

ALINE ALVES DE LIMA SILVA

Avaliação imuno-histoquímica de elementos da resposta
imune e metaloproteinases em lesões cutâneas verrucosas
na cromoblastomicose

São Paulo

2018

ALINE ALVES DE LIMA SILVA

Avaliação imuno-histoquímica de elementos da resposta
imune e metaloproteinases em lesões cutâneas verrucosas
na cromoblastomicose

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutora em
Ciências

Programa de Dermatologia

Orientadora: Dra. Carla Pagliari

Versão Corrigida conforme resolução CoPGr6018/11

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Aline Alves de Lima
Avaliação imuno-histoquímica de elementos da
resposta imune e metaloproteinases em lesões
cutâneas verrucosas na cromoblastomicose / Aline
Alves de Lima Silva. -- São Paulo, 2018.
Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.
Orientadora: Carla Pagliari.

Descritores: 1.Cromoblastomicose 2.Células
dendríticas 3.Macrófagos 4.Matriz extracelular
5.Fonsecaea pedrosoi 6.Fonsecaea nubica 7.Imuno-
histoquímica

USP/FM/DBD-409/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Aos meus pais e

à todos os pacientes envolvidos neste estudo

AGRADECIMENTOS

O doutoramento traz consigo inquestionável aprimoramento profissional, mas de modo particular me permitiu muito mais, propiciou encontros e estreitamento de laços com seres humanos excepcionais, os quais faço questões de registrar aqui minha gratidão.

Agradeço primeiramente à *Deus* por permitir que eu tenha vivido cada uma das experiências que tive até o presente momento, por ter me presenteado com cada uma das pessoas e instituições que, cada qual à sua maneira, agregou tanto à minha jornada individual.

Aos meus pais, *Cicero* e *Diva*, por terem feito por mim sempre o melhor que podiam com as condições que possuíam. Pelo amor e incentivo infindáveis.

À minha irmã, *Jaqueline*, por quem tenho profunda admiração. Obrigada por me ouvir, orientar, ensinar e me mostrar que nossos laços não são simplesmente sanguíneos, são de alma.

Ao meu irmão *Lucas*, por ser exatamente quem você é. Seus desafios e conquistas são também meus, obrigada por me ensinar com a sua existência;

Aos meus sobrinhos *Caio* e *Samuel* por toda a alegria e aprendizado que me trazem. Como é gostoso vê-los crescer, meus amores...

A um dos homens que eu mais admiro na vida e que amo imensuravelmente, *Boris Kim Takamura*. Obrigada por me ensinar sobre as coisas que realmente importam, por ser solo seguro e fértil para que eu floresça, por acreditar nos meus sonhos, por todo esse amor que transborda, puro e plácido. Ah, eu ia me esquecendo: obrigada pela opinião técnica sobre fontes e

tabelas e por me acalmar todas as 954782 vezes em que algo saiu do planejado. Que sorte a minha de tê-lo como companheiro de vida... Amo você!

À minha orientadora, *Dra Carla Pagliari*, pelos oito anos de parceria. Por me presentear com essa casuística que trouxe tantas alegrias em congressos, publicações e na vida como um todo. Pelos inúmeros aprendizados acadêmicos e pessoais, por permitir meu desenvolvimento e os bons encontros que tive na instituição.

À *Profa. Maria Irma Seixas Duarte*, por ceder espaço para a realização desse trabalho, pelos aprendizados, por seu notável amor pela Imunopatologia e a sempre agradável companhia.

À *Profa. Mirian Nacagami Sotto*, pelas valorosas contribuições acadêmicas, por vibrar junto à nós (minha orientadora e eu) com os frutos desse projeto e por sua prazerosa companhia.

Ao *Dr. Paulo Criado* por sua disponibilidade em ajudar na composição dessa casuística, por suas contribuições durante a qualificação e, de modo mais que especial, por ser para mim uma inspiração de profissional, que busca impactar positivamente a vida de seus pacientes.

À *Dra. Elaine Raniero Fernandes*, pelas valorosas contribuições para a melhoria deste trabalho. Mas muito mais que isso, por ser fundamental para a minha formação profissional e por, pessoalmente, me despertar tamanho afeto. Eu a admiro, torço por seu sucesso e felicidade, sempre!

À *Dra. Tania Sueli de Andrade*, pelas valorosas contribuições na qualificação dessa tese. Contribuições tais, que não só agregaram ao presente estudo, como fomentarão futuras investigações.

Ao *Ricardo Spina*, por sua generosa contribuição com o levantamento de prontuários, disponibilização de fotos, intermediação de contatos e sua adorável companhia.

Ao *Wellington Luiz Ferreira da Silva* pela preparação de parte das lâminas desse estudo e por sua disponibilidade em me ensinar a utilizar o programa de captura de imagens e de quantificação.

À *Jaqueline* e à *Cristina*, do Laboratório de Dermatologia do ICHC, pela preparação das lâminas faltantes para a conclusão do estudo.

À secretaria da Dermatologia através da *Dona Eli (in memorian)*, *Márcia Fernandes*, *Ruth Meneses* e *Marcelo Silva* por estarem sempre prontos a me auxiliar no que fosse necessário.

À *Cleusa Takakura* e *Mônica Kauffman*, duas queridas do Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis do Departamento de Patologia da FMUSP que ao longo desses oito anos me propiciaram aprendizados, auxiliaram em situações diversas e me renderam inúmeros risos.

À *Luciane Kanashiro Galo* e à *Tania Barboza* por estarem sempre presente, pelo auxílio, carinho e amizade de valor imensurável.

À *Rosana Cardoso*. Grande facilitadora de assuntos diversos, amiga, presente que a vida me deu. Obrigada por ser luz e alegria na minha vida desde o primeiro dia em que nos vimos e, se depender de mim, continuará sendo por toda a eternidade.

À *Dra Fernanda Guedes*, por lááá no comeciinho ter me dado a oportunidade de aprender imuno-histoquímica e ao longo desses anos me inspirar como exemplo de amizade verdadeira e profissional dedicada.

Ao *Prof Dr. Heitor Franco*, por orientar minha vivência durante dois semestres de estágio na graduação da FMUSP.

Às professoras *Dra. Maria Aparecida Basile* e *Dra. Elisabeth de Souza Nascimento* por despertarem em mim o encantamento pela docência e trazerem mais arte e sensibilidade à minha jornada de vida.

À *Dra. Ana Lúcia Garippo* por gentilmente ceder parte de seu tempo e conhecimentos para que a técnica de fluorescência se tornasse um desejo realizado nesse trabalho.

Ao *Prof. Dr Flavio Queiroz Telles*, por gentilmente permitir a utilização dos dados demográficos atualizados sobre a doença na revisão do presente estudo.

À *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES)* pelo apoio financeiro por meio de bolsa de doutorado.

À *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)* pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa registrado sob o número 2013/07994-1.

Agradeço ainda, a cada *paciente envolvido nesse trabalho*. Gostaria de poder citar um a um e não o faço por razões éticas. Espero, de todo o coração, que os achados aqui apresentados possam, em um futuro próximo, impactar positivamente na vida daqueles que vivem com cromoblastomicose, reaproximando-os do estado saudável.

“Torna-te quem tu és”

Nietzsche

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

RESUMO

SILVA AAL. *Avaliação imuno-histoquímica de elementos da resposta imune e metaloproteinases em lesões cutâneas verrucosas na cromoblastomicose* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

A cromoblastomicose (CBM) é uma micose crônica cosmopolita muito comum em regiões rurais de países subdesenvolvidos, que compõe o grupo de doenças tropicais negligenciadas. Apesar de seu conhecimento centenário muitas são as questões a serem aclaradas, especialmente do ponto de vista imunológico. Em um estudo transversal retrospectivo, avaliamos por imuno-histoquímica células dendríticas, macrófagos polarizados (M1 e M2) e marcadores de matriz extracelular e os comparamos com espécimes hígidos, além de avaliação intragrupal separando as espécies *F. pedrosoi* e *F. nubica*; duas das tantas causadoras de CBM. Os achados evidenciaram participação de CD206⁺, células CD207/IL-17⁺, predomínio de macrófagos M2, degradação da matriz extracelular através de alta expressão de MMP-2, MMP-9, Fibronectina e Laminina, entretanto, os níveis de colágeno IV estão preservados. O compilado de dados nos leva a crer que mediante ao invasor as células de Langerhans e CD207/IL-17⁺ possivelmente se mobilizam para sinalizar a infecção, enquanto macrófagos polarizados contribuem para a captura do patógeno e juntos, células dendríticas e macrófagos, orquestram o estabelecimento da resposta de defesa. Ademais, as incessantes tentativas de contenção da infecção não só não conseguem eliminar o fungo como provocam a degradação da matriz extracelular, contribuindo para a formação de lesões exuberantes e a cronicidade da doença, mantendo tal padrão de resposta quer o patógeno seja a espécie *F. pedrosoi* quanto a *F. nubica*. O presente estudo espera contribuir com a melhor compreensão da imunopatologia da CBM e fomentar a discussão sobre opções terapêuticas mais efetivas em um futuro próximo.

Descritores: cromoblastomicose; células dendríticas; macrófagos; matriz extracelular; *Fonsecaea pedrosoi*; *Fonsecaea nubica*; imuno-histoquímica.

ABSTRACT

SILVA AAL. *Immunohistochemical evaluation of elements of the immune response and Metalloproteinases in Verrucous skin lesions on Chromoblastomycosis* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

The Chromoblastomycosis (CBM) is a chronic and cosmopolitan mycosis very common to rural regions in underdeveloped countries, which makes up the group of neglected tropical diseases. Despite the centennial discovery of the disease, there are many issues to be clarified, especially from the immunological point of view. We evaluated by immunohistochemistry dendritic cells, polarized macrophages (M1 and M2), markers of extracellular matrix from CBM human skin lesions and compared with healthy specimens. In addition, the group of lesions was compared between *F. pedrosoi* and *F. nubica*; two of the many cause of CBM. The findings showed participation of the CD206⁺, cells co-expressing CD207/IL-17⁺, predominance of macrophages M2, degradation of the extracellular matrix through the high expression of MMP-2, MMP-9, Fibronectin and Laminin. However, there is preservation of the levels of Collagen IV. The compiled data leads us to believe that, in contact with the invader, Langerhans cells and CD207/IL-17⁺ cells possibly mobilized to signal infection, while macrophages polarized contribute to the capture of the pathogen and together, dendritic cells and macrophages, orchestrate the establishment of the defense response. Moreover, the incessant attempts to containment of infection not only is unable to eliminate the fungus but also cause the degradation of the extracellular matrix, contributing to the formation of exuberant lesions and the chronicity of the disease, maintaining this pattern of response against both *F. pedrosoi* or *F. nubica*. We believe that our study can contribute to the better understanding of the immunopathology of CBM and encourage the discussion on more effective therapeutic options in the near future.

Descriptors: chromoblastomycosis; dendritic cells; macrophages; extracellular matrix; *Fonsecaea pedrosoi*; *Fonsecaea nubica*; immunohistochemistry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01.	Distribuição geográfica da Cromoblastomicose	23
Figura 02.	Classificação de gravidade das lesões de Cromoblastomicose ...	24
Figura 03.	Coloração de hematoxilina-eosina (HE) em lesões de CBM evidenciando infiltrado inflamatório	42
Figura 04.	Reação imuno-histoquímica em lesões de CBM evidenciando a expressão de CD207	43
Figura 05.	Dupla reação imuno-histoquímica em lesões de CBM evidenciando a expressão concomitante de CD207 e IL-17	44
Figura 06.	Dupla reação imuno-histoquímica por microscopia confocal em lesões de CBM evidenciando a expressão concomitante de CD207 e IL-17	45
Figura 07.	Reação imuno-histoquímica em lesões de CBM evidenciando a expressão de iNOS e pSTAT-1	46
Figura 08.	Reação imuno-histoquímica em lesões de CBM evidenciando a expressão de Arginase-1 e c-Maf	47
Figura 09.	Dupla reação imuno-histoquímica em lesões de CBM evidenciando a expressão concomitante de CD68 e c-Maf	48
Figura 10.	Reação imuno-histoquímica em lesões de CBM evidenciando a expressão de CD206.....	49
Figura 11.	Reação imuno-histoquímica em lesões de CBM evidenciando a expressão de MMP-2	50
Figura 12.	Reação imuno-histoquímica em lesões de CBM evidenciando a presença de MMP-9	51
Figura 13.	Reação imuno-histoquímica em lesões de CBM evidenciando a presença de Laminina	52
Figura 14.	Reação imuno-histoquímica em lesões de CBM evidenciando a presença de Fibronectina	53
Figura 15.	Reação imuno-histoquímica em lesões de CBM evidenciando a presença de Colágeno IV	54
Figura 16.	Conjecturas sobre a imunologia das lesões de cromoblastomicose	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 01.	Relação de anticorpos primários e sistemas de detecção	39
Tabela 02.	Dados demográficos da casuística	41

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01.	Expressão de CD207 entre espécimes de CBM e híidos	55
Gráfico 02.	Expressão de CD207 entre as espécies causadoras de CBM	56
Gráfico 03.	Expressão de macrófagos polarizados M1 e M2 em espécimes totais de CBM	57
Gráfico 04.	Expressão de marcadores citoplasmáticos de macrófagos polarizados entre as espécies causadoras de CBM	58
Gráfico 05.	Expressão de marcadores nucleares de macrófagos polarizados entre as espécies causadoras de CBM.....	59
Gráfico 06.	Expressão de CD206 entre espécimes de CBM e híidos	60
Gráfico 07.	Expressão de CD206 entre as espécies causadoras de CBM	61
Gráfico 08.	Expressão por fração de área dérmica de MMP-2 entre espécimes de CBM e híidos	62
Gráfico 09.	Expressão celular de MMP-2 entre espécimes de CBM e híidos	63
Gráfico 10.	Expressão por fração de área dérmica de MMP-9 entre espécimes de CBM e híidos	64
Gráfico 11.	Expressão celular de MMP-9 entre espécimes de CBM e híidos	65
Gráfico 12.	Expressão por fração de área dérmica de Fibronectina entre as espécies causadoras de CBM	66
Gráfico 13.	Expressão por fração de área dérmica de Laminina entre espécimes de CBM e híidos	67
Gráfico 14.	Expressão por fração de área dérmica de Colágeno IV entre espécimes de CBM e híidos	68
Gráfico 15.	Expressão por fração de área dérmica de Laminina, Colágeno IV e Fibronectina entre as espécies causadoras de CBM	69

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3. REVISÃO DA LITERATURA	22
3.1 Os agentes etiológicos e sua distribuição	22
3.2 As lesões	24
3.3 Diagnóstico e Terapêutica	25
3.4 A Imunologia da Cromoblastomicose	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
5. RESULTADOS	41
5.1 Dados demográficos da amostra	41
5.2 Achados histopatológicos	42
5.3 Achados imuno-histoquímicos	43
5.3.1 Células de Langerhans	43
5.3.2 Macrófagos polarizados	46
5.3.3 Matriz extracelular	50
5.4 Achados quantitativos e estatísticos	55
5.4.1 Células de Langerhans	55
5.4.2 Macrófagos polarizados	57
5.4.3 Matriz extracelular	62
6. DISCUSSÃO	71
6.1 Células de Langerhans	71
6.2 Macrófagos polarizados	74
6.3 Matriz extracelular	77
6.4 As espécies avaliadas	81
6.5 Considerações finais	82
6.6 Limitações do estudo	84
7. CONCLUSÕES	86
REFERÊNCIAS	89
APÊNDICE	
Apêndice 01. Quantificação geral do estudo	97
ANEXOS	
Anexo 01. Aprovação do Comitê de Ética	99

1. *Introdução*

A cromoblastomicose (CBM) é uma infecção fúngica crônica cutânea e subcutânea ¹. Apesar de tratar-se de uma doença cosmopolita o número de casos é expressivamente mais elevado em regiões tropicais e subtropicais, além de acometer especialmente trabalhadores de regiões rurais ².

Desde 2017 a CBM compõe o preocupante grupo das doenças tropicais negligenciadas, cerca de vinte doenças tais como dengue, raiva e hanseníase, cuja classificação expressa a tamanha segregação e esquecimento vividos pelos mais de um bilhão de indivíduos por elas acometidos ³.

O termo “doenças tropicais negligenciadas” foi proposto pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em meados de 2001 com a finalidade de classificar as doenças relativas às populações menos abastadas que encontram-se às margens das ações de instituições governamentais, das agências de saúde e da indústria farmacêutica ⁴.

Indivíduos acometidos por cromoblastomicose não evoluem ao óbito pelo estabelecimento da infecção em si, mas pelas comorbidades que eventualmente podem apresentar^{1,5}, a exemplo de diabetes mellitus, neurocisticercose, imunossupressão induzidas por fármacos e coinfeções por outros agentes ⁶.

Muito embora não seja sinônima ao óbito a doença acarreta dificuldades laborais e, devido ao frequente sangramento e o odor fétido das lesões, resulta em significativos danos biopsicossociais. Fatores que fazem da CBM um estigma social que essas pessoas experienciam por anos a fio ^{1,5,7}.

Em face de sua recente identificação, pouco mais de 100 anos, os diversos e variados estudos disponíveis ainda não preencheram lacunas que possam propiciar terapêutica absolutamente efetiva para a doença ⁸.

Há algumas opções de tratamento que variam de acordo com o quadro clínico apresentado pelo paciente, mas independente da estratégia terapêutica adotada o tratamento é longo, registrando expressivas taxas de descontinuidade, de recrudescência e mínima porcentagem de cura clínica ⁸.

A literatura científica da CBM envolve estudos do âmbito do parasita, do hospedeiro e da interação entre ambos. Partindo do pressuposto que o sucesso terapêutico depende especialmente da estratégia que o sistema imunológico do hospedeiro arquitetará sua defesa, estudos imunológicos podem ser determinantes para o futuro da cromoblastomicose.

Diante do exposto, o presente estudo visa avaliar elementos da resposta imune de pacientes com cromoblastomicose a fim de ampliar o conhecimento sobre a doença de forma tal a contribuir com possíveis terapêuticas mais assertivas em um futuro próximo.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O presente estudo tem por escopo caracterizar a resposta imune *in situ* de lesões tegumentares verrucosas de pacientes acometidos por cromoblastomicose, visando ampliar o conhecimento disponível sobre a interação e relevância dos diversos elementos imunes e metaloproteinases para o estabelecimento do gênero *Fonsecaea*; um dos gêneros causadores da doença.

2.2 Objetivos Específicos

- 1- Investigar a imunoexpressão de células dendríticas CD207⁺; de macrófagos polarizados de classes 1 através dos biomarcadores iNOS e pSTAT-1 e macrófagos de classe 2 através dos biomarcadores Arginase-1, c-Maf, e CD206; das metaloproteinases MMP-2; MMP-9 e dos marcadores de matriz extracelular: Laminina, Fibronectina e Colágeno IV;
- 2- Avaliar comparativamente a imunoexpressão dos marcadores supracitados entre os espécimes de *Fonsecaea pedrosoi* e *Fonsecaea nubica*;
- 3- Identificar correlatos entre os achados obtidos e a evolução clínica da cromoblastomicose.

3. Revisão da literatura

3.1 Os agentes etiológicos e sua distribuição

Embora tenha sido observada em primeira mão em 1911 por Pedroso e Gomes em pacientes da Santa Casa de Misericórdia em São Paulo, a primeira publicação sobre a cromoblastomicose só se deu em 1914 por Max Rudolph⁹ relatando pacientes de Estrela do Sul em Minas Gerais e tardiamente registrada a primazia de observação, em 1920¹⁰.

