

UNIVERSIDADE FEDERAL ALFENAS – UNIFAL-MG

ANTONIO JOSÉ ARAUJO DE LIMA

**COMPARAÇÃO ENTRE OS ENSAIOS DOT BLOT, ELISA E
INTRADERMORREAÇÃO NO LEVANTAMENTO DA PREVALÊNCIA DA
INFECÇÃO PARACOCCIDIOÍDICA EM ÁREA ENDÊMICA**

Alfenas/MG

2014

ANTONIO JOSÉ ARAUJO DE LIMA

**COMPARAÇÃO ENTRE OS ENSAIOS DOT BLOT, ELISA E
INTRADERMORREAÇÃO NO LEVANTAMENTO DA PREVALÊNCIA DA
INFECÇÃO PARACOCCIDIOÍDICA EM ÁREA ENDÊMICA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias.

Alfenas/MG

2014

Lima, Antonio José Araujo de.

Comparação entre os ensaios DOT BLOT, ELISA e Intradermoreação no levantamento da prevalência da infecção paracoccidiodica em área endêmica. / Antonio José Araujo de Lima - 2014.

61 f. -

Orientador: Luiz Cosme Cotta Malaquias.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde)

Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

Bibliografia.

1. Paracoccidiodomycose. 2. Dot Immunoblotting. 3. Elisa. I. Malaquias, Luiz Cosme Cotta. II. Título.

CDD: 614.53

ANTONIO JOSÉ ARAUJO DE LIMA

**COMPARAÇÃO ENTRE OS ENSAIOS DOT BLOT, ELISA E
INTRADERMORREAÇÃO NO LEVANTAMENTO DA PREVALÊNCIA DA
INFECÇÃO PARACOCCIDIOÍDICA EM ÁREA ENDÊMICA**

A banca abaixo-assinada aprova a dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL/MG.

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Aprovado em 02/10/2014

Aprovado em 02/10/2014

Prof. Dr.: Yamã Sant'Ana Teixeira

Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO - UFTM

Prof. Dr.: Luiz Osmelette Guslof Junior

Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

Prof. Dr.: Amandabete Olias

Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

Dedico a realização desse trabalho a Deus, à minha esposa – Renata e minha filha Sofia, aos meus pais – João e Divina Lúcia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente ao Prof. Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias. Graças a sua generosidade e confiança consegui iniciar um projeto de vida.

Ao Programa de Biociências Aplicadas à Saúde e todos os professores do mesmo, pois aprendi muito com seus ensinamentos.

Aos colegas Ana Paula Ribeiro e Evandro Monteiro de Sá Magalhães. Não haveria melhor companhia para esse trabalho.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Microbiologia e do Laboratório de Vacinas da UNIFAL.

A FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Agradeço as comunidades rurais dos municípios de Alfenas. A confiança dos moradores na equipe e que permitiu a realização desse trabalho.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

Theodore Roosevelt

RESUMO

A paracoccidiodomicose (PCM) é caracterizada como uma micose profunda e que acomete, principalmente, indivíduos do sexo masculino e de regiões agrícolas. A infecção ocorre através da inalação de propágulos fúngicos presentes no ambiente, atingindo inicialmente os pulmões e podendo se disseminar para outros órgãos. O diagnóstico precoce da doença previne a formação de sequelas e garante que o trabalhador dê continuidade a sua atividade de vida diária. Os testes de intradermorreação, imunodifusão dupla e ELISA são os mais utilizados no diagnóstico da PCM, no entanto, podem apresentar reatividade cruzada com outras doenças, como Histoplasmose, Candidíase e Criptococose. Em ensaios de Dot Blot com gp43 purificada, foi comprovada a eficiência deste teste para o sorodiagnóstico da PCM em pacientes durante terapia antimicótica, apresentando alta sensibilidade e especificidade. Portanto, objetiva-se com este trabalho utilizar a técnica do ensaio de Dot Blot com a glicoproteína de 43 KDa como um método de diagnóstico para a PCM infecção em indivíduos expostos ao *Paracoccidioides brasiliensis* na área rural de Alfenas. A prevalência de positividade nos testes Dot Blot, ELISA e IDR foi 57,57% 56,71% 68,83% respectivamente. A proporção de positivos no teste de Dot Blot foi maior no gênero masculino. A maioria dos indivíduos positivos situa-se na faixa etária acima dos 30 anos. Os resultados mostram uma maior concordância entre o teste Dot Blot e ELISA. Devido à dificuldade na padronização no teste Dot Blot e a uma melhor reprodutibilidade e rapidez do teste de ELISA, os resultados sugerem que o teste de ELISA seja mais adequado para levantamento da prevalência da PCM em áreas rurais.

Palavras – chave: Paracoccidiodomicose. Dot Blot. ELISA.

ABSTRACT

The paracoccidioidomycosis (PCM) is characterized as a deep mycosis and that affects mainly males and agricultural regions. Infection occurs by inhalation of fungal propagules in the environment, initially reaching the lungs and may spread to other organs. Early diagnosis of the disease prevents the formation of sequels and ensures that the worker gives continuity to their activities of daily living. The intradermal tests, immunodiffusion and ELISA are the most used in the diagnosis of PCM, however, may show cross-reactivity with other diseases such as histoplasmosis, candidiasis and cryptococcosis. Therefore, the objective of this study was to use the technique of Dot Blot assay glycoprotein of 43 kDa as a diagnostic method for PCM infection in individuals exposed to *P. brasiliensis* in rural Alfenas. Different variables were tested in the standardization of Dot Blot assay using sera samples from patient's positive and negative individuals. The prevalence of positivity in Dot Blot, ELISA and IDR tests was 57.57%, 56.71% and 68.83% respectively. Seropositivity in the Dot Blot test was higher in males. Most positive individuals lie in the age group above 30 years. The results show a better agreement between the Dot Blot and ELISA. Due to the difficulty in standardizing the Dot blot test a better reproducibility and speed of ELISA, the results suggest that ELISA is more suitable for survey of the prevalence of PCM in rural areas.

Key - words: Paracoccidioidomycosis. Dot Blot. ELISA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Esquema mostrando visão geral da história natural da interação Hospedeiro-parasita na PCM.....	17
Figura 2 -	Distribuição geográfica da Paracoccidioomicose.....	21
Figura 3 -	Métodos microscópicos de identificação do <i>Paracoccidiooides brasilienses</i>	23
Figura 4 -	A: Laboratório de Vacinas-UNIFAL. B: Apresentação da pesquisa em uma comunidade rural.....	28
Figura 5 -	A: Modelo de cartaz. e B: modelo de panfleto informativo sobre a paracoccidioomicose.....	29
Figura 6 -	Aplicação de paracoccidioidina de maneira correta. B: o descarte do material perfuro-cortante em local apropriado.....	30
Figura 7 -	A: aplicação correta de paracoccidioidina com a formação de pápula. B: leitura de halo de endureção de indivíduo reativo.....	31
Figura 8 -	A: Aparato de DOT BLOT montado. B: bomba a vácuo.....	34
Figura 9 -	Membrana de nitrocelulose sensibilizada com antígeno bruto em diferentes concentrações e testada com soros positivos e negativos para PCM.....	36
Figura 10 -	Membrana de nitrocelulose sensibilizada com antígeno bruto (10 µg/mL) e testada com soros positivos e negativos para PCM.....	38
Figura 11 -	Membrana de nitrocelulose sensibilizada com antígeno bruto (10µg/ml) e testada com soros positivos e negativos para PCM....	39
Figura 12 -	Membrana de nitrocelulose sensibilizada com paracoccidioidina 5µg/mL.....	40
Figura 13 -	Membrana de nitrocelulose sensibilizada com paracoccidioidina 5µg/mL, bloqueio TBS-SFB 10%, lavagem com TBS-Tween 0,05%, amostras diluídas a 1/200 em duplicata, conjugado diluído/3000 em TBS, revelação em DAB por 10 minutos.....	41

LISTA DE TABELAS E QUADRO

Quadro 1 -	Interpretação dos valores de k.....	35
Tabela 1 -	Distribuição da frequência do teste Dot Blot, IDR e ELISA de moradores de área endêmica para PCM em Alfenas, MG.....	42
Tabela 2 -	Distribuição da frequência do teste Dot Blot positivos e negativos por gênero masculino e feminino de moradores de área endêmica para PCM em Alfenas, MG.....	42
Tabela 3 -	Distribuição da frequência do teste Dot Blot positivos e negativos por faixa etária de moradores de área endêmica para PCM em Alfenas, MG.....	43
Tabela 4 -	Comparação entre o teste Dot Blot e o teste de ELISA de moradores de área endêmica para PCM em Alfenas, MG.....	44
Tabela 5 -	Comparação entre o teste Dot Blot e o teste intradérmico (IDR) de moradores de área endêmica para PCM em Alfenas, MG.....	44
Tabela 6 -	Comparação entre os resultados dos testes de Dot Blot e ELISA pelo teste de Kappa.....	45
Tabela 7 -	Comparação entre os resultados dos testes de Dot Blot e IDR pelo teste de Kappa.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	“Acquire Immunodeficiency Syndrome” (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
Anti – gp43kDa	Anticorpo anti glicoproteína de 43kDa
Anti – gp70kDa	Anticorpo anti glicoproteína de 70KDa
CIE	Contraímunoeletroforese
DO	Densidade Óptica
ELISA	“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”(Ensaio Imune Enzimático)
FC	Fixação do complemento
Gp 43 KDa	Glicoproteína de 43 KDa
Gp 850 KDa	Glicoproteína de 850 KDa ou Laminina
HIV	“Human Immunodeficiency Virus“(Vírus da Imunodeficiência Humana)
IDD	Imunodifusão Radial Dupla
IDR	Intradermorreação
IFI	Imunofluorescência Indireta
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
<i>P. brasiliensis</i>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PCM	Paracoccidioidomicose
SFB	Soro Fetal Bovino
TBS	Solução salina tamponada por Tris base
Th1	Linhagem linfocítica T Helper padrão de resposta 1 (celular)
Th2	Linhagem linfocítica T Helper padrão de resposta 2 (humoral)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	133
2	REVISÃO DA LITERATURA	155
2.1	ASPECTOS GERAIS	155
2.1.1	Paracoccidioides brasiliensis	155
2.1.2	Infecção	166
2.1.3	Paracoccidioidomicose – Doença	188
2.1.4	Epidemiologia da infecção	21
2.2	DIAGNÓSTICOS LABORATÓRIAS PARA PCM	23
3	OBJETIVOS	277
3.1	OBJETIVO GERAL.....	277
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	277
4	MATERIAIS E METODOLOGIA	288
4.1	LOCAL DE ESTUDO.....	288
4.2	CONSCIENTIZAÇÃO SOBRE PCM E SENSIBILIZAÇÃO DOS MORADORES DE LOCALIDADES RURAIS.....	299
4.3	COLETA DE DADOS E APLICAÇÃO DA PARACOCCIDIOIDINA (INTRADERMOREAÇÃO).....	3030
4.4	TESTES DE ELISA (ENZYME LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY)	31
4.5.	PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO DOT BLOT	333
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	355
5	RESULTADOS	366
5.1	PADRONIZAÇÃO DO TESTE DE DOT BLOT	366
5.2	O TESTE DE DOT BLOT	40
6	DISCUSSÃO	466
7	CONCLUSÃO	51
	REFERENCIAS	522
	APENDICE	599
	ANEXO	61

1 INTRODUÇÃO

A paracoccidioomicose (PCM) é uma doença sistêmica granulomatosa crônica causada pelo fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*). Esta doença concentra-se, principalmente, nas Américas do Sul e Central, atingindo, na grande maioria, pessoas que tem contato prolongado com a terra, geralmente do sexo masculino, etilistas crônicos com condições de higiene, nutricionais e socioeconômicas precárias (LACAZ et al. 2002). A baixa incidência da doença entre o sexo feminino está relacionada ao fator protetor do hormônio estrogênio (SHANKAR et al. 2011).

A infecção ocorre através da inalação de propágulos do *P. brasiliensis*, atingindo primeiramente o pulmão, onde se desenvolvem as lesões pulmonares podendo se disseminar para outros órgãos produzindo lesões secundárias na mucosa, na pele, nos nódulos linfáticos e na glândula adrenal. A infecção por *P. brasiliensis* é caracterizada por um longo período de latência, e na maioria dos casos, a doença se manifesta após décadas. Na ausência de terapia eficiente, a PCM progride e pode ser letal (PALMIEIRO; CHERUBINI; YURGEL, 2005).

A paracoccidioomicose, assim como outras doenças fúngicas, depende da interação entre o fungo e a resposta imunológica do hospedeiro para evoluir para a cura espontânea ou disseminar-se pelo organismo causando reação granulomatosa crônica (VALLE; COSTA, 2001; FORTES et al. 2011).

No Brasil, a endemicidade está relacionada principalmente com as regiões agrícolas, como as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do país, pois são regiões onde o fungo encontra condições de solo e vegetação com umidade favorável ao seu desenvolvimento (PALMIEIRO; CHERUBINI; YURGEL, 2005).

Na literatura encontra-se uma grande quantidade de trabalhos em que se avaliou a prevalência da PCM em regiões endêmicas da doença através da IDR (CARANDINA; MAGALDI, 1974; BAGATIN, 1986; DIOGENES et al. 1990; BLOTTA et al. 1999; MANGIATERRA et al. 1999; KALMAR et al. 2004; FORNAJEIRO et al. 2005). A soroprevalência da PCM tem sido avaliado pelo teste de ELISA (MALUF et al. 2003).

Os testes sorológicos mais comumente usados no diagnóstico auxiliar da PCM são, a imunodifusão radial dupla (IDD) e o ensaio da imunoabsorção

enzimática (ELISA) e visam detectar anticorpos específicos (MARQUES, 2003; CAMARGO et al. 1984; CAMARGO, 2008). Existem também trabalhos em que se fez a detecção de antígenos de *P. brasiliensis* em soro humano por Imunoradiometria (CRUZ; CASTRO; RIBEIRO, 1991). Testes sorológicos tradicionais podem apresentar reatividade cruzada com outras doenças e podem gerar resultados falso-negativos ou falso-positivos (revisado por CAMARGO, 2008). A sorologia da PCM, além de auxílio diagnóstico, tem a função de acompanhamento durante e após o tratamento antimicótico (SHIKANAI-YASUDA et al. 2006).

O ensaio de Dot Blot revelou-se uma ferramenta útil para o sorodiagnóstico da doença em pacientes durante tratamento antimicótico demonstrando ser um teste rápido, de alta especificidade e útil para detecção de anticorpos anti – *P. brasiliensis* (TABORDA; CAMARGO, 1994).

