

CLIVIA MARIA MORAES DE OLIVEIRA

**Análise comparativa do perfil citocínico Th22 na imunopatogenia da
doença de Jorge Lobo e cromomicose**

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

Programa de Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Juarez Antônio
Simões Quaresma

São Paulo

2022

CLÍVIA MARIA MORAES DE OLIVEIRA

**Análise comparativa do perfil citocínico Th22 na imunopatogenia da
doença de Jorge Lobo e cromomicose**

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

Programa de Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Juarez Antônio
Simões Quaresma

Versão Corrigida Conforme Resolução CoPGr6018/11

São Paulo

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira, Clivia Maria Moraes de
Análise comparativa do perfil citocínico Th22 na
imunopatogenia da doença de Jorge Lobo e cromomicose
/ Clivia Maria Moraes de Oliveira. -- São Paulo,
2022.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.
Orientador: Juarez Antônio Simões Quaresma.

Descritores: 1.Cromoblastomicose 2.Lobomicose
3.Doença de Jorge Lobo 4.Micoses subcutâneas
5.Imunologia

USP/FM/DBD-303/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

*Aos meus filhos, **João Victor e Maria Fernanda,**
razão principal da minha felicidade e meu maior incentivo.*

Agradecimentos

A **Deus** por tudo e tanto, sempre!

Ao meu amado pai, **Evandro Antônio Bentes de Oliveira**, meu xodó, meu melhor amigo, minha fonte de admiração, o qual sempre me ensinou que amor, humildade e espiritualidade são os alicerces da nossa vida.

À minha mãe querida, **Maria de Nazaré Moraes de Oliveira**, meu modelo de fortaleza e determinação, a qual, com seu exemplo, me instruiu que nossos bens mais preciosos são a família, a moral e a fé inabalável.

Ao meu filho, **João Victor**, meu amor, meu orgulho, meu presente de Deus, o qual me ensina, diariamente, com seu jeito carinhoso, sua leveza, coração puro e alma transparente, que a maternidade é a fonte genuína da felicidade.

À minha filha, **Maria Fernanda**, minha cúmplice, meu sonho realizado, minha melhor companhia, minha dádiva divina, a qual, com suas inúmeras qualidades, dá sentido à minha vida e é minha inspiração para me tornar uma pessoa melhor.

Ao meu orientador e amigo, **Juarez Simões Quaresma**, exímio médico e brilhante pesquisador, o qual me deu as mãos na busca à realização desse sonho e, com grande empenho, me auxiliou na construção desta tese.

Ao meu irmão, **Evandro Antônio Bentes de Oliveira Jr**, meu maior exemplo de superação, o qual, com a imensidão e pureza do nosso amor fraterno, me acalenta, transborda meu coração de afeto e me ensina, diariamente, o poder da fé e da resiliência.

À minha irmã, **Maria do Socorro Oliveira Portela**, muito mais que amiga, minha alma gêmea, a qual é a bússola imprescindível no meu suporte emocional e minha inspiração em toda a minha jornada na busca de conhecimentos.

Aos meus primos-irmãos **Andressa, Thais, Melissa, Larissa, Antônio Carlos Filho e Victor**, meus parceiros de vida e confidentes fieis, os quais só dão orgulho à minha família e invadem a minha vida com amor genuíno e bons exemplos.

Aos funcionários do Serviço de Dermatologia da Universidade de São Paulo, em especial à **Ruth, Maria Auxiliadora e Marcelo** que, com carinho e dedicação, muito me auxiliaram na realização deste trabalho.

Aos **pacientes anônimos** que fizeram parte da minha pesquisa, os quais foram imprescindíveis no auxílio à realização desta pesquisa.

*“Concretizar um ideal é atingir a felicidade.
Execute tua profissão com dignidade e consciência.”
Clivia Trindade Moraes - minha avó materna*

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. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertação, 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, Valeria Vilhena. 3a. ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Sumário

Lista de figuras

Lista de quadros

Lista de abreviaturas e siglas

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Doença de Jorge Lobo.....	2
1.1.1 Conceito.....	2
1.1.2 Sinonímias.....	3
1.1.3 Histórico.....	3
1.1.4 Etiologia.....	5
1.1.5 Epidemiologia.....	8
1.1.6 Patogenia.....	10
1.1.7 Aspectos clínicos.....	11
1.1.8 Diagnósticos diferenciais.....	15
1.1.9 Diagnóstico laboratorial.....	15
1.1.9.1 <i>Micológico</i>	15
1.1.9.2 <i>Cultura</i>	15
1.1.9.3 <i>Histopatológico</i>	15
1.1.10 Terapêutica.....	18
1.2 Cromomicose.....	19
1.2.1 Conceito.....	19
1.2.2 Sinonímias.....	19
1.2.3 Histórico.....	20
1.2.4 Etiologia.....	21
1.2.5 Epidemiologia.....	23
1.2.6 Aspectos clínicos.....	25
1.2.7 Diagnósticos diferenciais.....	28
1.2.8 Diagnóstico laboratorial.....	28
1.2.8.1 <i>Micológico</i>	28
1.2.8.2 <i>Cultura, microcultivo e técnicas de biologia molecular</i>	28

1.2.8.3 <i>Histopatológico</i>	29
1.2.8.4 <i>Microscopia confocal</i>	30
1.2.8.5 <i>Imunodiagnose</i>	30
1.2.9 Terapêutica.....	30
1.3 O padrão da resposta imune nas micoses cutâneas	34
1.4 Células Th22	44
2 JUSTIFICATIVA	51
3 OBJETIVOS	53
3.1 Objetivo geral.....	53
3.2 Objetivos específicos.....	53
4 MÉTODOS	54
4.1 Tipo de estudo.....	54
4.2 Descrição da população.....	54
4.3 Parecer de ética.....	54
4.4 Processo para obtenção dos dados.....	54
4.5 Seleção de pacientes.....	55
4.5.1 Critérios de inclusão.....	55
4.5.2 Critério de exclusão.....	55
4.6 Controles.....	55
4.7 Técnica de imunomarcção no tecido.....	56
4.8 Análise quantitativa.....	57
4.9 Análise estatística.....	57
4.10 Documentação fotográfica.....	58
5 RESULTADOS	59
5.1 Resultados clínico-epidemiológicos.....	59
5.2 Resultados imuno-histoquímicos.....	60
5.3 Resultados estatísticos.....	62
6 DISCUSSÃO	68
7 CONCLUSÕES	78
8 ANEXOS	79
9 REFERÊNCIAS	84

Lista de figuras

Figura 1	Aspectos clínicos da doença de Jorge Lobo.....	14
Figura 2	Aspectos clínicos da CBM.....	26
Figura 3	Fontes e alvos celulares dos membros da família IL-10.....	46
Figura 4	Padrão de imunomarcacão por imuno-histoquímica para citocinas de perfil Th22 em lesões cutâneas da DJL.....	61
Figura 5	Padrão de imunomarcacão por imuno-histoquímica para citocinas de perfil Th22 em lesões cutâneas da CBM.....	62
Figura 6	Análise quantitativa para a imunomarcacão de TNF- α , IL-10, IL-13, IL-22 e FGF b na DJL comparada ao controle.....	65
Figura 7	Análise quantitativa para a imunomarcacão do perfil Th22 (TNF- α , IL-10, IL-13, IL-22 e FGF b) na CBM comparada ao controle.....	66
Figura 8	Análise quantitativa comparativa para a imunomarcacão do perfil Th22 (TNF- α , IL-10, IL-13, IL-22 e FGF b) na DJL, CBM comparada ao controle.....	67
Figura 9	Influência do perfil Th22 na imunopatogenia da infecção na DJL e CBM, com liberaçao das citocinas IL-13, IL-22, IL-10, FGF b e TNF- α levando ao dano tecidual.....	77

Lista de tabelas

Tabela 1	Técnica para imunomarcção no tecido com anticorpos específicos.....	56
Tabela 2	Características epidemiológicas dos casos de CBM: sexo, idade, localização da lesão e procedência.....	59
Tabela 3	Características epidemiológicas dos casos de DJL: sexo, idade, localização da lesão e procedência.....	60
Tabela 4	Análise dos 17 casos de CBM quanto ao gênero, faixa etária, localização das lesões e procedência.....	63
Tabela 5	Análise dos 16 casos de DJL quanto ao gênero, faixa etária, localização das lesões e procedência.....	64

Lista de abreviaturas e siglas

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
APC	Célula apresentadora de antígeno
BSA	Soro albumina bovina
CBM	Cromoblastomicose
CCR	Receptor de quimiocina C-C
CEC	Carcinoma espinocelular
CLR	Receptores de lectina C
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CO ₂	Gás carbônico
DF-BE	Diacetato de fluoresceína e brometo de etídeo
DJL	Doença de Jorge Lobo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNCB	Dinitroclorobenzeno
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ETE	Eliminação transepitelial
EUA	Estados Unidos da América
FA	Forma do adulto
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
FJ	Forma juvenil
HO	Hipótese de nulidade
H1	Hipótese alternativa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HE	Hematoxilina-eosina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IA	Infecção assintomática
IC	Intervalo de confiança
IFN	Interferon
IFN- γ	Interferon-gama
IgG	Imunoglobulina-G
IL	Interleucina
IL-2	Interleucina-2

iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
ISHAM	<i>International Society for Human & Animal Mycology</i>
ITZ	Itraconazol
KOH	Hidróxido de potássio
LES	Lupus eritematoso sistêmico
LSAB	<i>Labeled Streptavidin-biotin Method</i>
MCH	Hemoglobina corpuscular média
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MINCLE	<i>Macrophage Inducible C-type lectin</i>
MMII	Membros inferiores
MMPs	Metaloproteínas
MMSS	Membros superiores
NK	<i>Natural killer</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMP	Padrão molecular associado ao patógeno
PAS	Ácido periódico de Schiff
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
PCM	Paracoccidioidomicose
PCR	Proteína C reativa
PRR	Receptores de reconhecimento padrão
RAB5	<i>Rabbit polyclonal antibody</i>
RCA	<i>Rolling Circle Amplification</i>
TCR	Receptor de antígenos de células T
TGF- β	Fator transformador de crescimento beta
TIMPs	Inibidor tissular de metaloproteinases
TLRs	Receptores do tipo <i>Toll</i>
TLR 7	Receptor <i>Toll-like 7</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	T reguladores
UFPA	Universidade Federal do Pará
ZAUM	Centro de Alergia e Meio Ambiente

Resumo

Oliveira CMM. *Análise comparativa do perfil citocínico Th22 na imunopatogenia da doença de Jorge Lobo e cromomicose* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Cromomicose e doença de Jorge Lobo são micoses subcutâneas que, a despeito de serem causadas por distintos agentes etiológicos, apresentam similaridade clínica manifestando-se como doença localizada, sobretudo nos membros inferiores, de evolução crônica e êxito terapêutico não totalmente eficaz. Seus agentes etiológicos podem sofrer o fenômeno de eliminação transepitelial e apresentam melanina constitutiva na parede celular, apesar de o fungo causador da doença de Jorge Lobo não ser demáceo, o que confere resistência aos oxidantes produzidos por macrófagos, diminuindo a capacidade de eliminar o patógeno. Em virtude da cronicidade da doença de Jorge Lobo e cromomicose, 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 em ambas as doenças, pouco sabemos sobre a participação e o possível papel de novos perfis citocínicos na evolução das lesões nestas micoses profundas. Realizou-se a avaliação da participação da resposta Th22 nas lesões cutâneas de doença de Jorge Lobo e cromomicose através da expressão tecidual de citocinas, utilizando a marcação imuno-histoquímica para IL-22, TNF- α , IL-10, IL-13, FGF básico, comparando-as entre as doenças e com o grupo controle. Foram também analisadas as características clínico-demográficas dos pacientes investigados. Dos 17 pacientes portadores de cromomicose analisados, 94.1% eram do gênero masculino, 70.58% tinham entre 40 e 60 anos, em relação à localização das lesões 88.2% eram nos membros inferiores e 11.76% nos membros superiores, sendo todos os pacientes paraenses. 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 o predomínio da

expressão do perfil Th22 caracterizado pela imunomarcagem das citocinas pesquisadas no tecido dos pacientes com doença de Jorge Lobo e cromomicose, comparado ao controle. Quando as doenças foram comparadas, não foi observada diferença estatística condizente com expressão da IL-13 e IL-22, no entanto, na doença de Jorge Lobo, a quantificação da IL-10 e do FGF básico foi mais acentuada com diferença significativa quando comparada à cromomicose e a quantificação do TNF- α foi mais expressiva na cromomicose em comparação com a doença de Jorge Lobo. Dessa forma, o estudo de citocinas do perfil Th22 *in situ* revelou que, em ambas as doenças, os marcadores pesquisados corroboram com resposta compensatória ao dano tecidual acentuado produzido pelo perfil Th1 e Th17, com resposta microbicida eficiente. Por outro lado, o perfil Th22 encontra no Th2 e Treg o sinergismo para mediar a resposta anti-inflamatória que contribui para a construção de uma resposta granulomatosa para a geração de lesões verrucosas, quadros de hiperplasia pseudoepiteliomatosa e fibrose, observada nas lesões dos pacientes. Apesar desses novos achados, ainda há muitas incertezas sobre o assunto, o que suscita mais estudos para investigar as correlações subjacentes entre os perfis Th e a doença de Jorge Lobo e cromomicose, na tentativa de auxiliar no grande obstáculo do insucesso terapêutico da maioria dos pacientes.

Descritores: Cromoblastomicose; Lobomicose; Doença de Jorge Lobo; Micoses subcutâneas; Imunologia.

Abstract

Oliveira CMM. *Comparative analysis of the Th22 cytokine profile in the immunopathogenesis of Jorge Lobo's disease and chromomycosis* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Chromomycosis and Jorge Lobo's disease are subcutaneous mycoses that, despite being caused by different etiological agents, present clinical similarity manifesting themselves as a localized disease, mainly in the lower limbs, with a chronic evolution and therapeutic results not entirely effective. Their etiologic agents may undergo the phenomenon of transepithelial elimination and present constitutive melanin on the cell wall, despite the fact that the fungus causing Jorge Lobo's disease is not dematiaceous, which brings about resistance to oxidants produced by macrophages, reducing the ability to eliminate the pathogen. Due to the chronicity of Jorge Lobo's disease and chromomycosis, with the permanence of the fungus in the tissue for a long period, the activation of the host's immune system is of paramount importance 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 new cytokine profiles in the evolution of lesions in such deep mycoses. Participation of the Th22 response in the skin lesions of Jorge Lobo's disease and chromomycosis was evaluated through the tissue expression of cytokines, using immunohistochemical blot for IL-22, TNF- α , IL-10, IL-13, basic FGF, comparing them between the diseases and with the control group. The clinical-demographic characteristics of the investigated patients were also analyzed. Out of the 17 patients with chromomycosis analyzed, 94.1% were male, 70.58% were between 40 and 60 years old, and in regards to the location of the lesions, 88.2% were in the lower limbs and 11.76% in the upper limbs, wherein all patients were from Pará [State]. Out of the 16 patients with Jorge Lobo's disease analyzed, 81.25% were male, 81.25% were between 40 and 60 years of age and the location of the lesions in 43.75% of the cases was in the lower limbs, 25% on the ear, all patients being from Pará [State]. There was a clear predominance of the expression of the Th22 profile characterized by the

immunoblot of the cytokines investigated in the tissue of patients with Jorge Lobo's disease and chromomycosis, compared to the control group. When the diseases were compared, no statistical difference was observed consistent with the expression of IL-13 and IL-22; however, in Jorge Lobo's disease, the quantification of IL-10 and of basic FGF was more pronounced, with a significant difference when compared to chromomycosis, and TNF- α quantification was more significant in chromomycosis as compared to Jorge Lobo's disease. Thus, the study of cytokines of the Th22 profile in situ revealed that in both diseases, the markers investigated confirm a compensatory response to the enlarged tissue damage produced by the Th1 and Th17 profile, with an efficient microbicidal response. On the other hand, the Th22 profile finds synergism in Th2 and Treg to mediate the anti-inflammatory response that contributes to the construction of a granulomatous response, to the generation of verrucous lesions, cases of pseudoepitheliomatous hyperplasia and fibrosis, observed in the lesions of patients. Such new findings notwithstanding, there are still many uncertainties on the subject, which calls for further studies to investigate the underlying correlations between the Th profiles and Jorge Lobo's disease and chromomycosis, in an attempt to address the major obstacle of therapeutic failure in most patients.

Descriptors: Chromoblastomycosis; Lobomycosis; Jorge Lobo's disease; Subcutaneous Mycoses; Immunology.

1 INTRODUÇÃO

As micoses subcutâneas incluem um grupo heterogêneo de infecções fúngicas que se desenvolvem no local do trauma transcutâneo sendo mais prevalente nos trópicos. Os fungos causais são saprófitos do solo, de epidemiologia regional, cuja capacidade de adaptação ao hospedeiro é extremamente variável (Opromolla; Baruzzi, 2005; Queiroz-Telles et al., 2017a).

A infecção evolui lentamente à medida que o agente etiológico sobrevive e se adapta ao ambiente tecidual do hospedeiro. O diagnóstico baseia-se na apresentação clínica, histopatologia e cultura dos agentes etiológicos. Tem como características a evolução crônica, o difícil tratamento e, por vezes, pode requerer intervenções cirúrgicas (Marcos et al., 2005).

As principais infecções fúngicas subcutâneas são esporotricose, cromoblastomicose, micetoma, doença de Jorge Lobo, rinosporidiose, zigomicose subcutânea e feohifomicose subcutânea (Talhari, 1995; Queiroz-Telles et al., 2017a).

Nesta abordagem, vamos considerar a cromoblastomicose (CBM), também chamada de cromomicose, e a doença de Jorge Lobo (DJL) micoses subcutâneas que, a despeito de serem causadas por distintos agentes etiológicos, apresentam similaridade clínica evoluindo como doença localizada, sobretudo nos membros inferiores, de evolução crônica e êxito terapêutico não totalmente eficaz. Ambos os agentes etiológicos das doenças apresentam melanina constitutiva na sua parede celular, apesar de o fungo causador da DJL não ser um fungo demáceo, o que confere resistência aos oxidantes produzidos por macrófagos, diminuindo a capacidade de eliminar o fungo. Além disso, durante a evolução da infecção, o fenômeno de eliminação transepitelial (ETE) do agente etiológico pode ser observado em ambas as doenças (Brito; Quaresma, 2007; Queiroz-Telles et al., 2017b).

Em virtude da cronicidade da DJL e CBM com permanência do fungo no tecido por longo período, é de suma importância a ativação do sistema imunológico do hospedeiro. O tipo de reação tecidual encontrado em cada uma das infecções com suas particularidades reflete a incapacidade das células

fagocíticas na eliminação completa dos agentes etiológicos (Brito; Quaresma, 2007; Passero et al., 2021).

As expressões clínicas em ambas as doenças variam de acordo com a resposta imunológica do paciente, e os mecanismos de defesa influenciam no surgimento e na gravidade dessas infecções fúngicas. Apesar de a resposta imunológica do hospedeiro nessas micoses subcutâneas ser de extrema importância, grande parte dos trabalhos publicados aborda a evolução dessas infecções, baseada, sobretudo, no padrão clássico de expressão de citocinas, sendo poucos os relatos bibliográficos que abordam o papel de novos perfis citocínicos e sua correlação com a resposta imune ao agente infeccioso, bem como sua relação com a evolução da doença (Opromolla et al., 2003; Breda et al., 2021).

Diante dessa complexidade, novas abordagens na imunopatogênese dessas infecções podem auxiliar a desvendar distintas interpretações nos mecanismos fisiopatológicos e imunológicos e a elucidar lacunas do conhecimento ainda não preenchidas no espectro evolutivo da DJL e da CBM.

1.1 Doença de Jorge Lobo

1.1.1 Conceito

A doença de Jorge Lobo (DJL) é uma micose cutânea-subcutânea, de evolução crônica e prognóstico bom quanto à vida, porém reservado quanto à regressão das lesões. É considerada uma micose negligenciada sendo causada por um fungo patogênico obrigatório chamado de *Lacazia loboi* e manifesta-se clinicamente por lesões de aspecto queloidiano que podem acometer qualquer área do tegumento, mas incidem principalmente nos membros inferiores, pavilhão auricular e membros superiores. Predomina entre os países da região amazônica, sobretudo a brasileira, com escassos relatos na Europa, Estados Unidos e Canadá (Opromolla et al., 2003; Marcos et al., 2005; Florian et al., 2020, Brito et al., 2022).

1.1.2 Sinonímias

A doença tem diversas nomenclaturas: Micose de Jorge Lobo, Blastomicose tipo Jorge Lobo, Blastomicose queloidiana, Blastomicose amazônica, Blastomicose queloidiforme de Lobo, Mal de Jorge Lobo, Enfermidade de Jorge Lobo, Doença de Jorge Lobo, Granulomatose blastomicoide, lepra-dos-caiabi, falsa-lepra, “miraip” e “piraip”, Lobomicose e, mais recentemente, Lacaziose (Opromolla; Baruzzi, 2005).

1.1.3 Histórico

Em 1931, no Recife (Pernambuco), Jorge de Oliveira Lobo, médico e professor de Dermatologia da Faculdade de Medicina do Recife descreveu um novo tipo de micose num paciente masculino, seringueiro, de 52 anos de idade, procedente do Amazonas, com lesões cutâneas de aspecto multinodular, confluentes e endurecidas na região lombossacral, com 19 anos de evolução, a qual denominou, àquela época, de Blastomicose queloidiforme, constituindo-se no primeiro relato da doença (Rodriguez-Toro, 1989; Pradinaud, 1998).

Em 1938, o patologista Amadeu Fialho observou o segundo caso em paciente masculino de 55 anos, também natural do estado do Amazonas, com lesões de aspecto queloidiano no pavilhão auricular, com 12 anos de evolução e denominou a doença de Blastomicose tipo Jorge Lobo (Fialho, 1938). Rocha et al., em 1941, apresentaram o terceiro caso procedente da Amazônia, ressaltando o aspecto queloidiano das lesões (Rocha et al., 1941).

Fonseca Filho e Leão (1940) contribuíram com os novos conceitos da doença descrevendo aspectos culturais e sistemáticos, os quais permitiram classificar o fungo num novo gênero e espécie: *Glenosporella lobo* (Fonseca; Lacaz, 1971).

O primeiro relato descrito fora do Brasil foi na Costa Rica, por Trejos e Romero em 1953 e corresponde ao 11º caso mundial. Na sequência, outros casos foram descritos fora do território brasileiro, como no Panamá em 1955, na Venezuela em 1958, na Colômbia em 1958, na Guiana Francesa em 1960, no Suriname em 1965, no Peru em 1972, na Guiana Inglesa em 1976, no

México em 1978 e em Honduras e Equador em 1986 (Talhari, 1995; Brito; Quaresma, 2007).

Em 2000, foi descrito o primeiro caso de DJL nos Estados Unidos (EUA) em paciente de 42 anos, residente na Geórgia, que havia viajado 7 anos antes para a Venezuela, onde praticara rapel em região de cachoeiras. O paciente apresentou, inicialmente, uma pequena pústula que evoluiu gradativamente de tamanho e adquiriu aspecto queloidiano, localizada na parede torácica direita, próxima à linha axilar. A lesão foi completamente excisada na cirurgia (Burns et al., 2000).