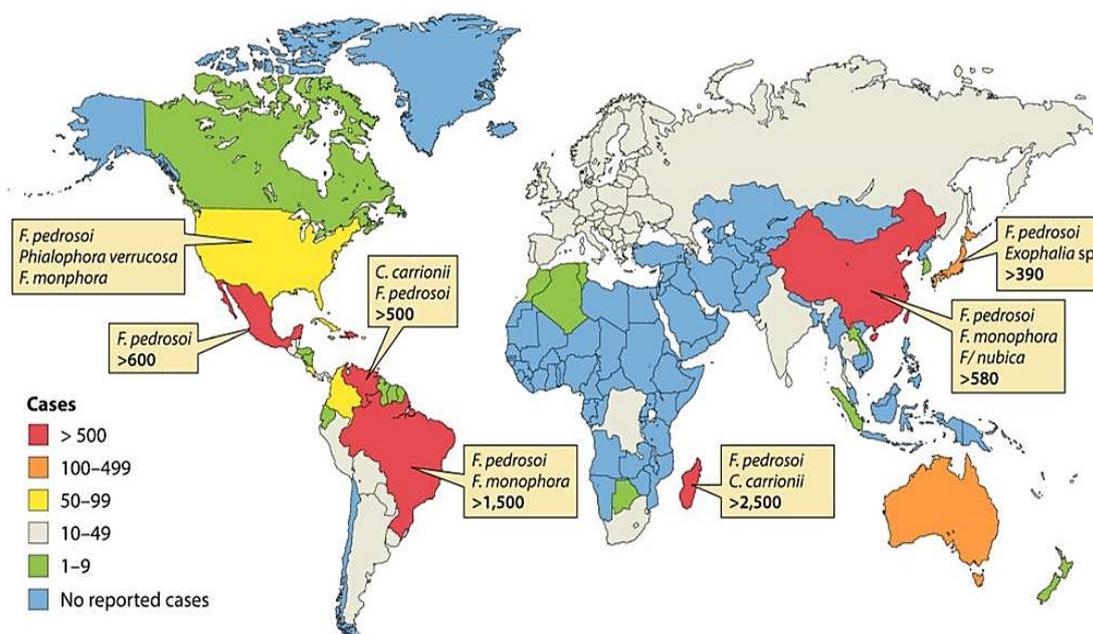
A cromoblastomicose é produto da inoculação traumática de uma gama de espécies de fungos melanizados que pertencem a ordem *Chaetothyriales* e família *Herpotrichiellaceae*, entre os quais pode-se citar *Cladophialophora carrionii*, *Chaetomium funicola*, *Cyphellophora ludoviensis*, *Exophiala jeanselmei*, *Exophiala spinifera*, *Fonsecaea nubica*, *Fonsecaea monophora*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea pugnacius*, *Phialophora verrucosa*, *Rhinocladiella aquaspersa*, *Rhinocladiella similis* e *Rhinocladiella tropicalis*^{8,11}.

A CBM não dispõe de notificação compulsória, limitando o mapeamento da doença e maiores investigações epidemiológicas. Ainda assim, nota-se que é uma doença cosmopolita, estando presente em quase todos os continentes, embora seja endêmica em regiões tropicais e subtropicais^{8,11,12}.

Estudos recentes apontam que o gênero *Fonsecaea* está mais presente em regiões de alta umidade e é responsável por cerca de 90% dos casos totais relatados pelo mundo, seguido pelo gênero *Cladophialophora* que se refere a 41% dos casos registrados nas regiões semi áridas^{8,12}.

Já os demais gêneros possuem relatos menos frequentes, não permitindo maior detalhamento^{8,12}, como ilustrado no mapa a seguir:

Figura 01. Distribuição geográfica da cromoblastomicose



Fonte: Elaborado por Queiroz-Telles *et al.*, 2017.

O conhecimento e identificação da doença encontram-se em expansão, após a publicação do mapeamento supracitado novo caso foi identificado em região nunca relatada antes. Relatou-se o acometimento de uma mulher de 47 anos no Vietnã, o qual a análise molecular revelou infecção pela espécie *Fonsecaea pedrosoi* ¹³.

No Brasil, são considerados endêmicos os estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e a região amazônica. Mas vale ressaltar que a precária qualidade do sistema brasileiro de saúde, especialmente em regiões rurais, faz com que os doentes migrem de seu local de origem para os grandes centros em busca de melhor atendimento médico. Tal fato acaba por dificultar a identificação precisa das áreas endêmicas no país ^{2,12}.

3.2 As lesões

Tal qual o agente etiológico as lesões também apresentam certa diversidade, podendo se apresentar clinicamente como: nodulares, verrucosas, tumorais, placas ou cicatriciais ^{5,12,14}.

As lesões são de alta relevância para o diagnóstico clínico de CBM, mas por guardar similaridade com outras doenças infecciosas como a Paracoccidioidomicose, Esporotricose, Leishmaniose cutânea, e mesmo com doenças não infecciosas como Psoríase, faz-se necessário a corroboração da suspeita através de análises complementares, seja por exame micológico direto, cultura da lesão ou avaliação histopatológica ^{5,12,14}.

Não somente os aspectos macroscópicos das lesões, mas a quantidade e a extensão que apresentam são importantes para a conduta médica. Há uma classificação bastante difundida para análise da gravidade das lesões ⁵:

Figura 02. Classificação de gravidade das lesões de cromoblastomicose



Fonte: Elaborado pelo autor. Adaptado de Queiroz-Telles *et al.*, 2009.

3.3 Diagnóstico e Terapêutica

Diante da confirmação diagnóstica há algumas opções terapêuticas disponíveis, as quais variam de acordo com o quadro clínico apresentado pelo paciente ¹².

As opções incluem cirurgia excisional, crioterapia, termoterapia, laserterapia com CO₂ e terapia fotodinâmica, todos associados ao uso de antifúngicos como Itraconazol, Terbinafina ou a administração combinada de ambos, sendo que o Itraconazol tem apresentado melhores resultados ¹².

Na tentativa de aumentar a eficiência terapêutica para cromoblastomicose, pesquisadores avaliaram terapias com imunoterapêuticos, a exemplo de glucano ¹³ e de Imiquimode ¹⁶.

O uso de Glucano intramuscular foi utilizado como terapia complementar ao tratamento já em curso com Itraconazol, enquanto que o Imiquimode foi testado tanto como monoterapia quanto como terapia coadjuvante e em ambos os estudos, todos os pacientes mostraram melhora da resposta imune celular e redução significativa das lesões. Diante disso pode-se especular que a aposta em imunoterapêuticos, apesar de ainda em processo moroso, mostra-se uma opção relevante e promissora para o tratamento da cromoblastomicose ^{12,15,16}.

Apesar das opções terapêuticas atualmente disponíveis, as taxas de recaída e cura são inversamente proporcionais, ambas muito longe do cenário ideal, de modo que a melhor opção frente à CBM ainda é a prevenção ^{5,12}.

A cromoblastomicose, tal qual outras micoses de implantação, não possui vacina comercialmente disponível e acomete majoritariamente indivíduos adultos, especialmente indivíduos que atuam como trabalhadores de regiões

rurais. Desta forma a mais efetiva medida profilática é o uso rotineiro e adequado de proteções individuais, tais como calçados, vestimentas que preservem os membros inferiores e superiores, além de chapéus, luvas e máscaras ¹².

3.4 A Imunologia da Cromoblastomicose

O sistema imunológico envolve órgãos, células e moléculas em uma estratégia de defesa contra os mais diversos patógenos com o intuito de manter e promover a homeostase do organismo, bem como a saúde do hospedeiro ¹⁷.

Como destacado outrora, os agentes causais da CBM são espécies fúngicas altamente bem sucedidas. Tendo em vista que, mesmo infectado, o microambiente permanece viável ao hospedeiro e ao parasita por longo período, ainda que com alguns óbices ao paciente ^{1,5}.

Sendo o sistema imunológico um especialista em identificar e eliminar invasores, o que acontece na relação parasita/hospedeiro na cromoblastomicose que permite o estabelecimento e evolução da infecção?

Sabe-se que a infecção se inicia por inoculação traumática, mas a forma exata de contaminação ainda não foi perfeitamente compreendida. Foram detectados hifas e esporos de *F. pedrosoi* nos espinhos de *Mimosa pudica*, um pequeno arbusto comum em regiões tropicais, e também células escleróticas similares às avistadas nos tecidos de indivíduos infectados, mas não é possível afirmar com certeza que as três formas são infectantes ¹⁸.

O estudo das lesões evidenciou a presença de células neutrofílicas no microambiente de CBM ¹⁸. Tais células são importantes para a reação de

granulação e opsonização, ações cruciais no recrutamento de outros elementos imunes e estabelecimento da cascata imunológica ^{17,19}.

Uma vez identificada a invasão, elementos imunes capazes de capturar o patógeno como células de Langerhans e macrófagos são recrutados ¹⁷. Sotto e colaboradores em um estudo *in situ* evidenciaram que macrófagos, células de Langerhans e dendrócitos dérmicos Fator XIIIa⁺ integram a resposta imune da cromoblastomicose e parecem participar da apresentação de antígenos nesses pacientes ²⁰.

Anos depois, outro grupo com estudo de natureza experimental demonstrou que células dendríticas e macrófagos assumem papel ainda mais relevante na imunopatologia da CBM e não somente participam da apresentação de antígenos como sugerido outrora, mas ambos os grupos celulares participam também do processo fagocítico. Neste estudo, revelou-se que as células macrofágicas fagocitam em maior quantidade, entretanto, a fagocitose por células dendríticas é mais efetiva na eliminação de células escleróticas ²¹.

Do ponto de vista comparativo entre gêneros e espécies, Hayakawa e colaboradores observaram que a fagocitose mediada por macrófagos atinge maiores níveis de efetividade na presença de *Fonsecaea pedrosoi* e *Rhinocladiella aquaspersa* que de outros fungos ²².

Da mesma forma, a atividade fagocítica mediada pelo Sistema Complemento obteve maior taxa de atividade diante da presença de *Phialophora verrucosa* e *Rhinocladiella aquaspersa*, evidenciando que a resposta imune pode variar de acordo com o agente invasor e ainda que dentre os fungos avaliados, *Rhinocladiella aquaspersa* é o mais suscetível a resposta do hospedeiro ²².

Há outros estudos que avaliam a possível relação entre o desenvolvimento da resposta imune e as diferentes apresentações de cromoblastomicose. Os resultados de Gimenes e colaboradores evidenciaram que as formas graves da doença possuem correlação com alta produção de IL-10, baixos níveis de IFN- γ e resposta ineficiente de células T, enquanto que as formas mais brandas apresentam perfil oposto ²³.

Em raciocínio similar, D'ávila e colaboradores avaliaram pacientes de CBM a partir do aspecto de suas lesões, separando-os em dois grupos: verrucoso e placa. Tal qual o estudo de Gimenes, D'ávila identificou que o grupo de melhor resposta constituía lesões em placa com o perfil Th1 de resposta enquanto que a resposta menos favorável ao hospedeiro constituía lesões verrucosas e perfil Th2 de resposta imune ²⁴.

A resposta imune celular é altamente dependente da presença e atividade de linfócitos TCD4, TCD8, linfócitos B e macrófagos ¹⁶. Para investigar mais detalhadamente o papel de Células T na cromblastomicose um estudo com camundongos deficientes de células TCD4 e TCD8 avaliou a evolução da doença após inóculo com *F. pedrosoi* ²⁵.

Curiosamente, os camundongos infectados e com deficiência de células TCD4 apresentaram a forma mais grave da doença, hipersensibilidade tardia e menor produção de IFN- γ , enquanto que os camundongos deficientes de células TCD8 parecem não ter sofrido alteração no padrão de resposta ao fungo ²⁵.

Explorando outras classes de linfócitos T, Silva e colaboradores evidenciaram que os principais grupos celulares de apoio as respostas efetoras (Treg e Th17) apesar de participarem do microambiente da CBM encontram-se

em desequilíbrio em pacientes com o tipo verrucoso de lesão, havendo predomínio da resposta Th17 em detrimento da resposta Treguladora ²⁶.

Outras tantas populações celulares importantes para a cascata imunológica da cromoblastomicose ainda não foram investigadas, bem como análises comparativas entre gêneros, espécies e as lesões apresentadas ainda precisam de maiores esclarecimentos.

Os estudos acerca da resposta humoral na CBM são menos frequentes. Há um estudo realizado com 136 amostras de pacientes com CBM por meio dos testes de ELISA e Western blot ao longo de um ano de terapia com terbinafina em que os resultados evidenciaram anticorpos imunodominantes fortemente reativos cujas massas moleculares foram 18,5, 36 e 40 kDa para *F. pedrosoi* e 23,5, 26, 33 e 40 kDa para *C. carrionii*, correspondendo à alta prevalência e concentração de anticorpos, de modo que os pacientes infectados por *C. carrionii* mostram piores resultados que os infectados por *F. pedrosoi* ²⁷.

Segundo os autores, além de ser possível identificar altos níveis de anticorpos específicos no soro dos pacientes com CBM, os achados permitem inferir que os níveis de IgG são correlatos aos níveis de anticorpos antineutrofílicos e impactam na cronicidade e extensão das lesões ²⁷.

Outro estudo mostrou que antes do tratamento, os pacientes com CBM grave apresentavam níveis mais elevados de IgG, IgG1, IgG2 e IgG3 em relação a pacientes com a doença moderada ou leve. Enquanto que ao longo do tratamento, os títulos médios de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 foram reduzidos, evidenciando importante padrão da resposta humoral em pacientes com cromoblastomicose ²⁸.

Em um aspecto altamente inovador, Siqueira realizou um trabalho experimental em ratos Wistar infectados com *F. pedrosoi* e tratados com uso de Itraconazol e Anfotericina B. Os ratos foram submetidos ao uso da vacina de DNA-hsp65 com o intuito de constituir um modelo animal seguro o suficiente que pudesse abrir novos horizontes para as medidas profiláticas e terapêuticas para CBM ²⁹.

A vacina é capaz de estimular a produção de óxido nítrico permitindo que a defesa do hospedeiro seja direcionada para uma resposta mais efetiva, acelerando o processo de cura. Apesar da necessidade de novos estudos mais específicos e abrangentes, os dados deste estudo parecem altamente promissores ²⁹.

Como é possível observar, mesmo diante do crescente número de estudos, das mais variadas naturezas e escopos, ainda não é possível afirmar com precisão as exatas falhas do sistema imunológico e/ou mecanismos do fungo que permitem o estabelecimento e a evolução da cromoblastomicose, mas vagarosamente caminha-se a elucidação desse processo.

4. Materiais e métodos

4.1 Biópsias

O presente estudo de natureza transversal retrospectivo foi composto por biópsias de nove pacientes diagnosticados clínica e anatomopatologicamente no Laboratório de Dermatopatologia da Divisão de Clínica Dermatológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

4.1.1 Critérios de inclusão

- Primeira biópsia da lesão, utilizada para o diagnóstico da doença;
- Biópsia com diagnóstico de CBM e presença do fungo na lesão;
- Espécimes com área expressiva para a quantificação dos marcadores.

4.1.2 Critérios de exclusão

- Segunda ou demais biópsias de lesões do mesmo paciente;
- Biópsias de controle terapêutico;
- Biópsia com diagnóstico de CBM sem presença parasitária no tecido;
- Espécimes com área insuficiente para a quantificação dos marcadores.

Após a delimitação, o projeto de estudo foi devidamente aprovado pela Comissão de Ética para Análise e de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas e FMUSP, sob o número 818.315 de 2014.

O estudo histopatológico das lesões se deu através da coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) para clara observação do agente, de alterações epidérmicas, dérmicas e grau de parasitismo.

O grau de parasitismo foi avaliado por meio de semiquantificação em cruzes, onde foi estabelecido 0 para ausência de formas fúngicas, + para a presença discreta de formas fúngicas, ++ para a presença moderada e +++ para a presença intensa de formas fúngicas ao longo da área do espécime em análise.

4.2 Método molecular para identificação das espécies

Paralelo às biópsias, o Núcleo de Coleção de Microorganismos do Instituto Adolfo Lutz (IAL) de São Paulo (SP-BR) realizou e analisou estudo do sequenciamento gênico nos espécimes dos sujeitos de pesquisa dessa casuística a fim de identificar os agentes da doença (Apêndice 01).

A elucidação das espécies se deu por meio de sequenciamento multilocus dos genes rDNA (região do ITS 1, 5.8S e ITS2) e Beta tubulina. Parte dos resultados obtidos, os quais concernem com a presente casuística, foi gentilmente cedida para o desenvolvimento deste trabalho ¹⁰.

4.3 Método imuno-histoquímico

Uma vez realizada a biópsia, os espécimes foram emblocados em parafina e por microtomia resultaram em cortes histológicos de 4µm de espessura depositados em lâminas de vidro com carga eletrostática positiva. Sequencialmente utilizou-se o protocolo de método imuno-histoquímico desenvolvido pelo Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis, da Faculdade de Medicina da USP, o qual consiste nos seguintes estágios:

Os cortes foram desparafinizados (em dois banhos de xilol por vinte minutos cada, à temperatura ambiente), hidratados (em seguimento decrescente de etanol passando de 100%, 95% até 70%, durante cinco minutos em cada solução) e lavados (em água corrente, em água destilada e em tampão “ Phosphate Buffer Saline (PBS) com pH 7,4 por cinco minutos em cada etapa).

A peroxidase endógena foi bloqueada com três imersões de quinze minutos cada em solução de água oxigenada (H₂O₂) a 3% em câmara escura e novamente lavadas em água corrente, água destilada e PBS por cinco minutos cada.

A exposição antigênica foi realizada através de calor úmido, imergindo os cortes histológicos em tampão TRIS/EDTA pH 9,0 ou tampão citrato pH6,0, de acordo com a indicação do biomarcador a ser avaliado (Tabela 01), por vinte minutos em banho-maria a 95°C e mais uma vez aplicou-se a sequência de lavagem.

Com a finalidade de bloquear a expressão de proteínas inespecíficas no tecido, utilizou-se leite desnatado na concentração de 10% em água destilada e os cortes foram incubados por trinta minutos.

Seguiu-se a incubação com os anticorpos estudados diluídos em solução de albumina bovina (BSA) a 1% "over night" a 4°C.

No dia seguinte, realizou-se lavagem em PBS por dez minutos e seguiu-se com a incubação do anticorpo secundário durante trinta minutos a 37°C na estufa, após realizou-se nova lavagem em PBS e incubação com complexo estreptavidina-biotina ou sistema de polímeros, conforme especificado na tabela 01, por mais trinta minutos a 37°C na estufa.

A revelação das imunorreações foi realizada com 3,3 Diaminobenzidina (DAB), 0,4% em PBS, acrescido de 1200 µl de água oxigenada a 3%.

A seguir as lâminas foram lavadas em água corrente e contracoradas com hematoxilina de Mayer. Por fim seguiu-se a desidratação dos cortes em seguimento crescente de etanol (70%, 95% e 100%), diafanização em xilol e montagem com resina.

4.3.1 Dupla reação imuno-histoquímica

Dentre os elementos imunes aqui avaliados algumas populações implicaram na investigação de antígenos expressos em concomitância, a exemplo de CD207/IL-17 para as células de Langerhans e de CD68/c-Maf para os macrófagos M2.

Nos casos referenciados acima aplicou-se a técnica imuno-histoquímica com dupla marcação, a qual segue as etapas iniciais idênticas ao protocolo supracitado, no item 4.3 “método imuno-histoquímico”, até lavagem com água corrente após a revelação com DAB acrescido de água oxigenada.

A partir disso, os cortes foram lavados em água corrente por dez minutos, em água destilada por cinco minutos, posteriormente aplicou-se o bloqueador de fosfatase alcalina “*Dual Endogenous Enzyme Block*” (DAKO, S2003) por dez minutos em temperatura ambiente e seguiu-se a aplicação do outro anticorpo de cadeia primária a ser pesquisado, também diluído em solução de albumina bovina (BSA) a 1% e incubado “over night” a 4°C.

No terceiro dia de experimento, realizou-se lavagem em PBS por dez minutos e incubação com o sistema de polímeros “EnVision G2 System AP Enzyme” (DAKO) durante trinta minutos a 37°C na estufa e revelado com a solução cromógena “*Permanent Red*” (DAKO).

Após a última revelação os cortes foram lavados em água corrente e destilada, ambas por cinco minutos e aguardou-se a completa secagem para a montagem das lâminas com resina.

4.3.2 Dupla reação por imunofluorescência

Para corroborar e evidenciar com maior precisão a co-localização da expressão simultânea de CD207 e IL-17 em células dendríticas, adotou-se a metodologia complementar de imunomarcacão por fluorescência.

Para tanto, seguiu-se o protocolo de imuno-histoquímica até o momento da aplicação do anticorpo de cadeia primária diluído em solução de albumina bovina (BSA) a 1%, mas os espécimes permaneceram incubados a 4°C por quarenta e oito horas.

Passados os dois dias, os cortes foram lavados com PBS em três sequências de cinco minutos cada e prosseguiu-se com a incubação dos fluoróforos “*Alexa Fluor*” (INVITROGEN) nas especificações 488 e 546, ambos diluídos em PBS, BSA a 1% e DAPI (“4’,6- Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride, INVITROGEN), onde reagiram por duas horas em câmara escura.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas em PBS por três vezes de cinco minutos cada e finalmente montadas com glicerina diluída a 50% em PBS.