Portanto, esse trabalho propõe utilizar o ensaio Dot Blot em soros de indivíduos moradores de área endêmica e comparar os resultados obtidos com ELISA e com a intradermoreação na zona rural Alfenas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Nesse capítulo serão descritos alguns estudos que demonstram as características do fungo, tipos de doença e diagnósticos, entre outras informações de importância na paracoccidioidomicose.

2.1 ASPECTOS GERAIS

Nesse tópico serão descritos as informações gerais sobre as características do fungo *P. brasiliensis*.

2.1.1 Paracoccidioides brasiliensis

A paracoccidioidomicose ou Doença de Lutz-Splendore-Almeida foi observada primeira vez no Brasil por ADOLF-LUTZ em São Paulo-1908. Splendore contribuiu com o estudo da morfologia do agente causal e propôs a denominação de *Zymonema brasilienses*, em 1912. Na década de 30, Almeida reclassifica a espécie e situa o microrganismo em novo gênero *P. brasilienses* (PALMIEIRO; CHERUBINI; YURGEL, 2005).

O *P. brasilienses* foi classificado através de técnicas moleculares no filo Ascomycota, ordem Onygenales, família Onygenacea. Na árvore filogenética é próxima de *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces*, e *Emmonsia parva*, sendo todos esses, estágios teleomórficos do gênero *Ajellomyces* (BRUMMER, CASTAÑEDA, RESTREPO, 1993). Estudos mais recentes apontam pelo menos três subespécies filogenéticas distintas: PS2, PS3 e S1 (TEIXEIRA et al., 2009).

Um estudo realizado por Teixeira et al., (2009) propõem uma nova espécie, *Paracoccidioides lutzii*, devido à alta diversidade poligenética e a características morfogenéticas exclusivas encontradas em alguns espécimes.

2.1.2 Infecção

A infecção na PCM ocorre através da inalação de propágulos ou conídios do fungo. A doença não é contagiosa de pessoa para pessoa, devido à temperatura corporal manter o fungo sob a forma leveduriforme (RESTREPO et al. 2011).

A inalação é considerada a via mais importante de infecção. Após a inalação, os conídios, que são as partículas infectantes, transformam-se em leveduras dentro do corpo. O principal local de infecção são os pulmões, embora muitas vezes não seja aparente. Depois de inalado o *P. brasiliensis* provoca uma infecção pulmonar. A infecção primária é quase sempre subclínica em indivíduos com um sistema imunitário normal. Se o indivíduo infectado se torna imunodeprimido, pode ocorrer uma reativação com infecção crônica nos pulmões ou outros órgãos, especialmente mucosas, tecidos cutâneos, tecidos linfáticos, glândulas suprarrenais e o sistema nervoso central (BRUMMER, CASTAÑEDA, RESTREPO, 1993).

As etapas cruciais para o aparecimento de uma micose disseminada são a fixação, colonização e disseminação do agente etiológico (MENDES-GIANNINI et al. 2005).

A fixação ou adesão de microrganismos às células hospedeiras e tecidos constitui um passo crítico no processo de infecção. Em micologia, o estudo fundamental sobre adesinas e proteínas de parede fúngica foi com *Candida albicans*, mas estendeu-se para vários outros fungos de importância médica. Assim, ao longo dos trabalhos em micologia foi possível estabelecer quais os principais ligantes proteicos de várias espécies de fungos, entre eles o *Paracoccidioides brasiliensis* (MENDES-GIANNINI et al. 2005).

As adesinas se ligam a um componente estrutural da célula hospedeira e isso tem uma implicação direta na evolução da doença (MENDES GIANINI, 2005).

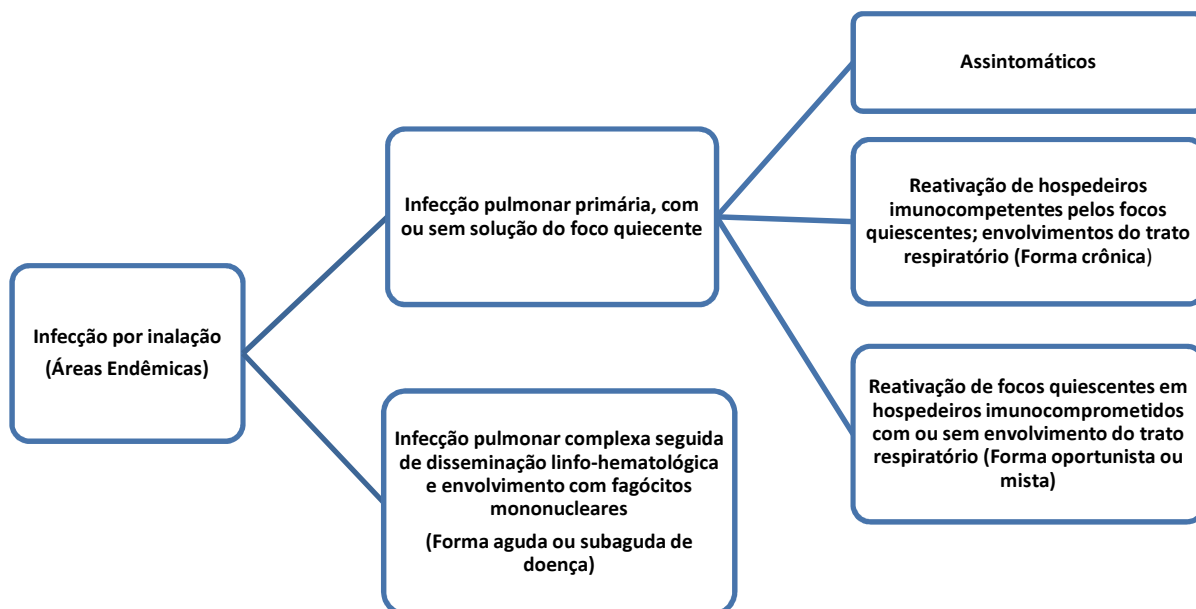
Um estudo com laminina, uma glicoproteína de 850 KDa presente na membrana basal das células hospedeiras, provou que há uma interação com a gp43 KDa do *P. brasiliensis* que influencia na patogênese. No entanto, os caminhos envolvidos na patogênese são mais complexos e não bem conhecidos. Ainda é preciso explicar como o fungo se desvencilha das membranas hospedeiras disseminando-se por todo o organismo (VICENTINI, 1994).

Em estudo realizado *in vitro* e *in vivo* observou-se que as proteínas do citoesqueleto sofrem ação de enzimas específicas do *P. brasiliensis*. A gp 43 KDa ou outras enzimas presentes causam uma degradação de citoqueratina nos microtúbulos e microfilamentos levando a perda de uma rede de filamentos característica. Assim se desenvolve o processo de invasão *in vitro* e pode ser o processo pelo qual o *P. brasiliensis* atravessa as barreiras epiteliais *in vivo*. No entanto, MENDES-GIANNINI et al., (2005) reiteram a necessidade de aprofundar o estudo desses mecanismos.

Há estudos sobre a heterogeneidade da virulência dos parasitas e a interação com a história de vida do hospedeiro como um agravante para o processo de persistência e propagação da doença, mas novos fatores de virulência são constantemente encontrados demonstrando uma face complexa e multifatorial dessa interação (MENDES-GIANNINI et al., 2008).

Um esquema da historia natural da doença pode ser observado na Figura 1.

Figura 1 - Esquema mostrando visão geral da história natural da interação Hospedeiro-parasita na PCM.



Fonte - Adaptado de BENARD (2008).

2.1.3 Paracoccidioidomicose – Doença

É uma micose sistêmica de natureza granulomatosa causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (FRANCO, 1986; SAN BLAS, 1993).

A doença tem por via principal o trato respiratório atingindo inicialmente os pulmões, podendo posteriormente disseminar-se para vários órgãos e sistemas, originando lesões secundárias nas mucosas, nos linfonodos, na pele e nas glândulas adrenais (BRUMMER, CASTAÑEDA, RESTREPO, 1993)

Franco et al. (1987) descrevem que a doença inicia com uma infecção pulmonar através da inalação dos propágulos ambientais, muitas vezes, silenciosa e com a disseminação do fungo no organismo. São produzidos granulomas ulcerosos nas superfícies das mucosas oral, nasal, do trato gastrointestinal, pele e do sistema reticuloendotelial.

Assim como outras doenças fúngica, a PCM depende de uma interação entre o fungo e a resposta imune, podendo adquirir um carácter assintomático, ou disseminar-se pelo organismo (PALMIEIRO, CHERUBINI, YURGEL, 2005). Contudo, não é considerada uma doença com carácter imunodepressor, como a criptococose e histoplasmose (SHIKANAI-YASUDA et al. 2006).

Há evidencia direta e indireta para a ocorrência de PCM-infecção sem doença, ou seja, a detecção de fibras e/ou nódulos pulmonares calcificadas contendo fungos mortos ou viáveis (ANGULO-ORTEGA, 1972) e também a existência de lesões cicatrizadas nos gânglios linfáticos do hilo pulmonar (SEVERO et al. 1979).

De acordo com o Consenso em Paracoccidioidomicose as formas clínicas podem ser divididas em: forma aguda/subaguda, crônica, unifocal, multifocal e sequelar (SHIKANAI-YASSUDA et al. 2006).

A forma aguda é a mais grave e com o pior prognóstico, representando cerca de 3% a 5% de todos os casos. É caracterizada por um curso rápido, com função imune mediada por células severamente deprimida. A maioria são crianças e adultos jovens (de até 30 anos). Nessa forma é observado em biópsias um grande número de células de *P. brasiliensis* multiplicando sem formação de granulomas, o pulmão não é o foco primário e não há manifestações clínico-radiológicas especiais

(BRUMMER, CASTAÑEDA, RESTREPO, 1993; PALMIEIRO, CHERUBINI, YURGEL, 2005).

A forma crônica ocorre em mais de 90% dos doentes, sendo a maioria adulta do sexo masculino. A doença progride lentamente e pode levar de meses a anos para estabelecer-se plenamente. Ao contrário da forma aguda, os sintomas pulmonares são evidentes em 90% dos casos. As manifestações exclusivamente pulmonares, unifocais, perfazem 25% dos casos, podendo ser silenciosa. Tal quadro faz o paciente procurar o serviço médico apenas quando ocorram lesões extrapulmonares, assim o quadro instalado já é multifocal (PALMIEIRO, CHERUBINI, YURGEL, 2005).

A doença é distribuída uniformemente entre os gêneros na infância, posteriormente ocorre um predomínio da infecção no adulto do gênero masculino (SHIKANAI-YASUDA et al. 2006). Isso porque o hormônio feminino estradiol influencia na transição morfológica dos fungos parasitas – demonstrado *in vitro* e *in vivo* – sendo uma interferência direta no processo de acometimento da doença (SHANKAR et al. 2011).

Nos pacientes com PCM, podem ocorrer comorbidades de natureza infecciosa e/ou não infecciosa. Entre os processos infecciosos, podemos destacar a tuberculose em 5 a 10% dos casos, doença pulmonar obstrutiva crônica e AIDS. Pode também aparecer casos de leishmaniose, micoses superficiais, hanseníase e Doença de Chagas, mas como raridade. Quanto às doenças não infecciosas podem ocorrer carcinomas e doença de Hodgkin (SHIKANAI-YASUDA et al. 2006) .

A paracoccidioidomicose tem uma multiplicidade de quadros clínicos. As formas cutânea e sistêmica seguem mecanismos imunológicos diferentes que precisam ser mais bem compreendidos. Os diferentes fatores correlacionados com a forma de infecção são: sexo, idade, estado imunitário e características do agente infeccioso, em especial sua virulência (FRANCO et al. 1994).

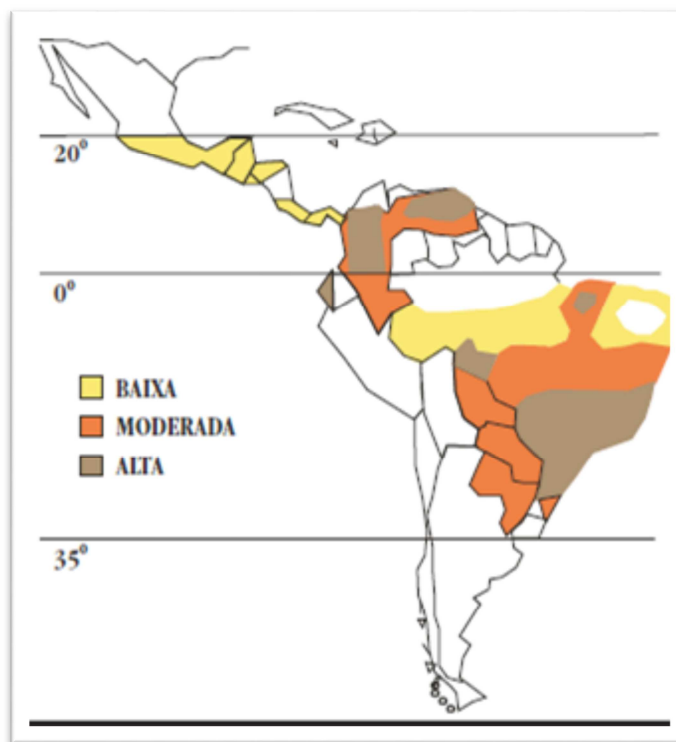
Segundo Mendes-Giannini et al., (1997) dados enfatizam a dissociação da resposta humoral da resposta celular específica para a PCM. Praticamente todos os pacientes com doença têm níveis de anticorpos detectáveis anti-gp70 KDa e anti-gp43 KDa na circulação. Assim pode-se visualizar a resposta em dois padrões imunes não interferentes na secreção de citocinas. Primeiro uma resposta Th1 que favorece as respostas mediadas por células e depois uma resposta Th2 favorece a resposta humoral. Essa hipótese sugere que pacientes com PCM-doença

desenvolvem uma predominância resposta imune tipo Th2. Predominantemente esses pacientes tem usualmente eosinofilia, hipergamaglobulenemia e altos níveis de anticorpos IgE específicas, cujas características são típicas desse modelo de resposta. Entretanto, recentemente foi sugerido que citocinas pró-inflamatórias podem também participar das alterações imunoregulatórias dos pacientes com PCM (MENDES GIANINI, 1997).

2.1.4 Epidemiologia da infecção

A paracoccidiodomicose é a micose sistêmica mais prevalente nas Américas do Sul e Central, com números consideráveis na Colômbia, Venezuela, Argentina e Brasil. Em nosso país sua ocorrência é maior nas regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste, embora a distribuição da doença não seja uniforme nessas regiões (LONDERO; WANKE, 1994) (Figura 1).

Figura 2 - Distribuição geográfica da Paracoccidiodomicose.



Fonte - SHIKANAI-YASUDA et al. 2006.