Arju et al. (2014) descreveram um caso de um residente de Nova York que apresentou vários nódulos de pele em ambos os braços e antebraços e foi, posteriormente, diagnosticado com a DJL. Este caso foi difícil inicialmente, pois esta infecção fúngica é incomum nos EUA. No entanto, com a frequência cada vez maior de viagens internacionais, novos casos de DJL foram diagnosticados em áreas de não-endemicidade, como os EUA, Europa e África do Sul. As histórias clínicas de tais infecções fúngicas importadas frequentemente demonstram os seus longos períodos de latência (Florian et al., 2020).

A DJL foi considerada como confinada geograficamente à América Latina até 1971, quando foi reportado o primeiro caso em golfinho, da espécie *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821), capturado na costa oeste da Flórida. Esse golfinho foi encontrado em condição de moribundo, com lesões nódulo-ulceradas, com numerosas células fúngicas encontradas na autópsia. Simultaneamente a esta observação, novos golfinhos com lesões queloidianas em várias partes do corpo foram observados na Flórida (Caldwell et al., 1975). Ao todo, até o momento, oito golfinhos foram observados com a DJL, sendo sete da espécie *Tursiops truncatus* e um da espécie *Sotalia guianensis* (Van Beneden, 1862) e foram capturados na costa da Espanha, Suriname, Flórida e Brasil (Taborda PR et al., 1999; Herr et al., 2001; Félix et al., 2019; Garcia et al., 2019).

1.1.4 Etiologia

O parasita causador da doença é um fungo imperfeito que, nas lesões cutâneas, se apresenta sob a forma unicelular, globosa ou elíptica, tipo leveduriforme, com parede espessa, de duplo contorno, refringente e citoplasma de aspecto granular ou homogêneo, com ou sem ramificações em cadeia, com três ou mais células conectadas por pequenos e estreitos túbulos, conferindo um aspecto de rosário catenulado ou em colar de contas. Mede em média 6 a 12 µm de diâmetro, multiplica-se por brotamento simples ou múltiplo e pode apresentar-se sob a forma de halteres, onde as células são unidas entre si por um tubo conector, além de apresentarem formas espiculares, semelhantes a ouriços (Herr et al., 2001; Azulay; Azulay, 2017).

É um parasita intracelular, residindo, principalmente, nos vacúolos macrofágicos, sendo encontrados ao exame direto e ao histopatológico em quantidade abundante e pode ser realçado pelos métodos do ácido periódico de Schiff (PAS) e prata-metenamina (Grocott-Gomori) (Fonseca; Lacaz, 1971; Brito; Quaresma, 2007).

A posição taxonômica do fungo foi amplamente discutida, sobretudo por ele nunca ter sido cultivado. Inúmeras nomenclaturas já foram propostas para o agente etiológico, a citar *Glenosporella lobo* (Fonseca Filho; Leão, 1940), *Blastomyces brasiliensis* (Conant; Howell, 1941), *Glenosporopsis amazonica* (Fonseca Filho, 1943), *Paracoccidioides lobo* (Almeida; Lacaz, 1949), *Blastomyces lobo* (Langeron; Vanbreuseghem, 1952), *Loboa lobo* (Ciferri et al., 1956) *Lobomyces lobo* (Borelli, 1968) (Lacaz et al., 1994; Pradinaud; Talhari, 1996; Herr et al., 2001). Tabora PR et al. (1999) propuseram a designação *Lacazia lobo* em homenagem ao Professor Carlos da Silva Lacaz, um dos pesquisadores que se dedicaram ao estudo desta micose a qual é utilizada na atualidade.

O *Lacazia lobo* é um parasita que pertence ao reino Fungi e se encontra na ordem dos *Onygenales*, à semelhança de outros fungos patógenos sistêmicos dimórficos como *Histoplasma capsulatum var capsulatum*, *Histoplasma capsulatum var duboisii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chrysosporium parvum* e *Paracoccidioides brasiliensis*, com quem tem a maior proximidade

taxonômica. Essa análise filogenética, através de biologia molecular, utilizou a amplificação da subunidade 18S do ácido desoxirribonucleído (DNA) ribossomal e 600 p.b. do gene da quitina sintetase-2 do DNA genômico das células leveduriformes e foi realizada por Herr et al. (2001).

A proximidade filogenética entre o *Lacazia loboi* e o *P.brasiliensis* poderia explicar por que o agente da Paracoccidioidomicose (PCM), por vezes, aparece em cadeias de pequenas células leveduriformes conectadas por tubos à semelhança do agente da DJL (Herr et al., 2001).

Apesar de o *L. loboi* possuir pigmento melânico nas suas paredes celulares, mais bem observado pela técnica de Fontana Masson, ele não é um fungo demáceo, à semelhança do *Cryptococcus neoformans* que também tem melanina constitutiva nas suas paredes celulares e é considerado um fungo hialino (Pulverer; Korth, 1971). Esse pigmento não é observado em outros fungos filogeneticamente relacionados da família *Onygenaceae*, como o *P. brasiliensis* (Taborda VB et al., 1999).

Ao avaliarmos os cortes histopatológicos de biopsias cutâneas de pacientes com DJL, observamos uma grande quantidade de células fúngicas, mas elas não possuem um conteúdo citoplasmático semelhante. A maioria dessas células fúngicas não apresenta conteúdo no seu interior; apresenta-se como se fossem cápsulas vazias. As demais apresentam, no interior de sua cápsula, formações diferentes com conteúdo citoplasmático em maior ou menor quantidade, assim como variação na coloração que pode ser basofílica ou eosinofílica. Postula-se que as células fúngicas que têm as cápsulas vazias e conteúdo citoplasmático menor correspondem à forma involutiva do fungo (Opromolla et al., 1999a; Brito; Quaresma, 2007).

Através da coloração pela prata metenamina (método de Gomori), a coloração do fungo não tem aspecto uniforme, podendo ter diversas tonalidades que variam do negro ao marrom mais claro e apresentam até células fúngicas somente com a parede corada com tonalidade amarelada e sem conteúdo. Essas diferentes colorações parecem refletir diferentes fases de degradação desse parasita (Opromolla et al., 1999a).

Por meio dos estudos de microscopia eletrônica, podemos observar que a parede celular do *L. loboi* é trilaminar, sendo a camada mais externa

revestida por escamas que se dispõem como telhas num telhado. Possui inúmeros núcleos, e no citoplasma observamos mitocôndrias, retículo endoplasmático, ribossomos, vesículas e gotas de lipídeos (Sesso; Baruzzi, 1988; Brito; Quaresma, 2007).

Vilani-Moreno e Opromolla (1997), através de diferentes métodos de coloração, avaliaram a viabilidade do *L. loboi*. A coloração de diacetato de fluoresceína-brometo de etídeo (DF-BE) foi a mais sensível nesse experimento. Foi detectado que a viabilidade do fungo é muito baixa, possivelmente pelo aspecto morfológico do fungo nos tecidos parasitados, na sua maioria representado por células inviáveis, além de ter sido observado que a temperatura é fator importante no crescimento do *L. loboi* (Vilani-Moreno et al., 2003).

É considerado um fungo oligotérmico, o que explicaria a prevalência da localização das lesões nas áreas mais frias do corpo, como, por exemplo, as orelhas (Silva; Brito, 1994).

Até o momento, as tentativas de cultivo do fungo em meios artificiais não tiveram sucesso, o que tem dificultado os estudos da imunopatologia, taxonomia e imunologia (Garcia et al., 2019).

Alguns estudos têm sido relatados na tentativa de reprodução experimental da DJL e poucos revelaram resultado satisfatório. O parasita já foi inoculado em diferentes animais, membrana cório-alantoide de ovos embrionários de galinha e no homem (Brito; Quaresma, 2007).

Opromolla e Nogueira (2000) concluíram que o tecido celular subcutâneo da bolsa jugal de hamster não é local adequado para a proliferação do fungo. Borelli, em 1968, relatou a inoculação em voluntário humano com surgimento de lesão nodular após 4 anos (Borelli, 1968). Leite, em 1993, realizou uma autoinoculação via intradérmica com surgimento de lesão pápulonodular após 19 meses. O quadro foi acompanhado por 22 anos e houve involução atribuída ao uso prolongado de cloridrato de prazosina (Leite, 1993).

O *habitat* natural do *L. loboi*, assim como suas condições de vida saprofítica, não são totalmente esclarecidos. Admite-se que o fungo viva como saprófita no solo, em vegetais e na água. Conforme Herr et al. (2001), na

natureza ele se apresenta sob a forma de micélio e, no hospedeiro, de levedura. O acometimento de golfinhos sugere que a água, doce ou salgada, seja um dos reservatórios do parasita (Sampaio; Rivitti, 2000; Félix et al., 2019).

1.1.5 Epidemiologia

Na Amazônia brasileira e em países limítrofes, há condições ambientais e climáticas que favorecem o desenvolvimento da DJL, representadas por clima equatorial quente e úmido, temperatura entre 19° e 34°C (média de 24°C), alto índice pluviométrico (mais de 2000µm/ano), com relevo de florestas tropicais e subtropicais, densas e entrecortadas por rios caudalosos (Talhari et al., 1988; Opromolla; Baruzzi, 2005; Araújo et al., 2018, Brito et al., 2022).

Por ser prevalente na Amazônia, poderíamos aumentar a suspeita de que outras espécies de golfinhos nesta área poderiam ser reservatórios ou mesmo afetados pela DJL, mas nunca foram reportados casos em botos (*Inia geoffrensis*) ou tucuxis (*Sotalia fluviatilis*), animais semelhantes, típicos da região (Opromolla; Baruzzi, 2005).

A suspeita de que o fator ambiental poderia ser considerado um reservatório do fungo é embasada pela elevada incidência de casos na região Amazônica, onde o ambiente para o seu desenvolvimento é favorável (Borelli, 1968; Brito; Quaresma, 2007).

Na história da DJL são importantes os relatos da alta prevalência de 63 casos entre a população indígena da tribo Caiabi, grupo de origem Tupi, quando habitava o território situado entre os rios Arinos e Teles Pires, formadores do rio Tapajós no estado do Mato Grosso. Porém, ao ser transferida para o parque nacional do Xingu, houve surgimento de poucos casos novos, o que sugere que o fator ambiental seja mais relevante do que o fator étnico (Lacaz et al., 1986; Florian et al., 2020).

A DJL acomete principalmente trabalhadores rurais que vivem em contato com a vegetação e o solo, como os seringueiros da Amazônia. Sendo assim, é mais frequente em adultos e no sexo masculino devido às atividades exercidas no seringal, garimpo ou lavoura. A faixa etária inicial da doença é de

21 a 40 anos de idade, o que corresponde ao período de maior produtividade laborativa do paciente. Não há predominância étnica e todas as raças parecem estar igualmente suscetíveis ao contágio (Talhari, 1995; Hornberger et al., 2021).

Entre os índios Caiabi há predomínio no gênero masculino em 61,9%, no entanto, como entre mulheres e meninas não indígenas a ocorrência da doença é de 10% a 12%, podemos considerar que há uma elevada prevalência em mulheres Caiabi (38,1%) que pode ser explicada pelo trabalho feminino em contato próximo ao meio ambiente. A idade de início das lesões ocorreu antes dos 21 anos, a suscetibilidade e o início precoce podem ser explicados pelo contato precoce com madeira e solo. Há relato de um caso em criança de 5 anos e outro caso de um índio Caiabi de 2 anos de idade, assim como em paciente de 83 anos (Pradinaud, 1977; Brun, 1999; Florian et al., 2020).

Ocorre predominantemente no Brasil, porém há relatos de casos na Guiana Francesa, Suriname, Colômbia, Venezuela, Panamá, Peru, Equador, México, Costa Rica, Bolívia e Europa. Os casos registrados fora do continente americano adquiriram a enfermidade durante a permanência neste continente ou por contágio acidental com golfinho contaminado (Rodriguez-Toro, 1993).

O número estimado de casos, conforme Brito e Quaresma (2007), é difícil de se estabelecer com exatidão, por não se tratar de doença de notificação obrigatória, porém estima-se que, até 2007, havia 490 casos relatados no mundo, sendo 318 deles no Brasil. Em 2020, Florian et al., atualizando os dados sobre a doença, descreveram que existem 550 casos no mundo, incluindo os 63 casos dos índios da tribo Caiabi.

Foram registrados no Serviço de Dermatologia da Universidade Federal do Pará (UFPA), no período de 1955 a 2005, 109 casos de pacientes portadores de DJL, todos confirmados por exames histopatológicos e/ou micológicos (Brito; Quaresma, 2007).

Para a epidemiologia, ainda não está esclarecida a contaminação de golfinhos com a DJL, pois há uma grande diferença na fisiologia e *habitat* entre humanos e esses mamíferos aquáticos. Em ambos os hospedeiros, há a formação de granuloma histiocitário com células xantocrômicas, e o processo culmina com a fagocitose dos histiócitos para a destruição do fungo, porém o

tamanho do parasita parece ser duas vezes maior no homem do que no golfinho, sugerindo um crescimento diferente nas duas espécies. Não foi observado comprometimento visceral ou linfático nos golfinhos contaminados com a DJL (Opromolla et al., 1999a; Félix et al., 2019).

No Peru, em 1999, Miller e Owens observaram uma doença sistêmica em primatas *Aotus sp*, causada por fungo leveduriforme, ainda não classificado, com aspecto semelhante ao *L. loboi* por microscopia óptica e eletrônica, fato inusitado que representa mais um desafio no estudo da DJL (Miller; Owens, 1999; Brito; Quaresma, 2007).

Um estudo realizado em 2004, avaliando a distribuição dos grupos sanguíneos ABO e Lewis em portadores da DJL em comparação à população geral, não mostrou resultado estatisticamente significativo, porém os autores sugerem uma maior suscetibilidade da doença em pacientes com fenótipo B e menor frequência fenotípica Lewis b, sugerindo uma importância epidemiológica entre os portadores da enfermidade (Silva; Ferasçoli, 2004).

1.1.6 Patogenia

Em virtude de o agente etiológico nunca ter sido cultivado e dos experimentos em animais ainda não mostrarem resultados consistentes, a patogenia da DJL segue obscura (Brito; Quaresma, 2007).

A porta de entrada do *L. loboi* não está completamente esclarecida; admite-se que os traumatismos cutâneos confirmam as condições adequadas para a sua implantação. No entanto, há relatos de picada de insetos ou mesmo de cobra como soluções de continuidade para surgimento de lesões de DJL (Opromolla et al., 1999a).

Foram descritos casos de pacientes que relacionam o surgimento das lesões, sobretudo as localizadas no pavilhão auricular, após picada de artrópodes, carrapatos do grupo ixodídeos que poderiam, para alguns autores, ser um tipo de vetor (Lacaz et al., 1986).

O período de incubação é variável, mas supostamente longo, em média de 1 a 2 anos, muito embora existam relatos de 3 meses de evolução e outro de 7 anos (Baruzzi; Marcopito, 1997; Garcia et al., 2019).

A resposta do hospedeiro à agressão do agente etiológico é bastante variável. Há pacientes em que, em curto espaço de tempo, as lesões evoluem para uma forma mais disseminada e outras permanecem por anos sob a forma localizada da doença. Em qualquer situação, o parasita mantém seu tropismo pela pele. Os fatores e a maneira como ocorrem esses processos de disseminação permanecem desconhecidos, no entanto, como exames histopatológicos já demonstraram a presença do fungo no interior de vasos sanguíneos, sugere-se que a disseminação hematogênica seja uma das maneiras da disseminação da doença (Baruzzi et al., 1981; Vilani-Moreno, 2002).

Admite-se que a disseminação das lesões possa ocorrer por contiguidade, por via hematogênica, autoinoculação ou mesmo por via linfática, sobretudo quando há o acometimento dos membros inferiores (Vilani-Moreno, 2002).

Até o momento não há comprovação da transmissão da DJL entre pessoas, mesmo nos casos de convívio íntimo e prolongado da mesma família (Opromolla et al., 1999b).

Na PCM, há casos em que ocorre infecção sem manifestação clínica, podendo ser detectada através da paracoccidina positiva. Acredita-se que ocorra o mesmo na DJL, porém não dispomos, ainda, da reação intradérmica específica para a confirmação diagnóstica (Vilani-Moreno, 2002).

1.1.7 Aspectos clínicos

Inicialmente, a lesão cutânea da DJL se apresenta como uma pápula, superficial ou profunda, que conflui originando uma placa ou nódulo. O aspecto clínico é poliformo, sendo mais frequente e característica a lesão nodular de aspecto queloidiano, isolada ou confluenta, superfície lisa, brilhante, dura, consistência sólida, de cor castanho-amarronzada, formando massas multilobulares, recobertas por pele lisa, íntegra, com telangectasias. Outras formas clínicas têm sido descritas como gomosa, ulcerada, verrucosa, infiltrativa, esclerodermiforme, maculosa, dentre outras (Brito, 2006; Hornberger et al., 2021; Brito et al., 2022).

Podemos observar, em alguns casos, na superfície das lesões, pontos enegrecidos que correspondem à eliminação transepitelial (ETE) do fungo, como ocorre em outras micoses profundas, a exemplo da CBM (Fuchs et al., 1990).

As lesões 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 às injúrias. Nas orelhas podemos encontrar infiltração difusa, nódulos, telangiectasias e outras manifestações que levam à deformidade nessa região e decorrem, possivelmente, do hábito dos pacientes de carregarem cargas como frutas, madeiras e raízes em cestos e paneiros sobre os ombros, acarretando traumatismo nas orelhas, ou mesmo pela picada de ixodídeos (Loureiro et al., 1971; Hornberger et al., 2021).

Algumas classificações clínicas para a DJL já foram propostas. Baseados na morfologia das lesões, Silva e Brito (1994) sugeriram classificá-la em infiltrativa, queloidiforme, gomosa, ulcerada e verruciforme. Baruzzi et al. (1979) classificaram-na quanto à distribuição das lesões em formas isoladas ou localizadas, além das formas disseminadas. Opromolla et al., em 1999, classificaram as lesões em monomórficas e polimórficas, de acordo com a predominância de um só tipo de lesão ou a concomitância de múltiplas variedades lesionais (Brito et al., 1999; Opromolla et al., 1999b; Brito; Quaresma, 2007).

Os fatores que favorecem a disseminação da doença ainda são desconhecidos. Há casos nos quais os pacientes permanecem por longo período, ou mesmo para sempre, com formas isoladas ou localizadas da doença; em contrapartida há casos em que a disseminação ocorre precocemente (Brito; Quaresma, 2007).

Geralmente, as lesões são assimétricas e assintomáticas, de crescimento lento e permanecem localizadas por anos, o que justifica a demora na procura do atendimento médico e, por conseguinte, do diagnóstico precoce. Quanto à sintomatologia, quando presente, é discreta e limitada a sintomas subjetivos como prurido, ardor, dor à palpação, hipoestesia e anestesia (Brito, 2006; Brito; Quaresma, 2007).

Não há comprometimento sistêmico. O estado geral é conservado e os sintomas locais são discretos. As mucosas não são afetadas, mesmo quando o lábio é acometido. Os gânglios linfáticos regionais, quando acometidos, são duros e sem flutuação. O comprometimento de órgãos internos foi citado por Rodriguez-Toro em 1993 num homem com lesão na perna esquerda com mais de 47 anos de evolução, associada à linfangite e tumoração testicular, onde foi evidenciada a presença de *L. loboi* após orquidectomia (Rodriguez-Toro,1993; Azulay; Azulay, 2017).

Há relatos de degeneração carcinomatosa em alguns casos de índios da tribo Caiabi que faleceram por metástase, mesmo após ressecção cirúrgica da lesão. Alguns autores referem casos de degeneração para carcinoma espinocelular (CEC) em pacientes com lesões de longa evolução (Baruzzi et al.,1989; Florian et al., 2020; Belda et al., 2021a; Gadelha et al., 2021). Brito et al. (2022) consideram que é necessária a vigilância quanto à transformação em CEC em lesões de longa evolução.

Não há relatos de mortes causadas pela DJL, no entanto há pouca ou nenhuma tendência para a cura espontânea da doença. Em virtude de, na maioria das vezes, não comprometer o estado geral do paciente, pode persistir durante a vida toda (Tubilla et al., 2008) (Figura 1).



Figura 1 - Aspectos clínicos da doença de Jorge Lobo

A: Lesões nodulares de aspecto queloidiano, confluentes, no membro superior esquerdo.

B: Nódulos queloidianos brilhantes, agrupados, alguns ulcerados, disseminados no membro inferior direito.

C: Placas queloidianas com aspecto multilobular, disseminadas na região torácica posterior e membros superiores.

D: Nódulos e placas queloidianos múltiplos, disseminados e agrupados na coxa direita e áreas ulceradas, com fundo sangrante na perna direita.

E: Vista aproximada na figura D, com nódulos queloidianos múltiplos, disseminados e agrupados na coxa direita e placas queloidianas, com pontos enegrecidos na superfície, disseminadas na perna direita.

F: Nódulo queloidiano com centro exulcerado, sangrante no pavilhão auricular esquerdo.

1.1.8 Diagnósticos diferenciais

Devido ao polimorfismo lesional, podemos fazer o diagnóstico diferencial dos casos de DJL com inúmeras doenças. As lesões de aspecto queloidiano devem ser diferenciadas do queloide, fibromas, neurofibromas, dermatofibromas, dermatofibrossarcoma protuberans, hanseníase virchowiana, leishmaniose cutânea difusa, esporotricose, dentre outros. As lesões de aspecto verrucoso devem ser diferenciadas da CBM, PCM, esporotricose, carcinoma verrucoso, leishmaniose, tuberculose na sua variedade verrucosa, etc. As lesões em placas devem ser distinguidas da hanseníase tuberculoide, metástases cutâneas, dentre outros (Tubilla et al., 2008).

1.1.9 Diagnóstico laboratorial

1.1.9.1 Micológico

As lesões de DJL geralmente apresentam abundante quantidade de parasitas. O material para o exame micológico direto pode ser obtido pela curetagem, raspagem, escarificação ou fita gomada e uma solução clarificante de hidróxido de potássio a 10% em dimetilsulfóxido a 40%, sendo este considerado um método diagnóstico rápido, barato e não invasivo, onde observamos o agente etiológico em grande número (Talhari, 1995; Brito; Quaresma, 2007).

1.1.9.2 Cultura

Apesar da abundância do *L. loboi* nas lesões cutâneas, até o momento, o fungo ainda não foi cultivado (Miranda; Silva, 2005; Garcia et al., 2019).

1.1.9.3 Histopatológico

O exame histopatológico constitui o padrão ouro para o diagnóstico da doença. Os cortes histopatológicos podem ser corados pela hematoxilina-

eosina (HE), ácido periódico de Schiff (PAS), prata-metenamina (GROCOTT) e tricrômico de Gomori (Brito; Quaresma, 2007).