Devido à fotossensibilidade apresentada pelos reagentes utilizados nessa metodologia, as lâminas do experimento permaneceram em ambiente refrigerado até o momento da análise em microscópio de fluorescência confocal a laser, gentilmente disponibilizado pelo Núcleo de Microscopia Confocal/Fluorescência da Rede de Multiusuários do Sistema FMUSP/ HC-FMUSP.

4.3.3 Grupo controle positivo para reações imuno-histoquímicas

A avaliação comparativa dos marcadores CD206, CD207, MMP-2, MMP-9, Fibronectina, Laminina e Colágeno nos pacientes com cromoblastomicose teve como parâmetro a expressão em indivíduos com pele saudável.

Foram selecionados dez fragmentos de pele hígida, provenientes de cirurgia de joelho realizadas no HCFMUSP, sem qualquer atividade inflamatória ou infecciosa no ato cirúrgico.

4.3.4 Grupo controle negativo para reações imuno-histoquímicas

Durante a padronização dos anticorpos em questão, os espécimes foram submetidos ao teste de omissão do anticorpo primário com a finalidade de garantir que o anticorpo secundário é de fato específico ao reconhecimento do anticorpo primário e não aos antígenos dos tecidos estudados, evitando assim resultados erroneamente positivos.

4.3.5 Avaliação quantitativa e estatística

A expressão positiva dos marcadores foi quantificada levando em consideração nove campos dérmicos randomizados por espécime com auxílio de um microscópio Zeiss® Primo Star para registrar a área média de 0.0705mm² no aumento de 400X e do programa Image Pro Plus® versão 4.5.0.29.

As células imunomarcadas foram expressas na unidade de células/mm² enquanto que as imunomarcações de fibras e espaços extracelulares foram expressos em fração de área dérmica ou epidérmica, de acordo com o marcador, e foi calculada a proporção de área positiva em relação à área total do espécime analisado.

Para a avaliação epidérmica dos marcadores CD207, Laminina e Colágeno IV, foi utilizado retículo graduado (40x) acoplado à ocular (10x) do microscópio.

Considerou-se positividade quando os pontos do retículo, a intersecção de duas retas, coincidiam com a imunomarcação e o número de pontos positivos sobre a área avaliada determinou a fração de área epidérmica positiva.

Tabela 01. Relação de anticorpos primários e sistemas de detecção

Anticorpos	Diluição	Sistema	pH	Controle positivo
Arginase-1 (Anti-ARG1, Sigma)	1-3000	Novolink	9.0	Amígdala
CD206 (MCA5552Z Bio-Rad)	1-200	Novolink	9.0	Placenta
CD207 (12D-6 Novocastra)	1-400	CSA-II	6.0	Pele hígida
C-Maf (SC7866, Santa Cruz)	1-100	Advance	9.0	Apêndice
Colágeno IV (CIV22, Cell Marque)	1-50	Novolink	6.0	Pulmão pneumocócico
Fibronectina (Fibronectin, Serotec)	1-100	LSAB	6.0	Rim
iNOS (NB300-605, Novus)	1-500	Novolink	6.0	Amígdala
Laminina (NCL-Laminin, Novocastra)	1-50	Novolink	6.0	Placenta
MMP-2 (NCL-MMP2-507, Novocastra)	1-100	Novolink	9.0	Carcinoma de mama
MMP-9 (Anti-MMP9 Clone EP1255Y, Abcam)	1-50	LSAB	6.0	Pulmão
pSTAT-1 (SC135648, Santa Cruz)	1-50	Novolink	9.0	Adenoma de paratireóide

5. Resultados

5.1 Dados demográficos da amostra

A presente casuística é composta em sua totalidade por indivíduos do sexo masculino que apresentam lesões do tipo verrucoso, sendo 77,78% (n=7) nos membros inferiores, 11,11% (n=1) no membro superior e 11,11% (n=1) não há especificação em seu prontuário.

Dentre os nove sujeitos de pesquisa, 66,6% (n=6) apresentou positividade no sequenciamento de rDNA para *Fonsecaea pedrosoi* e 33,3% (n=3) para *Fonsecaea nubica*, cuja média de idade ficou em 63,6 anos para o grupo de *F. pedrosoi* e 51 anos para o grupo de *F. nubica*.

Tabela 02. Dados demográficos da amostra

Paciente	Sexo	Idade	Local da lesão	Agente
1	M	43	Não informado	<i>F. pedrosoi</i>
2	M	69	M. inferior D	<i>F. pedrosoi</i>
3	M	50	M. inferior E	<i>F. pedrosoi</i>
4	M	76	M. inferior D	<i>F. pedrosoi</i>
5	M	60	M. inferior E	<i>F. pedrosoi</i>
6	M	84	M. inferior D	<i>F. pedrosoi</i>
7	M	51	M. inferior E	<i>F. nubica</i>
8	M	52	M. inferior E	<i>F. nubica</i>
9	M	50	M. superior E	<i>F. nubica</i>

5.2 Achados histopatológicos

Observa-se hiperqueratose, acantose irregular e microabscessos na região epidérmica, além de granulomas epitelióides, alguns com centro supurado, infiltrado inflamatório constituído por células gigantes, células epitelióides, macrófagos, linfócitos, plasmócitos e eosinófilos na derme.

A análise dos espécimes evidenciou parasitismo de moderado a intenso (++/+++), não havendo diferenças expressivas entre os grupos de análise.

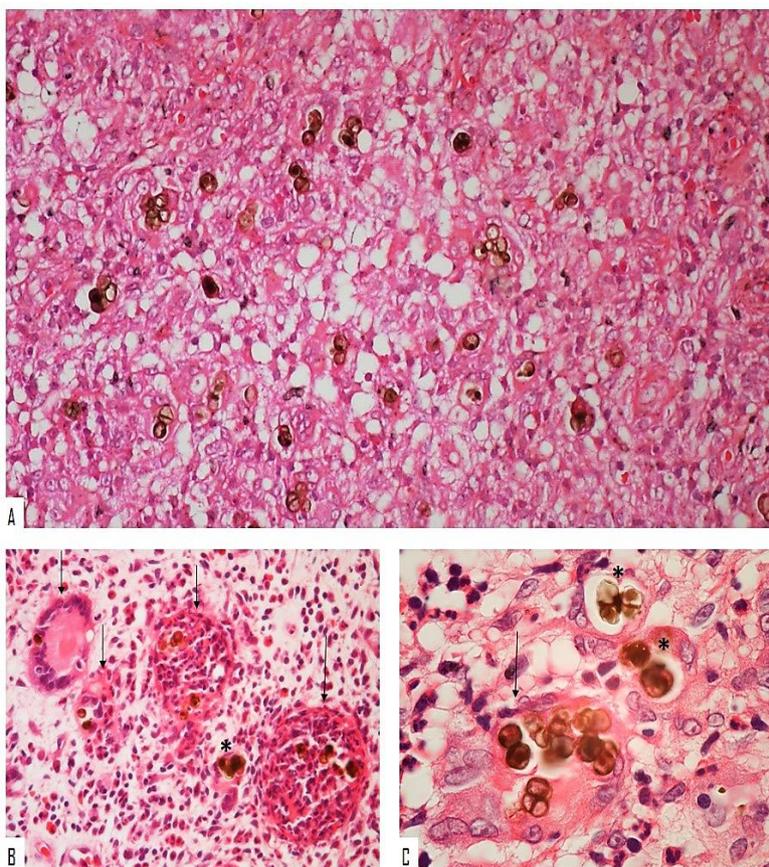


Figura 03. Coloração de hematoxilina-eosina (HE) em lesões de CBM evidenciando infiltrado inflamatório repleto de células gigantes, fungos naturalmente corados em marrom em expressiva quantidade, eosinófilos, macrófagos e linfócitos em 200x (A). Vista da contenção dos fungos por células gigantes sinalizadas por setas e alguns fungos esparsos no tecido sinalizados por asteriscos, em 400X (B). Detalhe de células fúngicas em 1000X (C).

5.3 Achados imuno-histoquímicos

5.3.1 Células de Langerhans

A pesquisa imuno-histoquímica permitiu identificar células dendríticas do tipo Langerhans através da expressão de seu marcador específico, o CD207.

As células CD207⁺ estavam distribuídas ao longo da epiderme e na derme; na região superficial e reticular média, com intensidade de leve a moderada. Foram avistadas ainda, permeando infiltrados inflamatórios e formações granulomatosas.

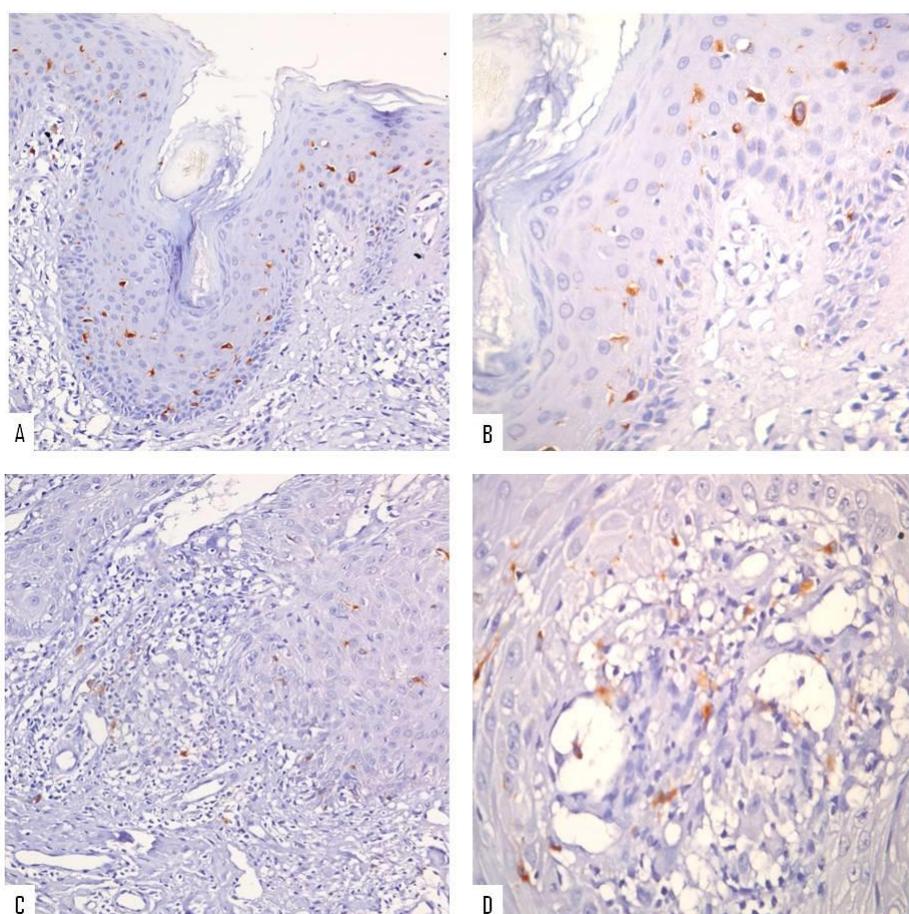


Figura 04. Reação imuno-histoquímica em lesões de CBM evidenciando a expressão de CD207 nas regiões epidérmica (em 200x e 400x, respectivamente A e B) e dérmica (em 200x, C) e em detalhe da região granulomatosa em 400x (D).

A presença de células CD207⁺ nas regiões e, de modo especial, granulomatosas incitou a investigação mais aprofundada para caracterizar a população celular em questão. A dupla imunomarcção resultou em positividade para IL-17.

Células CD207/IL-17⁺ foram observadas na derme, camada basal e em quantidade significativa na região epidérmica, tais células se apresentavam com morfologia dendrítica, fusiforme e arredondada.

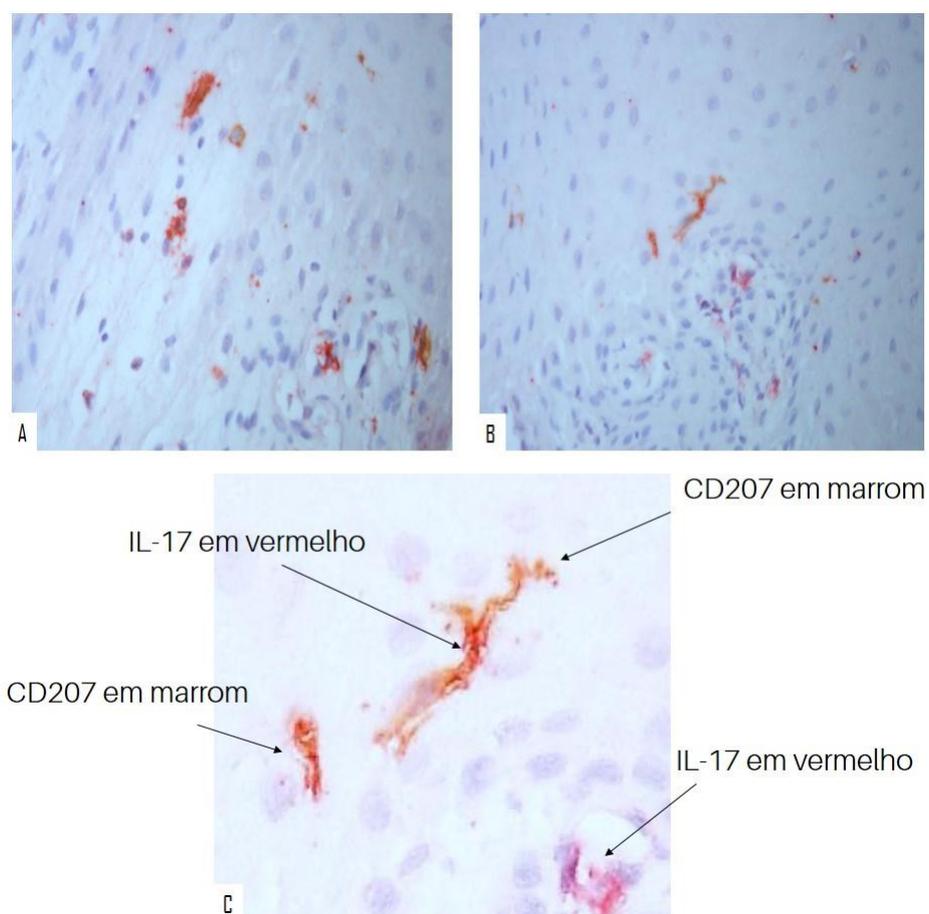


Figura 05. Dupla reação imuno-histoquímica em lesões de CBM evidenciando a expressão concomitante de CD207 e IL-17 em espécimes de CBM. Em 400x (A,B) e o detalhe das dupla imunomarcção (C), estando o CD207 representado marrom e IL-17 em vermelho.

Uma vez identificada a co-localização dos marcadores por meio da técnica convencional, o achado imuno-histoquímico foi corroborado com o uso do método de imunofluorescência a fim de ressaltar a co-expressão dos marcadores.

A dupla marcação por imunofluorescência evidenciou tanto células dendríticas quanto células arredondadas em ambos os grupos de lesão, tais elementos celulares pareciam transitar entre as camadas dérmicas e epidérmicas dos pacientes, como mostra a ilustração a seguir:

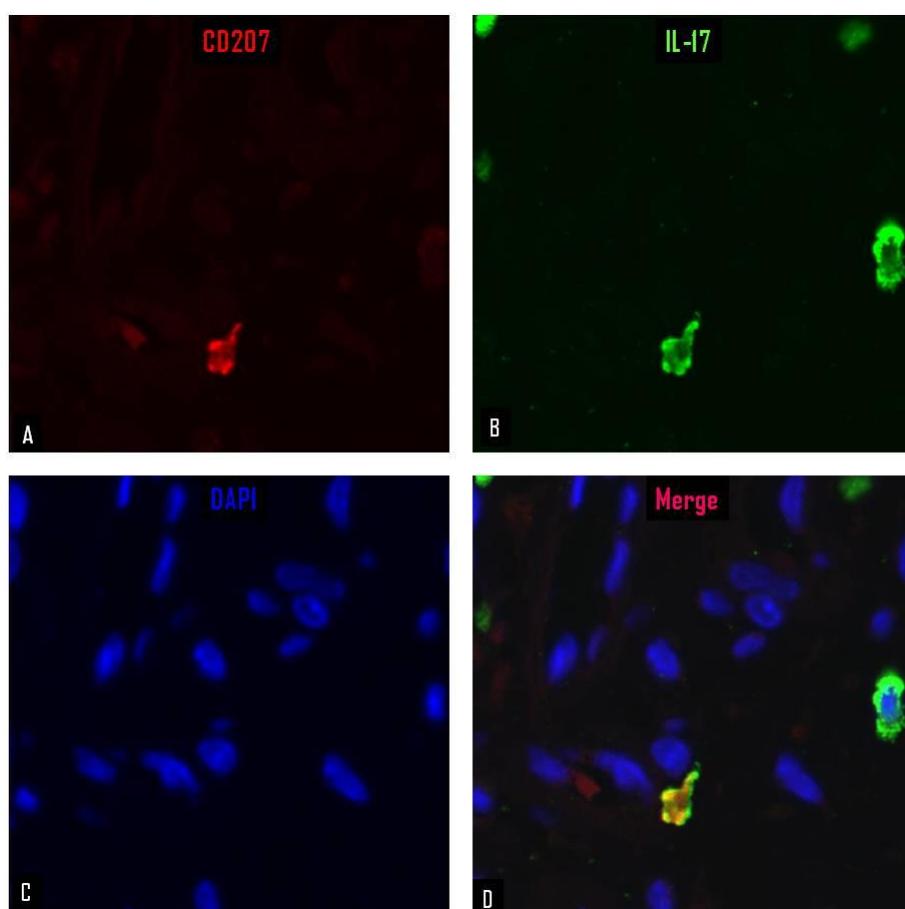


Figura 06: Dupla reação imuno-histoquímica por microscopia confocal em lesões de CBM evidenciando, através de secções da mesma região, a expressão de CD207 em vermelho (A), de IL-17 em verde (B), os núcleos celulares em azul (C) e a sobreposição dos marcadores (D).

5.3.2 Macrófagos polarizados

A caracterização de macrófagos polarizados do tipo 1 se deu por meio da imunoexpressão citoplasmática de iNOS e da imunoexpressão nuclear de pSTAT-1, conforme ilustrado abaixo:

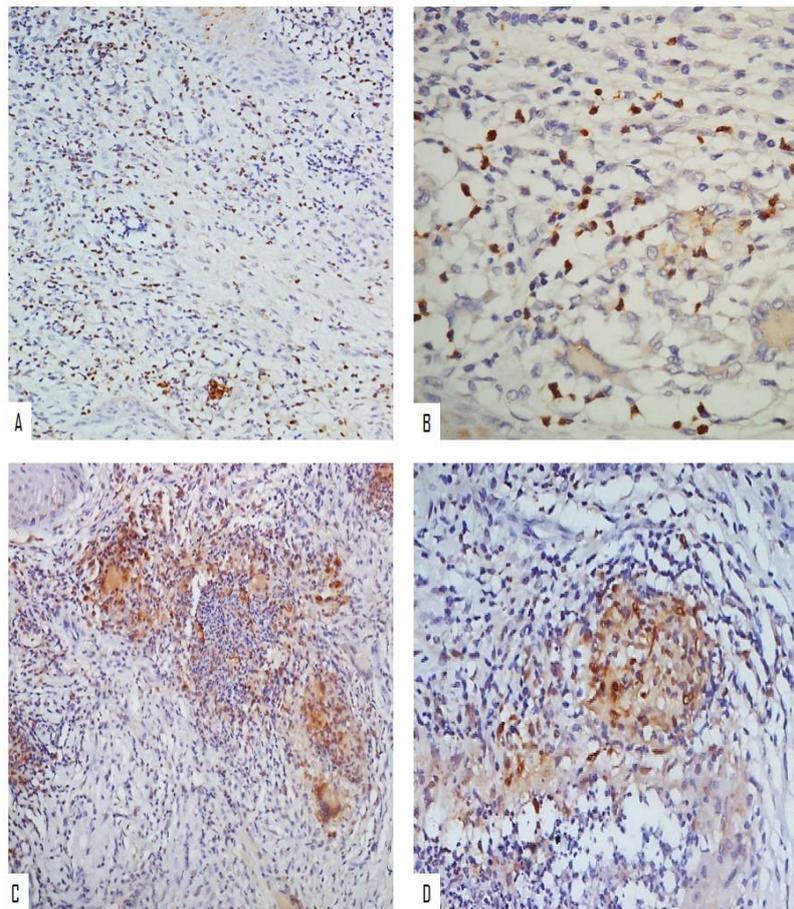


Figura 07. Reação imuno-histoquímica em lesões de CBM evidenciando a distribuição da expressão de iNOS pela derme em 200x(A) e no detalhe aumentado em 400x(B) e da expressão de pSTAT-1 em 200x (C) e no detalhe aumentado em 400x (D).