Com base na experiência de serviços de referência no atendimento de pacientes com PCM, acredita-se que sua incidência em zonas endêmicas varie de 3 a 4 novos casos/milhão até 1 a 3 novos casos por 100 mil habitantes ao ano. Informações registradas no Ministério da Saúde atestam que 3.181 casos de óbito por PCM foram registrados no Brasil entre 1980 a 1995, resultando em taxa de mortalidade por PCM de 1,45 casos por milhão de habitantes (SHIKANAI-YASUDA, 2006).

As características das regiões endêmicas são a temperatura moderada e umidade relativamente elevada e constante ao longo do ano. Nessas regiões, *P. brasiliensis* existe tanto nas plantas quanto no solo com microrganismos saprofíticos e a infecção naturalmente adquirida em animais tem sido demonstrada apenas em tatus (*Dasyipus novemcinctus*) (RESTREPO, MCEWEN, CASTANEDA, 2001).

A faixa de idade geralmente acometida pela doença está entre 30 e 60 anos, sendo crianças e adultos jovens apenas 3% e 10% dos casos respectivamente. Entretanto, o teste cutâneo demonstra que em área de endemicidade o contato com o *P. brasiliensis* é importante durante as primeiras duas décadas de vida (BRUMMER, CASTAÑEDA, RESTREPO, 1993).

A maior frequência de PCM é no sexo masculino, com uma taxa global de 13:1 em áreas de endemicidade. Essa proporção é muito maior na Colômbia, Equador e Venezuela (150:1). No entanto, o teste não aponta diferenças entre o sexo em indivíduos saudáveis e crianças, sendo a progressão da doença mais frequente em homens adultos (BRUMMER, CASTAÑEDA, RESTREPO, 1993)

O teste de IDR demonstrou-se uma importante ferramenta para identificar se o indivíduo já foi ou não sensibilizado pelo antígeno. Esse teste tem por característica avaliar a hipersensibilidade do tipo tardio a produtos do fungo (BAGATIN, 1986). Denomina-se o indivíduo IDR-positivo como portador de PCM-infecção. No entanto, a IDR cobre apenas 90% dos casos e não serve para avaliar casos de doença (BAGATIN, 1986).

A padronização do teste foi idealizada por FAVA-NETO; RAPHAEL (1961) e serviu como base para estudos epidemiológicos, acompanhamento da doença e evolução do tratamento. Esse padrão era passível de variação conforme a cepa utilizada e tempo de incubação. BLUMER; JALBERT; KAUFMAN (1984) identificaram uma instabilidade na qualidade dos antígenos produzidos e trabalhou em prol de melhorias, tendo como resultado um antígeno cuja especificidade e sensibilidade foram de 90% e 100% respectivamente. Por sua vez, PUCCIA et al (1986) separaram componentes exocelulares do fungo *P. brasilienses* estabelecendo a gp 43 KDa como a principal glicoproteína na fase leveduriforme

A prevalência da infecção por *P. brasiliensis* e *H. capsulatum* avaliada por Diógenes et.al. (1990) no município de Pereiro – Ceará foi baseada em reações intradérmicas de leitura macroscópica do local de injeção do antígeno no antebraço, após 48 horas. O trabalho revelou a ocorrência de infecções de PCM e

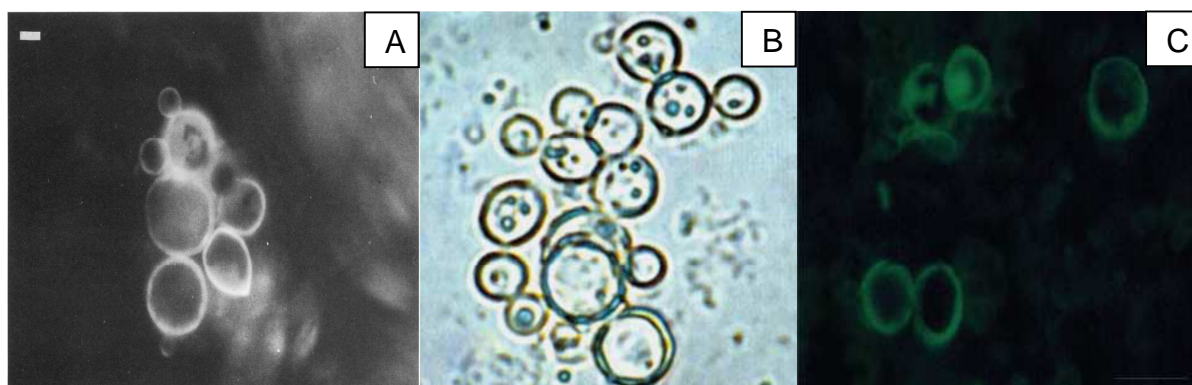
Histoplasmose. Como se detectou reatividade simultânea nas duas provas cutâneas é sugestivo a existência de reação cruzada ou a infecção simultânea pelos fungos *H. capsulatum* e *P. brasiliensis*. Para fins de inquérito epidemiológico foi considerado que o mesmo indivíduo foi infectado pelos dois fungos, pois a reatividade cruzada existe apenas na fase de doença, permanecendo positiva somente a reação específica após a cura da enfermidade.

Bagatin (1986) realizou um inquérito epidemiológico com a paracoccidioidina na região de Sorocaba, Estado de São Paulo, onde se obteve uma alta percentagem de reações positivas nas zonas rurais dessa região (49,6%), um nível expressivo de infecção que poderia ser atribuído às condições ecológicas favoráveis ao desenvolvimento do *P. brasiliensis*.

2.2 DIAGNÓSTICOS LABORATÓRIAS PARA PCM

Segundo Brummer; Castañeda; Restrepo (1993), a melhor e mais rápida maneira para estabelecer o diagnóstico da PCM é o exame microscópico direto de amostras clínicas. Uma série de variações de exames diretos podem ser utilizados para esta finalidade. Os principais são: KOH, calcoflúor e imunofluorescência (Figura 3).

Figura 3: Métodos microscópicos de identificação do *P. brasiliensis*.



Nota: A: exame direto com preparação de calcoflúor branco fresco, na visualização uma célula-mãe no centro junto com células-filhas de *P. brasiliensis* ao redor. B: exame direto com preparação de KOH e aumento de 400X. Visualmente são formas leveduriforme com brotamentos múltiplos em forma de roda de leme. C: Exame direto com reação de imunofluorescência utilizando anticorpo monoclonal BJ4.

Fonte: BRUMMER, CASTAÑEDA, RESTREPO; FORTES et al. 2011; BLANCO et al. 2011.

Além dos exames microscópicos diretos, pode se lançar mão de testes sorológicos. Os métodos para diagnóstico da PCM doença mais frequentes usados são testes de Imunodifusão Radial Dupla (IDD), Contra-imunoeletroforese (CIE), Fixação do complemento (FC) e Imunofluorescência Indireta (IFI). Os resultados revelaram que os testes em gel de agarose, representados por IDD e CIE foram 100% específicos, mais eficientes e com sensibilidade de 91,3% e 95,6% respectivamente. Enquanto que os resultados da FC e IFI não tiveram bons resultados (Del Negro et al.,1991). Esse trabalho confirmou resultados anteriores descritos por LONDERO et al. (1981), SIQUEIRA (1982). De acordo com alguns autores, o teste sorológico de IDD por possuir uma sensibilidade e especificidade entre 94 e 100%, tem sido o teste de escolha para o diagnóstico da PCM (CASOTTO, 1990).

O teste de ELISA também é empregado no diagnóstico da PCM por apresentar alta sensibilidade em estudos sobre a PCM e por ser utilizado para triagem sorológica. O uso de antígeno com expressiva quantidade de gp43 é importante na busca de alto grau de especificidade, pois essa molécula induz resposta de anticorpos em 100% dos pacientes portadores de PCM, o que não ocorre com soro de indivíduos normais. No entanto, tendo em vista a alta sensibilidade da técnica de ELISA não pode ser descartada a possibilidade de reações cruzadas especialmente com histoplasmose, leishmaniose e doença de Chagas que são comuns em algumas regiões (MALUF et al. 2003).

Numa tentativa para melhorar a especificidade do ensaio de ELISA, soros de pacientes com PCM foram testadas utilizando várias abordagens, tais como tratamento do antígeno (gp43) com metaperiodato de sódio, absorção de soro com antígenos de *Candida albicans* ou *Histoplasma capsulatum*, e diluição de soro em galactose. A especificidade máxima encontrada neste ELISA foi de 84%. Todos estes processos se mostraram ineficientes para eliminar todos os anticorpos de reação cruzada e de obtenção de uma ELISA específica para o diagnóstico de PCM (ALBUQUERQUE; SILVA; CAMARGO, 2005).

No estudo de Neves et.al. (2003), o teste de ELISA com gp43 KDa como antígeno para *P. brasiliensis*, soros de pacientes com IDD negativo foram positivos. Entretanto, eles tinham baixo título de IgG quando comparado aos soros de IDD positivos. Observou-se também que quando os soros dos pacientes com PCM foram testados com gp43 tratado com metaperiodato de sódio, os valores de absorbância

dos IDD negativos caíram significativamente, atingindo densidades ópticas (DO) abaixo do corte. No entanto, os soros de IDD positivos tiveram uma diminuição significativa, mas com DO acima do corte. Esse trabalho comprova a produção de IgG2 contra os antígenos, uma vez que se observou a diminuição da reatividade destes anticorpos contra gp43 tratado com metaperiodato de sódio.

A técnica de Western Blot testada por Casotto (1990) usou componentes de extrato leveduriforme de *P. brasiliensis*. Todos os antígenos presentes na amostra foram identificados por soros de pacientes, demonstrando ser uma ferramenta útil para o diagnóstico da PCM confirmando 87% dos casos (na combinação de 58, 57 e 45 KDa) e revelou heterogeneidade nas respostas dos soros dos pacientes. Também foi observada reação cruzada com soros de pacientes com histoplasmose, candidíase e aspergilose.

Correa et al. (2007) trabalhando com ensaio de Dot Blot mostraram que anticorpos presentes em dez amostras de soro a partir de sete pacientes com PCM reconheceram a proteína recombinante de 27 KDa apresentando uma sensibilidade de 100%, com uma especificidade de 98%.

O ensaio de Dot Blot, um teste rápido, de leitura visual, foi adaptado para diagnóstico sorológico e acompanhamento de pacientes durante terapia antimicótica para PCM. A gp43 purificada usada como antígeno foi testada antes e depois do tratamento com metaperiodato de sódio. Para validar o ensaio, testou-se com soros de pacientes com PCM, histoplasmose, doença de Jorge Lobo, aspergilose, candidíase, criptococose e indivíduos saudáveis. A gp43 nativa originou resultados positivos com todos os soros de pacientes com PCM e resultados fracamente positivos com soros de pacientes com doença de Jorge Lobo (31,3%). Nenhum resultado falso-positivo foi obtido quando a gp43 tratada com periodato de sódio foi utilizada como antígeno. Estes resultados indicam que o teste de Dot Blot é sensível, específico, econômico e rápido para diagnóstico sorológico e estudos de acompanhamento de PCM (TABORDA; CAMARGO, 1994). Embora o ensaio de Dot Blot seja promissor, ele ainda não é acessível à rotina diagnóstica da PCM.

Como mostrado acima, os testes sorológicos podem ser utilizados no diagnóstico auxiliar da PCM. A IDD é o teste sorológico mais utilizado na rotina diagnóstica, por sua simplicidade de execução, alta especificidade e sensibilidade, mas, no entanto, requer que o paciente apresente altos títulos de anticorpos, período no qual a doença esta sintomática e paciente pode apresentar sequelas, sugerindo

um diagnóstico tardio (revisto por Camargo, 2008). Além disso, parte dos pacientes podem apresentar testes falsos negativos. O teste de ELISA e a IDR podem apresentar reações cruzadas como outras micoses (NEVES et al. 2003).

Como o ensaio de Western Blot tem sido usado como uma prática confirmatória para o teste de ELISA em casos de infecção por HIV, mostrando ser uma prática útil no diagnóstico de AIDS (SIMON et al. 1992) e o teste de Dot Blot, uma variação do Western Blot, mostrou-se ser seja extremamente sensível e específica no diagnóstico e acompanhamento da terapêutica antimicótica na PCM (TABORDA; CAMARGO, 1994), estabeleceu-se como objetivo avaliar o teste de Dot Blot em área endêmica para PCM em comparação com os testes de ELISA e IDR.

3 OBJETIVOS

Nesse capítulo serão determinadas as razões para esse estudo.

3.1 OBJETIVO GERAL

Comparar os ensaios Dot Blot, ELISA e IDR no diagnóstico de infecção paracoccidíóidica em área endêmica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar o ensaio de Dot Blot e analisar comparativamente a reatividade de soros de indivíduos de área endêmica com os testes de IDR e ELISA.
- Verificar a viabilidade do emprego do ensaio de Dot Blot na triagem de indivíduos em áreas endêmicas.

4 MATERIAIS E METODOLOGIA

Nesse capítulo serão descritos os meios utilizados nesse estudo, como: materiais, infra-estrutura e as técnicas laboratorial e estatística utilizadas.

4.1 LOCAL DE ESTUDO

O presente estudo é parte integrante do “PROGRAMA DE INTEGRAÇÃO UNIFAL/COMUNIDADES RURAIS NO DIAGNÓSTICO E PREVENÇÃO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE” (PREAE 259/2009) e foi protocolado e aprovado no Comitê de ética e pesquisa com registro Nº119/2010 (ANEXO 1).

A parte laboratorial foi desenvolvida nos Laboratórios de Vacinas (Figura 4A) e Microbiologia da UNIFAL, enquanto a sensibilização, coleta e consultas clínicas foram realizadas em locais de referência para a aglomeração dos habitantes das comunidades rurais de Alfenas, como: igrejas, associações de bairro, escolas rurais e casa de moradores (Figura 4B).

Figura 4 - A: Laboratório de Vacinas-UNIFAL. B: Apresentação da pesquisa.



Nota: Apresentação da pesquisa pelo Prof. Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias – coordenador do grupo de pesquisa e docente da UNIFAL – e Evandro Monteiro de Sá Magalhães – médico pneumologista integrante do grupo de estudo em comunidade rural





Fonte: do autor

4.2 CONSCIENTIZAÇÃO SOBRE PCM E SENSIBILIZAÇÃO DOS MORADORES DE LOCALIDADES RURAIS

Em conjunto com a Secretária de Saúde de Alfenas, realizou-se encontro com os agentes de saúde com o objetivo de agendar oficinas para esclarecer sobre a forma de infecção e importância clínica da PCM e a importância de diagnosticar precocemente a doença em regiões endêmicas.