A epiderme pode apresentar-se com aspecto normal, atrófico, hiperplásico ou ulcerado, inclusive na mesma lesão. No estrato córneo observa-se, em alguns casos, por eliminação transepidérmica (ETE), presença de *L. loboi* entre as escamas e escamocroscas, representado clinicamente pelos pontos negros na pele que recobre as lesões, à semelhança do que ocorre na CBM (Miranda; Silva, 2005).

Separando a epiderme do infiltrado inflamatório, observamos uma faixa grenz de espessura variável. Na derme há vasos dilatados e infiltrado inflamatório granulomatoso, nodular e difuso, constituído, principalmente, por macrófagos, histiócitos, células gigantes multinucleadas do tipo Langhans e do tipo corpo estranho com citoplasma repleto de parasitos e, em menor quantidade, eosinófilos e plasmócitos (Opromolla; Nogueira, 2000).

Os histiócitos, sobretudo os da camada mais profunda da derme, por vezes são xantomizados devido a polissacarídeos e/ou lipídios intracelulares e finamente vacuolizados. Neles, o citoplasma é claro ou eosinofílico, xantomizado, discretamente granuloso, sem parasitos e com elementos comparados a agulhas, semelhantes às células de Gaucher clássicas, e podem estar isolados ou fazer parte do infiltrado granulomatoso (Stewart; Jones, 1999).

Conforme Opromolla et al. (2000) os fungos são fagocitados pelos histiócitos que se agrupam e, em certas ocasiões, podem originar células gigantes tipo corpo estranho, as quais podem ou não formar células gigantes tipo Langhans. As células gigantes encontram-se disseminadas nos focos histiocitários (Brito; Quaresma, 2007).

Necrose e neutrófilos são pouco encontrados. As estruturas nervosas encontram-se íntegras, tanto no granuloma como nos interstícios do conjuntivo. Nos poucos relatos em que há reação exudativa, encontramos agregados de linfócitos e plasmócitos entre as células fagocitárias ou na região perivascular. Fibrose, por vezes exacerbada, é um relato frequente na DJL (Opromolla et al., 1999a; Brito; Quaresma, 2007).

Através da coloração do Sudão III, foram observados lipídeos nas células do infiltrado e nos fungos. Foram encontrados corpos asteroides no infiltrado granulomatoso nas células multinucleadas tipo Langhans e corpo estranho, à semelhança de outras doenças granulomatosas (Michalany, 1995).

Na coloração de hematoxilina-eosina (HE), podemos observar uma quantidade abundante do parasita, em formas isoladas ou catenulada, com morfologia já descrita no item etiologia. Há relatos da presença de pseudohifas entre os aspectos pouco frequentemente encontrados. O conteúdo intracitoplasmático da célula fúngica é variável, apresentando, por vezes, farto material no seu interior e outros completamente vazios, o que representaria, para alguns autores, fungos inviáveis (Sesso; Baruzzi, 1988).

O *L. loboi* apresenta coloração de tonalidades diferentes que variam do negro ao marrom mais claro e, em alguns casos, sua parede tem tom amarelado e conteúdo vazio, sem cor. É descrito um material argentófilo granuloso em locais sem fungos, possivelmente relacionado à digestão do parasita. Motivo pelo qual onde há maior quantidade de fungos com cápsulas vazias, haverá maior quantidade dessa substância que corresponde aos restos do agente destruído no interior de macrófagos (Brito; Quaresma, 2007).

Há a descrição de granulomas nos gânglios linfáticos regionais, o que poderia sugerir a disseminação linfática. Os aspectos histopatológicos encontrados nos gânglios são semelhantes aos observados no tecido cutâneo (Opromolla et al., 2003).

Em virtude de a maioria das peças cutâneas não conter o tecido celular subcutâneo, é difícil definir as características encontradas da DJL nesta localização. O comprometimento da cartilagem, quando a doença acomete o pavilhão auricular, não é descrito (Brito; Quaresma, 2007).

Na técnica de coloração histoquímica de Fontana-Masson, o *L. loboi* apresenta melanina constitutiva na sua parede celular, diferente do *P. brasiliensis* e semelhante aos agentes etiológicos da CBM, apesar de não ser um fungo demáceo como acontece com o *C. neoformans*. A melanina fúngica é um pigmento marrom escuro que parece conferir resistência aos oxidantes produzidos por macrófagos, diminuindo a capacidade de eliminar o fungo. As

células melanizadas têm maior resistência a fungicidas e fungistáticos em relação às células não melanizadas (Vilani-Moreno; Opromolla, 1997).

Os fungos melanizados são mais resistentes às alterações causadas pela luz ultravioleta (irradiações, raios-X, dessecação e temperaturas elevadas). A produção deste pigmento tem sido associada à virulência fúngica, à resistência ao ataque microbiano e à sobrevivência acentuada em ambiente de estresse (Vilani-Moreno; Opromolla, 1997).

Na microscopia eletrônica, observou-se que as células macrofágicas estavam repletas de um material elétron denso que corresponderia à parede do fungo, em cujo citoplasma havia mitocôndrias, ribossomas, retículo endoplasmático granular e vacúolos (Brito et al., 1999; Opromolla et al., 1999a; Diniz et al., 2001).

Os estudos moleculares para obtenção genômica do *L. loboi* têm enfrentado grandes dificuldades, sobretudo pelo fato de mais de 50% das células fúngicas leveduriformes com infectividade tissular estarem mortas (Vilela et al., 2005; Garcia et al., 2019).

1.1.10 Terapêutica

Até o momento, não existem antifúngicos disponíveis com ação comprovada para o tratamento da DJL, então, sempre que possível, a associação de métodos pode ser a opção mais interessante (Araújo et al., 2018).

A exeresse cirúrgica é o padrão ouro no tratamento até o momento e é indicada nos casos incipientes. A criocirurgia com nitrogênio líquido, utilizada sobretudo para lesões recentes e localizadas, oferece possibilidade de cura. No entanto, a recidiva é frequente provavelmente pela permanência de macrófagos parasitados ao redor e à distância da lesão. (Fisher et al., 2002, Florian et al., 2020; Brito et al., 2022).

Drogas como itraconazol, clofazimina, imidazólicos, sulfas, anfotericina B e 5- fluocitosina foram experimentadas com resultado a desejar. Posoconazol promoveu a redução da lesão de um paciente descrito por Bustamante (Brito; Quaresma, 2007). Em 2021, Pasqualotto et al. descreveram um caso de DJL

extensa em paciente com insuficiência renal crônica em hemodiálise que apresentou resposta clínica parcial satisfatória com o uso de posoconazol.

Araújo et al. (2018) relataram caso de um paciente refratário ao tratamento cirúrgico isolado inicial, o qual foi posteriormente abordado com cirurgia extensa, crioterapia a cada 3 meses e associação de itraconazol e clofazimina por 2 anos e não foram detectados sinais de atividade clínica e histopatológica durante o seguimento, no entanto o período de acompanhamento ainda é curto e insuficiente.

É sugerido por Gonçalves et al. (2020) que o tratamento com poliquimioterapia para hanseníase possa ser uma provável terapêutica para o paciente com DJL.

Infelizmente, ainda não há uma medicação completamente eficaz para essa enfermidade, sobretudo nos casos disseminados, necessitando de mais estudos sobre a doença e melhor conhecimento sobre o agente etiológico para chegarmos ao êxito terapêutico, no entanto é sugerida a associação de cirurgia e antifúngicos como a mais completa medida terapêutica disponível até o momento (Gadelha et al., 2021).

1.2 Cromomicose

1.2.1 Conceito

A cromomicose é uma micose profunda subcutânea, crônica, descrita como uma doença ocupacional progressiva, incapacitante, causada por fungos demáceos, de implantação traumática transcutânea que acomete, sobretudo, pessoas que habitam as regiões tropicais e subtropicais do planeta, com aspecto clínico variado, preponderantemente verrucoso e com terapêutica desafiadora (Queiroz-Telles et al., 2017b; Brito; Bittencourt, 2018).

1.2.2 Sinonímia

Inúmeros são os termos usados para definir essa doença, a citar: cromomicose, figueira, formigueiro, cromoblastomicose, micose de Pedroso e

Lane, dermatite verrucosa, dermatite verrucosa cromoparasitária, dermatite cromoparasitária, micose de Carrion, micose de Lane-Pedroso, micose de Rudolph Pedroso e Lane, cladosporiose, blastomicose nigra, pé musgoso, Susna, Sunda, Chapa, doença de Guiteras, dentre outras (Talhari, 1995; Brito; Bittencourt, 2018; Passero et al., 2021).

1.2.3 Histórico

Em 1914, na cidade de Estrela do Sul, estado de Minas Gerais, o médico alemão Maximiliano Willibaldo Rudolph descreveu, pela primeira vez, a doença, citando seis casos, dos quais isolou o fungo de quatro deles, porém sem identificar o agente etiológico. Embora Pedroso e Lane tenham observado quatro casos de CMB em 1911, na cidade de São Paulo, sua publicação só foi realizada em 1920, motivo pelo qual a enfermidade também ficou conhecida como micose de Lane-Pedroso (Queiroz-Telles, 2015; Passero et al., 2021).

Em 1915, Lane e Medlar, em diferentes publicações, descreveram o primeiro caso de CBM na América do Norte, em paciente italiano, procedente de Boston. O primeiro caso fora das Américas foi descrito por Montpellier e Catanei em 1927 em um paciente argelino (Brito; Bittencourt, 2018).

Em 1936, Pablo Negroni, na Argentina, após estudo detalhado do agente etiológico da CBM, criou o gênero *Fonsecaea* e a espécie *F. pedrosoi*.

Em 1922, Terra et al. cunharam o termo “cromoblastomicose” para se referirem à doença. Moore e Almeida, em 1935, propuseram o termo “cromomicose” para substituir o termo “cromoblastomicose”, uma vez que sugeria que os agentes apresentavam brotamento de leveduras no tecido. Em 1983, McGinnis estabeleceu, claramente, o conceito do termo “cromomicose”, diferenciando-a da feohifomicose e de outras infecções causadas por fungos da família *Herpotrichiellaceae*. Em 1992 a *International Society for Human & Animal Mycology* (ISHAM) estabeleceu o termo “cromoblastomicose” como nome oficial da micose, a partir de então (Talhari, 1995; Brito; Bittencourt, 2018; Passero et al., 2021).

1.2.4 Etiologia

A CBM tem como agentes etiológicos fungos demáceos, geofílicos, pertencentes ao reino Fungi e, de acordo com os dados disponíveis, verificamos que pelo menos 41 espécies de fungos causam CBM em humanos, os quais estão organizados nas seguintes famílias: *Chaetomiaceae*, *Cladosporiaceae*, *Didymellaceae*, *Dothioraceae*, *Herpotrichiellaceae*, *Hysteriaceae*, *Microascaceae*, *Onygenaceae*, *Pleosporaceae* e *Pleurostomataceae*. A família *Herpotrichiellaceae* tem a maior importância clínica e inclui os principais gêneros que causam a doença, sendo eles: *Fonsecaea*, *Cladophialophora*, *Exophiala*, *Phialophora*, *Rhinoctadiella* e *Veronaea* (Queiroz-Telles et al., 2017b; Brito; Bittencourt., 2018; Belda et al. 2020; Passero et al., 2021).

Acredita-se que os agentes etiológicos desta micose, geralmente com baixo poder patogênico, vivem como saprófitas no solo, espinhos de árvores, troncos, matéria orgânica em decomposição e até mesmo no aparelho bucal e ferrões de invertebrados. Os gêneros mais frequentes são *Fonsecaea* e *Cladophialophora*, e as espécies mais prevalentes que infectam humanos são *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica* e *Cladophialophora carrionii*. A espécie mais encontrada no Brasil é a *F. pedrosoi* (Esterre; Queiroz-Telles, 2006, Belda et al., 2021, Passero et al., 2021).

Torres-Guerrero et al. (2018) relataram um caso de CBM no Brasil, causado pelo *Cladosporium langeronii*, agente extremamente raro, da família Cladosporiaceae, o qual foi confirmado através de técnicas moleculares baseadas na região rDNA-ITS que permitem uma identificação mais precisa das espécies.

É descrito que o fungo causador da CBM vive na sua forma saprofítica, miceliana, no solo e em plantas e adquire a morfologia esclerótica no tecido. A doença ocorre pela inoculação transcutânea e traumática de propágulos de várias espécies de fungos demáceos. No hospedeiro, os propágulos adaptam-se ao ambiente tecidual através do dimorfismo da fase filamentosa em estruturas em forma de globo denominadas células muriformes, corpos

fumagoides, escleróticos ou acastanhados (Esterre; Queiroz-Telles, 2006; Brito; Bittencourt, 2018).

A diferenciação das hifas em células muriformes parece contribuir para a virulência dos agentes etiológicos da CBM, pois essas células apresentam parede celular mais espessa que as hifas, o que auxilia na sobrevivência em hospedeiros mamíferos, uma vez que foi demonstrado que conídios e hifas induzem doença de autocura, e, por outro lado, células muriformes induzem doença crônica e desenvolvimento de tecido fibroso (Passero et al., 2021)

Os corpos fumagoides ou células muriformes são arredondados, isolados ou agrupados, de cor marrom ou castanho escuro, têm membrana espessa, multiplicam-se por septação sem brotamento, isto é, por cissiparidade e têm diâmetro de 5 a 12 μm . São considerados como um mecanismo de evolução adaptativa do fungo para sobreviver dentro do hospedeiro e estão diretamente associados a uma resposta granulomatosa intensa, sinalizando o início de uma doença crônica. Têm como peculiaridade a alta resistência ao ataque do sistema imune (Queiroz-Telles et al., 2017b; Brito, Bittencourt, 2018; Breda et al., 2021).

A presença de moléculas hidrofílicas extracelulares dos polissacarídeos parece auxiliar no processo de diferenciação para as células muriformes e, assim, propiciar a evolução para uma doença crônica granulomatosa a partir da hidrofobicidade. Os glicolipídeos e glicoproteínas presentes na parede celular do fungo parecem agir como epítomos, sugerindo que possam ser usados na imunodiagnose, além de uma possibilidade terapêutica através da estimulação da resposta humoral. Fungos extracelulares, como as células muriformes, secretam peptidase aspártica que é capaz de clivar a laminina nos tecidos conjuntivos, garantindo que os fungos se espalhem pelos tecidos. (Queiroz-Telles et al., 2017b; Breda et al., 2021; Passero et al., 2021).

O agente etiológico apresenta melanina na sua parede celular, a qual é considerada um componente imunologicamente ativo e representa importante papel na sua patogenicidade através da diferenciação patogênica do fungo. É sugerido que a presença de melanina diminua o processo da fagocitose do fungo, propiciando uma alteração no sistema imune adaptativo, levando à resistência aos antifúngicos. Características peculiares desse pigmento, como

possuir elétrons desemparelhados na sua estrutura que são capazes de eliminar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, protegem as células fúngicas muriformes no ambiente hostil de macrófagos e neutrófilos e suprimem a fagocitose (Franzen et al., 2008; Brito; Bittencourt, 2018, Passero et al., 2021).

Para muitos autores, a melanina presente na parede do fungo pode interagir com alguns antifúngicos, reduzindo sua atividade e a suscetibilidade dos fungos a esses agentes. Foi realizada uma revisão objetivando avaliar os aspectos da melanina na interação com a eficácia dos antifúngicos na CBM, no entanto por resultados contraditórios, não foi possível estabelecer essa relação *in vivo* (Koehler et al., 2021).

1.2.5 Epidemiologia

A CBM é considerada como uma doença tropical negligenciada de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), desde 2017, sendo a mais comum dentre as micoses causadas por fungos demáceos. A doença inicia pela inoculação traumática do agente com implantação do fungo por fontes ambientais. Não há relatos de casos inter-humanos ou de animal para humano (Talhari, 1995; Belda et al., 2020).

Apesar de ser encontrada em todo o mundo, ocorre com maior frequência nas zonas tropicais e subtropicais de certos países como Madagascar, Brasil, Costa Rica, República Dominicana, Cuba, Porto Rico, Japão, África do Sul, etc. A CBM ocorre na maioria dos estados do Brasil, país com a segunda maior casuística mundial e onde o estado do Pará apresenta a maior prevalência (Queiroz- Telles et al., 2011; Brito, Bittencourt, 2018; Santos et al., 2020).

Há a maior incidência em pacientes do sexo masculino na proporção de 5:1, na faixa etária entre 20 e 60 anos, sendo considerada por alguns autores como doença ocupacional de lenhadores, agricultores e trabalhadores de fazendas, pelo contato com o solo e pela frequência de andar descalços, o que os deixam mais sujeitos a traumatismos, em especial nos membros inferiores, justificando por que é o local acometido em quase 80% dos casos. Embora a

maioria dos pacientes com CBM seja adulta, casos da micose foram relatados em crianças e adolescentes em regiões endêmicas (Queiroz-Telles et al., 2009; Brito, Bittencourt, 2018).

Vale ressaltar que os indivíduos com risco de contrair CBM trabalham em países tropicais, onde a temperatura pode ser superior a 40°C no verão, e são pessoas que se recusam a usar equipamentos de proteção, como calçados, luvas, vestuário, dentre outros, mesmo sabendo que esse tipo de medida profilática pode prevenir diversos tipos de doenças; além disso, os indivíduos vulneráveis vivem, sobretudo, em países de baixa renda e, às vezes, moram longe dos serviços médicos, dificultando e retardando a procura pelo atendimento médico (Passero et al., 2021).

Merece um especial destaque como possível fonte de contaminação uma palmeira da Amazônia chamada de babaçu, de onde o fungo já foi isolado. Há relatos de endemia da CBM numa região do estado do Maranhão, local onde inúmeras famílias trabalhavam em área de extrativismo com esse vegetal (Marques et al., 2006). Foi realizada uma pesquisa que teve como objetivo detectar *F. pedrosoi* e *F. monophora* em cascas de coco babaçu, solo, restos vegetais e espinhos de áreas endêmicas de CBM no estado do Maranhão, norte do Brasil, utilizando *Rolling Circle Amplification* (RCA) com sondas de cadeado como uma nova ferramenta de triagem ambiental para agentes de CBM, no entanto nenhum agente da doença foi recuperado (Voidaleski et al., 2020).

O motivo de escassa incidência no sexo feminino parece estar relacionado com a proteção hormonal. Assim como na PCM há uma possível proteção hormonal através do estradiol, na CBM é relatado que a proteção advém da progesterona. A justificativa de que os homens são mais acometidos do que as mulheres, em virtude de se exporem mais às atividades rurais, não é mais aceita por alguns autores (Hernández-Hernández et al., 1995).

Há estudos que apontam a possibilidade de uma suscetibilidade genética ao HLA-A29 nos pacientes com CBM (Tsuneto et al., 1989).

Em virtude de a CBM não ser doença de notificação obrigatória, a quantidade de casos mundiais é estimada perante os casos publicados. Tem alta incidência em Madagascar e baixa incidência nos EUA (Queiroz-Telles et

al., 2011). Santos et al. (2021), no intuito de estimar a carga global de CBM, revisaram retrospectivamente a literatura publicada de 1914 a 2020 e detectaram a existência de um total de 7.740 pacientes com CBM em todos os continentes, exceto na Antártida.

1.2.6 Aspectos clínicos

A manifestação clínica inicia-se no local de implantação traumática transcutânea do fungo, o período de incubação é desconhecido e a evolução da doença é lenta e progressiva. Os principais sítios afetados são membros inferiores, unilateralmente, seguidos dos superiores e tronco. A lesão primária é uma pápula ou nódulo, de crescimento centrífugo, lento e crônico, a qual, na maioria das vezes, torna-se vegetante, com aspecto condilomatoso e/ou verrucoso, com progressão periférica, podendo tornar-se cicatricial ou ulcerado no centro. Outros aspectos clínicos encontrados são infiltrativo, psoriasiforme e circinado (Queiroz-Telles et al., 2009; Santos et al., 2020; Passero et al., 2021).

O polimorfismo lesional estimulou alguns autores a fazerem diversas classificações clínicas. A classificação proposta por Carrión em 1950 é a, ainda, mais utilizada, a qual divide a CBM nas formas nodular, tumoral, verrucosa, cicatricial, e em placas e eritematosa; no entanto, nos casos de mais longa evolução, podem coexistir várias formas clínicas. As lesões confluem formando nodosidades que podem atingir áreas extensas e ocupar todo ou quase todo o membro afetado e seu aspecto verrucoso pode ser exuberante semelhante à couve flor. Sangram com facilidade, mesmo aos pequenos traumas (Talhari, 1995; Brito; Bittencourt, 2018; Breda et al., 2021).

Uma característica importante da doença é a presença de pequenos pontos negros na superfície das lesões, chamados de *black dots* ou grãos de pimenta caiena. Representam o fenômeno dermoepidérmico de eliminação transepitelial (ETE) do fungo e são formados por sangue coagulado, detritos celulares e restos do fungo na sua fase parasitária (Queiroz-Telles et al., 2017b; Brito; Bittencourt, 2018).

A doença geralmente é assintomática ou oligossintomática, mas leve prurido e dor podem acompanhar o processo, motivo que explicaria a procura

médica tardia na maioria dos casos. A patogenicidade do fungo é baixa, vide a arrastada evolução do quadro clínico. A propagação das lesões se faz por contiguidade às regiões vizinhas, por via linfática e, mais raramente, por via sanguínea. Há descrições de pacientes acometidos com CBM em estado de imunossupressão incluídos os receptores de transplantes de órgão sólidos (Esterre; Queiroz-Telles, 2006; Brito; Bittencourt, 2018; Lima et al., 2022).

O estudo de Sendrasoa et al. (2020), de Madagascar, local com maior endemicidade do mundo, mostrou que o aspecto clínico das lesões de CBM muda após o tratamento com antifúngicos e as lesões passam a adquirir um aspecto cicatricial.

A evolução da doença pode cursar com linfedema, elefantíase, infecção secundária, a qual gera um odor fétido e úlceras crônicas que não cicatrizam. CBM oral já foi relatada. Pode ocorrer o envolvimento extracutâneo e há relatos de comprometimento de ossos, linfonodos, cérebro e pulmões. Foram reportados casos de transformação neoplásica, sobretudo nos casos crônicos, com evolução para CEC, tendo sido o primeiro descrito em 1968. Apesar de não afetar o estado geral do paciente, pode intervir na capacidade física pela sequela fibrosa. Não há cicatrização espontânea (Queiroz-Telles et al., 2011; Belda et al., 2021) (Figura 2).



