

**WALTER REFKALEFSKY LOUREIRO**

**Imunoexpressão de fatores de crescimento e citocinas em  
lesões cutâneas da doença de Jorge Lobo**

Versão Corrigida conforme resolução CoPGr6018/11

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

Programa de Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Juarez Antônio Simões  
Quaresma

**São Paulo  
2023**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Loureiro, Walter Refkalefsky  
Imunoexpressão de fatores de crescimento e  
citocinas em lesões cutâneas da doença de Jorge Lobo  
/ Walter Refkalefsky Loureiro. -- São Paulo, 2023.  
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Dermatologia.  
Orientador: Juarez Antônio Simões Quaresma.

Descritores: 1.Lobomicose 2.Lacaziose 3.Doença de  
Jorge Lobo 4.Matriz extracelular 5.Antígenos de  
resposta imune 6.Biomarcadores

USP/FM/DBD-105/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

**WALTER REFKALEFSKY LOUREIRO**

**Imunoexpressão de fatores de crescimento e citocinas em  
lesões cutâneas da doença de Jorge Lobo**

Versão Corrigida conforme resolução CoPGr6018/11

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

Programa de Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Juarez Antônio Simões  
Quaresma

**São Paulo  
2023**

Esta tese 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. Serviço 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 Documentações; 2011.

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

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha família: meu irmão que sempre foi uma inspiração para mim; meus pais que despertaram em mim o prazer pelo ensino, bem como a paixão e respeito pela Amazônia, com toda a sua beleza e biodiversidade. Às minhas filhas, Helena e Clara que são o motivo de tanto esforço e dedicação dentro e fora de casa. À minha esposa Camila, que sempre me incentivou em todos os meus sonhos e projetos, viabilizando suas realizações sem colocar dificuldades, apenas amor. Gestando e criando duas crianças no mesmo período em que levei para concluir este projeto, que não é apenas meu, é da nossa família. Te amo.

Gostaria também de agradecer à Professora Regina Carneiro por ter me recebido e aberto as portas do Serviço de Dermatologia da UEPA para que eu pudesse desenvolver minhas atividades como dermatologista, principalmente atendendo doenças negligenciadas como a Lacaziose. Também quero agradecer ao meu orientador, Professor Doutor Juarez Simões, pelo incalculável apoio para realização deste trabalho, mostrando que é possível se fazer pesquisa de ponta em todo Brasil, especialmente na região Norte, berço desta doença.

## SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Lista de gráficos	
Resumo	
Abstract	
1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1 A pele, sua complexidade e o sistema imunológico .....	2
1.1.1 Ceratinócitos .....	5
1.1.2 Células dendríticas, seu desempenho na inflamação, na autoimunidade e os macrófagos .....	9
1.1.3 Linfócitos T .....	15
1.1.4 Outros componentes celulares da pele .....	17
1.2 Doença de Jorge Lobo.....	19
1.2.1 Aspectos gerais .....	19
1.2.2 Etiologia .....	20
1.2.3 Epidemiologia .....	24
1.2.4 Patogenia.....	25
1.2.5 Quadro clínico.....	27
1.2.6 Imunologia .....	31
1.2.7 Tratamento.....	32
1.3 Matriz Extracelular .....	32
1.3.1 Matriz extracelular intersticial .....	33
1.3.2 Matriz extracelular pericelular .....	35
1.4 Metaloproteinasas de matriz e seus Inibidores.....	36
1.5 Laminina .....	45
1.6 Fibronectina.....	46
1.7 Citocinas e fatores de crescimento .....	47
1.7.1 Citocinas .....	47
1.7.2 Fatores de crescimento .....	51
1.8 Justificativa do estudo.....	54
2 OBJETIVOS .....	55
2.1 Objetivo geral .....	56
3 MÉTODOS.....	57
3.1 Tipo de estudo .....	58
3.2 População de estudo .....	58
3.3 Amostras teciduais.....	59
3.4 Critérios de inclusão .....	59
3.5 Critérios de exclusão .....	60
3.6 Grupo controle .....	60
3.7 Microtomia, histopatologia e histoquímica .....	60
3.8 Imuno-histoquímica.....	61
3.9 Análise das lâminas .....	63
3.10 Análise estatística .....	64
3.11 Documentação fotográfica.....	64

3.12 Aspectos éticos .....	64
4 RESULTADOS.....	66
4.1 Resultados clínico-epidemiológicos .....	67
4.2 Resultados imuno-histoquímicos.....	68
4.3 Resultados estatísticos .....	69
5 DISCUSSÃO .....	73
6 CONCLUSÕES .....	84
7 REFERÊNCIAS .....	87

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPs	- Peptídeos antimicrobianos
APC	- Apresentadoras de antígenos
AR	- Anfiregulina
ASC	- <i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain</i>
	CHS-2 - Quitina sintetase-2
DAMPs	- <i>Danger-associated molecular patterns</i>
DIRA	- Deficiência do antagonista do receptor de IL-1
DJL	- Doença de Jorge Lobo
EGF	- Fator de crescimento epidérmico
EPI	- Equipamentos de proteção individual
FGF b	- Fator de crescimento fibroblástico básico
FXIIIa+	- Fator XIIIa positivas
IFNs	- Interferons do tipo I
IL-1 $\beta$	- Interleucina 1 $\beta$
IL-22	- Interleucina 22
MEC	- Matriz extracelular
MMP	- Metaloproteinases de matriz
MMP-1	- Colagenase 1
MMP-2	- Gelatinase A
MMP-3	- Estromelisina-1
Mtb	- <i>M. tuberculosis</i>
NGF	- Fator de crescimento de nervos
NK	- <i>Natural killer</i>
NLR	- <i>NOD-like protein</i>
NMT	- Núcleo de Medicina Tropical
PAMPs	- Padrões moleculares associados a patógenos
PAS	- Ácido periódico de Schiff
PCM	- Paracoccidiodomicose



PDGF	- Fator de crescimento derivado de plaquetas
pro-IL1 $\beta$	- Pró-interleucina-1 $\beta$
ROS	- Espécies reativas do oxigênio
SABC	- Imuno-histoquímico de estreptavidina-biotina peroxidase ( <i>streptavidin-biotin peroxidase</i> )
SALT	- <i>Skin associated lymphoid tissue</i>
SNC	- Sistema nervoso central
SSU sDNA	- Subunidade de DNA ribossomal 18S
TIMPS	- Inibidores teciduais de metaloproteinases
TLR	- Receptores semelhantes à Toll
TRAPS	- Síndrome periódica associada ao receptor de TNF
UEPA	- Universidade do Estado do Pará
UFPA	- Universidade Federal do Pará

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Registro fotográfico do paciente relatado por Jorge Lobo em 1931.....	20
Figura 2 - Análise filogenética do <i>Lacazia loboi</i> .....	22
Figura 3 - <i>Lacazia loboi</i> ao exame direto .....	23
Figura 4 - <i>Lacazia loboi</i> isolado e em cadeias (Grocott 400x) .....	24
Figura 5 - Lesões de aspecto queloidiano .....	27
Figura 6 - Placas infiltradas recidivadas sobre cicatriz de exérese cirúrgica prévia .....	28
Figura 7 - Pontos enegrecidos sobre placa de aspecto queloidiforme na coxa, correspondendo à eliminação transepitelial do fungo.....	28
Figura 8 - Nódulos de aspecto queloidiano na orelha .....	29
Figura 9 - Padrão de imunomarcção por imuno-histoquímica para citocinas e fatores de crescimento em lesões cutâneas da DJL .....	68

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Características epidemiológicas dos casos de DJL: sexo, idade, localização da lesão e procedência .....67
- Tabela 2 - Quantificação da expressão de citocinas e fatores de crescimento em lesões na DJL e controles de pele normais. Os valores são mostrados em médias e seus desvios padrões, além do valor de p obtido através do teste de Mann-Whitney .....69

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Representação gráfica das médias e desvios padrões da imunexpressão celular para IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  em lesões cutâneas da DJL .....71
- Gráfico 2 - Representação gráfica das médias e desvios padrões da imunexpressão celular para EGF, FGFb, PDGF e NGF em lesões cutâneas da DJL .....72

## RESUMO

Loureiro WR. *Imunoexpressão de fatores de crescimento e citocinas em lesões cutâneas da doença de Jorge Lobo* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

A doença de Jorge Lobo é uma micose profunda que se apresenta localizada sobretudo nos membros inferiores, de evolução crônica e êxito terapêutico muito limitado. Em virtude da cronicidade da doença de Jorge Lobo, com permanência do fungo no tecido por longo período, é de suma importância a ativação do sistema imunológico do hospedeiro e, apesar de alguns trabalhos já terem descrito o padrão de resposta imune local, pouco se sabe sobre a participação e o possível papel da interação de citocinas e fatores de crescimento na sua patogenia. Realizou-se a quantificação de 8 citocinas e fatores de crescimento nas lesões cutâneas da doença de Jorge Lobo utilizando a marcação imuno-histoquímica, comparando-as com o grupo controle. Foram também analisadas as características clínico-demográficas dos pacientes investigados. Dos 16 pacientes portadores de Doença de Jorge Lobo analisados, 81,25% eram do gênero masculino, 81,25% tinham a faixa etária entre 40 e 60 anos e a localização das lesões em 43,75 % dos casos era nos membros inferiores, 25% na orelha, sendo todos os pacientes paraenses. Foi nítido e estatisticamente significativo o predomínio da expressão dos marcadores FGF, TGF- $\beta$  e NGF caracterizando um perfil antiinflamatório que contribui para a evasão imune e sobrevivência do fungo mesmo dentro de um ambiente pró-inflamatório caracterizado pela maior imunomarcagem de TNF- $\alpha$ , IL-1  $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , EGF e PDGF quando comparados ao grupo controle. Este ambiente inflamatório é ineficaz na destruição do fungo, porém suficiente para remodelar a matriz extracelular de maneira crônica gerando as alterações clínicas e histopatológicas características da doença. Este trabalho coloca mais uma peça na elucidação da fisiopatogenia da lacaziose, bem como direciona para novas perspectivas terapêuticas com medicamentos imunobiológicos e de biologia sintética. Mais estudos são necessários para elucidar outros fatores que participem na evasão imune do fungo, bem como correlacionar os subtipos clínicos com seus perfis imunológicos de citocinas e fatores de crescimento.

Descritores: Lobomicose; Lacaziose; Doença de Jorge Lobo; Matriz extracelular; Antígenos de resposta imune; Biomarcadores.

## ABSTRACT

Loureiro WR. *Immunoexpression of growth factors and cytokines in cutaneous lesions of Jorge Lobo's disease* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2023.

Jorge Lobo's disease is a subcutaneous mycosis that presents clinically as a localized disease, especially in the lower limbs, with a chronic evolution and therapeutic success that is not fully effective. Due to the chronicity of Jorge Lobo's Disease, with the fungus remaining in the tissue for a long period, it is extremely important to activate the host's immune system and, although some studies have already described the pattern of local immune response in both diseases, little is known about the participation and possible role of the interaction of cytokines and growth factors in its pathogenesis. The participation of cytokines and growth factors in the skin lesions of Jorge Lobo's disease was evaluated using immunohistochemical staining, comparing them between the diseases and with the control group. The clinical-demographic characteristics of the investigated patients were also analyzed. Of the 16 patients with Jorge Lobo Disease analyzed, 81.25% were male, 81.25% were aged between 40 and 60 years and the location of the lesions in 43.75% of the cases was on the lower limbs, 25% in the ear, being all patients from Pará State. The increased expression of the markers characterized by the immunostaining was statistically significant and predominant for FGF, TGF- $\beta$  and NGF characterizing an anti-inflammatory profile that contributes for immune evasion and fungus survival in spite of being inside an inflammatory environment marked by the also increased TNF- $\alpha$ , IL-1  $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , EGF and PDGF when compared to the control group. This inflammation is ineffective in fungus elimination, but sufficient enough for chronic extracellular matrix remodeling, resulting in the clinical and histopathological features of the disease. This study walks one more step in the direction of elucidating lacaziosis physiopathology and finding new treatment perspectives with immunobiological drugs and synthetic biology. More studies are needed for clarifying other immune evasion factors, as well as correlate clinical subtypes with their cytokines and grow factors profiles.

Descriptors: Lobomycosis; Lobomycosis; Jorge Lobo's disease; Extracellular Matrix; Immune response antigen; Biomarkers.

# **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 A pele, sua complexidade e o sistema imunológico**

Os tecidos que constituem a interface hospedeiro-meio ambiente, incluindo pele, intestino e outras superfícies mucosas, representam a primeira linha de defesa contra patógenos (Elias e Wakefield, 2014). A importância da barreira mecânico-funcional da pele para a manutenção da homeostase do organismo pode ser observada quando ocorre perda de sua integridade como, por exemplo, na vigência de doenças inflamatórias como dermatite atópica ou de contato. A pele se constitui num importante órgão que corresponde a cerca de 15% do peso corporal (Nestle *et al.*, 2009). Está organizada histologicamente pela epiderme, derme, anexos cutâneos e tecido subcutâneo, possuindo um complexo sistema de mecanismos imunológicos, desencadeando processos em que estão envolvidas tanto a imunidade inata quanto a adaptativa. Sob este ponto de vista, pode-se dizer que a pele é um território dotado de complexa rede de células imunes, histologicamente representado pelo tecido linfoide associado à pele (*skin associated lymphoid tissue* - SALT), onde se encontram populações celulares como as células dendríticas, mastócitos e linfócitos B e T, além dos próprios ceratinócitos (Nestle *et al.*, 2009). Estes, em determinadas situações, podem modular respostas imunológicas locais através de fatores humorais como as citocinas. A participação do sistema imunológico na fisiologia da pele não se restringe



apenas aos seus aspectos protetores contra a invasão de organismos estranhos, mas desempenha um papel fundamental na fisiopatologia de doenças de base inflamatória, sobretudo em relação à imunidade adaptativa, como ocorre nas doenças autoimunes e de hipersensibilidade (Grine *et al.*, 2014; Diani *et al.*, 2015). Várias doenças da pele têm seus mecanismos patogénéticos mediados por linfócitos T, e muitas dessas nosologias respondem à terapêutica imunossupressora ou antiinflamatória (Nestle *et al.*, 2009; Grine *et al.*, 2014; Diani *et al.*, 2015).

A pele humana possui dois compartimentos distintos: a epiderme e a derme. A epiderme é constituída por quatro camadas. O estrato basal é responsável pela renovação das células da epiderme e é composta por uma camada de células indiferenciadas que possuem atividade mitótica constante (Koljonen e Ilmonen, 2014). A partir da camada basal, as células se diferenciam para formar o estrato espinhoso, que se caracteriza pela produção de queratina. O estrato granuloso é constituído por ceratinócitos que possuem grânulos enegrecidos no citoplasma constituídos por proteínas da queratina e lipídios. Finalmente a camada mais externa, o estrato córneo, representado por ceratinócitos em seu maior estágio de maturidade compondo a barreira funcional da pele, protegendo da maior parte dos agentes potencialmente tóxicos para o organismo, bem como contribuindo para a manutenção da homeostase por evitar a perda de água e eletrólitos (Kuznetsov *et al.*, 2012; Koljonen e Ilmonen, 2014). Na epiderme ainda se encontram células especializadas: assim, os melanócitos, que produzem o pigmento melânico importante para a manutenção da integridade do DNA

contra as ações da radiação ultravioleta, além de serem capazes de promover a expressão do MHC II; as células de Merckel que são responsáveis pela somestesia da pele; e as células de Langherans, uma das principais células imunes especializadas residentes na pele e cujas funções serão discutidas mais adiante. Além dessas células, linfócitos T, a maioria CD8+, podem ser encontrados no estrato basal e no estrato córneo (Malissen *et al.*, 2014; Diani *et al.*, 2015; Mort *et al.*, 2015).

A derme, localizada sob a epiderme, é caracterizada por apresentar uma organização mais complexa e com maior diversidade de tipos celulares. Esta região contém células imunes especializadas, como células dendríticas, linfócitos T CD4+, linfócitos T  $\gamma\delta$  e células *natural killer* (NK). Além dessas células, foram encontrados na derme macrófagos, mastócitos, células nervosas, linfáticos e vasos sanguíneos, estes últimos responsáveis pela migração de células do sangue para a pele (Nestle *et al.* 2009; Koljonen e Ilmonen, 2014).

É fundamental o real entendimento das principais células que fazem parte da resposta imunológica na pele, bem como as que funcionam como sentinelas, agindo na vigilância contra agentes patógenos.

### 1.1.1 Ceratinócitos

Os ceratinócitos são células epiteliais que têm em sua estrutura pontes intercelulares (*tight junctions*) que participam para a organização do estrato córneo, importante para a manutenção da barreira mecânica e funcional da epiderme e contribuem para os processos inflamatórios, expressam MHC II e produzem citocinas (Quaresma, 2013; Burgeson e Christiano, 1997). Os ceratinócitos têm um amplo espectro de funções que, tal como as células epiteliais das mucosas do trato gastrointestinal, tem a capacidade de distinguir entre agentes que fazem parte da microbiota normal e agentes potencialmente patogênicos (Jakubowicz, 1969; Schmitt, 1994; Elbe e Stingl, 1995; Gieryńska *et al.*, 2009). As células epiteliais possuem mecanismos de reconhecimento através de receptores de componentes altamente conservados de agentes infecciosos, conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Lai e Gallo, 2008). Os PAMPs são estruturas frequentemente essenciais para a sobrevivência, colonização ou invasão dos microrganismos (lipopolissacarídeos, flagelinas, ácidos nucleicos, sequência CpG DNA não-metiladas, ácidos teicóicos, oligossacarídeos ricos em manose, etc) (Newton e Dixit, 2012). Eles garantem que os alvos de ação da resposta do hospedeiro não sejam descartados como um mecanismo de escape imune, tal como se observa em alguns agentes infecciosos frente à ação do sistema imunológico adaptativo (Shisler, 2015; Ulland *et al.*, 2015). Os receptores que se ligam aos PAMPs são conhecidos como receptores de reconhecimento de padrão, dentre os quais os receptores semelhantes à Toll (TLR) (Lai e Gallo, 2008). Ao se ligar aos PAMPs, os TLRs

são capazes de ativar vias intracelulares de sinalização das células alvos e a cascata de imunidade inata e adaptativa. Os ceratinócitos epidérmicos são capazes de expressar vários TLRs localizados tanto na superfície celular, tais como os TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6; e nos endossomos, tais como TLR3 e TLR9. Além disso, a ativação de TLR3 por moléculas de RNA de dupla cadeia induz a expressão de TLR7, criando uma resposta antiviral local (Lai e Gallo, 2008). A expressão de TLRs pelos ceratinócitos é crucial para a ativação da resposta imune da pele, uma vez que receptores nos ceratinócitos leva a uma resposta imune predominantemente do tipo TH1 e por sua vez a ativação de Interferons do tipo I (IFNs) (Lai e Gallo, 2008).

Além das TLRs, outra classe de proteínas conhecida como *NOD-like protein* (NLR), tem a capacidade de reconhecer PAMPs e endogenamente as chamadas *danger-associated molecular patterns* (DAMPs), e exercem um papel importante no reconhecimento de substâncias como irritantes e toxinas (Coll *et al.*, 2015). A indução das NLRs resulta na ativação de vias de sinalização pró-inflamatória através dos inflamossomos, que são um complexo proteico constituído pela NRL, um adaptador proteico *apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain* (ASC) e a pró-caspase 1 (Coll *et al.*, 2015). O inflamossomo por sua vez leva a ativação da caspase 1, com clivagem da pró-interleucina-1 $\beta$  (pro-IL1 $\beta$ ) e a pro-IL18, que por sua vez leva a expressão de citocinas pró-inflamatórias ativando células imunes residentes da pele com a indução de uma resposta imune elaborada a agentes lesivos (Feldmeyer *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2007; Keller *et al.*, 2008).

A produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs) é um mecanismo altamente conservado de defesa das células eucarióticas contra patógenos potencialmente invasores (Gilliet e Lande, 2008). Os AMPs são produzidos na superfície do epitélio lesionado e exercem seu papel, sobretudo evitando a invasão de micro-organismos através da indução de morte a patógenos, ativando células imunes ou modulando o perfil de citocinas. Na pele, os ceratinócitos são capazes de produzir essas AMPs, que são chamadas de defensinas e catelicidinas (Gilliet e Lande, 2008; Lai e Gallo, 2008).

Os ceratinócitos, na vigência de uma infecção de pele, podem aumentar a produção dos AMPs induzidos por citocinas liberadas por linfócitos T. Neste sentido tem particular importância citocinas de perfil TH17, como a IL-17 e a IL-22, pois são capazes de potencializar a liberação de AMPs pelos ceratinócitos ou por células mucosas, constituindo-se no elo entre os ceratinócitos e a imunidade adaptativa (Liang *et al.*, 2006; Weaver *et al.*, 2007; Kolls *et al.*, 2008).

Os ceratinócitos podem ainda secretar numerosas citocinas, incluindo a IL-1, IL-6, IL-10, IL-18 e TNF- $\alpha$  (Albanesi *et al.*, 2005). Dentre estas citocinas, um relativo interesse tem surgido na ação da IL-1 tanto na pele normal quanto em condições patológicas, uma vez que esta citocina tem efeito pleiotrópico, induzindo um espectro grande de efeitos biológicos, entre as quais a ativação de células T *helper*, células dendríticas, bem como a indução da maturação e expansão clonal de células B (Arend *et al.*, 2008). Em condições normais, os ceratinócitos secretam tanto a IL-1 $\alpha$  quanto a IL-1 $\beta$ , porém em formas não biologicamente ativas. Em condições de exposição à radiação ultravioleta, os

ceratinócitos processam e liberam a IL-1 $\beta$  através da ativação dos inflamossomos. Os mecanismos de regulação da liberação da IL-1 $\alpha$  não são totalmente esclarecidos, entretanto, alguns trabalhos têm demonstrado que a diminuição da caspase 8 leva a secreção de IL-1 $\alpha$  ativa a partir da reserva de pro- IL-1 $\alpha$  em ceratinócitos de camundongos, o que sugere uma regulação negativa da caspase 8 (Arend *et al.*, 2008).

Diversas quimiocinas e seus receptores também podem ser substancialmente expressos pelos ceratinócitos. A ativação de CCL20, CXCL9, CXCL10 e CXCL11 por sua vez pode promover a atração de células T efetoras para a pele em doenças caracterizadas pela infiltração de células T, tal como a psoríase (Albanesi *et al.*, 2005). Os ceratinócitos ativados promovem o recrutamento de neutrófilos para a epiderme inflamada de pacientes psoriáticos através da expressão de CXCL1 e CXCL8. Os ceratinócitos também influenciam o tráfico de precursores de células de Langerhans para o epitélio através da expressão de CCL20 (Dieu-Nosjean *et al.*, 2000).

Em relação ao fenômeno de apresentação de antígenos, os ceratinócitos podem expressar MHC de classe II em diversas doenças de pele caracterizadas pela infiltração leucocitária (Nickoloff e Turka, 1994), o que nos permite inferir que estas células funcionariam com uma célula apresentadora de antígenos não profissional. Alguns trabalhos têm demonstrado que os ceratinócitos são capazes de induzir respostas funcionais em linfócitos T de memória CD4 $^{+}$  e CD8 $^{+}$  induzindo a expressão de citocinas de perfil TH1 ou TH2, o que tem reforçado a visão de que os ceratinócitos funcionam como células apresentadoras de antígenos (APC) (Black *et al.*, 2007).

Recentemente, um papel importante dos ceratinócitos na indução da inflamação tem sido demonstrado a partir da reação da pele frente aos produtos aplicados sobre a mesma, onde se observou a ativação dessas células antes do influxo de linfócitos para a pele (Griffiths *et al.*, 1989). Esses dados, juntamente com os estudos de citocinas liberadas pelo ceratinócitos, têm apontado para um papel central dessa população celular na indução de processos inflamatórios cutâneos (Kupper, 1990; Luger e Schwarz, 1990; Barker *et al.*, 1991).