Foram confeccionados cartazes e panfletos informativos (Figura 5), também foi feito um teatro como forma de aproximação com a população. O material escrito foi produzido com linguagem simples e de fácil compreensão para o público-alvo conforme figura 5.

Figura 5 - A: Modelo de cartaz. e B: modelo de panfleto informativo sobre a paracoccidiodomicose.

<p>Unifal Paracoccidiodomicose</p> <p>É uma doença causada por um fungo encontrado nas plantas e no solo. Afeta principalmente pessoas que lidam diretamente com o manuseio da terra.</p>  <p>Pode gerar lesões no pulmão, pele, mucosas e em outras partes do corpo.</p>   <p>Para descobrir se você entrou em contato com o fungo, faça um teste no qual é feita a injeção de um líquido no seu braço e 48 horas depois volte para confirmar o resultado pela medição de uma área avermelhada que poderá aparecer ou não. Após a leitura você será encaminhado ao serviço médico para confirmação do diagnóstico e tratamento se necessário.</p>   	<p>Unifal</p> <p>Paracoccidiodomicose</p> <p>Você sabe o que é ?</p> <p>COMO SABER SE TIVE CONTATO ?</p> <p>Através de um teste onde é feita a injeção de antígeno do fungo no braço e 48 horas depois pode aparecer no local da injeção uma área endurecida e avermelhada. O teste não transmite a doença.</p>    <p>SE DER POSITIVO O QUE EU FAÇO ?</p> <p>Deve procurar o médico para fazer o diagnóstico clínico e laboratorial.</p>	<p>O QUE É PARACOCIDIODOMICOSE ?</p> <p>É uma doença causada por um fungo encontrado nas plantas e no solo. Afeta principalmente pessoas que lidam diretamente com o manuseio da terra.</p>  <p>COMO SE ADQUIRE ?</p> <p>Você pode pegar a doença ao respirar as partículas do fungo que estão suspensas no ar, durante a realização do trabalho rural. Essas partículas desenvolvem dentro do seu corpo e podem atingir vários locais. O contato com o doente não apresenta riscos de contágio.</p>  <p>O QUE ELA CAUSA ?</p> <p>No início a doença pode não apresentar sintomas. Mas depois podem aparecer feridas na pele, boca, problema nos pulmões, nervos e outras partes do corpo.</p> <p>COMO TRATAR A DOENÇA ?</p> <p>Existem medicamentos como os antifúngicos que devem ser tomados sob orientação médica.</p>   <p>COMO PREVENIR ?</p> <p>Não existem vacinas ainda disponíveis. Assim, o melhor a fazer é realizar os testes e fazer a consulta com médico especialista.</p>
---	--	---

Fonte: do autor

4.3 COLETA DE DADOS E APLICAÇÃO DA PARACOCCIDIOIDINA (INTRADERMOREAÇÃO)

Após a elucidação dos objetivos do trabalho aos moradores das localidades rurais dos municípios de Alfenas-MG foi realizado um cadastro dos indivíduos que aceitaram participar da pesquisa, onde foi preenchida uma ficha com dados pessoais e histórico médico (APENDICE A). Procedeu-se a leitura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (APENDICE B) e cada participante assinou o termo após esclarecimentos.

No preparo da paracoccidioidina, para uso intradérmico, a concentração protéica foi ajustada a 60 µg/mL (estéril e apirogênica), de modo a se usar 6 µg/100 µL para o teste, de forma que, a quantidade de gp43 fosse expressa superior a 70%. O preparo da paracoccidioidina foi realizado conforme Saraiva et al (1996) e a amostra utilizada é oriunda de uma cepa *P. brasiliensis* B-339, que é uma amostra padrão utilizada para produção de antígenos em toda a América Latina.

O procedimento consiste em injetar 100 µL do antígeno no terço médio do braço esquerdo – uma região de poucos pelos – evitando lesões, cicatrizes e/ou vasos calibrosos aparentes (Figura 6A).

Figura 6 - A: aplicação de paracoccidioidina de maneira correta. B: o descarte do material perfuro-cortante em local apropriado.

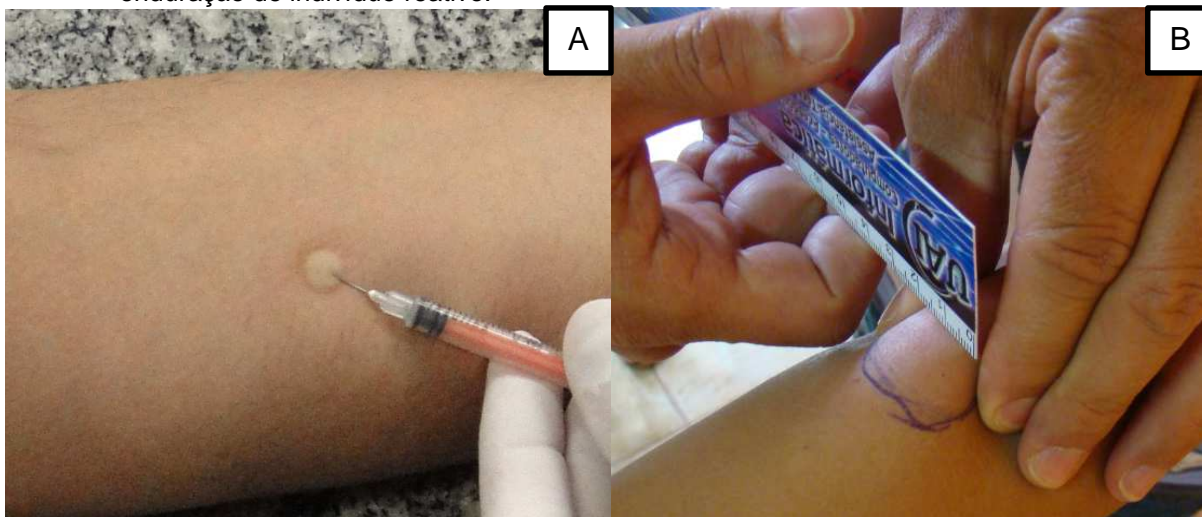


Fonte: do autor

A aplicação correta é feita com o bisel voltado para cima e a seringa fica paralela à pele de modo que o aplicador visualize a porção da agulha que foi inserida na pele. A inserção é feita de maneira lenta, se necessário, utilizar-se do

polegar sobre o canhão para estabilizar a seringa no local, no intuito de evitar o deslocamento do braço ou seringa durante a aplicação. O aspecto final da aplicação correta é a formação de uma pápula esbranquiçada com poros, um aspecto de “casca de laranja” (Figura 7A). A diminuição da pápula é de maneira gradual desaparecendo completamente em torno de 30 minutos.

Figura 7 - A: aplicação correta de paracoccidioidina com a formação de pápula. B: leitura de halo de endureção de indivíduo reativo.



Fonte: do autor

Após a realização do teste de Intradermoreação, os moradores foram informados sobre o retorno para leitura após 48 horas da aplicação. Nesse momento foi realizada a medição dos halos de endureção desenvolvidos nos pacientes (Figura 7B), coleta de sangue em todos os participantes da pesquisa – dos IDR positivos e negativos –, e também foi agendada uma data para exame clínico com profissional médico para monitorização e evolução dos indivíduos positivos no teste. Foi considerado positivo todo halo de endureção maior que 5 mm de diâmetro.

4.4 TESTES DE ELISA (ENZYME LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY)

O teste de ELISA indireto foi realizado conforme descrito por Camargo e colaboradores (1984) com modificações.

Foi usado placas de poliestireno de 96 poços (NUNC), o antígeno bruto de *P. brasiliensis* na concentração de 50 µg/mL por poço, em tampão carbonato-

bicarbonato pH 9,6, em seguida a placa permaneceu “overnight” em temperatura de 4°C, lavou-se 5 vezes para retirar o excesso de solução. Na sequência realizou o bloqueio dos poços com solução de leite desnatado (Molico®) a 5% em PBS-Tween 0,05% por uma hora a 37°C e novamente mesmo processo de lavagem anterior.

Os soros dos pacientes, controles positivos e negativos são diluídos previamente a 1/200 em PBS-Tween-gelatina 0,3%. Cada poço com bloqueio é lavado e recebe 100 µL dessas diluições e são incubadas a 37°C por uma hora, depois se lava de mesmo modo.

Uma estratégia para melhoria do método consiste na adição de PBS-Tween 0,05% com solução de ureia 6M por 5 minutos em câmara escura. Esse protocolo foi realizado por NAMUJJU e colaboradores (2011) com algumas modificações, pois pacientes com diferentes infecções podem apresentar anticorpos de baixa e alta afinidade gerando reações cruzadas. A solução de ureia tem poder de dissociação das ligações mais fracas, inespecíficas, diminuindo as reações cruzadas aumentando a especificidade do teste (RAHBARI et al, 2012), termina-se essa etapa com lavagem semelhante as demais.

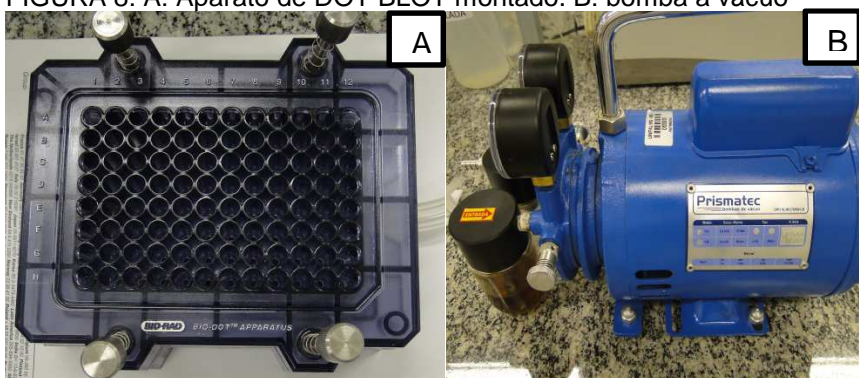
Considerando que ocorrera a formação de complexo antígeno-anticorpo nos poços em que soros tenham anticorpos para *P. brasiliensis*, o próximo passo é formar complexos com anticorpos secundários com marcador para revelação. Assim, foi usado 100 µL de conjugado Anti-IgG Humana Peroxidase (SIGMA) na diluição de 1/7.500 por poço, como incubação a 37°C por uma hora, posteriormente procedeu-se a lavagem.

Para revelação e geração de cor, utilizou-se de 100 µL de substrato o-fenilenodiamina (OPD) (SIGMA) e 10 µL de peróxido de hidrogênio diluídos em 10 mL de tampão citrato 0,1M pH 4.5 e deixando em repouso por oito minutos em câmara escura. A reação foi paralisada pela adição de 30 µL de ácido sulfúrico 2N por poço. A leitura foi feita em espectrofotômetro (ZENITH 200 RT) no comprimento de onda de 492 nm. O ponto de corte foi calculado a partir da soma da média da DO acrescida de duas vezes o desvio padrão de soros negativos em cada placa.

4.5. PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO DOT BLOT

O ensaio de Dot Blot para PCM foi realizado conforme TABORDA; CAMARGO (1994) com modificações. Uma membrana de nitrocelulose (Millipore, São Paulo, Brasil) medindo 11,5 x 8 cm foi hidratada por 5 minutos em solução salina Tris-HCl 20 mM, pH 7,5- NaCl 200 mM (TBS). A seguir, a membrana foi montada em um aparato para Dot Blot de 96 poços (Bio-Rad, Richmond, Califórnia) e sensibilizada com 100 µL de antígeno bruto do *P. brasilienses* na concentração de 10 µg/mL em TBS ou com 100 µL de solução antigênica paracoccidiodina a 5 µg/mL por uma hora. Alguns experimentos foram realizados a temperatura ambiente e outros a 37° C de acordo com o experimento. A seguir, a membrana foi lavada 3 vezes com solução TBS-Tween 20 0,05% e bloqueada. Para bloqueio foi utilizado 200 µL de solução a 0,5% ou 5% de leite desnatado ou 5% de leite desnatado + gelatina 3% ou solução a 10% de soro fetal bovino (SFB) em TBS por uma hora. Após este período, a membrana foi lavada 3 vezes com solução TBS-Tween 20 0,05%. A seguir, foram adicionados 100 µL das diluições das amostras de soros de pacientes com PCM (controles positivos) e negativos a partir de 1/200 em TBS ou TBS-TWEEN- 0,05%-GELATINA 0,3% por uma hora. As diluições das amostras de soro foram realizadas em uma placa de poliestireno de 96 poços e posteriormente transferidas para o aparato. A seguir, a membrana foi lavada 3 vezes com solução TBS-Tween 20 0,05% e adicionado 100 µL do conjugado peroxidase de cabra anti-IgG humana (SIGMA) em TBS. Foram testadas diferentes concentrações do conjugado. A membrana foi novamente lavada 3 vezes com solução TBS-Tween 20 0,05% e imersa em 10 mL de solução diaminobenzidina-H202 (SIGMA) em TBS por 10 min. A membrana foi fotografada para avaliação dos resultados. A presença de um ponto esférico (dot) de coloração marrom intensa indica resultado positivo e a ausência de coloração resultado negativo. Figura 8 mostra uma fotografia do aparato de Dot Blot e da bomba a vácuo utilizada nos experimentos.

FIGURA 8: A: Aparato de DOT BLOT montado. B: bomba a vácuo



Fonte: do autor

As etapas da execução do ensaio após padronização estão descritas abaixo:

1. Hidratar membrana de nitrocelulose (Millipore, São Paulo, Brasil) com tamanho 11,5 x 8 cm por 10 minutos em solução salina Tris-HCl 20 mM, pH 7,5 - NaCl 200 mM (TBS).
2. Montar o aparato para Dot Blot de 96 poços (BIO-RAD) (FIGURA 8A) com a membrana hidratada;
3. Sensibilizar com 100 μ L de solução antigênica paracoccidioidina a 5 μ g/mL em TBS-Tween 20 0,05% por uma hora a 37°C;
4. Lavar por três vezes utilizando 200 μ L de solução TBS-Tween 20 0,05% por poço em cada filtração com a bomba a vácuo (FIGURA 8B);
5. Bloqueio com 200 μ L de solução de soro fetal bovino (SFB) a 10% em TBS por uma hora a 37°C;
6. Lavar por 3 vezes com 200 μ L de solução TBS-Tween 20 0,05%.
7. Adicionar 100 μ L das diluições das amostras de soros de pacientes, controle positivo e negativo em quadruplicata a 1/400 em TBS-TWEEN 0,05% por uma hora a 37°C. As diluições das amostras de soro foram realizadas em uma placa de poliestireno de 96 poços e posteriormente transferidas para o aparato.
8. Lavar novamente a membrana 3 vezes, por filtração a vácuo, com 200 μ L de solução TBS-Tween 20 0,05%;
9. Adicionar 100 μ L do conjugado peroxidase de cabra anti-IgG humana (SIGMA) diluído a 1/3000 em TBS;
10. Lavar novamente a membrana 3 vezes com 200 μ L de solução TBS-Tween 20 0,05%;

11. Retirar a membrana do aparato e realizar a imersão em 10 mL de solução diaminobenzidina- H_2O_2 (SIGMA) previamente diluída em água destilada por 10 minutos.
12. Fotografar a membrana para avaliação dos resultados.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o programa SPSS versão 16 (2007). Foi realizada análise de distribuição de frequência das principais variáveis, com o objetivo de caracterizar a população atendida no estudo.