Já a imunexpressão citoplasmática de Arginase-1 e a expressão nuclear de c-Maf caracterizaram o tipo 2 de macrófagos.

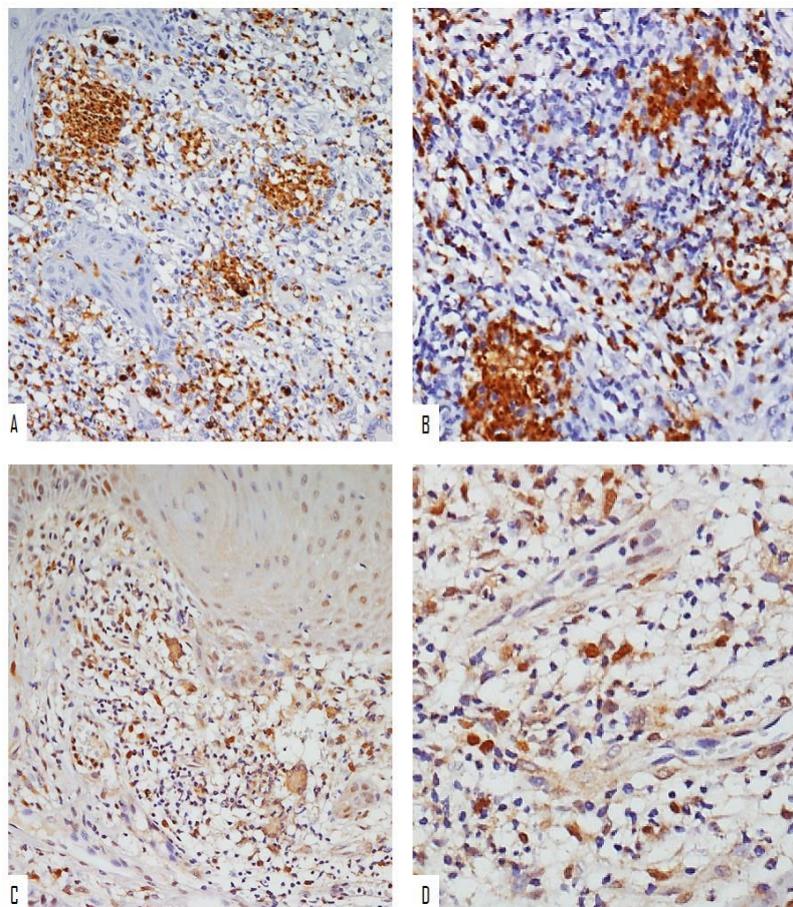


Figura 08. Reação imuno-histoquímica em lesões de CBM evidenciando a distribuição da expressão de Arginase-1 pela derme em 200x(A) e no detalhe aumentado em 400x(B) e da expressão de c-Maf em 200x (C) e no detalhe aumentado em 400x (D).

As células estavam esparsas ao longo do tecido dérmico e em quantidades sobressalentes circundando regiões de granulomas e abscessos. Entretanto, os marcadores do perfil M2 mostraram-se expressivamente superior aos do perfil M1, tanto em espécimes de *F. pedrosoi* quanto de *F. nubica*.

Para garantir que o perfil predominante de células imunomarcadas são seguramente macrófagos M2, realizou-se dupla marcação do marcador CD68, uma glicoproteína expressa por células macrofágicas associado ao marcador nuclear de macrófagos M2, c-Maf.

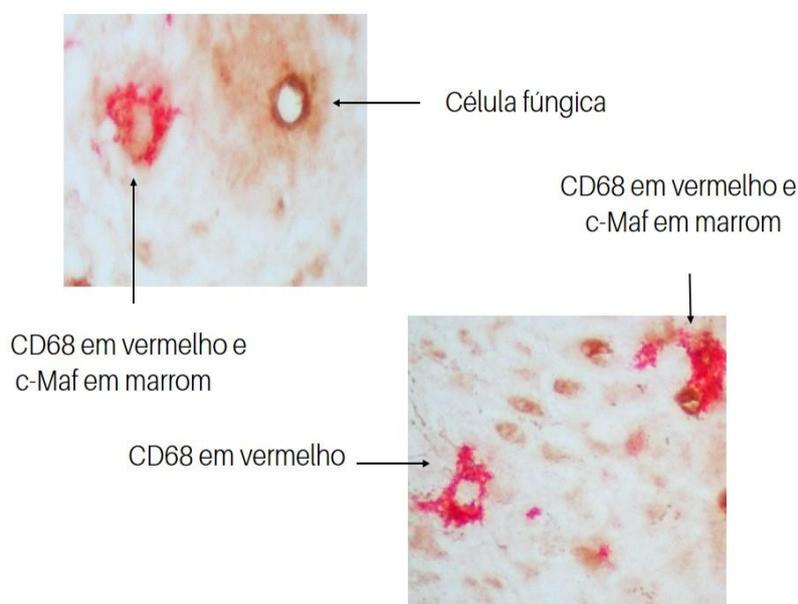


Figura 09. Dupla reação imuno-histoquímica em lesões de CBM evidenciando a expressão concomitante de CD68 e c-Maf; caracterizando um macrófago polarizado M2.

A presença de CD206, um receptor de manose expresso por macrófagos polarizados, foi identificada em todos os espécimes avaliados, variando de discreta a intensa em ambos os grupos, conforme apêndice 01.

O achado, *a priori*, pouco significativo para o atual contexto levou a avaliação do marcador também em espécimes de pele hígida. A expressão foi igualmente absoluta nos espécimes hígidos, entretanto, nota-se diferença significativa da intensidade de expressão entre os grupos, enquanto os pacientes de CBM apresentam intensa expressão em 55,5% da amostra, o grupo hígido mostra intensidade unanimemente discreta.

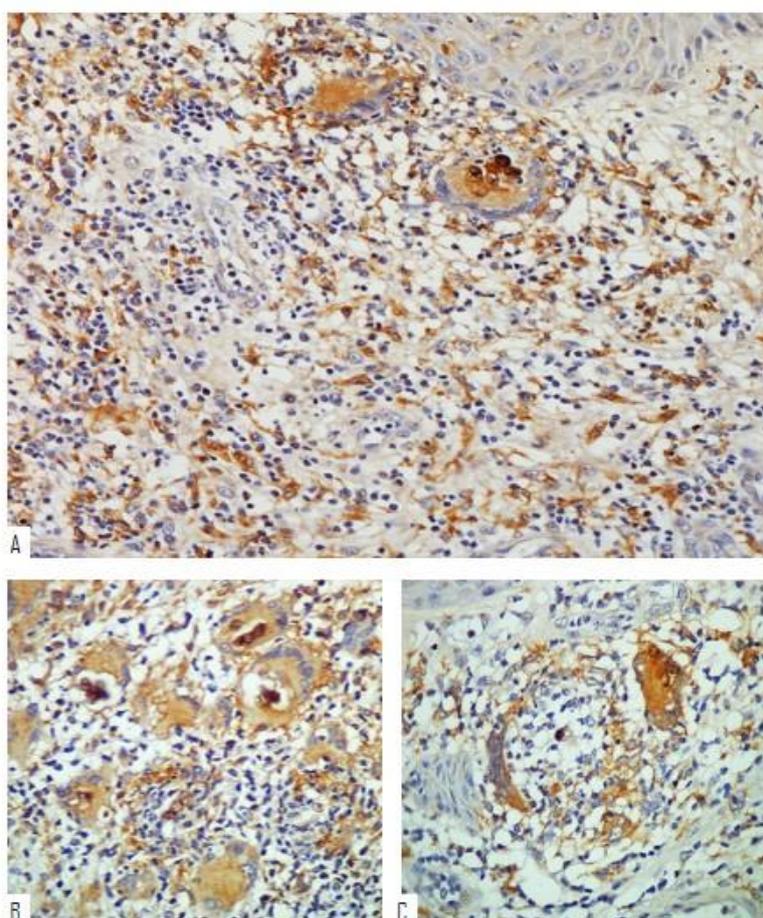


Figura 10. Reação imuno-histoquímica em lesões de CBM evidenciando a presença de CD206 permeando fungos e toda a formação granulomatosa na região dérmica de espécimes de CBM em 200x (A) e em 400x (B, C).

5.3.3 Matriz extracelular

A avaliação das metaloproteinases pela expressão de MMP-2 esteve positiva na região fibrótica, abundantemente em linfócitos, raramente em neutrófilos, nas células da membrana basal e alguns espécimes apresentam expansão da positividade na região epidérmica. Já nos espécimes do grupo controle o marcador esteve absolutamente ausente.

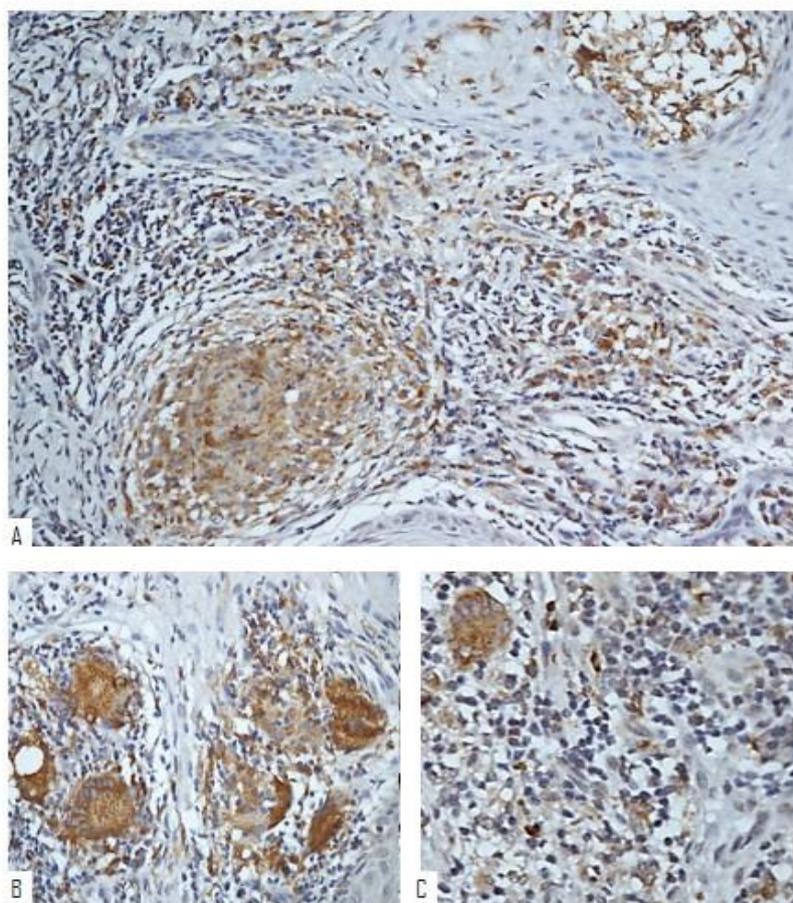


Figura 11. Reação imuno-histoquímica em lesões de CBM evidenciando a presença de MMP-2 em células, no meio extracelular, em abscessos e de maneira exuberante no interior de células gigantes do tipo Langhans com algumas células fúngicas englobadas em 200x (A), em 400x (B) e no detalhe aumentado de 400x (C).

A expressão de MMP-9 mostrou-se similar a expressão de MMP-2, estando positiva no meio extracelular, em numerosos linfócitos e de maneira exuberante as células gigantes, tanto do tipo Langhans quanto de corpo estranho. Os espécimes que compõem o grupo controle também mostraram-se negativos para a imunorreação de MMP-9.

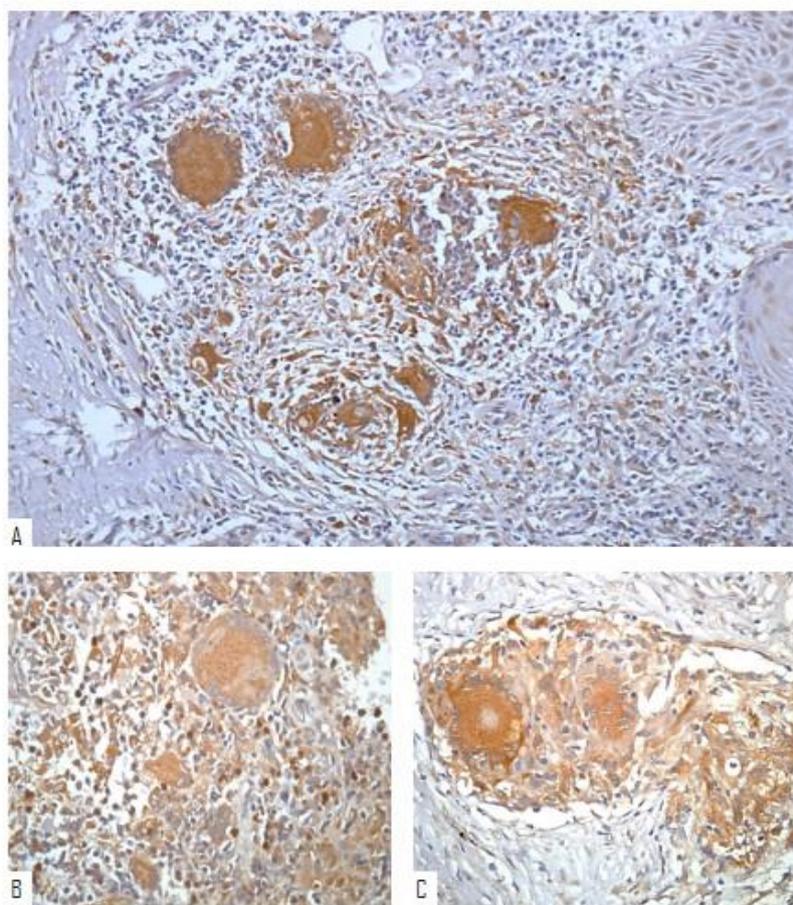


Figura 12. Reação imuno-histoquímica em lesões de CBM evidenciando a presença de MMP-9 em 200x (A), em 400x (B) e no detalhe aumentado a ilustração da participação do marcador na contenção fúngica em 400x (C).

A imunoposição das glicoproteínas Laminina e Fibronectina quando comparado à expressão em espécimes hígidos também mostrou-se superior.

A imunomarcção de Laminina foi avistada ao longo de toda a camada basal, tanto do grupo controle como do grupo de lesão. Apesar disso, o grupo de lesão evidenciou presença mais acentuada, abrangendo regiões extracelulares na derme e alto número de vasos sanguíneos, freqüentes em lesões de CBM.

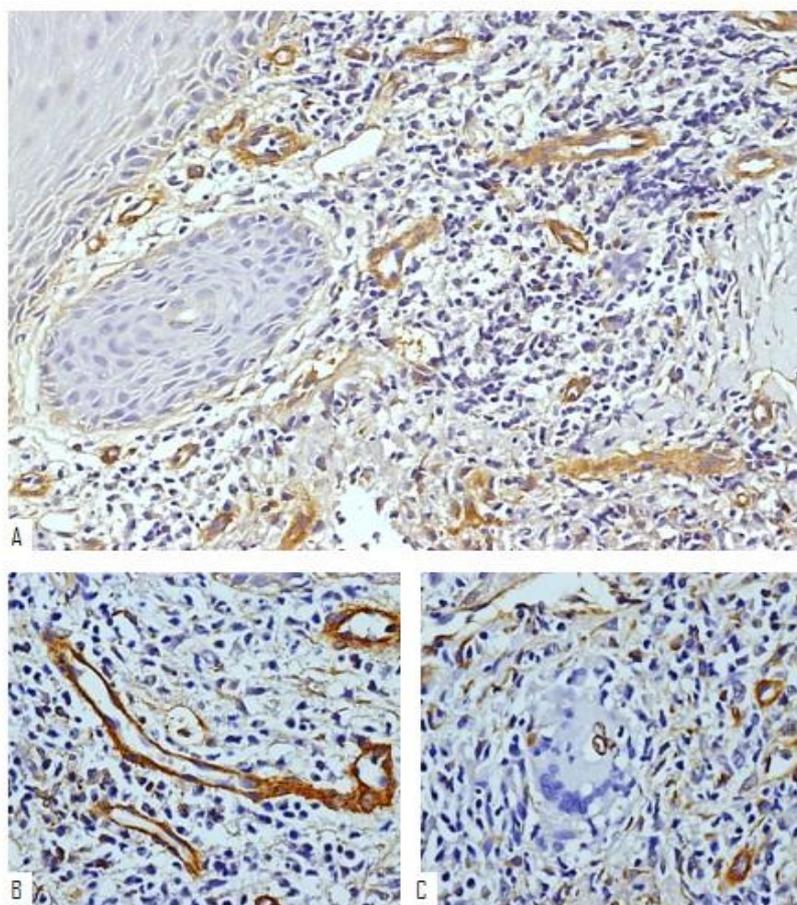


Figura 13. Reação imuno-histoquímica em lesões de CBM evidenciando a presença de Laminina especialmente ao redor de vasos sanguíneos em 200x (A) e 400x(B). No detalhe aumentado, avista-se discreta expressão ao redor de uma célula gigante em 400x (C).

Já a imunomarcação de Fibronectina distribuiu-se de maneira exuberante na região dérmica, foi visualizada na região extracelular, em células endoteliais e em células dos infiltrados inflamatórios dérmicos, como linfócitos e neutrófilos. Além de mostrar-se positiva em eventuais queratinócitos.

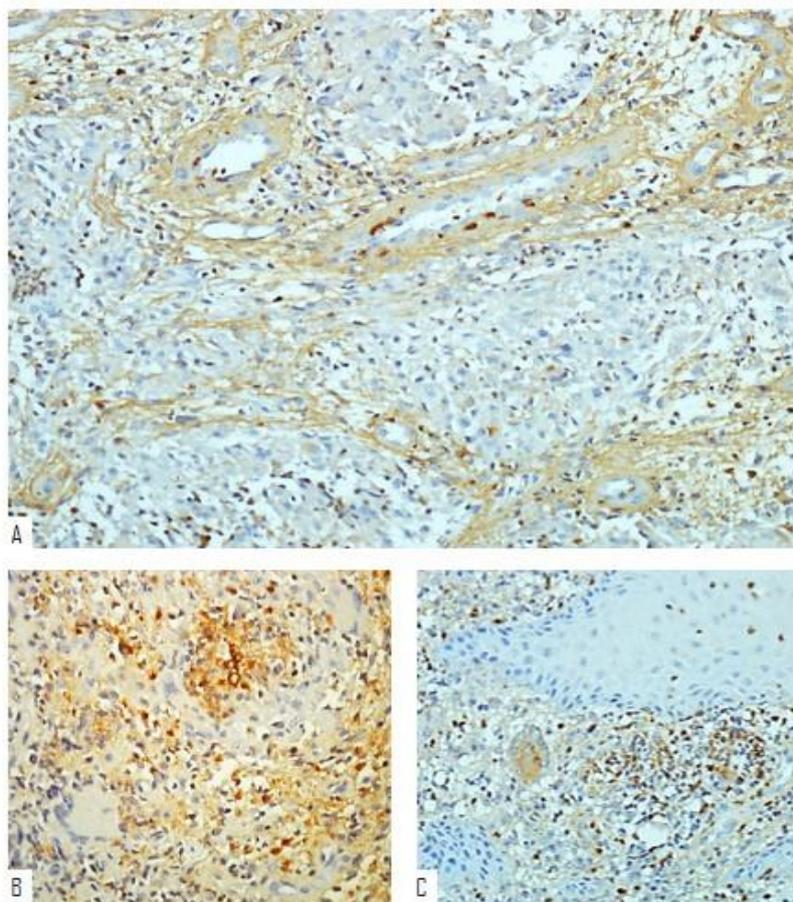


Figura 14. Reação imuno-histoquímica em lesões de CBM evidenciando a presença de Fibronectina destacada em linfócitos em 200x (A), a alta expressão em granulomas 400x(B) e no detalhe a expressão no meio extracelular e em raros queratinócitos em 400x(C).

Diferente dos demais marcadores de MEC, a expressão de Colágeno IV não diferiu entre os grupos de análise, estando presente especialmente em células endoteliais.