### **1.1.2 Células dendríticas, seu desempenho na inflamação, na autoimunidade e os macrófagos**

As populações de células dendríticas da pele, em geral, têm localização anatômica preferencial na epiderme ou derme. As células de Langerhans são as principais células dendríticas da epiderme enquanto as células dendríticas dérmicas (dendrócitos dérmicos) são localizadas imediatamente abaixo da junção dérmico-epidérmica e dispersas ao longo do compartimento dérmico. Além dessa distribuição preferencial das células dendríticas, diferentes subpopulações são encontradas na pele e possuem características funcionais diferenciadas (Nestle *et al.*, 2009). Dentre essas subpopulações observam-se as células dendríticas plasmocitoides envolvidas na liberação de interferons do tipo I (IFN 1), além das células dendríticas CD103+ e células dendríticas langerinas positivas (CD207+) encontradas na derme, e que representam uma subpopulação distinta das células de Langerhans da epiderme (Bursch

*et al.*, 2007; Ginhoux *et al.*, 2007; Poulin *et al.*, 2007; Nagao *et al.*, 2009; Nestle *et al.*, 2009).

As células de Langerhans são caracterizadas pela presença de um tipo especial de organela intracitoplasmática designada de grânulo de Birbeck e podem se distinguir das outras células dendríticas em humanos pela expressão do CD1a e langerina (Romani *et al.*, 2006). Essas células têm uma importância estratégica, pois são as primeiras células dendríticas que entram em contato com antígenos microbianos externos em virtude de sua localização na epiderme, e estariam envolvidas, segundo diversos estudos, no processamento de antígenos lipídicos e fragmentos microbianos para posterior apresentação aos linfócitos T efetores (Hunger *et al.*, 2004; Igyártó e Kaplan, 2013). Embora alguns trabalhos tivessem demonstrado que as células de Langerhans são capazes de promover a apresentação cruzada de antígenos e conseqüentemente ativando células T CD8+ *naive*, dados sugerem que as células dendríticas langerinas+ são as que estão primordialmente envolvidas nesse processo de apresentação cruzada (Stoitzner *et al.*, 2006; Waithman *et al.*, 2007; Bedoui *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2015). Além disso, diversas investigações foram conduzidas no sentido de elucidar o papel das células de Langerhans no processo de hipersensibilidade por contato tendo em vista sua localização na pele (Schuler *et al.*, 1985). Experimentos com aplicação de esteroides demonstraram que a diminuição dessa população pode aumentar a ocorrência de reações de hipersensibilidade por contato, o que levou alguns pesquisadores a construir a hipótese de que as células dendríticas atuam como inibidoras de processos



de hipersensibilidade por contato (Grabbe *et al.*, 1995). Além disso, trabalhos experimentais têm demonstrado que alguns tipos de respostas imunes mediadas por células são independentes das células de Langerhans, fenômeno este que pode induzir um ambiente inflamatório mais brando e conseqüentemente respostas tolerogênicas (Kaplan *et al.*, 2008).

Um subtipo de célula dendrítica caracterizada pela expressão de CD206 (receptor de manose de macrófagos) pode ser observado na epiderme inflamada de pacientes com diversas doenças inflamatórias da pele e é conhecida como célula dendrítica inflamatória (Wollenberg *et al.*, 2002). Essas células expressam um receptor do tipo *Fc* que possui alta afinidade pela IgE, estando envolvidas em processos inflamatórios alérgeno-específicos (Bieber, 2007). Embora essas células tenham sido descritas na epiderme, necessariamente estão envolvidas em processos inflamatórios tanto na epiderme quanto na derme (Guttman-Yassky *et al.*, 2007). Finalmente, investigações mais recentes têm implicado as células de Langerhans em fenômenos imunológicos de tolerância, necessitando, entretanto de mais investigações para a confirmação do envolvimento dessas subpopulações de células dendríticas nesse processo.

As células dendríticas dérmicas migram para os linfonodos a fim de iniciar o processo de resposta imunológica (Kissenpfennig *et al.*, 2005). Alguns dados recentes têm demonstrado que as células dendríticas dérmicas e não as células de Langerhans migram nesse processo (Fukunaga *et al.*, 2008). Além disso, com a descoberta das células dendríticas langerina+, achados referentes ao papel das células de Langerhans no controle da

homeostase e em situações patológicas tiveram que ser reanalisados (Merad *et al.*, 2008). Em humanos, diversos trabalhos têm procurado identificar a presença de moléculas de superfície celular que possam ser usadas para a identificação das diferentes subpopulações de células dendríticas residentes na derme em condições normais (Allan *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2003; Nestle *et al.*, 2009; Haniffa *et al.*, 2015). As células dendríticas dérmicas podem ser encontradas sob sua forma imatura e com citoplasma que expressam receptores de reconhecimento de padrão como TLR2, TLR4, CD206 e DS-SIGN (também conhecido como CD209). As células dendríticas mais maduras expressam altos níveis de moléculas co-estimulatórias, tais como o CD83, e baixos níveis de receptores de reconhecimento de padrão (Boyman *et al.*, 2005; Angel *et al.*, 2007). As células dendríticas ativadas participam da resposta inflamatória através da liberação de citocinas tais como TNF- $\alpha$  e iNOS, e quimiocinas, promovendo o desenvolvimento de um perfil citocínico específico que por sua vez pode contribuir para a erradicação de um agente infeccioso específico ou promover o aparecimento de doenças caracterizadas pela persistência de resposta inflamatória (Serbina *et al.*, 2003; Lowes *et al.*, 2005; Bedoui e Greyer, 2014; Baliwag *et al.*, 2015; Iwasaki *et al.*, 2015).

As células dendríticas plasmocitóides são observadas raramente na pele sã, porém são implicadas na patogênese de doenças inflamatórias da pele tais como a psoríase (Blanco *et al.*, 2001; Nestle *et al.*, 2009; Baliwag *et al.*, 2015). Nesta doença específica, tem sido observado que a ativação das células dendríticas plasmocitoides leva a ativação da resposta imune. A ligação da catelicidina LL37 ligadas a fragmentos de DNA próprio liberados

por células lesadas na pele leva a uma ativação da TLR9 nas células dendríticas plasmocitoides, resultando na produção de IFN $\alpha$  e consequentemente a ativação de uma resposta imune adaptativa, o que, em última instância, demonstraria que altos níveis de catelicidinas podem induzir a uma quebra da autotolerância ao DNA próprio e assim propiciar o surgimento de autoimunidade (Blanco *et al.*, 2001; Boyman *et al.*, 2007; Lande *et al.*, 2007; Nestle *et al.*, 2009).

Finalmente, as células dendríticas fator XIIIa positivas (FXIIIa+) são expressas por dendrócitos específicos derivados de linhagem de monócitos/macrófagos ou de células mesenquimais. São localizadas preferencialmente ao redor de vasos na derme adventicial, na junção dermo-epidérmica, ou ao redor dos anexos cutâneos, mas nunca dentro da epiderme. Aumento do número de dendrócitos dérmicos FXIIIa+ são observados em condições inflamatórias e fibróticas. Em condições neoplásicas, os dendrócitos dérmicos podem estar envolvidos na resposta a tumores como melanoma ou carcinoma de células basais (Hoyo *et al.*, 1993; Silverman e Tamsen, 1998; Quatresooz *et al.*, 2008).

Os macrófagos da pele são células sésseis que podem migrar para os linfonodos em condições inflamatórias. Trabalhos mais recentes têm demonstrado que, tal como as células dendríticas, os macrófagos também podem apresentar um fenótipo diferenciado na pele normal, e que pode ser identificado pela expressão de CD163. Diversos trabalhos identificaram na pele duas populações diferentes de macrófagos, a população de macrófagos M1, que expressam caracteristicamente o HLA-DR, e os macrófagos M2

caracterizados pela expressão de CD163 e arginase (van Furth *et al.*, 1985). Os macrófagos ingerem microrganismos pelo processo de fagocitose, que é um processo de englobamento de partículas grandes dependente de energia. A destruição microbiana nos macrófagos ocorre nas vesículas formadas na fagocitose, envolvendo necessariamente enzimas e espécies reativas do oxigênio (ROS). Os macrófagos possuem receptores de alta afinidade que se ligam especialmente a moléculas de anticorpos, proteínas do complemento e lectina, que são receptores essenciais para a fagocitose de muitos micróbios diferentes (Brown *et al.*, 2014; Chaudhuri, 2014; Tam e Aderem, 2014; Wang *et al.*, 2014).

Finalmente, vale ressaltar que os macrófagos e células dendríticas da pele apresentam uma heterogeneidade fenotípica marcada que demonstra sua diversidade, atuando de forma diferente nos diversos tipos e fases da resposta imune.

As células NK são linfócitos que não expressam receptores de células T e podem participar tanto da imunidade inata quanto da imunidade adaptativa, via citotoxicidade dependente de anticorpo, ou via produção de citocinas como IFN- $\gamma$ , quando estas são estimuladas por IL-2, além de produzirem granzima, perforina e granulicina, atuando na destruição direta de microrganismos e células neoplásicas, além de ter um papel chave na patogênese de doenças de pele de base inflamatória (Dunphy e Gardiner, 2011; Tobin *et al.*, 2011; Tončić *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2014; Sharma e Das, 2014).

São detectadas essencialmente pela expressão de CD16 (fagocitose e citotoxicidade celular dependente de anticorpos), CD56 (NCAM-molécula de

adesão de células neurais) e CD57. Esses linfócitos também secretam TNF- $\alpha$ , fator estimulante do crescimento de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CFS) e IL-3. Estas células promovem a ativação de macrófagos e, com isso, leva a destruição de microrganismos fagocitados (Sharma e Das, 2014).

### 1.1.3 Linfócitos T

Na pele normal, a população de linfócitos locais é cerca do dobro dos do número de células T no sangue (Clark *et al.*, 2006). Embora a presença das células T na pele tenha sido descrita há cerca de 70 anos (Andrew e Andrew, 1949), somente nos últimos 25 anos foi que o estudo dessa população de linfócitos ganhou atenção por parte dos cientistas. A pele possui uma população de linfócitos que é fenotipicamente heterogênea, a maioria sendo constituída por linfócitos T CD8+  $\alpha\beta$  de memória (Bos *et al.*, 1987; Foster *et al.*, 1990). Na epiderme, as células T são distribuídas nas camadas suprabasais e basal, próximo às células de Langerhans (Foster *et al.*, 1990). Na derme, as células T estão distribuídas em grupamentos ao redor dos capilares ou frequentemente na junção dermo-epidérmica e ao redor dos anexos cutâneos. Os linfócitos T CD4+ e CD8+ estão presentes na pele em proporções parecidas, sendo a maioria células T de memória (Bos e Kapsenberg, 1993).

Os três principais tipos de células T *helper* CD4+ na pele são as células TH1, TH2 e TH17, estas têm sido encontradas na pele na vigência de várias doenças infecciosas e inflamatórias (Nestle *et al.*, 2009). Nas infecções por microrganismos intracelulares, as células TH1 liberam predominantemente

IFN $\gamma$  e linfotoxinas, levando a ativação dos macrófagos, possibilitando-os a exercer sua atividade bactericida (Kutlu *et al.*, 2007). Classicamente na pele as células de perfil TH1 estão associadas à resolução de infecções e à patogênica de doenças autoimunes ou imunomediadas como a psoríase (Lowe *et al.*, 2014) e as células de perfil TH2 participam da resposta inflamatória a agentes infecciosos nos pacientes imunocomprometidos e são referidas no contexto das doenças alérgicas como a dermatite atópica (Di Cesare *et al.*, 2009). Mais recentemente, entretanto, têm se observado que células de perfil TH17 estão envolvidas na patogênese tanto da psoríase quanto da dermatite atópica, bem como são essenciais na primeira linha de defesa do organismo contra a infecção por alguns fungos e bactérias (Weaver *et al.*, 2007; Di Cesare *et al.*, 2009). Alguns estudos têm apontado para um papel importante da IL-17 e IL-22 no aumento da produção de peptídeos antimicrobianos pelos ceratinócitos (Liang *et al.*, 2006). Desta forma, os linfócitos de perfil TH17 podem constituir numa ponte de ligação entre as células imunes e as células epiteliais, otimizando a resposta imune do hospedeiro frente aos patógenos com predileção pela pele (Akagawa, 2012; McDonald, 2012).

Outro subgrupo de células T que expressam IL-22, mas não IL-17 ou IFN- $\gamma$ , chamado de perfil TH22, tem sido também recentemente identificado. Células dendríticas plasmocitoides são capazes de induzir o perfil TH22 através da liberação de TNF- $\alpha$  e IL-6. Essas células foram identificadas em cultura de pacientes com dermatite atópica e diversos outros trabalhos têm

investigado o papel deste perfil na pele em condições normais e patológicas (Nogralles, 2009).

Linfócitos T  $\gamma\delta$  constituem as assim chamadas células imunes não convencionais. Na pele humana, os linfócitos T  $\gamma\delta$  constituem uma pequena percentagem das células T tanto na derme, quanto na epiderme, perfazendo cerca de 2% a 9% e 1% a 10%, respectivamente. Ainda pouco se sabe acerca do seu papel na pele humana, entretanto tem sido observado um aumento na população dessas células na pele em pacientes com melanoma, histiocitose de células de Langerhans, leishmaniose, hanseníase, dentre outras, o que sugere seu envolvimento na patogênese de diversas doenças da pele (Hayday e Tigelaar, 2003; Bekiaris *et al.*, 2014).

#### **1.1.4 Outros componentes celulares da pele**

Outras células também fazem parte dessa complexa organização da pele, e mesmo que não atuem como primeira linha de defesa do hospedeiro, estes cooperam com o sistema imune no processo de resposta imunológica (Yang, 2010; Jönsson *et al.*, 2011; O'Reilly, 2014). Os fibroblastos têm como função primordial a produção de proteínas estruturais que compõem o tecido cutâneo e também cooperam com a resposta imune, permitindo a migração de células do sangue para os locais de lesão, provendo a interação com outras células locais e assim potencializando a cascata de resposta do hospedeiro frente aos agentes infecciosos (Yang, 2010; Jönsson *et al.*, 2011). Vários trabalhos têm discutido a importância da matriz extracelular da pele na patogênese de doenças infecciosas, caracterizando assim a importância

desses componentes teciduais na evolução das infecções. Além disso, semelhantemente aos ceratinócitos, os fibroblastos também são capazes de produzir algumas citocinas (Yang, 2010; Jönsson *et al.*, 2011).

As células endoteliais têm um papel fundamental no controle do fluxo de células do sangue para o tecido através da expressão de diversas moléculas de adesão, citocinas e quimiocinas, que em última instância servem como quimioatraentes para migração dos leucócitos (Koczy-Baron e Kasperska-Zajac, 2014).

Ainda como componentes estruturais da pele, os anexos cutâneos têm importância fundamental na manutenção da homeostase fisiológica da pele. Os pelos são estruturas queratinizadas formadas a partir da invaginação da epiderme na derme. Os folículos pilosos em fase de crescimento apresentam uma dilatação terminal, o bulbo piloso, e, na sua porção central, uma papila dérmica, que induz o crescimento do pelo. As células que recobrem a papila formam a raiz do pelo, constituída por queratinócitos e melanócitos. À medida que os queratinócitos da raiz do pelo se diferenciam, eles vão sofrendo queratinização e incorporando melanina. As glândulas sebáceas se originam da mesma bainha epitelial que forma o folículo piloso. O produto de secreção dessas glândulas constitui-se como uma mistura de colesterol e triglicerídeos. As glândulas sudoríparas écrinas são glândulas túbulo-enoveladas, cujas células eliminam somente o produto de secreção, sem comprometimento das células. O suor por elas produzido é eliminado diretamente para a superfície da pele, por meio de um duto excretor, e é composto por uma solução aquosa contendo íons, ( $\text{Na}^{++}$ ,  $\text{K}^{+}$ ,  $\text{Cl}^{-}$ ), ureia, amônia, ácido úrico e pouquíssima proteína. As glândulas



sudoríparas apócrinas são encontradas nas regiões axilares, pubiana e perianal do corpo humano. Parte do citoplasma dessas células é perdida durante o processo de secreção. Além disso, as glândulas sudoríparas apócrinas produzem uma secreção viscosa que é descarregada para o canal dos folículos pilosos, em vez de diretamente para a superfície da pele (Loewenthal, 1963).

Finalmente, os neurônios, que primariamente atuam no processo somestésico da pele, quando interagindo com os linfócitos, podem contribuir para a regulação da resposta imunológica local (Rosas-Ballina *et al.*, 2011).

## **1.2 Doença de Jorge Lobo**

### **1.2.1 Aspectos gerais**

A doença de Jorge Lobo (DJL) é uma micose profunda causada pelo fungo *Lacazia loboi*. A infecção é crônica, de longa evolução e caracterizada por lesões nodulares, queloidianas ou verrucosas podendo estar isoladas ou disseminadas (Sampaio e Rivitti, 2007).

O primeiro registro da DJL ocorreu em 1931, na cidade de Recife a partir de observações do professor de dermatologia Jorge de Oliveira Lobo, que acreditou estar diante de uma nova enfermidade. Ainda que o agente apresentasse semelhança microscópica com *P. brasiliensis*, denominou a nova doença de blastomicose queloidiana. O paciente do sexo masculino de 52 anos, vivia como seringueiro na região Amazônica e apresentava lesões nodulares, salientes, confluentes e duras, localizadas na região lombossacral (Lobo, 1931) (Figura 1).



**Figura 1 - Registro fotográfico do paciente relatado por Jorge Lobo em 1931 [Fonte: Lobo, 1931]**

Ao longo dos anos, outros casos foram descritos como blastomicose de Jorge Lobo, blastomicose pseudolepromatosa amazônica, granulomatose blastomicoide, lepra dos Caiabi, miraip ou piraip (o que arde, em Tupi), falsa lepra, blastomicose amazônica, lobomicose ou lacaziose (Baruzzi *et al.*, 1979; Brito e Quaresma, 2007). A real prevalência da DJL é desconhecida devido à falta de registros unificados. São estimados 907 casos mundiais dos quais 496 (55%) seriam do provenientes do estado do Acre. (Papadavid *et al.*, 2012; Gonçalves *et al.* 2022).

### **1.2.2 Etiologia**

Na descrição original de Jorge Lobo, foram isolados corpúsculos parasitários semelhantes ao *Paracoccidioides brasiliensis*. O agente recebeu diversas denominações ao longo dos anos, a saber, *Glenosporella lobo*

(Fonseca Filho e Area Leão, 1940; Fonseca Filho, 1943), *Blastomyces brasiliensis* (Lacaz *et al.*, 1986; Lacaz *et al.*, 2002). *Blastomyces lobo* (Lacaz *et al.*, 1986; Lacaz *et al.*, 2002), *Loboa lobo* (Azevedo *et al.*, 1956), *Paracoccidioides lobo* (Almeida e Lacaz, 1948a, 1948b), e *Lobomyces lobo* (Borelli, 1958, 1968). Em 1999 o fungo foi colocado no gênero *Lacazia* e criada a espécie *Lacazia lobo* (Taborda *et al.*, 1999). Em 2001, estudos de análise filogenética do DNA fúngico usando a pequena subunidade de DNA ribossomal 18S (SSU sDNA) e o gene da quitina sintetase-2 (CHS-2), colocaram a *Lacazia lobo* como irmão taxonômico do *Paracoccidioides brasiliensis* pertencendo à ordem dimórfica *Onygenales* e família *Ajellomycetaceae* (Herr *et al.*, 2001) (Figura 2). Estudos de microscopia eletrônica evidenciaram similaridades estruturais, com diferenças no ciclo reprodutivo, validando a classificação da *L. lobo* como uma espécie distinta (Furtado *et al.*, 2007).

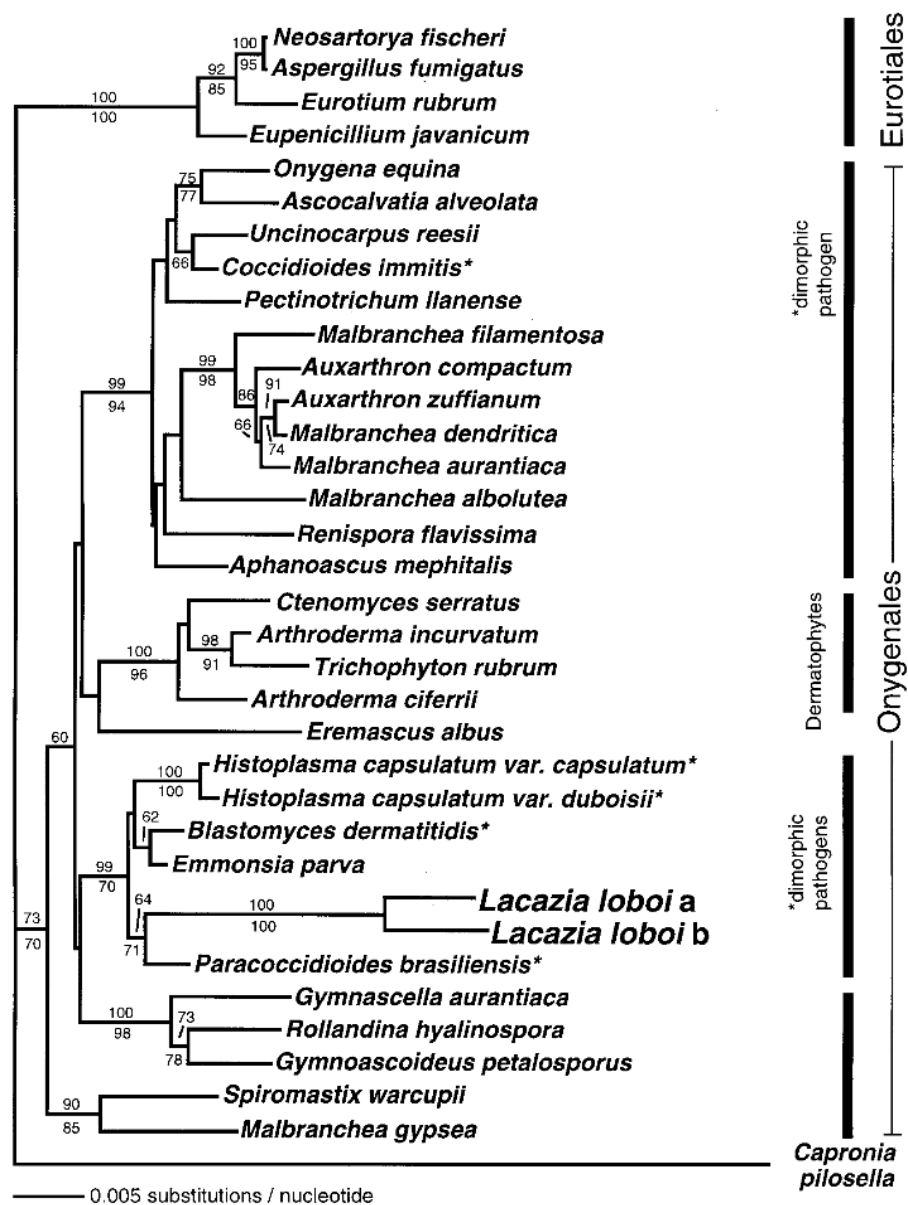
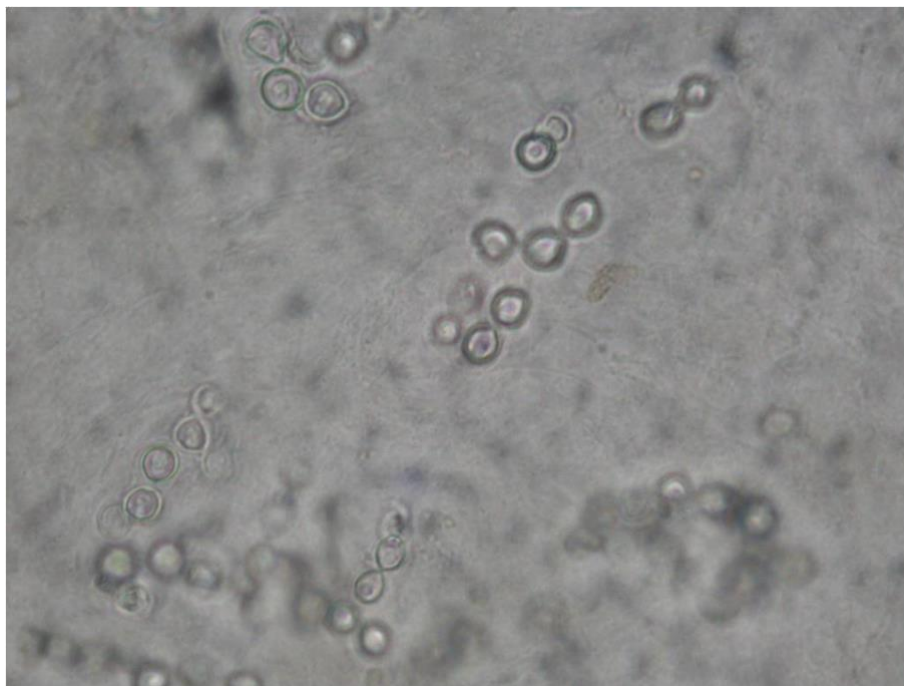


Figura 2 - Análise filogenética do *Lacazia loboi* [Fonte: Herr et al., 2001]

O fungo apresenta-se na microscopia como corpúsculos globosos ou elípticos, medindo de 6  $\mu\text{m}$  a 12  $\mu\text{m}$ , com membrana refringente de duplo contorno e citoplasma homogêneo ou granuloso (Sampaio e Rivitti, 2007) (Figura 3). Pode ser identificado no exame histopatológico nas colorações do ácido periódico de Schiff (PAS) e prata-metenamina (Grocott-Gomori) (Brito e Quaresma, 2007) (Figura 4). O fungo se reproduz por brotamento, formando

grupamentos ramificados com três a seis células de tamanhos semelhantes e aspecto em rosário ou catenulado (Lacaz *et al.*, 1986; Papadavid *et al.*, 2012). Apesar de se encontrar em abundante quantidade de fungos nos tecidos acometidos, até o momento ainda não se conseguiu cultivar o parasito em nenhum meio, o que dificulta o estudo do seu mecanismo patológico. Belone *et al.* (2002) conseguiram com sucesso a reprodução experimental da lobomicose em ratos BALB/c através de inoculação intradérmica da *Lacazia loboi* extraída de ratos previamente infectados com material obtido de lesões humanas.