Foi realizada análise da distribuição de frequência das variáveis: prevalência, gênero e faixa etária. A existência de associação entre as variáveis categóricas serão comparadas utilizando o teste do Qui-quadrado.

Na comparação do teste de ELISA com o Dot Blot foi estabelecido resultado positivo ou negativo e não os valores de densidade ótica obtidos com as leituras das placas de ELISA. Assim foi possível limitar possíveis variáveis alternativas.

O método estatístico usado para avaliação da concordância entre métodos foi o método de Kappa, que consiste no cálculo de um coeficiente de correlação interclasses, considerando também probabilidade (VIEIRA; GARRETT., 2005). A interpretação dos valores de k estão expressos no Quadro 1:

Quadro 1- Interpretação dos valores de k

K	Interpretação
<0	Sem acordo
0,0-0,20	Acordo ligeiro
0,21-0,4	Acordo "fair"
0,41-0,60	Moderada concordância
0,61-0,80	Acordo substancial
0,81-1,00	Concordância quase perfeita

Nota: K=correlação entre os resultados

Fonte: Landis; Koch (1977)

5 RESULTADOS

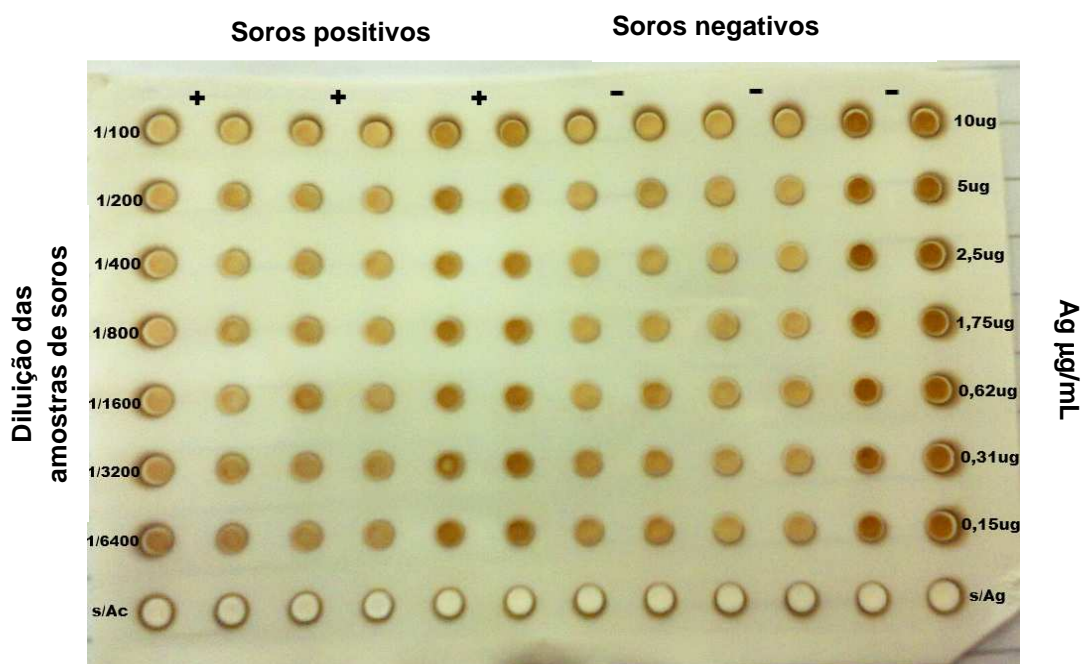
Nesse capítulo serão demonstrados os resultados obtidos no estudo.

5.1 PADRONIZAÇÃO DO TESTE DE DOT BLOT

As condições para realização do teste foram estabelecidas como descritas na seção 4.5. em material e métodos.

A Figura 9 mostra o resultado de um experimento onde se testou diferentes concentrações do antígeno bruto (0,15 a 10 µg/mL) e diferentes diluições das amostras de soros (1/100 a 1/6400). Foram utilizados 3 soros positivos e 3 soros negativos para PCM em duplicata. A reação observada foi inespecífica, pois não houve discriminação entre os soros positivos e negativos. Não foi observada deposição do substrato nos poços sem antígeno ou soro.

Figura 9 – Membrana de nitrocelulose sensibilizada com antígeno bruto em diferentes concentrações e testada com soros positivos e negativos para PCM.



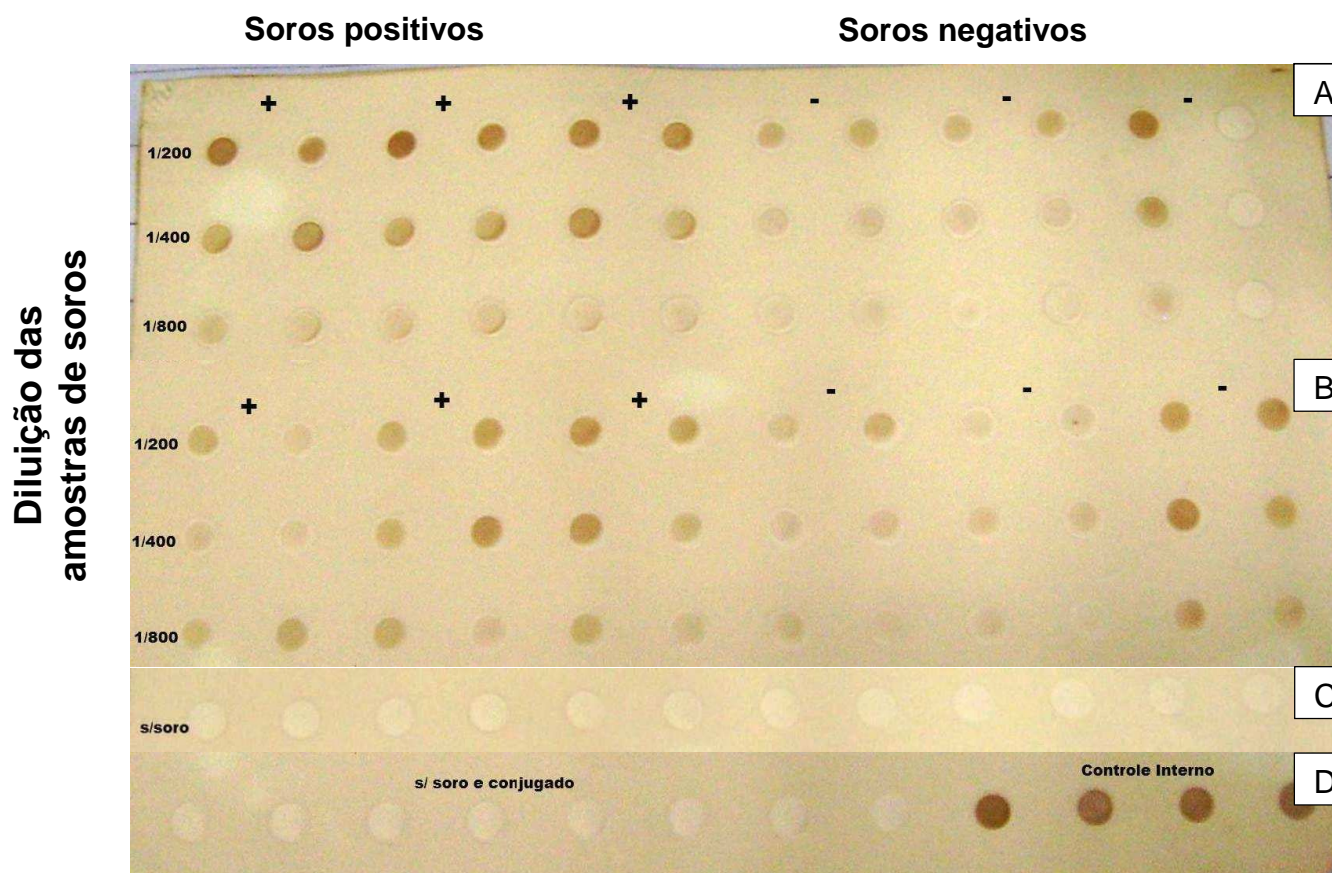
Nota: Bloqueio: TBS-Leite 0,5%. Diluição do conjugado em 1/500. Diluição das amostras de 1/100 a 1/6400. Ag: antígeno bruto; Ac: Anticorpo.

Fonte: do autor

Uma explicação para a reação inespecífica mostrado na Figura 4 poderia ser devido à concentração do conjugado (1/500). Assim foi realizado um novo teste com diferentes concentrações do conjugado peroxidase anti-IgG humana com o objetivo de verificar se a resposta apresentava melhor discriminação entre as amostras positivas e negativas. As concentrações do conjugado testadas foram de 1/2500 e 1/5000 (Figura 10).

Pode se observar no resultado do teste das concentrações do conjugado (Figura 10A, 10B) uma melhor discriminação entre as amostras positivas e negativas. A maior diferença entre soros positivos e negativos ocorreu na diluição do conjugado de 1/2500 e da amostra 1/200. No entanto, também foram observados pontos positivos em amostras negativas, sugerindo que o ensaio ainda precisa ser melhorado. Todos os controles da reação foram eficientes. Na Figura 10C ficou demonstrado que não ocorreu ligação do conjugado anti-IgG na membrana sem presença de amostra de soro (anticorpo primário). Na Figura 10D os “dots” apenas bloqueados, sem sensibilização (antígeno) e sem adição de amostra de soro (anticorpo primário) não apresentaram nenhuma precipitação, enquanto que os 4 últimos “dots” na mesma linha apresentaram precipitação do substrato (controle interno). Esse resultado era esperado, pois o bloqueio não deve interferir ou gerar precipitação do DAB e a sensibilização direta da membrana com soro humano (controle interno) faz com que IgGs circulantes fiquem aderidas à membrana reagindo com o conjugado peroxidase anti-IgG humano gerando “dots” bem compactos.

Figura 10 – Membrana de nitrocelulose sensibilizada com antígeno bruto (10 g/mL) e testada com soros positivos e negativos para PCM

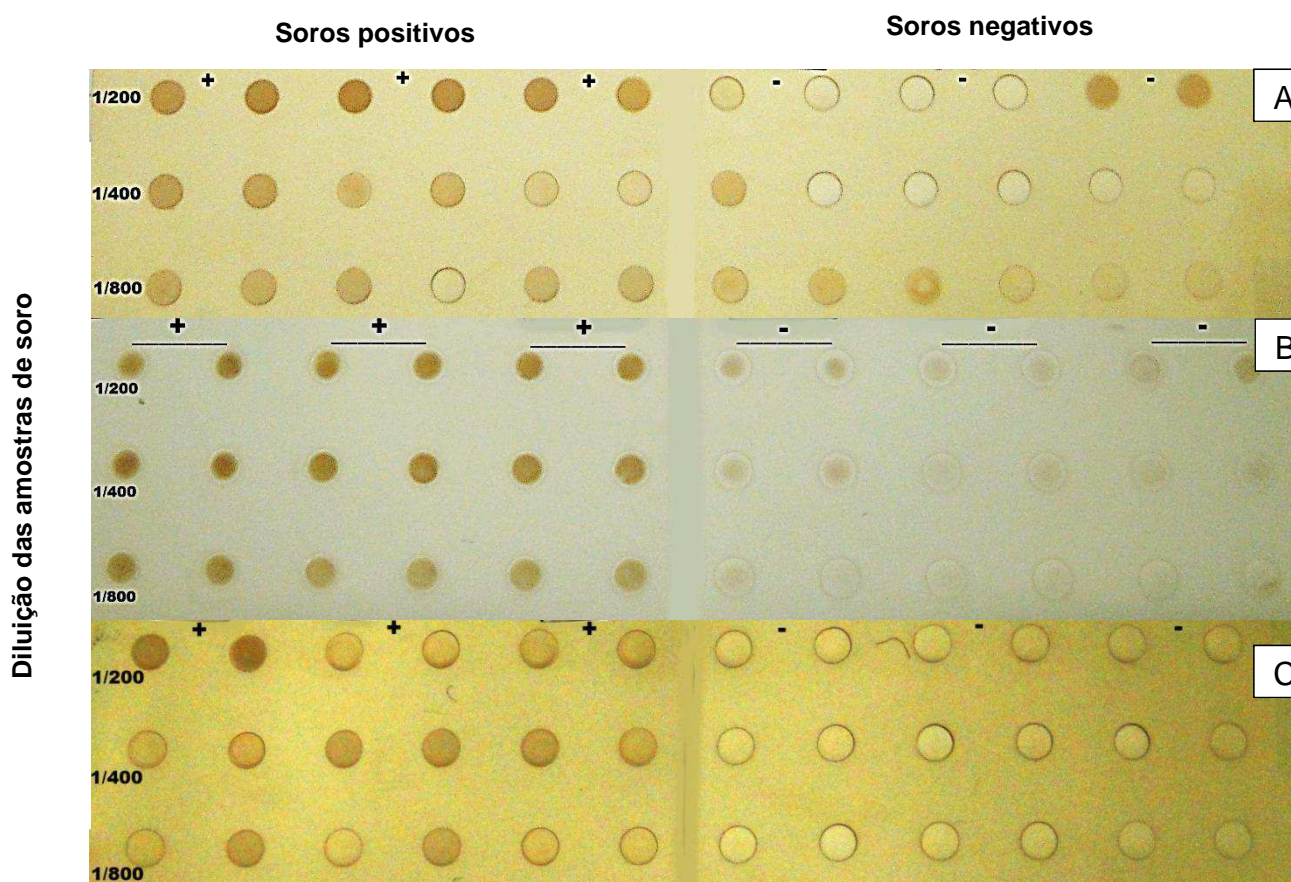


Nota: Bloqueio: TBS-Leite 0,5%. A: Diluição do conjugado em 1/2500. B: Diluição do conjugado em 1/5000. C: Controle sem presença de amostra. D: Controle interno.