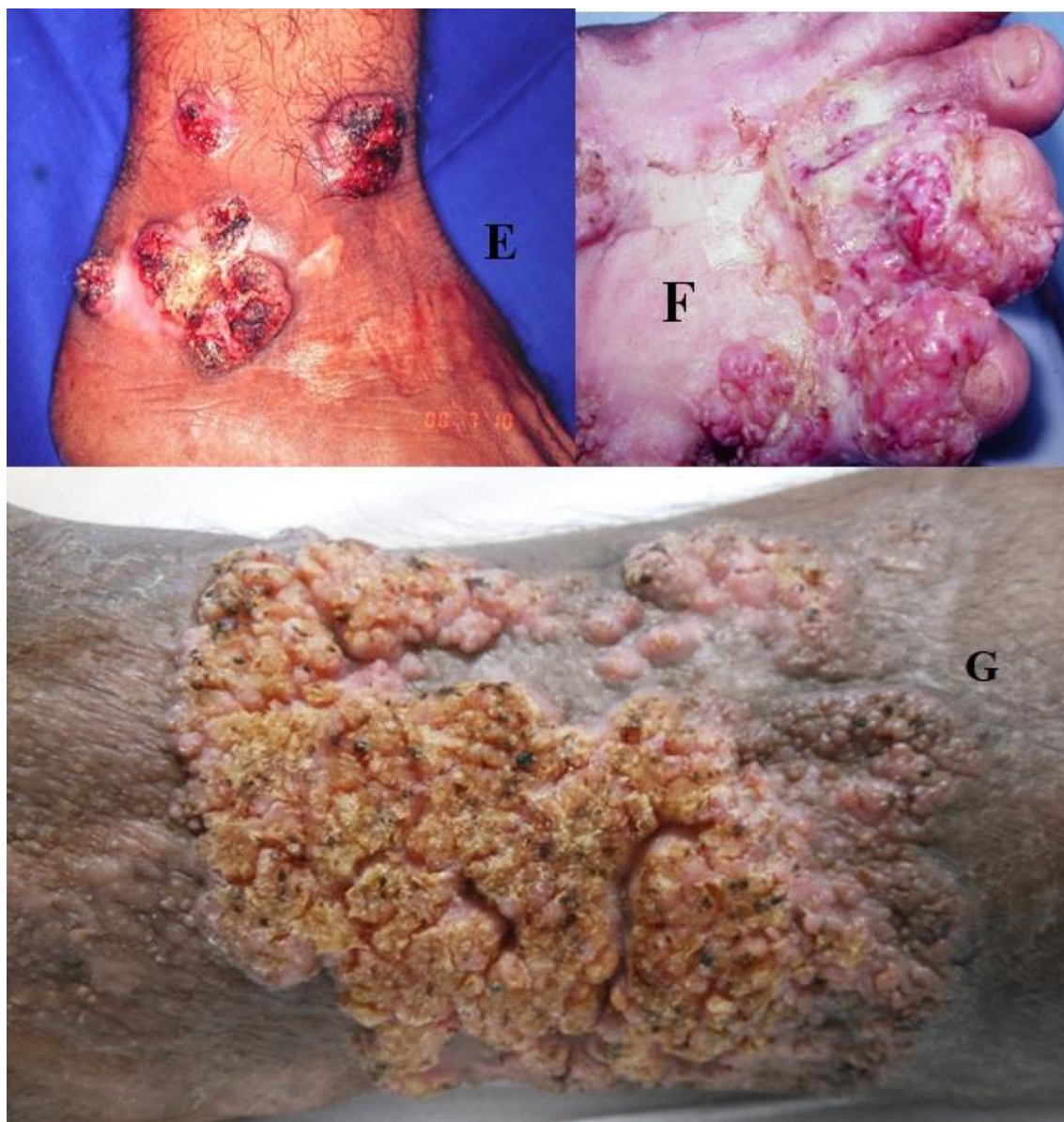


Figura 2 - Aspectos clínicos da CBM

A: Placa vegetante verrucosa na região maleolar direita.

B: Maior detalhe da borda de lesão com aspecto verrucoso, apresentando crostas melicéricas e *black dots*.

C: Placa vegetante verrucosa com progressão periférica e centro cicatricial na região tibial esquerda.

D: Placa acometendo quase todo o membro inferior direito com aspecto psoriasiforme.

E: Placas infiltradas com aspecto verrucoso e centro sangrante com *black dots*, entremeadas por áreas de atrofia cutânea no tornozelo direito.

F: Área exulcerada, com bordas de aspecto vegetante verrucoso com superfície friável, sangrante, no dorso do pé esquerdo.

G: Placas vegetantes verrucosas com *black dots* no tornozelo esquerdo.

1.2.7 Diagnósticos diferenciais

O diagnóstico diferencial é vasto em virtude do polimorfismo lesional e deve ser feito com outras doenças causadas por fungos, como a DJL, feohifomicose, PCM, esporotricose, eumicetoma, blastomicose norte americana, coccidioidomicose; com algumas doenças de origem bacteriana, a citar: nocardiose, actinomicose, tuberculose cutânea, hanseníase, botriomicose, sífilis terciária, micobacterioses, dentre outras, como psoríase, sarcoidose, neoplasias, etc (Talhari, 1995; Passero et al., 2021).

1.2.8 Diagnóstico laboratorial

1.2.8.1 Micológico

Através do exame micológico direto, o material colhido do paciente é clarificado com o uso de solução com 10-20% de hidróxido de potássio (KOH/DMSO) e observados os corpos muriformes ou fumagoides característicos da CBM. Hifas demáceas, por vezes, podem estar associadas aos corpos muriformes. É um método fácil, rápido e barato com sensibilidade de 90-100% (Esterre; Queiroz-Telles, 2006; Santos et al., 2020).

A maior probabilidade de resultado positivo está nas amostras das lesões com os chamados “pontos pretos” visíveis na superfície da lesão representando a eliminação transdérmica do fungo (ETE). Miranda et al. (2005) utilizaram fita adesiva de vinil para o diagnóstico de algumas micoses profundas incluindo CBM (Brito; Bittencourt, 2018).

1.2.8.2 Cultura, microcultivo e técnicas de biologia molecular

A cultura do fungo em ágar Sabouraud desenvolve-se à temperatura ambiente ao fim de oito a 15 dias e inicia-se com a cor esverdeada, evoluindo até o negro, quando, então, observamos colônia filamentosa de aspecto aveludado, superfície plana ou centro elevado, de coloração escura, olivácea ou negro-acinzentada. Através do microcultivo, notamos o fungo na

sua fase vegetativa em um dos seus processos de frutificação e determinamos o gênero do agente etiológico conforme as peculiaridades específicas. Podemos observar três tipos de frutificação ou esporulação: tipo *Cladosporium*, tipo *Phialophora* e tipo *Rhinocladiella* (Talhari, 1995; Brito; Bittencourt, 2018).

As técnicas de biologia molecular são consideradas essenciais para completar o diagnóstico, e testes de proteína C reativa (PCR) foram desenvolvidos para identificar espécies de *Fonsecaea* e *C. carrionii*. Há relatos do uso de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) em soros de pacientes para avaliar a resposta humoral antes, durante e após o tratamento empregando um antígeno somático (AgSPP) de *C. carrionii*. Na atualidade, PCR e ELISA ainda não estão disponíveis em muitas áreas endêmicas (Brito; Bittencourt, 2018).

1.2.8.3 Histopatológico

Na histopatologia, observamos células fumagoides características da CBM no citoplasma de células gigantes multinucleadas ou células gigantes tipo Langherans pelo HE. A sensibilidade para o achado do fungo aumenta com o método de Gomori-Grocott e Fontana-Masson (Queiroz-Telles et al., 2017b).

Na epiderme há hiperparaceratose com hiperplasia pseudoepiteliomatosa, acantose irregular, microabcessos intracorneais e eliminação transdérmica de fungos (ETE), os quais podem estar dentro ou fora dos microabcessos (Queiroz-Telles et al., 2011; Queiroz-Telles et al., 2017b).

Na derme, há um denso infiltrado granulomatoso com fibrose apresentando células mononucleares, como linfócitos, histiócitos e plasmócitos, além de células epitelioides, células gigantes e polimorfonucleadas. Há duas variedades de granulomas: o granuloma supurativo, caracterizado por hiperplasia pseudoepiteliomatosa, microabcesso, ectasias vasculares, fibrose e abundância fúngica e o granuloma tuberculoide verdadeiro, caracterizado por atrofia epidérmica, discreta acantose, granuloma bem formado com células de Langherans, células epitelioides, abcessos e microabcessos (Queiroz-Telles et al., 2017b, Passero et al., 2021).

1.2.8.4 *Microscopia confocal*

No estudo realizado através da microscopia confocal (MCR), foram descritos corpos esféricos brancos brilhantes dentro de células redondas provavelmente correspondendo aos melanossomos dentro de células muriformes. Conforme os autores, se esses resultados puderem ser confirmados por estudos adicionais, a MCR pode ser útil para o diagnóstico não invasivo de CBM (Borges et al., 2021).

1.2.8.5 *Imunodiagnose*

Apesar de já terem sido tentados testes intradérmicos e sorológicos para a diagnose da CBM, até o momento não há teste intradérmico padronizado para a doença (Queiroz-Telles et al., 2017b).

1.2.9 *Terapêutica*

À exceção das formas localizadas iniciais, que podem ser excisadas e curadas cirurgicamente, o tratamento da CBM costuma ser refratário e de longa duração (Meira et al., 1996; Brito; Bittencourt, 2018).

A metodologia terapêutica clássica para a CBM é realizada com antifúngicos orais por longos períodos associados a abordagens físicas, como cirurgia, crioterapia e termoterapia; no entanto os antifúngicos disponíveis têm eficácia limitada tornando importante padronizar novas opções terapêuticas (Belda et al., 2020).

A exérese cirúrgica é o método terapêutico mais eficaz indicada nos casos iniciais e bem localizados podendo, também, ser utilizada em associação com itraconazol ou terbinafina. A eletrocirurgia tem indicação nas lesões pequenas e localizadas onde possa ser realizada a ablação completa da lesão. O laser de gás carbônico (CO₂) com margens de segurança e terapia fotodinâmica também são possibilidades terapêuticas utilizadas com sucesso (Queiroz-Telles et al., 2017b; Lan et al., 2021).

A criocirurgia com nitrogênio líquido é um método seguro com excelentes resultados, sendo considerada uma boa opção terapêutica para o tratamento da CBM. A eficácia dessa modalidade terapêutica não está na destruição do parasita pelas baixas temperaturas, mas, sim, através de fenômenos biológicos tardios induzidos pelo frio como necrose, inflamação e até um possível papel de adjuvância imunológica (Castro et al., 2003).

Há relatos de casos tratados com eficácia com terapia fotodinâmica e cirurgia micrográfica de Mohs (Brito; Bittencourt, 2018; Lan et al., 2021).

A termoterapia é utilizada na temperatura de 43 a 46°C através do uso de bolsa térmica, devendo ser realizada várias vezes ao dia. O método é explicado pela ação fungicida ou fungistática do calor sobre o fungo ou pela estimulação dos mecanismos de defesa, uma vez que há o aumento do fluxo sanguíneo com maior aporte de fagocitose (Castro et al., 2003).

Dentre os antifúngicos orais, o padrão ouro na CBM é o itraconazol. Assim como os demais azólicos, ele age inibindo a síntese do ergosterol da membrana celular do fungo, a qual fica mais permeável (Grant; Clissold, 1989). Deve ser administrado na dosagem de 200 a 400 mg/dia com duração prolongada de 8-10 meses. No entanto, em alguns casos é mantido até a redução da lesão ou mesmo até os critérios de cura serem atingidos, o que pode durar um tempo mais prolongado. Esse fármaco age em todos os agentes etiológicos da CBM, mas tem maior eficácia no *C. carrionii* em comparação à *F. pedrosoi* (Queiroz-Telles et al., 2011).

O segundo antifúngico mais utilizado é a terbinafina com eficácia similar à encontrada com o itraconazol. Trata-se de uma alilamina com efeitos fungicidas e fungistáticos através da inibição esqualeno-peroxidase, a qual age diretamente na função da membrana do fungo pela biossíntese do ergosterol. A dose recomendada é de 250 a 500 mg/dia por tempo variável, de acordo com a melhora clínica e/ou cura micológica (Queiroz-Telles et al., 2017b).

Em 2011, Criado et al. utilizaram o voriconazol em paciente com CBM pela primeira vez e concluíram que, apesar de ser uma medicação de alto custo, é uma droga segura e, possivelmente, promissora para uso nos casos de doença extensa refratária ao tratamento convencional (Criado et al., 2011).

Dentre os novos triazólicos, o posaconazol tem sido descrito como a melhor opção para o tratamento de todas as formas de CBM inclusive nos casos resistentes e refratários. A posologia recomendada é de 800 mg/dia divididos em duas tomadas por um período prolongado. Um triazólico mais recente chamado de Isavuconazole, que vem sendo utilizado no tratamento de aspergilose e mucormicose invasivas, foi testado em alguns poucos casos de CBM e foi demonstrada uma excelente eficácia *in vitro* contra fungos melanizados sugerindo ser um fármaco promissor no tratamento da CBM (Queiroz-Telles et al., 2017b).

Cetoconazol oral e 5-fluorouracil tópico já foram usados associados no passado com resultados variáveis e muitos efeitos colaterais. Vitamina D e iodeto de potássio oral também já foram utilizados no passado sem muita eficácia (Queiroz-Telles et al., 2011).

A imunoterapia, a qual visa estimular ou restaurar a capacidade do sistema imunológico de combater uma infecção superando o comprometimento imunológico do hospedeiro, já foi usada como arma terapêutica na CBM através de alguns agentes imunoestimulantes, como o imiquimod e o glucano (Breda et al., 2021).

O glucano é um carboidrato, o qual é um composto da parede celular de diversos fungos, e há evidências de que essa molécula tenha efeito positivo no tratamento de doenças, pois pode estimular respostas imunes inatas. Há a descrição da melhora clínica de um paciente CBM tratado com glucano no qual houve regressão significativa da lesão em uma forma grave de CBM após o tratamento com glucano e itraconazol (ITZ); em um paciente com história de três anos de tratamento sem sucesso apenas com drogas antifúngicas, revelando poder ser uma alternativa adjuvante no tratamento desta doença (Meira et al., 1996; Breda et al., 2021).

O imiquimod é um composto sintético, indutor de citocina, que estimula as vias imunes inatas e adaptativas através do receptor *Toll-like 7* (TLR7) induzindo o recrutamento e ativação celular com a produção de IFN-gama. Este composto sintético possui potentes atividades antivirais, antitumorais e imunorreguladoras (Breda et al., 2021).

Sousa et al. (2014) descreveram o uso tópico do imiquimod com resultado satisfatório num relato de quatro casos de CBM onde foi usado a 5% e promoveu um infiltrado liquenoide como reflexo da imunidade local, concluindo-se que é capaz de modificar e acelerar a resposta ao tratamento antifúngico convencional sem efeitos colaterais. O mesmo resultado favorável foi relatado em 2021 por Huang et al. mostrando ser um interessante método terapêutico (Sousa et al., 2014; Huang et al., 2021).

Foi relatado o uso de acitretin em associação com antifúngico oral com êxito terapêutico (Belda et al., 2021b). Belda et al. (2020) publicaram um relato de caso no qual dois pacientes com extensas lesões de CBM foram tratados com a associação de itraconazol, acitretina e imiquimod mostrando resultados satisfatórios.

Outros métodos terapêuticos como o uso de triciclazol, um inibidor da melanina, e inibidores da peptidase do vírus da imunodeficiência humana (HIV) também foram estudados no contexto da CBM mostrando interessante atividade fungicida (Passero et al., 2021).

Alguns autores postulam que a obtenção de uma vacina ou abordagem imunoterápica contra a CBM seriam excelentes medidas terapêuticas, no entanto uma elucidação profunda do sensoriamento imunológico durante as interações hospedeiro-fúngico seria fundamental para fornecer dados úteis para abordagens de imunoterapia, assim como o conhecimento completo do proteoma fúngico específico do hospedeiro seria essencial para a identificação de novas vacinas (Breda et al., 2021).

O tratamento da CBM deve ser embasado nos critérios clínicos, micológicos e histopatológicos. A cura clínica é obtida com o desaparecimento da lesão, da cicatriz e dos sintomas associados como prurido e dor local. Segundo alguns autores, é necessário o acompanhamento por dois anos sem recorrência para estabelecer a cura do paciente (Queiroz-Telles et al., 2017b).

Até o momento, faltam dados sobre um tratamento padrão na literatura médica, o que pode ser parcialmente explicado pela existência de uma diversidade de agentes etiológicos e formas clínicas, assim como pelo pouco entendimento do padrão imunológico envolvido na CBM (Passero et al., 2021).

1.3 O padrão da resposta imune nas micoses cutâneas

A linha de defesa inicial do hospedeiro contra as infecções fúngicas está nas barreiras físicas da pele e nas superfícies das células epiteliais da mucosa do trato gastrointestinal, respiratório e genito-urinário (Abbas; Linchtman, 2005).

O reconhecimento e neutralização dos fungos inicialmente são executados pelas colectinas, defensinas e componentes do sistema complemento e são mediados por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) presentes nas células do hospedeiro, como os receptores do tipo *toll* (TLRs) e os receptores de lectina tipo C (como dectina-1, dectina-2) que reagem com estruturas dos microorganismos conhecidas como padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs). O sistema de defesa é ativado tão logo ocorra o reconhecimento dos PAMPs pelos PRRs (Abbas; Linchtman, 2005; Breda et al., 2021).

Os principais responsáveis pela imunidade inata contra os fungos são neutrófilos, macrófagos, monócitos, células dendríticas, além das células epiteliais e endoteliais, os quais promovem a fagocitose e/ou eliminação direta do parasita enquanto produzem mediadores químicos capazes de desencadear as diversas etapas da cascata de resposta imune (Seder; Gazzinelli, 1999; Breda et al., 2021).

Pacientes neutropênicos são muito mais suscetíveis a infecções fúngicas oportunistas. É suposto que os neutrófilos liberem substâncias fungicidas, como os intermediários reativos do oxigênio e enzimas lisossomais, além de fagocitarem os fungos para destruição intracelular. A fagocitose do fungo pelas células apresentadoras de antígeno (APC), tais como macrófagos e células dendríticas, leva à maturação dessas células e faz a diferenciação de células T naive em células T auxiliares (Th) efectoras (Romani; Howard, 1995; Seder; Gazzinelli, 1999; Breda et al., 2021).

O aumento do conhecimento sobre as células T progrediu rapidamente nos últimos 20 anos, e subconjuntos de células T recém-descobertos mostram uma grande diversidade de características e diferenciações. Vários

subconjuntos dessas células são capazes de regular uns aos outros para manter o corpo em um complexo e eficiente equilíbrio (Gong et al., 2021).

Os linfócitos T reguladores (Treg) têm a função de limitar as respostas excessivas das células T mediando a magnitude das respostas efetoras da imunidade inata e adaptativa. Esse mecanismo pode diminuir a eficácia da resposta imune protetora, levando à persistência da infecção fúngica no paciente e, nos casos mais graves, à imunossupressão (Seder; Gazzinelli, 1999).

Em relação à imunidade adaptativa, o equilíbrio entre imunidade celular e humoral é fundamental para a evolução de várias doenças infecciosas, entre elas as micoses. Este equilíbrio é influenciado pela ativação de determinadas subpopulações de células T CD4 + que podem ser classificadas de acordo com o tipo de citocinas produzidas. Sendo assim, inicialmente foram descritos os interferon gama (IFN- γ), interleucina-2 (IL-2) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), produtos de células T CD4 + chamadas células T auxiliar Th1, enquanto IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e fator transformador do crescimento beta (TGF- β) são produzidos por células Th2 (Seder; Gazzinelli, 1999; Breda et al., 2021).

O principal mecanismo da imunidade adaptativa contra os fungos é a imunidade mediada por células, onde o predomínio da resposta Th1 é considerado o mais eficaz no combate a esses tipos de infecções, e a resposta Th2 é considerada menos eficaz e, conseqüentemente, prejudicial para o hospedeiro. O padrão Th1 está diretamente associado à proteção contra fungos e à efetividade de vacinas antifúngicas; sua ativação decorre da interação de células fúngicas com TLRs e receptores de lectina tipo C, resultando na produção de IL-12 e IFN- γ , citocinas preponderantes no processo de ativação de fagócitos no sítio de infecção (Steinman, 2007; Breda et al., 2021).

O perfil Th2 favorece a ativação alternativa dos macrófagos, além de diminuir os efeitos produzidos pelo perfil Th1, favorecendo o surgimento de doenças fúngicas, suas recidivas e o surgimento de reações alérgicas desencadeadas pela presença de células fúngicas. Esse padrão surge após a

diferenciação das células T naive, induzido, sobretudo, pelas IL-4 e IL-13 (Abbas; Linchtman, 2005; Passero et al., 2021).

Após a sua descrição, as células Th17 foram associadas à resposta imunológica das doenças causadas por fungos e identificadas como um dos principais mecanismos efetores que promovem resistência a esses patógenos. Portanto, assim como a resposta Th1, a população de linfócitos Th17 também está associada ao padrão de resposta protetora contra infecções fúngicas. Na experiência com modelo de infecção causada por *Pneumocystis jirovecii*, a produção de IL-17 e IL-23 foi descrita como sendo importante na resposta protetora (Steinman, 2007; Breda et al., 2021).

As células Th17 estimulam células epiteliais, macrófagos e células endoteliais a produzirem citocinas e quimiocinas inflamatórias, a exemplo da IL-1 β , IL-23 e IL-6 e peptídeos antimicrobianos, tais como defensinas, induzindo acúmulo de neutrófilos e outras células inflamatórias que desempenham um papel relevante no controle de infecções fúngicas (Steinman, 2007; Breda et al., 2021; Passero et al., 2021).

Zelante et al. (2011) mostraram que, na infecção experimental com *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*, a IL-17 (e IL-23) induzem o aumento da capacidade migratória e da atividade inflamatória de neutrófilos e, ao mesmo tempo, reduzem a atividade fungicida dessas células contra esses patógenos.

Descritas em 2009, as células Th22, que são células produtoras de citocinas em especial de IL-22, parecem ser essenciais na defesa contra agentes bacterianos e contra alguns fungos como a *C. albicans* (Zenewicz et al., 2007; Liu et al., 2009).

Em relação ao comportamento imunológico das micoses, cada uma delas tem as suas características específicas. Na Candidíase, as lesões geralmente começam pelas mucosas, e parece ser a imunidade mediada por células a responsável por impedir que os fungos se propaguem aos tecidos (Harty et al., 2000).

De uma maneira geral, a resistência à infecção com *C. albicans* está associada ao padrão de resposta Th1, enquanto a imunidade mediada por Th2 é associada à susceptibilidade. Queratinócitos, neutrófilos, macrófagos,

eosinófilos e basófilos compreendem a primeira linha de defesa contra a infecção desse patógeno. Os neutrófilos são as células efetoras que, inicialmente, atuam na eliminação do fungo *in vivo* e têm papel imunomodulador no desenvolvimento da resposta de linfócitos T auxiliares. Os neutrófilos produzem, sobretudo, as citocinas IL-12 e IL-10, e, por estarem presentes em grande quantidade na candidíase, parecem ser importantes na determinação do padrão de resposta imune adaptativa no curso da infecção (Harty et al., 2000).

Indivíduos infectados com *Candida albicans* produziram uma quantidade significativamente maior de IL-22 em comparação aos controles saudáveis. Estes dados demonstram que as células T produtoras de IL-22 em seres humanos podem desempenhar um papel importante na defesa contra infecções fúngicas tais como *C. albicans* (Liu et al., 2009).

Na PCM, sugere-se que a resposta envolvendo a resistência à *P. brasiliensis* depende, principalmente, das células Th1, enquanto a suscetibilidade a este patógeno necessariamente está relacionada às células Th2. (Castro et al., 2013).

