ALINE ALVES DE LIMA SILVA

Resposta imune *in situ* na cromoblastomicose humana:

participação de células T reguladoras

e expressão de citocinas de perfil Th17

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Dermatologia
Orientadora: Dra. Carla Pagliari

São Paulo

Maio de 2014

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

Resposta imune *in situ* na cromoblastomicose humana : participação de células T reguladoras e expressão de citocinas de perfil Th17 / Aline Alves de Lima Silva. -- São Paulo, 2014.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Dermatologia.

Orientadora: Carla Pagliari.

Descritores: 1.Cromoblastomicose 2.Linfócitos T reguladores 3.Células Th17 4.Pele/lesões 5.Citocinas 6.Biópsia 7.Imunoistoquímica

USP/FM/DBD- 083/14

As pessoas que mais amo nesse mundo: meus pais, irmãos, sobrinho

e ao meu grande amor, Danilo.

A todos os pacientes envolvidos nesse estudo.

Agradecimentos

Agradeço a **Deus** por todas as oportunidades que me foram dadas e que, de um modo ou de outro, contribuíram para que mais essa fase se concretizasse em minha vida. Sou grata por tudo e principalmente por ter em minha vida pessoas maravilhosas, que significam tanto para mim, sem as quais nada disso faria sentido!

Agradeço aos meus pais: **Cicero e Diva** por absolutamente tudo o que fizeram e continuam fazendo por mim. Por estarem sempre presentes, por me incentivarem e me oferecerem amor incondicional. Amo vocês com todo o meu coração!

A minha irmã **Jaqueline**, parte mãe, parte psicóloga e inteiramente parte de mim. Minha amiga, companheira, minha rosa dos ventos, exemplo de amor sem fim!

Ao meu irmão **Lucas** e meu sobrinho **Caio**, pelo simples fato de estarem ao meu lado e me darem tantas alegrias! Mes bijoux!!!

A minha orientadora **Dra. Carla Pagliari**, pelos inúmeros ensinamentos, profissionais ou não, pelas oportunidades que me proporcionou, por sua companhia, paciência, sabedoria, afetuosidade e por tantos bons momentos, os quais levarei para toda a vida.

A **Profa. Maria Irma Seixas Duarte**, por ceder espaço para a realização desse trabalho, pelos aprendizados e a agradável companhia.

A **Profa. Mirian Nacagami Sotto**, pelas imensuráveis contribuições para a realização desse trabalho, por seu admirável profissionalismo e sua prazerosa companhia.

Ao **Dr. Paulo Criado** pela disponibilidade, auxílio na coleta de dados desse trabalho e especialmente por seu notável e inspirador desejo de querer fazer mais por seus pacientes.

Ao **Ricardo Spina Nunes**, 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** por seu primoroso trabalho ao cortar os espécimes e preparar as lâminas dessa casuística.

A todos os amigos do Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis do Departamento de Patologia da FMUSP, entre as quais: **Luciane Kanashiro Galo, Rosana Cardoso, Cleusa Takakura, Mônica Kauffman e Tania Barboza** pelo carinho e incontáveis momentos de alegria. Por cada uma, com seu modo tão particular e especial, ter agregado tanto a minha vida nesses quase quatro anos de laboratório. Meninas, vocês são maravilhosas, meu mais sincero obrigada!

Ao **Dr. Sandro Rogério Almeida** e a **Dra. Elaine Raniero Fernandes**, pela presença e pelas valiosas contribuições no exame de qualificação.

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

Derradeiramente e de modo muito especial, agradeço a cada **paciente envolvido nesse trabalho**. Pessoas únicas de histórias ímpares que possibilitaram e são o motivo maior da realização desse estudo.

“É loucura odiar todas as rosas porque uma te espetou. Entregar todos os teus sonhos porque um deles não se realizou, perder a fé em todas as orações porque em uma não foi atendido, desistir de todos os esforços porque um deles fracassou. É loucura condenar todas as amizades porque uma te traiu, descrer de todo amor porque um deles te foi infiel. É loucura jogar fora todas as chances de ser feliz porque uma tentativa não deu certo. Espero que na tua caminhada não cometas estas loucuras. Lembrando que sempre há uma outra chance, uma outra amizade, um outro amor, uma nova força. Para todo fim, um recomeço.”

Antoine Saint-Exupéry

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*.

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de Figuras

Lista de Gráficos

Resumo

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS.....	3
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	5
4	MATERIAIS E MÉTODOS	13
	4.1 Método imunohistoquímico	15
	4.2 Análise quantitativa e estatística	18
5	RESULTADOS.....	19
	5.1 Análise geral dos pacientes	20
	5.2 Análise histopatológica	21
	5.3 Análise imunohistoquímica	24
	5.4 Análise quantitativa e estatística.....	31
6	DISCUSSÃO.....	38
7	CONCLUSÕES.....	46
8	ANEXOS.....	49
	Anexo A: Documento de aprovação da CAPPesq.....	50
	Anexo B: Relação de pacientes e marcadores analisados	51
9	REFERÊNCIAS	52

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA:	Do inglês " <i>Bovine serum albumin</i> "
CBM:	Cromoblastomicose
CD:	Do inglês " <i>cluster of differentiation</i> "
CSA:	Do inglês " <i>Catalyzed Signal Amplification System</i> "
DAB	Diaminobenzidina
CTLA-4:	Do inglês " <i>Intracellular cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4</i> "
EDTA:	Ácido etilenodiaminotetracético
Et al:	Entre outros
FMUSP:	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Foxp3:	Do inglês " <i>Forkhead Box p3</i> "
HE:	Hematoxilina/Eosina
IFN- γ :	Interferon gama
Ig:	Imunoglobulina
IL:	Interleucina
IL-R:	Receptor de interleucina
In situ:	No local
KOH:	Hidróxido de potássio
LSAB:	Do inglês " <i>Labeled Streptavidin-Biotin</i> "
MI:	Membro inferior
MS:	Membro superior
pH:	Potencial hidrogeniônico
PBS:	Do inglês " <i>Phosphate buffer saline</i> "
PCM:	Paracoccidioidomicose
TNF- α :	Do inglês " <i>tumor of necrosis fator</i> "
TGF- β :	Do inglês " <i>Transforming growth factor-beta</i> "
TCD4:	Linfócitos T <i>Cluster of Differentiation</i> 4
Th:	Células " <i>T helper</i> "
TNF- α :	Do inglês " <i>Tumor necrosis factor- alpha</i> "
Treg:	Células T reguladoras
TRIS:	Do inglês " <i>Tris-Buffered-Saline</i> "

LISTA DE SÍMBOLOS

%:	Porcentagem
ml:	Mililitros
mm ² :	Milímetros quadrados
μl:	Microlitros
°C:	Graus Celsius

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Coloração de hematoxilina-eosina em lesões de pele de cromoblastomicose nos aumentos de 40,100 e 200x	22
Figura 2:	Coloração de hematoxilina-eosina em lesões de pele de cromoblastomicose nos aumentos de 400 e 1000X	23
Figura 3:	Reação imunohistoquímica de estreptavidina-biotina peroxidase evidenciando células com expressão de Foxp3.....	25
Figura 4:	Reação imunohistoquímica de estreptavidina-biotina peroxidase evidenciando células com expressão de CD25...	26
Figura 5:	Reação imunohistoquímica de estreptavidina-biotina peroxidase evidenciando células com expressão de TGF- β ...	27
Figura 6:	Reação imunohistoquímica de estreptavidina-biotina peroxidase evidenciando células com expressão de IL-6...	28
Figura 7:	Reação imunohistoquímica de estreptavidina-biotina peroxidase evidenciando células com expressão de IL-23...	29
Figura 8:	Reação imunohistoquímica de estreptavidina-biotina peroxidase evidenciando células com expressão de IL-17...	30