Fonte: do autor

Posterior ao teste para verificação da diluição do conjugado foi testado a eficiência da solução de bloqueio com TBS–Leite desnatado 0,5%, TBS–Leite desnatado 0,5%–Gelatina 0,05% e TBS–SFB 10%. As demais variáveis foram mantidas. Os resultados demonstraram que o bloqueio TBS–SFB 10% foi mais eficiente, pois as amostras negativas não tiveram aparecimento de precipitação do substrato em nenhuma diluição (Figura 11).

Figura 11 - Membrana de nitrocelulose sensibilizada com antígeno bruto (10 g/ml) e testada com soros positivos e negativos para PCM.



Nota: Amostras positivas e negativas em duplicata diluídas em 1/200, 1/400 e 1/800 e com bloqueio em TBS-Leite desnatado 0,5% (A), TBS- Leite desnatado 0,5% (B) Gelatina 0,05% e TBS-SFB 10% a temperatura ambiente. Diluição do conjugado a 1/3000.

Fonte: do autor

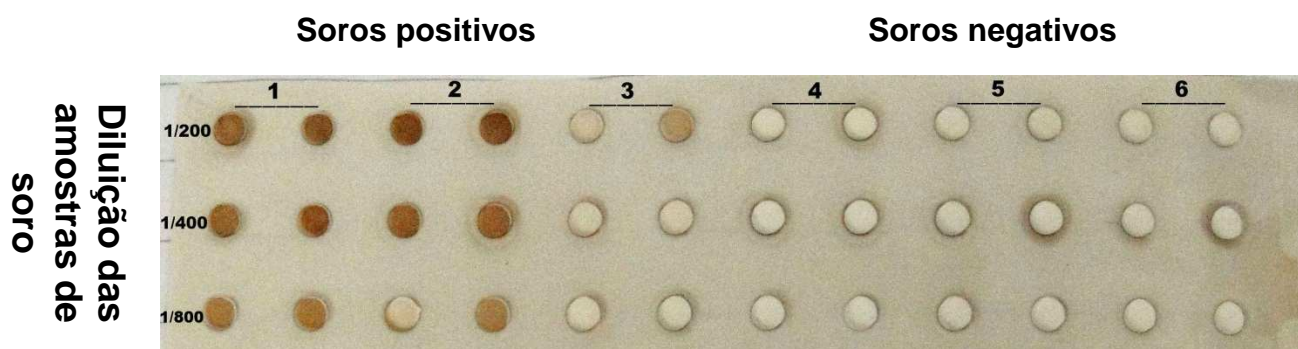
Durante a padronização foi observado que a sensibilização com antígeno bruto gerou precipitação do substrato em algumas amostras negativas e também em controles sem adição de Ag houve ligações inespecíficas em amostras de soro positivas, sugerindo que o resultado anteriormente observado com soros positivos poderia ser inespecífico.

Devido a isso foi testado a paracoccidioidina como antígeno sensibilizante devido esta ser uma preparação antigênica rica em gp43 (mais de 70%), o antígeno mais importante no diagnóstico da PCM (PUCCIA et al.,1986).

A Figura 12 mostra os resultados do teste de Dot blot usando a paracoccidioidina na concentração de 5 g/mL como antígeno. Pode ser observada uma discriminação satisfatória entre as amostras positivas quando comparada às amostras negativas. As ligações inespecíficas diminuíram ao ponto de diferenciar

visualmente as amostras positivas das amostras negativas para PCM. Não ocorreu a ligação inespecífica de anticorpos no controle sem adição de antígeno (não mostrado).

Figura 12 – Membrana de nitrocelulose sensibilizada com paracoccidioidina 5 µg/mL



Nota: Bloqueio TBS-SFB 10%, lavagem com TBS-Tween 0,05%, amostras positivas (1, 2 e 3) e negativas (4, 5, e 6) diluídas a 1/200, 1/400 e 1/800 em duplicata (colunas), conjugado diluído/3000 em TBS, revelação em DAB por 10 minutos.

Fonte: do autor

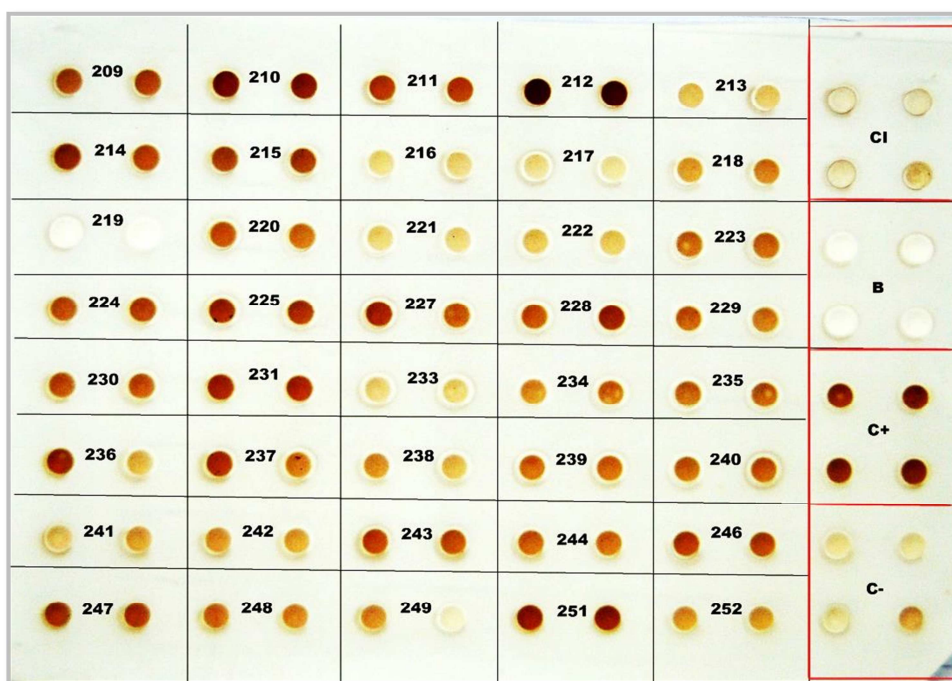
Após análise dos resultados chegou-se as seguintes condições do ensaio de Dot Blot: antígeno paracoccidioidina na concentração de 5 µg/mL; bloqueio utilizando SFB 10% em TBS; amostras de soros diluídas 1/400 em TBS-Tween 0,05%; conjugado peroxidase anti-IgG humana na diluição de 1/3000. A temperatura de 37°C, assim como uma hora de incubação em todas as etapas.

5.2 O TESTE DE DOT BLOT

Após padronização, o teste de Dot Blot foi realizado utilizando 231 amostras de soro de moradores de áreas rurais do município de Alfenas. Em cada membrana foram testados 40 soros em duplicada, juntamente com uma amostra como controle positivo e uma como controle negativo em quadruplicada, um branco (controle) e um controle interno (Ig humana). A precipitação de substrato nesses “dots” demonstra que há formação de complexo antígeno-anticorpo no final do teste, afirmando a correta execução do ensaio. A avaliação dos resultados de Dot Blot das amostras foi

realizada de maneira visual por comparação de cor entre as amostras, os controles positivos, negativos e o branco. Os resultados duvidosos foram submetidos a novo ensaio em condição análoga. A Figura 13 mostra um resultado representativo dos experimentos realizados.

FIGURA 13 - Membrana de nitrocelulose sensibilizada com paracoccidiodina 5 µg/mL, bloqueio TBS-SFB 10%, lavagem com TBS-Tween 0,05%, amostras diluídas a 1/200 em duplicata, conjugado diluído/3000 em TBS, revelação em DAB por 10 minutos.



Nota: Os quadrantes destacados em vermelho equivalem aos controles: CI: controle interno; B: Branco; C+: amostra de soro positiva para PCM; C-: amostra negativa para PCM.
Fonte: do autor.

A TABELA 1 apresenta a distribuição da frequência do resultado do teste de Dot Blot, IDR e ELISA respectivamente. Pode ser observado que 133 amostras (57,57%) foram classificadas como positivas e 98 (42,33%) como negativas para presença de anticorpos contra *P. brasiliensis* no teste de Dot Blot. Na IDR, 159 amostras (68,83%) foram positivas e no teste de ELISA, 131 (56,71%) amostras foram positivas. Ressalta-se a semelhança entre os resultados positivos nos testes Dot Blot e ELISA.

Tabela 1 - Distribuição da frequência do teste Dot Blot, IDR e ELISA de moradores de área endêmica para PCM em Alfenas, MG.

Variáveis		Nº de indivíduos	%
Teste Dot Blot	Positivo	133	57,58
	Negativo	98	42,42
	Total	231	100
ELISA	Positivo	131	56,71
	Negativo	100	43,29
	Total	231	100
IDR	Positivo	159	68,83
	Negativo	72	31,17
	Total	231	100

Fonte: do autor

Dos 103 indivíduos masculinos, 64,08% (66) foram positivos no teste de Dot Blot e dos 128 indivíduos femininos, 52,34% (67) eram do sexo feminino (TABELA 2).

Tabela 2 - Distribuição da frequência do teste Dot Blot positivos e negativos por gênero masculino e feminino de moradores de área endêmica para PCM em Alfenas, MG.

Dot Blot	Gênero		Total
	Masculino	Feminino	
Positivo	66 (64,08%)	67 (52,34%)	133 (57,58%)
Negativo	37 (35,92%)	61 (47,66%)	98 (42,42%)
Total	103 (44,59%)	128 (55,41%)	231 (100%)

Fonte: do autor

A TABELA 3 mostra a distribuição do teste de Dot Blot por faixa etária. Dos indivíduos positivos no teste de Dot Blot 11,69% (27) tinham entre 11 e 29 anos, 24,24% (56) tinham entre 30 e 49 anos e 21,64% (50) dos indivíduos tinham mais que 50 anos de idade. A proporção de indivíduos negativos na faixa etária de 11 a 29 anos foi de 20 indivíduos (8,66%), na faixa etária de 30 a 49 anos, 48 indivíduos (20,78%) e na faixa etária igual ou maior que 50 anos, 30 (12,99%) respectivamente (TABELA 3).

Tabela 3. Distribuição da frequência do teste Dot Blot positivos e negativos por faixa etária de moradores de área endêmica para PCM em Alfenas, MG.

Faixa etária	Dot Blot		Total
	Positivo	Negativo	
11-29 anos	27 (11,69%)	20 (8,66%)	47 (20,35%)
30-49 anos	56 (24,24%)	48 (20,78%)	104 (45,02%)
> = 50 anos	50 (21,64%)	30 (12,99%)	80 (34,63%)
Total	133 (57,58%)	98 (42,42%)	231 (100,00%)

Fonte: do autor

A concordância entre os resultados positivos e negativos nos testes de Dot Blot e ELISA e nos teste Dot Blot e o teste intradérmico pode ser observada nas TABELAS 4 e 5 respectivamente.

Foi observada uma concordância de 59,31% entre os resultados positivos e negativos entre os testes de Dot Blot e ELISA e uma discordância 40,69% (TABELA 4) ($P < 0,05$).

Por sua vez, pode ser observada uma concordância de 48,92 % entre os resultados positivos e negativos entre os testes de Dot Blot e IDR e uma discordância 51,08% (TABELA 5).

Tabela 4 - Comparação entre o teste Dot Blot e o teste de ELISA de moradores de área endêmica para PCM em Alfenas, MG.

ELISA	Dot Blot		Total	P
	Negativos	Positivos		
Negativos	52 (22,51%)	48 (20,78%)	100 (43,29%)	P= 0,0111
Positivos	46 (19,91%)	85 (36,80%)	131 (56,71%)	
Total	98 (42,42%)	133 (57,58%)	231 (100%)	

Fonte: do autor

Tabela 5 - Comparação entre o teste Dot Blot e o teste intradérmico (IDR) de moradores de área endêmica para PCM em Alfenas, MG.

Dot Blot	IDR		Total	P
	Negativos	Positivos		
Negativos	26 (11,26%)	72 (31,17%)	98 (42,42%)	P= 0,1997
Positivos	46 (19,91%)	87 (37,66%)	133 (57,58%)	
Total	72 (31,17%)	159 (68,83%)	231 (100%)	

Fonte: do autor

Foi utilizado um cálculo de coeficiente de correlação interclasses – Kappa – para verificação da concordância entre os métodos conforme VIEIRA e GARRET (2005).

A análise do teste de Kappa realizada entre os testes de ELISA e Dot Blot e entre os testes de Dot Blot e IDR é apresentada nas tabelas 6 e 7 respectivamente.

Foi obtido um Kappa no valor de 0,1693 entre o teste de ELISA e Dot Blot, sugerindo um acordo ligeiro (TABELA 6).

Por sua vez, a análise do teste de Kappa realizada entre os testes de ELISA e o teste intradérmico foi de -0,0835, sugerindo não haver acordo entre os testes (TABELA 7).

Tabela 6 - Comparação entre os resultados dos testes de Dot Blot e ELISA pelo teste de Kappa.

Concordância	Concordância esperada	Kappa	Erro padrão	Z	Prob>Z
59,31%	51,02%	0,1693	0,0658	2,578	0,0050

Fonte: do autor

Tabela 7 - Comparação entre os resultados dos testes de Dot Blot e IDR pelo teste de Kappa.

Concordância	Concordância esperada	Kappa	Erro padrão	Z	Prob>Z
48,92%	52,85%	-0,0835	0,0639	-1,31	0,904

Fonte: do autor

6 DISCUSSÃO

A paracoccidioidomicose causada pelo *P.brasiliensis* é uma doença sistêmica que se concentra na América do Sul e Central (LACAZ et al., 2002). O Brasil responde por 80% dos casos relatados (BRUMMER, CASTAÑEDA, RESTREPO, 1993). Quando diagnóstica tardiamente e não tratada de forma adequada pode ocasionar em graves sequelas e mesmo em óbito (MARQUES, 2007; PALMIEIRO; CHERUBINI; YURGEL, 2005).

A infecção por *P.brasiliensis* é caracterizada por um longo período de latência, e na maioria dos casos, a doença se manifesta após décadas. (PALMIEIRO; CHERUBINI; YURGEL, 2005). A maior frequência de PCM é no sexo masculino. O teste cutâneo demonstra que em área de endemicidade o contato com o *P. brasiliensis* é importante durante as primeiras duas décadas de vida (BRUMMER, CASTAÑEDA, RESTREPO, 1993).

Existe uma alta prevalência de PCM-infecção em várias regiões do Brasil. Noroeste do Paraná com 43% (FORNAJEIRO et al, 2005), Ibiá, na microrregião do alto Paranaíba em Minas Gerais com 49,5% (SILVA-VERGARA; MARTINEZ, 1998) e em Alfenas, região do sul de Minas Gerais, moradores de comunidades rurais apresentaram uma positividade de 46.67% (MAGALHÃES et al., 2014).

