 41, n. 3, p. 217-223, 2003.

BELLISSIMO-RODRIGUES, F.; MACHADO, A. A.; MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycosis Epidemiological Features of a 1,000 - Cases Series from a Hyperendemic Area on the Southeast of Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 3, p. 546-550, 2011.

BERNARDES-FILHO, F., SGARBI, I., DOMINGOS, S. F. S., SAMPAIO, R. C. R., QUEIROZ, R. M., FONSECA, S. N. S., HAY, R. J., TOWERSEY, L. Acute paracoccidioidomycosis with duodenal and cutaneous involvement and obstructive jaundice. **Medical Mycology Case Reports**, v. 20, p.21-25, 2018.

BERTONI, T. A.; TAKAO, E. K. H.; DIAS, J. R. C.; SVIDZINSKI, T. I. E. Paracoccidioidomicose e tuberculose: diagnóstico diferencial. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 1, p. 17-21, 2010.

CAPOCI, I. R. G.; FARIA, D. R.; SAKITA, K. M.; RODRIGUES-VENDRAMINI, F. A. V.; BONFIM-MENDONÇA, P. S.; BECKER, T. C. A.; KIOSHIMA, É. S.; SVIDZINSKI, T. I. E.; MAIGRET, B. Repurposing approach identifies new treatment options for invasive fungal disease. **Bioorganic Chemistry**, v. 84, p. 87-97, 2019.

COMPARATO-FILHO, O. O.; MORAIS, F. V.; BHATTACHARJEE, T.; CASTILHO, M. L.; RANIERO, L. Rapid identification of *Paracoccidioides lutzii* and *P. brasiliensis* using Fourier Transform Infrared spectroscopy. **Journal of Molecular Structure**, v. 1177, p.152-159, 2019.

COSTA, A. N.; BENARD, G.; ALBURQUERQUE, A. L. O.; FUJITA, C. L.; MAGRI, A. S. K.; SALGE, J. M.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, C. R. R. The lung in paracoccidioidomycosis: new insights into old problems. **Clinics**, v. 68, n. 4, p. 441-448, 2013.

COSTA, M. V.; LANDGRAF, T. N.; CORRÊA, P. C.; SOUZA, I. E. L.; FERNANDES, F. F.; PANINTO-CASTELO, A. Quantitation of pulmonary fungal burden in *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice by real-time PCR. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 61, n. e2, p. 1-5, 2018.

COUTINHO, Z. F. **Morbimortalidade por paracoccidioidomicose no Brasil (1998-2006)**. Tese (Doutorado em Saúde Pública). Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca. Rio de Janeiro, RJ.

DA-SILVA, F. L.; OLIVEIRA, H.C.; MARCOS, C.M.; ASSATO, P.A.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Advances and challenges in paracoccidioidomycosis serology caused by *Paracoccidioides* species complex: an update. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 84, n. 1, p. 87–94, 2016.

DUARTE, A. J. S.; BENARD, G. Paracoccidioidomycosis: A model for evaluation of the effects of human immunodeficiency virus infection on the natural history of endemic tropical diseases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, n. 4, p.1032-1039, 2000.

DUTRA, L. M.; SILVA, T. H.; FALQUETO, A.; PEÇANHA, P. M.; SOUZA, L. R.; GONÇALVES, S. S.; VELLOSO, T. R. Oral paracoccidioidomycosis in a single-center retrospective analysis from a Brazilian southeastern population. **Journal of Infection and Public Health**, v. 11, n. 4, p. 530-533, 2018.

ENDO, SHIGEO.; KOMORI, T.; RICCI, G.; SANO, A.; YOKOYAMA, K.; OHORI, A.; KAMEI, K.; FRANCO, M.; MIYAJI, M.; NISHIMURA, K. Detection of gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis* by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. **FEMS Microbiology Letters**, v. 234, n. 1, p. 93-97, 2004.

FABRIS, L. R.; ANDRADE, U. V.; SANTOS, A. F.; MARQUES, A. P. C.; OLIVEIRA, S. M. V. L.; MENDES, R. P.; PANIAGO, A. M. M. 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, 2014.

FERREIRA, C. S.; RIBEIRO, E.M.C.; GOES, A.M.; SILVA, B.M. Current strategies for diagnosis of paracoccidioidomycosis and prospects of methods based on gold nanoparticles. **Future Microbiology**, v. 11, n. 7, p. 87-94, 2016.

FORTES, M. R. P.; KUROKAWA, C. S.; MARQUES, S. A.; MIOT, H. A.; MARQUES, M. E. A. Imunologia da Paracoccidioidomicose. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 86, n. 3, p. 516-525, 2011.

GUAVIRIA, M.; RIVERA, V.; MUÑOS-CADAVID, C.; CANO, L.E.; NARANJO, T.W. Validation and clinical application of a nested PCR for paracoccidioidomycosis diagnosis in clinical samples from Colombian patients. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 4, p. 376-383, 2015.

HAHN, R. C.; RODRIGUES, A. M.; TERRA, P. P. D.; NERY, A. F.; HOFFMANN-SANTOS, H. D.; GÓIS, H. M.; FONTES, C. J. F.; CAMARGO, Z. P. Clinical and epidemiological features of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii*. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 6, p. e0007437, 2019.

HRYCYK, Francisca Marluce. **Ecologia de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii* e sua associação com o tatu *Dasypus novemcinctus* nos estados de São Paulo e Mato Grosso, Brasil**. Tese (Doutorado em Biologia de Parasitas e Microrganismos). Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP. 2018.

IWEN, P. C.; HINRICHS, S. H.; RUPP, M. E. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. **Medical Mycology**, v. 40, n.1, p.87-109, 2001.

KAMIKAWA, C. M.; MENDES, R. P.; VICENTINI, A. P. Standardization and validation of Dot-ELISA assay for *Paracoccidioides brasiliensis* antibody detection. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, p. 11, 2017.

KUMAR, C. M.; MUGUNTHAN, M.; KAPOOR, C. R.; PANDALANGHAT, C. S. Speciation of fungi using real time PCR with molecular beacons: Can we solve the enigma of diagnosis of invasive fungal disease? **Medical Journal Armed Forces India**, v. 75, n.1, p. 41-49, 2019.

MACEDO, P. M.; TEIXEIRA, M. M.; BARKER, B. M.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. ALMEIRA-PAES, R.; VALLE, A. C. F. Clininal features and genetic background of the sympatric species *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides americana*. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 4, p. e007309, 2019.

MACORIS, S.; SUGIZAKI, M. F.; PERAÇOLI, M. T. S.; BOSCO, S. M. G.; HEBELER-BARBOSA, F.; SIMÕES, L. B.; THEODORO, R. C.; TRINCA, L. A.; BAGAGLI, E. Virulence attenuation and phenotypic variation of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos and patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 3, p. 331-334, 2006.

MARTINEZ, R. New trends in paracoccidioidomycosis epidemiology. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p.1, 2017.

MASSI, L. S.; DALL BELO, A.G.; D'AZEVEDO, P.A.; SEVERO, L.C. Diagnóstico molecular de paracoccidioidomicose associada à tuberculose em amostras de escarro. **Clinical and Biomedical Research**, v. 36, n. 3, p. 142-147, 2016.

MENDES, R. P.; CAVALCANTE, R. S.; MARQUES, S. A.; MARQUES, M. E. A.; VENTURINI, J.; SYLVESTRE, T. F.; PANIAGO, A. M. M.; PEREIRA, A. C.; DA-SILVA, J.; FABRO, A. T.; BOSCO, S. M. G.; BAGAGLI, E.; HAHN, R. C.; LEVORATO, A. D. Paracoccidioidomycosis: Current perspectives from Brazil. **The Open Microbiology Journal**, v.11, p. 224-282, 2017.

MILLIGTON, M. A.; NISHIOKA, S. A.; MARTINS, S. T.; SANTOS, Z. M. G.; JÚNIOR, F. E. F. L.; ALVES, R. V. Paracoccidioidomicose: abordagem histórica e perspectivas de

implantação da vigilância e controle. **Epidemiologia e Serviço de Saúde**, v. 27, n. e0500002, p. 1-4, 2018.

MOYA, M. J.; MARTINEZ, R. Associação entre paracoccidiodomicose e alcoolismo. **Revista Saúde Pública de São Paulo**, v. 1, n. 26, p.12-16, 1992.

OLIVEIRA, A. R.; OLIVEIRA, L. N.; CHAVES, E. G. A.; WEBER, S. S.; BAILÃO, A. M.; PARENTE-ROCHA, J. A.; BAEZA, L. C.; SOARES, C. M. A.; BORGES, C. L. Characterization of extracellular proteins in members of the *Paracoccidioides* complex. **Fungal Biology**, v. 122, n. 8, p. 738-751, 2018.

PEREIRA, Virgínia Bodelão Richini. **Ecologia molecular de fungos patogênicos Onygenales em animais silvestres do interior do estado de São Paulo**. Tese (Doutorado em Biologia Geral e Aplicada) – Instituto de Biociência, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP. 2009.

ROCHA-SILVA, F., GUIMARÃES, C. F., JÚNIOR, E. R. O., FIGUEIREDO, S. M., CALIGIORNE, R. B. Disseminated paracoccidiodomycose prediagnosed as neoplasm: an important challenge in diagnosis using RT-PCR. **Medical Mycology Case Reports**, v. 19, p.1-5, 2018.

SANCHES, L. C.; FARIA, M. G. I. A importância do diagnóstico diferencial entre a paracoccidiodomicose (PCM) e tuberculose (TB). **Revista Uningá Review**, v. 20, n. 1, p. 76-80, 2014.

SANO, A.; YOKOYAMA, K.; TAMURA, M.; MIKAMI, Y.; TAKAHASHI, I.; FUKUSHIMA, K.; MIYAJI, M.; NISHIMURA, K. Detection of gp43 and ITS 1-5. 8S-ITS2 Ribosomal RNA Genes of *Paracoccidioides brasiliensis* in paraffin-embedded tissue. **Japanese Journal of Medical Mycology**, v. 42, n. 1, p. 23-27, 2001.

SANTOS, L. A.; GRISOLIA, J. C.; OLIVEIRA, A. M. Paracoccidiodomicose: Os desafios do diagnóstico e tratamento. **Revista da Universidade do Vale do Rio Verde**, v. 17, n. 1, p. 1-10, 2019.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. Paracoccidiodomycosis treatment. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 19, p. 31-37, 2005.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; MENDES, R.P.; COLOMBO, A.L.; QUEIROZ-TELLES, F. KONO, A.S.G.; PANIAGO, A.M.M.; NATHAN, A.; VALLE, A.C.F.; BAGAGLI, E.; BENARD, G.; FERREIRA, M.S.; TEIXEIRA, M.M.; SILVA-VERGARA, M.L.; PEREIRA, R.M.; CAVALCANTE, R.S.; HAHN, R.; DURLACHER, R.F.; KHOURY, Z.; CAMARGO, Z.P.; MONETTI, M.L.L.; MARTINEZ, R. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidiodomycosis. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 715-740, 2017.

SIFUENTES-OSORNIO, J.; CORZO-LEÓN, D. E.; PONCE-DE-LEÓN, L. A. Epidemiology of invasive fungal infections in Latin America. **Current Fungal Infection Reports**, v. 6, n. 1, p. 23-34, 2012.

SOUSA, C. M., CAMARGO, L. M. A., LIMA, S. M. D., ALVEZ, T. C., VIEIRA, G. D. Paracoccidioidomycosis in a wester Brazilian Amazon State: Clinical-epidemiologic profile and spatial distribution of the disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 1, p. 63-68, 2014.

TATAGIBA, L. S., PIVATTO, L. B., FACCINI-MARTÍNEZ, Á. A., PEÇANHA, P.M., VELLOSO, T. R., GONCALVES, S. S., RODRIGUES, A. M., CAMARGO, Z. P., FALQUETO, A. A case of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii* presenting sarcoid-like form. **Medical Mycology Case Reports**, v.19, p. 6-8, 2018.

TEIXEIRA, M. M.; THEODORO, R. C.; OLIVEIRA, F. F. M.; MACHADO, G. C.; HAHN, R. C.; BAGAGLI, E.; SAN-BLAS, G.; FELIPE, M. S. S. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. **Medical Mycology**, v. 52, n. 1, p.19-28, 2013.

TEIXEIRA, M.; THEORODO, R. C.; CARVALHO, M. J. A.; FERNANDES, L.; PAES, H. C.; HAHN, R. C.; MENDONZA, L.; BAGAGLI, E.; SAN-BLAS, G.; FELIPE, M. S. S. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 52, n. 2, p. 273-283, 2009.

TELES, F. R.; MARTINS, M. L. Laboratorial diagnosis of paracoccidioidomycosis and new insights for the future of fungal diagnosis. **Talanta**, v. 85, n. 5, p. 2254-2264, 2011.

TERÇARIOLI, G. R.; BAGAGLI E.; REIS, G. M, THEODORO, R. C.; BOSCO S. D. E. M.; MACORIS, S. A.; RICHINI-PEREIRA, V. B. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. **BMC Microbiology**, v.7, n. 92, p. 1-8, 2007.

THEODORO, R. C., CANDEIAS, J. M. G., JR-ARAÚJO, J. P., BOSCO, S. M. G., MACORIS, S. A. G., JUNIOR, L. O. P., BAGAGLI, E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. **Medical Mycology**, v.43, n. 8, p. 725-729, 2005.

THEODORO, R. C.; TEIXEIRA, M. M.; FELIPE, M. S. S.; PEDUAN, K. S.; RIBOLLA, P. M.; BAGAGLI, E. Genus *Paracoccidioides*: Species Recognition and Biogeographic Aspects. **Plos one**, v. 7, n. 5, p. e37694, 2012.

TURISSINI, D. A.; GOMEZ, O. M.; TEIXEIRA, M. M.; MCEWEN, J. G.; MATUTE, D. R. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 106, n.1, p. 9-25, 2017.