**Figura 3 - *Lacazia loboi* ao exame direto [imagem cedida pela Dra. Francisca Regina Oliveira Carneiro]**

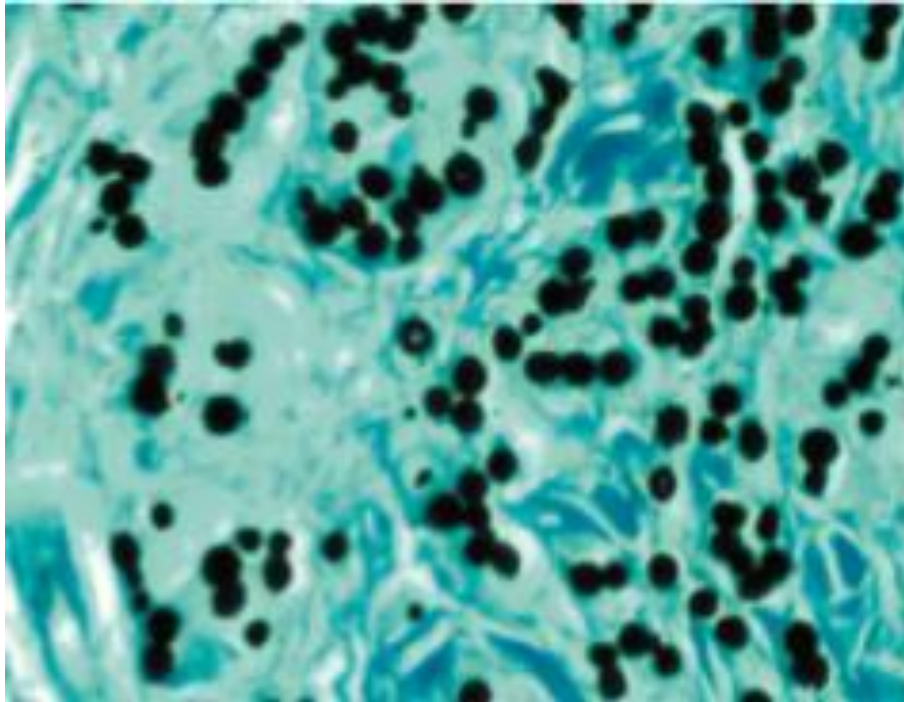


Figura 4 - *Lacazia loboi* isolado e em cadeias (Grocott 400x) [Fonte: Brito e Quaresma, 2007]

### 1.2.3 Epidemiologia

A doença acomete principalmente homens entre 20 e 40 anos na proporção de 10 para cada mulher, que tenham como ocupação o cultivo da terra e trabalhadores com atividades na floresta, como seringueiros, garimpeiros, mineiros e caçadores (Brito e Quaresma, 2007).

A distribuição da doença é praticamente exclusiva da zona intertropical. Borelli (1969) considerou a Amazônia brasileira e regiões vizinhas como favoráveis à micose, por apresentarem floresta tropical com clima quente e úmido, bacia hidrográfica e chuvas abundantes. Aparentemente não há transmissão entre seres humanos e acredita-se que o contágio seja realizado por inoculação direta do parasito por trauma local, ou pela presença de alguma fonte de contaminação no ambiente. Este fato é corroborado pela

observação de numerosos casos entre os índios Caiubi no estado do Mato Grosso que, após terem sido realocados para o Parque Nacional do Xingu, nenhum novo caso foi observado na tribo. O que sugere não haver fonte de contaminação no Parque Nacional do Xingu e, que além dos fatores ambientais, possivelmente exista uma predisposição genética para a DJL nos índios Caiubi (Baruzzi *et al.*, 1967, 1973, 1979; Dias *et al.*, 1970; Opromolla *et al.*, 1999; Woods *et al.*, 2010). Embora em quantidade muito menor do que na América Latina, existem relatos de casos em humanos na África (Al-Daraji *et al.*, 2008), Europa (Symmers, 1983; Papadavid *et al.*, 2012) e Estados Unidos (Burns *et al.*, 2000).

#### **1.2.4 Patogenia**

A patogenia da DJL permanece sem ser completamente compreendida. Isto se deve principalmente ao insucesso no cultivo do fungo, o que dificulta seu estudo em laboratório. Acredita-se que o *L. loboi* se mantenha viável em vegetais, solo e água, sendo a inoculação traumática na pele a provável via de contágio do ser humano (Brito e Quaresma, 2007). Este fato seria corroborado por estudo observacional feito no estado do Acre, onde foi visto uma predominância de lesões no lado esquerdo de seringueiros, lado mais exposto a traumas por afastar a vegetação nativa enquanto que a mão direita, que empunha o facão, entre menos em contato direto com a mata (Woods *et al.*, 2010). Não se sabe com precisão a duração do período de incubação da doença, havendo relatos que variam desde 3 meses (Symmers, 1983) a 7 anos (Burns *et al.*, 2000). Entretanto, existem evidências clínicas e

laboratoriais que apontam ocorrer entre 1 e 2 anos (Leite, 1954; Azulay *et al.*, 1968; Baruzzi *et al.*, 1979).

Durante muitos anos, acreditou-se que a DJL fosse uma doença exclusiva de seres humanos, entretanto, existem relatos na literatura do acometimento de animais. O primeiro caso humano autóctone europeu foi descrito no ano de 1983, em um funcionário de um aquário francês que teve um contato ocupacional com um golfinho da espécie *Tursiops truncatus*, capturado na Golfo da Biscaia ao norte da Espanha e oeste da França. O golfinho apresentava granulomas na pele onde foram isolados fungos indistinguíveis da *Lacazia loboi* (Symmers, 1983). Outros casos também foram descritos em golfinhos nos Estados Unidos (Migaki *et al.*, 1971; Cowan, 1993). Norton (2006), de uma maneira divertida, descreve sua experiência após uma biópsia por *shaving* de um golfinho no Havaí na qual sua lâmina cortou seu dedo logo após ter cortado a lesão do golfinho. Quatro meses após o acidente, apresentou uma lesão no local da incisão diagnosticada como granuloma anular, resolvendo com uso de corticoides. No sudeste do Brasil foram observados casos de DJL em golfinhos (Woods *et al.*, 2010). O achado da doença em golfinhos sugere que o fungo esteja presente na água doce e salgada.

Em 2018, Vilela e Mendoza através de estudos de sequenciamento de DNA, diferenciam a *L. loboi* do fungo causador dos granulomas nos cetáceos, colocando-o em um grupo próximo ao *P. brasiliensis*, sendo denominado *Paracoccidioidis brasiliensis var. ceti*.



### 1.2.5 Quadro clínico

Ao exame dermatológico podem ser observadas máculas hiper ou hipocrômicas, pápulas, nódulos, gomas, placas nodulares, cicatrizes, úlceras e predomínio de lesões com aspecto queloidiano (Machado, 1972) (Figura 5 e 6). Podem ser observados pontos negros na superfície das lesões que correspondem à eliminação transepitelial do fungo (Fuchs *et al.*, 1990) (Figura 7). As lesões são localizadas preferencialmente nos membros e pavilhão auricular, com distribuição assimétrica e geralmente restrita à uma região corporal, com menor frequência são generalizadas (Talhari *et al.*, 2006) (Figura 8). Não há registro na literatura de lesão no couro cabeludo (Pradinaud, 1984) nem nas mucosas, mesmo quando ocorre acometimento perioral (Loureiro *et al.*, 1971).



Figura 5 - Lesões de aspecto queloidiano [imagem do acervo do Serviço de Dermatologia da UEPA Prof. Miguel Saraty de Oliveira]



**Figura 6 - Placas infiltradas recidivadas sobre cicatriz de exérese cirúrgica prévia [imagem do acervo do Serviço de Dermatologia da UEPA Prof. Miguel Saraty de Oliveira]**



**Figura 7 - Pontos enegrecidos sobre placa de aspecto queloidiforme na coxa, correspondendo à eliminação transepitelial do fungo [imagem do acervo do Serviço de Dermatologia da UEPA Prof. Miguel Saraty de Oliveira]**



**Figura 8 - Nódulos de aspecto queloidiano na orelha [imagem do acervo do Serviço de Dermatologia da UEPA Prof. Miguel Saraty de Oliveira]**

O aspecto polimórfico é um achado muito comum, principalmente nos casos de longa evolução e está relacionado ao padrão de resposta imunológica do doente. Na literatura encontrou-se a proposta de considerar a DJL como uma doença espectral, classificando-a em dois grupos polares: hiperérgico com predomínio de máculas, pápulas e gomas; e hipoérgico, apresentando lesões nodulares, verrucosas e queloidiformes (Oliveira Carneiro *et al.*, 2015). Outras formas de classificação também foram propostas de acordo com a sua distribuição. Lacaz *et al.* (1986) e Baruzzi *et al.* (1991) propuseram a classificação como formas isoladas ou localizadas e, formas disseminadas. Opromolla *et al.* (1999) sugeriram classificar em isoladas, disseminadas e multifocais no mesmo membro.

A evolução da doença é crônica podendo haver ulceração com infecção bacteriana secundária. O estado geral do paciente é bom, com eventuais queixas de prurido e dor à palpação. O acometimento de órgãos internos é raro, mas existem relatos de detecção do fungo em linfonodos e testículos (Rodríguez-Toro, 1993; Pradinaud, 1998; Opromolla *et al.*, 1999).

O diagnóstico é realizado pelo isolamento do fungo nas lesões através de exame micológico direto ou histopatológico, revelando abundância do fungo muitas vezes formando cadeias ou contas de rosário, sendo melhor visualizados pela coloração do PAS ou Grocott (Brito e Quaresma, 2007). O histopatológico revela epiderme atrófica, hiperplásica ou ulcerada. Hiperplasia irregular ou pseudo epiteliomatosa é frequente nas lesões verrucosas ou nas bordas de úlceras. O fungo pode ser evidenciado nas escamas ou crostas no estrato córneo, pela eliminação transepidérmica do fungo, muitas vezes evidenciada pelo aspecto macroscópico de pontos. Na derme é observado infiltrado inflamatório granulomatoso, nodular e difuso com macrófagos e células multinucleadas de Langerhans e corpo estranho. Histiócitos de aspecto espumoso apresentam grande quantidade de fungos no interior. Necrose é quase sempre inexistente e os neutrófilos, quando presentes, encontram-se na derme superior. A epiderme é separada do infiltrado inflamatório por uma faixa clara, a zona de Grenz (Brito e Quaresma, 2007; Ramos-e-Silva *et al.*, 2009).

### 1.2.6 Imunologia

A DJL apresenta formas clínicas que podem variar desde uma apresentação mais localizada da doença até quadros disseminados. Este espectro polar sugere haver diferentes perfis de resposta imunológica individuais ao fungo (Opromolla *et al.*, 1999). Oliveira Carneiro *et al.* (2015) sugeriram que, à semelhança da hanseníase, as formas de resposta na DJL poderiam ser agrupadas em dois polos: uma forma nodular com predominância da resposta Th1, semelhante à hanseníase tuberculoide; outra forma onde predomina a resposta Th2 caracterizada por lesões infiltrativas, análoga ao polo virchowiano; e formas intermediárias entre esses dois polos (Modlin *et al.*, 1983). O perfil celular e imuno-histoquímico do polo nodular Th1 exibiria uma predominância de linfócitos T CD4+, CD8+ e CD45+, células de Langerhans (CD1a+), dendrócitos (FXIIIa+) e S100+, bem como a presença de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  com baixa expressão de IL-10 e TGF- $\beta$ . O infiltrado celular no polo infiltrativo Th2 exibiria predominância de células CD45+, Langerhans (CD1a+) e IL-10 com menor expressão de TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  (Oliveira Carneiro *et al.*, 2015). No entanto, este entendimento carece de mais artigos na literatura que possam dar suporte a esta teoria.

Outras células presentes no infiltrado inflamatório das lesões dos pacientes com DJL apontam para mecanismos de resposta não efetivos contra o fungo. Dentre elas há células Th17, que produzem IL-17, quando as respostas Th1 e Th2 não são efetivas (Kanashiro-Galo *et al.*, 2016). Por outro lado, a ausência de células dendríticas plasmocitóides (CD123 e BDCA-2) que funcionam como células apresentadoras de antígenos, possivelmente está

relacionada à imunodeficiência do hospedeiro ao fungo (Pagliari *et al.*, 2014). Em estudo realizado por Marcos *et al.* (2005) com 21 pacientes portadores de DJL, nenhuma associação foi encontrada entre a DJL e os antígenos HLA, sendo sugerido um possível aspecto protetor do antígeno HLA-DR7.

### **1.2.7 Tratamento**

O tratamento padrão ouro é a excisão completa da lesão na sua fase inicial, principalmente quando isoladas, sendo as recidivas atribuídas a ressecção incompleta (Lacaz *et al.*, 1986, 2002; Baruzzi *et al.*, 1991; Pradinaud, 1984, 1998). A criocirurgia é outra alternativa terapêutica tradicionalmente muito usada com resultados variados (Cáceres e Rodríguez-Toro, 1991; Rodríguez-Toro, 1993). O tratamento medicamentoso é lento e apresenta resultados pouco satisfatórios. Os melhores resultados foram obtidos com clofazimina isolada ou associada ao itraconazol (Silva, 1978; Lacaz *et al.*, 1986; Baruzzi *et al.*, 1991; Woods *et al.*, 2010).

### **1.3 Matriz Extracelular**

Os tecidos humanos não são constituídos exclusivamente por células, mas também por um complexo arranjo de componentes não celulares que formam a matriz extracelular (MEC). Estes elementos além de formar um arcabouço no qual as células se alojam, também regulam diversos processos celulares incluindo crescimento, migração, diferenciação e apoptose (Frantz *et al.*, 2010).



A matriz extracelular apresenta proporções variadas de proteínas e polissacarídeos, organizados em rede, sendo responsáveis pela diversidade morfológica e funcional dos tecidos, fornecendo substrato adequado para o crescimento e diferenciação dos vários tipos celulares (Fingleton, 2007). O matrissoma (conjunto de proteínas que contribuem com a matriz extracelular) é composto por aproximadamente 300 proteínas, dentre elas vários tipos de macromoléculas (proteoglicanas e glicosaminoglicanas), além de proteínas fibrosas como colágeno e elastina, ambas com função estrutural, e as glicoproteínas adesivas como laminina, tenascina e fibronectina (Fingleton, 2007; Hynes e Naba, 2012). Pode ser dividida em dois tipos, a saber, matriz extracelular intersticial e pericelular.

### **1.3.1 Matriz extracelular intersticial**

A MEC intersticial preenche os espaços entre as células mesenquimais formando uma espécie de esqueleto composta de fibras de colágeno, que conferem estrutura para o tecido e formam “caminhos” por onde as células migram. As células interagem com esta rede através de seus receptores de superfície, entre os quais pode-se citar as integrinas. Essa interação entre a MEC e as células promove um constante remodelamento da estrutura e componentes da matriz extracelular através da degradação proteica mediada por enzimas como as metaloproteinases de matriz (MMP) (Yue, 2014). A ação proteolítica das MMPs é limitada pelos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPS) e outros inibidores. Uma quebra neste equilíbrio pode causar danos aos tecidos, como fibrose por exemplo, levando ao

surgimento de doenças (Lu *et al.*, 2011). Este remodelamento acontece normalmente, mas também é modulado por estímulos exógenos como citocinas, glicocorticoides, estresse oxidativo, pressão e estiramento mecânico (Yue, 2014).

As propriedades físicas da matriz extracelular conferem rigidez, densidade, insolubilidade, porosidade e arranjo espacial aos tecidos, formando caminhos pelos quais as células migram. A interação das células com a matriz se dá através de seus receptores de superfície e suas características podem influenciar o comportamento celular. Por exemplo, a maior ou menor rigidez da matriz pode favorecer um caminho específico na diferenciação de células tronco mesenquimais (Yue, 2014).

A MEC possui a capacidade de armazenar citocinas e fatores de crescimento, funcionando como um reservatório de fragmentos bioativos. A liberação destes elementos é controlada tanto de maneira espacial, quanto temporal, regulando diversos processos fisiológicos e patológicos. Como exemplo, pode ser citado o TGF- $\beta$  que é armazenado na MEC em sua forma inativa, sendo ativado pela ação proteolítica das MMPs (Lu *et al.*, 2011).

As células possuem uma intensa relação de duas vias onde a matriz extracelular produz e secreta substâncias que remodelam a MEC que, por sua vez, ativa receptores influenciando o crescimento e atividade celular (Geiger e Yamada, 2011; Daley e Yamada, 2013).



### **1.3.2 Matriz extracelular pericelular**

As matrizes extracelulares pericelulares são aquelas que estão em contato muito próximo com as células, como por exemplo a membrana basal (Theocharis *et al.*, 2016). A membrana basal é composta principalmente por laminina e colágeno tipo IV que, em conjunto, formam uma intrincada estrutura para adesão celular e arquitetura tecidual respectivamente. A laminina se encontra no lado celular da membrana basal e fornece sítios de adesão celular, ancorando as células através dos hemidesmossomos. Os hemidesmossomos, por sua vez, são formados pela interação entre a laminina da MEC e os receptores da membrana celular, dos quais fazem parte as integrinas (Paulsson, 1992).

As integrinas, são proteínas transmembranas com um domínio extracelular que se prende a componentes da MEC e outro domínio citoplasmático acoplado a porção do citoesqueleto constituído por actina (Hodde e Johnson, 2007). Além das lamininas, as integrinas também se conectam com a fibronectina, uma glicoproteína abundante na maioria dos tecidos, regulando diversas funções como adesão, migração e diferenciação celular (Schwarzbauer e DeSimone, 2011).

#### 1.4 Metaloproteinases de matriz e seus Inibidores

A matriz extracelular sofre um constante processo de remodelamento através da degradação, depósito ou modificação das proteínas que a compõem (Yue, 2014). As proteinases são enzimas que quebram seletivamente proteínas em peptídeos ou aminoácidos, bem como regulam a atividade e as interações entre proteínas, criam novas moléculas bioativas e modulam a sinalização molecular (López-Otín e Bond, 2008). O degradoma humano é constituído por pelo menos 715 proteases, representando cerca de 2% do genoma humano, dividido em 5 classes: metaloproteinases, serino proteases, cisteíno proteases, proteases aspárticas e treonina proteases (Overall *et al.*, 2004). A maior destas classes é a das metaloproteinases de matriz.

As metaloproteinases constituem uma família de enzimas dependentes de zinco para desempenhar suas funções catalíticas e manter sua integridade estrutural, justificando o prefixo “metalo” (Sterchi, 2008). Desempenham um papel importante na remodelação da matriz em vários processos fisiológicos e patológicos como, por exemplo, na cicatrização, na reabsorção óssea, na involução mamária, e em outras funções fisiológicas relacionadas à gravidez e parto. Existem aproximadamente 23 tipos de metaloproteinases de matriz humanas formando a maior classe de proteinases. São classificadas em seis grupos de acordo com a estrutura e substrato específico: collagenases (MMP-1, -8 e -13), gelatinases (MMP-2, -9), estromelinas (MMP -3, -10, -11), matrilisinas (MMP -7, -26), MMPs ligadas à membrana plasmática (MT-1, -2, -3, -4, -5, -6 MMP) e outras MMPs (MMP -19, -21, -23A, -23B, -27, -28) (Theocharis *et al.*, 2016).

Em condições fisiológicas existe uma rigorosa regulação da secreção das MMPs, as quais são sintetizadas e secretadas como pró-enzimas, zimógenos, que posteriormente serão ativadas pela perda do seu domínio pro-peptídeo. Tocchi e Parks (2013) especulam que a proteólise mediada pelas MMPs esteja confinada a compartimentos celulares como vesículas de secreção ou a membrana celular, e não secretadas livremente, para que se possa atingir níveis adequados de enzimas e substrato. A regulação da atividade das MMPs ocorre somente em momentos específicos, onde há processos multifásicos de ativação dos zimógenos, além de existirem diversos inibidores sanguíneos e teciduais para limitar a ação da proteinase. Em doenças com inflamação crônica ou em neoplasias, um excesso ou alteração na expressão das MMPs pode levar a destruição tecidual, fibrose ou progressão tumoral.

A regulação das MMPs é feita pelas integrinas presentes na matriz, das quais seis podem interferir na expressão de MMPs, entre elas, fibronectina e vitronectina. As integrinas também podem influenciar sua secreção e ainda a ativação da protease latente na superfície celular (Larsen *et al.*, 2006).

A colagenase 1 (MMP-1) é codificada pelo gene 11q22-q23 e tem como substratos principalmente o colágeno nativo tipo III, mas também os colágenos tipo I, II, VII e X; gelatina, agrecan (proteoglicana 1 do sulfato de condroitina), proteínas ligadoras, entacina, tenascina e perlecan. Esta, atua modulando a ação das MCP-1, MCP-3 e MCP-4 (proteínas quimiotáticas de monócitos); inativa o SDF-1 (Fator 1 derivado de células estromais); cliva a Pro-IL-1 $\beta$  ativando a IL-1 $\beta$  e atua nesta inativando-a; IGF-BP-2 (proteína

ligadora de IGF) e IGF-BP-3 biodisponibilizando o IGF (fator de crescimento semelhante a insulina); atua no perlecan liberando FGF (fator de crescimento de fibroblastos); cliva a pro-TNF- $\alpha$  ativando o TNF- $\alpha$ ; quebra a porção precursora tornando ativas as pro-MMP-1, pro-MMP-2; inativa o inibidor da  $\alpha$ 1-proteinase,  $\alpha$ 2-macroglobulina e  $\alpha$ 1-antiquimotripsina (Overall, 2002). Vários alelos da MMP-1 são associados a uma maior incidência de doença cardiovascular, aterosclerose e estenose de carótida (Djuric e Zivkovic, 2017).