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1:	Análise quantitativa da expressão de Foxp3 entre os grupos de estudo.....	31
Gráfico 2:	Análise quantitativa da expressão de CD25 entre os grupos de estudo.....	32
Gráfico 3:	Análise quantitativa da expressão de TGF- β entre os grupos de estudo.....	33
Gráfico 4:	Análise quantitativa da expressão de IL-6 entre os grupos de estudo.....	34
Gráfico 5:	Análise quantitativa da expressão de IL-17 entre os grupos de estudo.....	35
Gráfico 6:	Análise quantitativa da expressão de IL-23 entre os grupos de estudo.....	36
Gráfico 7:	Análise da imunoexpressão de Foxp3 e IL-17 em espécimes de CBM	37

RESUMO

SILVA AAL. Resposta imune *in situ* na cromoblastomicose humana: participação das células T reguladoras e expressão de citocinas de perfil Th17 [dissertação]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2013.

A cromoblastomicose é uma infecção fúngica crônica que acomete pele e tecido subcutâneo. As lesões podem ser classificadas em tumoral, verrucosa, cicatricial e do tipo placa. A resposta imune é principalmente celular e a forma grave da doença correlaciona-se com citocinas de perfil Th2. Nós exploramos populações celulares do tipo T reguladoras e Th17. Foram utilizadas vinte e três biópsias da forma verrucosa obtidas de pacientes com diagnóstico clínico e histopatológico de cromoblastomicose, sem tratamento. Foi realizado o método de imunohistoquímica para detectar Foxp3, CD25, TGF- β , IL-6, IL-17 e IL-23. A IL-17 predominou sobre os outros marcadores, embora haja número regular de Foxp3. TGF- β , IL-6 e IL-23 raramente foram visualizados. A constituição de uma resposta imune local com alta expressão de IL-17 e baixa expressão de outras citocinas pode ser, ao menos em parte, uma tentativa de ajudar o sistema imunológico contra infecções fúngicas. Células Foxp3 poderiam ser capazes de interferir na resposta imune eficiente contra fungos, mas também beneficiar o hospedeiro, através da capacidade de reduzir os danos do tecido que seguem uma resposta imune local. Esses elementos celulares podem contribuir para a cronicidade que caracteriza esta doença.

Descritores: cromoblastomicose; células T reguladoras; Th17; pele/lesões; citocinas; biópsia; Imunohistoquímica.

ABSTRACT

SILVA AAL. *In situ* immune response in human chromoblastomycosis: participation of regulatory T cells and cytokines of Th17 profile [master's degree]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2013.

Chromoblastomycosis is a chronic fungal infection that affects skin and subcutaneous tissue. Lesions can be classified in tumorous, verrucous, cicatricial and plaque type. The immune response is primarily cellular and the severe form of the disease correlates with a Th2 pattern of cytokines. We intended to explore the populations of regulatory T cells and the Th17 pattern. Twenty-three biopsies of verrucous form were obtained from patients with clinical and histopathological diagnostic of chromoblastomycosis, without treatment. It was performed an immunohistochemistry method to detect Foxp3, CD25, TGF- β , IL-6, IL-17 and IL-23. IL-17 predominated over the other markers in chromoblastomycosis, although there was a regular number of Foxp3. TGF- β , IL-6 and IL-23 were rarely visualized. The constitution of a local immune response with high expression of IL-17 and low expression of other cytokines could be at least in part, an attempt to help the immune system against fungal infection. Foxp3 cells could be able to interfere with the efficient immune response against fungi, but also benefit the host, through the ability to reduce the tissue damage that follows a local immune response. They could play a role in chronicity that characterizes this disease.

Keywords: chromoblastomycosis; regulatory T cells; Th17; skin/ lesions; cytokines; biopsy; immunohistochemistry

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

A cromoblastomicose (CBM) é uma infecção fúngica crônica de aspecto granulomatoso que acomete pele e tecido subcutâneo, principalmente de membros inferiores¹. É uma doença cosmopolita, mas classicamente encontrada em regiões tropicais e subtropicais².

Comemoramos este ano o centenário da primeira descrição sobre a cromoblastomicose³. Celebramos os avanços propiciados por grupos de pesquisa de todo o mundo que se dedicaram ao estudo tanto do ponto de vista do parasita quanto do âmbito do hospedeiro e mesmo sobre a interação de ambos.

Mesmo com os avanços científicos a CBM permanece configurada como uma doença caracteristicamente ocupacional, com arsenal terapêutico limitado, responsável por danos significativos no setor psicossocial dos pacientes⁴⁻⁶, de modo que ainda há muitas questões a serem aclaradas e barreiras a ultrapassar.

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo caracterizar a resposta tecidual cutânea na cromoblastomicose, abordando a participação de células T reguladoras e a expressão de IL-17.

Especificamente, o objetivo foi detectar através do método imunohistoquímico a presença dos marcadores Foxp3, CD25, TGF- β , IL-6, IL-17 e IL-23, quantificar sua imunoexpressão e correlacionar o possível papel destas com a patogenia da doença.

3. Revisão de literatura

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ASPECTOS GERAIS DA CROMOBLASTOMICOSE

O primeiro relato da cromoblastomicose foi feito pelo médico alemão Max W. Rudolph (1887-1955) com o estudo de seis casos na cidade de Estrela do Sul – MG em 1914, descrita como “Figueira”³, no entanto estudiosos afirmam que a primazia de observação deve-se a Alexandrino Pedroso em 1911 na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, porém esta não foi publicada.

A primeira publicação se deu em 1915 por Lane e Medlar com dados de um caso diagnosticado como tuberculose verrucosa⁴. Os achados de Alexandrino de Moraes Pedroso só vieram a conhecimento em 1920 em trabalho conjunto com José Maria Gomes sobre quatro casos de “Dermatite Verrucosa” cujo agente era *Phialophora verrucosa*⁷.

Pesquisadores pelo mundo todo se dedicaram a estudos sobre a CBM o que foi aos poucos resultando em uma melhor compreensão da doença e lhe conferiu vasta sinonímia: Doença de Carrión, Doença de Fonseca, Micose de Pedroso, Cromomicose, Blastomicose-Negra, Pé Musgoso, Espúndia, Dermatite verrucosa cromoparasitária, Figueira, Formigueiro^{1,4}, entre outras e passou a ser denominada como cromoblastomicose em 1922 por Terra et al ^{8,9}.

A CBM é resultante da inoculação traumática de propágulos de fungos demáceos¹⁰, as espécies mais frequentemente isoladas são *Fonsecae*

pedrosoi, *Phialophora verrucosa*, *Cladosporium carrioni* e eventualmente *Rhinocladiella aquaspersa*^{11,12}.

Os agentes etiológicos são fungos dimórficos que apresentam coloração acastanhada devido à presença de pigmentos de melanina em sua parede celular^{15,16}, o que lhes confere fotoproteção e funciona como fator de virulência¹⁷. São considerados elementos saprobióticos e ubiqüitários na natureza, podendo sobreviver no solo, água contaminada, matéria orgânica em decomposição e outros^{4,13,14,18}.