WANKE, B.; AIDÊ, M. A. Capítulo 6 - Paracoccidioidomicose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 12, p. 1245-1249, 2009.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, F. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Eds). PCR Protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, p. 315–322, 1990.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar a presença de *Paracoccidioides* sp. em amostras de escarro de pacientes sintomáticos respiratórios do município de Rio Branco – Acre, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR).

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1. Realizar uma revisão sistemática da aplicação das técnicas de diagnóstico da Paracoccidioidomicose no Brasil;

3.2.2. Verificar a detecção e incidência de *Paracoccidioides* sp. por meio da PCR em amostras de escarro de pacientes sintomáticos respiratórios no município de Rio Branco, Acre.

CAPÍTULO I

**APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DA
PARACOCCIDIOIDOMICOSE NO BRASIL: REVISÃO SISTEMÁTICA**

**Artigo publicado na revista South American Journal of Basic Education, Technical and
Technological - Qualis periódicos 2013-2016- B4 - Área: Interdisciplinar**

APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE NO BRASIL: REVISÃO SISTEMÁTICA

APPLICATION OF PARACOCCIDIOIDOMICOSIS DIAGNOSIS TECHNIQUES IN BRAZIL: A SYSTEMATIC REVIEW

Leandro Cavalcante Santos^{1*}; Clarice Maia Carvalho^{1,2}; Leila Priscila Peters¹

¹Universidade Federal do Acre (UFAC), Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, Rio Branco, Acre, Brasil;

²Universidade Federal do Acre (UFAC), Centro de Ciências Biológicas e da Natureza.

*Autor correspondente: leandrosantos765@hotmail.com

RESUMO

A paracoccidioomicose (PCM) é uma micose profunda, causada pelo fungo do gênero *Paracoccidioides*. Doença considerada mais importante da América Latina, com 80% dos casos provenientes do Brasil. Seu diagnóstico pode ser através do exame direto, cultivo, sorológicos, histopatológicos e métodos moleculares das amostras clínicas. Assim, este trabalho teve como objetivo realizar uma revisão sistemática acerca dos métodos de diagnóstico empregados na PCM no Brasil, consultando artigos indexados nas plataformas Google Acadêmico, Science Direct, Pubmed, Scopus e Scielo, entre os anos de 1956 a 2019. A metodologia de diagnóstico utilizados são: histopatológico (47,2%), seguido do exame direto (18,4), (PCR) (12,7), sorologia (11,4%) e cultura (10,3%). A região sudeste brasileira apresenta maior incidência de casos de PCM: São Paulo (25,8), Rio de Janeiro (19,4) e Minas Gerais (9,7). A incidência foi maior no sexo masculino (42%) e na faixa etária de 41-50 anos de idade (14%).

Palavras-chave: *Paracoccidioides*., micose profunda e micose pulmonar.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a deep mycosis caused by the fungus of the genus *Paracoccidioides*. Considered the most important disease in Latin America, with 80% of cases from Brazil. Its diagnosis can be through direct examination, culture, serological, histopathological and molecular methods of clinical samples. Thus, this work aimed to perform a systematic review of the diagnostic methods employed in PCM in Brazil, consulting articles indexed in the Google Academic, Science Direct, Pubmed, Scopus and Scielo platforms, from 1956 to 2019. The diagnostic methodology used are: histopathological (47.2%), followed by direct examination (18.4), (PCR) (12.7), serology (11.4%) and culture (10.3%). The southeastern region of Brazil has a higher incidence of PCM cases: São Paulo (25,8), Rio de Janeiro (19,4) and Minas Gerais (9,7). The incidence was higher in males (42%) and in the age group 41-50 years (14%).

Key-words: *Paracoccidioides*. deep mycosis and pulmonary mycosis.

1. INTRODUÇÃO

Os fungos têm representado um importante grupo de microrganismos causadores de doenças infecciosas por todo o mundo e nos últimos anos, tem tido aumento contínuo, principalmente devido à epidemia de HIV/AIDS, uso de imunossupressores e quimioterápicos no tratamento de câncer. Assim, diante disso, torna-se um desafio o diagnóstico, tratamento e controle das doenças infecciosas fúngicas [1].

A paracoccidioomicose (PCM) é uma micose sistêmica, crônica que tem como agente causador as espécies *Paracoccidioides brasiliensis* e *P. lutzii*, afetando regiões tropicais e

subtropicais da América Latina [2]. Por não ser uma doença de notificação compulsória na maioria dos estados brasileiro, não há dados precisos a respeito da prevalência, incidência e morbidade desta doença. As estimativas oriundas de inquérito epidemiológico, séries de casos, registros de hospitalização e dados de mortalidade relataram que 80% dos casos presente na América Latina são provenientes do Brasil [3].

PCM foi confirmada em 27% dos municípios brasileiros, causando internação em 4,3 por um milhão de habitantes e é tida como a oitava causa mais frequente de morte por doença infecciosa e parasitária crônica [4].

A PCM também apresenta índices elevados em alguns países da América Latina, como Brasil, Argentina, Venezuela, Colômbia e Equador [5]. O número de casos que ocorrem nestes países varia de 1 a 3 por 100.000 habitantes, implicando diretamente nos aspectos sociais e econômicos, visto que acomete o indivíduo no período mais produtivo da vida, com longo período de tratamento, podendo ser observado sequelas na maioria das vezes [6].

As espécies de *Paracoccidioides* sp. são termodimórficas e podem ser encontradas na forma micelial em solo e vegetais, e na forma leveduriforme, a temperatura de 37 °C em tecidos infectados [7]. Possui o ar como veículo de dispersão de seus esporos, que quando inalados, se instalam nos pulmões, cujo período de incubação pode variar de um mês a muitos anos [3].

A PCM se expressa como uma pneumopatologia ligada a lesões mucosas e cutâneas, que quando instalado nos pulmões, se transforma para forma leveduriforme. A partir do parênquima pulmonar poderá se disseminar via corrente sanguínea e sistema linfático para outros órgãos, como baço, fígado, osso e sistema nervoso central [8]. A fase primária da infecção envolve normalmente indivíduos jovens, como doença pulmonar limitada, que dificilmente progride para o estado agudo/subagudo da doença, diferente dos casos crônicos, nos quais os indivíduos apresentam longos períodos de latência e que durante sua reativação é observado acometimento pulmonar e/ou de outros órgãos [9].

Na forma aguda/subaguda há um predomínio em crianças, adolescentes e jovens adultos, com menor duração da sintomatologia e acometimento dos nódulos linfáticos, fígado, baço, medula óssea e, raramente, acometimento pulmonar e mucosa oral, diferente do observado na forma crônica, com predomínio em pacientes adultos com mais de 30 anos, com longo período de sintomatologia e alta prevalência por envolvimento pulmonar e mucosas [10]. A doença pode ser unifocal, com acometimento de um único órgão ou multifocal com acometimento de vários órgãos [11].

Dentro do gênero *Paracoccidioides* existem cinco espécies descritas, *Paracoccidioides brasiliensis* (antigo grupo filogenético S1) com suas duas populações crípticas S1a e S1b, *Paracoccidioides americana* (antigo grupo filogenético PS2), *Paracoccidioides restrepiensis* (antigo grupo filogenético PS3) *Paracoccidioides venezuelensis* (antigo grupo filogenético PS4) e *Paracoccidioides lutzii* (antigo Pb01) (TURISSINI et al., 2017). As espécies *P. restrepiensis* e *P. venezuelensis* são geograficamente encontradas na Colômbia e Venezuela, e *P. brasiliensis*, *P. americana* e *P. lutzii* são amplamente distribuídos pela América Latina [13].

O diagnóstico padrão ouro na identificação de *Paracoccidioides* sp. é através da visualização microscópica do fungo feito em material fresco, biópsia ou isolamento e identificação com crescimento fúngico por cultura do material clínico, sendo observado como múltiplas leveduras em brotamento ao redor da célula mãe (com aspecto de roda de leme) de parede birrefringente [14].

As técnicas imunodiagnósticas baseadas na detecção dos antígenos do fungo ou anticorpos do paciente tem sido de grande importância para diagnóstico, sendo muito utilizado as glicoproteínas de 43 kDa (gp43), 70 kDa (gp70), kDa 27 (gp27) e 150 kDa (gp150) apresentando variação nas reações com soro de pacientes com PCM [15]. As glicoproteínas 43 kDa, 70 kDa e kDa 27 são conhecidas por serem altamente específicas no diagnóstico de PCM, apresentando reação em 90% de pacientes com PCM [2, 16, 17, 18,].

Técnicas moleculares têm sido utilizadas como ferramenta no diagnóstico de diversas doenças fúngicas, possuindo resultados rápidos e eficientes [19]. No intuito de identificar e diferenciar as espécies de *Paracoccidioides* spp. em amostras clínicas, tem-se utilizado *primers* com base em sequências específicas do gene do fungo, como gp43, gp27 e ITS 1 e 2, específico para *P. brasiliensis*, e o gene HSP 70, específico para *P. lutzii* [16, 20, 21, 22]. O diagnóstico rápido e preciso da paracoccidioidomicose é necessário para o início efetivo e específico da terapia, prevenindo assim, danos e sequelas aos pacientes acometidos [14].

Com o aumento dos casos de PCM nas últimas décadas, houve a necessidade de inovação nas técnicas de diagnóstico, pois métodos tradicionais têm demonstrado serem poucas sensíveis e/ou muito demorado para fechar diagnóstico rápido e fidedigno. Diante disso, este trabalho objetivou realizar uma revisão sistemática dos artigos que utilizaram métodos tradicionais e moleculares no diagnóstico de PCM no Brasil.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de uma revisão sistemática com foco na identificação de estudos abordando diagnóstico em amostras clínicas de Paracoccidiodomicose no Brasil, conforme as bases nas diretrizes disponíveis no guia Preferred Reporting Intems for Systematic Review and MetaAnlyses (PRISMA) [23].

Foram empregadas as plataformas de bases científica Google Acadêmico, Science Direct, Pubmed, Scopus e Scielo com os descritores: molecular diagnosis of paracoccidiodes in Brazil, molecular diagnosis of paracoccidiodes in clinical specimens in Brazil em inglês, português e espanhol, entre os anos de 1956 a 2019. Apenas artigos publicados em inglês, português ou espanhol foram utilizados na pesquisa propósito da revisão. Os critérios de inclusão dos artigos nesta revisão foram os estudos com descrição do método para diagnóstico de paracoccidiodomicose no Brasil. Quanto aos critérios de exclusão, os seguintes estudos foram considerados inadequados a esta revisão: artigos de revisão, abordando métodos moleculares que não seja de espécimes clínicos, trabalhos com pacientes de outros países e trabalhos que utilizaram amostras previamente diagnosticadas. As informações a cerca dos diagnósticos contidas em todos os trabalhos foram reunidas e sistematizadas em planilha do Excel, com o objetivo de reunir informações sobre sexo, idade, localização geográfica, número de casos e método de diagnóstico, no intuito de descrever os resultados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 RESULTADOS

Com posterior busca dos artigos utilizando os descritores acima mencionados, foram obtidos um total de 6.750 registros e foram distribuídos da seguinte forma: 6.300 registros da base Google Acadêmico, 367 registros na base Science Direct, 48 registros da base Pubmed, 21 registros na base Scielo e 20 registros na base Scopus. Entre todos os registros encontrados, foram realizadas leituras dos títulos no intuito de identificar a duplicidade de trabalhos, obtendo assim, 750 artigos. Todos os trabalhos que abordavam a utilização de métodos analisando amostras de solo, aerossol, animais, trabalhos que utilizavam apenas amostras clínicas de pacientes previamente diagnosticados ou que não mencionava a metodologia para diagnóstico dos pacientes, foram excluídos, alcançando assim, 201 artigos. Destes 201 artigos, apenas 40 continham as informações utilizadas como parâmetros neste trabalho (sexo, idade, localização geográfica, número de casos e método de diagnóstico) podendo então ser utilizadas nesta revisão sistemática (Figura 1).

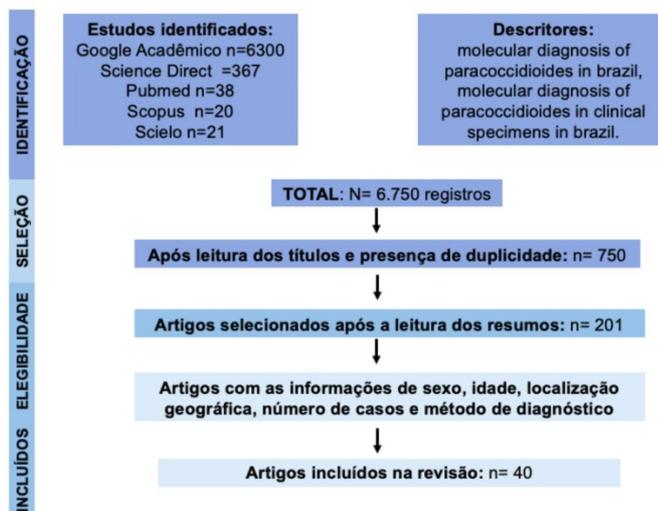


Figura 1. Fluxograma da seleção de artigos para Revisão Sistemática sobre aplicação das técnicas de diagnóstico da Paracoccidioidomicose no Brasil.

Após a análise dos 40 artigos selecionados, foi observado que no Brasil é empregado basicamente cinco técnicas de diagnóstico para a paracoccidioidomicose, as técnicas histopatológicas (47,12%), seguido do exame direto (18,39%), PCR (12,64%), sorologia (11,49%) e cultura do material clínico (10,34%). Para os exames sorológicos utilizaram-se com maior frequência a técnica de imunodifusão 80%, seguida da técnica de Elisa 10% e Inclusão de contra-immunoelctroforese 10%. Para análise, pode-se utilizar uma variedade de amostras clínicas, como linfonodos, secreção de úlcera, pus de lesão, nódulos cervicais, escarro, esfregaço da lesão, biópsia e sangue (Figura 2).