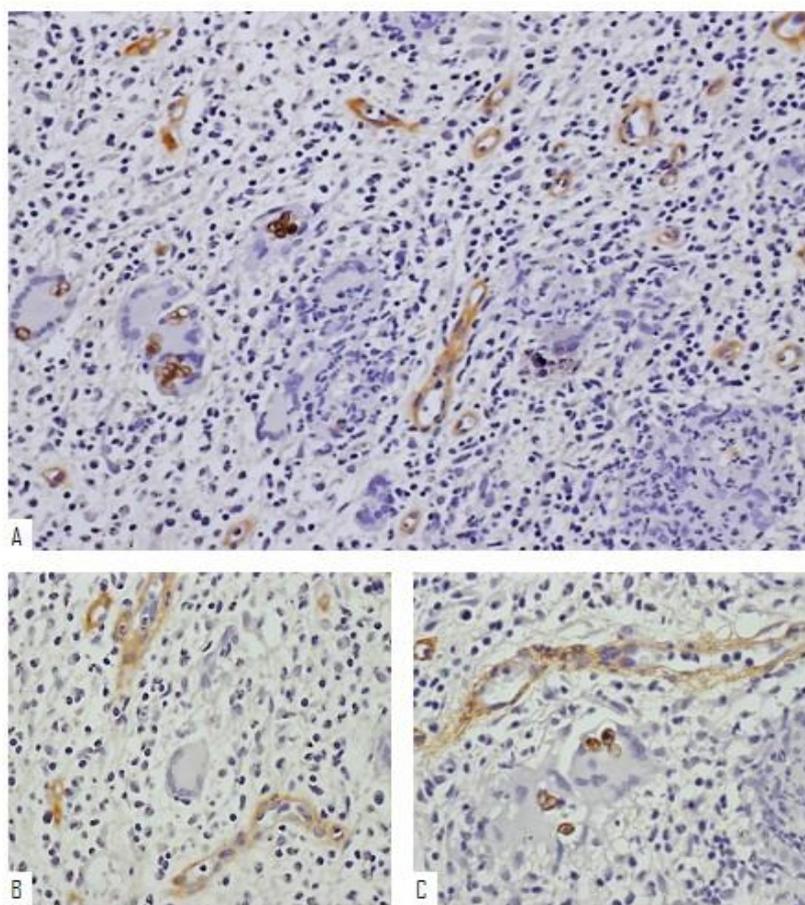


Figura 15. Reação imuno-histoquímica em lesões de CBM evidenciando a presença de Colágeno IV especialmente ao redor do endotélio (A em 200x, B em 400x) e sem qualquer interação com as células fúngicas (C em 400x).

5.4 Achados quantitativos e estatísticos

5.4.1 Células de Langerhans

Células CD207⁺ estavam presentes em 100% dos espécimes analisados nesse estudo, tanto em pacientes com lesões quanto em pacientes com pele saudável.

A análise comparativa da expressão de CD207 epidérmica entre os espécimes de CBM e espécimes hígidos evidenciou maior densidade dessas células no grupo saudável, entretanto sem diferença estatisticamente significativa ($p=0,0764$).

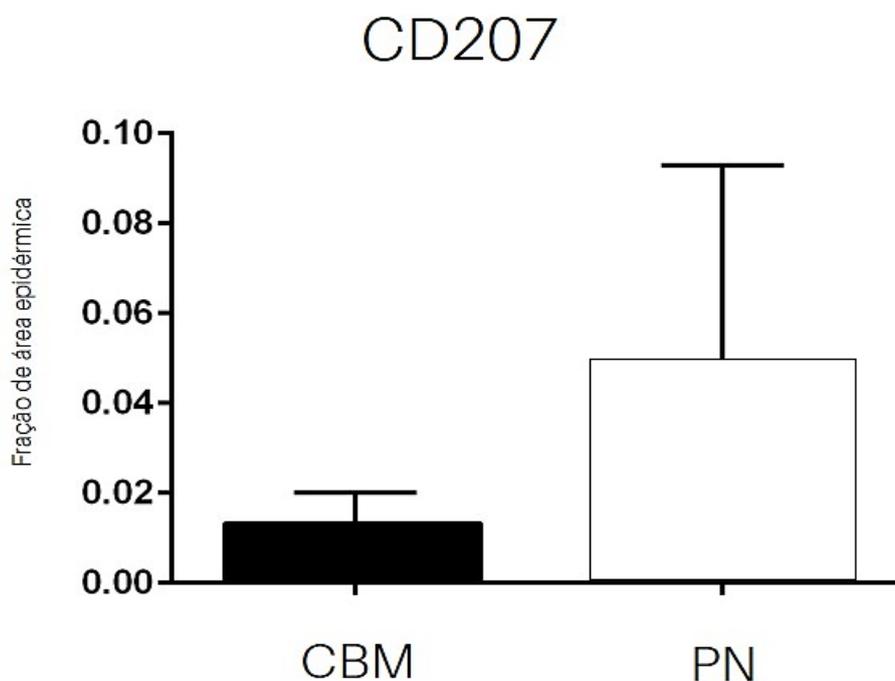


Gráfico 01. Avaliação comparativa da expressão de CD207 entre espécimes de cromoblastomicose e espécimes hígidos.

A avaliação intragrupal dos espécimes de lesão evidenciou que a expressão do marcador é semelhante entre as duas espécies ($p=0,1429$), não conferindo diferença estatisticamente significativa.

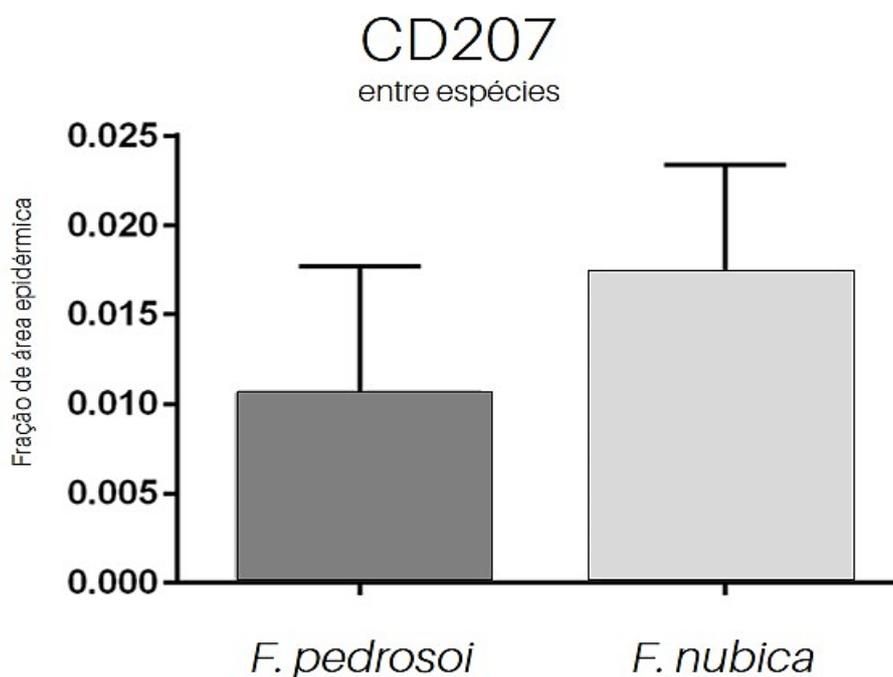


Gráfico 02. Avaliação comparativa da expressão de CD207 nos espécimes de cromblastomicose entre as espécies *F. pedrosoi* e *F. nubica*.

A expressão concomitante de CD207 e IL-17 apesar de perfeitamente identificável, conforme ilustrado nas figuras 05 e 06, não permitiu análise quantitativa em função de limitações técnicas. Nota-se perda significativa dos níveis de expressão dos marcadores quando comparado com suas reações imuno-histoquímicas isoladas.

5.4.2 Macrófagos polarizados

Os macrófagos M1 estavam presente em 77,7% da casuística total, tanto pela expressão de iNOS quanto de pSTAT-1. Já a expressão da classe M2 pelos marcadores Arginase-1 e c-Maf mostrou-se unânime (n=100%).

Quando avaliado o balanço das populações macrofágicas, a análise estatística conferiu diferença estatisticamente significante entre os perfis M1 e M2 tanto dos marcadores citoplasmáticos iNOS X Arginase-1 ($p=0,0039$) quanto dos marcadores citoplasmáticos pSTAT-1 X c-Maf ($p=0,0002$), embasando o predomínio do perfil M2 sobre M1 em espécimes de cromoblastomicose .

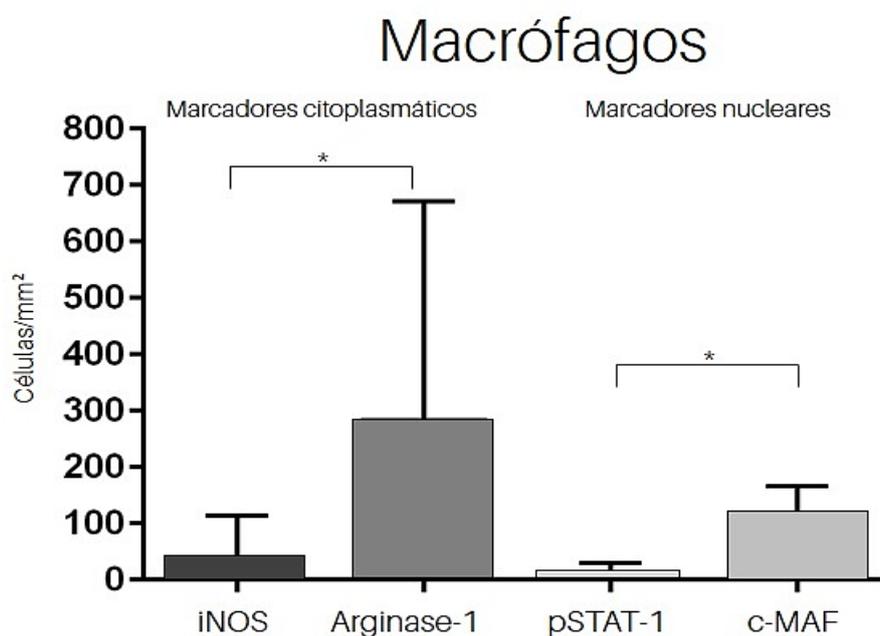


Gráfico 03. Avaliação comparativa entre os marcadores de macrófagos M1 (iNOs X Arginase-1) e de M2 (pSTAT-1 X c-Maf) nos espécimes totais de CBM.

A análise dos marcadores citoplasmáticos de macrófagos M1 e M2 entre as espécies causadoras de CBM evidenciou maior expressão de macrófagos M2 pela presença de Arginase-1 nos dois grupos fúngicos. Entretanto, a comparação da densidade de iNOS entre as espécies não conferiu diferença estatística ($p > 0,9999$) e nem mesmo a expressão de Arginase-1 ($p = 0,3810$).

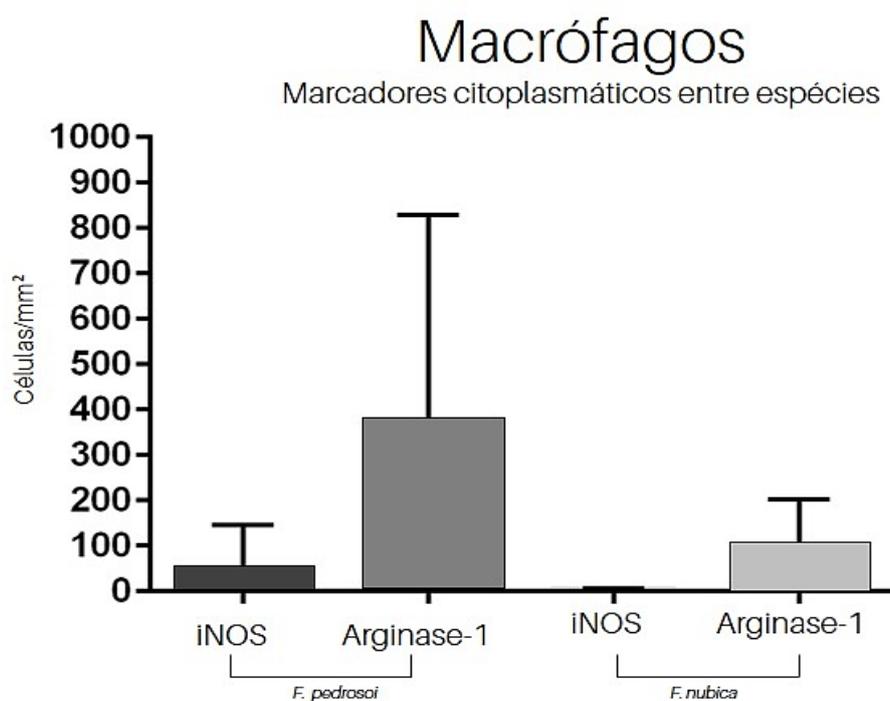


Gráfico 04. Avaliação comparativa entre os marcadores citoplasmáticos de macrófagos polarizados entre as espécies causadoras de CBM.

Resultados semelhantes foram obtidos a partir da análise dos marcadores nucleares de macrófagos M1 e de macrófagos M2 entre as espécies estudadas no presente trabalho. Há expressão mais elevada da classe M2 em relação à M1, entretanto, não houve diferença estatística para pSTAT-1 ($p=0,2024$) nem para c-Maf ($p=0,2$).

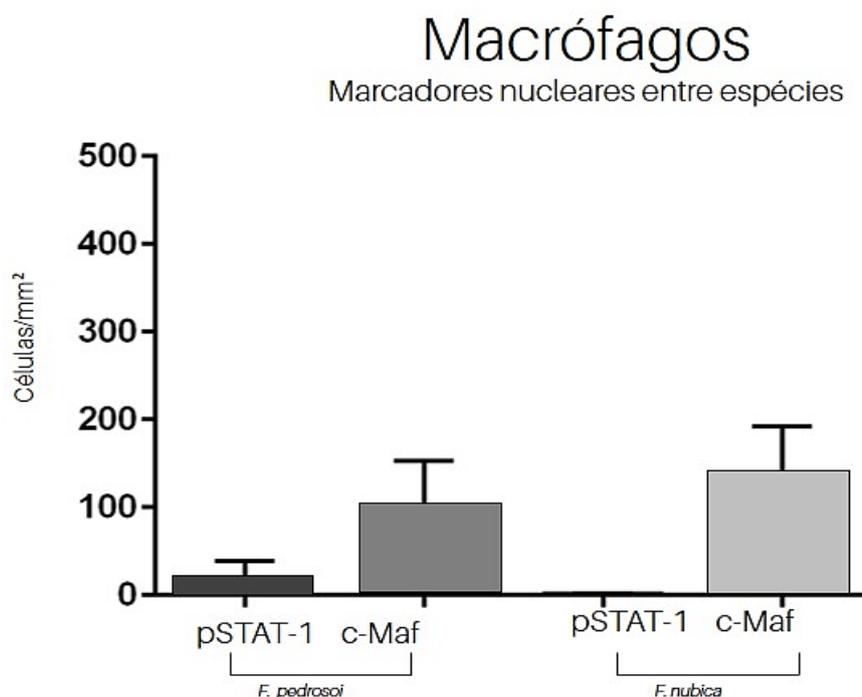


Gráfico 05. Avaliação comparativa entre os marcadores citoplasmáticos de macrófagos polarizados entre as espécies causadoras de CBM.

Quanto à expressão de CD206, a quantificação da positividade do marcador se deu por avaliação semi quantitativa variando de 0 para ausente, 1 para presença discreta, 2 para moderada e 3 para presença intensa. A expressão nos espécimes com cromoblastomicose é superior à expressão em espécimes hígidos ($p=0,0035$).

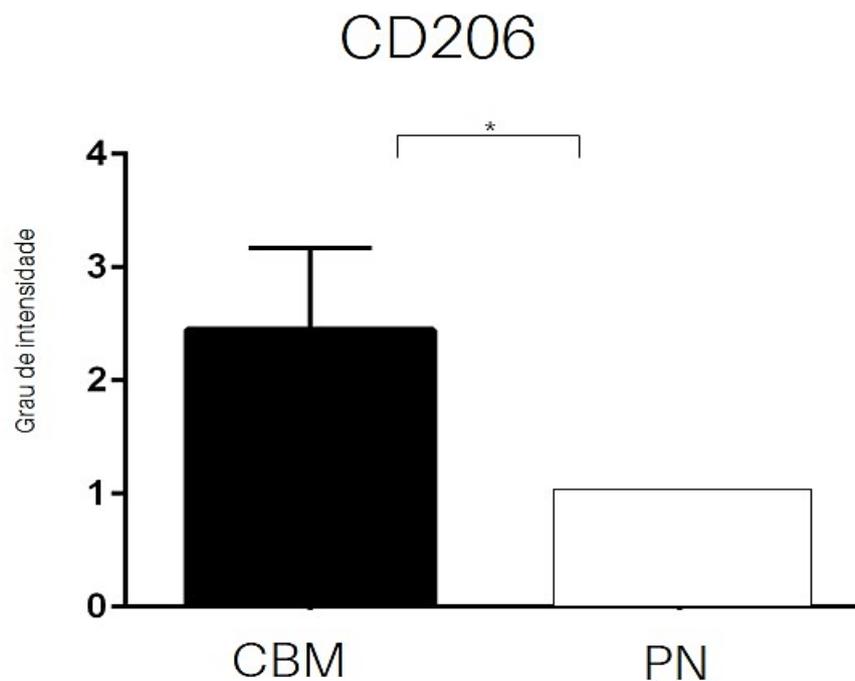


Gráfico 06. Avaliação comparativa da intensidade de expressão de CD206 entre espécimes de cromoblastomicose e espécimes hígidos.

Quando realizada a análise intragrupal, nota-se presença moderada do marcador nos espécimes de ambos os grupos, não havendo diferença estatisticamente significativa ($p=0,0764$).

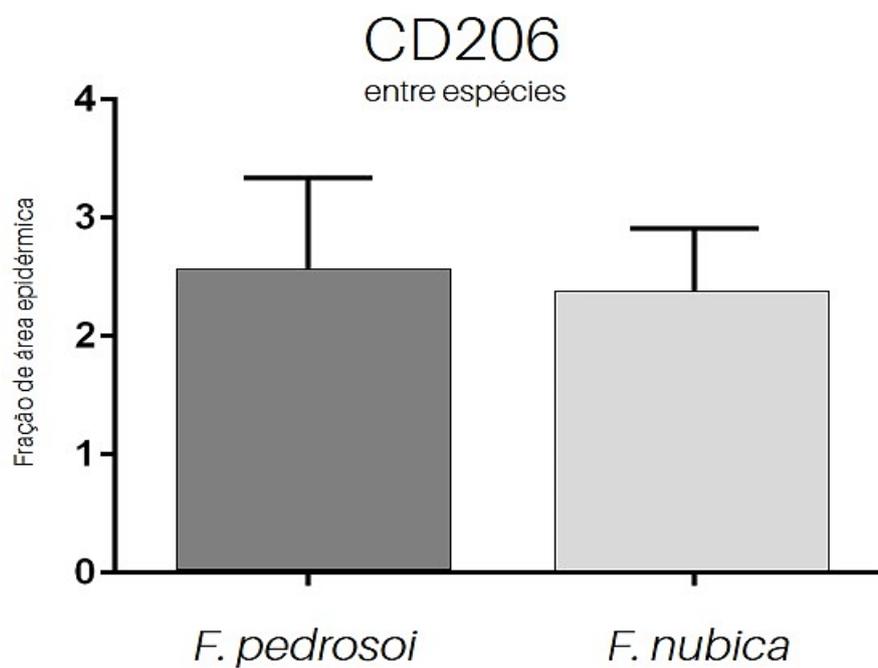


Gráfico 07. Avaliação comparativa da intensidade de expressão de CD206 entre as espécies causadoras de cromblastomicose.

5.4.3 Matriz extracelular

A análise comparativa entre a expressão extracelular de MMP-2 entre espécimes com CBM e espécimes hígidos conferiu diferença estatisticamente significativa ($p=0,0050$) uma vez que o marcador encontra-se ausente em ambiente saudável.