Além da coloração característica, a morfologia arredondada com dupla membrana e formato de lente côncavo-convexa, simulando “tigela” garantem fácil diagnóstico histológico das lesões ou mesmo em exame micológico direto com hidróxido de potássio (KOH)^{19,20}.

No processo de inoculação, os conídios ou fragmentos de micélios dos fungos adentram no hospedeiro e aderem-se às células epiteliais, em seguida se diferenciam em células escleróticas, transpõem as células efetoras e seguem dissipando a doença²¹.

De maneira geral, a CBM se inicia com a erupção de pápulas, verrugas ou nódulos que evoluem em número e volume de forma lenta. Costumeiramente se apresenta nos membros inferiores, joelhos e mãos. Isso porque a doença usualmente é adquirida por trabalhadores rurais que em ambiente ocupacional podem não fazer uso de sapatos fechados ou vestes que protejam a pele do contato com solo e plantas infectadas. Há relatos de

acometimento da face, tórax, nádegas e outras regiões. A disseminação por via linfática é possível, porém pouco frequente²².

Macroscopicamente, as lesões podem ser classificadas em duas instâncias: uma que leva em consideração o aspecto e a outra a gravidade^{5, 10, 22-25}. Quanto ao aspecto, são subdivididas em: nodular, tumoral, verrucoso, cicatricial ou em placas (eritematosa ou infiltrativa).

A classificação que leva em conta a gravidade das lesões sugere:

- ✓ Forma leve: lesão única. Tipo placa ou nodular com menos de cinco cm de diâmetro.
- ✓ Forma moderada: lesão única ou múltipla. Tipo placa, nodular ou verrucoso. Quando múltipla, presença de um ou vários tipos de lesão. Localizam-se em uma ou duas regiões cutâneas adjacentes medindo menos que 15 cm de diâmetro.
- ✓ Forma grave: qualquer tipo de lesão única ou múltipla, adjacentes ou não, recobrando extensas áreas do tegumento. Quando múltipla, presença de um ou vários tipos de lesão.

Em análise histopatológica, habitualmente o epitélio caracteriza-se por acantose, hiperqueratose, papilomatose, paraqueratose e observa-se ainda, hiperplasia pseudocarcinomatosa com certa frequência. Nota-se que a reação granulomatosa é constituída por linfócitos, histiócitos, neutrófilos, células gigantes do tipo Langhans e rotineiramente corpos fumagóides são avistados no interior desses granulomas ou mesmo isoladamente no tecido. É igualmente corriqueira a presença de vasos neoformados na região dérmica, o que

propicia fácil sangramento e confere odor desagradável às lesões. Fator tal que resulta na dificultosa interação social dos pacientes e afeta, além das atividades ocupacionais, as esferas psicológica e afetiva²⁶⁻²⁸.

3.2 IMUNOLOGIA DA CBM

Os mecanismos de defesa do hospedeiro na CBM não foram completamente elucidados. Sabe-se que o processo fagocítico é ordenado por macrófagos. Ainda que a fagocitose seja eficaz, a presença de melanina na parede do fungo parece impedir sua destruição de maneira efetiva²⁹. Estudos mostram que além dos macrófagos, células de Langerhans e dendrócitos dérmicos fator XIIIa+ parecem estar envolvidos em menor escala na fagocitose e participam da apresentação de antígenos frente ao *F. pedrosoi*^{30,31}.

Análise realizada entre pacientes que apresentam lesões verrucosas e do tipo placa atrófica sugeriu que os espécimes de lesões verrucosas apresentam alta carga fúngica nos fagócitos e desenvolvimento de uma resposta granulomatosa, seguindo um padrão imune de perfil Th2, atribuído ao quadro de pior resposta, enquanto que espécimes de placa atrófica apresentam escassos fungos fagocitados, apresentam perfil citocínico de padrão Th1, com resposta imune e granulomatosa mais eficiente resultando em lesões menos salientes³².

Outro trabalho verificou a resposta linfoproliferativa e a produção de citocinas associadas à gravidade da doença, onde a forma grave da doença foi

caracterizada pela produção de IL-10 e TNF- α , cuja associação com baixos níveis de IFN- γ direcionam a supressão da resposta imune celular. Já pacientes com a forma média apresentam alta produção de IFN- γ e baixos níveis de IL-10, obtendo resposta imunológica mais adequada³³.

Ensaio com murinos infectados com *F. pedrosoi* demonstrou que a ausência de células TCD4 acaba por promover a forma grave da CBM, sendo essas células elementos essenciais na resposta frente à doença³⁴.

3.3 PERFIS T REGULADOR E TH17 DE RESPOSTA IMUNE

Diversos estudos têm sido direcionados ao entendimento das diferenças que o organismo faz entre o paradigma Th1/Th2 de resposta imune ou, em algumas doenças, o permear do hospedeiro entre ambos os padrões. Sabe-se que há um subgrupo de linfócitos T capaz de modular a resposta imune frente à patógenos, alérgenos e antígenos próprios e que também é constituinte da tolerância imunológica; essa linhagem foi denominada células T reguladoras (Treg)^{35,36}.

Ainda segundo os mesmos autores, as células T reguladoras são caracterizadas pela expressão de altos níveis de CD25 (cadeia α da IL-2) e tem o papel de controlar a resposta imune bloqueando a ativação ou função das células T efectoras, função que depende diretamente do fator de transcrição Foxp3.

Essas células são originárias do timo e estudos experimentais com murinos mostram que a timectomia precoce resulta na deficiência de IL-2 e IL-2R (receptor de IL-2), cuja ausência ocasiona desenvolvimento de doenças autoimunes³⁷.

Uma citocina de altíssimo valor para os estudos acerca da resposta imune é o TGF- β , pois está envolvida no processo de cicatrização exercendo funções reparadoras com a finalidade de minimizar danos teciduais³⁸, além de suprimir células TCD8⁺³⁹, transformar células TCD4+CD25⁻ em TCD4+CD25⁺⁴⁰, induzir células T *naive* a produzir Foxp3⁴¹ e não obstante, ainda participa na diferenciação de células TCD4 em células Th17⁴².

Dados literários mostram que altas concentrações de TGF- β vinculados à ausência de citocinas pró-inflamatórias direcionam o organismo para o desenvolvimento de resposta reguladora mediada por células T. Da mesma maneira, baixas concentrações de TGF- β associadas às citocinas pró-inflamatórias, podendo ser IL-1 β , IL-6, IL-21 e IL-23 promovem a expressão do receptor de IL-23 (IL-23R), fator que favorece a diferenciação de células TCD4 em Th17^{43,44}.

A linhagem Th17 constitui uma subpopulação de células TCD4+ caracterizada pela secreção de IL-17 que parece reforçar a proteção do hospedeiro quando as cascatas imunes dos perfis Th1 e Th2 não são altamente eficazes frente a patógenos intracelulares. Alvo dos holofotes científicos, essas células parecem ser protagonistas em quadros inflamatórios crônicos, a exemplo da psoríase^{45,46}.

O estudo de ambas as linhagens celulares foi realizado por Pagliari e colaboradores⁴⁷ em espécimes de pacientes com paracoccidioidomicose em lesões cutâneas e mucosas.

A análise evidenciou a participação dos dois perfis celulares, identificando tanto a presença de mecanismo imunorregulador quanto o reforço de células T efectoras expressando IL-17. A quantidade de células expressando Foxp3 apresentou-se superior quando comparada a expressão de IL-17 nesses espécimes, de modo que os autores discutem o papel dessas células na resposta imune local e ainda, sua provável correlação com a gravidade das lesões.