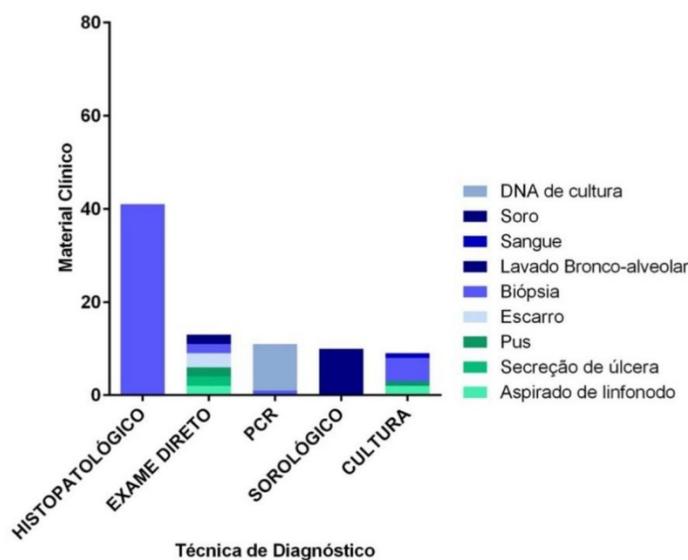


Figura 2. Métodos de diagnóstico e material clínico utilizados para detectar a paracoccidiodomicose no Brasil.

Os estados que apresentaram maiores casos de PCM foram: São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais. Estado de São Paulo (25,80%) apresentou relatos em oito municípios, como Ribeirão Preto (1), Monte Castelo (1) Campinas (1), Piracicaba (1), Itapeçerica da Serra (1), São Manuel (1) e em um caso não foi mencionado o município e em outro é apenas retratado como interior de São Paulo. O Estado do Rio de Janeiro é relatado seis casos (19,35%), nos municípios de Itaipava (2), São José do Vale do Rio Preto (1), São João de Meriti (1), Rio de Janeiro (1) e Casimiro de Abre (1) e o Estado de Minas Gerais com três relatos (9,67%), nos municípios de São Sebastião do Paraíso (1), São Sebastião do Maranhão (1) e São José das Letras (1). Mato Grosso apresentou dois casos (6,45%), Vila Rica (1) e Indianópolis (1) e Mato Grosso do Sul apresenta um caso (3,22%), no qual não se descreve o município de origem. Pernambuco (3,22) – Recife, Espírito Santo (3,22%) -Santa Maria do Jequitibá e Paraná (3,22%)-Londrina, apresentaram respectivamente um caso de paracoccidiodomicose cada (Figura 3).



Figura 3 Distribuição de caso de Paracoccidioidomicose (PCM) por Estados no Brasil.

Em relação à distribuição de casos por sexo e faixa etária, é evidente a maior incidência de PCM no sexo masculino na faixa etária de 41 a 51 anos de idade, seguido de 11-20 anos e 51-60 anos. A maior incidência de PCM no sexo feminino foi entre os 31-40 anos de idade. Em 27 casos não foram relatadas as idades dos pacientes (Figura 4).

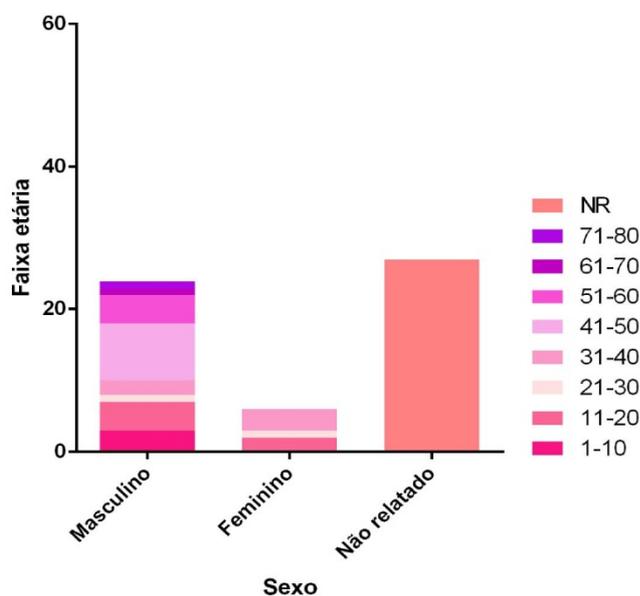


Figura 4. Distribuição de casos de Paracoccidioidomicose por sexo e faixa etária no Brasil.

3.2. DISCUSSÃO

Nesta revisão foi verificado que a técnica mais empregada foi a histopatológica, seguido de exame direto, PCR, sorologia e por último, cultura do material clínico.

A técnica histopatológica permite a fragmentação do tecido oriundo de biópsia e tem sido aliada no diagnóstico patológico de PCM, podendo evidenciar a micromorfologia e reação tecidual, com visualização das células fúngica em brotamento arredondadas, esférico ou oval com dupla membrana birrefringente ligados à célula mãe, com vasto granuloma compacto, repleto de células epitelióides contendo fungos [24]. Por mais que seja invasiva e traumática ao paciente, a histopatologia possui elevada sensibilidade ao diagnóstico de PCM, pois se bem realizada, contribui na visualização do patógeno e seu diagnóstico [25]. Mas sempre que possível, deve-se aliar o diagnóstico histopatológico ao cultivo micológico, para que possa esclarecer e obter diagnóstico definitivo [26].

Os exames diretos das amostras clínicas representaram o segundo método mais utilizado com 18,35%, possivelmente por oferecem resultados anteriores a cultura do material, que demanda tempo para haver o crescimento em meio de cultura, sendo considerado rápido, de fácil leitura, específico e sensível [27]. Este exame baseia-se em avaliar microscopicamente o material clínico, entre lâmina e lamínula, com a ajuda de reagentes e/ou corantes para a visualização das estruturas fúngicas, podendo muitas vezes ser conclusivo no diagnóstico de PCM, mas que sozinho, nem sempre é suficiente a visualização e identificação do fungo [26].

A técnica de reação em cadeia da Polimerase (PCR) foi a terceira metodologia mais utilizada no diagnóstico de PCM, representando 12,6%, demonstrando possuir elevada taxa de sensibilidade e especificidade, na qual a reação pode amplificar regiões do gene específico do DNA ribossômico 28S, gene ribossômico 5.8S (rRNA), espaçadores internos transcritos (ITS) 1 e 2, ARF, GP43, GP27 e HSP 70 [21, 17]. Os trabalhos obtidos nesta revisão utilizaram duas regiões para amplificação, a glicoproteína gp43 e o fator de ribosilação de ADP parcial (arf), que são sequência de genes suficientemente capaz de diferenciar as espécies de *Paracoccidioides* sp. [13].

É notório que o diagnóstico de certeza com visualização do agente etiológico através das técnicas histológicas, exame a fresco ou cultivo é de grande ajuda, mas nem sempre é possível obter acesso ao local da lesão, impossibilitando a coleta do material para análise [28]. A dificuldade na demonstração do agente etiológico, aliada ao difícil crescimento na fase micelial e sua confirmação na reversão para a forma leveduriforme, faz das técnicas sorológicas uma opção para diagnóstico de PCM [18]. Nesta revisão, a sorologia foi à quarta metodologia mais utilizada (12,60%) com o uso das técnicas de Imunodifusão dupla (80%), ELISA (10%) e contra-imunoeletroforese (10%), sendo útil no diagnóstico de PCM, em especial quando não se é possível a visualização das células de *Paracoccidioides* sp. [29].

A imunodifusão dupla (DID) tem sido o método de escolha entre os métodos sorológicos no diagnóstico de PCM e único validado, sendo simples, baixo custo e importante no monitoramento, com especificidade de 65% e sensibilidade de 100% dependendo da glicoproteína utilizada [30].

O uso de glicoproteínas específicas no diagnóstico de PCM é essencial, pois se tem relato que o uso da glicoproteína gp43 da espécie de *Paracoccidioides brasiliensis* na técnica de imunodifusão, tem demonstrando sensibilidade e especificidade de 97% e 100% [18].

Além da glicoproteína gp43, foi verificado por *immunoblotting* que 90% dos soros de pacientes com PCM reagem com componente de 70 kDa, do gene gp70, e que após o tratamento com antifúngicos, as titulações de anti-gp70 diminuam, podendo assim ser utilizada como marcador para doença [31].

No entanto, a sorologia possui a desvantagem devido ao falso-positivo em indivíduo imunocomprometido ou co-infectados com outras micoses [3]. Além disso, os avanços no conhecimento da caracterização do gênero de *Paracoccidioides* se conheceu uma maior complexidade na utilização da sorologia, pois níveis baixos ou a ausência de expressão do gp43 pelo sistema imunológico do indivíduo, pode levar a imprecisão no diagnóstico sorológico [32].

O cultivo do agente etiológico é essencial para o diagnóstico de infecções fúngicas, permitindo isolamento do agente causador e garantindo sua identificação, sendo este o padrão ouro no diagnóstico micológico [33]. Nesta revisão, a cultura do material clínico representou apenas (10,3%), sendo o método menos relatado, possivelmente por apresentar lento crescimento fúngico, demorando 2-4 semanas para apresentar algum resultado [17]. Outro fato, é a dificuldade do crescimento fúngico na fase micelial e por ser um fungo dimórfico, se faz necessário haver a reversão para a forma leveduriforme, e assim, a confirmação do agente etiológico de PCM [18].

Neste trabalho, foi possível verificar o Estado de São Paulo Rio de Janeiro e Minas Gerais com o maior número de casos de PCM, seguidos de Mato Grosso, Pará, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo e Paraná. Este achado corrobora com a literatura, pois a região sudeste do Brasil, incluindo São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo, são áreas que apresentam um importante histórico de alta endemicidade da doença, onde o Rio de Janeiro possui o maior número de hospitalizações por PCM no Brasil [13].

Os dados obtidos nesta revisão confirmam o Estado de São Paulo com um dos maiores índices de PCM no Brasil [3]. A incidência anual de PCM no Estado de São Paulo e Rio de Janeiro tem sido de 0,96 e 0,71 respectivamente, e entre os anos de 1980 e 1990 a incidência

na região de Ribeirão Preto-SP, variou de 1,5 a 3,7 casos/100.000 habitantes/ano [34] O Estado de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul são conhecidos por apresentar elevada endemicidade, sendo retratado na literatura que entre os anos de 1980 e 1999 houveram 422 casos, cerca de 22,2 casos por ano [35, 36].

Com relação ao caso que ocorreu em Pernambuco, a literatura relata que existem poucos casos na região nordeste do Brasil, devido ao clima semi-árido que dificulta a sobrevivência do fungo no ambiente. Entretanto, com a variedade de biomas brasileiros e a migração humana por estes biomas, o cenário epidemiológico tem mudado [13].

Esta revisão aponta a maior incidência de PCM no sexo masculino (42,1%), em comparação com o sexo feminino (10,5%), sendo a faixa etária de 41 a 50 anos a mais frequente para homens e para as mulheres a faixa de 31 a 40 anos de idade, dados estes que corroboram com outros estudos, sendo descrito a maior incidência de PCM entre homens com 30 a 50 anos, e incidência de 10 a 15 homens para 1 mulher [3, 24, 29, 37].

Esta menor incidência no sexo feminino pode estar relacionando a resistência a infecção de *Paracoccidioides* sp. devido modulação hormonal, pois o hormônio estradiol inibe a transformação da forma micelial para a forma leveduriforme, essencial para a infecção, sugerindo assim, que o complexo proteína-estradiol modula a expressão da proteínas de *Paracoccidioides* sp., não observado no hormônio testosterona, mais encontrado no homem [38].

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método mais utilizado para diagnóstico de PCM tem sido histopatológico. A maior quantidade de casos tem sido relatada no sudeste do Brasil, especificamente São Paulo e Rio de Janeiro, com maior incidência no sexo masculino entre faixa etária de 51-60 anos.

REFERÊNCIAS

- [01] PAZ, G.S.; ADORNO, B.M.V.; RICHINI-PEREIRA, V.B.; BOSCO, S.M.G.; LANGONI, H. Infection by *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus* spp. And *Paracoccidioides brasiliensis* in bats collected in urban areas. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n.6, p. 1797-1805, 2018.
- [02] ROCHA-SILVA, F., GUIMARÃES, C. F., JÚNIOR, E. R. O., FIGUEIREDO, S. M., CALIGIORNE, R. B. Disseminated paracoccidioidomycose prediagnosed as neoplasm: Na importante challenge in diagnosis using rt-PCR. **Medical Mycology Case Reports**, v. 19, p.1-5, 2018.