A resposta imunológica na PCM varia conforme a manifestação clínica da doença. Na forma juvenil (FJ), há o predomínio da resposta Th2 com liberação de citocinas supressoras, como IL-4, IL-5, IL-10, TGF- β e baixa produção de IFN- γ e de TNF- α . A forma do adulto (FA) desenvolve uma resposta mista produzindo citoquinas do tipo Th1, tais como IFN- γ , TNF- α e IL-2, bem como quantidades variáveis de IL-10 e IL-4, relacionadas com células Th2. Nos pacientes com infecção assintomática (IA), que são os indivíduos saudáveis com paraccocidiodina positiva, há o desenvolvimento de células contra antígenos fúngicos e alta produção de IFN- γ , IL-2 e TNF- α e níveis basais de IL-4, IL-5 e IL-10 (Zhu et al., 2010; Castro et al., 2013).

Estudos demonstraram que os pacientes com PCM apresentam um número elevado de células T reguladoras (Treg) na circulação periférica as quais levam a uma atividade supressora. Entre as citocinas Th1, o IFN- γ desempenha um papel importante na ativação da resposta imune mediada por células participando ativamente da resistência à infecção por *P. brasiliensis*, além de atuar através da ativação de macrófagos aumentando seu

metabolismo oxidativo e favorecendo a destruição da célula leveduriforme do *P. brasiliensis*. Foi observado, também, um aumento de IL-4, citocina que caracteriza a resposta Th2 a qual se torna relevante na inibição da diferenciação e atuação Th1 sobre a resposta humoral (Zhu et al., 2010).

Na PCM foi observada imunorreatividade para TGF- β 1 difusa na derme de lesões mucocutâneas e foi detectado um aumento do seu depósito na área de fibrose após o tratamento (Xavier et al., 2008).

Acredita-se que as células dendríticas plasmocitoides possam agir como uma fonte secundária importante de citocinas na patogenia das doenças PCM e CBM (Pagliari et al., 2014).

Recentemente, foi relatado que, na pele e nas lesões de mucosas de pacientes com PCM, é encontrada grande quantidade de células produtoras de IL-17. Outros relatos demonstraram que a produção de IL-9 nos pacientes com PCM, seja na forma FA ou FJ, foi maior quando comparada com os outros grupos controles. Em relação à IL-22, alguns resultados demonstraram aumento na produção dessa citocina por células de pacientes com PCM ligeiramente superior na forma FA (Steinman, 2007; Zelante et al., 2011).

A presença de citocinas múltiplas observadas nos pacientes com PCM indica que, em vez de um fenótipo fixo, os linfócitos T CD4+ podem apresentar uma pluralidade de fenótipos (Castro et al., 2013).

Em suma, na PCM a resistência à infecção observada nos pacientes parece ser mediada por uma predominantemente resposta Th1, responsável pela ativação de macrófagos, que são as células mais importantes na resistência ao *P. brasiliensis*. A forma mais grave da doença (FJ) apresenta uma resposta caracterizada por células Th2/Th9, responsável pela indução de uma resposta da imunidade humoral, bem como um aumento do número de eosinófilos. A resposta inflamatória característica dos pacientes com FA apresenta predomínio de células Th17, com importante participação de células Th1 (Liu et al., 2009; Castro et al., 2013).

A resposta Th17 nestes pacientes, embora contribuindo para a resistência parcial à infecção, pode induzir a uma resposta inflamatória exacerbada, à destruição dos tecidos e fibrose, frequentemente observadas neste grupo de pacientes (Liu et al., 2009; Castro et al., 2013).

Na histoplasmose, o agente etiológico, representado por um parasita intracelular que vive em macrófagos, é eliminado por mecanismos celulares à semelhança das infecções causadas por bactérias intracelulares. Os fungos, geralmente, desencadeiam respostas de anticorpos específicos que são úteis para o diagnóstico sorológico dessa infecção (Harty et al., 2000).

No que se refere à criptococose, foi descrito que cepas de *Cryptococcus neoformans* inibem a produção de determinadas citocinas como TNF- α e IL-2 pelos macrófagos e estimulam a produção de IL-10 inibindo a ativação dos macrófagos (Romani; Howard, 1995; Seder; Gazzinelli, 1999).

Na criptococose pulmonar, há um predomínio do padrão de resposta do tipo Th1 seguido de recrutamento e ativação de leucócitos no pulmão. O infiltrado leucocitário, em resposta à infecção com *Cryptococcus neoformans*, inclui um conjunto celular de origem linfóide e mieloide capaz de matar ou inibir o crescimento do fungo sendo os neutrófilos e macrófagos as principais células fagocíticas responsáveis pela eliminação do fungo no tecido. Os linfócitos T CD4+ são imprescindíveis no controle do parasita, comprovado pela resistência do hospedeiro na criptococose cerebral, quando há predomínio de linfócitos T CD4+ (Grupo do Consenso de Criptococose, 2008).

Apesar de mais recentemente haver publicações descrevendo o padrão de resposta imune na DJL, os mecanismos de imunidade inata e adaptativa nesta doença ainda não estão totalmente elucidados. Mesmo as lesões sendo ricas em macrófagos e células gigantes que fagocitam grande quantidade de fungos, há uma deficiência parcial da imunidade celular com reação de dinitroclorobenzeno (DNCB) negativa e aumento no tempo de rejeição ao enxerto cutâneo, mas o teste tuberculínico é positivo (Pecher, 1994). A associação à imunodeficiência celular grave, como em pacientes HIV-AIDS, não altera o curso da doença (Xavier et al., 2006).

Apesar dos poucos estudos que avaliam a resposta imunológica de pacientes com DLJ, uma análise imuno-histoquímica do infiltrado inflamatório de lesões de pacientes com essa doença revelou uma alta frequência de células TGF- β 1 e IL-10. A presença dessas citocinas pode resultar na supressão de respostas protetoras Th1 e Th17 a qual permite a ativação

alternativa de macrófagos e, como consequência, torna mais provável a persistência fúngica (Azevedo et al., 2015).

A citocina TGF- β é considerada como um marcador determinante de susceptibilidade a infecções agudas e crônicas, pois tem capacidade de induzir apoptose de células imunes e inibir a resposta celular imune como pode ser visto na intensa inibição da atividade de macrófagos diminuindo sua eficácia microbicida (Brito; Quaresma, 2007; Xavier et al., 2008).

A atividade do TGF- β já foi descrita em diversas doenças infecciosas, como na hanseníase, hepatites crônicas e febre amarela. Na DJL, o TGF- β tem intensa imunomarcagem, o que pode explicar as abundantes faixas de colágeno vistas na doença, pois essa citocina induz fibrose e pode ser o motivo do aspecto queloidiano observado na maioria dos casos (Brito; Quaresma, 2007; Xavier et al., 2008).

A importância do TGF- β na DJL pode ser sustentada pela indução de fibrinogênese e apoptose em algumas linhagens celulares, levando à inibição da resposta imune celular ou à fibrose, favorecendo o curso crônico da doença (Brito; Quaresma, 2007).

Vilani-Moreno et al. (2004) quantificaram as citocinas em sobrenadante de cultura de células de pacientes com DJL e detectaram uma diminuição de IL-2 e aumento de IL-4 e IL-6. Esse predomínio no perfil Th2 poderia alterar a capacidade de regulação dos mecanismos responsáveis pela contenção do agente etiológico na DJL. Foi descrita uma abundância de Células B e imunoglobulinas principalmente por IgG na imunohistoquímica de pacientes com DJL, o que pode indicar que a resposta humoral promove uma resposta imune Th2 e um fenótipo anti-inflamatório em macrófagos infectados. (Kanashiro-Galo et al., 2020).

A ausência de expressão de CD123 e CD303 parece indicar que as células dendríticas plasmocitoides não estão envolvidas na resposta imunitária da DJL (Pagliari et al., 2014).

Através de recentes investigações, foi detectada a participação efetiva das células de Langerhas e dendrócitos dérmicos na resposta imune da DJL (Barboza et al., 2015). Atuais estudos revelam uma prevalência de CD8 sobre células CD4, seguidas por células *natural killer* (NK) na DJL. Tais dados

sugerem que, na DJL, a resposta imunológica citotóxica poderia representar outro mecanismo importante para o controle da infecção por *Lacazia loboi*. Concluindo-se que, embora as células T CD4+ sejam essenciais para a defesa do hospedeiro na DJL, as células T CD8+ poderiam desempenhar um papel na eliminação do fungo (Alexandre et al., 2017).

As células Th17 representam um fator de destaque na resposta imunológica de DJL. Há uma elevação da IL-17 e as citocinas IL-1 β e IL-6, associadas ao número aumentado de TGF- β , parecem estimular o padrão de resposta da doença. As células Th17 poderiam estar presentes como um esforço para modular a resposta imune local, contudo níveis elevados de um perfil de Th17 poderiam superar o papel das células Treg. O desequilíbrio entre as células Treg/Th17 parece corroborar com a resposta imunológica menos eficaz contra o fungo (Kanashiro-Galo et al., 2016).

No que se refere à CBM, as condições imunológicas do hospedeiro, a virulência, viabilidade e quantidade de parasita são fatores determinantes do curso da infecção. Em virtude da cronicidade da doença, com permanência do fungo no tecido por longo período, é de extrema importância a ativação do sistema imunológico do hospedeiro. As formas clínicas variam de acordo com a resposta imunológica do paciente, os mecanismos de defesa influenciam no surgimento e na gravidade das infecções fúngicas e o processo de fagocitose e destruição de fungos pode ser suprimido devido à incapacidade dos receptores *Toll-like* de reconhecer o patógeno (Franzen et al., 2008; Passero et al., 2021).

Após a implantação traumática das hifas do fungo da CBM, o tecido e as células imunes irão liberar metabólitos e citocinas que aumentarão a permeabilidade do endotélio; associados a esse processo, mediadores imunológicos e alterações fenotípicas que ocorrem no endotélio, permitirão a adesão e migração de leucócitos celulares, a passagem de componentes plasmáticos para o tecido danificado e a ativação de células imunes. Nesse contexto, os componentes da resposta imune inata irão interagir primeiramente com o patógeno. Neutrófilos, células fagocitárias mononucleares e linfócitos demonstraram ser os tipos celulares mais comuns no infiltrado inflamatório de pacientes com CBM, organizados concentricamente em torno de células muriformes (Breda et al., 2021; Passero et al., 2021).

Na CBM, o tipo de reação granulomatosa padrão encontrado, associado aos abscessos ricos em neutrófilos, reflete a incapacidade das células fagocíticas na eliminação completa do fungo. Os fagócitos destroem as células fúngicas pela produção de reativos intermediários do oxigênio, produção de mieloperoxidase ou outros componentes secretados por tais células, atuando de forma mais fungistática do que fungicida. Na CBM, embora os macrófagos tenham sido capazes de produzir peroxidase de hidrogênio, possivelmente a melanina fúngica sequestra essa espécie reativa de oxigênio. Os agentes CBM possuem alta concentração de melanina na parede celular; esse pigmento tem sido associado à virulência e evasão imune dos agentes da CBM, e sua alta síntese inibe a atividade de fagocitose de macrófagos, levando à cronicidade da doença (Queiroz-Telles et al., 2017; Breda et al., 2021; Passero et al., 2021).

Outro componente importante da parede celular fúngica é a quitina, um polissacarídeo que desempenha um importante papel na estrutura e diferenciação do fungo e age como um PAMP. Foi relatado um componente semelhante à quitina de células muriformes de *F. pedrosoi* que é capaz de prejudicar o reconhecimento imunológico de β -glucanos pela dectina-1, bem como inibir o desenvolvimento de Th17 (Breda et al., 2021).

Na CBM, a resposta imune não é totalmente clara, embora a principal resposta seja celular envolvendo macrófagos, células de Langerhans, dendrócitos dérmicos fator XIIIa+, além da resposta humoral (Brito; Bittencourt, 2018; Passero et al., 2021).

A expressão de citocinas varia de acordo com a gravidade da doença. Nos casos de maior gravidade, há predomínio da IL-10 e baixos níveis de IFN- γ resultando numa proliferação celular de células T ineficiente, características da resposta do tipo Th2. Na forma leve da doença, ocorre o contrário com o perfil citocínico, levando a uma elevada proliferação de células T. Portanto, as formas leves da CBM favorecem a proliferação do perfil Th1 revelando uma boa resposta imunológica que protege o hospedeiro contra a doença. Por outro lado, as formas moderadas da doença expressam uma resposta entre os perfis Th1 e Th2 (Queiroz-Telles et al., 2017b).

Podemos, então, sugerir que a CBM pode ser caracterizada como uma doença bipolar espectral, quando uma resposta imune Th1 tende a se desenvolver, lesões cutâneas atróficas podem ser observadas com granulomas tuberculoides bem formados, mas pacientes que montam uma resposta imune Th2 mostram tipos mais graves de lesões com reação granulomatosa supurativa (D'Avila et al., 2003; Passero et al., 2021).

A função das células Th17 na CBM não está totalmente esclarecida, mas suas citocinas parecem exercer um importante papel na defesa mucocutânea do hospedeiro. Recentes publicações identificaram, por meio de imuno-histoquímica, uma participação maciça de linfócitos T secretores de IL-17 nos infiltrados inflamatórios de lesão de pacientes com CBM, no entanto foram observadas poucas células expressando o fenótipo regulatório. É descrito que a IL-17 e IL-22 agem na defesa muco cutânea do hospedeiro (Queiroz-Telles et al., 2017b).

Alguns estudos notaram a participação da IL-17 nesta infecção fúngica e foi observado que essa citocina recruta neutrófilos, o que pode ajudar na destruição de patógenos. No entanto, apesar de um acúmulo significativo de neutrófilos ser observado na pele de animais experimentais e humanos com CBM e em diferentes infecções fúngicas e os neutrófilos serem capazes de destruir fungos, os agentes etiológicos da CBM parecem ser resistentes aos principais efeitos microbicidas dessas células. Portanto, é necessário mais evidências científicas para entender o real papel da citocina IL-17 na CBM (Breda et al., 2021; Passero et al., 2021).

Um dado interessante é que agentes da CBM se ligam ao *Macrophage-inducible C-type lectin* (MINCLE), um novo receptor de descoberta da família de receptores de lectina tipo C (CLR), um PRR que inibe e evita o sistema imunológico do hospedeiro. A interação fúngica com MINCLE leva à sinalização intracelular que bloqueia a produção de IL-12 inibindo a diferenciação Th1 de linfócitos CD4+, levando à diferenciação Th2, favorecendo a sobrevivência do patógeno e disseminação da infecção. A ativação do MINCLE também inibe a diferenciação de Th17, mas seu mecanismo de inibição ainda não está claro (Breda et al., 2021).

Foi demonstrado que pacientes com CBM apresentaram altos níveis séricos de fator transformador de crescimento (TGF- β) que foram diminuídos após três meses de terapia com itraconazol. No entanto, após 6 a 12 meses, as quantidades de TGF- β aumentaram para os níveis encontrados antes da terapia, o que está relacionado com a lenta melhora clínica e a persistência das células escleróticas e da fibrose (Silva et al., 2010).

1.4 Células Th22

Pesquisadores de *Helmholtz Zentrum München* e do Centro de Alergia e Meio Ambiente (ZAUM) da *Technische Universität München*, chefiados pela Dra. Stefanie Eyerich, juntamente com seus colegas de Londres e Roma, descobriram, em 2009, as células Th22 durante a análise de amostras de pele de pacientes com psoríase, eczema atópico e dermatite de contato alérgica (Eyerich et al., 2009).

Esse novo grupo celular, chamado de Th22, corresponde a um diferente subconjunto de células Th humanas CD4⁺ produtoras de respostas imunológicas adaptativas distintas com citocinas e funções específicas. Ele apresenta diferenças no perfil de genes, quando comparados às células Th1, Th2 e Th17, confirmando sua identidade individual. São células T helper com o fenótipo receptor de quimiocina C-C (CCR6 + CCR4 + CCR10 +) expressos na sua superfície e são caracterizadas pela secreção principalmente de IL-22, além de TNF- α e IL-10, na ausência de IFN- γ , IL-4 e IL-17 (Eyerich et al., 2009).

Embora as células NK exibam um perfil semelhante de citocinas, as células Th22 foram claramente definidas como células não NK, demonstradas pela expressão de CD4, pelo receptor de antígeno das células T (TCR) e pela ausência de marcadores de células NK (Eyerich et al., 2009).

A descoberta de subconjuntos de células Th22 contribuiu para enriquecer ainda mais o complexo sistema de regulação imune e ilustra a alta plasticidade das células Th naive (Gong et al., 2021).

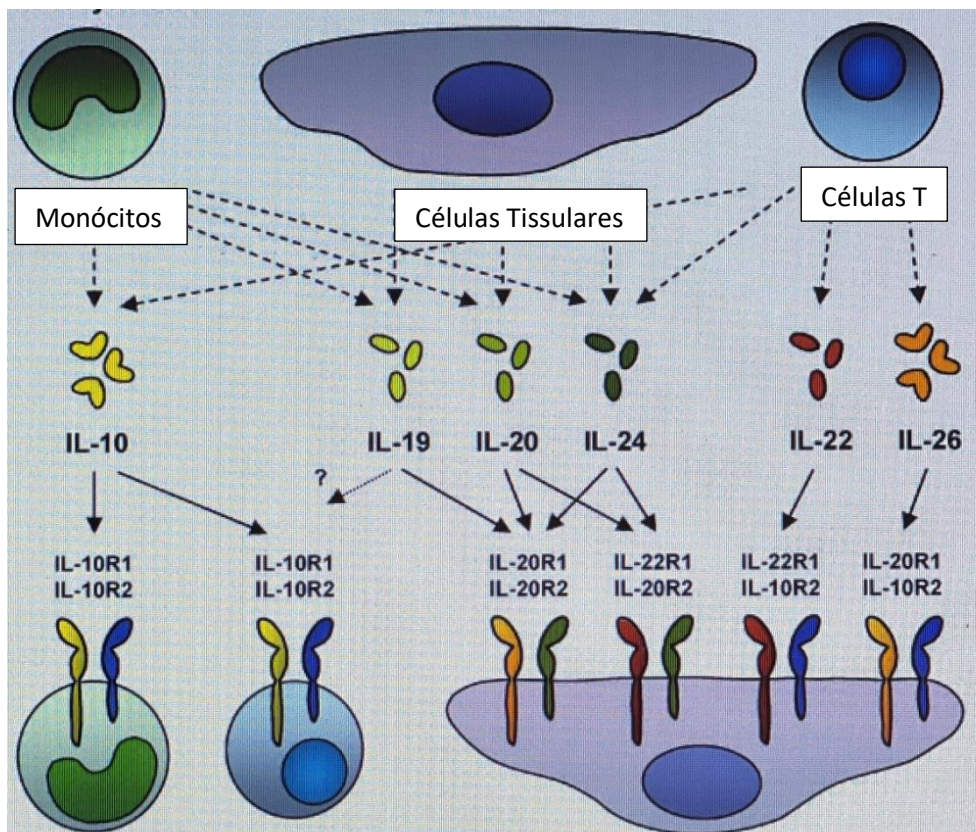
A diferenciação das células Th virgens em células Th22 pode ser promovida mediante a liberação de citocinas específicas como a IL-6 e TNF- α (Duhon et al., 2009; Gong et al., 2021; Jiang et al., 2021).

A função das células Th22 estende-se desde o envolvimento inicial na inflamação da pele e cicatrização de feridas até a regulação de processos patológicos, como doenças autoimunes, doenças infecciosas, tumores, doenças hematológicas e doenças renais (Gong et al., 2021; Jiang et al., 2021).

Estudos revelam que as células Th22 estão envolvidas na patogênese das doenças autoimunes através de múltiplas funções efetoras, incluindo a produção de várias citocinas, de tal maneira que evidências emergentes apoiam a noção de que as células Th22 podem servir como alvos terapêuticos para doenças autoimunes (Jiang et al., 2021).

Os diferentes papéis das células Th22 e moléculas associadas estão intimamente ligados aos tipos de doenças virais e à duração da infecção viral. Estudos relatam que células Th22 desempenharam um papel protetor nas infecções causadas pelo HIV, pelo vírus influenza e pelo vírus da hepatite B. Na doença mão, pé, boca, há relatos que as células Th22 estão associadas à gravidade, e na infecção pelos vírus da hepatite C desempenham um papel crucial na patogênese. A dinâmica imunológica em pacientes infectados com SARS-CoV-2 em relação às células Th22 ainda é incerta (Gutiérrez-Bautista et al., 2020; Fenoglio et al., 2021; Gong et al., 2021).

A citocina efetora principal de células Th22, a IL-22, é produzida por células do sistema imune que incluem, além das células Th22, Th1 e Th17, células NK e células indutoras de tecido linfóide. Ela pertence à família da IL-10, a qual é formada pela IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 e IL-26 (Figura 3). Seu principal papel biológico envolve o incremento da imunidade inata, proteção contra dano tecidual e auxílio na regeneração de tecidos. Suas células-alvo são células de tecido da pele, fígado e rim, de órgãos do trato respiratório e gastrointestinal modulando a resposta tecidual durante a inflamação (Witte et al., 2010; Jiang et al., 2021).



FONTE: Adaptado de Sabat (2010)

Figura 3 - Fontes e alvos celulares dos membros da família IL-10

A IL-22 pode desempenhar papel protetor ou patogênico em doenças inflamatórias crônicas dependendo da natureza do tecido afetado e das citocinas presentes no meio. Portanto, é difícil descrever sua função precisa, pois tem atividades distintas; não é anti-inflamatória, nem é, necessariamente, pró-inflamatória. No caso de respostas epiteliais inatas, pode ter efeito prejudicial ou protetor (Duhon et al., 2009; Gong et al., 2021).

Exemplos de efeitos prejudiciais da IL-22 são encontrados na psoríase, onde vemos a hiperplasia epitelial que também pode ser induzida por esta citocina em culturas artificiais de pele e nas células epiteliais brônquicas humanas e miofibroblastos colônicos, nos locais onde a IL-22 sinergiza com IL-17 na indução de citocinas pró-inflamatórias. Exemplos de efeitos protetores da IL-22 foram relatados na pneumonia bacteriana Gram-negativa, na qual ela induz a secreção de substâncias antimicrobianas nas células epiteliais de pulmão e nos casos de inflamação aguda do fígado, onde ela age limitando os danos aos hepatócitos (Zenewicz et al., 2007).

Na pele, a IL-22 induz peptídeos antimicrobianos, promove a proliferação de queratinócitos e inibe a sua diferenciação, o que sugere um papel na remodelação da cicatrização de feridas e em mecanismos de defesa inata promovendo a proliferação e reparação de tecidos e órgãos, protegendo a integridade da barreira cutânea, aspectos esses confirmados em sobrenadantes onde as citocinas Th22 aumentaram a cicatrização de feridas num modelo de lesão *in vitro* que era exclusivamente dependente da IL-22 (Eyerich et al., 2009; Ouyang et al., 2019).