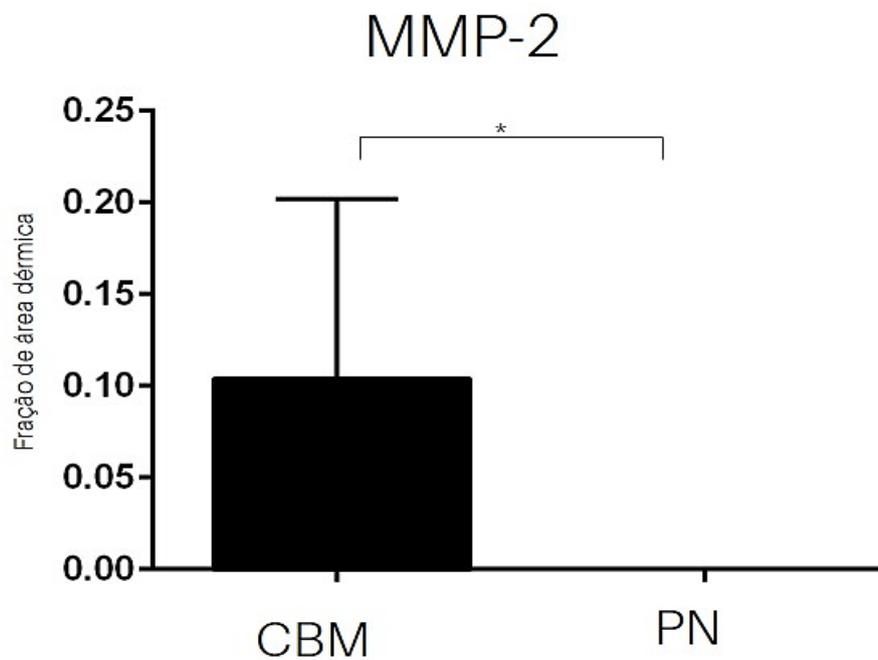


Gráfico 08. Avaliação comparativa da expressão extracelular de MMP-2 entre espécimes de cromblastomicose e hígidos.

A expressão celular de MMP-2 em espécimes hígidos é igualmente nula, conferindo diferença estatisticamente significante $p=0,0165$ em relação aos espécimes acometidos por CBM.

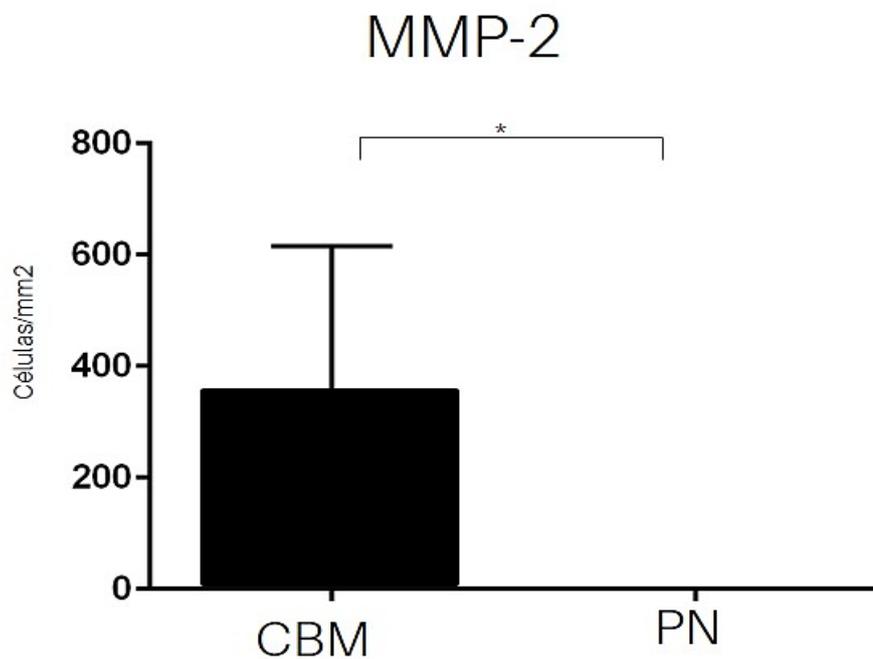


Gráfico 09. Avaliação comparativa da expressão celular de MMP-2 entre espécimes de cromoblastomicose e hígidos.

Assim como ocorre na expressão de MMP-2, os espécimes hígidos não apresentam expressão extracelular de MMP-9, portanto, há diferença estatisticamente significativa ($p=0,0010$) entre a expressão de MMP-9 quando comparada aos espécimes de CBM.

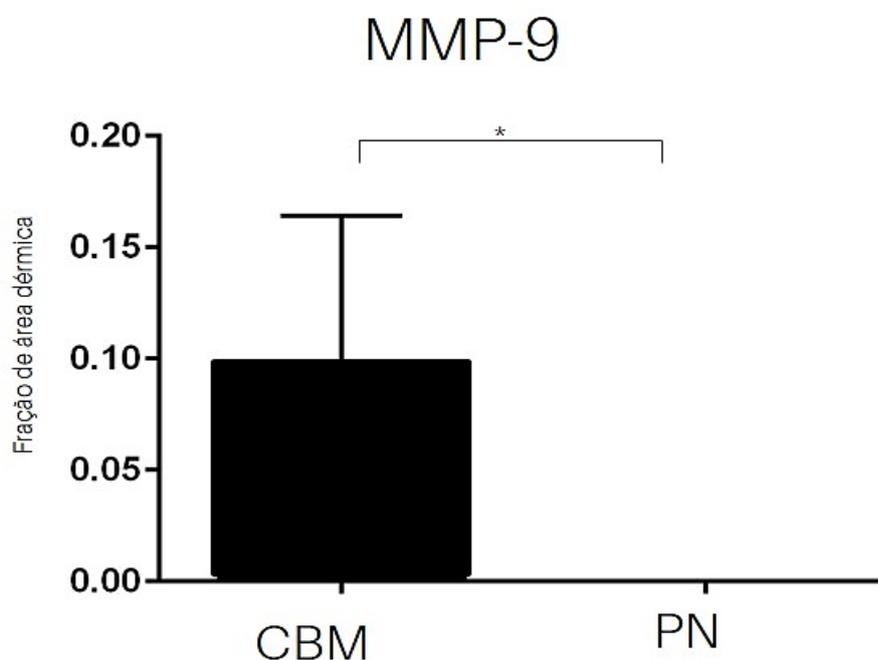


Gráfico 10. Avaliação comparativa da expressão extracelular de MMP-9 entre espécimes de cromoblastomicose e hígidos.

O mesmo padrão é observado quando avaliada a expressão celular de MMP-9 entre espécimes de CBM e espécimes hígidos, a expressão em ambiente saudável é completamente nula; conferindo diferença estatística entre os grupos de comparação ($p=0,0010$).

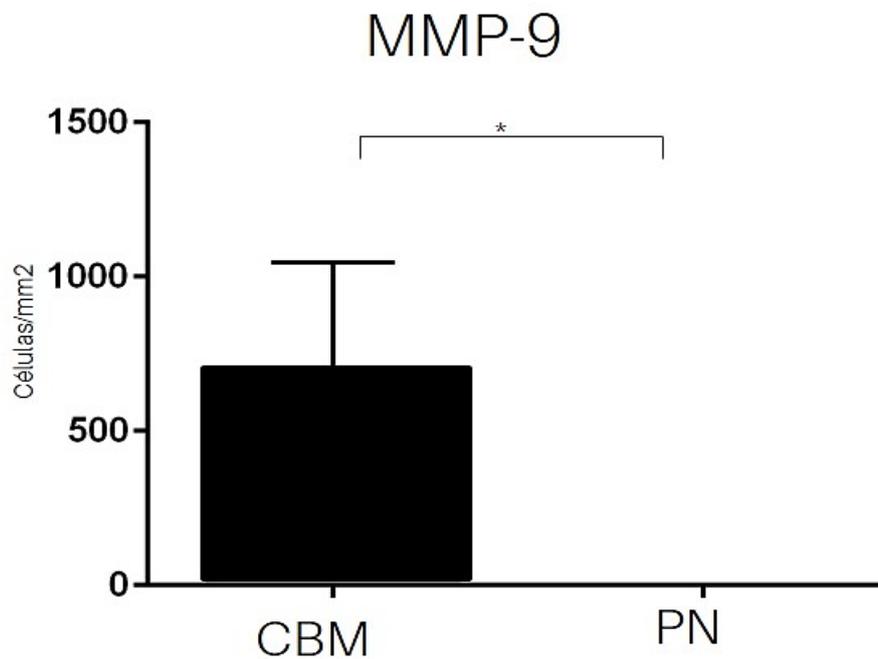


Gráfico 11. Avaliação comparativa da expressão celular de MMP-9 entre espécimes de cromoblastomicose e hígidos.

A adequação do protocolo imuno-histoquímico para a pesquisa de Fibronectina implicou no comprometimento da integridade dos espécimes hígidos, impossibilitando a quantificação do marcador.

Embora correspondam ao mesmo tecido de análise, o tegumento, a técnica foi realizada com sucesso em espécimes de lesão. A expressão foi observada em células de ambos os grupos de CBM, entretanto, sem diferença estatisticamente significativa ($p=0,3810$).

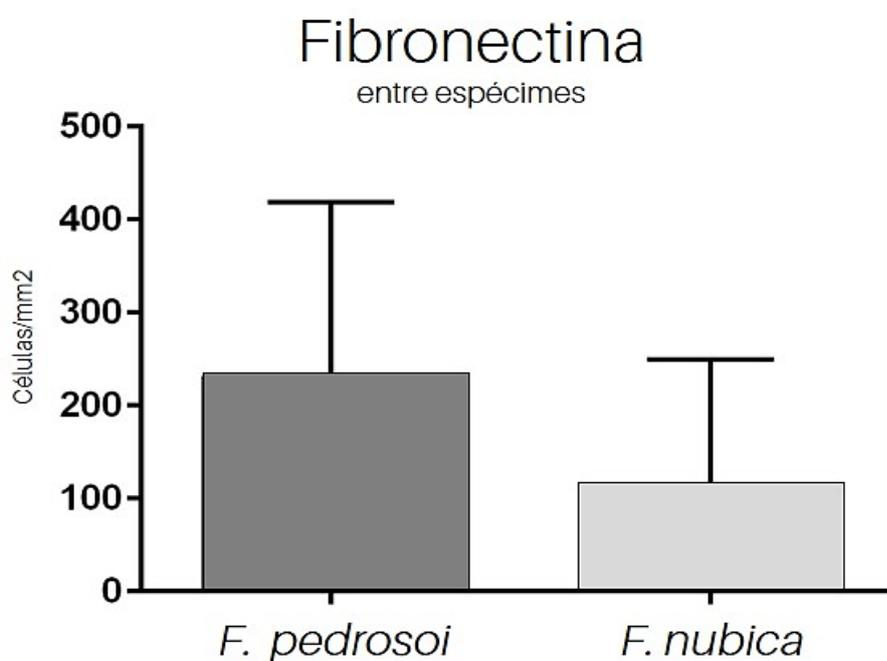


Gráfico 12. Avaliação comparativa da expressão celular de Fibronectina entre as espécies causadoras de cromoblastomicose.

A imunopressão por fração de área de Laminina entre espécimes de CBM e espécimes hígidos mostrou-se estatisticamente significativa ($p=0,0010$) uma vez que o marcador não é expresso em ambiente saudável.

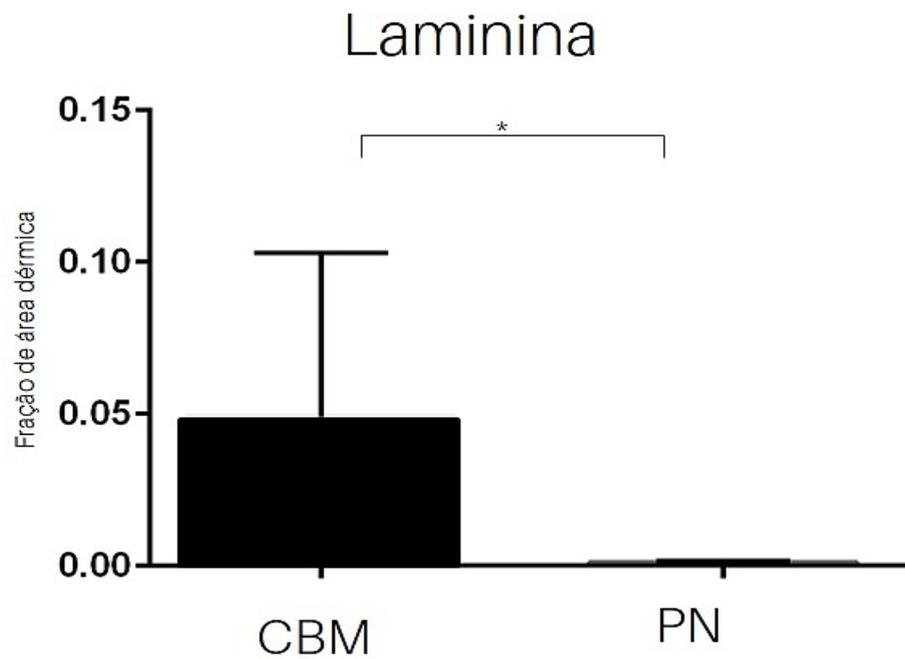


Gráfico 13. Avaliação comparativa da expressão extracelular de Laminina entre espécimes de cromblastomicose e espécimes hígidos.

A imunoexpressão por fração de área de Colágeno IV mostrou-se semelhante entre os espécimes de CBM e os espécimes hígidos ($p=0,0649$).

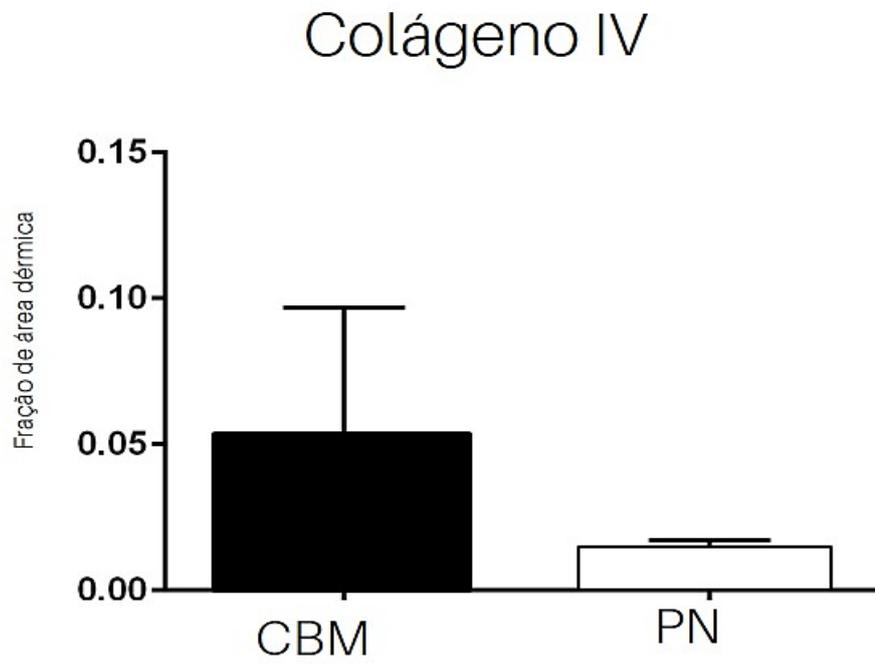


Gráfico 14. Avaliação comparativa da expressão extracelular de Colágeno IV entre espécimes de cromoblastomicose e espécimes hígidos.

Os marcadores Laminina, Colágeno IV e Fibronectina foram avaliados ainda através de sua expressão por fração de área levando em conta os grupos de lesão. Os três marcadores mostram positividade em todos os espécimes de lesão e em quantidades similares entre os grupos de *F. pedrosol* e *F. nubica*, não conferindo diferença estatística (Laminina $p=0,1548$; Colágeno IV $p= 0,3810$; Fibronectina $p=0,5476$).

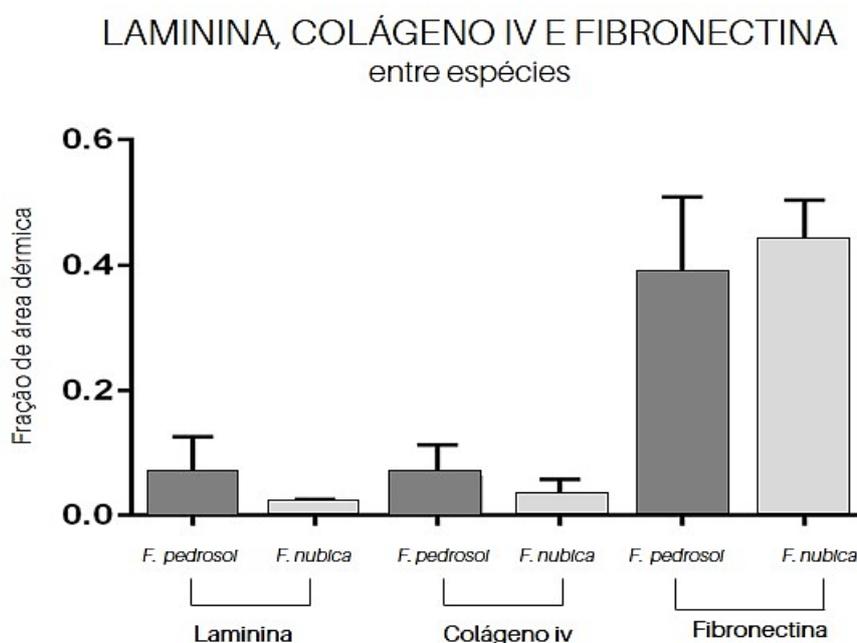


Gráfico 15. Avaliação comparativa da expressão extracelular de Laminina, Colágeno IV e Fibronectina entre as espécies causadoras de CBM.

6. Discussão

Há meados de uma centena de anos da primeira observação da cromoblastomicose ⁹ e, embora diversos grupos de pesquisa se dediquem a compreendê-la, ainda há muitas questões a serem aclaradas, de modo especial do ponto de vista imunopatológico da doença ³⁰.

A ineficiência da resposta imune na eliminação de células fúngicas e na contenção da doença em pacientes com lesões verrucosas de cromoblastomicose é bem descrita ^{21,22}. No entanto, os motivos pelos quais o hospedeiro não é capaz de erradicar o fungo e atingir o estágio de cura merecem maiores esclarecimentos.

6.1 Células de Langerhans

Dentre o agrupado de achados apresentados neste estudo, evidenciamos a participação de células de Langerhans através da presença de CD207 nos espécimes de pacientes com CBM. Tais células foram avistadas com ampla distribuição ao longo de toda a epiderme, bem como no grupo controle. Entretanto a análise comparativa da expressão epidérmica evidenciou diminuição significativa das células CD207⁺ no grupo de lesão, sinalizando possível migração desses elementos para outras regiões do tecido ou mesmo para outros tecidos do organismo.

Curiosamente, nos espécimes de CBM detectamos a presença de células CD207⁺ também na derme superficial e reticular média, fato não observado em espécimes hígidos.

A elaboração da resposta imunológica envolve diversos processos e há populações celulares essenciais para a sua instauração. O evento primário da cascata imunológica é a apresentação de antígenos, atividade exercida com maestria pelas células de Langerhans ^{17,31}.

A minimização da apresentação de antígenos epidérmicos e a presença destes na região dérmica já justificariam a investigação como ilustrativo da provável atividade migratória dessas células em direção às células efetoras na CBM. Entretanto, a alta densidade dessas células em infiltrados inflamatórios e formações granulomatosas chamou atenção para avaliação mais aprofundada desses elementos.

Mais que detectar a presença de Células de Langerhans e seu processo migratório caracterizamos uma subclasse dessa linhagem celular ainda pouco compreendida, as células CD207/IL-17⁺.

Em estudo transversal retrospectivo prévio nosso grupo avaliou o desempenho das populações linfocitárias de apoio Th17 e Treg em lesões de pele de CBM. Os dados obtidos na ocasião evidenciaram o predomínio do perfil Th17 sobre as células T reguladoras e acredita-se que tal desequilíbrio pode ser um dos principais contribuintes para a ineficiência da resposta imune estabelecida ²⁶.

Uma análise paralela entre os achados atuais e os prévios permite inferir que a resposta linfocitária preponderante nos espécimes de CBM sofre influências já na apresentação de antígenos, corroborando com dados da literatura sobre a capacidade das células dendríticas de agirem como moduladores do microambiente em que estão inseridas ³².

Apesar disso, nossos dados levantam uma incógnita sobre as células identificadas. De acordo com os dados de Ratzinger e seus colaboradores, as células de Langerhans são o subtipo de células dendríticas mais potente para a estimulação de células T citolíticas; uma subclasse de células TCD8 capazes de destruir exclusivamente células portadoras de antígenos associados a produtos de MHC de classe I e capazes ainda de promover a homeostase tegumentar por meio de células T reguladoras ³³.