A gelatinase A (MMP-2) é codificada pelo gene 16q12.2 e degrada principalmente o colágeno desnaturado (gelatinas) e o colágeno tipo IV, embora também atue sobre os colágenos I, V, VII, X e XI, elastina, fibronectina, laminina 5, agrecan, brevican, neurocan, BM-40, decorina e vitronectina (Overall, 2002; Peng *et al.*, 2012). É distribuída amplamente e produzida por alguns tipos celulares em cultura e sabe-se que ela não é ativada por enzimas do plasma. A MT1-MMP (MMP-14) é a maior responsável pela ativação da MMP-2 na superfície celular em um complexo com o inibidor tecidual de MMP 2 (TIMP2) clivando o pro-domínio da proMMP-2 (Tocchi e Parks, 2013). Dentre suas diversas funções e substratos pode-se citar: inativar o SDF-1 (fator 1 derivado de células estromais); modular a MCP-3; clivar a pro-TGF- $\beta$ 1, pro-TNF- $\alpha$  e pro-IL-1 $\beta$  ativando a TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  respectivamente. Modular a biodisponibilidade do IGF (fator de crescimento semelhante a insulina) através da clivagem da IGFBP-3 e IGFBP-5 (proteínas ligadoras de IGF). Liberar o ectodomínio do FGF-R1 (receptor 1 de fator de crescimento de fibroblastos), regulando a atividade do FGF e potencialmente inibindo o crescimento tumoral (Cauwe *et al.*, 2007). Liberar ativamente TGF-

$\beta$  pela clivagem da decorina. Clivar a galectina-3, que se liga a IgE e à moléculas de superfície de diversas células podendo diminuir a quimiotaxia de macrófagos. Quebrar a porção precursora tornando ativas as pro-MMP-1, pro-MMP-2, pro-MMP-13 e, inativar o inibidor da  $\alpha$ 1-proteinase e  $\alpha$ 2 macroglobulina (Overall, 2002). Sua expressão nas células do tecido conectivo tem importante papel no sistema vascular, sendo também implicada nos processos de invasão celular, migração de células de músculo liso e instabilização da placa aterosclerótica (Djuric e Zivkovic, 2017).

A gelatinase B (MMP-9) degrada as gelatinas (colágeno desnaturado), os colágenos I, IV, V, VII, X e XI, elastina, fibronectina, laminina, agrecan e vitronectina (Overall, 2002; Peng *et al.*, 2012). Esta enzima é produzida por monócitos, macrófagos, linfócitos T, neutrófilos e células tumorais, bem como queratinócitos, fibroblastos, microglia, astrócitos e células endoteliais. Nos neutrófilos, a MMP-9 é armazenada em grânulos para liberação imediata após estímulo pela IL-8 ou TNF (Khokha *et al.*, 2013). Os neutrófilos não apresentam expressão de TIMP-1, o que é coerente com a função de primeira linha de resposta à infecção e dano tissular (Opdenakker *et al.*, 2001). Tem como substratos e ações: inativar o SDF; clivar a pro-IL-8, pro-TGF- $\beta$ 1, pro-TNF- $\alpha$  e pro-IL-1 $\beta$  ativando a IL-8, TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  respectivamente. Degradar a CTAP-III (peptídeo ativador do tecido conectivo), NAP-2 (proteína ativadora de neutrófilos), GRO $\alpha$  (oncogene regulador do crescimento), PF-4 (fator plaquetário). Atua de maneira semelhante no FGF-R, no receptor de superfície celular do IL-2R e plaminogênio, regulando a atividade do FGF, IL-2R $\alpha$  e angiostatina. Degrada a galectina-3; quebrando a porção precursora tornando

ativas as pro-MMP-1, pro-MMP-2, pro-MMP-13 e, inativa o inibidor da  $\alpha$ 1-proteinase e  $\alpha$ 2 macroglobulina (Overall, 2002). Uma análise dos genes das MMPs associados à doença coronariana e infarto do miocárdio revelou que variações nos genótipos da MMP-9 podem levar a um maior risco de infarto do miocárdio, hipertensão arterial, insuficiência cardíaca, acidentes vasculares cerebrais, esclerose múltipla, Doença de Parkinson e Alzheimer (Djuric e Zivkovic, 2017).

A estromelina-1 (MMP-3) está mapeada no cromossomo 11q23 e tem como substratos a agregan, laminina, fibronectina, regiões dos colágenos nativos II, III, IV, V, IX, X e XI, gelatina, entacina, perlecan, decorina, tenascina, vitronectina, fibrina e fibrinogênio, proteínas de ligação e elastina. Atua modulando a ação das MCP-1, MCP-2, MCP-3 e MCP-4. Inativa o SDF; cliva pro-HB-EGF (fator de crescimento semelhante a EGF de ligação à heparina), pro-IL-1 $\beta$  ativando a HB-EGF e IL-1 $\beta$ . Atua no perlecan e decorina liberando FGF e TGF $\beta$ . Biodisponibiliza IGF pela clivagem da IGF-BP-3. Cliva a pro-TNF- $\alpha$  ativando a TNF- $\alpha$ . Quebra a porção precursora tornando ativas as pro-MMP-1, pro-MMP-3, pro-MMP-7, pro-MMP-8, pro-MMP-9, pro-MMP-13 e, inativa o inibidor da  $\alpha$ 1-proteinase,  $\alpha$ 2- macroglobulina e  $\alpha$ 1-antiquimotripsina (Overall, 2002). As variantes no gene da MMP-3 mostraram associação com hipertensão, doença coronariana, estenose e aterosclerose de carótida e aneurisma de aorta abdominal (Djuric e Zivkovic, 2017).

O controle da ação das MMPs é feito por inibidores específicos, no plasma o inibidor geral de proteases é a  $\alpha$ 2 macroglobulina, enquanto que nos tecidos esta regulação é realizada pelas TIMPs (inibidores teciduais das

MMPs) (Baker *et al.*, 2002). O desequilíbrio entre MMP e TIMP pode resultar em várias patologias. Além disso, essa alteração na produção de MMPs e sua relação com a produção de citocinas inflamatórias como o TNF $\alpha$  é bastante claro em doenças inflamatórias do sistema nervoso, como, por exemplo, esclerose múltipla, meningite bacteriana, doença de Alzheimer, neuropatia vascular entre outras (Ricard-Blum e Faye, 2005). Existem quatro TIMPs que formam complexos na proporção de 1:1 com as MMPs: TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-4 estão presentes de maneira solúvel no ambiente extracelular, enquanto que a TIMP-3 é insolúvel permanecendo na matriz extracelular (Yu *et al.*, 2000). As TIMPs são produzidas de maneira constante por monócitos, linfócitos B e T não estimulados no sangue periférico. Os monócitos expressam maior quantidade de TIMP1, TIMP2 e TIMP4 que os linfócitos T ou B, estes últimos expressando TIMP3 em quantidade abundante (Bar-Or *et al.*, 2003). Todas as quatro TIMPs tem ação contra todas as MMPs, exceto a TIMP-1 que inibe pouco a MMP-19 e várias MMPs do tipo membrana (MT-MMPs) (Baker *et al.*, 2002).

Na esclerose múltipla, o aumento na atividade de MMPs por um aumento na produção ou diminuição da inibição, pode levar a degradação da mielina, além de facilitar a entrada, pela quebra da barreira hematoencefálica, de células inflamatórias e proteínas do plasma (anticorpos e proteínas do sistema complemento) no sistema nervoso central (SNC). Além disso, a expressão desordenada dessas enzimas parece estar relacionada à patogênese de diversas doenças cutâneas, particularmente doenças inflamatórias onde ocorre destruição tecidual e extravasamento de células. A remodelagem tecidual

seguida pelo aumento da nova síntese de colágeno e a diminuição da desagregação de colágeno no fígado é um evento frequente durante as infecções virais. O acúmulo excessivo de proteínas da matriz extracelular e a modificação na arquitetura do fígado são os principais fatores patológicos e histológicos de progressão de doenças hepáticas sendo, dessa forma, relatada a ação das MMPs nesses processos. Sabe-se que os vírus B e C são causas muito comuns de infecção hepática persistente e hepatite crônica. A maior mudança patológica durante a progressão de doenças hepáticas crônicas é a quantidade de proteínas da matriz extracelular, que é excessivamente acumulada no fígado cirrótico ou fibrótico. Portanto a regulação anormal da atividade das MMPs (MMP-9 e -2) é um fator responsável pela alteração patológica da MEC em doenças hepáticas virais. As MMPs também estão envolvidas na patogênese de doenças como a infecção por *M. tuberculosis* (Mtb), onde ocorre a indução da expressão de MMPs em células hospedeiras estimuladas pelo bacilo (Ali *et al.*, 2017). A fagocitose do Mtb por células monocíticas humanas dirige preferencialmente a expressão gênica e secreção de MMP-9 em comparação ao seu antagonista direto, o TIMP-1. De fato, a regulação da secreção de MMP pode ser crítica na defesa do hospedeiro contra o Mtb. Por outro lado, a participação das MMPs em outras infecções micobacterianas como a hanseníase ainda não são conhecidas totalmente. Na paracoccidiodomicose (PCM) a glicoproteína GP43 localizada na parede do fungo, isolada por Gesztes *et al.* (1986) e secretada na fase leveduriforme, parece ser o principal ou único agente proteolítico capaz de hidrolisar caseína, colágeno e elastina, relacionando-se à virulência do *Paracoccidioides*



*brasiliensis* por facilitar a sua penetração nos tecidos. Além disso, classicamente, tem-se caracterizado que infecções pelo *Lacazia loboi* na DJL, ocorrem com a evidente proliferação colágena que caracteriza as lesões paraqueloidianas na doença, fato este também observado na cromoblastomicose, porém pouco se tem investigado os mecanismos de degradação da matriz nessas lesões. Diante do exposto, uma das poucas preocupações dos pesquisadores tem sido elucidar os mecanismos que regulam a degradação local da MEC infectada por agentes infecciosos. Entre os candidatos a fator promotor da degradação local da MEC estão enzimas proteolíticas capazes de degradar diferentes tipos de matriz extracelular e sua inter-relação com fatores inibidores e de crescimento.

**Quadro 1 - Metaloproteinasas, seus substratos e alvos de ação e as doenças relacionadas a ação de cada tipo dessas enzimas**

	MMP	Substrato	Ação	Doenças
Colagenases	-1	<b>Principal:</b> III <b>Atua:</b> I, II, VII, X, gelatina, agrecan, proteínas ligadoras, entacina, tenascina, perlecan	<b>Ativa:</b> IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , MMP-1, MMP-2 <b>Inativa:</b> SDF-1, inibidor da $\alpha$ 1-proteinase, $\alpha$ 2-macroglobulina, $\alpha$ 1-antiquimotripsina <b>Modula:</b> MCP-1, -3, -4 <b>Biodisponibiliza:</b> IGF	Doença cardiovascular Aterosclerose Estenose de carótida
Gelatinases	-2	<b>Principal:</b> colágeno desnaturado e IV <b>Atua:</b> I, V, VII, X e XI, elastina, fibronectina, laminina 5, agrecan, brevican, neurocan, BM-40, decorina e vitronectina	<b>Ativa:</b> TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MMP-1, -2, -13 <b>Inativa:</b> inibidor da $\alpha$ 1-proteinase, $\alpha$ 2-macroglobulina <b>Modula:</b> IGF, FGF, quimiotaxia de macrófagos	Presente no sistema vascular Processos de invasão celular Migração de células de músculo liso Instabilização da placa aterosclerótica Cirrose hepática
	-9	<b>Principal:</b> colágeno desnaturado <b>Atua:</b> I, IV, V, VII, X e XI, elastina, fibronectina, laminina, agrecan, vitronectina	<b>Ativa:</b> IL-1 $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MMP-1, -2, -13 <b>Inativa:</b> SDF, inibidor da $\alpha$ 1-proteinase, $\alpha$ 2-macroglobulina <b>Degrada:</b> CTAPIII, NAP-2, GRO $\alpha$ , PF-4, FGF-R, IL-2R, plaminogênio <b>Modula:</b> FGF, IL-2R $\alpha$ , angiostatina	Infarto do miocárdio Hipertensão Insuficiência cardíaca Acidentes vasculares cerebrais Esclerose múltipla Doença de Parkinson Alzheimer Cirrose hepática
Estromelisinases	-3	Aggrecan, laminina, fibronectina, II, III, IV, V, IX, X, XI, gelatina, entacina, perlecan, decorina, tenascina, vitronectina, fibrina, fibrinogênio, proteínas de ligação, elastina	<b>Ativa:</b> HB-EGF, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , MMP-1, -3, -7, -8, -9, -13 <b>Inativa:</b> SDF, inibidor da $\alpha$ 1-proteinase, $\alpha$ 2-macroglobulina, $\alpha$ 1-antiquimotripsina <b>Modula:</b> MCP-1, -2, -3, -4, FGF, TGF $\beta$ <b>Biodisponibiliza:</b> IGF	Hipertensão arterial Doença coronariana Estenose Aterosclerose de carótida Aneurisma de aorta abdominal

## 1.5 Laminina

As lamininas são glicoproteínas da matriz extracelular que estão interligadas ao colágeno tipo IV, agrina e perlecan formando a membrana basal. São formadas por 3 cadeias ( $1\alpha$ ,  $1\beta$  e  $1\gamma$ ) sendo que cada isoforma é composta por uma de cada das  $5\alpha$ ,  $3\beta$  e  $3\gamma$  presentes nos vertebrados. A isoforma mais estudada é a laminina-111, composta pelas cadeias  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  e  $\gamma 1$ . As lamininas interagem com as células através de receptores de superfície celular (Durbeej, 2010). A laminina 511 inibe a proliferação e migração dos ceratinócitos, tanto por efeitos diretos mediados pela sua ligação aos ceratinócitos basais, quanto por mudanças na concentração de fatores de crescimento livres na interface em ambos os lados da membrana basal. Estes achados sugerem que a importância da laminina está além do seu papel como molécula de adesão, sendo importante na homeostase fazendo a intercomunicação entre a epiderme e a derme (Wegner *et al.*, 2016).

Mutações nos genes das lamininas são responsáveis por algumas doenças congênitas como, por exemplo, a distrofia muscular congênita tipo 1A por mutações no gene da cadeia  $\alpha 2$  (Jimenez-Mallebrera *et al.*, 2005). A síndrome de Pierson, ocorre por mutações no gene que codifica a laminina  $\beta 2$  (Gubler, 2008). A epidermólise bolhosa juncional por mutações nos genes da laminina-332 (Tzu e Marinkovich, 2008). O penfigoide cicatricial causado por autoanticorpos contra a laminina-332. O penfigoide anti-p200 é uma doença bolhosa subepidérmica autoimune causada por autoanticorpos que se ligam a uma proteína de 200 kDa presente na junção dermo-epidérmica, embora seu papel na patogênese ainda não esteja esclarecido, o soro desses

pacientes reconhece a cadeia  $\gamma 1$  (Goletz *et al.*, 2014). As lamininas também estão implicadas em doenças neoplásicas como o carcinoma espinocelular (Tran *et al.*, 2008). Em algumas doenças infecciosas, patógenos que apresentam laminina na sua superfície, invadem as células através dos seus receptores de superfície para laminina. Na hanseníase, o *Mycobacterium leprae* se liga à cadeia  $\alpha 2$  da laminina presente nos músculos e nervos periféricos (Rambukkana *et al.*, 1997).

## 1.6 Fibronectina

A fibronectina é uma das glicoproteínas que compõem a matriz extracelular. Apresenta duas formas, a plasmática e a celular, abundantes no sangue e matriz fibrilar respectivamente (Schwarzbauer e DeSimone, 2011). As moléculas de fibronectina formam fibras compondo uma rede que, em conjunto com outras moléculas, possui uma série de receptores para fibrina, colágeno, gelatinas e células (Theocharis *et al.*, 2016). A fibronectina parece estar relacionada à fibrina na adesão e migração celular nos coágulos, bem como a sua remoção da circulação na inflamação (Pankov e Yamada, 2002). Interage com o colágeno nativo e o desnaturado, as gelatinas, através de receptores que também se ligam à transglutaminase tissular e à fibrilina-1 (Hynes, 2002; Sabatier *et al.*, 2009). A ligação das células com a fibronectina é realizada através de integrinas e sindecans que, por sua vez, funcionam como correceptores das integrinas potencializando a sua sinalização (Hynes, 2002; Morgan *et al.*, 2012). Esta diversidade de receptores sugere que a

fibronectina possui a habilidade de interagir simultaneamente com diferentes moléculas da matriz extracelular (Pankov e Yamada, 2002).

As fibras de fibronectina na MEC são produzidas de maneira contínua em um processo dinâmico durante o remodelamento tecidual, na formação ou cicatrização, desenvolvimento embrionário e no crescimento tumoral (*extracellular matrix structure*).

## **1.7 Citocinas e fatores de crescimento**

Sabe-se que a resposta imunológica aos diversos agentes infecciosos resulta na liberação de citocinas e fatores de crescimento como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-10, TNF, IL-2, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13. Estas moléculas seriam liberadas na matriz durante a resposta imunológica e ficariam disponíveis para as células adjacentes. Entre as citocinas e fatores de crescimento estão alguns que sabidamente induzem a produção de metaloproteinases como a IL-1  $\alpha$  e  $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ , EGF, PDGF,  $\beta$ FGF, NGF e TGF- $\beta$  (Verrecchia e Mauviel, 2007). Esse é um ponto muito importante que ainda não está amplamente abordado em muitos estudos com doenças infecciosas da pele, sobretudo aquelas que evoluem com lesões que evidentemente se desenvolvem secundariamente a proliferação colágena como é o caso da lacaziose ou doença de Jorge Lobo.

### **1.7.1 Citocinas**

São proteínas de sinalização solúveis de ação altamente localizada

produzidas por células polimorfonucleares para regular a resposta imunológica, desenvolvimento hematopoiético, comunicação intercelular e resposta a inflamação e infecções (Stenken e Poschenrieder, 2015). Seus efeitos biológicos muitas vezes dependem da concentração de diversas citocinas funcionando em conjunto, por este motivo é importante dosar várias citocinas diferentes na mesma amostra (Wakita *et al.*, 2001).

Normalmente a concentração de citocinas nos fluidos corporais e tecidos é muito pequena ou indetectável. Durante condições de inflamação ou doenças, a produção das citocinas pode aumentar sua concentração em até 1.000 vezes, fazendo com que sejam consideradas como excelentes biomarcadores (Dinarello, 2000). As citocinas podem se ligar a receptores solúveis ou de membrana celular. Os receptores solúveis funcionam como agonistas ou antagonistas regulando os níveis das citocinas, de maneira a evitar que cheguem em concentrações críticas que ameacem a vida. Normalmente, quando uma citocina está ligada ao seu receptor solúvel, ela não é quantificável pelos imunoenaios. Desta maneira, se a concentração destes receptores estiver aumentada, as concentrações de citocinas podem aparecer menores do que o esperado (Stenken e Poschenrieder, 2015).

Os ceratinócitos, mastócitos, células de Langerhans, dendrócitos liberam vários mediadores, dos quais há as citocinas pro-inflamatórias IL-1  $\alpha$  /  $\beta$  e o antagonista dos seus receptores, o IL-1Ra (Feldmeyer *et al.*, 2007). Estas citocinas estão envolvidas em uma grande variedade de doenças e estão relacionadas à inflamação aguda e crônica (Falcone *et al.*, 2017). As IL-1  $\alpha$  /  $\beta$  se ligam ao mesmo receptor e exercem diversas funções diferentes em

populações celulares distintas: produção de quimiocinas e moléculas de adesão pelas células epiteliais; síntese de colágeno, migração e proliferação de fibroblastos; fagocitose e recrutamento de neutrófilos; liberação de citocinas pró-inflamatórias e Th2 pelos mastócitos; indução de  $IFN\gamma$  e diferenciação de células NK; diferenciação, fagocitose, secreção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e apresentação de antígenos em monócitos, macrófagos e células dendríticas (Striz, 2017).

A interleucina  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) é uma citocina pró-inflamatória liberada por células do sistema imunológico inato e adaptativo (monócitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células NK e linfócitos B), bem como por células não imunes (queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais, por exemplo) durante injúria celular, invasão, infecção e inflamação (Dinarello, 2000; Zhang e An, 2007). Em situações de inflamação, a produção de IL- $1\beta$  associado à infiltração neutrofílica, funcionam como uma primeira linha de defesa na pele. Entretanto, sem infecção os neutrófilos podem causar danos ao tecido (Navarini *et al.*, 2016). Nos pacientes com hidradenite supurativa, os níveis de  $TNF\alpha$ , IL- $1\beta$  e IL-10 são elevados nas lesões (van der Zee *et al.*, 2011). Na psoríase, os ceratinócitos expressam IL- $1\alpha$ , IL- $1\beta$  e IL-18 que regulam genes envolvidos na patogênese da doença (Perera *et al.*, 2012).

Os antagonistas de receptores de interleucina-1 (IL-1Ra), se ligam competitivamente aos mesmos receptores que as IL- $1\alpha$  e  $1\beta$  inibindo suas ações. O equilíbrio entre a produção de IL-1 e IL-1Ra é fundamental para a modulação da resposta inflamatória na pele normal e doente, sendo que a relação entre IL- $1\alpha$  e a IL-1Ra pode ser usada para quantificar esta inflamação

na pele (Stamatas *et al.*, 2013). O que pode ser observado na redução dos níveis de IL-1 $\alpha$  e da relação IL-1 $\alpha$ /IL-1Ra após tratamento tópico da pele inflamada. Este aumento na relação IL-1 $\alpha$ /IL-1Ra também foi observado na pele sem lesão de pacientes com dermatite atópica, psoríase e rosácea quando comparados com a pele de indivíduos saudáveis, sugerindo que possa haver inflamação subclínica mesmo em pacientes com pele aparentemente normal (Falcone *et al.*, 2017). Também foi observado na pele de uma população idosa saudável uma diminuição IL1-Ra, mantendo os níveis normais de IL-1, gerando uma tendência a um estado pro-inflamatório nesta população (Kinn *et al.*, 2015). A deficiência do antagonista do receptor de IL-1 (DIRA) é uma doença genética rara que causa autoinflamação do organismo com início no período neonatal e se apresenta como inflamação sistêmica, pústulas, edema de articulações, periostite e osteomielite multifocal (Altiok *et al.*, 2012).

A interleucina 22 (IL-22) pertence à família da IL-10 produzida por linfócitos T ativados, cujo receptor compartilha uma subunidade com o receptor de IL-10. Especula-se que a IL-22 seja um dos mediadores entre o sistema imune e as células epiteliais, estando envolvida na defesa do organismo contra patógenos. Durante as doenças inflamatórias, um estudo indicou que a produção de IL-17 e IL-22 estimula a secreção de IL-1 $\beta$  pelos ceratinócitos, fazendo um *feedback* positivo da resposta Th17. A IL-10 tem ação anti-inflamatória que inibe a ação de citocinas pró-inflamatórias como TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-1 ativada por macrófagos. Esta inibição pode se dar pela potencialização de anticitocinas, bem como pelo bloqueio de receptores de



citocinas pro-inflamatórias (Zhang e An, 2007).

A síndrome periódica associada ao receptor de TNF (TRAPS) é uma doença autossômica dominante que codifica o gene do receptor 1 de TNF $\alpha$ , gerando um receptor defeituoso acumulando TNF no citoplasma. Se manifesta com febre por mais de 7 dias associada a dor abdominal, serosite, mialgias e máculas ou placas eritematosas que podem ser migratórias (Fenini *et al.*, 2017).

### **1.7.2 Fatores de crescimento**

O fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) é uma molécula com funções anti e pró-inflamatórias dependendo do tipo celular e perfil local de citocinas, também participa do desenvolvimento, reparação tecidual e regulação imunológica das células. Atua no remodelamento da MEC estimulando a fibroblastos e miofibroblastos a expressar genes que codificam colágeno, MMPs e TIMPs criando novos componentes da MEC após injúria tecidual. Sua presença é fundamental na reparação tecidual, mas sua desregulação pode levar a fibrose do tecido (Boyd e Thomas, 2017). É produzida por todas as células do organismo juntamente com seus receptores e apresenta uma intensa ação supressora de macrófagos, bem como da resposta celular Th1, sendo de grande importância para regulação da resposta imune nos processos infecciosos (Quaresma *et al.*, 2008). Atua inibindo IL-1, IL-2, TNF e estimula a expressão do antagonista de receptores de IL-1 (IL-1 Ra) (Roberts e Sporn, 1993).