- [03] SHIKANAI-YASUDA, M. A.; MENDES, R.P.; COLOMBO, A.L.; QUEIROZ-TELLES, F. KONO, A.S.G.; PANIAGO, A.M.M.; NATHAN, A.; VALLE, A.C.F.; BAGAGLI, E.; BENARD, G.; FERREIRA, M.S.; TEIXEIRA, M.M.; SILVA-VERGARA, M.L.; PEREIRA, R.M.; CAVALCANTE, R.S.; HAHN, R.; DURLACHER, R.F.; KHOURY, Z.; CAMARGO, Z.P.; MONETTI, M.L.L.; MARTINEZ, R.. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p 715-740, 2017.
- [04] KRYCYK, F. M.; GARCES, H. G.'BOSCO, S. M.; OLIVEIRA, S.; MARQUES, S. A.; BAGAGLI, E. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*, *P. lutzii* and related species: infection in armadillos, soil occurrence and mycological aspects. **Medical Mycology**, v. 56, n. 8, p. 950-962.
- [05] RUAS, L. P.; GENARO, L.M.; JUSTO-JUNIOR, A.S.; COSER, L.O.; CASTRO, L.F.; TRABASSO, P.; MAMONI, R.L.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; BLOTTA, M.H.S.L. Effect of artinM on human blood cells during infection with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Frontiers In Microbiology**, v. 9, p. 867, 2018.
- [06] SCORZONI, L.S.; LUCAS, M.P.; SINGULANI, J.L.; OLIVEIRA, H.C.; ASSATO, P.A.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Evaluation of *Caenorhabditis elegans* as a host model for *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*. **Pathogens And Disease**, v.76, n.1, p. 004, 2018.
- [07] CAMACHO, E.; NIÑO-VEGA, G.A. *Paracoccidioides* spp.: virulence factors and immune-evasion strategies. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, n. 19, p. 1-13, 2017.
- [08] SILVA, J.F.; OLIVEIRA, H.C.O.; MARCOS, C.M.; ASSATO, P.A.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; GIANNINI, M.J.S.M. Advances and challenges in paracoccidioidomycosis serology caused by *Paracoccidioides* species complex: na update, v.84, n.1, p. 87-94, 2016.
- [09] MASSI, L. S.; DALL BELO, A.G.; D'AZEVEDO, P.A.; SEVERO, L.C. Diagnóstico molecular de paracoccidioidomicose associada à tuberculose em amostras de escarro. **Clinical and Biomedical Research**, v. 36, n. 3, p. 142-147, 2016.
- [10] LEVORATO, A.D.; MORIS, D.V.; CAVALCANTE, R.S.; SYLVESTRE, T.F.; AZEVEDO, P.Z.; CARVALHO, L.R.C.; MENDES, R.P. Evaluation of the hepatobiliary system in patients with paracoccidioidomycosis treated with cotrimoxazole or itraconazole. **Medical Mycology**, v.56, n.5, p. 531-540, 2018.
- [11] MARTINS, P. H. R. **Análise Proteômica de *Paracoccidioides* sp. isolado de um caso de Fungemia.** (Dissertação) Mestrado em Genética e Biologia Molecular -Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.
- [12] TURISSINI, D. A.; GOMEZ, O, M.; TEIXEIRA, M. M.; MCEWEN, J.; MATUTE, D. R. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 106, p.9-17, 2017.
- [13] MACEDO, P. M.; TEIXEIRA, M.M. BARKER, B.M.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M.; ALMEIDA-PAES, R.; VALLE, A.C.F. Clinical features and genetic background of the

sympatric species *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides americana*. **Neglected Tropical Diseases**, v. 13. N.4, p. e007309, 2019.

[14] FERREIRA, C. S.; RIBEIRO, E.M.C.; GOES, A.M.; SILVA, B.M. Current strategies for diagnosis of paracoccidioidomycosis and prospects of methods based on gold nanoparticles. **Future Microbiology**, v.11, n.7, p. 87-94, 2016.

[15] NAGASHIMA, L. A.; MASSUDA, T. Y. C.; OBA, L.; KAMINAMI, M. S.; ITANO, E. N. Análise de soros de pacientes com paracoccidioidomicose por Western Blotting. **Biosaúde**, n. 6, n. ½, p.37-46, 2014.

[16] GOMES, G, M.; CISALPINO, P.S.; TOBORDA, C.P.; CAMARGO, Z.P. PCR for diagnosis of Paracoccidioidomycosis. **American Society for Microbiology**, v.38, n.9, p. 3478-3480, 2000.

[17] GUAVIRIA, M.; RIVERA, V.; MUÑOS-CADAVID, C.; CANO, L.E.; NARANJO, T.W. Validation and clinical application of a nested PCR for paracoccidioidomycosis diagnosis in clinical samples from Colombian patients. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n.4, p. 376-383, 2015.

[18] DA-SILVA, J.F.; OLIVEIRA, H.C.O.; MARCOS,C.M.; ASSATO, P.A.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; GIANNINI, M.J.S.M. Advances and challenges in paracoccidioidomycosis serology caused by *Paracoccidioides* species complex: na update, v.84, n.1, p. 87-94, 2016.

[19] SAN-BLES, G.; NIÑO-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: Molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Medical Mycology**,v.40, n.3, p. 225-242, 2002.

[20] SANO, A.; YOKOYAMA, K.; TAMURA, M.; MIKAMI, Y.; TAKAHASHI, I.; FUKUSHIMA, K.; MIYAJI, M.; NISHIMURA, K. Detection of gp43 and ITS1-5.8s-ITS2 Ribosomal RNA gene of *Paracoccidioides brasiliensis* in Paraffin-embedded tissue. **Nippon Ishinjin Hakkai Zasshi**, v.42, n. 1, p. 23-27, 2001.

[21] ENDO, S.; KOMORI, R.; RICCI, G.; SANO, A.; YOKOYAMA, K.; OHORI, A.; KAMEI, L.; FRANCO, M.; MOYAJI, M.; NISHIMURA, K. Detection of gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis* by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. **FEMS Microbiology Letters**, v.234, n. 1, p. 93-97, 2004.

[22] TEIXEIRA, M. M.; THEODORO, R.C.; OLIVEIRA, F.F.M.; MACHADO, G.C.; HAHN, R.C.; BAGAGLI, E.; SAN-BLAS, G.; FELIPE, M.S.S. *Paracoccidioides hutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. **Medical Mycology**, v.52, n.1, p.19-28, 2013.

[23] SHAMSEER, L.; MOHER, D.; CLARKE, M.; GHERSI, M.; LIDERATI, A.; PETTICREW, P.S.; STEWART, L.A. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015: elaboration and explanation. **BMJ**, v. 349, p. g7647, 2015.

[24] RICCI, C.D.; EVANGELISTA, C.; TOMAZ, B.C.A.; SILVA, M.V.'BARBO, M.L.P. Paracoccidioidomicose: forma crônica cutânea. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 20, n. 1, p. 51-4, 2018.

- [25] MELO, R.R.G.; LIMA, L.C.N.; LEHNEN JR, C.A. Blastomicose de laringe. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v.70, n. (1/2), p.81-82, 1996.
- [26] XAVIER, M. O.; OLIVEIRA, F. M.; SEVERO, L. C. Diagnóstico Laboratorial Das Micoses Pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 36, n. 9, p. 907-919, 2009.
- [27] BRASIL, K.W., PINHEIRO, R.L.; PIMENTEL, I.C. Laboratory diagnosis of superficial and cutaneous mycosis: a comparison of the potassium hydroxide and calcofluor white methods. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 78, n. 5, p. 547-551, 2003.
- [28] FERREIRA-DA-CRUZ, M.F.; FRANCESCONI-DO-VALE, A.C.; ESPINERA, M. C.D.; WANKE, B.T.; GALVAO-CASTRO, B. Study of antibodies in paracoccidioidomycosis: follow-up of patients during and after treatment. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 28, n.2, p.151-157, 1990.
- [29] CAMARGO, Z. P.; BERZAGHI, R.; AMARAL, C.C.; SILVA, S.H.M. Simplified method for producing *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for use in immunodiffusion tests. **Medical Mycology**, v. 41, n. 6, p. 439-542, 2003.
- [30] BERTONI, T.A.; TAKAO, E.K.H.; DIAS, J.R.C.; SVIDZINSKI, T.I.E. Paracoccidioidomicose e tuberculose: Diagnóstico diferencial. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 1, p. 17-21, 2010.
- [31] MARICATO, Juliana Terzi. Clonagem e caracterização do gene que codifica a glicoproteína de 70 kDa (gp70) de *Paracoccidioides brasiliensis*. Tese (Doutorado em Ciências). Escola Paulista de Medicina, São Paulo, Sp.
- [32] PUCCIA, R.; MCEWEN, J. G.; CISALPINO, P. S. Diversity in *Paracoccidioides brasiliensis*. The pbGP43 gene as genetic marker. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 275, 2008.
- [33] AYATS, J., MARTÍN-MAZUELOS, E., PEMÁN, J., QUINDÓS, G., SÁNCHEZ, F., GARCÍA-RODRÍGUEZ, J., GUARRO, J., GUINEA, J., LINARES, M. M., PONTÓN, J., RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L., CUENTA-ESTRELLA, M. Recomendaciones sobre el diagnóstico de la enfermedad fúngica invasora de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). **Enfermedad Infecciosa y Microbiología Clínica**, v. 29, n.1, p. 1-15, 2011.
- [34] MARTINEZ, R. New trends in paracoccidioidomycosis epidemiology. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p.1, 2017.
- [35] PANIAGO, A. M. M., AGUIAR, J. I. A, AGUIAR, E. S., CUNHA, R. V., PEREIRA, G. R. O. L., LONDERO, A. T., WANKE, B. Paracoccidioidomicose: 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, 2003.
- [36] VERLI, F. D., MARINHO, S. A., SOUZA, S. C., FIGUEIREDO, M. A. Z., YURGEL, L. A. Perfil clínico-epidemiológico dos pacientes portadores de paracoccidioidomicose no Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio

Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 3, p. 234-237, 2005.

[37] BOER, S.J.B.; CAMARGO, W.R. Oral manifestations of papiloma and paracoccidioidomycosis: case report. **Revista Uningá**, v. 20, n.1, p. 72-75, 2014.

[38] SIFUENTES-OSORNIO, J.; CORZO-LEÓN, D. E.; PONCE-DE-LEÓN, L. A. Epidemiology of invasive fungal infections in Latin America. **Current Fungal Infection Reports**, v. 6, n. 1, p. 23-34, 2012.

CAPÍTULO II

DETECÇÃO MOLECULAR DE *Paracoccidioides* sp. EM AMOSTRAS DE ESCARRO EM PACIENTES DO MUNICÍPIO DE RIO BRANCO – ACRE

DETECÇÃO MOLECULAR DE *Paracoccidioides* sp. EM AMOSTRAS DE ESCARRO EM PACIENTES DO MUNICÍPIO DE RIO BRANCO - ACRE

Leandro Cavalcante Santos¹; Clarice Maia Carvalho^{1,2};

Leila Priscila Peters¹.

1. Universidade Federal do Acre (UFAC), Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, Rio Branco, Acre, Brasil;
2. Universidade Federal do Acre (UFAC), Centro de Ciências Biológicas e da Natureza.

Resumo

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose granulomatosa, sistêmica, causada por fungos do gênero *Paracoccidioides*, com elevados índices nos países da América Latina, em especial no Brasil. O fungo possui o solo como habitat natural, que por meio da inalação de conídios e/ou propágulos infecta o ser humano. A PCM pode se comportar como PCM infecção, PCM doença, sendo está na forma aguda/subaguda e crônica, além de unifocal ou multifocal. PCM afeta especialmente homens com trabalho relacionado ao campo e devido à modulação hormonal, as mulheres são as menos atingidas. O diagnóstico dessa doença pode ser obtido por meio de métodos microbiológicos e sorológicos. Além disso, pode-se realizar seu diagnóstico por meio dos métodos moleculares, em especial via reação em cadeia da polimerase (PCR), porém, possui grande dificuldade devido à falta de padronização. Diante disso, este trabalho teve como objetivo realizar a detecção molecular de *Paracoccidioides* sp. em amostras de escarro em pacientes sintomáticos respiratórios do município de Rio Branco, Acre, utilizando a técnica de PCR. Um total de 59 amostras de escarro foram coletados de pacientes sintomáticos nas unidades de saúde do município de Rio Branco. Todas as 59 amostras de escarro passaram pela técnica de nested-PCR com *primers* externos ITS5 e ITS4 e *primers* internos PbITSE e PbITSR, entretanto, somente um (1,69%) paciente apresentou positividade para *P. brasiliensis*. Este paciente havia morado no interior do estado do Acre e apresentava histórico de atividade ligada a agricultura. A técnica de nested-PCR com os *primers* acima mencionados apresentou baixa sensibilidade (54,5%), entretanto, elevada especificidade (100%) para diagnóstico de PCM.

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose, Diagnóstico molecular, PCR.

Abstract: Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic granulomatous mycosis caused by fungi of the genus *Paracoccidioides*, with high rates in Latin American countries, especially in Brazil. The fungus has the soil as a natural habitat, which by inhaling conidia and / or propagules infects humans. PCM can behave like PCM infection, PCM disease, being in acute / subacute and chronic form, in addition to unifocal or multifocal. PCM especially affects men with field-related work and due to hormonal modulation, women are the least affected. The diagnosis of this disease can be obtained through microbiological and serological methods. In addition, its diagnosis can be performed using molecular methods, especially via polymerase chain reaction (PCR), however, it has great difficulty due to the lack of standardization. Therefore, this study aimed to perform the molecular detection of *Paracoccidioides* sp. in sputum samples in symptomatic respiratory patients in the municipality of Rio Branco, Acre, using the PCR technique. A total of 59 sputum samples were collected from symptomatic patients in health units in the municipality of Rio Branco. All 59 sputum samples underwent the nested-PCR technique with ITS5 and ITS4 external primers and PbITSE and PbITSR internal primers, however, only one (1.69%) patient was positive for *P. brasiliensis*. This patient had lived in the interior of the state of Acre and had a history of activity related to agriculture. The nested-PCR technique with the aforementioned primers showed low sensitivity (54.5%), however, high specificity (100%) for PCM diagnosis.

Keywords: Paracoccidioidomycosis. Molecular diagnosis. PCR.

Introdução

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica granulomatosa, que possui as espécies *Paracoccidioides brasiliensis* e *P. lutzii*, além de suas espécies crípticas, *P. americana*, *P. restrepiensis* e *P. venezuelensis* como agente etiológico (TURISSINE et al., 2017). Essas espécies são termodimórficas, encontrada na forma micelial em solo que a partir da inalação de suas partículas fúngica, ocorre reversão para forma leveduriforme, instalando-se assim a infecção (SESTARI et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2018).

A PCM afeta prioritariamente pessoas de regiões tropicais e subtropicais da América Latina, desde o sul do México a Argentina, sendo relatado 80% dos casos proveniente no Brasil, classificada como a oitava causa de morte mais frequente entre as doenças infecciosas e parasitárias crônicas (SANTOS et al., 2019).