Levando em conta que embora as células de padrão Th17 e as T reguladoras possuem ontogenia similar, mas desempenham papéis opostos na geração e controle das infecções⁴⁸, explorar sua inter-relação contribui com a compreensão da imunopatologia da cromoblastomicose podendo resultar no auxílio às estratégias terapêuticas mais eficazes frente à doença.

4. Materiais e métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas 23 biópsias de pele de pacientes com diagnóstico clínico e anatomopatológico de cromoblastomicose, gentilmente cedidas pelo Laboratório de Dermatopatologia da Divisão de Clínica Dermatológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). O critério para seleção dos casos foi a representatividade da amostra, cujo tamanho fosse suficiente para realização de todos os procedimentos imunohistoquímicos.

Em paralelo, foram utilizadas 20 biópsias de pele de pacientes com diagnóstico clínico e anátomo-patológico de paracoccidioidomicose, confirmado através da demonstração de formas em levedura com exo-esporulação múltipla inequívoca. Esses espécimes foram igualmente cedidos pelo Laboratório de Dermatopatologia da Divisão de Clínica Dermatológica do HC-FMUSP.

Foram usados ainda, como grupo controle, 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.

O estudo histopatológico das lesões ocorreu através da coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) para observação de alterações epidérmicas e dérmicas e grau de parasitismo.

O presente projeto foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital das Clínicas e FMUSP, sob o número 0317/11.

4.1 MÉTODO IMUNOHISTOQUÍMICO

As reações de imunohistoquímica foram realizadas de acordo com o protocolo abaixo, desenvolvido pelo Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis, da Faculdade de Medicina da USP:

Os cortes foram desparafinizados em dois banhos de xilol por vinte minutos cada, à temperatura ambiente. Em seguimento decrescente de etanol os cortes foram hidratados, durante cinco minutos em cada solução. Fez-se posteriormente o bloqueio de peroxidase endógena, com quatro passagens de dez minutos cada, em solução de água oxigenada a 3% em câmara escura. As lâminas foram lavadas em água corrente por cinco minutos, postas em água destilada e a seguir em PBS (do inglês, Phosphate Buffer Saline - solução salina tamponada) pH 7,4. Na sequência fez-se a exposição de antígenos com tampão TRIS/EDTA pH 9,0 e em banho-maria a 95°C.

Após esta etapa realizou-se a incubação das lâminas com leite desnatado a 10% diluído em água destilada por trinta minutos em estufa a 37°C para bloqueio de proteínas inespecíficas.

Seguiu-se a incubação com os anticorpos primários, específicos às células a serem estudadas, diluídos em solução de albumina bovina (BSA) a 1% “over night” a 4°C.

Fez-se a lavagem em PBS por dez minutos e incubação com anticorpo secundário do Kit LSAB (K690, marca DAKO) durante trinta minutos a 37°C na

estufa e após nova lavagem em PBS a incubação com complexo estreptavidina-biotina do Kit LSAB durante trinta minutos a 37°C na estufa.

A revelação das reações foi realizada com 3,3 diaminobenzidina, 0,4% em PBS, acrescido de 1200 microlitros de água oxigenada a 3%.

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

Tabela 1. Relação de anticorpos utilizados: código, marca, diluição e controles de reação indicados pelos fabricantes.

ANTICORPO	CÓDIGO	MARCA	DILUIÇÃO	CONTROLE POSITIVO DE REAÇÃO
Ig de rato anti-Foxp3	14-4776	E-Bioscience	1:50	Amígdala
Ig de camundongo anti-CD25	NCL-CD25	Novocastra	1:50	Amígdala
Ig de camundongo anti-TGF β	NCL-TGF	Novocastra	1:40	Placenta
Ig de camundongo anti-IL-6	NCL-IL-6	Novocastra	1:20	Pulmão
Ig de camundongo anti-IL-23	511201	Biolegend	1:80	Lúpus
Ig de cabra anti-IL-17	AF-317-NA	R&D Systems	1:20	Amígdala

4.2 ANÁLISE QUANTITATIVA E ESTATÍSTICA

A imunomarcção positiva foi evidenciada na cor castanha. As células imunomarcadas foram quantificadas de maneira randomizada considerando nove campos na derme com uso de um retículo graduado acoplado à ocular do microscópio, em aumento de 400x, com área de 0,0625 mm².

Os resultados obtidos a partir da análise quantitativa foram analisados estatisticamente pelo método não paramétrico Mann-Whitney, cujo nível de significância estabelecido foi de 95% ($p < 0,05$). Para tal avaliação foi empregado o uso do programa de estatística “Graph Pad Prism”, versão 5.00 para Windows (GraphPad software, San Diego, CA).

5. Resultados

5. RESULTADOS

5.1 ANÁLISE GERAL DOS PACIENTES:

Os pacientes envolvidos na casuística foram majoritariamente indivíduos do sexo masculino, correspondendo a 86,96% dos casos.

A faixa etária, analisando ambos os sexos, variou de 41 a 87 anos, com idade média de 61 anos.

As lesões localizaram-se nos membros inferiores em 60% dos casos e 40% nos membros superiores.

O ambulatório da dermatologia do HC-FMUSP realizou cultura de todos os pacientes da casuística, o crescimento foi unânime de *F. pedrosoi*, tal dado consta ainda no trabalho realizado pelo laboratório de micologia clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo⁴⁹.

5.2 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

As lesões que constituíram a casuística foram do tipo verrucoso. Ao exame microscópico os achados histológicos mais frequentes foram:

- ✓ Epiderme: hiperqueratose, acantose irregular, microabscessos.
- ✓ Derme: granulomas, alguns com centro supurado, infiltrado inflamatório constituído por células gigantes, células epitelióides, macrófagos, linfócitos, plasmócitos e eosinófilos. Parasitismo que variou de moderado a intenso.

Entre outros achados relevantes destacam-se: a presença de ulceração da epiderme, hiperplasia pseudocarcinomatosa e fibrose.

A figura 1 demonstra as características histológicas das lesões de CBM e figura 2 destaca os detalhes das células fúngicas.

Figura 1: Histologia de lesões de pele de cromoblastomicose evidenciada em coloração de hematoxilina-eosina (HE). A: Epiderme apresentando hiperplasia pseudocarcinomatosa e acantose (40X). B: Presença de acantose e microabscesso intraepidérmico (100x). C: Formação granulomatosa com infiltrado inflamatório caracterizado por células gigantes, alto número de células fúngicas, eosinófilos, macrófagos e linfócitos (200x).

Figura 2: Histologia de lesões de pele de CBM evidenciada pela coloração de hematoxilina-eosina (HE) evidenciando células fúngicas parasitando o tecido epitelial. Fungos no interior de células gigantes e ao longo do tecido em 400x (A) e o detalhe das características fúngicas em 1000X (B,C,D).

5.3 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

Pela técnica imunohistoquímica foi possível verificar a presença de células Foxp3+ em 38,63% dos casos, com imunomarcção nuclear. A positividade se deu em infiltrados inflamatórios e regiões associadas aos granulomas (Figura 3 A-D).

A expressão de células CD25+ foi evidenciada em 86,36% dos espécimes analisados. Essas células estavam distribuídas no infiltrado inflamatório dérmico e ao redor dos granulomas (Figura 4 A-D).

Células com expressão de TGF- β foram visualizadas em 95,45% das biópsias, a imunomarcção foi específica em células mononucleares do infiltrado inflamatório (Figura 5 A- D).