O fator de crescimento de nervos (NGF) é uma neurotrophina que atua em neurônios sensitivos simpáticos e derivados da crista neural e, no sistema nervoso central, onde tem uma função trófica de desenvolvimento e manutenção de neurônios colinérgicos (Dreyfus, 1989). As neurotrophinas pertencem à superfamília dos fatores de crescimento, apresentando elementos estruturais semelhantes ao TGF- $\beta$ , PGDF, HCG e VEGF entre outros (Skaper, 2007). O NGF e seu receptor (NGFR) participam ativamente da resposta imune regulando a produção de citocinas envolvidas no dano celular aos nervos. O NGF estimula a proliferação de linfócitos B, linfócitos T, mastócitos, células hematopoiéticas além de interagir com mono e polimorfonucleares (Skaper, 2007). A expressão de NGF e NGFR aumenta em resposta à infecção pelo bacilo *Mycobacterium leprae* na hanseníase, como uma medida de proteção ao tecido neural (Shingaki *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2013). Também foi observado que o NGF pode inibir a apoptose e promover a regeneração de nervos da pele e células endoteliais recrutando fibroblastos para atuar no processo de resolução da inflamação (Raychaudhuri *et al.*, 2001; Aarão *et al.*, 2014). A IL-17 regula negativamente a produção de NGFR nos pacientes com a forma TT da hanseníase, o que promoveria um dano neural e remodelamento tecidual (Aarão *et al.*, 2016).

O fator de crescimento epidérmico (EGF) é um polipeptídeo sintetizado a partir de uma proteína transmembrana precursora nos ceratinócitos. O precursor e o EGF competem pelo receptor de EGF (EGFR) estimulando ceratinócitos e fibroblastos. Além do EGF, outros fatores de crescimento similares em estrutura também podem se ligar e ativar os EGFR, sendo

divididos em 3 grupos: O grupo 1 é formado pelo próprio EGF, o  $TGF\alpha$ , a anfiregulina (AR) entre outros, se ligam ao EGFR agindo como agonistas em toda a epiderme, sobretudo nas células da camada basal (Wong e Guillaud, 2004). Como resultado há uma resposta antiapoptótica, mitogênica epitelial e endotelial resultando em hiperplasia epidérmica tanto em doenças benignas quanto malignas, como psoríase e câncer de pele não melanoma. O complexo EGF e EGFR desencadeia diversas respostas inflamatórias e imunológicas nos ceratinócitos, estimula receptores *toll-like* (TLR5 e TLR9) e peptídeos antimicrobianos, bem como pode tanto estimular quando inibir quimiocinas (Pastore *et al.*, 2008). A produção de EGF e EGFR é fortemente induzida por citocinas como  $TNF\alpha$  e  $IFN\gamma$ , produzidas por linfócitos Th1 ativados em situações de inflamação crônica da pele (Valyi-Nagy *et al.*, 1992).

O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) é uma glicoproteína codificada por quatro genes, formando cinco isoformas: PGDF-AA, PGDF-AB, PGDF-BB, PGDF-CC e PGDF-DD (Fredriksson *et al.*, 2004). O aumento na expressão de PDGF é encontrado nas alterações fibróticas em vários órgãos diferentes, tendo um papel quimiotático e mitogênico importante na proliferação de miofibroblastos. O  $TGF-\beta_1$ , além de atuar sobre esta nova população aumentada de miofibroblastos estimulando a fibrinogênese e deposição de colágeno, também regula positivamente os receptores de PDGF (PDGFR), estimulando a hiperplasia de fibroblastos. Em humanos, foi demonstrado um aumento da expressão de PDGF e PDGFR na pele de pacientes com esclerodermia sistêmica (Bonner, 2004). Nos pacientes com reação hansênica tipo 2, o PDGF-BB representa um potencial marcador,

ainda mais quando se sabe que possui uma ação angiogênica e que os pacientes com reação tipo 2 frequentemente apresentam vasculite (Stefani *et al.*, 2009).

### **1.8 Justificativa do estudo**

A DJL é uma doença infecciosa de evolução crônica cujo padrão de apresentação clínica pode apresentar formas localizadas ou disseminadas. Estes aspectos clínicos são o reflexo na pele da resposta imunológica do hospedeiro frente ao fungo *Lacazia loboi*. Vários trabalhos já têm caracterizado a participação de fatores imunes de forma a auxiliar a adequada resposta imunológica frente à presença do fungo. Dentre os quais citam-se o TGF- $\beta$ 1, células dendríticas, macrófagos, linfócitos T citotóxicos, ligantes de endotélio e perfil Th17. Apesar desses trabalhos caracterizarem parte dos eventos que participam da resposta imune ao fungo na pele, muitas lacunas ainda restam a serem estudadas para melhor compreensão patogênica da DJL, entre os quais a de interação parasito-hospedeiro na doença, sobretudo no que tange a ação de fatores de crescimento sobre essa matriz promovendo o remodelamento e expansão da mesma, o que leva ao surgimento das lesões cutâneas características da infecção. Desta forma, o presente projeto teve como objetivo principal a investigação do papel de fatores de crescimento e citocinas que podem interferir no processo de resposta da matriz frente à infecção pelo *Lacazia loboi*.

## **2 OBJETIVOS**

## **2.1 Objetivo geral**

O objetivo geral do presente projeto é descrever o padrão de expressão por imuno-histoquímica de fatores de crescimento e citocinas com atividade em macrófagos nas lesões cutâneas da doença de Jorge Lobo.

## **3 MÉTODOS**

### **3.1 Tipo de estudo**

Foi realizado um estudo transversal analítico com fragmentos de biópsias do Núcleo de Medicina Tropical (NMT) da Universidade Federal do Pará (UFPA) e Serviço de Dermatologia da Universidade do Estado do Pará (UEPA) em Belém.

### **3.2 População de estudo**

O estudo consiste na análise de biópsias cutâneas de 16 pacientes portadores de DJL, atendidos e diagnosticados no Ambulatório do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará e Serviço de Dermatologia da Universidade do Estado do Pará. O diagnóstico dos pacientes foi realizado através da análise de dados de prontuário e coleta de material para avaliação histopatológica e coloração especial para identificação do fungo nas lesões. Foram colhidas informações das requisições referentes aos dados demográficos como procedência, idade, sexo e apresentação clínica das lesões.



### **3.3 Amostras teciduais**

Trata-se de uma amostra de conveniência onde serão utilizados um total de 16 amostras teciduais obtidos através de biópsia para fim de diagnóstico e embebidos em parafina provenientes de arquivos dos laboratórios de patologia do Núcleo de Medicina Tropical/UFPA e Serviço de Dermatologia/UEPA.

### **3.4 Critérios de inclusão**

Foram incluídas amostras coletadas de pacientes com diagnóstico confirmado de DJL por critérios clínicos e histopatológicos. De acordo com a legislação vigente, os serviços médicos laboratoriais são os responsáveis legais pela guarda das amostras de tecido obtidas de biópsias para fim de diagnóstico, desta maneira, a utilização dos espécimes neste estudo foi autorizada pelo responsável técnico pelo laboratório.

### **3.5 Critérios de exclusão**

Foram excluídas amostras que não tiveram o laudo histopatológico confirmatório. Amostras que não possuíam material suficiente para confecção de lâminas, ou seja, com quantidade de material escassa ao ponto de comprometer o armazenamento de uma parte para retorno ao arquivo de blocos do laboratório. Não foram incluídos neste estudo pacientes menores de 18 anos ou que constasse nos prontuários como coinfectados com o vírus HIV, em uso de corticoides ou imunossupressores no momento da coleta da amostra.

### **3.6 Grupo controle**

Foi usado como grupo controle, 10 amostras de pele de áreas fotoexpostas consideradas histopatologicamente sem doença, provenientes de biópsias para esclarecimento diagnóstico, fornecidas do arquivo pessoal da Dra. Maraya Bittencourt (professora Serviço de Dermatologia da UFPA).

### **3.7 Microtomia, histopatologia e histoquímica**

O material obtido de blocos de parafina foi seccionado em micrótomo rotativo, de onde se obteve cortes com espessura de 3 µm que foram montados em lâminas silanizadas e posteriormente coradas pelos métodos de hematoxilina-eosina, tricromo de Masson, reticulina, técnica de Sirius Red 2%, Grocott e PAS. Os demais cortes foram então submetidos à imunomarcacão seguindo-se o protocolo descrito a seguir.

### 3.8 Imuno-histoquímica

Foi utilizado o método imuno-histoquímico de estreptavidina-biotina peroxidase (SABC, do inglês *streptavidin-biotin peroxidase*) descrito por Hsu *et al.*, em 1981:

1. O bloqueio de peroxidase endógena foi feito em câmara escura com três incubações em água oxigenada 3% por 10 minutos.
2. Em seguida os preparados foram novamente lavados em água corrente e água destilada por 5 minutos cada, sendo colocados posteriormente em tampão PBS pH 7,4.
3. A exposição antigênica, quando necessária, foi realizada por incubação em panela a vapor (Steam Cuisine 700 Hi Speed – T-FAL) com tampão Target Retrieval Solution pH6 (Dako - cód. S1699) durante 20 minutos após o aquecimento do tampão a temperatura de 85 °C a 90 °C ou ainda por digestão enzimática utilizando-se solução de tripsina 0,25% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO/USA - cód. T-8253).
4. Os preparados foram novamente lavados em água corrente, água destilada e tampão PBS pH 7,4 por em média 5 minutos cada.
5. Realizado bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido com incubação em solução de leite desnatado (Molico, Nestlé) a 10% durante 30 minutos a temperatura ambiente.
6. Incubação dos preparados com os anticorpos primários, diluídos em solução 1% de albumina bovina fração V (Serva cód. 11930) acrescida de azida sódica 0,1% em PBS pH 7,4, “overnight” a 4

°C.

7. Após duas lavagens com tampão PBS pH 7,4 por 5 minutos cada, foi feita a incubação com o anticorpo secundário anti-imunoglobulina de coelho e anti-imunoglobulina de camundongo produzido em cabra diluído 1:500 em PBS pH 7,4, durante 30 minutos a 37 °C ou ainda o anticorpo secundário anti-imunoglobulina de cabra produzido em coelho diluído 1:500 em PBS pH 7,4, para os anticorpos primários produzidos em cabra.
8. Os preparados foram novamente lavados em tampão PBS pH 7,4 e incubados com o complexo SABC diluído 1:500 em PBS pH 7,4 durante 30 minutos a 37°C.
9. Após nova lavagem em tampão PBS pH 7,4, a reação foi revelada com solução cromógena de diaminobenzidina (3,3'-diaminobenzidine) 0,03% acrescida de 1,2 mL de água oxigenada 3%. A intensidade de cor foi controlada ao microscópio óptico através dos controles positivos que acompanharão cada reação.
10. Os preparados assim processados foram lavados em água corrente por 10 minutos, contracorados com Hematoxilina de Harris por 20 segundos, lavados em água corrente, desidratados em etanol e diafanizados em xilol.
11. A montagem das lâminas foi feita com resina Permout.

12. Alguns anticorpos necessitarão do emprego de um sistema de amplificação denominado CSA (Catalysed Signal Amplification), que consiste da utilização do reagente biotil tiramida após a incubação com o complexo SABC, durante 15 minutos. Esse reagente tem por finalidade a multiplicação da biotina presente no sistema.
13. Após essa etapa, as lâminas foram incubadas com estreptavidina conjugada à enzima peroxidase e a reação será revelada como descrito anteriormente por Bobrow *et al.* (1989).

Foram empregados os seguintes anticorpos monoclonais: anti IL-1  $\alpha$  e  $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , EGF, FGF-básico, PDGF e NGF.

### **3.9 Análise das lâminas**

As porções retiradas das amostras foram analisadas no microscópio Zeiss, modelo 456006. Os imunomarcadores foram analisados de forma quantitativa através da seleção de 10 campos aleatórios na área da lesão contemplando a epiderme e tecido profundo, utilizando lente de aproximação de 400x. Cada campo foi subdividido em áreas 10 x 10 delimitadas pela lente do microscópio, compreendendo uma região de 0,0625 mm<sup>2</sup>. Para a análise das fibras elásticas será utilizado um sistema de imagem Axio Imager Carl Zeiss dotado de sistema e programa de morfometria que é capaz de delimitar a área imunomarcada e calcular o nível de expressão da imunomarcção específica a ser avaliada.

### **3.10 Análise Estatística**

Os resultados obtidos durante os experimentos serão armazenados em planilhas eletrônicas usando o programa Microsoft Excel 365 e analisadas por meio do programa GraphPad Prism 5.0. As variáveis numéricas foram analisadas pela obtenção de medidas de tendência central como média e mediana, bem como por medidas de variabilidade como desvio-padrão e variância. As hipóteses serão testadas pelos testes de *Mann-Whitney* e a correlação de *Spearman*. Todos os testes foram realizados considerando um nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

### **3.11 Documentação fotográfica**

As fotomicrografias foram obtidas através do sistema de microscópio AXIO IMAGER Z1-ZEISS (modelo 4560006) dotado de sistema fotográfico.

### **3.12 Aspectos éticos**

O projeto faz parte de um projeto maior intitulado “Estudo comparativo da inter-relação entre componentes da Matriz extracelular, fatores de crescimento, metaloproteinases, endotélio e resposta imunológica tecidual em dermatoses tropicais infecciosas: uma abordagem morfológica, imuno-histoquímica e molecular através da investigação de micrnas e expressão gênica pelo sequenciamento de última geração (NGS)” e aprovado através do parecer 3.001.632 do Núcleo de Medicina Tropical. Todos os procedimentos de biossegurança serão tomados para minimizar os riscos do estudo.

Em relação aos aspectos de biossegurança, no decorrer dos procedimentos serão utilizados equipamentos de proteção individual (EPI) e todo material potencialmente contaminado manipulado em laboratório foi descartado de modo seguro de acordo com o manual de segurança do Laboratório.

O material biológico foi armazenado sob a responsabilidade dos pesquisadores e instituição que realizou os testes. O sigilo e respeito à confidencialidade foi mantido através da codificação das amostras.

## **4 RESULTADOS**



#### 4.1 Resultados clínico-epidemiológicos

Os pacientes portadores de DJL (16 pacientes) foram analisados nas suas características clínico-epidemiológicas e distribuídos quanto ao sexo, faixa etária, localização das lesões e procedência, conforme demonstrado na Tabela 1.

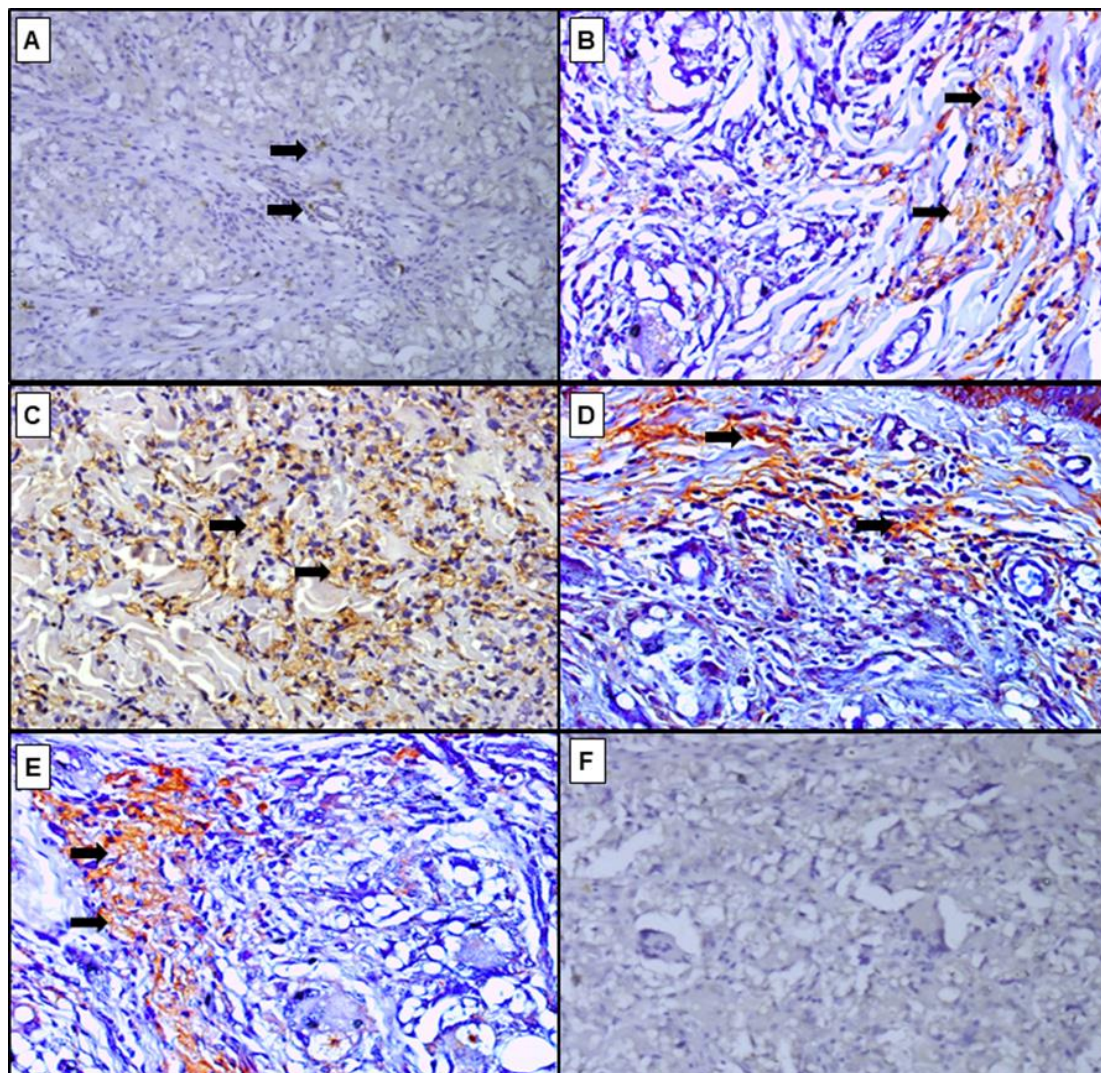
**Tabela 1 - Características epidemiológicas dos casos de DJL: sexo, idade, localização da lesão e procedência**

Sexo	Idade	Localização	Procedência
M	51 anos	Orelha	Moju – PA
M	57 anos	Dorso	Paragominas – PA
M	63 anos	Antebraço E	Arari – PA
M	44 anos	Orelha D	Alenquer – PA
F	41anos	Face	Marituba – PA
M	48 anos	Orelha E	Bragança – PA
M	55 anos	Antebraço	S.D.Capim – PA
M	63 anos	Perna E	Marabá – PA
F	45 anos	Joelho E	Santarém – PA
M	44 anos	Perna E	Marituba – PA
M	40 anos	Orelha E	Santarém – PA
M	54 anos	Perna	Santarém – PA
M	59 anos	Perna	Marabá – PA
F	59 anos	Perna	Alenquer – PA
M	51 anos	Perna	Cametá – PA
M	64 anos	Face	Moju – PA

## 4.2 Resultados imuno-histoquímicos

Os pacientes estudados foram avaliados pela imunoexpressão tecidual de citocinas e fatores de crescimento, a saber, IL-1  $\alpha$  e  $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , EGF, FGF-básico, PDGF e NGF.

O padrão de imunomarcção no tecido dos pacientes com DJL realizado para as citocinas pesquisadas e fatores de crescimento está demonstrado na Figura 9.



Notar que as áreas consideradas positivas são aquelas marcadas em castanho, seja na expressão celular ou extracelular das citocinas do perfil e apontadas pelas setas. A: IL- $\beta$ , B: TNF- $\alpha$ , C: TGF- $\beta$ , D: EGF, E: PDGF, F: Controle negativo. Magnificação: 200x e 400x

**Figura 9 - Padrão de imunomarcção por imuno-histoquímica para citocinas e fatores de crescimento em lesões cutâneas da DJL**

### 4.3 Resultados estatísticos

Os 16 pacientes portadores de DJL analisados eram de supremacia masculina (81,25%) e tinham a faixa etária entre 40 e 60 anos (81,25%). Em relação à localização das lesões, os locais preponderantes foram mmii (43,75%) e orelha (25%), sendo todos os pacientes paraenses (100%).

Em relação a quantificação tecidual das citocinas e fatores de crescimento, com as médias e desvios padrões, bem como o resultado do valor de  $p$ , nas lesões de DJL em comparação com os controles normais são mostrados na Tabela 2.

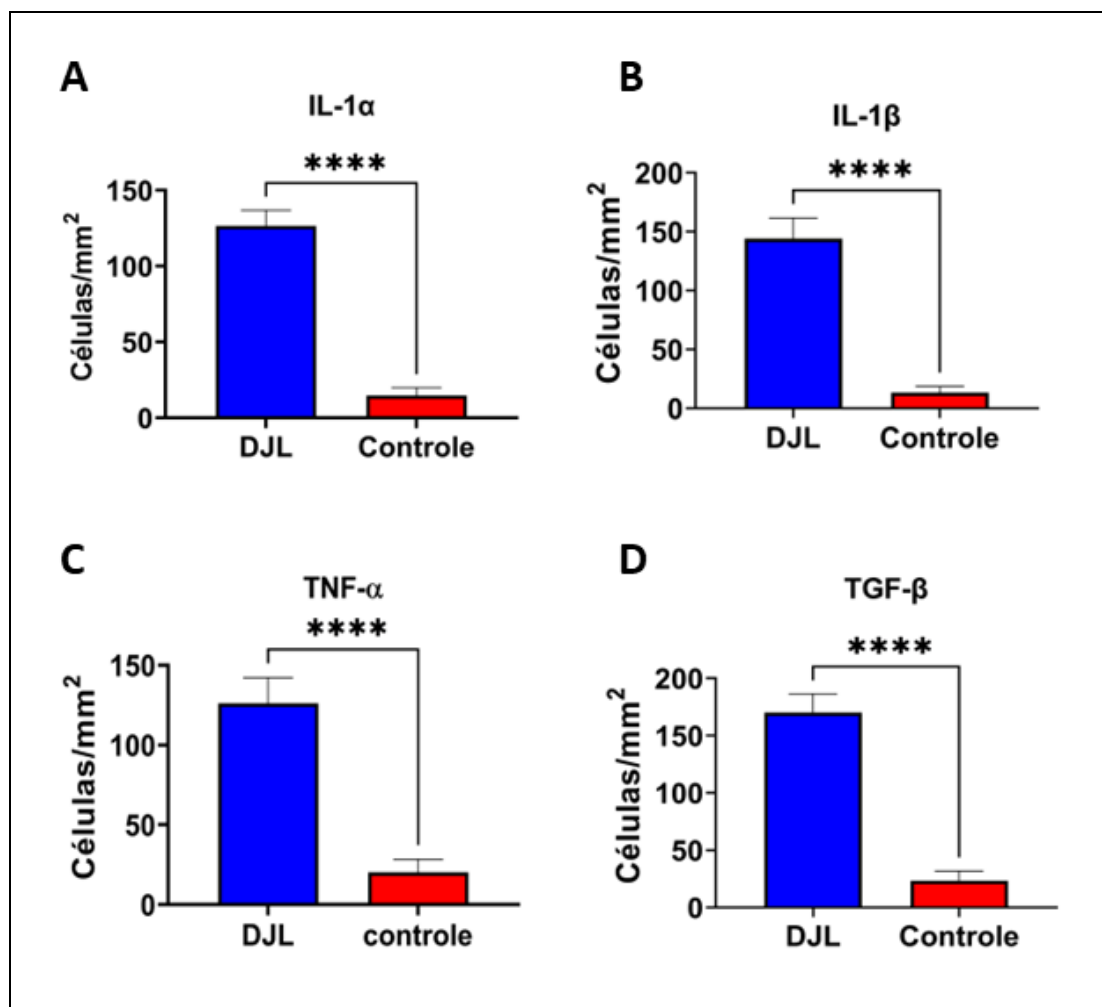
**Tabela 2 - Quantificação da expressão de citocinas e fatores de crescimento em lesões na DJL e controles de pele normais. Os valores são mostrados em médias e seus desvios padrões, além do valor de  $p$  obtido através do teste de Mann-Whitney**

Marcadores (células/mm <sup>2</sup> )	Média ± DP	Mann-Whitney ( $p \leq 0,0001$ )
IL-1 $\alpha$	126,6 ± 10,32	
Controle	14,72 ± 5,269	****
IL-1 $\beta$	144,0 ± 17,64	
Controle	13,44 ± 5,182	****
TNF- $\alpha$	126,0 ± 16,14	
Controle	20,16 ± 8,269	****
TGF- $\beta$	170,2 ± 16,28	
Controle	23,36 ± 8,406	****
EGF	151,6 ± 11,68	
Controle	19,52 ± 6,118	****
FGF básico	179,4 ± 14,04	
Controle	20,48 ± 8,560	****
PDGF	160,4 ± 7,651	
Controle	13,76 ± 3,710	****
NGF	131,0 ± 9,169	
Controle	15,04 ± 4,005	****

Na DJL, os seguintes resultados foram encontrados; para a imunomarcagem do IL-1 $\alpha$  houve uma média  $126,6 \pm 10,32$ , ao passo que para a IL-1 $\beta$  a média encontrada foi de  $144,0 \pm 17,64$ , em ambos a diferença estatística da expressão de tais citocinas entre o grupo caso e controle foi fortemente significativa com  $p \leq 0,0001$ . Seguindo-se pela avaliação da imunomarcagem para TNF- $\alpha$ , onde pode-se observar diferença estatística forte ( $p \leq 0,0001$ ) quando comparada aos seus respectivos controles, com  $126,0 \pm 16,14$ . O TGF- $\beta$ , que é um forte inibidor da ação macrófaga e conseqüentemente um dos fortes fatores que atuam na formação do aspecto fibrótico lesional dentre os grupos estudados, na DJL a média de célula/mm<sup>2</sup> foi de  $170,2 \pm 16,28$  enquanto que no grupo controle a média foi de  $23,36 \pm 8,406$  células/mm<sup>2</sup> com  $p$  altamente significativa ( $p < 0,0001^{****}$ ). Em relação à imunoexpressão da EGF, na DJL, a média encontrada para este fator de crescimento foi de  $151,6 \pm 11,68$  células/mm<sup>2</sup> enquanto no grupo controle a média foi de  $19,52 \pm 6,118$  células/mm<sup>2</sup> ( $p < 0,0001^{****}$ ). Envolvendo a presença do FGF-b, a média encontrada foi de  $179,4 \pm 14,04$  células/mm<sup>2</sup> na DJL, e no grupo controle, a média foi de  $20,48 \pm 8,560$  células/mm<sup>2</sup> ( $p < 0,0001^{****}$ ). Para a PDGF, a análise quantitativa mostrou-se estatisticamente significativa sendo que na DJL a média das células expressando este fator foi de  $160,4 \pm 7,651$  células/mm<sup>2</sup> quando comparada ao controle  $13,76 \pm 3,710$  células/mm<sup>2</sup> ( $p < 0,0001^{****}$ ). Sobre o NGF, a expressão do fator de crescimento foi mais acentuada na DJL  $131,0 \pm 9,169$  células/mm<sup>2</sup> comparada ao controle  $15,04 \pm 4,005$  células/mm<sup>2</sup> ( $p < 0,0001^{****}$ ).