É relatado que o Brasil apresenta incidência de internações de 7,99/1000 hab., números maiores que demais micoses, além de apresentar maiores relatos na região sul, sudeste e centro-oeste (HAHN et al., 2019.; TATAGIBA et al., 2018.; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

O aumento no número de casos de PCM vem sendo registrado em alguns Estado da região Norte, sendo estes locais submetidos à área de colonização, como Mato Grosso, Tocantins, Pará, Rondônia e Acre, acreditando-se que PCM possa ser uma micose emergente (MARTINEZ, 2017). O estado de Rondônia tem demonstrado uma potencial zona endêmica para PCM, apresentando 9,4 casos por 100.000 hab. (MARTINEZ, 2015)

No estado do Acre, somente três estudos fazem relato de infecção por *Paracoccidioides* spp, dois deles utilizaram a leitura da reação de intradermorreação à paracoccidioidina como inquérito epidemiológico, apresentaram índices de positividade a PCM de (34,1%) e (41,5%) respectivamente (FIGUEIREIDO, 2005.; FIGUEIREIDO

2011). Realizando a análise de 17 amostras de escarro de pacientes suspeitos de tuberculose pulmonar, Perreira (2009) relata a presença de um caso positivo por métodos clássicos e que por meio de sequenciamento, demonstrou 93% de identidade com *Paracoccidioides brasiliensis*.

O diagnóstico laboratorial de rotina de PCM é feito por métodos clássicos, com observação direta do material clínico e cultivo micológico (SANTOS et al., 2018). Na sorologia, o emprego de antígenos e anticorpos é amplamente útil e dão suporte ao diagnóstico, com o uso da imunodifusão dupla, apresentando elevada sensibilidade e especificidade (WANKER, AIDÊ, 2009).

Além disto, métodos moleculares também são utilizados, como a técnica de reação em cadeia da polimerase - PCR (SAN-BLAS, NIÑO-VEGA, 2008; GOLDANI, WIRTH, 2017), porém, ainda não é disponível na rotina de diagnóstico de PCM (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

As técnicas moleculares são estabelecidas como metodologias sensíveis e específicos no diagnóstico de diversas doenças infecciosas, obtendo a vantagem da liberação de resultados rápidos (BABADY et al., 2011).

Apesar da gravidade a nível de saúde pública, PCM continua no grupo de doenças negligenciadas e sem exigência para notificação compulsória, com isso, não há dados precisos de incidência ou prevalência e que devido os poucos estudos no estado do Acre, este trabalho teve por objetivo verificar a presença de *Paracoccidioides* sp. em amostras de escarro de pacientes sintomáticos respiratórios do município de Rio Branco – Acre, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR).

Material e Métodos

Coleta das amostras e dados epidemiológicos

Esta pesquisa foi desenvolvida nas Unidades de Referência de Atenção Primária (URAP), Cláudia Vitorino, Augusto Hidalgo de Lima, Ary Rodrigues, Centro de Saúde Barral y Barral e Hospital das Clínicas do Acre – FUNDACRE, do município de Rio Branco/AC, no período de 2018-2019. Foram coletadas amostras de escarro de pacientes sintomáticos respiratórios atendidos em uma destas unidades de saúde e dados epidemiológicos com Questionário (APÊNDICE I) onde foram obtidas informações como: idade, sexo, moradia, ocupação anterior e atual, grau de instrução, uso de fumo e bebida, sintomatologia e doenças anteriores.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas do Acre –HCA/FUNDHACRE, com número do parecer 2.987.220 (ANEXO I).

Processamento das amostras

As amostras foram processadas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Acre, seguindo as recomendações de biossegurança (BORDA et al., 2009). O escarro foi transferido para tubo falcon de 15 mL e adicionado 1 mL do fluidificante n-acetil cisteína 1% e 4 mL de citrato de sódio, sendo homogeneizado e centrifugado por 15 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento acondicionado em criotubo e armazenado em freezer a -80 °C (LIMA et al., 2007).

Extração de DNA do escarro

As extrações de DNA das amostras de escarro foram realizadas utilizando o Kit *DNeasy UltraClean Microbial Kit* (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. Após este processo, as amostras F305, F201, HL302, AR202, BB03 foram quantificadas no equipamento Quibit 4 Fluorometer (Invitrogen).

Os produtos da extração foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1 % corados com Syber Safe (Invitrogen) (tampão TBE 1x sob 100 volts por 1 hora) para verificar a integridade do DNA e o resultado foi fotodocumentado utilizando-se um equipamento Quantum ST4 (THEODORO et al., 2005).

Amplificação de DNA fúngico

Os *primers* utilizados para a detecção de *Paracoccidioides* sp. estão descritos na Tabela 1. A *nested*-PCR ocorreu com a utilização de *primers* externos ITS 5 e ITS 4 e posterior ciclagem com *primers* internos PbitSE e PbitSR.

Cada 25 µL da solução de reação para PCR consistia de 1,25 U/µL de Taq DNA polimerase (Ludwig Biotecnologia), 1X de solução tampão, 1,5 mM de Mg²⁺, 0,2 µM de dNTPs (Qiagen), 0,4 mM de cada *primer* (Exxtend), 1,25 µg /µl de BSA e foi utilizado em torno de 20 a 60 ng de DNA .

Tabela 1. *Primers* utilizados para realização de PCR e *nested*-PCR para detectar a presença de *Paracoccidioides* sp. em amostras de escarro de pacientes sintomáticos respiratórios.

Gene	Espécie/Região	Sequência	Pares de bases	Referências
ITS 5	Região Universal para fungos	5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3'	560 pb	White et al. (1990)
ITS 4		5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'		
PbitSE	Região conservada para <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	5' GAGCTTTGACGTCTGAGACC 3'	387 pb	Theodoro et al. (2005)
PbitSR		5' AAGGGTGTGATCGAGAGAG 3'		

As ampliações foram realizadas em termociclador (Bio-Rad) nas seguintes ciclagens. Para as reações utilizando os *primers* ITS5 e ITS4 foram: desnaturação inicial de 94 °C por 5 minutos, seguida por 40 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 2 minutos, 72 °C por 2 minutos e uma extensão final de 72 °C por 2 minutos (Figura 1).

Para os *primers* PbitSE e PbitSR as condições foram semelhantes, exceto para extensão final de 72 °C por 5 minutos (Figura 2).

Todos os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% corados com Syber Safe (Invitrogen) (tampão TBE 1x sob 100 volts por 1 h) para verificar a amplificação da sequência alvo e fotodocumentadas (Quantum ST4) (THEODORO et al.,2005).

Sequenciamento

Os *amplicons* da amostra F305 deste estudo foram purificadas com o Kit EasyPure PCR Purification (Transgen) e encaminhadas para o laboratório LacTAD – Laboratório Central de Tecnologia de Alto Desempenho em Ciências da Vida da UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas, para sequenciamento. A amostra foi submetida ao sequenciamento por eletroforese capilar-Sanger, na plataforma 3730XL (Applied Biosystems). Posteriormente, foi realizado o alinhamento das sequências com o algoritmo ClustalW (THOPSON et al., 1994) e obtenção da sequência consensus no software BioEdit (HALL, 1999), e depositada na plataforma GenBank com número de acesso MT367708.

Análise filogenética

A sequência (MT367708) de rDNA obtidas no sequenciamento foram comparadas com várias outras sequências disponíveis no GenBank de rDNA de *Paracoccidioides* spp. provenientes de ser humano, no qual também utilizaram a região ITS para

sequenciamento. Posteriormente, foi realizado o alinhamento das sequências com o algoritmo ClustalW (THOPSON et al., 1994). A árvore filogenética foi construída conforme *neighbor-joining* (NJ) (SAITOU, NEI, 1987). O *software* Mega 7.0 foi utilizado para realizar o alinhamento das sequências e construção da árvore filogenética.

As seguintes espécies foram incluídas no alinhamento e construção da árvore filogenética.

Tabela 2: Espécie, número de acesso de GenBank e Estado e/ou País das sequências utilizadas para construção de árvore filogenética.

Espécie	Número de acesso GenBank	Estado e/ou País
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	(MT367708)	Rio Branco, Ac, Brasil.
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	(MN519724)	Brasil
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	(MH860706)	Colômbia
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	(KT155885)	Colômbia
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	(KX709842)	Brasil
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	(KX774411)	Brasil
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	(KX774410)	Brasil
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	(KJ540974)	Caracas, Venezuela.

<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	(KJ540973)	São Paulo, Brasil.
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	(KJ540971)	Antioquia, Colômbia
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	(AB304414)	Brasil
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	(AY374339)	Peru
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	(AB304415)	Brasil
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	(AY374338)	Colômbia
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	(AF322389)	Brasil
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	(AF038360)	Canadá
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	(AY445662)	Áustria
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	(AB038165)	Argentina
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	(AB038164)	Argentina
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	(KJ540978)	Goiás, Brasil
<i>Paracoccidioides</i>	(AB304436)	São José, Costa Rica.

<i>brasiliensis</i>		
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	(AY374337)	Brasil
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	(AB304434)	São José, Costa Rica.
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	(AY374336),	Brasil
<i>Paracoccidioides lutzii</i>	(NR_155022)	Goiás, Brasil.
<i>Paracoccidioides lutzii</i>	(KJ540979)	Goiás, Brasil.
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	(AF092903)	Brasil.
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	(KJ540977)	Goiás, Brasil.
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	(AB304443)	Londrina, Paraná, Brasil.
<i>Cryptococcus albidus</i>	(JQ070095)	Não relatado.
<i>Cryptococcus gattii</i>	(NR_165941)	China.

Sensibilidade e especificidade

A sensibilidade foi calculada pela razão dos casos positivos de PCM (A), dividido pelo valor dos verdadeiramente positivos para PCM (A), somado aos resultados falso negativo da técnica de *nested*-PCR (C), multiplicado por 100 (SOARES et al., 2002), utilizando a seguinte fórmula $A/(A+C) \times 100$.

A especificidade foi calculada conforme os pacientes verdadeiramente negativos, sem PCM (D), divididos por falso positivos (B) que é somado a falso negativos (B),

multiplicados por 100 (SOARES et al., 2002), utilizando a seguinte fórmula $D/(B+D) \times 100$.

Resultados

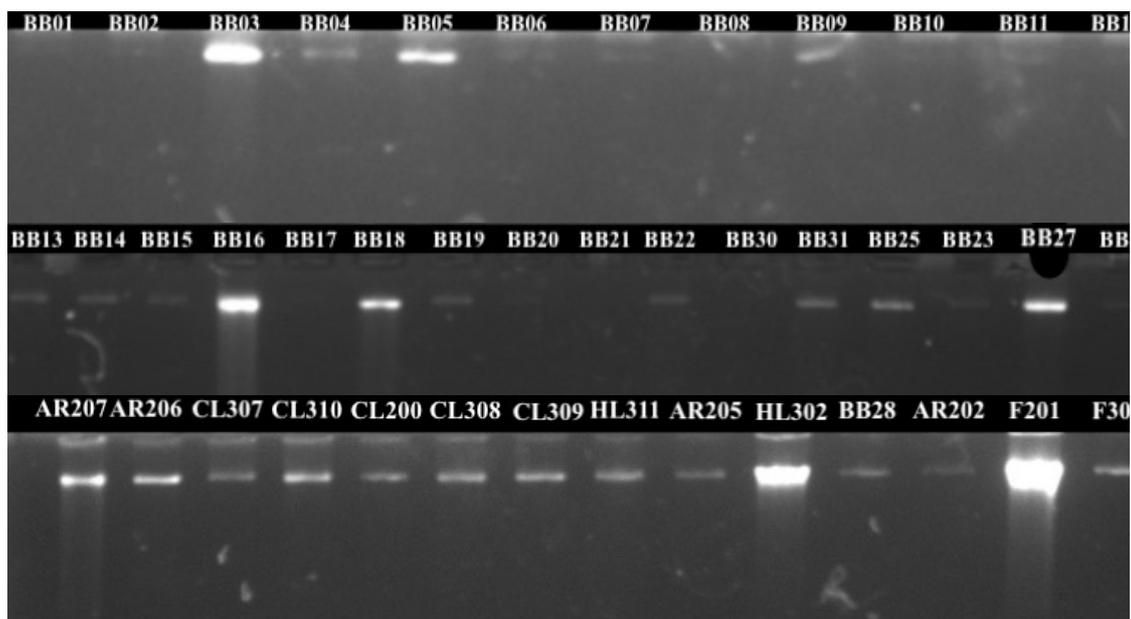
Coleta das amostras

Foram obtidos um total de 59 amostras de escarros de pacientes sintomático respiratório atendidos nas Unidades Básicas de Saúde no município de Rio Branco-Acre. A unidade Barral y Barral apresentou o maior número de amostras (34), seguida por Ary Rodrigues (9), Claudia Vitorino (7), Augusto Hidalgo de Lima (6) e Fundação Hospitalar do Acre (3).

Extração de DNA do escarro

Após a eletroforese em gel de agarose a 1% corado com Syber Safe (Invitrogen) e fotodocumentadas (Quantum ST4) das 59 amostras de escarro, somente foi possível verificar a presença da integridade de DNA em 46 (78%) amostras (Figura 3).

As amostras de DNA quantificadas tiveram os seguintes resultados: F305 - 11,1 ng/ μ L, F201 - 394 ng/ μ L, HL301 - 214 ng/ μ L, AR202 - 6,52 ng/ μ L e BB03 57,6 ng/ μ L.