Alguns estudos apontaram que a IL-22 estaria envolvida na patogênese de algumas doenças autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico (LES), esclerose sistêmica, sarcoidose, doença inflamatória intestinal, assim como na dermatite atópica (Nogralles et al., 2009; Zhang et al., 2011).

O papel da IL-22 parece ser promissor como um potencial terapêutico para doenças inflamatórias crônicas, e o tratamento com citocina recombinante ou administração de terapia gênica de IL-22 pode aliviar a destruição de tecido durante as respostas inflamatórias. Portanto, a célula Th22 desempenha um papel importante nas doenças inflamatórias e autoimunes (Zhang et al., 2011; Yang et al., 2013).

Para Zenewicz e Flavell (2011), a IL-22 é expressa em algumas condições inflamatórias crônicas, incluindo psoríase e artrite reumatoide, e a sua regulação positiva está frequentemente relacionada com a atividade da doença.

A IL-22 é considerada um ativador da proliferação excessiva de queratinócitos; segundo alguns autores, seus níveis plasmáticos em pacientes com psoríase estão aumentados e diretamente correlacionados com a gravidade da doença. No entanto, outras publicações relatam que, na psoríase, as células Th22 estão elevadas, mas em menor proporção em relação à Th1 e Th17. O tratamento com anticorpos neutralizantes de IL-22 diminuiu os níveis de peptídeos antimicrobianos e inibiu o desenvolvimento da psoríase em um modelo de camundongos sugerindo o potencial terapêutico dos inibidores de IL-22, tanto na psoríase, quanto na artrite psoriásica (Wolk et al., 2009; Kagami et al., 2010; Mitra et al., 2012; Van Belle et al., 2012; Luan et al., 2014; Owczarczyk et al., 2020).

Níveis elevados das células Th22 estão associados aos níveis de proteína C reactiva no plasma de pacientes com sífilis secundária. Os estudos sugerem que as células Th22 podem estar implicadas na patogênese da doença (Zhu et al., 2012).

Conforme Silveira et al. (2015), na hanseníase há produção de IL-22, IL-13, TNF- α e FGF b. Neste estudo foi demonstrado que a expressão de IL-22 pode ser um mecanismo alternativo para desencadear a maturação fagolisossômica, levando ao aumento dos níveis intracelulares de cálcio, o que contribui para melhorar a fusão fagossômica.

A IL-22 desempenha um papel importante na defesa contra infecções fúngicas tais como *C. albicans* (Liu et al., 2009).

Dentre as citocinas produzidas pelas células Th22, o TNF- α tem como principal função 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).

A hipótese principal é de que a IL-22 e o TNF- α representam a combinação chave de citocinas expressas por células Th22 que desbloqueiam a ativação de queratinócitos. Em contraste com os efeitos principais na resposta imune inata por queratinócitos num contexto pró-inflamatório, IL-22 e TNF- α não se sinergizaram na cicatrização de feridas induzida pelas células Th22. Este efeito foi apenas dependente da IL-22 e refletiu a indução de genes promigradores em queratinócitos exclusivamente pela IL-22. Estes dados indicam uma dupla função da IL-22 na imunidade cutânea: por um lado, sendo protetora e regenerativa e, por outro, amplificando os sinais induzidos pelo TNF- α para contribuir para um microambiente pró-inflamatório durante as reações imunológicas da pele (Eyerich et al., 2009).

A IL-10, outra citocina também produzida por esse perfil celular, desempenha uma função de interesse no controle da inflamação e na regulação da resposta imune adaptativa, e sua desregulação está ligada à suscetibilidade a inúmeras doenças infecciosas e autoimunes em modelos de camundongos e em humanos. Essa citocina tem sido implicada como um regulador chave das respostas inflamatórias do hospedeiro durante a infecção

com uma variedade de patógenos parasitários, bacterianos, virais e fúngicos (Locksley et al., 2001; Moore et al., 2001; Hedrich et al., 2010).

No caso de doenças infecciosas em especial, as propriedades anti-inflamatórias da IL-10 suscitam um paradoxo, pois no início de respostas inflamatórias ela está relacionada às respostas eficazes contra patógenos nocivos. Por outro lado, a expressão de IL-10 pode facilitar a sobrevivência do patógeno, como, por exemplo, a sobrevivência de um fungo ou o estabelecimento de infecção persistente, como ocorre durante a infecção por *Leishmania* (Hedrich et al., 2010; Moreira et al., 2017).

Além de IL-22, TNF- α e IL-10, as células Th22 também secretam IL-26 e IL-13 e agem de forma sinérgica com IL-17, TNF- α e IFN- γ num contexto pró-inflamatório, levando a uma remodelação de tecidos através da expressão de fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs), aspectos importantes na expressão de doenças autoimunes. A IL-13 leva a uma inibição de macrófagos e ao aumento da produção de muco pelas células epiteliais (Eyerich et al., 2009).

O perfil de expressão de Th22 revelou vários FGFs. O FGF1 é um mitógeno intenso que exibe forte ação em diferentes tipos de células incluindo células endoteliais; o FGF2, também conhecido como fator básico de crescimento de fibroblastos (FGF b); possui atividades mitogênicas e de sobrevivência celular e está envolvido em vários processos biológicos, incluindo desenvolvimento embrionário, crescimento celular, morfogênese, reparo de tecidos, crescimento e invasão de tumores; o FGF5 atua na diferenciação neuronal e está associado à inibição do crescimento capilar. Estas substâncias destacam-se como relevantes em vários estádios de desenvolvimento e morfogênese, bem como na angiogênese e processos de cicatrização de feridas (Yu et al., 2007; Eyerich et al., 2009).

Embora o estudo da célula Th22 tenha sido estendido a vários sistemas, a compreensão desse mecanismo regulatório preciso ainda é muito limitada e a sua relação com Th17, Th9, Th1 e outras células não é completamente compreendida (Gong et al., 2021).

Em conclusão, as células Th22 representam um subconjunto de células T unicamente capaz de regular as respostas epidérmicas em doenças

inflamatórias da pele, o qual não é apenas definido por um perfil de expressão estável e distinto, mas, também, caracterizado pelo que parece ser um novo perfil funcional. A identificação de células Th22 proporciona um alvo celular para intervenção terapêutica e pode lançar luz sobre caminhos até agora desconhecidos no controle da imunidade dos tecidos e da sua remodelação (Eyerich et al., 2009).

2 JUSTIFICATIVA

Apesar de alguns trabalhos já terem descrito o padrão de resposta imune tecidual na DJL e CBM, poucos são os estudos que caracterizam a participação e o possível papel de novos perfis citocínicos na evolução das lesões nestas duas doenças, deixando uma lacuna no entendimento sobre o curso clínico e patogenia de ambas. Essas doenças crônicas têm difícil êxito terapêutico o que requer novos estudos para melhor esclarecimento sobre suas peculiaridades.

Como ambas as micoses profundas, DJL e CBM, na maioria dos casos, têm expressão clínica semelhante, pois são quase sempre exclusivas do tegumento, de localização subcutânea, sobretudo nos membros inferiores (MMII), evolução crônica, que podem cursar com o fenômeno da eliminação transepitelial (ETE), além da dificuldade terapêutica, sugerimos comparar os achados imunológicos desse novo perfil de citocina entre as duas doenças, com o intuito de incorporar novos paradigmas na sua evolução, trazendo benefícios para o entendimento da imunopatogenia e uma luz sobre a terapêutica específica ainda tão insatisfatória.

O *L. Lobo* apresenta melanina constitutiva na sua parede celular à semelhança dos agentes etiológicos da CBM, mesmo não sendo um fungo demáceo. Esse pigmento marrom escuro parece conferir resistência aos oxidantes produzidos por macrófagos, diminuindo a capacidade de eliminar o fungo, levando à maior resistência a fungicidas e fungistáticos. Portanto, a identificação de expressão do perfil das células Th22 poderá trazer conhecimentos até então inexistentes sobre alguns eventos imunológicos dessas micoses profundas e lançar luz sobre caminhos ainda não desvendados no controle da imunidade tecidual e da sua relação com a evolução da DJL e na CBM.

Através desse trabalho, buscaremos contribuir com o entendimento mais amplo da imunopatogenia destas infecções e esperamos poder, com isso, ter uma melhor compreensão de sua evolução e apresentação clínica, fornecendo dados relevantes que possam ser utilizados para o desenvolvimento de novas terapias capazes de modular a resposta imunológica do hospedeiro, não só na

DJL e CBM, como também nas demais micoses que cursam com processo inflamatório crônico.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar, comparativamente, a expressão tecidual de citocinas que participam da resposta Th22 nas lesões cutâneas da DJL e CBM.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar e comparar as características demográficas da casuística estudada na DJL e CBM;
- Quantificar e correlacionar a imunexpressão das citocinas de perfil Th22 através da marcação imuno-histoquímica para IL-22, TNF- α , IL-10, IL-13, FGF b nos pacientes com DJL e grupo controle;
- Quantificar e correlacionar a imunexpressão das citocinas de perfil Th22 através da marcação imuno-histoquímica para IL-22, TNF- α , IL-10, IL-13, FGF b nos pacientes com CBM e grupo controle;
- Quantificar e correlacionar, comparativamente, a imunexpressão das citocinas de perfil Th22 através da marcação imuno-histoquímica para IL-22, TNF- α , IL-10, IL-13, FGF b nos pacientes com DJL e CBM.

4 MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo do tipo transversal, de caráter retrospectivo, descritivo e analítico.

4.2 Descrição da população

O estudo consiste na análise de fragmentos de pele parafinados, obtidos a partir de biopsias cutâneas de 16 pacientes portadores da DJL e 17 pacientes portadores de CBM atendidos e diagnosticados no Departamento de Dermatologia do Hospital da Santa Casa de Misericórdia do Pará/Universidade Federal do Pará.

4.3 Parecer de ética

Esse projeto de pesquisa foi submetido à avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará com aprovação conferida em 06/07/2017, CAAE 68405317.8,0000.5172 (Anexo A). No desenvolvimento da pesquisa foram respeitadas as Normas de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (Res. CNS 466/12) e suas complementares do Conselho Nacional de Saúde (CNS) / Ministério da Saúde do Brasil.

4.4 Processo para obtenção dos dados

Inicialmente, foram analisados os prontuários para obtenção dos dados no que diz respeito à idade, sexo, procedência e localização das lesões dos pacientes com DJL e CBM. Em seguida, foram avaliados os aspectos histopatológicos dos pacientes selecionados em lâminas coradas pela hematoxilina-eosina (HE), seguindo o protocolo estabelecido por Bancroft e Gamble (2007). Posteriormente, foram analisados pelo mesmo observador os

aspectos imuno-histoquímicos das citocinas do perfil Th22 estudadas nas duas micoses profundas. Os resultados imuno-histoquímicos encontrados foram comparados entre a DJL, CBM e o grupo controle.

4.5 Seleção de pacientes

O material obtido no arquivo do Laboratório de Histopatologia do Departamento de Dermatologia do Hospital da Santa Casa de Misericórdia do Pará/Universidade Federal do Pará foi selecionado, de maneira aleatória, a partir de um conjunto de aproximadamente 100 blocos de parafina, seguindo os critérios abaixo.

4.5.1 Critérios de inclusão

- Blocos de parafina obtidos por biopsias oriundas de pacientes com diagnóstico histológico de DJL e CBM;
- Peças com melhor estado de conservação;
- Quantidade adequada de fragmento cutâneo para análise.

4.5.2 Critério de exclusão

- Blocos de parafina obtidos por biopsias que, após processamento, mostraram-se inadequadas para análise.

4.6 Controles

Foram utilizados para o grupo controle 10 blocos de parafina com biopsias de pele provenientes de pacientes sem doenças dermatológicas e sem alterações histológicas observadas, oriundos de bordas de cicatrizes de áreas fotoexpostas

4.7 Técnica de imunomarcção no tecido

Para a imunomarcção tecidual, os anticorpos primários monoclonais foram utilizados para análise das células Th22 e constituídos por anticorpos anti-IL-22, TNF- α , IL-10, IL-13, FGF b. O protocolo utilizado foi o descrito por Hsu et al. (1981) com metodologia parcialmente modificada por Quaresma et al. (2006).

A técnica para a imunomarcção do tecido com os anticorpos específicos para cada marcador foi baseada no método imuno-histoquímico envolvendo a formação do complexo Streptavidina-biotina-peroxidase (Anexo B). Inicialmente, as amostras teciduais foram desparafinizadas em xilol e hidratadas em álcool etílico em concentração de 90, 80 e 70%. Em seguida, a peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% por 45 minutos. Após, a recuperação antigênica foi feita com tampão citrato pH 6,0 por 20 minutos a 90°C. Em seguida, o bloqueio das proteínas inespecíficas foi feito com leite desnatado concentrado a 10% por 30 minutos. Finalizada esta etapa, os cortes histológicos foram incubados com os anticorpos primários diluídos em Soro albumina bovina (BSA) a 1% por 14 horas (Tabela 1).

Tabela 1 - Técnica para imunomarcção no tecido com anticorpos específicos

Citocina	Tipo de Anticorpo	Espécie animal	Diluição	Fabricante
IL-22	Monoclonal	Coelho	1:200	Abcam
TNF- α	Monoclonal	Coelho	1:200	Abcam
FGF b	Monoclonal	Camundongo	1:200	Abcam
IL-10	Monoclonal	Coelho	1:200	Abcam
IL-13	Monoclonal	Coelho	1:200	Abcam

Após este intervalo, as lâminas foram imersas em solução tampão de PBS 1X e, em seguida, incubadas com o anticorpo secundário biotilado LSAB (*DakoCytomation*) em estufa por 30 minutos a 37°C. Após a primeira incubação, as lâminas foram novamente imersas em PBS (Solução salina

tamponada com fosfatos) 1X e incubadas com estreptavidina peroxidase (*LSAB DakoCytomation*) por 30 minutos a 37°C. Após este intervalo, os cortes foram revelados com a aplicação da solução cromógena composta por diaminobenzidina a 0,03% e peróxido de hidrogênio a 3%. Terminando a etapa de revelação, os preparados foram lavados em água destilada e, em seguida, contracorados com a hematoxilina de Harris por 1 minuto. Finalmente, os cortes histológicos foram desidratados em álcool etílico em concentrações crescentes e diafanizados em xilol.

4.8 Análise quantitativa

A quantificação dos eventos histopatológicos e do padrão de imunomarcção foi feita pela contagem de células positivas para os diferentes anticorpos primários utilizados em cada 10 campos de grande aumento (400x) em gradículo graduado com 10 x 10 subdivisões e com 0,0625 mm² de área a ser avaliado na área da lesão, com auxílio de microscópio *AXIO IMAGER Z1-ZEISS* (modelo 4560006). Obtendo-se como resultado do número de células com expressão de cada citocina analisada por unidade de área na derme das lesões de ambas as doenças.

4.9 Análise estatística

Os dados coletados foram estruturados em um banco de dados no programa Microsoft Excel 2007, no qual também foram confeccionadas tabelas e figuras para representação dos dados. Posteriormente, foram analisados no programa Bioestat 5.0 (Ayres et al., 2003) para a geração de resultados estatísticos que comprovassem a associação de variáveis pertinentes ao estudo considerando o intervalo de confiança (IC) 95% e nível α 5% (p-valor $\leq 0,05$), isto é, um achado seria considerado estatisticamente significativo se valor de “p” fosse menor ou igual a 0,05 e seria considerado sem significância estatística se esse valor de “p” fosse maior que 0,05. Para a confirmação da hipótese de nulidade (H0) foi considerado $p > 0,05$ e para a rejeição, $p \leq 0,05$. Tendo-se a hipótese de nulidade aceita, significa dizer que as variáveis

envolvidas no teste não estão associadas, ou seja, não exercem nenhuma influência uma sobre a outra. Caso a hipótese de nulidade seja rejeitada, opta-se pela hipótese alternativa (H1), a qual afirmará que as variáveis estão relacionadas entre si.

Nas variáveis quantitativas, foram realizadas as medidas de tendência central, sendo calculadas a média e a mediana com seus respectivos desvios padrões.

O teste do Qui-quadrado foi utilizado nas comparações de n amostras independentes, cujas proporções observadas nas diversas modalidades seriam dispostas em tabelas de contingência $I \times c$, onde se determinariam as proporções observadas nas diferentes categorias.

O teste t e o teste de Kruskal–Wallis foram utilizados para comparar o perfil de citocinas das células Th22 entre as amostras rejeitando-se ou aceitando-se a hipótese de nulidade conforme os valores de “ p ” obtidos.

4.10 Documentação fotográfica

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

5 RESULTADOS

5.1 Resultados clínico-epidemiológicos

Os pacientes portadores de DJL (16 pacientes) e CBM (17 pacientes) foram analisados nas suas características clínico-epidemiológicas e distribuídos quanto ao sexo, faixa etária, localização das lesões e procedência, conforme demonstrado nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Características epidemiológicas dos casos de CBM: sexo, idade, localização da lesão e procedência

Paciente	Sexo	Idade	Localização	Procedência
1	M	47 anos	Perna E	Gurupá – PA
2	M	49 anos	Perna D	PA
3	M	44 anos	Perna E	S Isabel PA
4	M	45 anos	Perna E	S Isabel PA
5	M	59 anos	Perna E	Mocajuba PA
6	M	52 anos	Tornozelo E	Bragança PA
7	M	83 anos	Tornozelo D	PA
8	M	50 anos	Mão D	PA
9	M	66 anos	Dorso mão D	PA
10	M	58 anos	Perna E	PA
11	M	53 anos	Coxa D	PA
12	M	48 anos	Pé D	PA
13	M	40 anos	Perna E	PA
14	M	57 anos	Tornozelo D	PA
15	M	93 anos	Perna E	PA
16	M	75 anos	Joelho D	PA
17	F	35 anos	Joelho E	PA

Tabela 3 - Características epidemiológicas dos casos de DJL: sexo, idade, localização da lesão e procedência

Paciente	Sexo	Idade	Localização	Procedência
1	M	51 anos	Orelha	Moju – PA
2	M	57 anos	Dorso	Paragominas –
3	M	63 anos	Antebraço E	Arari – PA
4	M	44 anos	Orelha D	Alenquer – PA
5	F	41anos	Face	Marituba – PA
6	M	48 anos	Orelha E	Bragança – PA
7	M	55 anos	Antebraço	S.D.Capim – PA
8	M	63 anos	Perna E	Marabá – PA
9	F	45 anos	Joelho E	Santarém – PA
10	M	44 anos	Perna E	Marituba – PA
11	M	40 anos	Orelha E	Santarém – PA
12	M	54 anos	Perna	Santarém – PA
13	M	59 anos	Perna	Marabá – PA
14	F	59 anos	Perna	Alenquer – PA
15	M	51 anos	Perna	Cametá – PA
16	M	64 anos	Face	Moju – PA

5.2 Resultados imuno-histoquímicos

Os pacientes estudados foram avaliados pela imunoexpressão tecidual para o perfil Th22, marcados com TNF- α , IL-13, IL-22, IL-10 e FGF b. O padrão de imunomarcção no tecido dos pacientes com DJL e CMB realizado para as citocinas pesquisadas está demonstrado nas figuras 4 e 5.

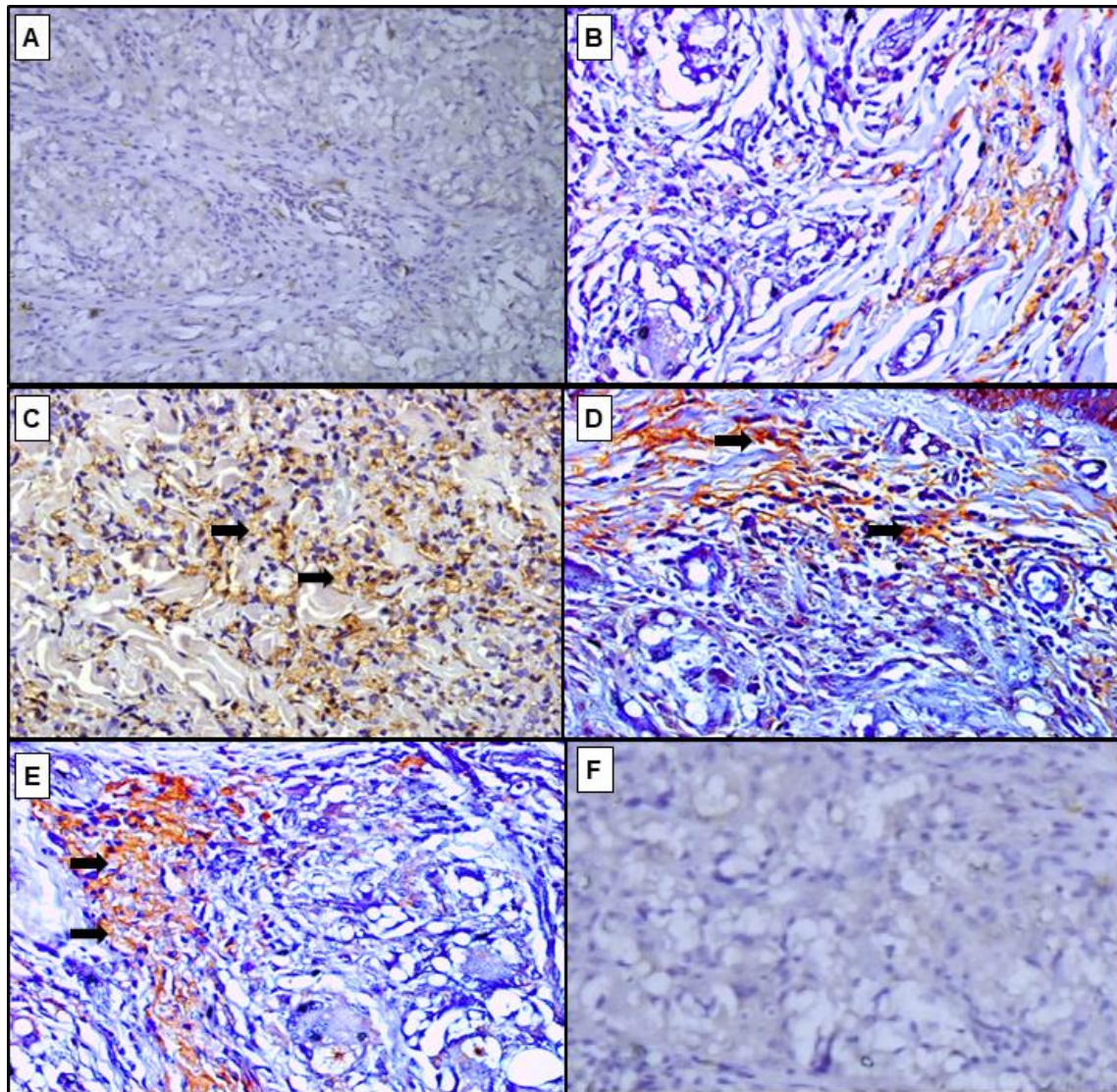


Figura 4 - Padrão de imunomarcção por imuno-histoquímica para citocinas de perfil Th22 em lesões cutâneas da DJL

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-10; B: TNF- α ; C: FGF b; D: IL-22; E: IL13; F: Controle negativo. Magnificação: 200x e 400x.