A expressão de IL-6 foi discreta em nossa casuística, apenas 20,45% das biópsias apresentaram-se positivas para o marcador (Figura 6 A-D).

A IL-23 foi observada em 81,81% dos casos analisados, estando raramente presente nos infiltrados inflamatórios (Figura 7 A-D).

Quanto a IL-17, 97,72% dos espécimes em questão apresentaram imunoexpressão em células mononucleares e em células polimorfonucleares geralmente em áreas de granulomas supurativos (Figura 8 A-D).

Figura 3: reação imunohistoquímica de estreptavidina-biotina peroxidase evidenciando células com expressão de Foxp3 (expressão nuclear) nos aumentos de 200x (A,B) e 400x (C,D).

Figura 4: reação imunohistoquímica de estreptavidina-biotina peroxidase evidenciando células com expressão de CD25 nos aumentos de 200x (A,B) e 400x (C,D).

Figura 5: baixo número de células com expressão de TGF- β nos aumentos de 200x (A,B) e 400x (C,D). Reação imunohistoquímica de estreptavidina-biotina peroxidase.

Figura 6: reação imunohistoquímica de estreptavidina-biotina peroxidase evidenciando células com expressão de IL-6 nos aumentos de 200x (A,B) e 400x (C,D).

Figura 7: evidenciação de células expressando IL-23 nos aumentos de 200x (A,B) e 400x (C,D). Reação imunohistoquímica de estreptavidina-biotina peroxidase.

Figura 8: elevado número de células com expressão de IL-17 em infiltrado dérmico e em granulomas. Reação imunohistoquímica estreptavidina-biotina peroxidase nos aumentos de 200x (A,B) e 400x (C,D).

A distribuição de TGF- β mostrou-se semelhante entre os três grupos avaliados, não conferindo diferença estatística ($p>0.05$).

Gráfico 3: Análise quantitativa da expressão de TGF- β entre os grupos de estudo.

Células com expressão de IL-17 estiveram presentes nos três grupos analisados. A análise comparativa evidenciou aumento estatisticamente significativo no grupo CBM quando comparado aos demais grupos ($p < 0,001$).

Gráfico 5: Análise quantitativa da expressão de IL-17 entre os grupos de estudo.

Gráfico 7: Análise da imunoexpressão de Foxp3 e IL-17 em espécimes de CBM.

6. Discussão

6. DISCUSSÃO

O estudo de lesões cutâneas na cromoblastomicose tem fundamental importância não somente por questões estéticas, considerando-se os diferentes aspectos que podem apresentar, mas especialmente devido a essas lesões serem espelho do comprometimento imunológico do paciente. O tecido tegumentar muitas vezes é responsável pelo início da cascata imunológica e, no caso da cromoblastomicose, é a estrutura pela qual o fungo apresenta tropismo.

Realizamos um levantamento de casos nos arquivos do laboratório de Dermatopatologia da Divisão de Clínica Dermatológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) no período de 18 anos (1992-2010) e obtivemos 23 casos de lesões classificadas como do tipo verrucoso e nenhum caso do tipo placa atrófica. Tal fato corrobora indicações literárias que afirmam que, das diferentes formas de lesão que a CBM pode apresentar, as do tipo verrucoso são as mais comumente observadas^{50,51}.

A idade dos pacientes envolvidos neste estudo variou de 41 a 87 anos ao registrarem-se no serviço de dermatologia do HC-FMUSP, com idade média de 61 anos. As lesões, em grande parte, se apresentavam nos membros inferiores (60%) e esses indivíduos eram majoritariamente do sexo masculino (87%).

A incidência em relação ao sexo pode variar de acordo com a região de análise, mas a estimativa global mostra predominância do sexo masculino, como ocorre em Madagascar¹¹, Cuba⁵² e Brasil^{12,19}.

Em vias gerais as lesões são mais frequentes nos membros inferiores. Isso se deve, em grande parte, por tratar-se de uma doença ocupacional, típica de trabalhadores do meio rural^{4,5,11}.

A análise histopatológica de nossa casuística evidenciou hiperplasia pseudo epiteliomatosa e eliminação de fungos na região trans-epidérmica. Já na derme, foram observados granulomas supurativos mal formados e infiltrado inflamatório constituído por linfócitos, plasmócitos, eosinófilos, presença expressiva de neutrófilos e macrófagos. Observou-se ainda, extensa fibrose e grande número de células fúngicas. Tais achados assemelham-se aos relatos de 2003 e 2010^{2,32}.

Ao que se refere ao agente etiológico, o isolamento de *Fonsecaea pedrosoi* foi unânime em nossas amostras, conforme trabalho realizado anteriormente⁵². Embora a CBM tenha maior incidência em países tropicais e subtropicais^{14,26,53} seja na China⁵⁴, Gabão⁵⁵ ou Brasil^{6,56} *Fonsecaea* é o agente causador da doença mais isolado por todo o mundo.

Estudos acerca da resposta imunológica na CBM têm mostrado que pacientes que apresentam lesões verrucosas apresentam granulomas micóticos de formação mista, com padrão de resposta de perfil Th2 condizente com o quadro de pior resposta frente ao fungo e que pacientes com lesões em placa atrófica apresentam granulomas micóticos de formação organizada, desenvolvem o perfil Th1 e, portanto, uma melhor resposta imune^{32,57}. No entanto, até o presente momento não há relatos do estudo da dinâmica imunológica que os pacientes apresentam ou inferências sobre o que os leva a desenvolver tais respostas.

Evidenciamos nessa casuística o predomínio de células com expressão de IL-17, bem como presença de TGF- β e IL-23. Esse perfil citocínico predominante, segundo trabalhos, caracteriza a resposta do tipo Th17⁵⁸⁻⁶⁰. Nessas lesões, a constituição de resposta com tal perfil poderia ser uma tentativa do sistema imune em conter a infecção frente ao fungo, uma vez que há predomínio de perfil Th2 em lesões verrucosas em detrimento de Th1, como previamente demonstrado³².

Com relação à presença de células T reguladoras, embora em menor número quando comparadas às células com expressão de IL-17, também pudemos verificar número considerável de células Foxp3+ (cerca de 40% dos casos) e células CD25+ (cerca de 90%).

Como discorrem Melo e Carvalho em 2009⁶¹, as células T reguladoras possuem papel-chave na manutenção da tolerância e regulação da resposta imune, da mesma maneira, em trabalho de Weaver⁴⁵ discute-se que as células Th17 parecem ser a tradução da adaptabilidade do sistema imunológico em favor da proteção ao hospedeiro, de modo que a elucidação das características de ambas as linhagens pode, além de identificar os mecanismos de organismos invasores, auxiliar na elaboração de terapêuticas mais eficazes para inúmeras doenças.

As células T reguladoras possuem fenótipo CD4+CD25+⁶², porém a molécula CD25 é expressa por outras populações celulares como linfócitos B, T e macrófagos ativados, de modo que a presença apenas de CD25 não indica necessariamente a presença de células T reguladoras. Estudos demonstraram que o gene Foxp3 é expresso no núcleo de células Treg sendo assim marcador fidedigno desta linhagem celular⁶³.

Como já visto a citocina TGF- β media o direcionamento entre as respostas Treg e Th17. Altos níveis de TGF- β correlacionados a ausência de citocinas pró-inflamatórias propiciam o perfil T regulador e baixos níveis de TGF- β correlacionados a presença significativa de citocinas pró-inflamatórias promovem a síntese de IL-23, citocina associada ao desenvolvimento e manutenção de linfócitos Th17^{59, 64, 65}.