Embora células T reguladoras tenham sido identificadas outrora no microambiente das lesões verrucosas de CBM, nota-se que sua presença e/ou desempenho não são suficientemente capazes de modular a resposta imune de maneira a atingir efetividade ideal para a eliminação do fungo e contenção da doença ²⁶, o que nos permite explicar no momento sobre as células CD207/IL-17⁺ se tratarem de outro subtipo de células dendríticas que apesar de guardar semelhanças, não são Langerhans.

Outros grupos científicos descreveram células CD207 em ambiente dérmico. Mostraram sua capacidade de repovoamento, que aparentemente não é típico em CL ³⁴, mostraram inclusive a expressão concomitante de IL-17 em lesões de pele e osso de Histiocitose de células de Langerhans ³⁵. Mostraram ainda, que essas células estão inseridas em um contexto de baixa expressão de TGF- β ³⁶, tal qual em nosso estudo prévio com espécimes de CBM ²⁶.

Esse conjunto de fatores reforça a ideia de que as células aqui identificadas, células dérmicas CD207/IL-17⁺, podem ser uma nova subpopulação de células dendríticas distintas das Langerhans e que, pelo menos em nosso estudo, parecem cooperar com a cascata da resposta imune de Th17.

6.2 Macrófagos polarizados

É sabido que o sucesso da resposta imune do hospedeiro frente a um patógeno é altamente dependente da capacidade que as células imunes tem de trabalhar em sinergia, agindo com elementos das respostas imunes inata e adaptativa em equilíbrio tal que seja fatal ao agressor, preferencialmente sem causar óbices significativos ao organismo hospedeiro ^{17,35}. Dito isso, tão importante quanto a apresentação de antígenos é o processo de fagocitose.

A investigação de macrófagos polarizados na presente casuística evidenciou que ambos os perfis estão presentes no microambiente da CBM. Entretanto o perfil M2, caracterizado pela expressão de Arginase-1 e c-Maf, é predominante.

A avaliação do CD206 tornou evidente a presença do marcador tanto em ambiente saudável quanto nas lesões de cromoblastomicose, mas nota-se que no ambiente de lesão sua expressão torna-se mais acentuada.

Por vezes atrelado ao perfil M2 de resposta macrofágica ³⁷, esse receptor de manose é também expresso por células dendríticas, células endoteliais e outras classes celulares, o que explica sua presença nesses espécimes ³⁸.

Um estudo envolvendo CD206 em experimento imuno-histoquímico e de citometria de fluxo constatou que células dendríticas do tipo “não Langerhans” (CD1a⁺/CD206⁺/ negativas para grânulos de Bierbeck em microscopia eletrônica) expressam o marcador e aparentemente o utilizam para endocitose nos contextos de dermatite atópica e psoríase ³⁸. Diante disso, a presença elevada deste marcador de CD206 no presente contexto é fundamentado por duas das populações aqui estudadas, permitindo afirmar apenas que ele

participa da indução da resposta inflamatória da cromoblastomicose, mas sem maiores explicações quanto a sua ontogenia e ativação.

Os agentes causadores da CBM são fungos que possuem melanina em sua parede celular ³⁹⁻⁴¹ e está bem documentado que a presença de melanina compromete a resposta oxidativa dos macrófagos através do impedimento da síntese de óxido nítrico, permitindo a replicação dos fungos no interior dos fagócitos e a consequente evolução da infecção ⁴²⁻⁴⁵.

Vale ressaltar que a resposta imune clássica contra fungos é orquestrada via fagocitose realizada por macrófagos com auxílio de IFN- γ , que presta suporte à ação de neutrófilos e dos próprios macrófagos. Sendo assim, qualquer instabilidade na ação macrofágica contra fungos pode significar importante prejuízo ao hospedeiro ⁴⁶ e como já vimos na revisão literária do presente estudo, as lesões verrucosas constituem o perfil de resposta menos efetiva, com discreta incidência de IFN- γ ²⁵.

Gordon e Martinez ⁴⁷ explanam sobre a alta plasticidade macrofágica, que pode levá-los a se diferenciar em M1 ou M2 ao decorrer do processo de resposta ao agente agressor. É possível que a presença de iNOS e pSTAT-1 na atual casuística signifique uma tentativa de resposta local mais efetiva em um dado momento da infecção, provavelmente no estágio inicial da infecção, mas que a interação melanina/macrófago não a permita se firmar.

Fairweather e colaboradores ⁴⁸ acreditam que assim como as infecções evoluem de aguda à crônica levando o perfil linfocitário a se adaptar de Th1 para Th2, é possível que alguns microorganismos modulem a resposta macrofágica com o intuito de que essas células se direcionem a um perfil mais ameno, de tolerância, corroborando com o raciocínio exposto no presente trabalho.

Mosser e Edwards ⁴⁹ afirmam que o recrutamento de macrófagos M2 pode por vezes beneficiar o hospedeiro, pois o intuito dessa classe celular é atenuar a resposta imune e impedir que a severidade da resposta M1 gere óbices ao organismo, no entanto, a presença dessas células tem sido apontada como fomentadora da cronicidade de doenças infecciosas ⁵⁰.

Um estudo mais recente discute os benefícios e prejuízos dos macrófagos polarizados. Segundo os autores, uma resposta excessiva de macrófagos M1 pode potencialmente levar a um estado de inflamação crônica, enquanto que o excesso de macrófagos M2 pode levar a fibrose do tecido e até, em alguns contextos, promover o aparecimento de tumores. Desta forma a questão sobre os macrófagos polarizados estaria mais ligada a sua quantidade que a sua polaridade ⁵¹.

Os achados de D'avila ²⁴ mostram que situação semelhante ocorre com as populações linfocitárias nesses espécimes: as lesões verrucosas de CBM mostram predomínio do perfil Th2 de linfócitos em detrimento de Th1, de forma que a resposta efetora está mais associada à tolerância imunológica do que à eliminação do agente.

Frente às informações apresentadas cresce o questionamento sobre o mecanismo de ação dos macrófagos na CBM. Estariam eles protegendo o hospedeiro ou favorecendo o invasor?

Fato comprovado é que o processo fagocítico em lesões verrucosas de cromoblastomicose é ordenado por macrófagos do tipo M2 com sutil participação de células M1.

Quer seja para evitar a disseminação da infecção e eventuais danos ao organismo, quer seja para albergar o fungo, o perfil regulador dessas células

parece impactar direta e negativamente na evolução de uma resposta imune mais robusta contribuindo para a evolução e cronicidade da doença, além de estar em consonância com a resposta linfocitária estabelecida.

6.3 Matriz extracelular

Ainda que a resposta imunológica estabelecida não seja a mais eficaz do ponto de vista do hospedeiro, o sistema imune permanece na tentativa de reagir ao agressor ^{31,52}. No caso da cromoblastomicose, as tentativas incessantes de contenção da infecção resultam no surgimento de fibrose, de numerosos vasos neoformados, entre outros ².

Para explorar outros eventuais danos que a fisiopatologia da cromoblastomicose possa resultar ao paciente avaliamos a matriz extracelular quanto a sua sustentação, tensão e sinalização celular.

A análise comparativa entre a expressão de colágeno IV entre espécimes de CBM e espécimes hígidos evidenciou índices similares do marcador, permitindo inferir que mesmo com a intensa atividade imunológica as fibras colágenas responsáveis pela sustentação, ou ao menos parte delas, do tecido tegumentar permanecem preservadas.

Um estudo *in vitro* com leveduras de *P. brasiliensis*, micose que guarda muitas similaridades com a CBM, evidenciou que o fungo se utiliza de enolase recombinante (rPbEno) para conseguir a ligação com moléculas de Colágeno do tipo I, Fibronectina e macrófagos para se estabelecer no meio ⁵³.

Realizando um comparativo entre os dados de ambas as micoses, pode-se levar em conta a possibilidade de que manter as fibras colágenas faça parte da estratégia do gênero *Fonsecaea* para se estabelecer, o que justificaria os resultados aqui apresentados.

Quando avaliadas as metaloproteinases, observamos que a expressão na CBM é inversamente proporcional a expressão na pele sã. Enquanto 100% do grupo de lesão mostra a presença dos marcadores, o grupo controle é absolutamente negativo.

As metaloproteinases servem como parâmetro de tensão entre os componentes da matriz de modo que a positividade de expressão desses elementos pode traduzir que a alta atividade imunológica durante a infecção altera a estrutura do tecido tegumentar^{54,55}, fato não identificado em espécimes sãos.

Um estudo imuno-histoquímico dos momentos pré e pós tratamento com terbinafina em pacientes de CBM avaliou a qualidade de colágeno do tipo I, MMP1 e 9. Os achados desse estudo evidenciaram redução dos marcadores avaliados pré e pós terapia, bem como de fibroblastos, macrófagos, neutrófilos e transglutaminases, apontando que citocinas e fibroblastos epidérmicos são essenciais para a regulação da matriz extracelular e esta, por sua vez, em associação a presença abundante de TGF- β contribuem para a formação de fibrose, fator tão presente nas lesões de CBM⁵⁶.

Em outro contexto, no melanoma *in situ*, experimentos mostram que no processo de degradação da matriz extracelular as MMP 2 e 9 tem a função de atuar especificamente sob o colágeno denaturado e do tipo IV a fim de preservar a estrutura do tecido tegumentar⁵⁷.

Diante disso, podemos inferir que tal qual a MMP1 e o colágeno I, as MMP 2 e 9 e o colágeno IV também desempenham papel importante na formação de fibrose, bem como na tentativa de manter a integridade da matriz extracelular.

Nos espécimes da presente casuística as metaloproteinases (2 e 9) encontram-se superiores enquanto que as fibras de colágeno IV mostram-se similares aos espécimes hígidos, o que pode suscitar duas possibilidades: ou o gênero *Fonsecaea* não interage com fibras colágenas do tipo IV ou a interação ocorre no estágio inicial da doença, precedente ao momento da realização da biópsia, e posteriormente retoma aos níveis de pacientes saudáveis.

Caberia como suporte à segunda hipótese o estudo realizado em pulmões de camundongos acometidos por *P. brasiliensis*, onde a destruição das fibras colágenas dos tipos I, III e IV ocorre até o terceiro dia pós infecção e do quarto dia em diante as fibras voltam a se regenerar⁵³, ainda assim há necessidade de estudos mais aprofundados para confirmar tal hipótese.

O último aspecto observado foi o de sinalização celular, por meio das glicoproteínas Laminina e Fibronectina, responsáveis pela orientação da migração celular^{53,58}. A análise comparativa da imunoexpressão dos marcadores evidenciou que ambos os marcadores tiveram maior densidade de expressão no grupo de lesão.

Em citação prévia, a alta expressão de Fibronectina foi documentada também na presença de *P. brasiliensis* e os autores discutem sua importância para o fungo, uma vez que ele parece se utilizar das características de alguns dos componentes da MEC para instaurar a infecção⁵⁸.

No contexto do estudo realizado com células A549, González e colaboradores mostraram que a inibição de Fibronectina, Fibrinogênio e Laminina minimiza a disseminação de conídios de *P. brasiliensis*⁵³.

Segundo os autores a degradação da MEC é um evento chave para o desencadeamento da resposta imunológica já nos primeiros dias pós infecção e, tal qual ao processo fagocítico, os fungos se aderem aos componentes da MEC para migrar para outros tecidos, alastrando a infecção⁵³.

Altos níveis de fibronectina foram associados também ao pobre prognóstico de tumores de cabeça e pescoço e especialmente em carcinomas epidermóides, uma predisposição dos pacientes acometidos por cromoblastomicose. Acredita-se que as células tumorais também sejam capazes de produzir fibronectina, de modo a facilitar sua adesão às células híbridas e a migração ao longo do estroma tumoral⁵⁹.

Em suma, os dados supracitados evidenciam o aumento da imunopressão das Metaloproteinases 2 e 9, Fibronectina e Laminina, além da preservação dos níveis de colágeno IV, sinalizando a ocorrência de degradação da matriz extracelular e ao mesmo tempo a preservação de algumas estruturas de sustentação do tecido tegumentar nos pacientes acometidos por CBM.

Não é possível afirmar se as alterações na matriz extracelular ocorrem pela atividade imunológica do hospedeiro, pela atividade fúngica ou por ambos, ainda assim, tais achados inferem que a degradação da MEC parece funcionar mais como um dos sistemas de transporte do fungo e agravante do aspecto verrucoso das lesões do que de fato um auxiliar de identificação do patógeno e de resolução da doença, isso porque mesmo identificado pelo organismo

hospedeiro, o microambiente permanece favorável a estadia do fungo por longa período.

6.4 As espécies avaliadas

A avaliação intragrupo dos espécimes de cromoblastomicose evidenciou a presença das espécies *Fonsecaea pedrosoi* e *Fonsecaea nubica*. Dos nove pacientes que compõem a casuística, seis são da espécie *F. pedrosoi* e três *F. nubica*.

Dos parâmetros epidemiológicos, histopatológicos e imuno-histoquímicos aqui avaliados ambas as espécies mostram padrão de estabelecimento muito semelhante.

É bem descrito que a cromoblastomicose pode ser causada por diversos agentes fúngicos, bem como as apresentações clínicas são variadas^{5,11,12}. Mas ainda não é conhecido um algoritmo que determine a forma mais branda e a melhor resposta frente à doença⁶¹.

É possível e altamente provável que espécies diferentes tenham mecanismos de ação diferentes e essas diferenças se correlacionem com as formas clínicas e imunopatologia da cromoblastomicose, mas os achados obtidos no presente trabalho não identificaram diferenças significativas entre as espécies estudadas. Até porque ambas resultaram na apresentação verrucosa da doença e formação granulomatosa com os mesmos elementos e disposição.

Ainda assim, sendo a *Fonsecaea nubica* uma das mais recentes espécies identificadas como causadora da cromoblastomicose ^{11, 62} os achados deste estudo contribuem para seu melhor conhecimento.

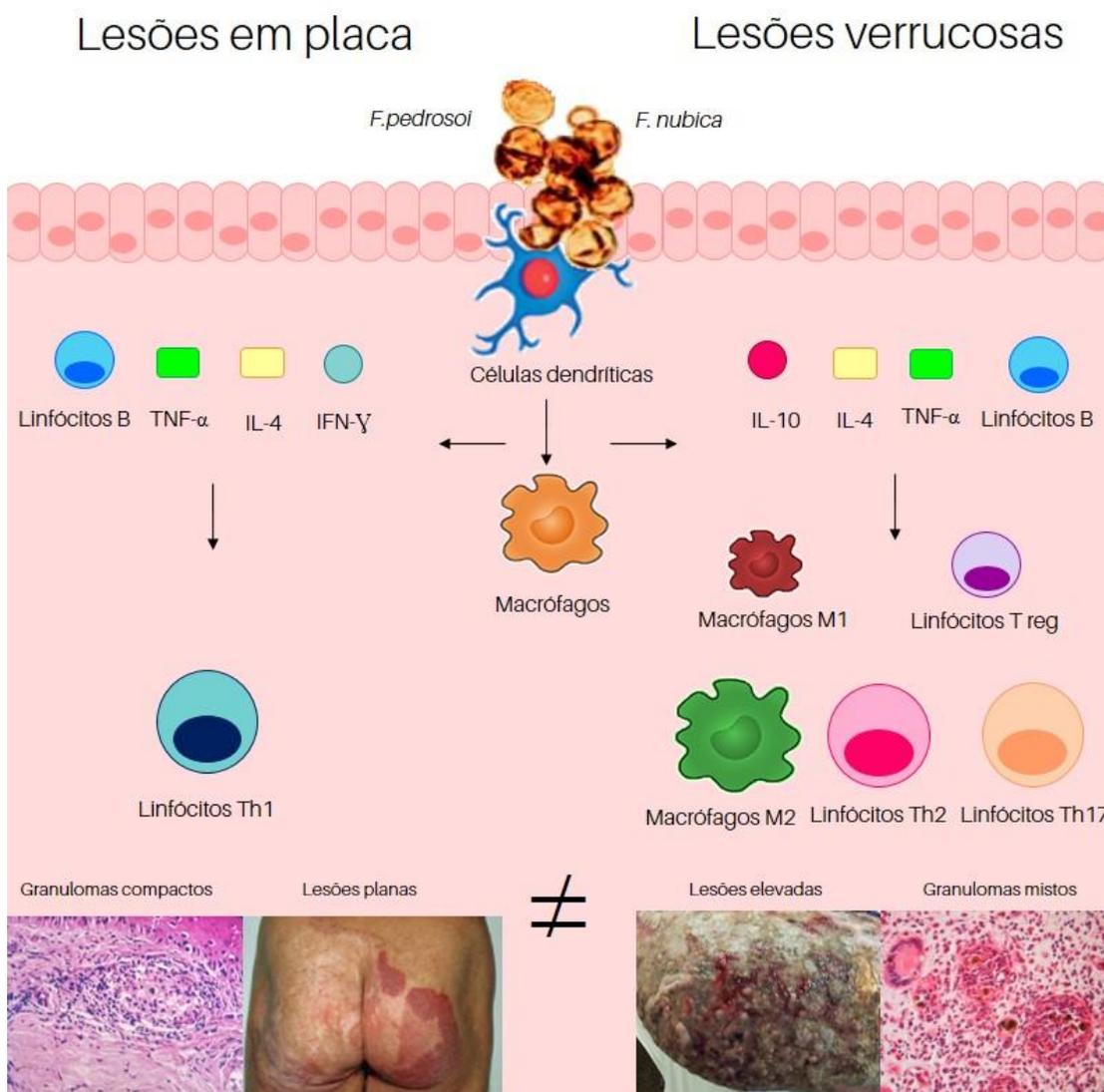
6.5 Considerações finais

Em última análise podemos conjecturar que mediante a presença do patógeno as células CD207/IL-17⁺ se mobilizam para sinalizar a contaminação do meio, bem como as células macrofágicas polarizam-se para contribuir com o englobamento do patógeno e juntos, células dendríticas e macrófagos, orquestram o estabelecimento da resposta de defesa, direcionando a resposta imunológica de acordo com o fenótipo do microambiente.

Nas lesões em questão, institui-se o predomínio do eixo Th2/M2, com quantidade expressiva de células Th17 e discretas células T reguladoras, além de formação granulomatosa pouco organizada, constituindo um microambiente de tolerância de alta atividade imunológica.

Muito embora haja um arsenal imune robusto envolvido nas tentativas de contenção da infecção, o padrão de resposta imune estabelecido não só não consegue eliminar o fungo como provoca degradação da matriz extracelular cutânea, contribuindo para a formação de lesões exuberantes e a cronicidade da doença, quer seja esse patógeno *F. pedrosoi* ou *F. nubica*, como ilustra o esquema a seguir:

Figura 16. Conjecturas sobre a imunologia das lesões de cromoblastomicose.



Fonte: Elaborado pelo autor. Adaptado de D'ávila *et al.*, 2003; Sotto *et al.*, 2004; Mazo *et al.*, 2005; da Silva *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2014.

Dado que a cromoblastomicose compõe o grupo de doenças tropicais negligenciadas, o presente estudo espera contribuir com a melhor compreensão da doença e fomentar a discussão sobre opções terapêuticas que propiciem o equilíbrio entre os eixos Th1/Th2 e M1/M2 e sejam mais efetivas para a resolução da infecção.

6.6 Limitações do estudo

A delimitação do presente estudo partiu do apanhado de trinta e nove biópsias coletadas de vinte e dois pacientes atendidos na Divisão de Clínica Dermatológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) ao longo de dezesseis anos (1994-2010).

Para assegurar a consistência dos dados que seriam posteriormente apresentados foram aplicados filtros que permitissem uma amostra fidedigna ao proposto: as primeiras biópsias de atendimento no serviço do HC-FMUSP, sem início terapêutico, com diagnóstico seguro de cromoblastomicose, espécimes com área suficiente para avaliação dos elementos imunes e informações adicionais sobre o agente.

Por tratar-se de um estudo retrospectivo de uma doença onde a alta incidência é em regiões rurais^{5,11,59} e o atendimento médico nos últimos tempos estar cada vez menos centralizado, o afilamento do número dos sujeitos de pesquisa foi inevitável, resultando em nove espécimes inquestionavelmente adequados para o escopo proposto.

Além disso, o estudo imuno-histoquímico *in situ* permite avaliar e mensurar os elementos apenas no momento exato da biópsia sem que se possa enumerar a ordem de sucessão de eventos. Por outro lado, possibilita a ilustração veraz do momento da biópsia.