Como mostrado anteriormente, os testes sorológicos podem ser utilizados no diagnóstico auxiliar da PCM. No entanto, nenhum deles apresentou ainda capacidade de diagnóstico precoce e ausência de reações cruzadas em um mesmo teste. Por sua vez, Taborda; Camargo (1994) mostraram que o ensaio de Dot Blot demonstrou ser um teste rápido, de fácil leitura visual, com uma sensibilidade e especificidade de 100% e barato, apresentando eficácia para o uso no diagnóstico de PCM e acompanhamento de terapia antimicótica, inclusive para estudos soropidemiológicos.

Dentro desse contexto, esse trabalho teve como objetivo avaliar o teste de Dot Blot em área endêmica para PCM em comparação com os testes de ELISA e IDR. Para tanto, uma coorte constituída de 231 indivíduos foi selecionada a partir do levantamento realizado por Magalhães et al., (2014). A Figura 13 mostra o resultado de uma membrana representativa do teste de Dot Blot após padronização. Pode ser observado “dots” com coloração marrom intensa até “dots” sem coloração, sugerindo

que esta variação na intensidade de cor entre “dots” reflita a quantidade de anticorpos presentes nas amostras de soros. Pode ser observado que o controle sem amostra (branco) sempre permaneceu sem coloração e a grande diferença entre o controle positivo e o negativo. Neste último, detectou-se uma pequena coloração.

A TABELA 1 indica uma positividade de 57,58% no Dot Blot, 56,71% no teste de ELISA e 68,83% para o teste de IDR respectivamente. O percentual de positivos dos testes sorológicos são próximos e menores do que o percentual da IDR. O uso da ureia no teste ELISA pode eliminar as interferências causadas por anticorpos de ligação mais fraca, ou seja, anticorpos inespecíficos, reduzindo as ligações inespecíficas como proposto por NAMUJJU et al., (2011) e RAHBARI et al., (2012).

Entre os pesquisados, a quantidade de mulheres 128 (55,41%) foi maior que homens 103 (44,59%), pois a procura pelo serviço oferecido foi maior entre o sexo feminino. Entretanto, no ensaio Dot Blot 64,07% dos indivíduos positivos eram do gênero masculino e 52,34% eram do gênero feminino (TABELA 2). BAGATIN (1986) realizou um inquérito epidemiológico com paracoccidioidina na população rural de Sorocaba e obteve em uma positividade de 66,7% no gênero masculino e 57,7% no gênero feminino. Há que se considerar o tempo de exposição ao fungo, pois segundo CARALDINA; MAGALDI (1974), a prevalência é maior no sexo masculino devido ao maior tempo de exposição. Outros estudos de inquéritos epidemiológicos não observaram diferença significativa entre gêneros na infecção, o que é diferente da PCM doença, onde a proporção de homens é maior devido às mulheres terem um fator protetivo hormonal (SHANKAR et al., 2011).

Com relação às faixas etárias, o ensaio Dot Blot revelou a menor concentração de positivos 27 (11,69%) está na faixa etária mais jovem (11-29 anos). A faixa etária entre 30-49 anos com 56 (24,24%) de positivos e a faixa etária acima de 50 anos com 50 (21,64%) dos positivos (TABELA 3) demonstra um resultado correlato da literatura, em que a maior soroprevalência de PCM-infecção está entre os homens adultos entre 30 e 50 anos de vida (PALMIEIRO; CHERUBINI; YURGEL, 2005).

Com relação às faixas etárias esse estudo apontou um percentual de 79,7% positivos com idade acima da 3ª década de vida. Esses valores são compatíveis com a literatura epidemiológica da doença, pois BLOTTA et al (1999) estabelecem a

maior incidência entre os 41 e 50 anos nos homens. FORNAJEIRO et al., (2005) situam o predomínio da infecção entre a 3ª e 5ª década de vida e os dados de BITTENCOURT et al, (2005) corrobora essa faixa de maior incidência e também conclui que a maior mortalidade está nessa faixa etária.

Segundo MALUF et al (2003), a progressão de infecção para doença depende de fatores relacionados tanto ao agente quanto ao hospedeiro e pode ocorrer depois de vários anos. Dessa forma, as manifestações clínicas da micose apresentam-se, na maioria das vezes, em pessoas acima dos 30 anos, apesar do contato inicial do hospedeiro com o fungo ter ocorrido durante as primeiras décadas de vida.

A concordância entre os resultados positivos e negativos nos testes de Dot Blot e ELISA e nos teste Dot Blot e o teste intradérmico (TABELAS 4 e 5 respectivamente) mostram uma maior concordância entre o teste Dot Blot e ELISA, dados corroborado pelo cálculo de coeficiente de correlação interclasses, Kappa, sugerindo haver um acordo ligeiro entre o teste Dot Blot e ELISA e nenhum entre o teste Dot Blot e o teste intradérmico (TABELAS 6 e 7 respectivamente).

De acordo com PAPAGGIANIS; ZIMMER (1990), na coccidioidomicose, outra doença fúngicas sistêmica, não se deve descartar a possível ocorrência de doença quando há uma sorologia positiva juntamente a uma resposta imune celular negativa. Contudo, pode ocorrer uma resposta imune celular positiva durante muito tempo sem a presença de sorologia detectável, mas nesse caso pode se descartar a doença fúngica, salvo casos que o indivíduo tem uma imunossupressão instalada. Portanto, na amostra pesquisada nesse estudo não se pode descartar a presença de indivíduos com ausência de resposta imune celular e presença de anticorpos contra *P. brasiliensis*, mas também não se pode descartar que a IDR positiva pode não ser contra o *P. brasiliensis* e sim uma reação cruzada com outros fungos como o *Histoplasma capsulatum*. A possível reação cruzada com outros fungos deve ser questionada, pois autores como DIOGENES (1990); ANDRADE (1984); FERREIRA da CRUZ, (1991); ZEMBRZUSKI (1996) sugerem a ocorrência de possível reação cruzada como outros fungos, principalmente *Histoplasma capsulatum*. Assim, o nível de discordância observado poderia ser atribuído a reações cruzadas (CAMARGO, 2008).

As citocinas e o padrão da resposta imune do indivíduo poderiam contribuir tanto para a resistência quanto para a susceptibilidade a infecção (BORGES et al, 2002). É sabido que a resposta humoral não desempenha um papel importante na

defesa dos organismos infectados (BORGES, 2002). Pesquisas com formas agudas da doença (BENARD, 1997) e em modelos experimentais (CALICH et al., 1998) demonstram que ambos produzem grandes quantidades de anticorpos específicos.

A não concordância entre os testes de Dot Blot e IDR podem ser explicados pela dissociação da resposta humoral da resposta celular específica para a PCM. Praticamente todos os pacientes com doença têm níveis de anticorpos detectáveis anti-gp70 KDa e anti-gp43 KDa na circulação. Assim pode-se visualizar a resposta em dois padrões imunes não interferentes na secreção de citocinas. Primeiro uma resposta Th1 que favorece as respostas mediadas por células e depois uma resposta Th2 favorece a resposta humoral. Essa hipótese sugere que pacientes com PCM-doença desenvolvem uma predominância resposta imune tipo Th2. Predominantemente esses pacientes tem usualmente eosinofilia, hipergamaglobulenemia e altos níveis de anticorpos IgE específicas, cujas características são típicas desse modelo de resposta. Entretanto, recentemente foi sugerido que citocinas pró-inflamatórias podem também participar das alterações imunoregulatórias dos pacientes com PCM (MENDES GIANINI et al., 1997).

Acredita-se que uma resposta celular prejudicada é causada pela própria doença (BRUMMER, CASTAÑEDA, RESTREPO, 1993) e uma forte evidência para isso é que após o tratamento, a resposta celular volta a ser boa (MOK, 1977). Em áreas endêmicas, o indivíduo é exposto recidivamente ao fungo e assim seu sistema imune é desafiado diversas vezes ao longo do tempo produzindo títulos mensuráveis de anticorpos.

Vale ressaltar que a produção de antígenos tem um importante papel na qualidade do imunoensaio (CAMARGO, 2008). No trabalho original, TABORDA; CAMARGO (1994) empregaram a gp43 purificada e tratada com metaperiodato de sódio e nos trabalhamos com uma suspensão rica em gp 43. Este antígeno exocelular e imunodominante é relatado como o mais expressivo na espécie do *P. brasiliensis* (PUCCIA et al., 1986). Porém, a gp43, não é uma molécula totalmente específica, pois sua fração carboidrato contém epítomos capazes de serem reconhecidos por soros heterólogos, principalmente, soros contendo anticorpos anti – *Histoplasma capsulatum* (PUCCIA; TRAVASSOS, 1991).

Os resultados observados demonstram uma elevada prevalência da sensibilização cutânea ao *P. brasiliensis* em áreas rurais do município de Alfenas-MG, estabelecendo a região como uma área endêmica. O teste Dot Blot é apenas

qualificativo e discrimina como positivo aquele paciente que tem títulos significativos contra o *P.brasiliensis* e semelhantes ao obtido pelo método de ELISA. No entanto, nossos estudos são necessários para uma melhor padronização do teste Dot Blot.

7 CONCLUSÃO

Foram obtidos resultados semelhantes entre os testes de Dot Blot e de ELISA. Devido a dificuldade na padronização no Dot Blot e a uma melhor reprodutibilidade e rapidez do teste de ELISA, os resultados sugerem que o teste de ELISA seja mais adequado para levantamento da prevalência da PCM em áreas rurais.

REFERENCIAS

ALBORNOZ M. B. Paracoccidioidomicosis-Infecção. In: DEL NEGRO G., LACAZ C.S., FIORILLO A.M; **Paracoccidioidomycose. Blastomycose sul-americana**, São Paulo, Sarvier–Edusp, 1982, p. 91-96.

ANDRADE et al. Inquérito Com Paracoccidioidina Em Uma População Da Bahia (Brasil), **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**;v. 26 n.1, p.1-16, 1984.

ANGULO-ORTEGA A. Calcifications In Paracoccidioidomycosis: Are They The Morphological Manifestation Of Subclinical Infection? In: **Paracoccidioidomycosis. PAHO**. Pan American Health Organization, Washington, n. 254, p 129-133, 1972.

BAGATIN, E. Inquérito Epidemiológico Com A Paracoccidioidina, Na Região De Sorocaba, Estado De São Paulo; **Anais Brasileiros de Dermatologia** v. 61, n. 1, p. 5-8. 1986.

BENARD et al. Immunosuppression In Paracoccidioidomycosis: T Cell Hyporesponsiveness To Two Paracoccidioides Brasiliensis Glycoproteins That Elicit Strong Humoral Immune Response. **The Journal Infetious Diseases**, v.175. p.1263-1267. 1997.

BENARD G. An Overview Of The Immunopathology Of Human Paracoccidioidomycosis, **Mycopathologia**, v. 165, p 209–221, 2008.

BITTENCOURT, J. I. M.; OLIVEIRA, R. M.; COUTINHO Z. F.; Mortalidade Por Paracoccidioidomycose No Estado Do Paraná, Brasil, 1980/1998. Rio de Janeiro: **Cad. Saúde Pública**. v. 21, n.6, nov / dez. 2005

BLANCO et al. Differential Pbp27 Expression In The Yeast And Mycelial Forms Of The Paracoccidioides Brasiliensis Species Complex, **Fungal Genetics and Biology** n. 48, p 1087–1095, 2011.

BLUMER, SO JALBERT M., KAUFMAN L. Rapid And Reliable Method For Production Of A Specific Paracoccidioides Brasiliensis Immunodiffusion Test Antigen. **Journal Of Clinical Microbiology**, p. 404-407, 1984.

BLOTTA et al. Endemic Regions Of Paracoccidioidomycosis In Brazil: A Clinical And Epidemiologic Study Of 584 Cases In The Southeast Region, **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v.61, n.3, p. 390–394,1999.

BOBBITT J. M.; Periodate Oxidation Of Carbohydrates; **Adv. Carbohydr. Chem.**; v. 48, n. 11, p. 1-41, 1956.

BORGES et al,. The Pathobiology Of Paracoccidioides Brasiliensis. **TRENDS in Microbiology**, v.10, n.2, Febr 2002.

BRUMMER, E., CASTAÑEDA, E. & RESTREPO, A.; Paracoccidioidomycosis: An Update; **Clinical Microbiology Rev.**; v. 6, n. 2, p. 89-117, ISSN 0893-8512, 1993.

CALICH, V.L.G. et al. Immunity to Paracoccidioides brasiliensis infection. **Res. Immunol**, p. 407–417, 1998.

CAMARGO, Z. P., J. L. GUESDON, E. DROUHET, AND L. IMPROVISI. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) In The Paracoccidioidomycosis. Comparison With Counterimmunoelectrophoresis And Erythroimmunoassay. **Mycopathologia** v.88, p.31-37. 1984.

CAMARGO, Z. P. Serology Of Paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**. v. 165, p. 289-302, 2008.

CAÑO, L.E.; RESTREPO, A.; Predictive Value Of Serologic Tests In The Diagnosis And Follow-Up Of Patients With Paracoccidioidomycosis. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, n. 29, p. 276-283, 1987.

CARANDINA; MAGALDI. Inquérito Sobre Blastomicose Sul-Americana Pela Intradermo Reação Em Uma Comunidade Rural Do Município De Botucatu, Sp (Brasil). Revista de Saúde Publica de São Paulo. v.8, n.2, p.171-80, 1974.

CASOTTO, M.J.; Characterization Of The Cellular Antigens Of Paracoccidioides Brasiliensis Yeast Form; **Clin Microbiol.**; v. 28, n. 6, p. 1188-93, junho, 1990.

CRUZ, M.F.F.; CASTRO B.G.; RIBEIRO C.T.D.; Sensitive Immunoradiometric Assay For The Detection Of Paracoccidioides Brasiliensis Antigens In Human Sera; **Journal Clinical Microbiology**; v. 29, p. 1202-1205, 1991.

CORREA, MM, BEDOYA AM, GUERRERO MP, MÉNDEZ J, RESTREPO A, MCEWEN JG. Mycoses. Diagnosis Of Paracoccidioidomycosis By A Dot Blot Assay Using A Recombinant Paracoccidioides Brasiliensis P27 Protein, v.50, n.1, p.41-7. Jan. 2007.

DEL NEGRO, G.M.B et al; The Sensitivity, Specificity And Efficiency Values Of Some Serological Tests Used In The Diagnosis Of Paracoccidioidomycosis; **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.33, n.4, p. 277-280, 1991.

DIÓGENES, M. J. N. et al; Reações À Histoplasmina E Paracoccidioidina Na Serra De Pedreiro (Estado Do Ceará-Brasil). **Rev. Inst. Med. trop**, v. 32, n. 2, p. 116-120, São Paulo, mar./abr. 1990.