A citocina IL-17 tem recebido atenção considerável em diversos contextos desde sua descoberta em 1993⁶⁶. Sua secreção é promovida pela IL-23 produzida por células TCD4+ de memória^{43, 44}. Níveis significativos de células Th17, de acordo com inúmeros estudos, estabelecem-nas como protagonistas em condições inflamatórias crônicas, uma vez que essa população celular parece ser um reforço aos padrões Th1 e Th2 de resposta⁴⁵. A atuação dessa linhagem celular é caracterizada pela secreção de IL-6, IL-17, IL-22 e TNF- α ⁶⁷.

Em conjuntura semelhante consideramos pacientes acometidos por paracoccidioidomicose (PCM), micose sistêmica com imunopatogenia melhor esclarecida com muitas semelhanças à CBM. A PCM se dá pela inalação de conídeos do *Paracoccidioides brasiliensis*, fungo dimórfico⁶⁸, cuja infecção envolve especialmente pulmões e em cerca de 30% dos casos, a pele. Diferentemente da CBM, observa-se disseminação linfo-hematogênica com certa frequência⁶⁹.

Em trabalho recente discutiu-se a interação de células produtoras de IL-17 e Foxp3+ na homeostase do tecido mucoso intestinal. Acreditamos, assim como Littman e Rudensky⁷⁰, que a interação desregulada da atividade pró-inflamatória da IL-17 com patógenos possa levar ao viés do balanço entre a

resposta efetora e a resposta reguladora, predispondo o indivíduo à cronicidade da doença. Vale lembrar que mesmo sendo submetidos a tratamentos de longo período, a maioria dos pacientes acometidos por CBM não apresenta cura absoluta e frequentemente há recidiva das lesões⁷¹⁻⁷³. Sendo assim, a população Th17 na CBM parece ser pouco efetiva do ponto de vista do hospedeiro e talvez haja necessidade de rever os padrões utilizados no tratamento empregado nesses pacientes.

Atualmente alguns estudos relacionados à psoríase encontram-se em andamento buscando encontrar um modelo melhorado do receptor de IL-17A ou produzir anticorpos anti-IL-17A. Ambos os seguimentos de pesquisa visam inibir a secreção desta citocina e com isso promover a recuperação de pacientes. Um desses estudos resultou na recuperação de ratos que apresentavam placas de psoríase por meio da alteração do receptor de IL-17A, abrindo fronteiras no futuro do tratamento de pacientes psoriáticos^{74,75}.

Vale ressaltar que o polimorfismo das lesões de CBM induz à necessidade de se fazer o diagnóstico diferencial com uma série de doenças infecciosas, a exemplo da esporotricose⁷⁶, a leishmaniose cutânea⁷⁷, ou ainda doenças não infecciosas, como algumas neoplasias e principalmente a psoríase⁷⁸.

Em agravante as complicações que podem ocorrer no momento do diagnóstico, esses indivíduos ainda se deparam com tratamentos de longa duração e o infortúnio de os procedimentos médicos e fármacos empregados serem eficientes de início, mas ineficazes em âmbito geral, havendo muitas vezes a recidiva das lesões^{22,71-73,79}.

Embora muitos pesquisadores tenham se mobilizado nas últimas décadas a melhor compreender o universo da CBM, muitos estudos ainda se fazem necessário para que, além da compreensão da dinâmica entre parasita-hospedeiro, obtenhamos medicamentos verdadeiramente adequados ao tratamento dessa infecção.

Em suma, nossos dados mostram que a expressão de Foxp3 na CBM é semelhante à expressão em espécimes sãos (não conferindo diferença estatisticamente relevante), mas é menor quando comparada a expressão de PCM, apresentando $p < 0,001$. Já a demonstração de IL-17 apresenta-se superior tanto em relação à pele normal ($p < 0,001$) quanto a espécimes com PCM ($p < 0,001$). Demonstramos desta forma, o predomínio da resposta Th17 sobre a resposta T reguladora em lesões verrucosas na cromoblastomicose.

Em concordância com os resultados apresentados, podemos inferir que a presença exacerbada de IL-17 no microambiente de lesões verrucosas dos pacientes com CBM figura-se interferente na ação de células Foxp3+, promovendo ação desregulada e ineficaz de ambos os perfis. De modo que ao invés do padrão Th17 caracterizar apoio à resposta Th2, essas células parecem propiciar viés na defesa do hospedeiro frente ao processo inflamatório e diferente do que ocorre em doenças com maior equilíbrio entre as respostas imunes, a cura clínica é rara e a recidiva das lesões é frequentemente observada.

Ao evidenciarmos principalmente o predomínio de células com expressão de IL-17 nas lesões, acreditamos que a relevância de nosso estudo se dá pela contribuição a compreensão da imunopatogenia da cromoblastomicose e com isso a possibilidade de auxiliar o desenvolvimento de

terapias capazes de modular o sistema imunológico do hospedeiro para o perfil imune mais efetivo e permitir dessa maneira, melhor desempenho do hospedeiro e a contenção da infecção.

7. Conclusões

7. CONCLUSÕES

- Demonstramos pela primeira vez que elementos celulares relacionados à resposta T reguladora e Th17 participam da resposta imune *in situ* das lesões verrucosas da cromoblastomicose.
- Nessas lesões a resposta imune de perfil Th17 é a predominante.
- No microambiente das lesões do tipo verrucoso na cromoblastomicose há evidências de desequilíbrio entre os mecanismos reguladores e efetores da imunidade (mediados por linfócitos Foxp3+ e Th17).
- Linfócitos que expressam o receptor de interleucina 2 (CD25+) estão presentes de modo expressivo nas lesões cutâneas da cromoblastomicose.
- A densidade de células que expressam o TGF- β na resposta imune *in situ* nessas lesões parece estar mais relacionada à constituição da resposta de perfil Th17 do que da resposta de perfil T regulador.

- Células com expressão das citocinas IL-23 e IL-6 teriam provável participação somente na fase inicial da promoção da resposta imune Th17 na cromoblastomicose, uma vez que nos sítios de lesão não diferiram em número do grupo controle.

ANEXO A: DOCUMENTO DE APROVAÇÃO DA CAPPesq

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 08/06/2011, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0317/11**, intitulado: **"RESPOSTA IMUNE IN SITU NA CROMOBLASTOMICOSE HUMANA: PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS E EXPRESSÃO DE CITOCINAS DE PERFIL TH17"** apresentado pelo Departamento de **PATOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Carla Pagliari**

Co-autores: **Mirian Nacagami Sotto, Maria Irma Seixas Duarte, Elaine Raniero Fernandes, Paulo Ricardo Criado, Aline Alves de Lima Silva, Wellington Luiz Ferreira da Silva**

CAPPesq, 08 de Junho de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
 Coordenador
 Comissão de Ética para Análise de
 Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492
 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