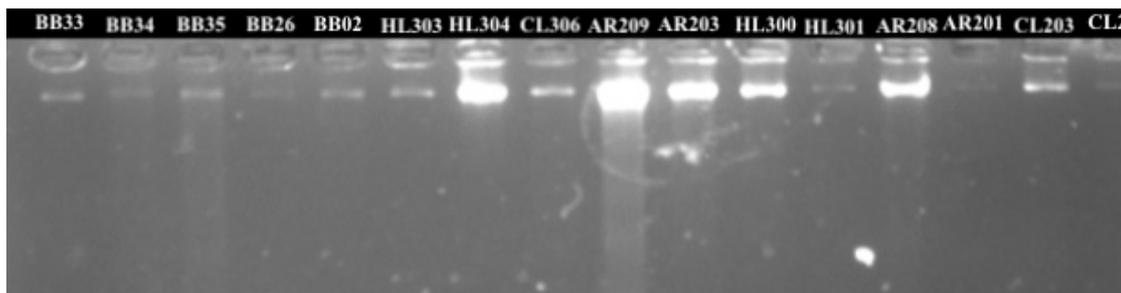
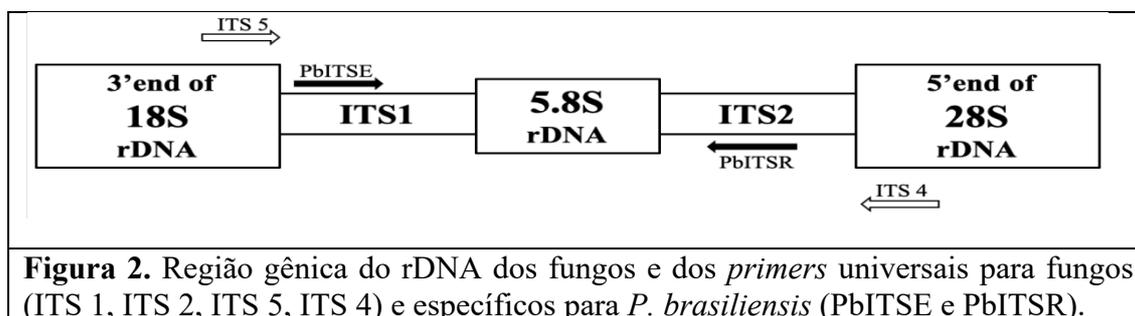


Figura 1. Resultado da eletroforese em gel de agarose (2%) de extração de DNA de amostras de escarro de pacientes sintomáticos respiratórios do município de Rio Branco-Acre utilizando o Kit comercial *DNeasy UltraClean Microbial Kit* (Qiagen). A presença banda indica o fragmento da região do DNA: BB03, BB04, BB05, BB06, BB07, BB13, BB14, BB15, BB16, BB18, BB19, BB22, BB31, BB25, BB23, BB27, BB24, AR207, AR206, CL310, CL200, CL308, CL309, HL311, AR205, HL302, BB28, AR202, F201, F305, BB33, BB34, BB35, BB26, BB02, HL303, HL304, CL306, AR209, AR203, HL300, HL301, AR208, AR201, CL203 e CL 204.

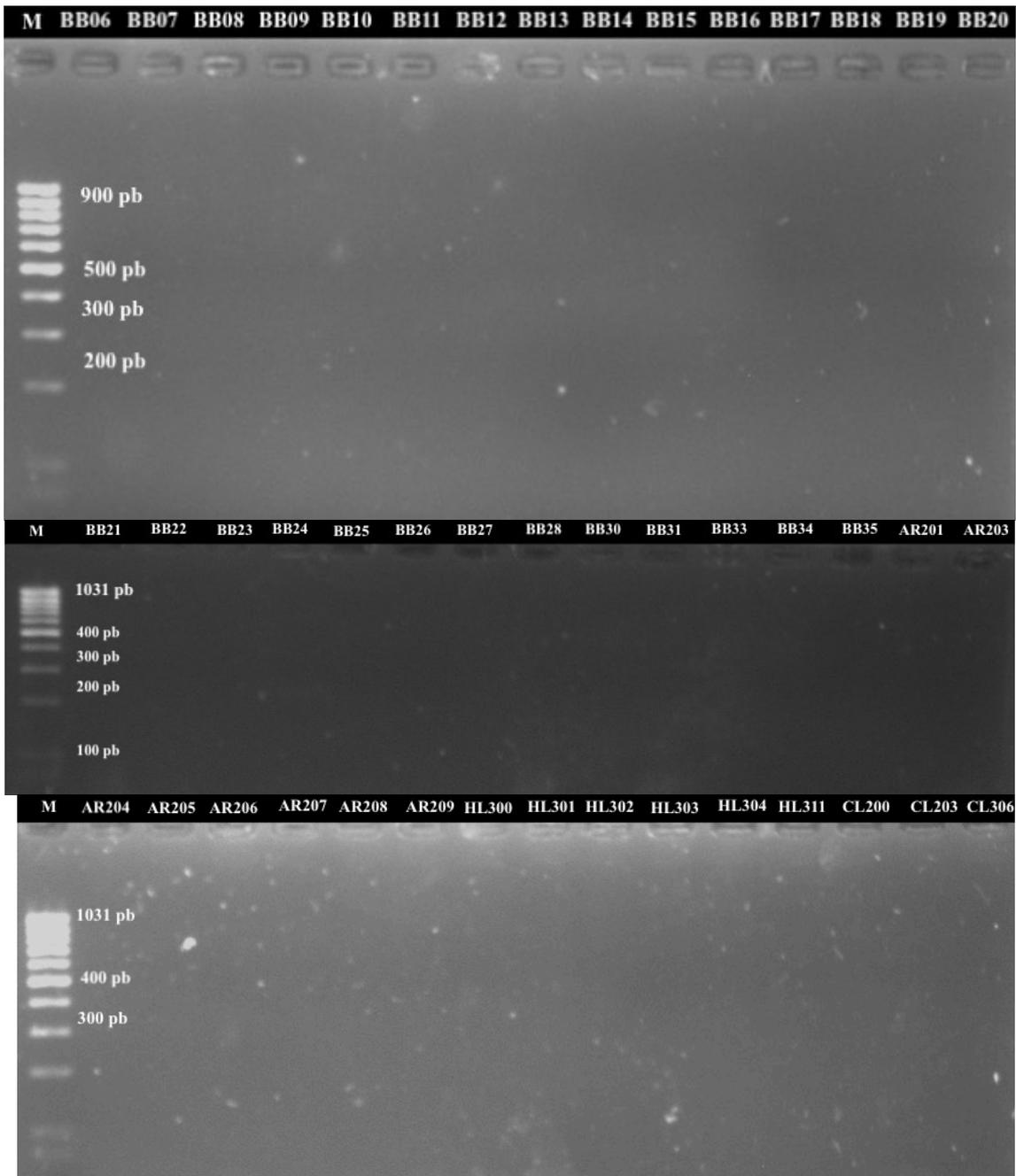
Amplificação de DNA via PCR e dados epidemiológicos

Todas as 59 amostras de escarro extraídas foram submetidas a ampliações com os *primers* ITS 5 e ITS 4, seguidos de nested-PCR com *primers* PbITSE e PbITSR (Figura 3)



Para testar a especificidade da nested-PCR com os *primers* PbITSE e PbITSR, foram utilizados DNA puro de *Candida albicans* e *Cryptococcus* sp. como controle negativo e DNA de *Paracoccidioides brasiliensis* como controle positivo.

Das 59 amostras de escarro, somente a amostra F305 (1,69%) houve amplificação na nested-PCR, com fragmento de 387 pb. As amostras de *Candida albicans* e *Cryptococcus* sp. não amplificaram, e o controle positivo de *Paracoccidioides brasiliensis* amplificou com produto de 387 pb (Figura 5).



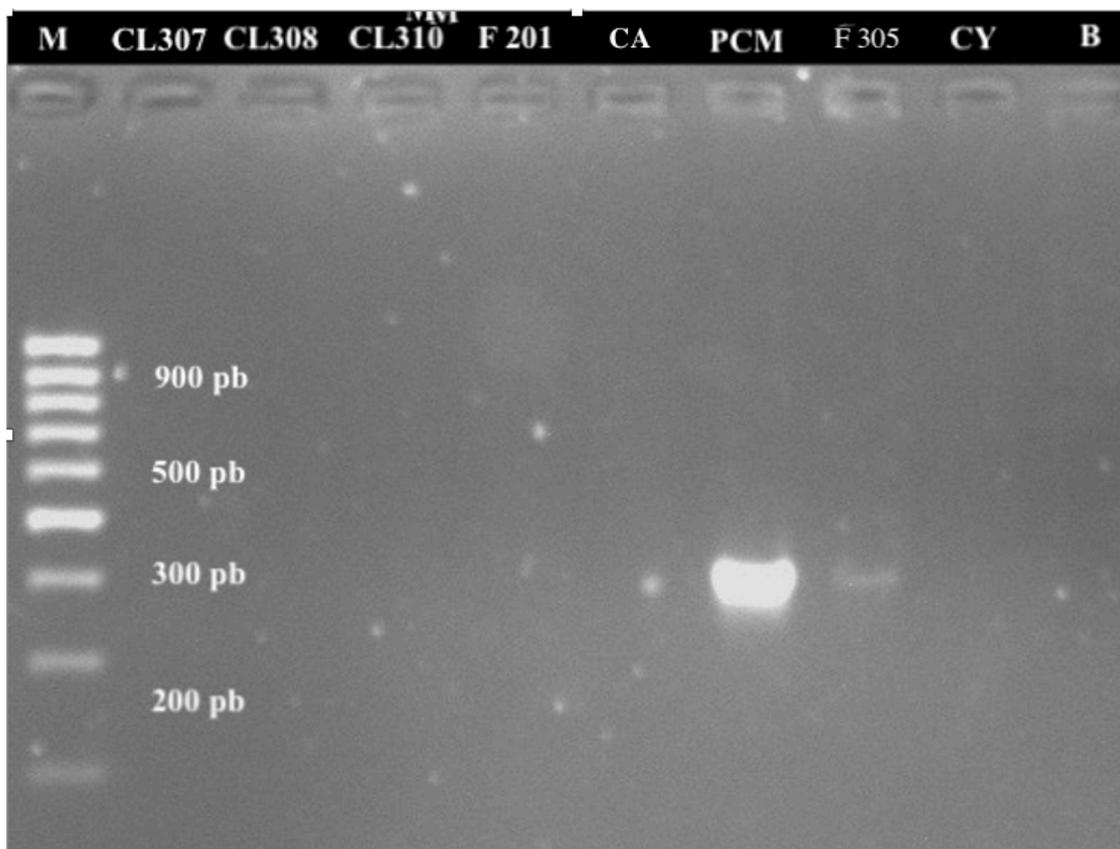
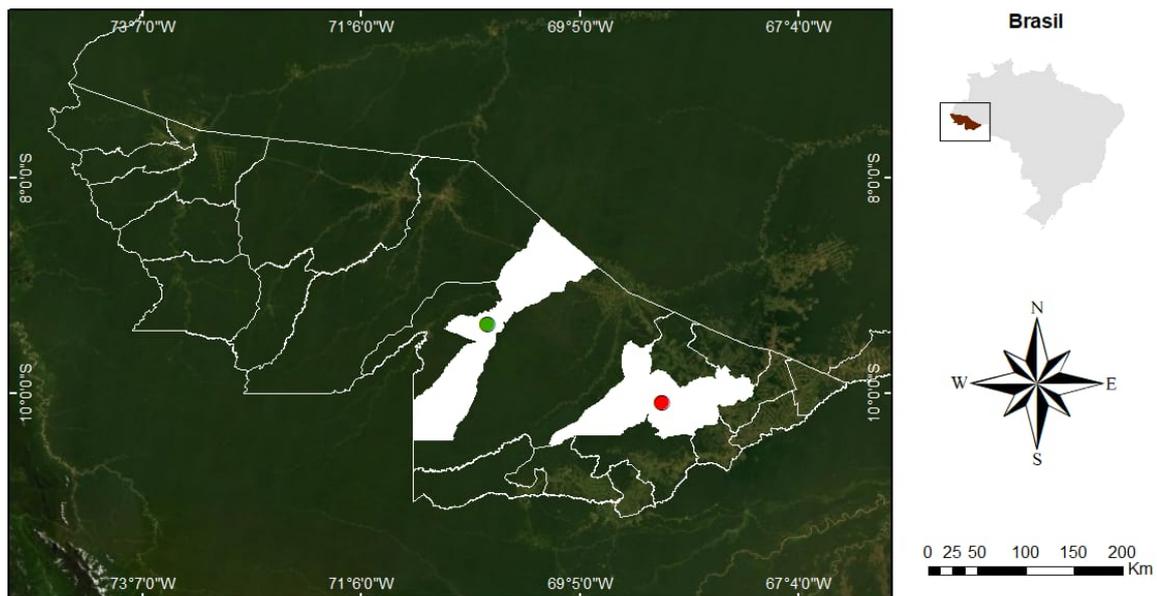


Figura 3. Amplificação de nested-PCR com *primers* PbITSE e PbITSR de DNA extraído das amostras de escarro e culturas puras de fungos. M. marcador de peso molecular 80-1031pb (Mass Ruler DNA Ladders); BB 06, BB 07, BB 08, BB09, BB10, BB 11, BB12, BB 13, BB14, BB15, BB 16, BB17, BB18, BB19, BB20, BB21, BB 22, BB 23, BB 24, BB 25, BB 26, BB 27, BB 28, BB 30, BB 31, BB, 33, BB 34, BB 35, AR 201, AR 203, AR 204, AR 205, AR 206, AR 207, AR 208, AR 209, HL 302, HL 303, HL 304, HL 311, CL 200, CL 203, CL 306, CL 307, CL 308, CL 309, CL 310, F 201, (CA) *Candida albicans*; (PCM) *Paracoccidioides brasiliensis* (controle positivo), (F 305) amostras de escarro de paciente; (CY) DNA do fungo *Cryptococcus* sp.; (B) controle negativo.

Em relação a dados clínicos e sociodemográficos (Tabela 3), o paciente positivo para *P. brasiliensis* é do sexo masculino, 40 anos de idade, nasceu em Manuel Urbano, interior do Acre e atualmente é residente no bairro São Francisco, em Rio Branco-Acre (Figura 6). Mora em área rural e trabalhou com jardinagem e agricultura até antes de seus 10 anos de idade. Durante sua vida realizou a prática de pesca, caça e acampamento. Apresentava queixa clínica de tosse produtiva e ferida na boca.



Localização Geográfica - Paciente F305

- Manoel Urbano, Moradia Anterior
- Rio Branco, Moradia Atual

Sistema de Coordenadas Geográficas
 Datum: SIRGAS 2000. Fonte: IBGE
 Data de Produção: 15/04/2020
 Elaboração: PRADO, L. S.

Figura 4. Representação geográfica da moradia anterior e atual do paciente positivo para *P. brasiliensis* por PCR.