FAVA-NETO; RAPHAEL Fava-Netto, C.. Contribuição Para O Estudo Imunológico Da Blastomicose De Lutz. **Rev. Inst. Adolpho Lutz**. v.21, p.99-194. 1961.

FORNAJEIRO, N. et. al. Inquérito Epidemiológico Sobre A Paracoccidioidomicose Utilizando A Gp43 Em Dois Municípios Do Noroeste Do Paraná, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p.191-193, mar./abr. 2005.

FORTES et al, Immunology Of Paracoccidioidomycosis, **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n.3, p. 516-25, 2011.

FRANCO C.S.; LACAZ A.; RESTREPO A.; DEL NEGRO G.M.B.; **Paracoccidioidomycosis**. CRC Press. Boca Raton, 1994.

FRANCO M.; Host-Parasite Relationships In Paracoccidioidomycosis; **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 25, p. 5-18, 1986.

FRANCO, M. et al. Paracoccidioidomycosis: A Recently Proposed Classification Of Its Clinical Forms. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 20, n. 2, p. 129-132, abr./jun. 1987.

LACAZ C.S. et al; Paracoccidioidomicose; In: LACAZ C.S.; PORTO E.; MARTINS J.E.C.; HEINS-VACCARI E.M. TAKAHASHI DE MELO, N.; **Tratado de Micologia Médica Lacaz**, v. 9, p. 639-729, Sarvier, Sao Paulo, Brasil, 2002.

LANDIS JR, KOCH GG.The Measurement Of Observer Agreement For Categorical Data. **Biometrics**; v.33, p.159-174, 1977.

LONDERO A.T. et al; A Prova De Dupla Difusão Em Gel De Ágar No Diagnostico Da Paracoccidioidomicose; **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul**, v. 25, p. 272-275, 1981.

LONDERO A.T.; WANKE B.; Epidemiology and Paracoccidioidomycosis Infection; In: FRANCO M.; LACAZ C.S.; RESTREPO-MORENO A.; DEL NEGRO G.; **Paracoccidioidomycosis**. CRC Press, Boca Raton, 1994, p. 109-120.

KALMAR E.M et al. Paracoccidioidomycosis: An Epidemiologic Survey In A Pediatric Population From The Brazilian Amazon Using Skin Tests. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* V. 71, p.82-86. 2004.

NAMUJJU P. B et al. Low Avidity Of Human Papillomavirus (HPV) Type 16 Antibodies Is Associated With Increased Risk Of Low-Risk But Not High-Risk HPV Type Prevalence. **BMC Research Notes**, v. 4, p.170, jun. 2011.

MAGALHAES, E. M. S. et al. Prevalence Of Paracoccidioidomycosis Infection By Intradermal Reaction In Rural Areas In Alfenas, Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, p. 281-285, 2014.

MALUF, L. F. et. al; Prevalência De Paracoccidioidomicose-Infecção Determinada Através De Teste Sorológico Em Doadores De Sangue Na Região Noroeste Do Paraná, Brasil; **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v.36, n.1, p. 11-16, jan./fev. 2003.

MANGIATERRA M.L et al. Paracoccidioides Brasiliensis Infection In A Subtropical Region With Important Environmental Changes. **Bull Soc Pathol Exot.** V.92, n.3, p.173-6, Jul.1999.

MARQUES S. A. Paracoccidioidomicose: Atualização Epidemiológica, Clínica E Terapêutica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n.2, p. 135-150, Rio de Janeiro, mar/abr, 2003.

MARQUES Et Al, 2007 Paracoccidioidomicose: Frequencia, Morfologia E Patogenese De Lesoes Tegumentares, **An Bras Dermatol.** V.82, N.4, P.411-417, 2007.

MARTINEZ, R.; MOYA M. J.; Associação Entre Paracoccidioidomicose E Alcoolismo; **Revista de Saúde Pública**, v. 26, n.1, p. 12-16, São Paulo, 1992.

MATUTE D.R. et al; Microsatellite Analysis Of Three Phylogenetic Species Of Paracoccidioides Brasiliensis; **Journal Clinical of Microbiology**, v.44, n. 6, p. 2153-2157, 2006.

MENDES-GIANNINI M.J.S et al; Interaction Of Pathogenic Fungi With Host Cells: Molecular And Cellular Approaches; **FEMS Immunology and Medical Microbiology**; v. 45, p. 383–394, 2005.

MENDES-GIANNINI M.J.S et al. Immunosuppression In Paracoccidioidomycosis: T Cell Hyporesponsiveness To Two Paracoccidioides Brasiliensis Glycoproteins That Elicit Strong Humoral Immune Response. **Journal Infectology Disease**, v. 175, n. 5, p. 1263-7, maio, 1997.

MENDES-GIANNINI, M.J.S et al; Interactions Of *Paracoccidioides Brasiliensis* With Host Cells: Recent Advances; **Mycopathologia**, v. 165, p. 237–248, 2008.

MOK P.W.V; Greer, D.L. Cell Mediated Immune Responses In Patients With Paracoccidioidomycosis. **Cli. Exp Immunol**, v. 28, p. 89-92, 1977.

NOYA, B. A. et al; *Schistosoma Mansoni*: Immunodiagnosis Is Improved By Sodium Metaperiodate, Which Reduces Cross-Reactivity Due To Glycosylated Epitopes Of Soluble Egg Antigen; **Exp. Parasitol**, v. 95, p. 106–112, 2000.

PALMIEIRO M.; CHERUBINI K.; YURGEL L.S.; Paracoccidioidomycose – Revisão da Literatura; **Scientia Medica**, v.15, n. 4, p. 274-278, out./dez. 2005.

PUCCIA, R. et. al. Exocellular Components Of *Paracoccidioides Brasiliensis*: Identification Of A Specific Antigen; **Infect. Immuno**, v.53, p.199-206, 1986.

PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L. R. 43-Kilodalton Glycoprotein *Paracoccidioides Brasiliensis*: Immunochemical Reactions With Sera From Patients With Paracoccidioidomycosis, Histoplasmosis And Jorge Lobo`S Disease. **Journal Clinical of Microbiology**; v. 29, p. 2610-2615, 1991.

RAHBARI, A. H. et. al. Igg Avidity ELISA Test For Diagnosis Of Acute Toxoplasmosis In Humans. **Korean Journal Parasitology**. v. 50, n. 2, p. 99-102, jun. 2012.

RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G.; CASTANEDA, E. The Habitat Of *Paracoccidioides Brasiliensis*: How Far From Solving The Riddle? **Medical Mycology**, v. 39, n. 3, p. 233-41, jun. 2001.

RESTREPO, A. et al. Paracoccidioidomycose. In: KAUFFMAN, C.A. Et Al. (Editores). **Essentials of Clinicals Mycology**. Springer, v.2, p. 367-85. New York, 2011.

ROSEMBERG J. Tabagismo, Sério Problema De Saúde Pública, v.2, Editora e Livraria Almed Ltda, 1987.

SAN-BLAS G. Paracoccidioidomycosis And Its Etiologic Agent Paracoccidioides Brasiliensis, **Journal of Medical and Veterinary Mycology** v. 31, p. 99-113, 1993.

SANTOS W. A. et al. Associação Entre Tabagismo E Paracoccidioidomicose, **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 1, p. 245-253, jan-fev, 2003.

SARAIVA, E. C. O. et al. *Paracoccidioides Brasiliensis*-Gp43 Used As Paracoccidioidin. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 34, n. 3, p. 155-61, jun./jul. 1996.

SEVERO L.C. et al; The Primary Pulmonary Lymph Node Complex In Paracoccidioidomycosis; **Mycopathologia** v. 67, p.115-118, 1979.

SHANKAR J. et al. Hormones And The Resistance Of Women To Paracoccidioidomycosis, **Clinical Microbiology Reviews**, p. 296–313 Abr. 2011.

SHIKANAI-YASUDA M.A. et al, Guideliness in paracoccidioidomycosis; **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 39, n.3, p. 297-310, mai-jun, 2006.

Silva-Vergara, M. L.; Martinez, R. Inquérito Epidemiológico Com Paracoccidioidina E Histoplasmina Em Área Agrícola De Café Em Ibiá, Minas Gerais, Brasil. **Revista Iberoamericana De Micologia**, v. 15, n. 4, p. 294-7, Dez 1998.

SIMON et al., Reliability Of Western Blotting For The Confirmation Of HIV-1 Seroconversion, **The Lancet**, v. 340, p.1541 - 1542, 1992.

SIQUEIRA, A.M. Avaliação Da Sensibilidade E Especificidade De Algumas Provas Sorológicas No Diagnóstico, Prognóstico E Controle De Cura Da Paracoccidioidomicose. Caracterização Imunoquímica Do Antígeno E Do Paracoccidioides Brasiliensis. 2014. Tese de doutorado apresentada ao **Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo**. São Paulo, 1982.

TABORDA C.P., CAMARGO, Z. P. Monoclonal Antibody Capture Enzyme Immunoassay For Detection Of Paracoccidioides Brasiliensis Antibodies In Paracoccidioidomycosis; **Journal Clinical of Microbiology**, v. 32, n. 10, p. 2377-2381, 1994.

TEIXEIRA, M. M. et al. Phylogenetic Analysis Reveals A High Level Of Speciation In The Paracoccidioides Genus; **Mol Phylogenet Evol.** v. 52, n. 2, p. 273-283, ISSN1095-9513; 2009.

VALLE, A.C.F.; COSTA R.L.B; Paracoccidioidomicose. In: BATISTA, K.S.; IGREJA R.P.; GOMES A.D.; HUGGINS D.W; **Medicina Tropical: Abordagem Atual Das Doenças Infecciosas E Parasitárias.** Cultura Médica, p. 943-958, Rio de Janeiro, 2001.

VICENTINI A. P., Binding Of Paracoccidioides Brasiliensis To Laminin Through Surface Glycoprotein Gp43 Leads To Enhancement Of Fungal Pathogenesis, **Infection and Immunity**, p.1465-1469, Abr. 1994.

VIEIRA, A.J.; GARRETTJ.M., Understanding Interobserver Agreement: The Kappa Statistic, **Fam Med.** V.37, n.5, p.360-363, 2005.

ZEMBRZUSKI M.M. et al. Inquérito Com Histoplasmina E Paracoccidioidina Em Duas Regiões Do Rio Grande Do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 28:1-3, 1996.

APENDICE

APENDICE A – Ficha Cadastral

Estudo: “ANÁLISE DA PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO PELO *Paracoccidioides brasiliensis* EM ÁREAS RURAIS DE ALFENAS, MINAS GERAIS”

Dados do paciente

Nome: _____

Idade: _____ Sexo: _____ Estado civil : _____

Profissão e dados relativos à mesma: _____

Endereço: _____

Telefone: _____ Localidade: _____

Agravos: _____

Medicação: _____

Dados Laboratoriais

IDR: Negativo: Positivo: (_____ mm data: _____)

IDD: Negativo: Positivo: (titulação: _____ data: _____)

ELISA: Negativo: Positivo: (D.O.: _____ data: _____)

Rx: _____

Hemograma: _____

Diagnóstico Negativo: Positivo:

Forma clínica: _____

Tempo aproximado da micose ou da suspeita: _____

Tratamento (Início – Duração –Terapêuticacomplicações): _____

APENDICE B - TCLE (Termo De Consentimento Livre E Esclarecido)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ANÁLISE DA PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO PELO *Paracoccidioides brasiliensis* EM ÁREAS RURAIS DE ALFENAS, MINAS GERAIS

A Paracoccidioidomicose é uma doença causada por fungo, endêmica em cidades localizadas no Sul de Minas Gerais, tornando-se grave quando não tratada precocemente. A UNIFAL-MG recebe vários pacientes com suspeita de infecção funcionando como referência diagnóstica na região. Este trabalho visa à identificação de portadores da doença e indivíduos infectados assintomáticos. Desta forma poder-se-á avaliar a realidade, contribuir para adoção de medidas preventivas, bem como encaminhar os infectados para tratamento e/ou acompanhamento. Este último para os indivíduos infectados assintomáticos.

A identificação se fará pelo teste intradérmico, injetando 0,1 mL de solução de antígeno bruto no terço médio ventral do antebraço, na camada mais superficial da pele. Neste local se formará imediatamente uma pequena pápula, com aspecto de casca de laranja que desaparecerá posteriormente. Após dois dias (48 horas) será feita a leitura devendo os participantes retornar ao local do exame no horário previamente estabelecido. De acordo com os resultados serão realizadas as primeiras orientações e encaminhamentos. Para realização do teste será utilizada proteína antigênica, previamente preparada para testes intradérmicos pelo Prof. Zoilo Pires de Camargo da UNIFESP (Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina). O teste não traz qualquer risco para os participantes.

Com base nos motivos expostos para esta pesquisa, pelo presente instrumento que atende as _____ exigências _____ legais, eu, _____

_____, portador da cédula de identificação nº _____, ou certidão de nascimento nº _____, (ou _____ responsável pelo menor) _____

_____, após leitura e entendimento do termo de consentimento livre e esclarecido, devidamente explicado, detalhadamente, ciente dos serviços e procedimentos aos quais serei submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito, firmo meu Consentimento Livre e Esclarecido em concordância de participar do trabalho proposto, no que lhe é cabível, sem remuneração, conforme este documento. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa, da Universidade Federal de Alfenas, com o certificado **CAAE: 23087.004231/2008-41**.

Fica claro que como participante ou representante legal posso a qualquer momento retirar meu consentimento livre e esclarecido e deixar de participar deste estudo, e estou ciente de que todo trabalho realizado torna-se informação confidencial guardada por força do sigilo profissional. Permito apenas a divulgação dos dados sem minha identificação para fins acadêmicos em eventos científicos e periódicos.

Recebi essas informações anteriormente aos procedimentos pela acadêmica responsável juntamente com o convite para participar deste projeto.

Por estarem entendidos e confirmados, assinam o presente termo

Alfenas, ___/___/___

Assinatura do participante

Assinatura do acadêmico(a)

ANEXO

ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 - Alfenas/MG - CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000 - Fax: (35) 3299-1063




COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

DECLARAÇÃO

Declaro para todos os fins que o projeto intitulado "COMPARAÇÃO ENTRE OS ENSAIOS DE DOT BLOT E ELISA PARA O DIAGNÓSTICO DE PARACOCCIDIOIDOMICOSE" foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unifal-MG, recebendo o parecer **APROVADO**, conforme registro em Ata da 81ª. Reunião, de 08 de fevereiro de 2011, protocolo N^o 119/2010.

Alfenas, 09 de fevereiro de 2011.


Prof. Dra. Máisa Ribeiro Pereira Lima Brigagão
Coordenador do CEP