ANEXO B: RELAÇÃO DE PACIENTES E MARCADORES ANALISADOS

Paciente	Sexo	Idade	Localização da lesão	Grau de Parasitismo	Foxp3	CD25	TGF-β	IL-6	IL-17	IL-23
1	M	55	*	**	5,212	36,345	21,684	0	514,304	7,11
2	F	41	MI	+	0	36,249	4,728	0	446,952	2,930
3	M	82	MI	+	0	20,488	29,000	0	316,039	0
4	M	45	MS	+	176,927	132,841	5,469	14,511	2153,333	35,627
5	M	50	MI	+++	0	4,728	0	21,097	755,611	1,628
6	M	52	MI	+	0	87,719	3,347	0	183,460	5,919
7	F	75	MS	++	0	0	39,701	0	131,283	6,363
8	M	43	MI	+	0	3,152	39,118	191,527	146,572	*
9	M	50	MS	+	0	117,871	5,714	0	1696,060	1,576
10	M	51	MI	++	0	25,542	24,007	0	624,016	2,678
11	M	78	MS	++	0	105,399	60,615	0	366,008	54,874
12	M	87	MS	**	3,306	74,781	30,197	4,846	571,995	12,832
13	M	56	MI	++	18,860	33,096	14,224	0	1598,305	10,66
14	M	61	MS	++	70,814	31,737	11,449	0	678,72	5,122
15	M	55	*	+	0	49,504	10,326	76,43	111,899	4,728
16	M	71	MI	+	3,387	5,043	64,163	15,408	711,247	9,666
17	M	60	MS	+++	**	8,536	0	*	1273,031	*
18	M	54	MI	+	47,416	58,405	17,685	0	690,437	35,627
19	M	77	MI	+	0	82,335	39,641	0	2005,680	28,709
20	M	83	MI	+	381,135	146,193	18,835	5,509	1510,339	18,433
21	F	87	MI	+	0	4,728	19,298	0	909,921	17,336
22	M	43	*	+	0	0	7,880	0	125,217	9,661
23	M	49	MS	+++	113,728	104,643	8,034	0	915,395	3,283

*Dados não informados **Fragmento com área insuficiente para contagem **Parasitismo:1-10 (+), 10-20 (++), > 20 (+++)**

9. Referências

9. 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. Rudolph M. Über die brasilianische “Figueira” (Vorläufige Mitteilung). *Arch. Schiffs u Tropen. Hyg.* 1914;18:498–499.
4. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vacari EM, de Melo NT. Tratado de Micologia Médica. 9a ed. São Paulo: Sarvier; 2002. Cap.18, p. 441-61.
5. Queiroz-Telles F, McGinnis MR, Salkin I, Graybill JR. Subcutaneous mycoses. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 2003; 17:59-85.
6. 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.

7. Pedroso A, Gomes JM. Sobre 4 casos de dermatite verrucosa produzida pela *Phialophora verrucosa*. *Ann Paulistas de Med e Cir*. 1920; 11: 53–61.
8. Terra F, Torres M, Fonseca Filho O. Novo tipo de dermatite verrucosa; micose por *Acrotheca* com associado de leishmaniose. *Brasil Medico*. 1922; 36:363-8.
9. Odds FC, Araújo T, Disalvo AF, Evans EG, Hay RJ, Randhawa HS, Rinaldi MG, Walsh TJ. Nomenclature of fungal diseases: a report and recommendations from a Sub-Committee of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM). *J Med Vet Mycol*. 1992; 30:1-10.
10. Carrion AL. Chromoblastomycosis. *Ann NY Acad Sci*. 1950; 50:1255-1282.
11. Esterre P, Andriantsimahavandy A, Ramarcel ER, Pecarrere JL. Forty years of chromoblastomycosis in Madagascar: a review. *Am J Trop Med Hyg*. 1996; 55:45-7.
12. Silva JP, de Souza W, Rozental S. Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonian Region (Brazil). *Mycopathologia*. 1999; 143:171-5.
13. Frey MN, Bonamigo RR, Ioppi AEE, Prado GP. Estudo sobre as características clínicas, epidemiológicas, histopatológicas e micológicas de

pacientes com micoses profundas em um Serviço de Dermatologia de Porto Alegre, RS. *Rev da AMRIGS*. 2011; 55: 123-9.

14. McGinnis MR. Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis, and mycology. *J Am Acad Dermatol*. 1983; 8:1-16.

15. 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.

16. Ellis DH e Griffiths DA. The location and analysis of melanins in the cell walls of some soil fungi. *Am J Microbiol*. 1974; 20:1379-1428.

17. Alviano DS, Franzen AJ, Travassos LR, Holandino C, Rozental S, Ejzemberg R, et al. Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* induces production of human antifungal antibodies and enhances the antimicrobial efficacy of phagocytes. *Infect. Immun*. 2004; 72:229-37.

18. De Hoog GS, Queiroz-Telles F, Haase G, Fernandez-Zeppenfeldt G, Attili Angelis D, Gerrits Van Den Ende AH, Matos T, Peltroche-Llacsahuanga H, Pizzirani-Kleiner AA, Rainer J, Richard-Yegres N, Vicente V, Yegres F. Black fungi: clinical and pathogenic approaches. *Med Mycol*. 2000; 38:243-50.

19. Londero AT, Ramos CD. Chromomycosis: a clinical and mycologic study of thirty-five cases observed in the hinterland of Rio Grande do Sul, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1976; 25:132-5.
20. Torres-Guerrero E, Isa-Isa R, Isa M, Arenas R. Chromoblastomycosis. *Clinics in Dermat.* 2012; 30:403–408.
21. Salgado CG. Fungal x host interactions in Chromoblastomycosis: what we have learned from animal models and what is yet to be solved. *Virulence.* 2010; 1:3-5.
22. 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.
23. Zaror L, Fischman O, Pereira CA, Felipe RG, Gregório LC, Castelo A. A case of primary nasal chromoblastomycosis. *Mykosen* 1987; 30:468-71.
24. Ogawa MM, Alchorne MM, Barbieri A, Castiglioni ML, Penna AP, Tomimori-Yamashita J. Lymphoscintigraphic analysis in chromoblastomycosis. *Int. J. Dermatol.* 2003; 42: 622-25.
25. de Queiroz Filho, F. A cromoblastomicose no estado do Paraná: etiologia, epidemiologia, clínica e terapêutica com itraconazol [tese]. Curitiba: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Paraná; 1996.

26. Uribe F, Zuluaga AI, Leon W, Restrepo A. Histopathology of chromoblastomycosis. *Mycopathologia*. 1989; 105:1-6.
27. Ricard-Blum S, Hartmann DJ, Esterre P. Monitoring of extracellular matrix metabolism and cross-linking in tissue, serum and urine of patients with chromoblastomycosis, a chronic skin fibrosis. *Eur. J. Clin. Invest.* 1998; 28:748-54.
28. Saeb M, Arenas R. Cromomicosis: informe de cinco casos con énfasis histopatológico y terapéutico. *Derm. Venez.* 1999; 37:46-50.
29. 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.
30. Sotto MN, De Brito T, Silva AM, Vidal M, Castro LG. Antigen distribution and antigen-presenting cells in skin biopsies of human chromoblastomycosis. *J. Cutan. Pathol.* 2004; 31:14-8.
31. Silva JP, Silva MB, Salgado UI, Diniz JAP, 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.

32. 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.
33. Mazo FGV, Da Gloria DM, Ferreira KS, Marques SG, Goncalves AG, Santos VCL, Pedroso e Silva CM, Almeida SR. Cytokines and lymphocyte proliferation in patients with different clinical forms of chromoblastomycosis. *Microbes Infect* 2005; 7:708-13.
34. Teixeira de Sousa MG, Ghosh EE, Almeida SR. Absence of CD4+ T cells impairs host defence of mice infected with *Fonsecaea pedrosoi*. *Scand J Immunol*. 2006; 64:595-600.
35. Campbell DJ, Ziegler SF. Foxp3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7: 305-310.
36. Sojka DK, Huang YH, Fowell DJ. Mechanisms of regulatory T cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. *J Immunology*. 2008; 124: 13-22.
37. Piccirillo CA. Regulatory T cells in health and disease. *Cytokine*, 2008; 120: 395-401.
38. Parise-Fortes MR, Miot HÁ, Kurokawa CS, Marques MEA, Marques SA. Imunologia da paracoccidioidomicose. *An Bras Dermatol*. 2011; 86: 516-25.