Tabela 3. Variáveis do questionário aplicado ao paciente positivo para *P. brasiliensis*.

Cód. do Paciente	F305
Idade	40 anos
Sexo	Masculino
Município de nascimento	Manuel Urbano – AC
Municípios em que já morou	Manuel Urbano/AC e Rio Branco/AC
Bairro onde atualmente mora	São Francisco
Qual de instrução	Não lê nem escreve
Renda mensal	Nenhuma renda
Fumante	Não
Uso de bebida alcoólica	Não
Já trabalhou em área rural	Sim
Já trabalhou na agricultura	Sim
Em qual fase da vida trabalhou na agricultura	Antes dos 10 anos de idade
Profissão atual	Ajudante de fazenda
Já trabalhou em jardinagem	Sim
Sua casa possui jardim arborizado	Não

Já realizou caça, pesca e acampamento	Sim
Presença de tosse e catarro	Sim
Febre e perda de peso	Não
Ferida na boca ou lábio	Sim
Ferida no nariz ou em outra parte do corpo	Não
Já teve verminose	Sim
Já teve câncer, tuberculose e leishmaniose	Não
Possui HIV/AIDS?	Não

Análise filogenética

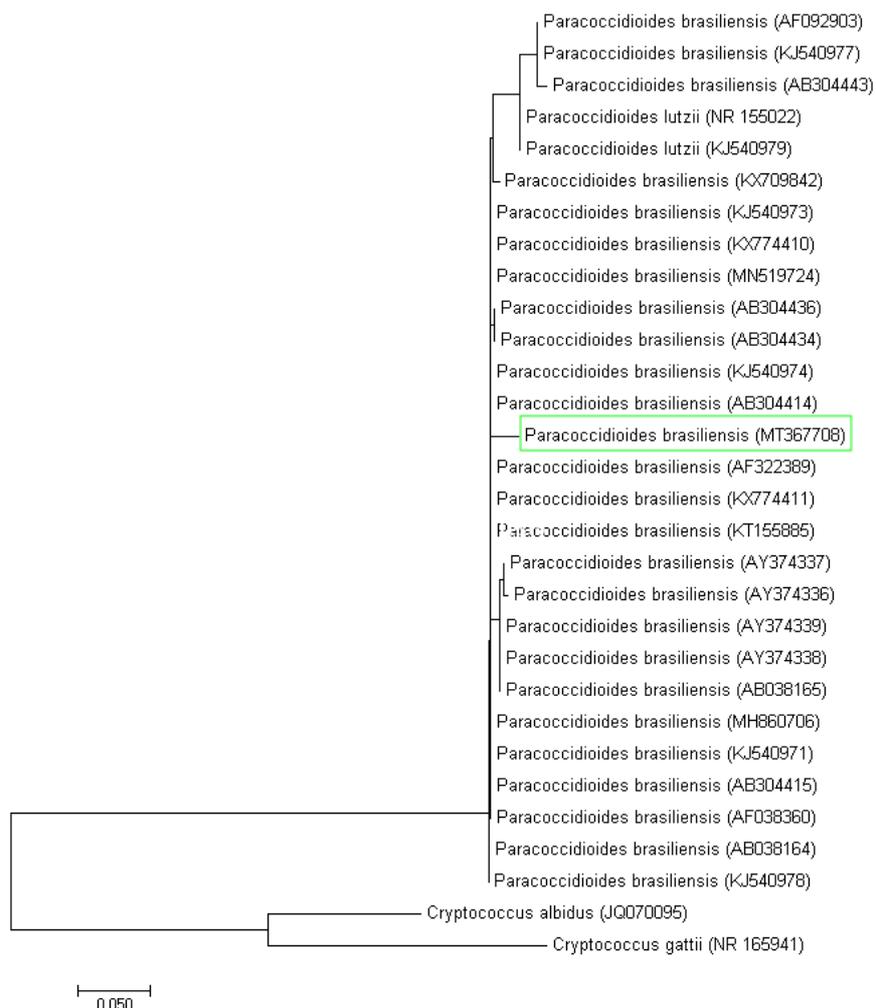


Figura 5. Árvore filogenética construída a partir de sequências da região ITS do rDNA de *Paracoccidioides brasiliensis*. *Cryptococcus albicus* e *C. gattii* foram utilizados como grupos externos. Valores de *Bootstrap* foram de 3000 repetições. A barra indica o número de etapas evolutivas com sequências divergentes. O isolado F305 está destacado em verde.

Sensibilidade e especificidade

Foi verificado que a técnica de nested-PCR apresentou baixa sensibilidade (54,5%), entretanto, elevada sensibilidade (100%).

Discussão

Das 59 amostras de escarro obtidas, 13 (22,03%) não tiveram extração de DNA bem-sucedido utilizando o kit de extração, possivelmente pela escassez de material biológico, possuir pouco ou nenhum DNA fúngico, ou até mesmo a ausência de células humana, além de que a qualidade e quantidade de DNA extraído podem ser afetadas pela coleta do material, seu manuseio, transporte, armazenamento e método de extração (MELO et al., 2010).

A extração do DNA antecede à amplificação e possui extrema importância para se obter alta eficiência na amplificação durante a PCR, pois o DNA deve apresentar boa qualidade, ser íntegro e com baixo nível de contaminantes, além da quantidade suficiente para ser utilizado nos processos seguintes, assim, se tem optado por realizar as extrações de DNA com protocolos pré-estabelecidos dos Kits comerciais, em especial nas amostras de escarro, que apresentam diversos inibidores da polimerase (SUFFYS et al., 2001.; MELO et al., 2010.; BRANCHER et al., 2018).

Atualmente, há diversas variações para reação de PCR, uma vez que cada uma responde melhor conforme a amostra clínica utilizada (WHITE et al., 2009). Entretanto, para testes direto nas amostras clínicas para PCM, acredita-se que a técnica de nested-PCR seja a mais indicado, pois aumentam a sensibilidade do método (KLUTTS, ROBINSON-DUNN, 2011).

Todavia, das 59 amostras de escarro de pacientes sintomático respiratório, somente a amostra F305 e controle positivo para *P. brasiliensis* apresentaram positividade na nested-PCR, demonstrando possuir baixa sensibilidade (55,4%). Entretanto, não houveram ampliações de amostras negativas e nem dos fungos *Candida albicans* e *Cryptococcus* sp. testados, apresentando com isso, boa especificidade (100%).

Das 59 amostras, 6 (10,17 %) amostras foram positivas por outros métodos de diagnóstico para PCM: 4 (66,7%) amostras pelo método padrão ouro e 2 (33,3%) por imunodifusão dupla (dados não publicados). Entretanto, somente 1 (16,7 %) dessas amostras foi possível obter positividade pelo método da nested-PCR, possivelmente por ser a amostra que apresentavam um maior número de células de *Paracoccidioides* sp. na microscopia, o que aumenta a possibilidade de extração de DNA fúngico bem-sucedido.

A baixa sensibilidade da nested-PCR pode ser atribuído a falha na extração de DNA fúngico, devido a poucas células ou ausência nas amostras, além da falta de purificação de DNA das amostras, o que possibilita que os inibidores de PCR possam atuar (SUFFYS et al., 2001) e que segundo Massi (2016), a padronização da extração de DNA em amostras de escarro possibilita a obtenção de DNA purificado, livre de interferentes para a PCR.

Assim, por mais que o resultado de testes moleculares sejam conhecidos por altasensibilidade, (MELO et al., 2010).

Trabalho publicado por Massi et al. (2016) utilizando a técnica de nested-PCR em amostra de escarro para pesquisa de PCM apresentou melhor sensibilidade no diagnóstico, pois das 49 amostras de escarro, 13 (26,5%) apresentaram positividade, com isso, recomendasse a implementação simultânea de outros *primers* durante a nested-PCR, como os *primers* interno PbitSE e PbitST para pesquisa de *P. lutzii* (HRYCYK, 2018),

uso de *primers* para demais regiões de *Paracoccidioides* spp. como gp43 (GOMES et al., 2000), HSP70 (TEIXEIRA et al., 2013) para ampliações diretas.

Entretanto, por mais que a PCR convencional apresente um ótimo custo-benefício, a qPCR traria possivelmente melhores resultados (MASSI et al., 2016). Pois utilizando está técnica com *primers* para região Pb27 em amostras clínicas, Rocha-Silva et al. (2018) obteve 94% de sensibilidade e 100% de especificidade.

Foram obtidas duas ampliações na nested-PCR, a amostra F305 e controle positivo para PCM, apresentando ambos fragmentos de 387 pb, além de não amplificar os demais fungos testados. A metodologia adotada nesta pesquisa é similar aos dados obtidos por Theodoro et al., (2005), no qual realizando pesquisa de *P. brasiliensis* em amostras de solo com a utilização dos *primers* PbITSE e PbITSR, que são derivadas de regiões conservadas para pesquisa deste fungo, obtiveram ampliações com fragmento de 387 pb para DNA de *P. brasiliensis* e negativas para demais fungos.

O sequenciamento e pareamento com dados disponíveis no GenBank relata que a amostra F 305 possui 97% de similaridade com *Paracoccidioides brasiliensis*, além de ser geneticamente similar a sequências de *P. brasiliensis* do Brasil, Colômbia e Venezuela. Além do mais, é diferente geneticamente dos demais fungos, como *Cryptococcus albidus* e *Cryptococcus gatti*. Com isto, é notório observar que está metodologia apresenta boa especificidade e com ajustes, pode ser utilizada para pesquisa de *Paracoccidioides* spp.

O Estado do Acre é uma das 27 unidades federativas do Brasil, com população estimada em pelo IBGE (2019) de 881.935 pessoas, no qual, 201.280 mil pessoas são provenientes da zona rural (2010) e sua economia é baseada na exploração de recursos naturais e no setor primário. Rio Branco é capital do estado, com maior número de habitante (336.038), diferente de Manuel Urbano, que é o 19º em número de habitantes

(7.981) (IBGE, 2019). Todos os 6 pacientes positivos para *Paracoccidioides* sp. relataram já terem morado no interior do Acre, sendo 2 em Sena Madureira, 1 em Cruzeiro do Sul, 1 Manuel Urbano e 2 Xapuri (dados não publicados).

O paciente positivo na nested-PCR é do sexo masculino, acima de 39 anos de idade, baixa renda, morou na zona rural, trabalhou como agricultor e jardinagem, além de realizar as práticas de pesca, caça e acampamento. Com isso, esse paciente cria um perfil ideal para que possa ocorrer o contato com as partículas fúngicas de *Paracoccidioides* spp. e causar a infecção, dados estes são condizentes com o que está disponível na literatura, pois PCM afeta principalmente o sexo masculino, acima de 30 anos e aqueles que possuem atividade ligada à agricultura, além da prática de caça e pesca, e com queixas clínicas de tosse, presença de catarro e lesão na boca, sendo essas características comuns na PCM (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017.; MACEDO et al., 2019.; SANTOS et al., 2019).

Alguns autores relataram que uso de cigarro e bebida alcoólica possam contribuir para a infecção por *P. brasiliensis* (RODRIGUES et al., 2010). No entanto, o paciente relatou que nunca fumou e fez uso de bebida alcoólica, contrariando o que está disponível na literatura (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

Conclusão

Somente um paciente foi diagnosticado com PCM utilizando a metodologia de nested-PCR, demonstrando baixa sensibilidade, entretanto, com elevada especificidade, pois não houve resultados falso-positivo e nem amplificação de demais fungos testados.

Por mais que apresente baixa sensibilidade, o uso dos *primers* externo ITS 5 e ITS4 e *primers* interno PbITSE e PbITSR pode ser empregue para pesquisa de *P. brasiliensis*, pois na análise de sequenciamento apresentou 97% de similaridade para *P. brasiliensis*.

O paciente em questão faz parte do grupo de risco relatado pela literatura, pois é do sexo masculino, acima de 30 anos, morado de zona rural, e relatar a prática de agricultura.

Recomenda-se em novos estudos a utilização de Kit de extração específicos para amostra de escarro, purificação desse DNA via Kit para retirada de inibidores de PCR, além da utilização de outros *primers* para pesquisa de demais espécies e outros genes do fungo, no intuito de aumentar a sensibilidade do método para diagnóstico de PCM. A utilização de PCR em tempo real possibilitar a pesquisa quantitativa, a possibilidade de utilizar fragmentos menores e com isso, a melhor especificidade, além da utilização de sonda para regiões específicas de DNA, melhorando assim, a sensibilidade no diagnóstico de PCM.

Referências

BADADY, N. E., BUCKWALTER, S. P., HALL, L., FEBRE, K. M. L., BINNICKER, M. J., WENGENACK, N. L. Detection of *Blastomyces dermatitidis* and *Histoplasma capsulatum* from culture isolates and clinical specimens by use of Real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v, 49, n. 9, p. 3204-3208, 2011.

BIALEK, R., IBRICEVIC, A., FOTHERGILL, A., BEGEROW. Smal subunit ribosomal DNA sequence shows *Paracoccidioides brasiliensis* closely related to *Blastomyces dermatitidis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 9, p. 3190-3193, 2000.

BRANCHER, T. L., HAWERROTH, M. C. KVITSCHAL, M. V., MANENTI, D. C. Eficiência de diferentes protocolos de extração de DNA em macieira. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 17, n. 3, p. 361-367, 2018.

BORBA, C. M., COSTA, M. A. F, PEREIRA, M. E. C., CARVALHO, P. R., VALLE, S. Biossegurança e boas práticas laboratoriais. **Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio**, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde, Guia de orientações para coleta de escarro. Acesso em 12/09/2019. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_controle_tuberculose.pdf 2014.

FERREIRA, I. R. S. **Ocorrência de *Paracoccidioides* spp. no município de Rio Branco – Acre**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2019.

FIGUEIREDO, M. B. **Inquérito com paracoccidioidina e Histoplasmina em Distrito Docente-assistencial do Tucumã**. 2005. Dissertação (Mestrado em Medicina e Saúde) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2005.