7. Conclusões

- A molécula CD206, células CD207⁺, macrófagos polarizados dos tipos 1 e 2 participam da resposta imune *in situ* na cromoblastomicose;
- Identificamos células dendríticas dérmicas com fenótipo CD207/IL-17⁺, possivelmente uma subclasse diferente das Células de Langerhans CD207⁺, que nesse microambiente parecem cooperar para a evolução da resposta Th17;
- Ambos os perfis de macrófagos polarizados (M1 e M2) participam da resposta imune *in situ* da CBM. Entretanto, há predomínio do perfil M2, favorecendo a cronicidade da doença;
- As metaloproteinases 2 e 9 encontram-se significativamente mais expressas em espécimes de CBM que em espécimes hígidos, sinalizando importante dano à matriz extracelular decorrente da infecção estabelecida;
- Mesmo com a ação das células fúngicas e do acionamento da cascata imune os níveis de colágeno do tipo IV permanecem preservados;
- Os níveis de Fibronectina e Laminina são mais elevados no grupo de lesões que no grupo controle. Especula-se que o fungo se utilize dessas glicoproteínas como parte de sua estratégia para instaurar a infecção;

- Os elementos imunes frente ao *Fonsecaea nubica* e ao *Fonsecaea pedrosoi* parecem se comportar de maneira semelhante, ao menos no contexto das lesões verrucosas de cromoblastomicose.

Referências

1. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, de Melo NT. Cromoblastomicoses. In: *Tratado de Micologia Médica Lacaz*. Sarvier. Cap 18, pag 441-461, 2002.
2. Correia RTM, Criado PR, Valente NYS, Martins JEC. Chromoblastomycosis: study of 27 cases and review of medical literature. *An. Bras. Dermatol.* 2010; 85:448-54.
3. World Health Organization. Neglected Tropical Diseases. [online]. 2018. Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/mycetoma-chromoblastomycosis-deep-mycoses/en/index1.html Acesso em 01/08/2018.
4. Araujo IS, Moreira AL, Aguiar R. Doenças negligenciadas, comunicação negligenciada. Apontamento para uma pauta política e de pesquisa. *RECIIS*. 2013; 6(4). Disponível em: <https://www.reciis.icict.fiocruz.br/index.php/reciis/article/view/706/1351> Acesso em 13/08/2018.
5. Queiroz-Telles F, Esterre P, Perez-Blanco M, Vitale RG, Salgado CG, Bonifaz A. Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Med. Mycol.* 2009; 47:3-15.
6. Mouchalouat, M.F *Cromoblastomicose. Estudo de uma série de 14 casos atendidos no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, de 1994 a 2005*. Rio de Janeiro, 2008. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas]. Instituto de Pesquisa Evandro Chagas.
7. Pires CA, Xavier MB, Quaresma JA, Macedo GM, Sousa BR, Brito AC. Clinical, epidemiological and mycological report on 65 patients from the Eastern Amazon region with chromoblastomycosis. *An Bras Dermatol.* 2012; 87: 555-60.
8. Brito AC, Bittencourt MJS. Chromoblastomycosis: an etiological, epidemiological, clinical, diagnostic, and treatment update. *An Bras Dermatol.* 2018; 93(4):495-506.

9. Rudolph M. Über die brasilianische “Figueira” (Vorläufige Mitteilung). *Arch. Schiffs u Tropen. Hyg.* 1914;18:498–499.
10. Pedroso A, Gomes JM. Sobre 4 casos de dermatite verrucosa produzida pela *Phialophora verrucosa*. *Ann Paulistas de Med e Cir.* 1920; 11: 53–61.
11. Gomes RR, Vicente VA, Azevedo CM, Salgado CG, da Silva MB, Queiroz Telles F, et al. Molecular Epidemiology of Agents of Human Chromoblastomycosis in Brazil with the Description of Two Novel Species. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 28.10(11):e0005102. doi:10.1371/journal.pntd.0005102.
12. Queiroz-Telles F, Hoog S, Santos DWCL, Salgado CS, Vicente VA, Bonifaz A, et al. Chromoblastomycosis. *Clin Microbiol Rev.* 2017; 30(1):233-76.
13. Le TA, Nguyen KL, Pham MH, Vi TT, Do NA. Case Report: A case of Chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* in Vietnam. *Mycopathologia.* 2018; 1-5. doi: 10.1007/s11046-018-0284-3.
14. McGinnis MR. Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis, and mycology. *J Am Acad Dermatol* [online]. 1983; 8(1):1–16.
15. Azevedo CDM, Marques SG, Resende MA, Gonçalves AG, Santos DV, da Silva RR, et al. The use of glucan as immunostimulant in the treatment of a severe case of chromoblastomycosis. *Mycoses.* 2008; 51:341–344.
16. Teixeira de Sousa MG, Belda W Jr, Spina R, Lota PR, Valente NS, Brown GD, et al. Topical application of Imiquimod as a treatment for chromoblastomycosis. *Clin Infect Dis.* 2014; 58:1734–1737.
17. Bartemes KR, Kita H. Innate and adaptive immune responses to fungi in the airway. *J Allergy Clin Immunol.* 2018; 142(2):353-363.
18. Salgado CG, da Silva JP, Diniz JAP, da Silva MB, da Costa PF, Teixeira C, et al. Isolation of *fonsecaea pedrosoi* from thorns of *mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* [online]. 2004; 46: 33-6.

19. Uribe F, Zuluaga AI, Leon W, et al. Histopathology of chromoblastomycosis. *Mycopathologia*. 1989; 105: 1-6.
20. Sotto MN, de Brito TD, Silva AMG, Castro LG. Antigen distribution and antigen-presenting cells in skin biopsies of human chromoblastomycosis. *J Cutan Pathol*. 2004; 31: 14-8.
21. da Silva JP, da Silva MB, Salgado UI, Diniz JA, Rozental S, Salgado CG. Phagocytosis of *Fonsecaea pedrosoi* conidia, but not sclerotic cells caused by Langerhans cells, inhibits CD40 and B7-2 expression. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007; 50: 104-11.
22. Hayakawa M, Ghosn EEB, de Sousa MGT, Ferreira KS, Almeida SR. Phagocytosis, production of nitric oxide and pro-inflammatory cytokines by macrophages in the presence of dematiaceous fungi that causes chromoblastomycosis. *Scand J Immunol*. 2006; 64: 382-7.
23. Gimenes VMF, de Souza MG, Ferreira KS, Marques SG, Gonçalves AG, Santos VCL, et al. Cytokines and lymphocyte proliferation in patients with different clinical forms of chromoblastomycosis. *Microbes Infect*. 2005; 7: 708-13.
24. D'Avila SC, Pagliari C, Duarte MI. The cell-mediated immune reactions in cutaneous lesions of chromoblastomycosis and their correlation with different clinical forms of the disease. *Mycopathologia*. 2003;156:51-60.
25. Teixeira de Sousa MG, Ghosn EEB, Almeida SR. Absence of CD4⁺ T cells impairs host defence of mice infected with *Fonsecaea pedrosoi*. *Scand J Immunol*. 2006; 64: 595-600.
26. Silva AA, Criado PR, Nunes RS, da Silva WL, Kanashiro-Galo L, Duarte MI, et al. *In situ* immune response in human chromoblastomycosis--a possible role for regulatory and Th17 T cells. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014.18;8(9):e3162. doi: 10.1371 / journal.pntd.0003162.
27. Esterre P, Jahevitra M, Andriantsimahavandy A. Humoral Immune Response in Chromoblastomycosis during and after Therapy. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000; 7(3): 497–500.

28. Azevedo CD, Bruña-Romero O, Marques SG, Nascimento FR, Pinto MC, Silva LA, et al. Association of IgG immunoglobulin and subclasses level with the severity of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi* and therapeutic response to Itraconazole. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014; 33(10):1791-7.
29. Siqueira IM. *Avaliação do tratamento da cromoblastomicose experimental utilizando vacina de DNA (DNA-hsp65)*. [dissertação]. Mestrado em Patologia Molecular. Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Brasília. 109p. 2010.
30. Siqueira IM. *Imunopatologia da cromoblastomicose: modulação da resposta inflamatória por formas do fungo *Fonsecaea pedrosoi* e seu impacto na cromoblastomicose murina*. [tese]. Doutorado em Patologia Molecular. Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Brasília. 172p. 2016.
31. Malissen B, Tamoutounour S, Henri S. The origins and function of dendritic cells and macrophages in the skin. *Nat Rev Immunol*. 2014; 14(6):417-28.
32. Klechevsky E, Morita R, Liu M, Cao Y, Coquery S, Thompson-Snipes G, et al. Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells. *Immunity*. 2008;29(3):497-510.
33. Ratzinger G, Baggers J, de Cos MA, Yuan J, Tao T, Reagan JL, et al. Mature human Langerhans cells derived from CD34+ hematopoietic progenitors stimulate greater cytolytic T lymphocyte activity in the absence of bioactive IL-12p70, by either single peptide presentation or cross-priming, than do dermal-interstitial or monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*. 2004;173(4):2780-2791.
34. Romani, N, Clausen BE, Stoitzner P. Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunol. Rev*. 2010;234:120–41. doi: 10.1111/j.0105-2896.2009.00886.
35. Coury F, Annels N, Rivollier A, Olsson S, Santoro A, Speziani C, et al. Langerhans cell histiocytosis reveals a new IL-17A– dependent pathway of dendritic cell fusion. *Nat Med*. 2008;14:81-7. doi:10.1038/nm1694.

36. Bursch LS, Wang L, Igvarto B, Kissenpfennig A, B Malissen, Kaplan DH, et al. Identification of a novel population of langerin⁺ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2007; 204: 3147–56. doi: 10.1084/jem.20071966.
36. Desguerre I, Mayer M, Leturcq F, Barbet JP, Gherardi RK, Christov C. Endomysial fibrosis in Duchenne muscular dystrophy: a marker of poor outcome associated with macrophage alternative activation. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2009; 68:762-773.
37. Wollenberg A, Mommaas M, Opiel T, Schottdorf EM, Günther S, Moderer M. Expression and function of the mannose receptor CD206 on epidermal dendritic cells in inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol.* 2002; 118(2):327-34.
38. Ellis DH; Griffiths DA. The location and analysis of melanins in the cell walls of some soil fungi. *Am J Microbiol.* 1974; 20:1379-1428.
39. Ibrahim-Granet O, de Bievre C, Jendoubi M. Immunochemical characterization of antigens and growth inhibition of *Fonsecaea pedrosoi* by species-specific IgG. *J Med Microbiol.* 1988; 26:217-22.
40. Farbiarz SR, Carvalho TU, Alviano C, Souza W. Inhibitory effect of melanin on the interaction of *Fonsecaea pedrosoi* with mammalian cells in vitro. *J. Med. Vet. Mycol.* 1992; 30:265-73.
41. Jacobson ES. Pathogenic roles for fungal melanins. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13:708–717. doi: 10.1128/CMR.13.4.708-717.2000.
42. Nosanchuk JD, Casadevall A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50:3519–3528.
43. Bocca AL, Brito PP, Figueiredo F, Tosta CE. Inhibition of nitric oxide production by macrophages in chromoblastomycosis: a role for *Fonsecaea pedrosoi* melanin. *Mycopathologia.* 2006; 161:195–203.
44. Cunha MML, Franzen AJ, Seabra SH, Herbst MH, Vugman NV, Borba LP, de Souza W, Rozental S. Melanin in *Fonsecaea pedrosoi*: a trap for oxidative radicals. *BMC Microbiol.* 2010; 10: 80. doi: 10.1186 / 1471-2180-10-80.

45. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:1-23. Cooke A, Zacccone P, Raine T, Phillips JM, Dunne DW. Infection and autoimmunity: are we winning the war, only to lose the peace? *Trends Parasitol.* 2004; 20:316-21.
46. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity.* 2010; 32: 593-604.
47. Fairweather D, Cihakova D. Alternatively activated macrophages in infection and autoimmunity. *J Autoimmun.* 2009; 33:222–30.
48. Mosser DM, Edwards J P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8:958-969.
49. Benoit M, Desnues B, Mege JL. Macrophage Polarization in Bacterial Infections. . *J Immunol.* 2008; 181: 3733–3739.
50. Eaton KV, Yang HL, Giachelli CM, Scatena M. Engineering macrophages to control the inflammatory response and angiogenesis. *Exp Cell Res.* 2015; 339(2):300-9.
51. Cooke A, Zacccone P, Raine T, Phillips JM, Dunne DW. Infection and autoimmunity: are we winning the war, only to lose the peace? *Trends Parasitol.* 2004;20:316-21.
52. González A, Lenzi HL, Motta EM, Caputo L, Angela Restrepo A, Cano LE. Expression and arrangement of extracellular matrix proteins in the lungs of mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Int J Exp Pathol.* 2008; 89(2): 106–16.
53. Bornstein P, Sage EH. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Current Opin of Cell Biol.* 2002; 14:608- 16.
54. Li NG, Tang YP, Duan JA, Shi ZH. Matrix metalloproteinase inhibitors: a patent review (2011 - 2013). *Expert Opin Ther Pat.* 2014; 24(9):1039-52. doi: 10.1517/13543776.2014.937424.

55. Esterre P, Risteli L, Ricard-Blum S. Immunohistochemical study of type I Collagen turn-over and of matrix metalloproteinases in chromoblastomycosis before and after treatment by terbinafine. *Pathol. Res. Pract.* 1998; 194: 847-53.
56. Kerkela E, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp Dermatol.* 2003; 12:109-25.
57. Bailão AM, Nogueira SV, Bonfim SMRC, de Castro KP, da Silva JF, Giannini MJM, et al. Comparative transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* during in vitro adhesion to type I collagen and fibronectin: identification of potential adhesins. *Res Microbiol.* 2012;163(3):182-91.
58. Pereira ALA , Veras SSL , Silveira EJD , Seabra FRG , Pinto LP , Souza LB, et al. O papel das proteínas da matriz extracelular e das metaloproteinases em carcinomas de cabeça e pescoço: uma atualização bibliográfica. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2005; 71(1) 81-6.
59. De Hoog GS, Attili-Angelis D, Vicente VA, Van Den Ende AHGG, QueirozTelles F. Molecular ecology and pathogenic potential of *Fonsecaea* species. *Med Mycol.* 2004; 42(5):405–16.
60. Coelho RA, Brito-Santos F, Figueiredo-Carvalho MHG, Silva JVDS, Gutierrez-Galhardo MC, do Valle ACF, et al. Molecular identification and antifungal susceptibility profiles of clinical strains of *Fonsecaea* spp. isolated from patients with chromoblastomycosis in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018; 12(7):e0006675. doi: 10.1371/journal.pntd.0006675.
61. Najafzadeh MJ, Sun J, Vicente V, XiL, van den Ende AH, de Hoog GS. 2010. *Fonsecaea nubica* sp. nov., um novo agente de cromoblastomicose humana revelou o uso de dados moleculares . *Med Mycol.* 2010; e48 : 800-806. doi: 10.3109 / 13693780903503081.

Apêndice

Apêndice 01. Quantificação geral do estudo

Caso	Agente	C. Dendríticas			Macrófagos			Matriz extracelular													
		CD207	M1	M2	INOS	pSTAT1	Aplicase-1	c.Maf	CD200	MMP-2	MMP-9	Fibronectina	Laminina	Colágeno IV							
Nº	Espécie	Fungos	Fração de área op.	Fração de área op.	INOS	pSTAT1	Aplicase-1	c.Maf	CD200	col/mm2	área +/mm2	% área +	col/mm2	área +/mm2	% área +	col/mm2	área +/mm2	% área +	Fração de área dérmica	Fração de área dérmica	Fração de área dérmica
1	F. pedrosol	+	0,0244	0	0	0	12,44	52	+	251,402	0,2885	60%	403	0,0668	11%	123,77	0,3778	60%	0,046		0,3778
2	F. pedrosol	+	0,0093	24,88	64	519,11	90,66	+++		315,20	0,0807	13%	561,07	0,1233	19%	18,13	0,2278	39%	0,0272		0,1228
3	F. pedrosol	+++	0,0093	247,11	3,55	1230,22	78,22	+++		684	0,086	14%	1163,12	0,1532	24%	471,23	0,3180	50%	0,0055		0,111
4	F. pedrosol	+	0,0098	3,55	1,77	57,14	44	+++		453,90	0,1877	30%	1303,38	0,2015	32%	394,88	0,599	95%	0,0733		0,0258
5	F. pedrosol	+	0,0039	5,33	12,44	176	200	++		85,62	0,0037	1%	408,36	0,0847	14%	61,46	0,2889	46%	0,0458		0,0112
6	F. pedrosol	+	0,0067	0	2,28	240	112	+++		312,30	0	0%	485,97	0,0224	36%	313,63	0,446	71%	0,1824		0,0866
7	F. nubica	++	0,0236	5,33	1,77	6,85	116	++		0	0	0%	127,65	0,1861	29%	11,04	0,43	79%	0,0166		0,0135
8	F. nubica	++	0,0115	5,33	1,77	86,85	199,11	++		87,13	0,167	3%	606	0,0373	7%	67,84	0,3622	74%	0,0262		0,0613
9	F. nubica	+	0,0167	1,77	0	208	90,66	+++		830,575	0,1148	18%	903,07	0,1845	29%	266,70	0,5043	81%	0,0166		0,0133

Anexos

Anexo 01. Aprovação do Comitê de Ética



Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE ELEMENTOS DA RESPOSTA IMUNE E METALOPROTEINASES EM LESÕES CUTÂNEAS NA CROMOBLASTOMICOSE
Pesquisador Responsável: Carla Pagliari **Versão:** 1
Pesquisador Executante: Aline Alves de Lima Silva **CAAE:** 35600414.8.0000.0068
Co-autores: Profa. Mirian Nacagami Sotto, Profa. Maria Irma Seixas Duarte
Finalidade Acadêmica: Doutorado
Orientador: Carla Pagliari
Instituição: HCFMUSP
Departamento: DERMATOLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 12447
Número do Parecer: 818.315
Data da Relatoria: 01/10/2014

Apresentação do Projeto: Serão estudadas 30 biópsias de pele selecionadas do arquivo do Laboratório de Dermatopatologia do HCFMUSP, de doentes com diagnóstico clínico e anátomo-patológico de cromoblastomicose. O critério para seleção dos casos será a representatividade da amostra, cujo tamanho seja suficiente para realização de todos os procedimentos imuno-histoquímicos. Cinco fragmentos de pele normal obtidas da incisão de cirurgia cardíaca e cinco fragmentos de pele normal obtidos de cirurgia ortopédica de joelho, sem atividade inflamatória ou infecciosa no momento da cirurgia, constituirão o grupo controle. O estudo histopatológico das lesões será feito através da coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) para observação de alterações epidérmicas e dérmicas e grau de parasitismo. Será utilizado o método imunohistoquímico de Estreptavidina-biotina peroxidase (SABC, do inglês Streptavidin-Biotin Peroxidase) ou sistemas de detecção baseados em polímeros de acordo com padronizações prévias.

Objetivo da Pesquisa: Gerais: no presente projeto pretendemos contribuir ao estudo da caracterização da resposta tecidual cutânea na cromoblastomicose, verificando a presença de macrófagos M2, metaloproteinases, elementos da matriz extracelular, citocinas de perfil Th17 e células de com expressão de langerina. Especificamente: Verificar através de método imunohistoquímico a expressão de arginase 1, CD206, que são marcadores de macrófagos M2. Verificar a expressão das metaloproteinases MMP 2 e 9, laminina, fibronectina e colágeno IV. Demonstrar a presença de células com expressão de IL17, IL22 e IL23. Demonstrar a expressão de langerina e comparar com dados anteriores sobre a expressão de células de Langerhans CD1a+. Todos os dados obtidos serão correlacionados com parâmetros clínicos das lesões.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Com relação ao grupo estudado o não existe risco pois é retrospectivo e será feita apenas avaliação de prontuário e material de biópsia já realizado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Pesquisa adequada

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Nenhuma todos os termos obrigatórios foram apresentados

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Sem pendências.

Situação do Parecer: Aprovado

Rua Dr. Ovidio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5ª andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | cappesq.adm@hc.fm.usp.br

17187 105-9502009-05-14-01-01-0004-1103-00000000-11
 Carla Pagliari



Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: : Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 06 de Outubro de 2014.

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
 Coordenador
 Comissão de Ética para Análise de
 Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Prof. Dr. José Antonio Sanches Junior
 Coordenador do Curso de Pós-Graduação
 Área de Dermatologia
 Faculdade de Medicina da USP