39. Chen ML, Pittet MJ, Gorelik L, Flavell RA, Weissleder R, von Boehmer H, Khazaie K. Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. *Proc Natl Acad Sci.* 2005; 102: 419-24.
40. Pyzick M, Piccirillo CA. TGF-beta1 modulates Foxp3 expression and regulatory activity in distinct CD4+ T cell subsets. *J Leukoc Biol.* 2007; 82: 335-46.
41. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4+CD25- naïve T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med.* 2003; 198:1875-86.
42. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature.* 2006; 441: 231-34.
43. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat. *Nat Immunol.* 2008; 9:641-9.
44. Yang Y, Xu J, Niu Y, Bromberg JS, Ding Y. T-bet and eomesodermin play critical roles in directing T cell differentiation to Th1 versus Th17. *J Immunol.* 2008; 181:8700-10.

45. Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol.* 2007; 25:821–52.
46. Di Cesare A, Di Meglio P, Nestle FO. The IL-23/Th17 Axis in the Immunopathogenesis of Psoriasis. *J Inv Dermatology.* 2009; 129:1339–1350.
47. Pagliari C, Fernandes ER, Stegun FW, da Silva WL, Seixas Duarte MI, Sotto MN. Paracoccidioidomycosis: cells expressing IL17 and Foxp3 in cutaneous and mucosal lesions. *Microb Pathog.* 2011; 50:263-7.
48. Basso AS, Cheroutre H, Mucida D. More stories on Th17 cells. *Cell Res.* 2009;19:399-411.
49. Andrade TS, Castro LG, Nunes RS, Gimenes VM, Cury AE. Susceptibility of sequential *Fonsecaea pedrosoi* isolates from chromoblastomycosis patients to antifungal agents. *Mycoses.* 2004; 47: 216-21.
50. Vollum DI. Chromomycosis: a review. *Br J Dermatol.* 1977; 96:454-8.
51. Esterre P, Andriantsimahavandy A, Raharisolo C. Natural history of chromoblastomycosis in Madagascar and the Indian Ocean. *Bull Soc Pathol Exot.* 1997; 90:312-7.

52. Fundora FP, Albajés CR. Cromomicosis: quince años de incidência. *Ver Cubana Hig Epidemiol.* 1989; 27: 285-92.
53. Esterre P, Jahevitra M, Andriantsimahavandy A. Humoral immune response in chromoblastomycosis during and after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000, 7: 497-500.
54. Lu S, Lu C, Zhang J, Hu Y, Li X, Xi L. Chromoblastomycosis in Mainland China: a systematic review on clinical characteristics. *Mycopathologia.* 2013;175:489-95.
55. Kombila M, Gomez de Diaz M, Richard-Lenoble D, Renders A, Walter P, Billiault X, Joire A, Coniquet-Folquet S, Duong TH, de Bièvre C. Chromoblastomycosis in Gabon. Study of 64 cases. *Sante.* 1995 ;5:235-44.
56. Melo e Silva AC. Chromoblastomycosis in the state of Maranhão. *Rev Soc Bras Med Top.* 1992; 25: 37-44.
57. Minotto R. *Respostas polares à infecção pela cromoblastomicose antes e após as terapias* [tese]. Porto Alegre: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2009.

58. Oppmann B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*. 2000;13:715-725.
59. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector Th17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006;441:235.
60. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, Basham B, Smith K, Chen T, Morel F, Lecron JC, Kastelein RA, Cua DJ, McClanahan TK, Bowman EP, de Waal Malefyt R. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol*. 2007;8:950-7.
61. Melo KM, Carvalho BTC. Células T regulatórias: mecanismos de ação e função nas doenças humanas, *Rev Bras Alerg Immunopatol*. 2009; 32:184-8.
62. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995; 155:1151-1164.

63. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunology*. 2003; 4: 330-36.
64. Zaba LC, Cardinale I, Gilleaudeau P, Sullivan-Whalen M, Suárez-Fariñas M, Fuentes-Duculan J, Novitskaya I, Khatcherian A, Bluth MJ, Lowes MA, Krueger JG. Amelioration of epidermal hyperplasia by TNF inhibition is associated with reduced Th17 responses. *J Exp Med*. 2007; 204:3183-94.
65. Guha M, Xu ZG, Tung D, Lanting L, Natarajan R. Specific down-regulation of connective tissue growth factor attenuates progression of nephropathy in mouse models of type 1 and type 2 diabetes. *FASEB J*. 2007; 21:3355-68.
66. Rouvier E, Luciani MF, Mattéi MG, Denizot F, Golstein P. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J Immunol*. 1993; 150:5445-56.
67. McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol*. 2006; 27:17-23.
68. Carbonell LM. Cell Wall Changes During the Budding Process of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatitidis*. *J Bacteriology*. 1967; 94:213-223.

69. Franco M, Montenegro MR, Calich VLG, Benard G. Paracoccidioidomycose. Patologia das principais doenças tropicais no Brasil. In: Bogliolo. *Guanabara Koogan*. Cap.33, p.1387-1398, 2006.

70. Littman DR, Rudensky AY. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell*. 2010; 140:845–58.

71. Santos AL, Palmeira VF, Rozental S, Kneipp LF, Nimrichter L, Alviano DS, Rodrigues ML, Alviano CS. Biology and pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the major etiologic agent of chromoblastomycosis. *FEMS Microbiol Rev*. 2007; 31: 570-91.

72. Salgado CG, da Silva MB, Yamano SS, Salgado UI, Diniz JA, da Silva JP. Cutaneous localized annular chromoblastomycosis. *J Cutan Pathol*. 2008; 24: 142-47.

73. Levang J, Muller P, Marreel A, Nicolas M, Puzenat E, Aubin F, Humbert P. Chromomycosis in Guadeloupe. *Ann Dermatol Venereol*. 2008; 135: 111-115.

74. Kopf M, Bachmann MF, Marsland BJ. Averting inflammation by targeting the cytokine environment. *Nat Rev Drug Discov*. 2010; 9: 703-18.

75. Zaretsky M, Etzyoni R, Kaye J, Sklair-Tavron L, Aharoni A. Directed evolution of a soluble human IL-17A receptor for the inhibition of psoriasis plaque formation in a mouse model. *Chem Biol*. 2013; 20: 202-11.
76. Bonifaz A, Fierro L, Saúl A, Ponce RM. Cutaneous sporotrichosis. Intermittent treatment (pulses) with itraconazole. *Eur J Dermatol*. 2008; 18: 61-41.
77. Verma S, Verma GK, Singh G, Kanga A, Sharma V, Gautam N. Facial chromoblastomycosis in sub-Himalayan region misdiagnosed as cutaneous leishmaniasis: brief report and review of Indian literature. *Dermatol Online J*. 2012;18:3.
78. Pradhan SV et al. Chromoblastomycosis in Nepal: a study of 13 cases. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2007; 73: 176-8.
79. Castro LGM, de Andrade TS. Chromoblastomycosis. *Expert Ver Dermatol*. 2010; 5:1-11.