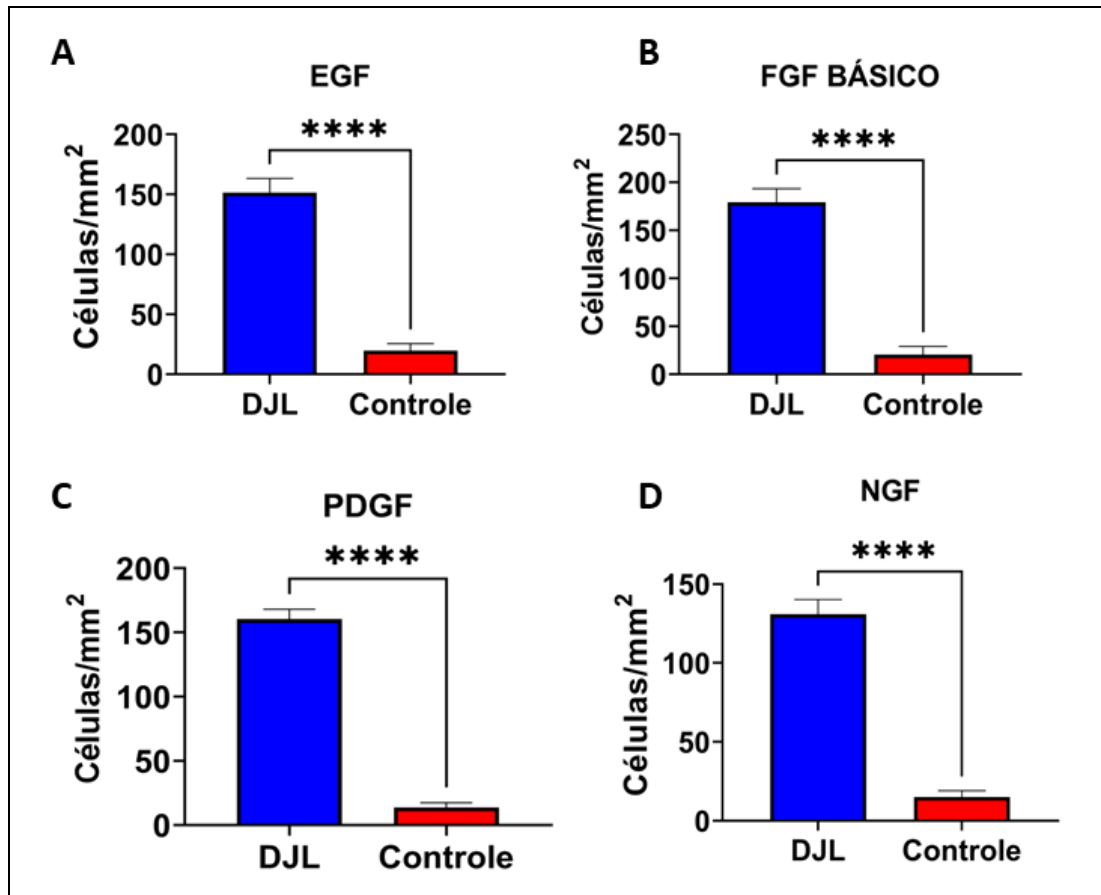
As representações gráficas da análise quantitativa da expressão celular dos marcadores aqui utilizadas estão demonstradas nos Gráficos 1 e 2.

**Gráfico 1 - Representação gráfica das médias e desvios padrões da imunexpressão celular para IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  em lesões cutâneas da DJL**



Observa-se nítida maior expressão de TGF- $\beta$  quando comparado com as demais citocinas. O TGF- $\beta$  é um forte indutor de apoptose e está envolvido no remodelamento da matriz extracelular, bem como na ativação de outros fatores ativadores de fibroblastos (FGFb) que levam, provavelmente a indução de fibrogênese e consequentemente o aspecto lesional.

Gráfico 2 - Representação gráfica das médias e desvios padrões da imunoposição celular para EGF, FGFb, PDGF e NGF em lesões cutâneas da DJL



Observa-se nítida maior expressão de FGFb quando comparado aos demais fatores de crescimento. O FGFb está envolvido na angiogênese e estimula o crescimento tecidual que, provavelmente, junto com o TGF- $\beta$ , contribuem para a formação da característica clínica da lesão na DJL.

## **5 DISCUSSÃO**

A DJL é uma infecção fúngica granulomatosa, que tem como agente etiológico o *L. loboi* e apresenta algumas características a citar: a cronicidade, a localização preponderante nos membros inferiores e a relação à resposta do dano celular sistemático (Arenas *et al.*, 2019; Hornberger *et al.*, 2021; Lima *et al.*, 2021).

A presença de melanina constitutiva na parede celular dos agentes etiológicos de ambas as doenças, apesar de o *L. loboi* não ser um fungo demáceo, confere a sobrevivência dos fungos, possivelmente por resistência aos oxidantes produzidos pelos macrófagos culminando com a resistência a ação dos antimicrobianos, propiciando o curso crônico observado nas duas micoses profundas (Vilani-Moreno e Opromolla, 1997).

No que se refere à prevalência quando ao sexo, a doença incide sobretudo no sexo masculino, conforme Queiroz-Telles *et al.* (2009). Estes dados são consonantes com os obtidos nesta pesquisa, onde foi encontrada a maior quantidade de pacientes do sexo masculino de 81,25% na DLJ. Entretanto a proporção encontrada foi de 4,3 homens para cada mulher, muito menor do que a proporção da literatura (10:1). Talvez isso possa ser explicado por os pacientes serem provenientes de regiões próximas à cidades maiores não tão adentro da floresta ou, pelo fato de mais mulheres estarem desempenhando funções que antes eram mais restritas aos homens.



Em relação à faixa etária, é descrito que a maior incidência das micoses profundas em questão ocorra na faixa etária adulta, que segundo Talhari (1995) culmina com a idade que corresponde ao período de maior produtividade laborativa do paciente. Os resultados encontrados diferem algo dos dados da literatura, uma vez que foi observada no estudo uma superioridade na incidência da faixa etária entre 40 e 60 anos de 81,25%, com média de idade de 64,4 anos. O que pode significar uma precarização na qualidade de vida, com pessoas tendo necessidade de trabalhar neste tipo de atividade cada vez até idades mais avançadas.

Conforme Loureiro *et al.* (1971), as manifestações clínicas da DJL podem surgir em qualquer local do tegumento, no entanto ocorrem com maior frequência nos membros inferiores (31%), pavilhão auricular (26%) e membros superiores (20%), provavelmente por serem áreas mais sujeitas a traumatismos. Foram encontrados resultados semelhantes, uma vez que os pacientes estudados com DJL apresentavam lesões clínicas nos membros inferiores em 43,75% dos casos, no pavilhão auricular em 25% e nos membros superiores em 18,75%.

De acordo com Florian *et al.* (2020) existem 550 casos de DJL relatados no mundo, incluindo os 63 casos dos índios da tribo Caiabi. A amostra obtida na pesquisa foi de 16 pacientes, o que corresponde a 2,9% dos casos existentes no mundo.

No que diz respeito à relação patógeno hospedeiro, o intenso dano tecidual que ocorre em virtude da patogenia da infecção pelo *Lacazia loboi* e outros fungos com curso clínico semelhante, na pele, é proveniente da

resposta imunológica exacerbada correlacionada diretamente com o grau de comprometimento e envolvimento adaptativo das estratégias de evasão imune desencadeada pelos micro-organismos (Vilani-Moreno *et al.*, 2004; Lupi *et al.*, 2005; Queiroz-Telles *et al.*, 2017; Passero *et al.*, 2021).

Tratando-se de células residentes e transitórias que servem como um anteparo imunológico de proteção contra o *Lacazia loboi*, células do sistema fagocítico mononuclear, bem como da linhagem linfocítica e neutrofílica, sinalizam para a organização de um ambiente de defesa que articula uma interface entre a imunidade inata e adaptativa (Abbas e Lichtman, 2005; Vilani-Moreno *et al.*, 2005; Breda *et al.*, 2021).

Neste contexto, na DJL já foi relatado que o movimento migratório pela matriz extracelular desencadeado por células dendríticas seria determinante para modular o processamento e apresentação de antígeno, principalmente para mediar a diferenciação de células TCD4 naive para um dos perfis de resposta imune celular adaptativa (Pagliari *et al.*, 2014; Barboza *et al.*, 2015; Kanashiro-Galo *et al.*, 2016).

Quando se estuda a atuação de células T, mecanismos intrigantes reforçam uma questão intrínseca e paradoxal revelando que, mediante a progressão da cascata inflamatória, na fase aguda, há uma resposta vigorosa de linfócitos TCD4+ e TCD8+; já na fase crônica, esta resposta é lenta, atenuada, sugerindo inibição do sistema de defesa em especial dos linfócitos T. Dessa forma, na tentativa de proteger o órgão dos agravamentos compartimentalizados, tecidualmente a fibrose é desencadeada (Vilani-Moreno *et al.*, 2005; Breda *et al.*, 2021; Gong *et al.*, 2021).

Com o intuito de estabelecer uma condição reparadora do órgão comprometido em virtude da extensa rede lesiva que se manifesta na DJL, outras subpopulações surgem a partir do processo de diferenciação dos linfócitos Th0 como os linfócitos Th2, os quais, com a perspectiva de controlar o processo inflamatório instalado, inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias e ativação da via clássica dos macrófagos M1, funções estas semelhantes às produzidas pelas células Treg, as quais têm como fator de transcrição regulador o FoxP3 e produzem IL-10, TGF- $\beta$ , FGF b, IL-13, IL-22. Esse efeito de *feedback* negativo gerado tem suas consequências nocivas na pele, haja vista que isso compromete diretamente a inibição de crescimento do micro-organismo como também facilita as estratégias de evasão imune (Vilani-Moreno *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 2016; Kanashiro-Galo *et al.*, 2016; Brito e Bittencourt, 2018, Ogawa *et al.*, 2019; Siqueira *et al.*, 2020). Em outro cenário, células como as Th17 acabam potencializando a resposta pró-inflamatória e, com isso, a geração de mecanismos que acentuam a inflamação no órgão, também influenciando no recrutamento de leucócitos via sistema vascular sanguíneo e na ativação de células endoteliais (Silva *et al.*, 2014; Brito e Bittencourt, 2018; Breda *et al.*, 2021; Passero *et al.*, 2021).

Nesta amostragem a quantificação da TGF- $\beta$  foi mais acentuada quando comparada aos outros fatores e citocinas à exceção do FGFb, com diferença significativa quando comparada à quantificação encontrada nos controles de pele normais. Quanto ao TNF- $\alpha$ , a citocina foi mais expressa na DJL quando comparado aos controles normais. O TNF- $\alpha$ , parece contribuir para um microambiente pró-inflamatório durante as reações imunológicas da

pele, uma vez que tem função de estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para os locais da infecção e ativar essas células para erradicar microorganismos (Locksley *et al.*, 2001; Moore *et al.*, 2001; Eyerich *et al.*, 2009). No entanto, apesar dessa citocina atrair e diferenciar macrófagos no tecido, as demais citocinas expressadas nas lesões da inibem a atividade microbicida do TNF $\alpha$ . Na média geral dos outros fatores e citocinas pesquisados, parece que o TNF- $\alpha$ , nesta amostragem, teve um papel mais secundário e seus efeitos muito provavelmente foram inibidos pela alta expressão de TGF- $\beta$  encontrado nas lesões principalmente em macrófagos. Vale ressaltar que, apesar disso, esta citocina poderia ter papel importante na ativação de células endoteliais, provendo assim atração de mais macrófagos e linfócitos, que são observados nas lesões.

A IL- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  são citocinas liberadas por macrófagos e têm um papel biológico semelhante a ação do TNF- $\alpha$ , atuando em células endoteliais e contribuindo para a migração de mais leucócitos para a área lesional, bem como participam da liberação de fatores inflamatórios de fase aguda. Particularmente, a IL-1 $\beta$  tem função de induzir a diferenciação de células Th-17 (Yazdi e Ghoreschi, 2016). Sua menor expressão em nesta amostra, quando comparada ao TGF- $\beta$ , FGFb e PDGF, ratificam o ambiente celular com supressão de fatores pró-inflamatórios e microbicidas adequados para o reconhecimento e eliminação do fungo.

O EGF (fator de crescimento epidérmico) e análogos ligam-se a receptores transmembranares que exibem atividade de tirosina quinase em seu domínio citoplasmático e que pertencem à família de receptores EGF (Poumay e Mitev, 2009). Esses fatores de crescimento e receptores relevantes foram nomeados após a identificação inicial das funções na epiderme. Entretanto possui um papel importante no processo de oncogênese atuando muitas vezes juntamente com o TGF- $\beta$  na gênese e progressão de diversos tumores. Em células tireoidianas epiteliais normais em cultura O EGF é inibido pelo TGF- $\beta$ 1 (Mincione *et al.*, 2011). No processo de transformação maligna, a inibição com a perda da capacidade de resposta do TGF- $\beta$  pode ser devida a uma expressão reduzida de receptores de TGF- $\beta$ , comprovado por experimento usando linhagens de células tireoidianas transformadas de ratos e em tumores tireoidianos humanos, ou à alterações de outros genes que controlam a via de transdução do sinal TGF- $\beta$ . No entanto, na neoplasia da tireoide, um padrão complexo de alterações que ocorrem durante a transformação e progressão do tumor tem sido descritos em diversos trabalhos na literatura. Funcionalmente, o TGF- $\beta$ 1 atua como supressor de tumor no estágio inicial de transformação ou como promotor de tumor em câncer avançado (Mincione *et al.*, 2011). Esse comportamento pleiotrópico peculiar do TGF- $\beta$  pode resultar em um *cross-talk* com vias de sinalização mediadas por outros fatores de crescimento, entre os quais os ligantes semelhantes ao EGF desempenham um papel importante. Na presente amostragem o EGF esteve mais expresso nas lesões da DJL que nos controles normais, o que poderia explicar as lesões de aspecto nodular ou

“tumoral” que pode vir aliada a uma hiperplasia da epiderme em alguns casos. Além disso, pode atuar, juntamente com o TGF- $\beta$ , contribuindo não somente para a hiperplasia epidérmica, mas também para o aumento de depósito de material colágeno denso observadas nessas lesões (Mincione *et al.*, 2011).

No caso do fator de crescimento fibroblástico básico (FGF b) que foi observado em maior quantidade no presente estudo na DJL em compartilhamento com o TGF- $\beta$ , pode modular o processo de angiogênese, síntese de colágeno, aumentar a expressão de inibidor tissular de metaloproteinases (TIMPs) e diminuir a produção de metaloproteinases (MMPs) e, dessa forma, auxiliar na construção de um arcabouço tecidual consistente com o acúmulo de matriz tecidual que tem implicações na reparação tecidual (Beenken e Mohammadi, 2009; Eto *et al.*, 2012; Benington *et al.*, 2020).

Em virtude do FGF b se expressar através da produção abundante de fibrose, como visto clinicamente nas lesões de aspecto queloidiano, era esperado o resultado obtido neste trabalho, que revelou uma superioridade da quantificação do FGF b encontrada de maneira mais acentuada nos pacientes quando comparado a todos os outros marcadores estudados. Uma consideração pertinente indica que, na construção do infiltrado inflamatório, o estabelecimento de agregados de plasmócitos é uma característica histopatológica peculiar na DJL reforçando que, na tentativa de articular uma resposta de neutralização a partir da produção de anticorpos, para que a fagocitose seja exercida, os linfócitos Th2 participam desse processo auxiliado também por citocinas do perfil Th22 como no caso da IL-13 que é

necessária para desencadear o processo de diferenciação (Silva *et al.*, 1992; Brito e Quaresma, 2007; Sousa *et al.*, 2019). Na hanseníase, leishmaniose e tuberculose, é graças à atuação da IL-13 que o fenótipo M2 consegue induzir a liberação de arginase 1 a qual é indispensável para mediar a produção de fatores de crescimento como no caso do TGF- $\beta$  e do FGF b. Isso ocorre devido à arginase 1 competir com a iNOS pela L-arginina (Sousa *et al.*, 2016; Tomiotto-Pellissier *et al.*, 2018; Le *et al.*, 2020).

Na DJL já foi demonstrado que, nas lesões cutâneas, a resposta de macrófagos M2 é predominante em detrimento a M1 e ocorre mediante as estratégias de evasão imune, na compensação da resposta inflamatória, na fibrose; vista nas lesões queloidianas e nas lesões verrucosas que são frequentemente encontradas nos pacientes com essas doenças. Esses podem ser os efeitos observados nos pacientes das micoses profundas estudadas em virtude da positividade significativa da imunomarcagem da IL-13 (Barboza *et al.*, 2020; Breda *et al.*, 2021).

Um fato interessante a citar é que na DJL a presença do fenótipo M2 seria um componente adicional reforçando que citocinas de perfil Th2 e o TGF- $\beta$  contribuem para a sobrevivência do microrganismo e da reparação tecidual a partir de processos adaptativos e das estratégias de escape imunológico adotados pelos patógenos e poderiam justificar a extrema dificuldade em atingir o sucesso terapêutico característico desses pacientes (Barboza *et al.*, 2020; Breda *et al.*, 2021).

O fator de crescimento derivado de plaquetas é o principal fator de crescimento do soro sanguíneo humano. *In vivo*, aparentemente é sintetizado

por megacariócitos e é transportado no sangue armazenado nos grânulos alfa das plaquetas (Antoniades, 1991; Paolini *et al.*, 2022). O hPDGF é um heterodímero de duas cadeias polipeptídicas homólogas (PDGF-1(A) e PDGF-2(B) ligadas por pontes dissulfeto. A cadeia PDGF-1(A) é codificada por um gene localizado no cromossomo 7 e o PDGF- A cadeia 2(B) é codificada pelo proto-oncogene c-sis localizado no cromossomo 22. O heterodímero hPDGF e suas duas isoformas, os homodímeros PDGF-1(A) e PDGF-2(B), são potentes mitógenos e quimioatraentes para células-alvo, como fibroblastos diplóides, osteoblastos, células musculares lisas arteriais e células gliais cerebrais. O homodímero PDGF-1(A) liga-se apenas ao seu receptor alfa específico, e o heterodímero hPDGF e o homodímero PDGF-2(B) ligam-se a ambos os receptores  $\alpha$  e  $\beta$ . Além de sua ação mitogênica, o PDGF estimula importantes atividades metabólicas celulares, incluindo a síntese de proteínas, lipídios e prostaglandinas (Antoniades, 1991; Paolini *et al.*, 2022). Parece ser um fator importante no desenvolvimento inicial e *in vivo* parece modular a regeneração e remodelação tecidual durante a cicatrização de feridas e osteogênese. A expressão aumentada dos genes do PDGF e seus produtos mitogênicos têm sido associadas a vários distúrbios proliferativos, como fibrose, aterosclerose e neoplasia. No que diz respeito a esta amostragem, sua expressão aumentada quando compara ao controle de pele normal, e quando comparada a outros fatores como o EGF e NGF, possivelmente contribui para o depósito de colágeno específico na gênese das lesões observadas clinicamente e de aspecto queilodiforme.



O fator de crescimento neural esteve mais expresso nas lesões de DJL quando comparados aos controles normais, porém, na média geral, ficou no mesmo nível das citocinas como IL-1 e TNF- $\alpha$ . Em alguns modelos de doenças infecciosas granulomatosas humanas que comprometem o sistema cutâneo, tem sido descrito que o NGF, juntamente com o TGF- $\beta$ , atuam no intuito de preservar ou regenerar terminações nervosas da pele, impedindo assim a evolução para deformidades, mas contribui juntamente com o TGF- $\beta$ , para a manutenção de um microambiente inflamatório tecidual constituído por macrófagos M2, ou com seus mecanismos microbicidas suprimidos (Aarão *et al.* 2018). Inexistem estudos mais aprofundados acerca da correlação clínica na DJL e o NGF, de forma que mais estudos precisam ser feitos a fim de se identificar o papel deste na patogenia da doença.

Dessa forma, pode-se inferir a partir destes achados que os fatores de crescimento, juntamente com o TGF- $\beta$ , tem um papel fundamental na gênese do aspecto lesional observado, entretanto, novos estudos são necessários para concluir os mecanismos pelos quais estes fatores atuam na relação patógeno/hospedeiro e evolução clínica da doença, assim como abrir novas frentes de pesquisa para o desenvolvimento de terapêutica mais eficaz contra o *Lacazia loboi*.

## **6 CONCLUSÕES**

Na patogenia da infecção na DJL, é de suma importância a expressão de citocinas e fatores de crescimento que interagem com as células e matriz extracelular contribuindo para o estabelecimento de um ambiente imunológico favorável ao desenvolvimento das lesões características da doença.

A exposição ao fungo inicia uma resposta imunológica na pele na tentativa de eliminá-lo. Entretanto, não é grande o bastante para destruir o fungo, porém suficiente para gerar um processo de remodelamento fibrótico da matriz extracelular. A incapacidade na destruição do fungo mantém este ambiente inflamatório de maneira crônica retroalimentando o processo.

Observamos a predominância no perfil antiinflamatório de citocinas e fatores de crescimento com níveis maiores de FGF, TGF- $\beta$  e NGF em relação ao perfil inflamatório, caracterizado por TNF- $\alpha$ , IL-1  $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , EGF e PDGF. Temos, portanto, um mecanismo que protege o fungo da resposta imunológica que tenta destruí-lo.