FIGUEIREDO, M. B. **Inquérito com paracoccidioidina em cinco cidades do Estado do Acre**. . Tese (Doutorado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.

FERREIRA, C. S.; RIBEIRO, E.M.C.; GOES, A.M.; SILVA, B.M. Current strategies for diagnosis of paracoccidioidomycosis and prospects of methods based on gold nanoparticles. **Future Microbiology**, v. 11, n. 7, p. 87-94, 2016.

GOLDANI, L. Z.; WIRTH, F. Animal Models and Antifungal Agents in Paracoccidioidomycosis: An Overview. **Mycopathologia**, v. 182, n. 7-8, p. 633-643, 2017.

GOMES, G. M.; CISALPINO, P. S.; TABORDA, C. P.; CAMARGO, Z. P. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n. 9, p. 3478-3480, 2000.

HAHN, R. C., RODRIGUES, A. M., TERRA, P. P. D., NERY, A. F., HOFFMANN-SANTOS, H. D., GÓIS, H. M., FONTES, C. J. F. F., CAMARGO, Z. P. Clinical and epidemiological features of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii*. **Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 6, p. e0007437, 2019.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, n. 41, p. 1979-2000, 1999.

IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo demográfico**: resultados: resultados preliminares, 2019.

KLUTTS, J. S.; ROBINSON-DUNN, B. A Critical appraisal of the role of the clinical microbiology laboratory in diagnosis of invasive fungal infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 9, p. S39-S42, 2011.

LIMA, K. V. B.; LOPES, M. L.; LOUREIRO, E. C. B.; COSTA, M. M.; CARDOSO, N. C.; LIMA, G. L. F.; SOUSA, M. S. *Nested-PCR* do gene que codifica o antígeno b aplicada ao diagnóstico da tuberculose pulmonar. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 212-215, 2007.

MASSI, Lisandra Silvani. Diagnóstico molecular de paracoccidiodomicose associada à tuberculose em amostras de escarro. Dissertação (Mestrado em Ciência Pneumológicas) –Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 2016.

MACEDO, P. M.; TEIXEIRA, M. M.; BARKER, B. M.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. ALMEIRA-PAES, R.; VALLE, A. C. F. Clinical features and genetic background of the sympatric species *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides Americana*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 4, p. e007309, 2019.

MARTINEZ, R. Epidemiology of paracoccidiodomycosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 57, n. 19, p. 11-20, 2015.

MARTINEZ, R. New trends in paracoccidiodomycosis epidemiology. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p.1, 2017.

MELO, M. R., MARTINS, A. R., BARBOSA, I. V., ROMANO, P., SHCOLNIK, W. Collection, transport and storage of samples for molecular diagnosis. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 5, p. 375-381, 2010.

OLIVEIRA, A. R.; OLIVEIRA, L. N.; CHAVES, E. G. A.; WEBER, S. S.; BAILÃO, A. M.; PARENTE-ROCHA, J. A.; BAEZA, L. C.; SOARES, C. M. A.; BORGES, C. L. Characterization of extracellular proteins in members of the *Paracoccidioides* complex. **Fungal Biology**, v.122, n. 8, p. 738-751, 2018.

PEREIRA, Virgínia Bodelão Richini. Ecologia molecular de fungos patogênicos onygenales em animais silvestres do interior do estado de São Paulo. Tese (Doutorado em Biologia Geral e Aplicada) –Instituto de Biociência, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP. 2019.

RODRIGUES, G. S., SEVERO, C. B., OLIVEIRA, F. M. O., MOREIRA, J. S., PROLLA, J. C., SEVERO, L. C. Associação entre paracoccidiodomicose e câncer. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 36, n. 3, p. 356-362, 2010.

ROCHA-SILVA, F., GUIMARÃES, C. F., JÚNIOR, E. R. O., FIGUEIREDO, S. M., CALIGIORNE, R. B. Disseminated paracoccidioidomycose prediagnosed as neoplasm: an important challenge in diagnosis using RT-PCR. **Medical Mycology Case Reports**, v. 19, p.1-5, 2018.

SAITOU, N., NEI, N. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEJA, G. Paracoccidioides brasiliensis: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. **Mycopathologia**, v. 165, n. p. 183-195, 2008.

SANTOS, L. A.; GRISOLIA, J. C.; OLIVEIRA, A. M. Paracoccidioidomycose: Os desafios do diagnóstico e tratamento. **Revista da Universidade do Vale do Rio Verde**, v. 17, n. 1, p. 1-10, 2019.

SANTOS, L. C., CARVALHO, C. M., PETERS, L. P. Aplicação das técnicas de diagnóstico da Paracoccidioidomycose no Brasil: Revisão Sistemática. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 6, n. 2, p. 762-775, 2019.

SESTARI, S. J.; BRITO, W. A.; NEVES, B. J.; SOARES, C. M. A.; SALEM-IZACC, S. M. Inhibition of protein kinase A affects Paracoccidioides lutzii dimorphism. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, n. 1, p. 1214-1220, 2018.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; MENDES, R.P.; COLOMBO, A.L.; QUEIROZ-TELLES, F. KONO, A.S.G.; PANIAGO, A.M.M.; NATHAN, A.; VALLE, A.C.F.; BAGAGLI, E.; BENARD, G.; FERREIRA, M.S.; TEIXEIRA, M.M.; SILVA-VERGARA, M.L.; PEREIRA, R.M.; CAVALCANTE, R.S.; HAHN, R.; DURLACHER, R.F.; KHOURY, Z.; CAMARGO, Z.P.; MONETTI, M.L.L.; MARTINEZ, R. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 715-740, 2017.

SOARES, J. L. M., PASQUALOTTO, A. C., ROSA, D. D., LEITE, V. R. S. Métodos diagnósticos: consulta rápida. 1ª edição. ARTMED, 2002.

SUFFYS, P., VANDERBORGHT, P. R., SANTOS, P. B., CORREA, A. P., BRAVIN, Y., KRITSKI, A. L. Inhibition of the Polymerase Chain reaction by sputum samples from tuberculosis patients after processing using a silica-guanidiniumthiocyanate DNA isolation procedure. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 8, p. 1137-1139, 2001.

TATAGIBA, L. S., PIVATTO, L. B., FACCINI-MARTÍNEZ, Á. A., PEÇANHA, P.M., VELLOSO, T. R., GONCALVES, S. S., RODRIGUES, A. M., CAMARGO, Z. P., FALQUETO, A. A case of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii* presenting sarcoid-like form. **Medical Mycology Case Reports**, v.19, p. 6-8, 2018.

TEIXEIRA, M. M.; THEODORO, R. C.; OLIVEIRA, F. F. M.; MACHADO, G. C.; HAHN, R. C.; BAGAGLI, E.; SAN-BLAS, G.; FELIPE, M. S. S. *Paracoccidioides lutzii*

sp. nov.: biological and clinical implications. **Medical Mycology**, v. 52, n. 1, p.19-28, 2013.

TELES, F. R.; MARTINS, M. L. Laboratorial diagnosis of paracoccidioidomycosis and new insights for the future of fungal diagnosis. **Talanta**, v. 85, n. 5, p. 2254-2264, 2011.

THEODORO, R. C.; CANDEIAS, J. M. G.; ARAÚJO JR, J. P.; BOSCO, S. D. M. G.; MACORIS, S. A. D. G.; JUNIOR, L. O. P.; FRANCO, M.; BAGAGLI, E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. **Medical Mycology**, v. 43, n. 8, p. 725-729, 2005.

THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., GIBSON, T. J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choices. **Nucleic Acids Research**, v. 11, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TURISSINI, D. A.; GOMEZ, O. M.; TEIXEIRA, M. M.; MCEWEN, J. G.; MATUTE, D. R. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 106, p. 9-25, 2017.

WANKE, B.; AIDÊ, M. A. Capítulo 6 – Paracoccidioidomicose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, n.15, n. 12, p. 1245-1249, 2009.

WHITE, P. L. et al. Polymerase chain reaction diagnosis of fungal disease: finally coming of age. **Current Fungal Infection Reports**, v. 3, n. 4, p. 207-215, 2009.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, F. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Eds). *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press, p. 315–322, 1990.

4. CONCLUSÕES GERAIS

O levantamento bibliográfico revelou que o exame histológico, seguido de exame direto e PCR são os mais rotineiramente empregues para diagnóstico de PCM no Brasil. E que os estados de São Paulo e Rio de Janeiro apresentam os maiores relatos de PCM, além dos maiores índices de PCM serem no sexo masculino, entre 51-60 anos de idade.

A técnica de nested-PCR com os *primers* internos PbITSE e PbITSR demonstraram possuir baixa sensibilidade para diagnóstico de PCM a partir de amostra de escarro, entretanto, apresentou elevada especificidade.

O projeto de pesquisa “Estudo clínico, epidemiológico, sorológico e molecular da Paracoccidioidomicose Pulmonar em Rio Branco, Acre, Brasil” deve continuar, no intuito de realizar novas coletas, assim, colaborar para compreensão da distribuição e real conhecimento da endemicidade de PCM no Estado do Acre.

Apêndice I

Questionário Aplicado

Estudo clínico, epidemiológico, sorológico e molecular da Paracoccidiodomicose Pulmonar em Rio Branco, Acre, Brasil	
Número de registro:	
Data:	
VARIÁVEIS INVESTIGADAS	TABULAÇÃO SPSS
1. Variáveis ligadas ao entrevistado	
1.1 Idade (anos):	Idade
1.2 Sexo: <input type="checkbox"/> Masculino <input type="checkbox"/> Feminino	Sexo
1.3 Raça: <input type="checkbox"/> Branco <input type="checkbox"/> Negro <input type="checkbox"/> Pardo <input type="checkbox"/> Asiático <input type="checkbox"/> Índio <input type="checkbox"/> Outro <input type="checkbox"/> Desconhecido	Raça
1.4 Estado civil (0)Solteiro (1) Casado ou com companheiro fixo (2) Separado (3) Outros	Estcivil
1.5 Município de nascimento:	Natural
1.6 Estado de nascimento:	UF
1.7 Quais os municípios em que morou ?	Locmoram
1.8 Bairro onde mora atualmente:	Bairro
1.9 Grau de instrução (0)Não lê nem escreve (1) Não lê, mas escreve o nome (2) Fundamental incompleto; (3) Fundamental completo; (4) Médio incompleto; (5) Médio completo; (6) Superior incompleto; (7) Superior completo;	Instruc
2.0 Renda Mensal (0) Nenhuma renda; (1) ≤ 1 salário mínimo(SM); (2) 1 a 3 SM; (3) > 3 a 6 SM; (4) > 6 SM	r-mensal
3- Variáveis ligadas a infecção	
3.1- Fuma há quantos anos? (0)Não fuma	T-fumante
3.2- Há quanto tempo usa bebida alcoólica? (0)Não uso bebida alcoólica	U-alcool
3.3 - Qual a sua ocupação profissional atual?	Ocupação
3.4 - Você já morou em área rural: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Resrural
3.5 – Você já trabalhou na agricultura ? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Agricul

3.6 – Em qual fase da sua vida você trabalhou com agricultura? (0) Nunca trabalhou; (1) Antes dos 10 anos de idade; (2) Entre 10 e 20 anos de idade; (3) Entre 21 e 30 anos de idade; (4) A partir dos 31 anos de idade	Faseagri
3.7 – Você trabalha ou já trabalhou com jardinagem? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	t-jardin
3.8 – Na sua casa tem jardim ou quintal arborizado? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Jarboriz
3.9 – Pratica ou praticou alguma dessas atividades: OBSERVAÇÃO: É PERMITIDO MARCAR MAIS DE UMA OPÇÃO	
3.9.1- Pesca <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Pesca
3.9.2 - Caça: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Caça
3.9.3 - Acampamento: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Camping
3.10 – Faz uso de alguma medicação? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não 3.10.1 – Qual ?	Medicamento
4 – Sinais e sintomas atuais	
4.1 – Tosse <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
4.2 – Catarros <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
4.3 – Perda de peso? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
4.4 – Febre? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
4.5 – Ferida na boca ou no lábio? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
4.6 – Ferida no nariz? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
4.7 – Ferida em alguma parte do corpo? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
4.7.1 – Qual parte do corpo tem ferida?	
4.8 – Tem algum caroço pelo corpo? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
4.8.1 – Onde tem caroço pelo corpo? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
5- Doenças Passadas	
5.1 - Já teve verminose? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> desconhecido	Verminose
5.2 - Já teve tuberculose? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> desconhecido	TB
5.3 – Já teve câncer? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> desconhecido	Câncer
5.4 – Leishmaniose? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> desconhecido	
6 - Doenças atuais	
6.1 - HIV/ AIDS? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> desconhecido	AIDS

Anexo I

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DO
ACRE - HCA/FUNDHACRE



Continuação do Parecer: 2.987.220

/ Brochura Investigador	projeto.docx	18:20:10	SILVA FERREIRA	Acelto
Folha de Rosto	rosto.pdf	23/07/2018 17:42:24	IASMINY RANIELLY SILVA FERREIRA	Acelto
Outros	questionario.docx	23/07/2018 17:01:13	IASMINY RANIELLY SILVA FERREIRA	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	lacen.pdf	18/07/2018 16:50:06	IASMINY RANIELLY SILVA FERREIRA	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	fundhacre.pdf	14/07/2018 23:27:50	IASMINY RANIELLY SILVA FERREIRA	Acelto
Outros	dados.docx	14/07/2018 23:25:35	IASMINY RANIELLY SILVA FERREIRA	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	seme.pdf	07/07/2018 17:13:58	IASMINY RANIELLY SILVA FERREIRA	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO BRANCO, 29 de Outubro de 2018

Assinado por:
Maria José Lucas Mortari
(Coordenador(a))

Endereço: BR 364 - Km 02
Bairro: Distrito Industrial **CEP:** 69.914-217
UF: AC **Município:** RIO BRANCO
Telefone: (68)3226-4809 **Fax:** (68)3226-4809 **E-mail:** cep.hc@ac.gov.br