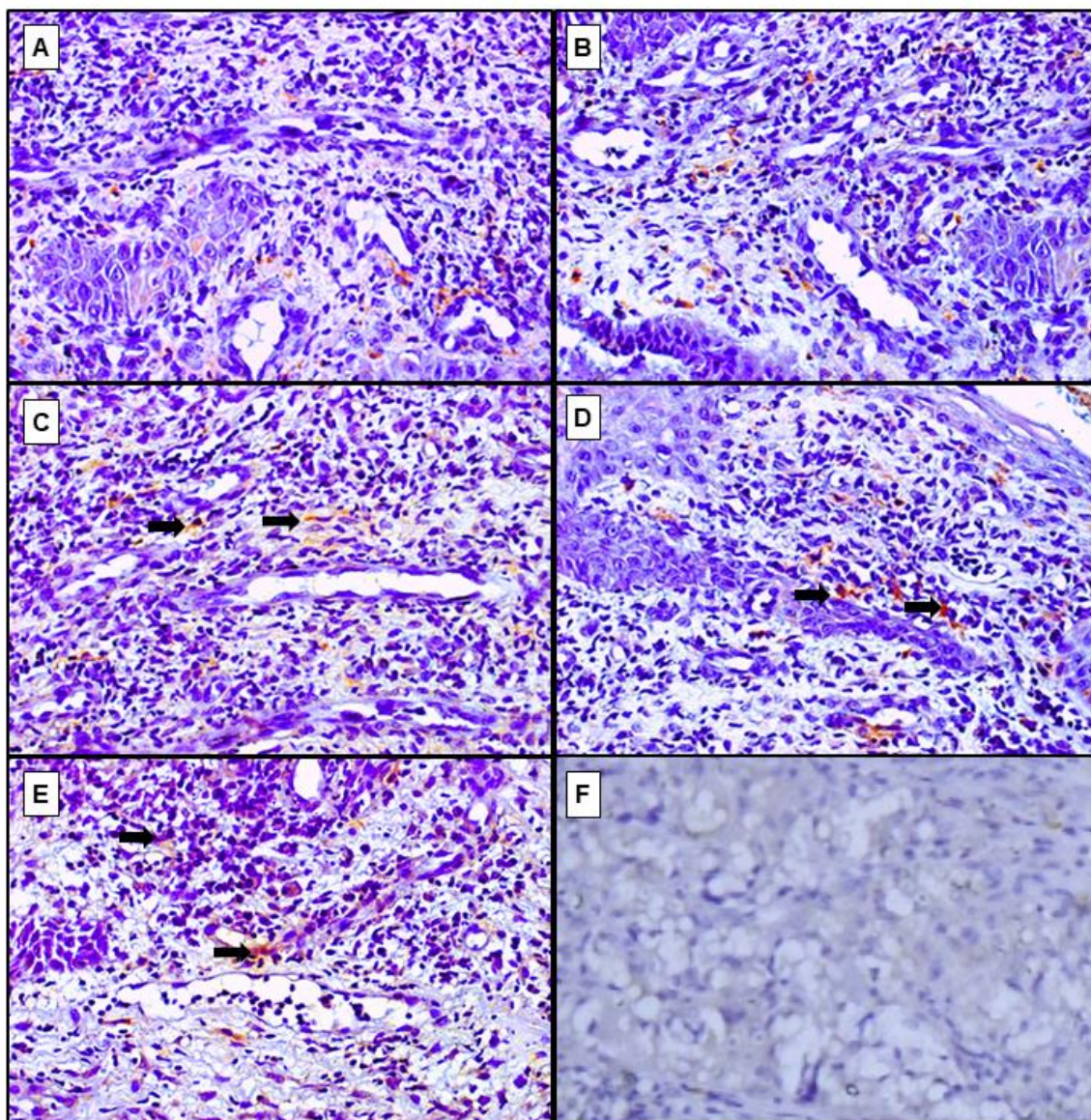


Figura 5 - Padrão de imunomarcção por imuno-histoquímica para citocinas de perfil Th22 em lesões cutâneas da CBM
Notar que as áreas consideradas positivas são aquelas marcadas em castanho, seja na expressão celular ou extracelular das citocinas do perfil e apontadas pelas setas. A: IL-10; B: TNF- α ; C: FGF b; D: IL-22; E: IL-13; F: Controle negativo. Magnificação: 200x e 400x

5.3 Resultados estatísticos

Em relação aos dados clínico-demográficos dos 17 pacientes portadores de CBM analisados, 94.1% eram do gênero masculino, 5.8% tinham idade

abaixo de 40 anos, 70.58% tinham entre 40 e 60 anos e 23.5% tinham idade acima de 60 anos. Em relação à localização das lesões, 88.2% eram localizadas nos membros inferiores (MMII) e 11.76% nos membros superiores (MMSS), sendo todos os pacientes paraenses (Tabela 4).

Tabela 4 - Análise dos 17 casos de CBM quanto ao gênero, faixa etária, localização das lesões e procedência

Características clínico-demográficas	N	%
Gênero		
Masculino	16	94.1
Feminino	01	5.8
Total	17	100
Faixa etária (anos)		
0-40	01	5.8
41-60	12	70.58
+60	04	23.5
Total	17	100
Localização das lesões		
MMII	15	88.2
MMSS	02	11.76
Total	17	100
Procedência		
Paraense	17	100
Total	17	100

MMII: membros inferiores; MMSS: Membros superiores

Os 17 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%) (Tabela 5).

Tabela 5 - Análise dos 16 casos de DJL quanto ao gênero, faixa etária, localização das lesões e procedência

Características clínico-demográficas	n	%
Gênero		
Masculino	13	81.25
Feminino	03	18.75
Total	16	100
Faixa etária (anos)		
0-40	0	00
41-60	13	81.25
+60	03	18.75
Total	16	100
Localização das lesões		
Orelha	04	25
MMII	07	43.75
MMSS	02	12.5
Tronco	01	6.25
Face	02	12
Total	16	100
Procedência		
Paraense	16	100
Total	16	100

MMII: membros inferiores; MMSS: Membros superiores

Em relação à DJL, os seguintes resultados foram encontrados: para a imunomarcção do TNF- α , pode-se observar diferença estatística entre os grupos estudados, sendo que, na DJL, a média encontrada foi de $126,0 \pm 16,14$

células/mm² enquanto que, no grupo controle, a média foi de 20,16 ± 8,269 células/mm² com *p* altamente significativa (*p*<0,0001****) (Figura 6A). Em relação à imunoposição da IL-10, na DJL, a média encontrada para a citocina foi de 170,2 ± 16,28 células/mm² enquanto que, no grupo controle, a média foi de 21,44 ± 6,229 células/mm² (*p*<0,0001****) (Figura 6B). Envolvendo a presença da IL-13, a média encontrada foi de 143,6 ± 17,95 células/mm² na DJL. Já, no grupo controle a média foi de 15,68 ± 3,831 células/mm² (*p*<0,0001****) (Figura 6C). Para a IL-22, a análise quantitativa mostrou-se estatisticamente significativa, sendo que, na DJL, a média das células expressando a citocina foi de 155,0 ± 25,49 células/mm², quando comparada ao controle 11,52 ± 5,481 células/mm² (*p*<0,0001****) (Figura 6D). Sobre o FGF b, a expressão do fator de crescimento foi mais acentuada na DJL 179,4 ± 14,04 células/mm² comparada ao controle 20,48 ± 8,560 células/mm² (*p*<0,0001****) (Figura 6E).

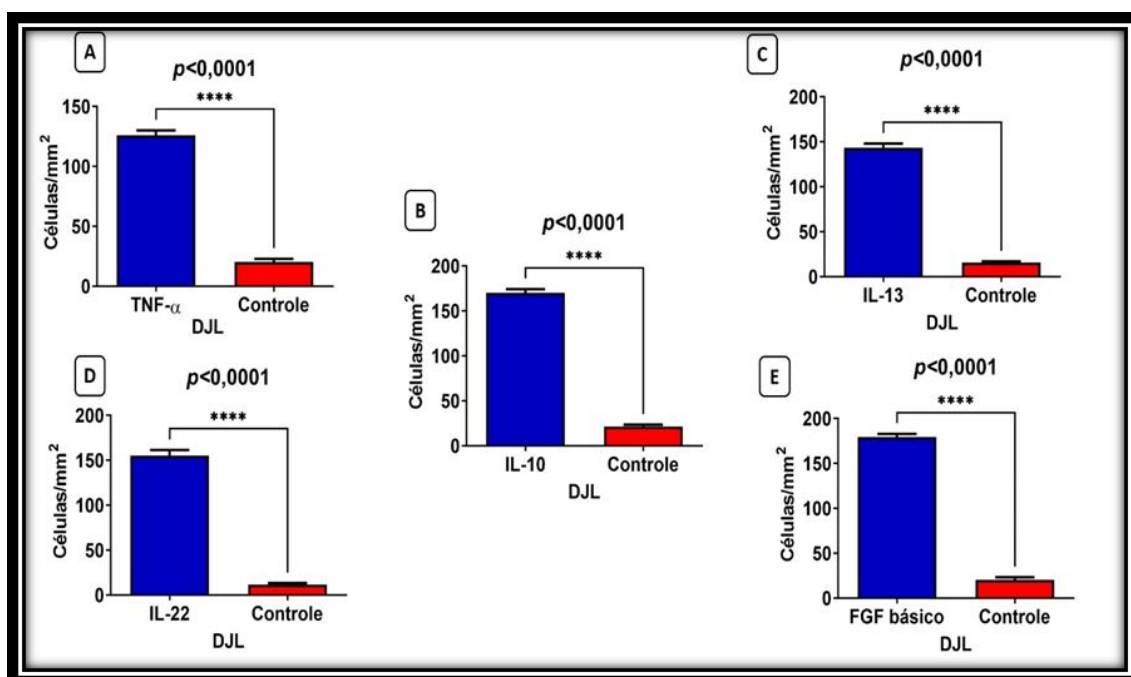


Figura 6 - Análise quantitativa para a imunomarcção de TNF- α , IL-10, IL-13, IL-22 e FGF b na DJL comparada ao controle

Referente à CBM, foram encontrados os seguintes resultados: em relação à imunomarcção da citocina TNF- α , pode-se observar diferença

estatística dentre os grupos estudados sendo que, na CBM, a média encontrada foi de $204,2 \pm 29,94$ células/mm² enquanto que, no grupo controle, a média foi de $20,16 \pm 8,269$ células/mm² com p altamente significativa ($p < 0,0001$ ****) (Figura 7A). Envolvendo a presença da IL-10, na CBM a média de expressão da citocina foi de $121,8 \pm 11,67$ células/mm². Já, no grupo controle, a média encontrada foi de $21,44 \pm 6,229$ células/mm² ($p < 0,0001$ ****) (Figura 7B). Em relação à imunoposição do IL-13 na CBM, a média de ocorrência foi de $154,4 \pm 11,79$ células/mm² enquanto que, no grupo controle, a média foi de $15,68 \pm 3,831$ cells/mm² ($p < 0,0001$ ****) (Figura 7C). Para a IL-22, a análise quantitativa mostrou-se estatisticamente significativa na CBM onde a média das células expressando a citocina foi de $153,8 \pm 20,91$ células/mm² quando comparada ao controle $11,52 \pm 5,481$ células/mm² ($p < 0,0001$ ****) (Figura 7D). Com relação ao FGF b, o predomínio de expressão é notório na CBM $107,3 \pm 16,56$ células/mm² comparada ao controle $20,48 \pm 8,560$ células/mm² ($p < 0,0001$ ****) (Figura 7E).

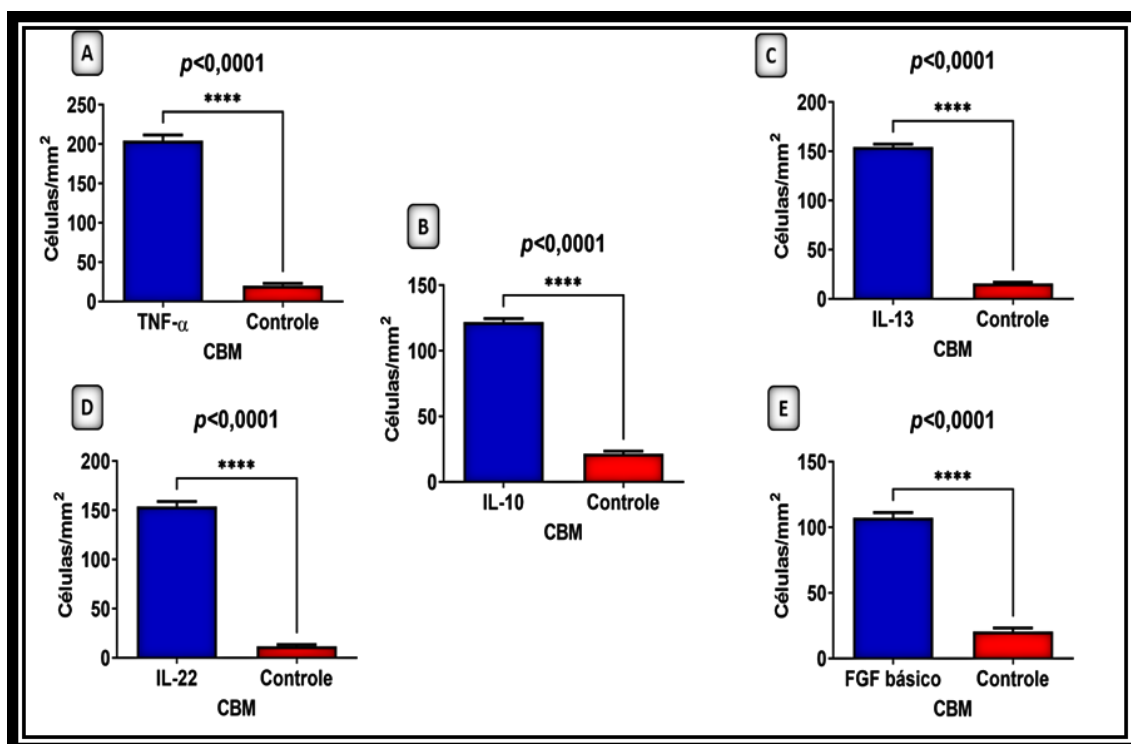


Figura 7 - Análise quantitativa para a imunomarcagem do perfil Th22 (TNF- α , IL-10, IL-13, IL-22 e FGF b) na CBM comparada ao controle

Na análise comparativa entre as doenças, as diferenças observadas de expressão das citocinas e o FGF b mostram que o TNF- α foi mais expresso na CBM comparada à DJL (Figura 8A). No entanto, a expressão de IL-10 se destaca na doença de DJL comparada à CBM (Figura 8B). Com relação à imunom expressão de IL-13 e IL-22, não foi observada diferença estatística significativa entre DJL e CBM (Figuras 8C e 8D). Tratando-se do FGF b entre ambas as doenças, o predomínio do fator de crescimento é mais acentuado na DJL comparada com a CBM (Figura 8E). Por fim, vale destacar que, em ambas as doenças, todos os marcadores apresentaram diferença estatística significativa comparados ao controle conforme a figura 8A-E.

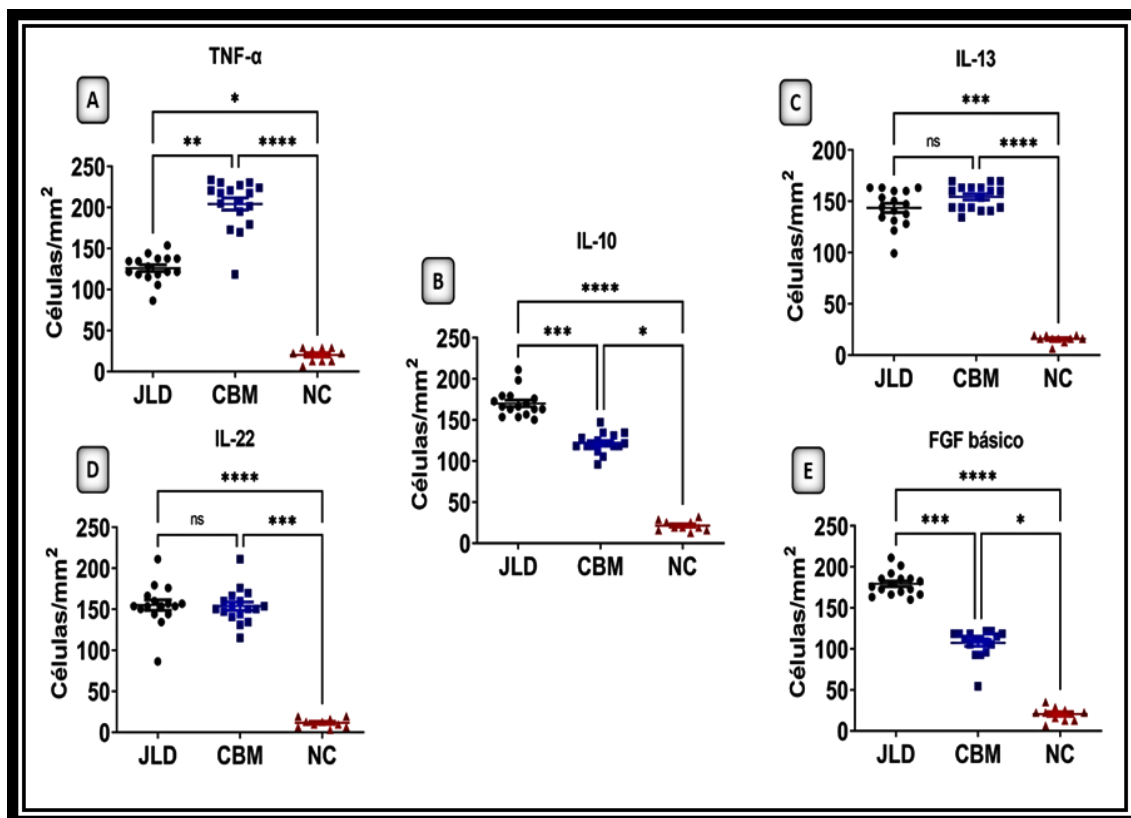


Figura 8 - Análise quantitativa comparativa para a imunomarcção do perfil Th22 (TNF- α , IL-10, IL-13, IL-22 e FGF b) na DJL, CBM comparada ao controle

6 DISCUSSÃO

A CBM é uma doença fúngica polimorfa que se manifesta clinicamente como nódulos e placas verrucosas os quais podem ulcerar. É uma micose que acomete a epiderme, a derme e o subcutâneo e pode apresentar infecção secundária levando à linfedema, elefantíase e, ocasionalmente, carcinoma espinocelular. Disseminação linfática e hematogênica têm sido observadas em raros casos (Correia et al., 2010; Yang et al., 2018; Santos et al., 2020).

A DJL é uma infecção fúngica granulomatosa que tem como agente etiológico o *L. loboi* e apresenta aspectos semelhantes à CBM, a citar: a cronicidade, a localização preponderante nos membros inferiores, a possibilidade de cursar com ETE 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 à ação dos antimicrobianos, propiciando o curso crônico observado nas duas micoses profundas (Vilani- Moreno; Opromolla, 1997).

No que se refere à prevalência quanto ao sexo, ambas as doenças incidem, sobretudo, no sexo masculino, conforme Queiroz- Telles et al. (2009). Estes dados são consonantes com os obtidos na nossa pesquisa, onde encontramos a maior quantidade de pacientes do sexo masculino, sendo em 94,1% na CBM e em 81,25% na DLJ.

Em relação à faixa etária, é descrito que a maior incidência das micoses profundas em questão ocorre 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 ratificam os dados da literatura, uma vez que foi observada uma superioridade na incidência da faixa etária entre 40 e 60 anos em 70,57% nos pacientes com CBM e 81,25% nos pacientes com DJL.

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. Encontramos 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%.

Queiroz-Telles et al. (2009) consideram a CBM uma doença ocupacional de trabalhadores rurais, o que os deixa mais sujeitos a traumatismos pelo contato com o solo e pela frequência de andarem descalços, especialmente nos membros inferiores, motivo pelo qual seria o local acometido em quase 80% dos casos. Os pacientes observados no estudo apresentaram similaridade com os relatos da literatura, uma vez que 88,2% dos pacientes com CBM apresentavam manifestações clínicas nos membros inferiores.

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. Santos et al. (2021) revisaram a literatura publicada de 1914 a 2020 sobre a CBM e detectaram a existência de um total de 7.740 pacientes com CBM em todos os continentes, exceto na Antártida. Na nossa revisão, foram descritos 17 pacientes com CBM correspondendo a 0,2% do total de casos da estatística mundial.

Algumas limitações foram encontradas nesse estudo, uma vez que, nos arquivos dos prontuários dos pacientes das micoses profundas estudadas, não foram encontrados dados referentes ao tipo clínico das lesões impossibilitando essa análise e comprometendo a sua comparação com a histopatologia, assim como a análise dos aspectos histopatológicos encontrados.

Em relação ao agente etiológico da CBM, a despeito da espécie mais encontrada no Brasil ser a *F. pedrosoi*, não podemos afirmar qual a espécie mais encontrada na nossa investigação, pois a pesquisa do agente etiológico da CBM não pôde ser realizada nas amostras observadas, uma vez que, por se tratar de blocos de parafina, foi impossibilitada a realização do microcultivo. Foi

tentada a análise por PCR, porém, em virtude de as amostras serem de blocos de parafina antigos não armazenados em condições ideais não se mostraram com qualidade suficiente para amplificação, o que pode ser um dado interessante para a continuidade desse estudo *a posteriori*.

No que diz respeito à relação patógeno hospedeiro, o intenso dano tecidual que ocorre na pele em virtude da patogenia da infecção de ambas as doenças 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; Sá et al., 2007; Queiroz-Telles et al., 2017b; Passero et al., 2021).

Tratando-se de células residentes e transitórias que servem como um anteparo imunológico de proteção contra ambos os patógenos, 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; Linchtman, 2005; Vilani-Moreno et al., 2005; Breda et al., 2021).

Neste contexto, em ambas as doenças 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., 2020).

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 temos uma resposta vigorosa de linfócitos T CD4 e CD8; 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 (D'Avila et al., 2003; Vilani-Moreno et al., 2005; Breda et al., 2021; Gong et al., 2021).

Classicamente, a participação dos linfócitos Th1 na patogênese da CBM e da DJL serve para inibir a proliferação dos micro-organismos induzindo a

produção de IFN- γ e TNF- α , citocinas que participam da ativação dos macrófagos M1 que, ao produzirem enzimas como o óxido nítrico sintase induzível (iNOS), aumentam a liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio agravando a resposta inflamatória e, conseqüentemente, o dano tecidual. Vale ressaltar que a lesão celular ocorrida no órgão *in situ* é proveniente de uma série de mecanismos que provocam um quadro de hipóxia tecidual que desencadeia um efeito deletério perpassando pela disfunção mitocondrial e impactando diretamente na geração de metabólitos reativos de oxigênio (Vilani-Moreno et al., 2004; Brito; Quaresma, 2007; Hu et al., 2009; Vilani-Moreno et al., 2011; Pagliari et al., 2014; Leeyaphan et al., 2016; Breda et al., 2020; Speakman et al., 2020).