Apesar desses novos achados a respeito do comportamento de citocinas específicas e fatores de crescimento, é necessário que sejam realizados mais estudos para investigar o papel de outras citocinas e fatores de crescimento, além de correlacioná-los com as distintas formas clínicas da doença, bem como elucidar os possíveis fatores inerentes ao fungo

implicados em sua evasão imune como a importância da melanina na parede celular e seus receptores de membrana.

Este trabalho coloca mais uma peça na elucidação da fisiopatogenia da lacaziose, bem como abre novos horizontes para possibilidades terapêuticas com medicamentos imunobiológicos e de biologia sintética.

## **7 REFERÊNCIAS**

Aarão TL, de Sousa JR, Botelho BS, Fuzii HT, Quaresma JA. Correlation between nerve growth factor and tissue expression of IL-17 in leprosy. *Microb Pathog*. 2016 Jan;90:64-8.

Aarão TL, Esteves NR, Esteves N, Soares LP, Pinto Dda S, Fuzii HT, Quaresma JA. Relationship between growth factors and its implication in the pathogenesis of leprosy. *Microb Pathog*. 2014 Dec;77:66-72.

Aarão TLS, de Sousa JR, Falcão ASC, Falcão LFM, Quaresma JAS. Nerve Growth Factor and Pathogenesis of Leprosy: Review and Update. *Front Immunol*. 2018 May 7;9:939.

Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.

Akagawa KS. Recent advances in tuberculosis immunity. *Kekkaku*. 2012; 87:61-70.

Albanesi C, Scarponi C, Giustizieri ML, Girolomoni G. Keratinocytes in inflammatory skin diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005; 4:329-334.

Al-Daraji WI, Husain E, Robson A. Lobomycosis in African patients. *Br J Dermatol*. 2008 Jul;159(1):234-6.

Ali MF, Dasari H, Van Keulen VP, Cornec D, Vasmatzis G, Peikert T, Carmona EM. Microbial Antigens Stimulate Metalloprotease-7 Secretion in Human B-Lymphocytes Using mTOR-Dependent and Independent Pathways. *Sci Rep*. 2017 Jun 20;7(1):3869..

Allan RS, Smith CM, Belz GT, van Lint AL, Wakim LM, Heath WR, Carbone FR. Epidermal viral immunity induced by CD8alpha+ dendritic cells but not by Langerhans cells. *Science*. 2003; 301:1925-1928.

Almeida F, Lacaz C. Blastomicose “tipo Jorge Lobo”. *An Fac Med Univ Sao Paulo*. 1948a;24:5-37.

Almeida F, Lacaz C. Blastomicose “tipo Jorge Lobo”. *Rev Paul Med*. 1948b;32:161-2.

Altioek E, Aksoy F, Perk Y, Taylan F, Kim PW, Ilikkan B, Asal GT, Goldbach-Mansky R, Sanal O. A novel mutation in the interleukin-1 receptor antagonist associated with intrauterine disease onset. *Clin Immunol*. 2012 Oct;145(1):77-81.

Andrew W, Andrew NV. Lymphocytes in the normal epidermis of the rat and of man. *Anat Rec*. 1949; 104:217-241.

Angel CE, Lala A, Chen CJ, Edgar SG, Ostrovsky LL, Dunbar PR. CD14+ antigen-presenting cells in human dermis are less mature than their CD1a+ counterparts. *Int Immunol*. 2007; 19:1271-1279.

Antoniades HN. PDGF: a multifunctional growth factor. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. 1991 Dec;5(4):595-613.

Arenas CM, Rodriguez-Toro G, Ortiz-Florez A, Serrato I. Lobomycosis in soldiers, Colombia. *Emerg Infect Dis*. 2019;25(4):654-60.

Arend WP, Palmer G, Gabay C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunol Rev*. 2008; 223:20-38.

Azevedo DE, Campos S, Carneiro LS, Ciferri R. Advance in the knowledge of the fungus of Jorge Lobo's disease. *J Trop Med Hyg*. 1956 Sep;59(9):214-5.

Azulay R, Andrade L, Carneiro J. Micose de Jorge Lobo. Contribuição ao seu estudo experimental. Inoculações no homem e animais de laboratório e investigação imunológica. *Hospital (Rio J)*. 1968;73:1165-72.

Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci*. 2002 Oct 1;115(Pt 19):3719-27.

Baliwag J, Barnes DH, Johnston A. Cytokines in psoriasis. *Cytokine*. 2015; S1043-4666.



Barboza TC, Quaresma JAS, Brito AC, Xavier MB, Oliveira CMM, Unger DAA, et al. Jorge Lobo's disease: immunohistochemical characterization of dendritic cells in cutaneous lesions. *Mycopathologia*. 2015;179(3-4):269-74.

Barboza TC, Sotto MN, Kanashiro-Galo L, Brito AC, Duarte MIS, Quaresma JAS, et al. M2-polarized macrophages determine human cutaneous lesions in Lacaziosis. *Mycopathologia*. 2020;185(3):477-83.

Barker JN, Mitra RS, Griffiths CE, Dixit VM, Nickoloff BJ. Keratinocytes as initiators of inflammation. *Lancet*. 1991; 337:211-214.

Bar-Or A, Nuttall RK, Duddy M, Alter A, Kim HJ, Ifergan I, Pennington CJ, Bourgoin P, Edwards DR, Yong VW. Analyses of all matrix metalloproteinase members in leukocytes emphasize monocytes as major inflammatory mediators in multiple sclerosis. *Brain*. 2003 Dec;126(Pt 12):2738-49.

Baruzzi R, Lacaz C, De Souza FA. Clínica de doenças tropicais e infecciosas. Rio de Janeiro: Interlivros, 1991.

Baruzzi R, Lacaz C, Souza FA. História natural da doença de Jorge Lobo. Ocorrência entre os índios Caiabí (Brasil Central). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1979;21:302-38.

Baruzzi RG, Castro RM, D'Andretta C Jr, Carvalhal S, Ramos OL, Pontes PL. Occurrence of Lobo's blastomycosis among "Caiabi," Brazilian Indians. *Int J Dermatol*. 1973 Mar-Apr;12(2):95-9.

Baruzzi RG, D'Andretta C Jr, Carvalhal S, Ramos OL, Pontes PL. Ocorrência de blastomicose queiloideana entre índios Caiabí. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1967;9:135-42.

Bedoui S, Greyer M. The role of dendritic cells in immunity against primary herpes simplex virus infections. *Front Microbiol*. 2014; 5:533.

Bedoui S, Whitney PG, Waithman J, Eidsmo L, Wakim L, Caminschi I, Allan RS, Wojtasiak M, Shortman K, Carbone FR, Brooks AG, Heath WR. Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nat Immunol*. 2009; 10:488-495.

Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8(3):235-53.

Bekiaris V, Šedý JR, Ware CF. Mixing Signals: Molecular Turn Ons and Turn Offs for Innate  $\gamma\delta$  T-Cells. *Front Immunol*. 2014; 5:654.

Benington L, Rajan G, Locher C, Lim LY. Fibroblast growth factor 2: a review of stabilisation approaches for clinical applications. *Pharmaceutics*. 2020;12(6):508.

Bieber T. The pro- and anti-inflammatory properties of human antigen-presenting cells expressing the high affinity receptor for IgE (Fc epsilon RI). *Immunobiology*. 2007; 212:499-503.

Black AP, Ardern-Jones MR, Kasprowicz V, Bowness P, Jones L, Bailey AS, Ogg GS. Human keratinocyte induction of rapid effector function in antigen-specific memory CD4+ and CD8+ T cells. *Eur J Immunol*. 2007; 37:1485-1493.

Blanco P, Palucka AK, Gill M, Pascual V, Banchereau J. Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus. *Science*. 2001; 294:1540-1543.

Bobrow MN, Harris TD, Shaughnessy KJ, Litt GJ. Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. *J Immunol Methods*. 1989 Dec 20;125(1-2):279-85.

Bonner JC. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004 Aug;15(4):255-73.

Borelli D. Aspergillus, sorpresas em micopatologia. *Bol Venez Lab Clinicos*. 1958;3:47-8.

Borelli D. La Reservarea de la Lobomycosis Comentarios a un Trabajo del Dr. Carlos Peña sobre dos Casos Colombianos. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*. 1969;37(2):145-9.

Borelli D. Lobomycosis: nomenclatura de su agente (revisión critica). *Med Cutanea*. 1968;3:151-6.

Bos JD, Kapsenberg ML. The skin immune system: progress in cutaneous biology. *Immunol Today*. 1993; 14:75-8.

Bos JD, Zonneveld I, Das PK, Krieg SR, van der Loos CM, Kapsenberg ML.

The skin immune system (SIS): distribution and immunophenotype of lymphocyte subpopulations in normal human skin. *J Invest Dermatol.* 1987; 88:569-573.

Boyd DF, Thomas PG. Towards integrating extracellular matrix and immunological pathways. *Cytokine.* 2017 Oct;98:79-86.

Boyman O, Conrad C, Dudli C, Kielhorn E, Nickoloff BJ, Nestle FO. Activation of dendritic antigen-presenting cells expressing common heat shock protein receptor CD91 during induction of psoriasis. *Br J Dermatol.* 2005; 152:1211-1218.

Boyman O, Conrad C, Tonel G, Gilliet M, Nestle FO. The pathogenic role of tissue-resident immune cells in psoriasis. *Trends Immunol.* 2007; 28:51-57.

Breda LCD, Menezes IG, Paulo LNM, Almeida SR. Immune sensing and potential immunotherapeutic approaches to control chromoblastomycosis. *J Fungi.* 2021;7(1):3.

Brito AC, Bittencourt MJS. Cromoblastomicose: uma atualização etiológica, epidemiológica, clínica, diagnóstica e terapêutica. *An Bras Dermatol.* 2018;93(4):495-506.

Brito AC, Quaresma JAS. Lacaziose (doença de Jorge Lobo): revisão e atualização. *An Bras Dermatol.* 2007;82(5):461-4.

Brown MB, von Chamier M, Allam AB, Reyes L. M1/M2 macrophage polarity in normal and complicated pregnancy. *Front Immunol.* 2014; 5:606.

Burgeson RE, Christiano AM. The dermal-epidermal junction. *Curr Opin Cell Biol.* 1997; 9:651-8.

Burns RA, Roy JS, Woods C, Padhye AA, Warnock DW. Report of the first human case of lobomycosis in the United States. *J Clin Microbiol.* 2000a Mar;38(3):1283-5.

Bursch LS, Wang L, Igyarto B, Kissenpfennig A, Malissen B, Kaplan DH, Hogquist KA. Identification of a novel population of Langerin+ dendritic cells. *J Exp Med.* 2007; 204:3147-3156.

Cáceres S, Rodriguez-Toro G. Lobomycosis de 35 años de evolución. *Rev Soc Col Dermatol.* 1991;1:43-5.

Cauwe B, Van den Steen PE, Opdenakker G. The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2007 May-Jun;42(3):113-85.

Chaudhuri A. Regulation of Macrophage Polarization by RON Receptor Tyrosine Kinase Signaling. *Front Immunol.* 2014; 5:546.

Clark RA, Chong B, Mirchandani N, Brinster NK, Yamanaka K, Dowgiert RK, Kupper TS. The vast majority of CLA+ T cells are resident in normal skin. *J Immunol.* 2006; 176: 4431-4439.

Coll RC, Robertson AA, Chae JJ, Higgins SC, Muñoz-Planillo R, Inserra MC, Vetter I, Dungan LS, Monks BG, Stutz A, Croker DE, Butler MS, Haneklaus M, Sutton CE, Núñez G, Latz E, Kastner DL, Mills KH, Masters SL, Schroder K, Cooper MA, O'Neill LA. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat Med.* 2015; 21:248-255

Cowan DF. Lobo's disease in a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) from Matagorda Bay, Texas. *J Wildl Dis.* 1993 Jul;29(3):488-9.

Daley WP, Yamada KM. ECM-modulated cellular dynamics as a driving force for tissue morphogenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 2013 Aug;23(4):408-14.

Di Cesare A, Di Meglio P, Nestle FO. The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2009; 129:1339-1350.

Diani M, Altomare G, Reali E. T cell responses in psoriasis and psoriatic arthritis. *Autoimmun Rev.* 2015; 14:286-292.

Dias LB, Sampaio MM, Silva D. Jorge Lôbo's disease. Observations on its epidemiology and some unusual morphological forms of the fungus. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1970 Jan-Feb;12(1):8-15.

Dieu-Nosjean MC, Massacrier C, Homey B, Vanbervliet B, Pin JJ, Vicari A, Lebecque S, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Zlotnik A, Caux C. Macrophage inflammatory protein 3alpha is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. *J Exp Med.* 2000; 192:705-718.

Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest*. 2000 Aug;118(2):503-8.

Djuric T, Zivkovic M. Overview of MMP biology and gene associations in human diseases. In: *The role of matrix metalloproteinase in human body pathologies*; 2017. p. 137-44.

Dreyfus CF. Effects of nerve growth factor on cholinergic brain neurons. *Trends Pharmacol Sci*. 1989 Apr;10(4):145-9.

Dunphy S, Gardiner CM. NK cells and psoriasis. *J Biomed Biotechnol*. 2011; 2011:248317.

Durbeej M. Laminins. *Cell Tissue Res*. 2010 Jan;339(1):259-68.

Elbe A, Stingl G. Dendritic cells as stimulator cells of MHC class I-restricted immune responses. *Adv Exp Med Biol*. 1995; 378:341-345.

Elias PM, Wakefield JS. Mechanisms of abnormal lamellar body secretion and the dysfunctional skin barrier in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2014; 134:781-791.

Eto H, Suga H, Aoi N, Kato H, Doi K, Kuno S, et al. Therapeutic potential of fibroblast growth factor-2 for hypertrophic scars: upregulation of MMP-1 and HGF expression. *Lab Investig*. 2012;92(2):214–23.

Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, Pallotta S, et al. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest*. 2009;119(12):3573-85.

Falcone D, Spee P, van de Kerkhof PCM, van Erp PEJ. Minimally-invasive Sampling of Interleukin-1 $\alpha$  and Interleukin-1 Receptor Antagonist from the Skin: A Systematic Review of In vivo Studies in Humans. *Acta Derm Venereol*. 2017 Oct 2;97(9):1066-1073.

Feldmeyer L, Keller M, Niklaus G, Hohl D, Werner S, Beer HD. The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1beta by keratinocytes. *Curr Biol*. 2007 Jul 3;17(13):1140-5.

Fenini G, Contassot E, French LE. Potential of IL-1, IL-18 and Inflammasome Inhibition for the Treatment of Inflammatory Skin Diseases. *Front Pharmacol*. 2017 May 22;8:278.

Fingleton B. Matrix metalloproteinases as valid clinical targets. *Curr Pharm Des*. 2007;13(3):333-46.

Florian MC, Rodrigues DA, Mendonça SBM, Colombo AL, Tomimori J. Epidemiologic and clinical progression of Lobomycosis between Kaiabi Indians, Brazil, 1965-2019. *Emerg Infect Dis*. 2020;26(5):930-6.

Fonseca Filho O, Area Leão A. Contribuição para o conhecimento das granulomatoses blastomycoides: o agente etiológico da doença de Jorge Lobo. *Rev Med Cirurg Brasil*. 1940;48:147-58.

Fonseca Filho O. *Parasitologia Médica - Parasitos e doenças parasitárias do homem*. Rio de Janeiro: Guanabara, 1943.



Foster CA, Yokozeki H, Rappersberger K, Koning F, Volc-Platzer B, Rieger A, Coligan JE, Wolff K, Stingl G. Human epidermal T cells predominantly belong to the lineage expressing alpha/beta T cell receptor. *J Exp Med.* 1990; 171:997-1013.

Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci.* 2010 Dec 15;123(Pt 24):4195-200.

Fredriksson L, Li H, Eriksson U. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004 Aug;15(4):197-204.

Fuchs J, Milbradt R, Pecher SA. Lobomycosis (keloidal blastomycosis): case reports and overview. *Cutis.* 1990 Sep;46(3):227-34.

Fukunaga A, Khaskhely NM, Sreevidya CS, Byrne SN, Ullrich SE. Dermal dendritic cells, and not Langerhans cells, play an essential role in inducing an immune response. *J Immunol.* 2008; 180:3057-3064.

Furtado JS, de Brito T, Freymuller E. Structure and Reproduction of *Paracoccidioides loboii*. *Mycologia.* 2007;59(2):286.

Geiger B, Yamada KM. Molecular architecture and function of matrix adhesions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 May 1;3(5):a005033.

Gesztes J, Puccia R, Travassos LR, Vicentini AP, de Moraes JZ, Franco MF, Lopes JD. Monoclonal antibodies against the 43,000 Da glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis* modulate laminin-mediated fungal adhesion to epithelial cells and pathogenesis. *Hybridoma.* 1996 Dec;15(6):415-22.

Gieryńska M, Schollenberger A, Cespedes IS, Pawlak E. Dendritic epidermal T cells: sentinels of the skin. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2009; 63:114-122.

Gilliet M, Lande R. Antimicrobial peptides and self-DNA in autoimmune skin inflammation. *Curr Opin Immunol*. 2008; 20:401-407.

Ginhoux F, Collin MP, Bogunovic M, Abel M, Leboeuf M, Helft J, Ochando J, Kissenpfennig A, Malissen B, Grisotto M, Snoeck H, Randolph G, Merad M. Blood-derived dermal langerin+ dendritic cells survey the skin in the steady state. *J Exp Med*. 2007; 204:3133-46.

Goletz S, Hashimoto T, Zillikens D, Schmidt E. Anti-p200 pemphigoid. *J Am Acad Dermatol*. 2014 Jul;71(1):185-91.

Gonçalves FG, Rosa PS, Belone AdFF, Carneiro LB, de Barros VLQ, Bispo RF, Sbardelott YAdS, Neves SAVM, Vittor AY, Woods WJ, et al. Lobomycosis Epidemiology and Management: The Quest for a Cure for the Most Neglected of Neglected Tropical Diseases. *Journal of Fungi*. 2022; 8(5):494.

Gong J, Zhan H, Liang Y, He Q, Cui D. Role of Th22 cells in human viral diseases. *Front Med*. 2021;8:708140.

Grabbe S, Steinbrink K, Steinert M, Luger TA, Schwarz T. Removal of the majority of epidermal Langerhans cells by topical or systemic steroid application enhances the effector phase of murine contact hypersensitivity. *J Immunol*. 1995; 155:4207-4217.

Griffiths CE, Nickoloff BJ. Keratinocyte intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression precedes dermal T lymphocytic infiltration in allergic contact dermatitis (*Rhus dermatitis*). *Am J Pathol.* 1989; 135:1045-1053.

Grine L, Dejager L, Libert C, Vandebroucke RE. An inflammatory triangle in psoriasis: TNF, type I IFNs and IL-17. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014; 26:25-33

Guttman-Yassky E, Lowes MA, Fuentes-Duculan J, Whynot J, Novitskaya I, Cardinale I, Haider A, Khatcherian A, Carucci JA, Bergman R, Krueger JG. Major differences in inflammatory dendritic cells and their products distinguish atopic dermatitis from psoriasis. *J Allergy Clin Immunol.* 2007; 119:1210-1217.

Haniffa M, Gunawan M, Jardine L. Human skin dendritic cells in health and disease. *J Dermatol Sci.* 2015; 77:85-92.

Hayday A, Tigelaar R. Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3:233-42.

Herr RA, Tarcha EJ, Taborda PR, Taylor JW, Ajello L, Mendoza L. Phylogenetic analysis of *Lacazia loboi* places this previously uncharacterized pathogen within the dimorphic Onygenales. *J Clin Microbiol.* 2001 Jan;39(1):309-14.

Hodde JP, Johnson CE. Extracellular matrix as a strategy for treating chronic wounds. *Am J Clin Dermatol.* 2007;8(2):61-6.

Hornberger MM, Farnsworth GS, Vilela R, Mendoza L, Bandino JP. Extensive,

multifocal lobomycosis. *J Cutan Pathol*. 2021:1-3.

Hoyo E, Kanitakis J, Schmitt D. The dermal dendrocyte. *Pathol Biol (Paris)*. 1993; 41:613-618.

Hunger RE, Sieling PA, Ochoa MT, Sugaya M, Burdick AE, Rea TH, Brennan PJ, Belisle JT, Blauvelt A, Porcelli SA, Modlin RL. Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells. *J Clin Invest*. 2004; 113:701-708.

Hynes RO, Naba A. Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 Jan 1;4(1):a004903.

Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 2002 Sep 20;110(6):673-87.

Igyártó BZ, Kaplan DH. Antigen presentation by Langerhans cells. *Curr Opin Immunol*. 2013; 25:115-119.

Iwasaki Y, Fujio K, Okamura T, Yamamoto K. Interleukin-27 in T Cell Immunity. *Int J Mol Sci*. 2015; 16:2851-2863.

Jakubowicz K. Role of keratinocytes in the process of keratinization. *Przegl Dermatol*. 1969; 56:795-800.

Jimenez-Mallebrera C, Brown SC, Sewry CA, Muntoni F. Congenital muscular dystrophy: molecular and cellular aspects. *Cell Mol Life Sci*. 2005 Apr;62(7-8):809-23.

Jönsson D, Nebel D, Bratthall G, Nilsson BO. The human periodontal ligament cell: a fibroblast-like cell acting as an immune cell. *J Periodontal Res.* 2011; 46:153-157.

Kanashiro-Galo L, Pagliari C, Barboza TC, de Brito AC, Xavier MB, de Oliveira CM, Unger DA, Sotto MN, Quaresma JA, Duarte MI. Th17 and regulatory T cells contribute to the in situ immune response in skin lesions of Jorge Lobo's disease. *Med Mycol.* 2016 Jan;54(1):23-8.

Kaplan DH, Kissenpfennig A, Clausen BE. Insights into Langerhans cell function from Langerhans cell ablation models. *Eur J Immunol.* 2008; 38:2369-23676.

Keller M, Ruegg A, Werner S, Beer HD. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell.* 2008; 132:818–831.

Khokha R, Murthy A, Weiss A. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013 Sep;13(9):649-65.

Kinn PM, Holdren GO, Westermeyer BA, Abuissa M, Fischer CL, Fairley JA, Brogden KA, Brogden NK. Age-dependent variation in cytokines, chemokines, and biologic analytes rinsed from the surface of healthy human skin. *Sci Rep.* 2015 Jun 2;5:10472.

Kissenpfennig A, Henri S, Dubois B, Laplace-Builhé C, Perrin P, Romani N, Tripp CH, Douillard P, Leserman L, Kaiserlian D, Saeland S, Davoust J, Malissen B. Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating

Langerhans cells. *Immunity*. 2005; 22:643-654.

Koczy-Baron E, Kasperska-Zajac A. The role of vascular endothelial growth factor in inflammatory processes. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2014; 68:57-65.

Koljonen V, Ilmonen S. Excision of a naevus. *Duodecim*. 2014; 130:1861-1866.

Kolls JK, McCray PB Jr, Chan YR. Cytokine-mediated regulation of antimicrobial proteins. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8:829-835.

Kupper TS. The activated keratinocyte: a model for inducible cytokine production by non-bone marrow-derived cells in cutaneous inflammatory and immune responses. *J Invest Dermatol*. 1990; 94:146-150.

Kutlu A, Bozkurt B, Ciftci F, Bozkanat E. Th1-Th2 interaction: is more complex than a see-saw? *Scand J Immunol*. 2007; 65:393-395.

Kuznetsov SL, Goriachkina VL, Ivanova Mlu, Tsomartova DA. [Histophysiology of the epidermis]. *Morfologija*. 2012; 142:76-85.

Lacaz C, Baruzzi R, Rosa M. *Doença de Jorge Lobo*. São Paulo: USP-IPSI, 1986.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Takahashi de Melo N. *Tratado de micologia médica*. 9a. ed. São Paulo: Savier, 2002.

Lai Y, Gallo RL. Toll-like receptors in skin infections and inflammatory diseases. *Infect Disord Drug Targets*. 2008; 8:144-155.

Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang YH, Homey B, Cao W, Wang YH, Su B, Nestle FO, Zal T, Mellman I, Schröder JM, Liu YJ, Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature*. 2007; 449:564-569.

Larsen M, Artym VV, Green JA, Yamada KM. The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 2006 Oct;18(5):463-71.

Le Y, Cao W, Zhou L, Fan X, Liu Q, Liu F, et al. Infection of mycobacterium tuberculosis promotes both m1/m2 polarization and mmp production in cigarette smoke-exposed macrophages. *Front Immunol*. 2020;11:1902.

Lee SJ, Song L, Yang MC, Mao CP, Yang B, Yang A, Jeang J, Peng S, Wu TC, Hung CF. Local administration of granulocyte macrophage colony-stimulating factor induces local accumulation of dendritic cells and antigen-specific CD8+ T cells and enhances dendritic cell cross-presentation. *Vaccine*. 2015 Mar 24;33(13):1549-55.

Leite J. Doença de Jorge Lobo. Contribuição ao seu estudo anátomo-patológico. 1954. Universidade Federal do Pará, 1954.

Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Fouser LA. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med*. 2006;

203:2271-2279.

Lima WC, Gadelha SQ, Souza MLG, Figueiras VV. Lobomycosis: exuberant presentation with malignant transformation. *An Bras Dermatol.* 2021;96(6):762-4.

Liu Y, Zhang W, An J, Li H, Liu S. Cutaneous intravascular natural killer-cell lymphoma: a case report and review of the literature. *Am J Clin Pathol.* 2014; 142:243-247.

Lobo J. Um caso de blastomicose, produzido por uma espécie nova, encontrada em Recife. *Rev Med Pernamb.* 1931;1:763-75.

Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 2001;104(4):487-501.

Loewenthal IJ. anatomy and histochemistry of skin 1961. *Dermatológica.*1963; 126:380-387.

López-Otín C, Bond JS. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J Biol Chem.* 2008 Nov 7;283(45):30433-7.

Loureiro AA, de Brito AC. Micose de Jorge Lobo de localização insólita [Jorge Lobo's mycosis of unusual location]. *An Bras Dermatol.* 1971 Jan-Mar;46(1):1-6.

Lowes MA, Chamian F, Abello MV, Fuentes-Duculan J, Lin SL, Nussbaum R, Novitskaya I, Carbonaro H, Cardinale I, Kikuchi T, Gilleaudeau P, Sullivan-



Whalen M, Wittkowski KM, Papp K, Garovoy M, Dummer W, Steinman RM, Krueger JG. Increase in TNF-alpha and inducible nitric oxide synthase-expressing dendritic cells in psoriasis and reduction with efalizumab (anti-CD11a). *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102:19057-19062.

Lowes MA, Suárez-Fariñas M, Krueger JG. Immunology of psoriasis. *Annu Rev Immunol*. 2014; 32:227-55.

Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011 Dec 1;3(12):a005058.

Luger TA, Schwarz T. Evidence for an epidermal cytokine network. *J Invest Dermatol*. 1990; 95:100-104.

Lupi O, Tying SK, McGinnis MR. Tropical dermatology: fungal tropical diseases. *J Am Acad Dermatol*. 2005;53(6):931-51.

Machado P. Polimorfismo das lesões dermatológicas na blastomicose de Jorge Lobo entre os índios Caiabi. *Acta Amaz*. 1972;2:93-7.

Malissen B, Tamoutounour S, Henri S. The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. *Nat Rev Immunol*. 2014; 14:417-428.

Marcos EV, Souza FC, Torres EA, Lauris JR, Opromolla DV. Estudo de associação entre antígenos leucocitários humanos e doença de Jorge Lobo [Study of the association between human leukocyte antigens and Jorge Lobo's disease]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005 Sep-Oct;38(5):399-401.

McDonald DR. TH17 deficiency in human disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2012; 129: 1429-1435

Merad M, Ginhoux F, Collin M. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8:935-947.

Migaki G, Valerio MG, Irvine B, Garner FM. Lobo's disease in an atlantic bottle-nosed dolphin. *J Am Vet Med Assoc.* 1971 Sep;159(5):578-82.

Mincione G, Di Marcantonio MC, Tarantelli C, D'Inzeo S, Nicolussi A, Nardi F, Donini CF, Coppa A. EGF and TGF- $\beta$ 1 Effects on Thyroid Function. *J Thyroid Res.* 2011;2011:431718.

Modlin RL, Hofman FM, Taylor CR, Rea TH. T lymphocyte subsets in the skin lesions of patients with leprosy. *J Am Acad Dermatol.* 1983 Feb;8(2):182-9.

Moore KW, Malefyt RD, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001;9:683-765.

Morgan MR, Humphries MJ, Bass MD. Synergistic control of cell adhesion by integrins and syndecans. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Dec;8(12):957-69.

Mort RL, Jackson IJ, Patton EE. The melanocyte lineage in development and disease. *Development.* 2015; 142:620-632.

Nagao K, Ginhoux F, Leitner WW, Motegi S, Bennett CL, Clausen BE, Merad M, Udey MC. Murine epidermal Langerhans cells and langerin-expressing dermal dendritic cells are unrelated and exhibit distinct functions. *Proc Natl*

Acad Sci USA. 2009; 106:3312-3317.

Navarini AA, Satoh TK, French LE. Neutrophilic dermatoses and autoinflammatory diseases with skin involvement--innate immune disorders.; Semin Immunopathol. 2016 Jan;38(1):45-56.

Nestle FO, Di Meglio P, Qin JZ, Nickoloff BJ. Skin immune sentinels in health and disease. Nat Rev Immunol. 2009; 9: 679-691.

Newton K, Dixit VM. Signaling in innate immunity and inflammation. Cold Spring arb Perspect Biol. 2012; 4:a006049.

Nickoloff BJ, Turka LA. Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes. Immunol Today. 1994; 15:464-469.

Nogales KE, Zaba LC, Shemer A, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Kikuchi T, Ramon M, Bergman R, Krueger JG, Guttman-Yassky E. IL-22-producing "T22" T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells. J Allergy Clin Immunol. 2009; 123:1244-1252.

Norton SA. Dolphin-to-human transmission of lobomycosis? J Am Acad Dermatol. 2006 Oct;55(4):723-4.

Ogawa MM, Mariano M, Silva MRR, Enokihara MMSS, Michalany NS, Nishikaku AS, et al. Study of tissue inflammatory response in different mice strains infected by dematiaceous fungi *Fonsecaea pedrosoi*. An Bras Dermatol. 2019;94(1):29-36.

Oliveira Carneiro FR, da Cunha Fischer TR, Brandão CM, Pagliari C, Duarte MI, Quaresma JA. Disseminated infection with *Lacazia loboi* and immunopathology of the lesional spectrum. *Hum Pathol*. 2015 Feb;46(2):334-8.

Opdenakker G, Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Van Coillie E, Masure S, Proost P, Van Damme J. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol*. 2001 Jun;69(6):851-9.

Opromolla DVA, Taborda PRO, Taborda VBA, Viana S, Furtado JF. Lobomycose: relato de 40 casos novos. *An Bras Dermatol*. 1999;74:135-41.

O'Reilly S. Innate immunity in systemic sclerosis pathogenesis. *Clin Sci (Lond)*. 2014; 126:329-337.

Overall CM, Tam EM, Kappelhoff R, Connor A, Ewart T, Morrison CJ, Puente X, López-Otín C, Seth A. Protease degradomics: mass spectrometry discovery of protease substrates and the CLIP-CHIP, a dedicated DNA microarray of all human proteases and inhibitors. *Biol Chem*. 2004 Jun;385(6):493-504.

Overall CM. Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites. *Mol Biotechnol*. 2002 Sep;22(1):51-86.

Pagliari C, Kanashiro-Galo L, Silva AA, Barboza TC, Criado PR, Duarte MI, Brito AC, Xavier MB, Unger D, Maria Moraes Oliveira C, Quaresma JA, Sotto MN. Plasmacytoid dendritic cells in cutaneous lesions of patients with chromoblastomycosis, lacaziosis, and paracoccidioidomycosis: a comparative

analysis. *Med Mycol.* 2014 May;52(4):397-402.

Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci.* 2002 Oct 15;115(Pt 20):3861-3.

Paolini C, Agarbati S, Benfaremo D, Mozzicafreddo M, Svegliati S, Moroncini G. PDGF/PDGFR: A Possible Molecular Target in Scleroderma Fibrosis. *Int J Mol Sci.* 2022 Mar 31;23(7):3904.

Papadavid E, Dalamaga M, Kapniari I, Pantelidaki E, Papageorgiou S, Pappa V, Tsirigotis P, Dervenoulas I, Stavrianeas N, Rigopoulos D. Lobomycosis: A case from Southeastern Europe and review of the literature. *J Dermatol Case Rep.* 2012 Sep 28;6(3):65-9.

Passero LFD, Cavallone IN, Belda Jr W. Reviewing the etiologic agents, microbe-host relationship, immune response, diagnosis, and treatment in chromoblastomycosis. *J Immunol Res.* 2021:9742832.

Pastore S, Mascia F, Mariani V, Girolomoni G. The epidermal growth factor receptor system in skin repair and inflammation. *J Invest Dermatol.* 2008 Jun;128(6):1365-74.

Paulsson M. Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1992;27(1-2):93-127.

Peng WJ, Yan JW, Wan YN, Wang BX, Tao JH, Yang GJ, Pan HF, Wang J. Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in systemic sclerosis. *J Clin Immunol.* 2012 Dec;32(6):1409-14.

Perera GK, Di Meglio P, Nestle FO. Psoriasis. *Annu Rev Pathol.* 2012;7:385-422.

Poulin LF, Henri S, de Bovis B, Devilard E, Kissenpfennig A, Malissen B. The dermis contains langerin+ dendritic cells that develop and function independently of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med.* 2007; 204:3119-3131.

Poumay Y, Mitev V. Members of the EGF receptor family in normal and pathological epidermis. *Folia Med (Plovdiv).* 2009 Jul-Sep;51(3):5-17.

Pradinaud R. Entre le Yucatan, la Floride et la Guyane Française, la lobomycose existe-t-elle aux Antilles? [Between Yucatan, Florida and French Guiana does lobomycosis exist in the Antilles?]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales.* 1984 May-Jun;77(3):392-400.

Pradinaud R. *Loboa lobo*. In: Collier L, Ballows A, Sussman M. (Ed.). *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections.* New York: Oxford University Press, 1998. p. 585-94.

Quaresma JA, de Oliveira E, Cardoso de Brito A. Is TGF-beta important for the evolution of subcutaneous chronic mycoses? *Med Hypotheses.* 2008;70(6):1182-5.

Quaresma JAS, Pagliari C, Medeiros DBA, Duarte MIS, Vasconcelos PFC. Immunity and immune response, pathology and pathologic changes: progress and challenges in the immunopathology of yellow fever. *Reviews in medical virology.* 2013 ; 23( 5): 305-318.

Quatresooz P, Paquet P, Hermanns-Lê T, Piérard GE. Molecular mapping of Factor XIIIa-enriched dendrocytes in the skin (Review). *Int J Mol Med*. 2008; 22:403-409.

Queiroz-Telles F, Hoog S, Santos DWCL, Salgado CG, Vicente VA, Bonifaz A, et al. Cromoblastomycosis. *Clin Microbiol Rev*. 2017b;30(1):233-73.

Rambukkana A, Salzer JL, Yurchenco PD, Tuomanen EI. Neural targeting of *Mycobacterium leprae* mediated by the G domain of the laminin- $\alpha$ 2 chain. *Cell*. 1997 Mar 21;88(6):811-21

Ramos-E-Silva M, Aguiar-Santos-Vilela F, Cardoso-de-Brito A, Coelho-Carneiro S. Lobomycosis. Literature review and future perspectives. *Actas Dermosifiliogr*. 2009 Nov;100 Suppl 1:92-100.

Raychaudhuri SK, Raychaudhuri SP, Weltman H, Farber EM. Effect of nerve growth factor on endothelial cell biology: proliferation and adherence molecule expression on human dermal microvascular endothelial cells. *Arch Dermatol Res*. 2001 Jun;293(6):291-5.

Ricard-Blum S, Faye C. Les collagènes associés aux membranes basales et leurs matricryptines [Collagens associated with basement membranes and their matricryptins]. *J Soc Biol*. 2005;199(4):321-8.

Roberts AB, Sporn MB. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Growth Factors*. 1993;8(1):1-9.

Rodríguez-Toro G. Lobomycosis. *Int J Dermatol*. 1993 May;32(5):324-32.

Romani N, Ebner S, Tripp CH, Flacher V, Koch F, Stoitzner P. Epidermal Langerhans cells--changing views on their function in vivo. *Immunol Lett.* 2006; 106:119-125.

Rosas-Ballina M, Olofsson PS, Ochani M, Valdés-Ferrer SI, Levine YA, Reardon C, Tusche MW, Pavlov VA, Andersson U, Chavan S, Mak TW, Tracey KJ. Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science.* 2011; 334:98-101.

Sabatier L, Chen D, Fagotto-Kaufmann C, Hubmacher D, McKee MD, Annis DS, Mosher DF, Reinhardt DP. Fibrillin assembly requires fibronectin. *Mol Biol Cell.* 2009 Feb;20(3):846-58.

Sampaio S, Rivitti E. Micoses profundas. In: *Dermatologia.* 3a. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2007. p. 733-5.

Schmitt D. Cutaneous immune system. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1994; 188:207-221.

Schuler G, Steinman RM. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med.* 1985; 161:526-546.

Schwarzbauer JE, DeSimone DW. Fibronectins, their fibrillogenesis, and in vivo functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Jul 1;3(7):a005041.

Serbina NV, Salazar-Mather TP, Biron CA, Kuziel WA, Pamer EG. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial



infection. *Immunity*. 2003; 19:59-70.

Sharma R, Das A. Organ-specific phenotypic and functional features of NK cells in humans. *Immunol Res*. 2014; 58:125-131.

Shen E, Wang M, Xie H, Zou R, Lin Q, Lai L, et al. Existence of Th22 in children and evaluation of IL-22 + CD4 + T, Th17, and other T cell effector subsets from healthy children compared to adults. *BMC Immunol*. 2016;17(1):20.

Shi X, Wang L, Clark JD, Kingery WS. Keratinocytes express cytokines and nerve growth factor in response to neuropeptide activation of the ERK1/2 and JNK MAPK transcription pathways. *Regul Pept*. 2013 Sep 10;186:92-103.

Shingaki K, Taniguchi M, Kanazawa S, Matsuzaki S, Maeda T, Miyata S, Kubo T, Torii K, Shiosaka S, Tohyama M. NGF-p75 and neuropsin/KLK8 pathways stimulate each other to cause hyperkeratosis and acanthosis in inflamed skin. *J Dermatol Sci*. 2012 Jul;67(1):71-3.

Shisler JL. Immune evasion strategies of molluscum contagiosum virus. *Adv Virus Res*. 2015;92:201-52.

Silva AAL, Criado PR, Nunes RS, Silva WLF, Kanashiro-Galo L, Duarte MIS, et al. In situ immune response in human chromoblastomycosis: a possible role for regulatory and Th17 T cells. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(9):e3162.

Silva ACCM, Serra Neto A, Galvão CES, Marques SG, Saldanha ACR, Silva CMP, et al. Cromoblastomicose produzida por *Fonsecaea pedrosoi* no Estado do Maranhão: I - aspectos clínicos, epidemiológicos e evolutivos. *Rev Soc*

Bras Med Trop. 1992;25(1):37-44.

Silva D. Traitement de la maladie de Lobo par la clofazimine (B 663) [Treatment of Lobo's disease with clofazimine (B 663)]. Bull Soc Pathol Exot Filiales. 1978 Nov-Dec;71(6):409-12.

Silverman JS, Tamsen A. CD34 and factor XIIIa-positive microvascular dendritic cells and the family of fibrohistiocytic mesenchymal tumors. Am J Dermatopathol. 1998; 20:533-536.

Siqueira IM, Wüthrich M, Li M, Wang H, Las-Casas LO, Castro RJA, et al. Early immune response against *Fonsecaea pedrosoi* requires dectin-2-mediated th17 activity, whereas th1 response, aided by treg cells, is crucial for fungal clearance in later stage of experimental chromoblastomycosis. PLoS Negl Trop Dis. 2020;14(6):e0008386.

Skaper SD. Nerve growth factor: a neuroimmune crosstalk mediator for all seasons. Immunology. 2017 May;151(1):1-15..

Sousa JR, Sousa RPM, Aarão TLS, Dias Jr LB, Carneiro FRO, Fuzii HT, et al. In situ expression of M2 macrophage subpopulation in leprosy skin lesions. Acta Trop. 2016;157:108-14.

Sousa JR, Vasconcelos PFC, Quaresma JAS. Functional aspects, phenotypic heterogeneity, and tissue immune response of macrophages in infectious diseases. Infect Drug Resist. 2019;12:2589-611.

Stamatas GN, Morello AP, Mays DA. Early inflammatory processes in the skin.

Curr Mol Med. 2013 Sep;13(8):1250-69.

Stefani MM, Guerra JG, Sousa AL, Costa MB, Oliveira ML, Martelli CT, Scollard DM. Potential plasma markers of Type 1 and Type 2 leprosy reactions: a preliminary report. BMC Infect Dis. 2009 May 27;9:75.

Stenken JA, Poschenrieder AJ. Bioanalytical chemistry of cytokines--a review. Anal Chim Acta. 2015 Jan 1;853:95-115.

Sterchi EE. Special issue: metzincin metalloproteinases. Mol Aspects Med. 2008 Oct;29(5):255-7.

Stoitzner P, Tripp CH, Eberhart A, Price KM, Jung JY, Bursch L, Ronchese F, Romani N. Langerhans cells cross-present antigen derived from skin. Proc Natl Acad Sci USA. 2006; 103:7783-7788.

Striz I. Cytokines of the IL-1 family: recognized targets in chronic inflammation underrated in organ transplantations. Clin Sci (Lond). 2017 Aug 10;131(17):2241-2256.

Symmers WS. A possible case of Lobo's disease acquired in Europe from a bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus*). Bull Soc Pathol Exot Filiales. 1983 Dec;76(5 Pt 2):777-84.

Taborda VB, Taborda PR, McGinnis MR. Constitutive melanin in the cell wall of the etiologic agent of Lobo's disease. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1999 Jan-Feb;41(1):9-12.

Talhari S, Talhari C, Azulay R. Doença de Jorge Lobo. In: Dermatologia. 4a.

ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 381-2.

Tam VC, Aderem A. Macrophage activation as an effector mechanism for cell-mediated immunity. *J Immunol.* 2014; 193:3183-3184.

Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016 Feb 1;97:4-27.

Tobin AM, Lynch L, Kirby B, O'Farrelly C. Natural killer cells in psoriasis. *J Innate Immun.* 2011; 3:403-410.

Tocchi A, Parks WC. Functional interactions between matrix metalloproteinases and glycosaminoglycans. *FEBS J.* 2013 May;280(10):2332-41.

Tomiotto-Pellissier F, Bortoleti BTS, Assolini JP, Gonçalves MD, Carloto ACM, Miranda-Sapla MM, et al. Macrophage polarization in leishmaniasis: broadening horizons. *Front Immunol.* 2018;9:2529.

Tončić RJ, Lipozenčić J, Martinac I, Gregurić S. Immunology of allergic contact dermatitis. *Acta Dermatovenerol Croat.* 2011; 19:51-68.

Tran M, Rousselle P, Nokelainen P, Tallapragada S, Nguyen NT, Fincher EF, Marinkovich MP. Targeting a tumor-specific laminin domain critical for human carcinogenesis. *Cancer Res.* 2008 Apr 15;68(8):2885-94.

Tzu J, Marinkovich MP. Bridging structure with function: structural, regulatory, and developmental role of laminins. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(2):199-214.

Ulland TK, Ferguson PJ, Sutterwala FS. Evasion of inflammasome activation by microbial pathogens. *J Clin Invest.* 2015; 125:469-477.

Valyi-Nagy I, Jensen PJ, Albelda SM, Rodeck U. Cytokine-induced expression of transforming growth factor-alpha and the epidermal growth factor receptor in neonatal skin explants. *J Invest Dermatol.* 1992 Sep;99(3):350-6.

van der Zee HH, de Ruyter L, van den Broecke DG, Dik WA, Laman JD, Prens EP. Elevated levels of tumour necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-10 in hidradenitis suppurativa skin: a rationale for targeting TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . *Br J Dermatol.* 2011 Jun;164(6):1292-8.

van Furth R, Nibbering PH, van Dissel JT, Diesselhoff-den Dulk MM. The characterization, origin, and kinetics of skin macrophages during inflammation. *J Invest Dermatol.* 1985; 85:398-402.

Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta and fibrosis. *World J Gastroenterol.* 2007 Jun 14;13(22):3056-62.

Vilani-Moreno FR, Belone AFF, Lara VS, Venturini J, Lauris JRP, Soares CT. Detection of cytokines and nitric oxide synthase in skin lesions of Jorge Lobo's disease patients. *Med Mycol.* 2011;49(6):643-8.

Vilani-Moreno FR, Belone AFF, Soares CT, Opromolla DVA. Immunohistochemical characterization of the cellular infiltrate in Jorge Lobo's disease. *Rev Iberoam Micol.* 2005;22(1):44-9.

Vilani-Moreno FR, Lauris JRP, Opromolla DVA. Cytokine quantification in the

supernatant of mononuclear cell cultures and in blood serum from patients with Jorge Lobo's disease. *Mycopathologia*. 2004;158(1):17-24.

Vilani-Moreno FR, Opromolla DVA. Determinação da viabilidade do *Paracoccidioides lobo* em biópsias de pacientes portadores da doença de Jorge Lobo. *An Bras Dermatol*. 1997;72(5):433-7.

Vilela R, Mendoza L. *Paracoccidioidomycosis ceti* (Lacaziosis/Lobomycosis) in Dolphins. In: *Emerging and Epizootic Fungal Infections in Animals*. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 177-96.

Waithman J, Allan RS, Kosaka H, Azukizawa H, Shortman K, Lutz MB, Heath WR, Carbone FR, Belz GT. Skin-derived dendritic cells can mediate deletional tolerance of class I-restricted self-reactive T cells. *J Immunol*. 2007; 179:4535-4541.

Wakita T, Shintani F, Yagi G, Asai M, Nozawa S. Combination of inflammatory cytokines increases nitrite and nitrate levels in the paraventricular nucleus of conscious rats. *Brain Res*. 2001 Jun 29;905(1-2):12-20.

Wang N, Liang H, Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Front Immunol*. 2014; 5:614.

Watanabe H, Gaide O, Pétrilli V, Martinon F, Contassot E, Roques S, Kummer JA, Tschopp J, French LE. Activation of the IL-1beta-processing inflammasome is involved in contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol*. 2007; 127:1956-1963.

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; 25:821-852.

Wegner J, Loser K, Apsite G, Nischt R, Eckes B, Krieg T, Werner S, Sorokin L. Laminin  $\alpha 5$  in the keratinocyte basement membrane is required for epidermal-dermal intercommunication. *Matrix Biol.* 2016 Dec;56:24-41.

Wollenberg A, Mommaas M, Oppel 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; 118:327-334

Wong RW, Guillaud L. The role of epidermal growth factor and its receptors in mammalian CNS. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004 Apr-Jun;15(2-3):147-56.

Woods WJ, Belone Ade F, Carneiro LB, Rosa PS. Ten years experience with Jorge Lobo's disease in the state of Acre, Amazon region, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2010 Sep-Oct;52(5):273-8.

Yang L. TGF-beta, a potent regulator of tumor microenvironment and host immune response, implication for therapy. *Curr Mol Med.* 2010; 10:374-380.

Yazdi AS, Ghoreschi K. The Interleukin-1 Family. *Adv Exp Med Biol.* 2016;941:21-29.

Yazdi AS, Ghoreschi K. The Interleukin-1 Family. *Adv Exp Med Biol.* 2016;941:21-29.

Yu WH, Yu S, Meng Q, Brew K, Woessner JF Jr. TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix. *J Biol Chem.* 2000 Oct 6;275(40):31226-32.

Yue B. Biology of the extracellular matrix: an overview. *J Glaucoma.* 2014 Oct-Nov;23(8 Suppl 1):S20-3.

Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007 Spring;45(2):27-37.

Zhao X, Deak E, Soderberg K, Linehan M, Spezzano D, Zhu J, Knipe DM, Iwasaki A. Vaginal submucosal dendritic cells, but not Langerhans cells, induce protective Th1 responses to herpes simplex virus-2. *J Exp Med.* 2003; 197:153-162.

Hsu SM, Raine L, Fanger H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol.* 1981 Jun;75(6):816-21.