Com o intuito de estabelecer uma condição reparadora do órgão comprometido em virtude da extensa rede lesiva que se manifesta nas DJL e CBM, 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 inúmeras citocinas. Esse efeito de *feedback* negativo gerado tem suas conseqüências nocivas na pele, tendo em 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; Azevedo et al., 2015; Shen et al., 2016; Brito; Bittencourt, 2018; Ogawa et al., 2019; Kanashiro-Galo et al., 2020; 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; Azevedo et al., 2015a; Brito; Bittencourt, 2018; Breda et al., 2021; Passero et al., 2021).

Apesar de a função das células Th17 na CBM não estar totalmente esclarecida, suas citocinas parecem exercer um importante papel na defesa mucocutânea do hospedeiro (Queiroz-Telles et al., 2017b). Na DJL, as células

Th17 representam um fator de destaque na resposta imunológica. A elevação da citocina IL-17 e também da IL-1 β , IL-6 e TGF- β parece estimular o padrão de resposta da doença (Kanashiro-Galo et al., 2016).

Neste cenário, no qual as células Th22 incorporam a amplitude de interpretação de resposta das subpopulações de células T, dependendo dos tipos de citocinas que são produzidas, *a priori* estas células têm por objetivo estabelecer uma linha de defesa que irá auxiliar outras células que se encontram na rede de proteção do órgão a manifestarem a indução de mecanismos que podem potencializar a resposta pró ou anti-inflamatória (Yamanaka; Mizutani, 2011; Fujita, 2013; Jia; Wu, 2014; Zhu; Zhu, 2020; Jiang et al., 2021).

Nossos resultados evidenciaram que, nas infecções pela CBM e DJL, há um aumento significativo na expressão do perfil Th22 (IL-10, IL-13, IL-22, TNF- α e FGF b) comparado ao grupo controle demonstrando que esse novo perfil celular tem um importante papel na etiopatogenia de ambas as doenças.

Em relação às citocinas do perfil Th22 pesquisadas, não foi observada diferença estatística condizente com a expressão da IL-13 e IL-22 na CBM e DJL. Entretanto, na DJL a quantificação da IL-10 e do FGF b encontrada foi mais acentuada, com diferença significativa quando comparada à quantificação encontrada na CBM. Quanto ao TNF- α , a citocina foi mais expressa na CBM em comparação com a DJL.

A IL-10 tem sido implicada como um regulador chave das respostas inflamatórias do hospedeiro durante a infecção com uma variedade de patógenos parasitários, bacterianos, virais e fúngicos; sua expressão pode facilitar a sobrevivência do agente etiológico como, por exemplo, a sobrevivência de um fungo, bem como o estabelecimento de infecção persistente à semelhança do que ocorre durante a infecção por *Leishmania* (Hedrich et al., 2010).

Nossos achados com positividade elevada da expressão da citocina IL-10 na CBM e DJL significativamente superior em relação ao grupo controle e com positividade maior na DJL corroboram os dados imuno-histoquímicos encontrados por Azevedo et al. (2015b) e parecem explicar a cronicidade das lesões, uma vez que a presença dessa citocina pode levar à supressão de

respostas protetoras Th1 e Th17 que permite a ativação alternativa de macrófagos e, conseqüentemente, torna mais viável a persistência fúngica dificultando o sucesso terapêutico o qual é vivenciado em ambas as doenças.

Nos cortes histopatológicos de biopsias cutâneas de pacientes com DJL, observamos uma grande quantidade de células fúngicas, e o êxito terapêutico dessa micose profunda é extremamente difícil, fatos que podem estar relacionados com a elevada positividade da IL-10.

No caso do FGF b, que foi observado em grande quantidade no nosso estudo na CBM e DJL, em compartilhamento com o TGF- β 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; Mohammadi, 2009; Eto et al., 2012; Benington et al., 2020).

Em virtude de o FGF b se expressar através da produção abundante de fibrose, como visto clinicamente nas lesões de aspecto queloidiano, era esperado o resultado obtido no nosso trabalho, que revelou uma superioridade da quantificação do FGF b encontrada de maneira mais acentuada nos pacientes com DJL, com diferença significativa quando comparada ao grupo controle e à quantificação encontrada na CBM (Silva et al., 1992; Brito; Quaresma, 2007; Sousa et al., 2019).

Uma consideração pertinente indica que, na construção do infiltrado inflamatório, o estabelecimento de agregados de plasmócitos é uma característica histopatológica peculiar na DJL e CBM 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; 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 e CBM já foi demonstrado que, nas lesões cutâneas, a resposta de macrófagos M2 é predominante em detrimento da 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 na nossa pesquisa em virtude da positividade significativa da imunomarcaçãõ da IL-13 (Barboza et al., 2020; Breda et al., 2021).

Um fato interessante a citar é que, na DJL e CBM, a presença do fenótipo M2 seria um componente adicional reforçando que citocinas de perfil Th2 e do Th22 contribuem para a sobrevivência do microrganismo e também 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 em ambas as doenças (Barboza et al., 2020; Breda et al., 2021).

No que diz respeito à participação da IL-22, alguns estudos demonstram que a citocina pode exercer um caráter dicotômico (Dudakov et al., 2015; Xuan et al., 2021). De fato, isso pode ser desencadeado justamente pelo comportamento pleotrópico da citocina. Na candidíase, a IL-22 tende a corroborar com perfil Th17 na tentativa de amplificar a resposta Th1 (Aggor et al., 2020). No entanto, tratando-se do epitélio, a IL-22 consegue induzir a fosforilação da STAT3 e expandir a expressão de IL-10 exercendo um efeito anti-inflamatório no epitélio (Pickert et al., 2009; Hutchins et al., 2013).

Na hanseníase, a predominância de uma resposta imunossupressora e anti-inflamatória no polo lepromatoso demonstra que a presença da IL-22 em macrófagos espumosos consegue induzir o aumento da expressão de arginase 1, de FGF b (Sousa et al., 2016; Sousa et al., 2017).

Além disso, a IL-22 em consonância com a STAT3 contribui para a geração de um efeito amplificador de resposta da iNOS e, por mais que seja gerada uma atividade microbicida eficiente, com o passar do tempo ela é

inibida em virtude da proliferação do microrganismo. Nossos resultados revelaram aumento significativo dessa citocina pleotrópica que mostra sua importante participação no processo imunológico da DJL e CBM, possivelmente buscando um arcabouço imunológico compensatório aos danos proporcionados pelas respostas Th1e Th17, encontrando um sinergismo com Th2 e Treg com o intuito de mediar a resposta anti-inflamatória (Sousa et al., 2017).

Outra citocina produzida pelas células Th22, o TNF- α , 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 de essa citocina atrair e diferenciar macrófagos no tecido, as demais citocinas expressadas nesse processo inflamatório de ambas as micoses profundas estudadas na nossa pesquisa parecem inibir a atividade microbicida do TNF α .

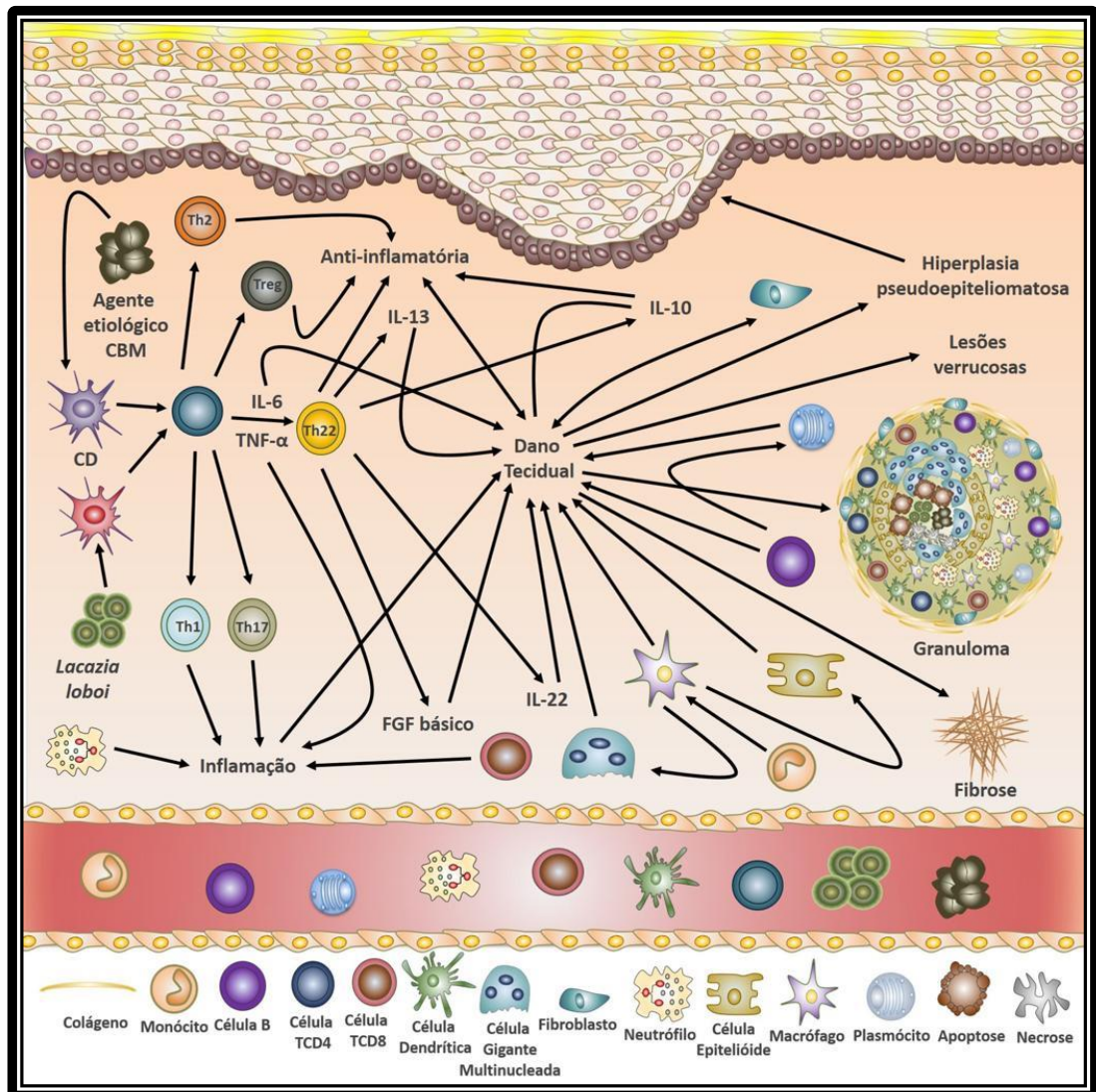
A supremacia da imunomarcção da citocina TNF α na CBM, quando comparada à DJL encontrada na nossa pesquisa, pode ser justificada pela característica histopatológica de granulomas epitelioides com ou sem supuração encontrados na CBM.

Há de se destacar que o desequilíbrio existente entre a gangorra imunológica provoca justamente uma interpretação do nosso sistema de defesa de agressão repassando a informação *in situ* de que ele precisa estabelecer um processo inflamatório que consiga eliminar o patógeno. Com isso, na CBM há a formação de granulomas supurativos e granulomas tuberculoides e na DJL observamos a organização da resposta granulomatosa sem a formação de granuloma imunogênico (tuberculoide) (Correia et al., 2010; Furtado et al., 2013). Quando se trata da imunomarcção para o perfil Th22, é notória a presença das citocinas estudadas na rede granulomatosa indicando que o perfil Th22 acaba impedindo a atividade do macrófago e revela a sua preponderante função imunossupressora (Araujo-Pires et al., 2014; Gideon et al., 2015).

Dessa forma, o produto final de ativação dos mecanismos de sinalização intracelular culmina no estabelecimento da organização do ambiente

fibrogênico, não somente para manter o granuloma, como também a fibrose no órgão. Portanto, nesta batalha imunológica que é travada contra os microorganismos, a lesão celular se manifesta e o fenômeno de morte celular é consolidado na figura da apoptose e necrose que são mecanismos que têm o aporte do perfil de citocinas Th22, Th1, Th17 e Treg e da geração de um quadro de hipóxia tecidual, excitotoxicidade e estresse oxidativo (Brito; Quaresma, 2007; Jeunon et al., 2013; Azevedo et al., 2015; Carneiro et al., 2015; Brito; Bittencourt, 2018).

Por fim, como desfecho do estudo de citocinas do perfil Th22, elaboramos uma figura (Figura 9) que sintetiza a participação integrativa das proteínas e fatores de crescimento no ambiente fisiopatológico e imunopatogênico da infecção da DJL e CBM destacando as principais implicações.



FONTE: Dados encontrados na pesquisa

Figura 9 - Influência do perfil Th22 na imunopatogenia da infecção na DJL e CBM, com liberação das citocinas IL-13, IL-22, IL-10, FGF b e TNF- α levando ao dano tecidual

7 CONCLUSÕES

- Na patogenia da infecção pela CBM e DJL, é notório o predomínio da expressão do perfil Th22 caracterizado pela imunomarcação de IL-10, IL-13, IL-22, TNF- α e FGF b no tecido, comparado ao grupo controle;
- Quando as doenças foram comparadas entre si, não foi observada diferença estatística condizente com expressão da IL-13 e IL-22. No entanto, na DJL, a quantificação da IL-10 e do FGF b foi mais acentuada com diferença significativa, quando comparada à CBM;
- Referente ao TNF- α , a citocina foi mais expressa na CBM em comparação com a DJL;
- Dessa forma, o estudo de citocinas do perfil Th22 *in situ* revelou que, em ambas as doenças, a atuação dos marcadores contribui para a geração de um ambiente imunológico que corrobora com a indução de mecanismos que visam estabelecer um anteparo de resposta compensatória ao dano tecidual acentuado pela resposta Th1, Th17 e que visam articular uma resposta microbicida eficiente. No entanto, em virtude da geração do processo inflamatório, o perfil Th22 encontra no Th2 e Treg o sinergismo para mediar a resposta anti-inflamatória que, por fim, contribui para a construção de uma resposta granulomatosa, bem como para a geração de lesões verrucosas, quadros de hiperplasia pseudoepiteliomatosa e a fibrose observada nos quadros de lesões queloidianas;
- Apesar desses novos achados a respeito do comportamento das citocinas do perfil Th22 na DJL e CBM, em virtude das propriedades da maioria dessas citocinas dependerem, em grande parte, do microambiente que envolve o fator inflamatório, ainda há muitas incertezas sobre o assunto, o que requer a necessidade de que mais estudos sejam realizados para investigar as correlações subjacentes entre os perfis de linfócitos *T helper* (Th) e a DJL e CBM, na tentativa de auxiliar no grande obstáculo do insucesso terapêutico da maioria dos pacientes, o qual permanece sendo um grande desafio para os médicos e pesquisadores.

8 ANEXOS

Anexo A

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DO PERFIL CITOCÍNICO DAS CÉLULAS Th22 NA IMUNOPATOGENIA DA DOENÇA DE JORGE LOBO E CROMOMICOSE

Pesquisador: CLIVIA MARIA MORAES DE OLIVEIRA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 68405317.8.0000.5172

Instituição Proponente: Núcleo de Medicina Tropical-NMT/ Universidade Federal do Pará - UFPA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.106.479

Apresentação do Projeto:

O projeto apresenta todos os itens exigidos. E pretende avaliar a expressão tecidual da resposta Th22 em Doença de Jorge Lobo e Cromomicose.

Objetivo da Pesquisa:

Está descrito adequadamente.

Objetivo Primário:

Avaliar a expressão tecidual de citocinas que participam da resposta Th22 nas lesões cutâneas de DJL e cromomicose.

Objetivo Secundário:

1- Correlacionar a imunexpressão das células Th22 através das suas citocinas; IL-22, TNF- , IL-10, IL-13, FGF- com as formas clínicas da DJL e cromomicose.

2- Comparar os aspectos encontrados entre as células Th22 através das suas citocinas; IL-22, TNF- , IL-10, IL-13, FGF- nas lesões cutâneas de DJL e cromomicose.

3-Fazer o levantamento dos dados clínicos e epidemiológicos dos casos estudados, correlacionando com o padrão observado na literatura

Endereço: Av. Generalíssimo Deodoro, 92

Bairro: Umarizal

CEP: 66.055-240

UF: PA

Município: BELEM

Telefone: (91)3201-0961

E-mail: cepbel@ufpa.br



UFPA - NÚCLEO DE MEDICINA
TROPICAL-NMT



Continuação do Parecer: 2.106.479

4-Comparar os resultados obtidos com o padrão encontrado entre as células Th22 através das suas citocinas; IL-22, TNF- , IL-10, IL-13, FGF- nas

lesões cutâneas dos pacientes estudados com DJL e cromomicose conforme a idade, gênero, profissão, procedência e localização das lesões

5- Comparar os aspectos encontrados entre as células Th22 através das suas citocinas; IL-22, TNF- , IL-10, IL-13, FGF- nas lesões cutâneas de DJL

e cromomicose com o grupo controle de pele normal.

Metodologia

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Precisa ser melhor descrito, descrever quais os possíveis riscos, mesmo que mínimos. Quanto aos benefícios, esses também precisam ser citados e explicados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo é relevante e pretende Avaliar a expressão tecidual de citocinas que participam da resposta Th22 nas lesões cutâneas de DJL e cromomicose. Contudo, o autor precisa adequar o projeto conforme as normas éticas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Falta o termo de aceite do Hospital Santa Casa de Misericórdia, já que os blocos de parafina estão sob a guarda dessa instituição. Adicionalmente está faltando o TCLE e o TCUD, já que além dos blocos de parafina também será utilizado dados dos prontuários desses participantes.

Recomendações:

Descrever melhor os itens de risco e benefício

Inserir o TCLE e o TCUD;

Adicionar a autorização da direção do Hospital Santa Casa para o desenvolvimento do estudo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O autor deve fazer as correções solicitadas por esse comitê de ética.

Descrever melhor os itens de risco e benefício

Inserir o TCLE e o TCUD;

Adicionar a autorização da direção do Hospital Santa Casa para o desenvolvimento do estudo.

Considerações Finais a critério do CEP:

Avaliado na reunião do dia 31/05/2017

Endereço: Av. Generalíssimo Deodoro, 92

Bairro: Umarizal

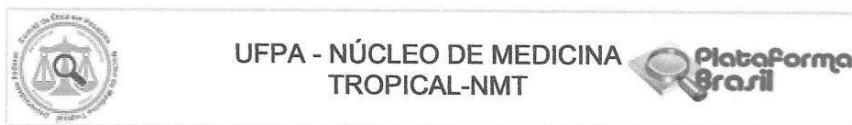
CEP: 66.055-240

UF: PA

Município: BELEM

Telefone: (91)3201-0961

E-mail: cepbel@ufpa.br



Continuação do Parecer: 2.106.479

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_907002.pdf	16/05/2017 14:13:48		Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.docx	16/05/2017 14:13:25	CLIVIA MARIA MORAES DE OLIVEIRA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Cartaaceiteinstitucional.jpg	16/05/2017 13:51:17	CLIVIA MARIA MORAES DE OLIVEIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	preprojetocep.pdf	16/05/2017 12:06:51	CLIVIA MARIA MORAES DE OLIVEIRA	Aceito
Outros	cartaencaminhamento.pdf	11/05/2017 21:23:32	CLIVIA MARIA MORAES DE OLIVEIRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	cartatermoderesponsabilidadedoutorado CEP.jpg	02/05/2017 14:56:46	CLIVIA MARIA MORAES DE OLIVEIRA	Aceito

Situação do Parecer:

Pendente

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELEM, 07 de Junho de 2017

Assinado por:
ANDERSON RAIOL RODRIGUES
(Coordenador)

Endereço: Av. Generalíssimo Deodoro, 92
Bairro: Umarizal CEP: 66.055-240
UF: PA Município: BELEM
Telefone: (91)3201-0961 E-mail: cepbel@ufpa.br

Anexo B

Método Imuno-histoquímico

O método imuno-histoquímico utilizado foi o de estreptavidina-biotina peroxidase, detalhado a seguir:

Primeira etapa:

1. Cortes de 4 μm de espessura foram obtidos a partir de material embebido em parafina e colhidos em lâminas previamente preparadas com solução adesiva de 3 amino-propyltriethoxy-silane (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO/USA, Cód A3648).

2. Submetidos à desparafinação em xilol por 20 minutos em estufa a 56°C. Após, passados no xilol por 20 minutos em temperatura ambiente.

3. Hidratados em concentrações decrescentes de álcoois (95%, 80% e 70%) por 5 minutos cada.

4. Lavados com água corrente, água destilada e PBS por 5 minutos cada.

Segunda etapa: (Bloqueio da peroxidase endógena)

1. Os cortes foram colocados em H₂O₂ a 3% em incubações de 10 minutos cada.

2. Lavados com água corrente, água destilada e PBS por 5 minutos cada.

3. Feita recuperação antigênica de acordo com o antígeno pesquisado.

4. Lavado em água corrente, destilada e PBS.

5. Incubado em leite mólico 10% por 30 minutos.

Terceira etapa: (Anticorpo primário)

Os cortes foram tratados com solução de anticorpo primário específico ao antígeno pesquisado, diluído em solução de soro-albumina-bovina (BSA) 1% e deixados na geladeira por 18 horas a 4°C.

Quarta etapa: (Anticorpo secundário)

Os cortes foram lavados com PBS por 2 vezes de 5 minutos cada.

1. Tratados com anticorpo secundário anti-imunoglobulina de coelho e anti-imunoglobulina de camundongo (DAKO K 492) na diluição de 1:1000 em PBS por 30 minutos a 37°C.

2. Lavados em PBS por 2 vezes de 5 minutos.

Quinta-etapa: (Anticorpo terciário)

1. Os cortes foram tratados com anticorpo terciário Streptavidin-Biotin-Complex (SABC) (DAKO K 492), diluição 1:1000 por 30 minutos a 37°C.

2. Lavados em PBS por 2 vezes por 5 minutos cada.

Sexta-etapa: (Revelação por cromógenos).

1. Preparou-se solução contendo 30mg de 3,3 Diamino-benzidina diluída em 100ml de PBS.

2. A mesma foi filtrada e misturada com 1200 micro-litros de H₂O₂ a 3%.

Os cortes foram corados nesta solução por 1,5 a 2 minutos e posteriormente lavados em água corrente, contra corados em hematoxilina, novamente de álcoois, diafanizados em xilol montados em permount.

9 REFERÊNCIAS

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

Aggor FEY, Break TJ, Trevejo-Nuñez G, Whibley N, Coleman BM, Bailey RD, et al. Oral epithelial IL-22/STAT3 signaling licenses IL-17-mediated immunity to oral mucosal candidiasis. *Sci Immunol*. 2020;5(48):eaba0570.

Alexandre AF, Quaresma JAS, Barboza TC, Brito AC, Xavier MB, Oliveira CMM, et al. The cytotoxic T cells may contribute to the in situ immune response in Jorge Lobo's Disease human lesions. *Med Mycol*. 2017;55(2):145-9.

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

Araújo MG, Cirilo NS, Santos SNMB, Aguilar CR, Guedes ACM. Lobomicose: um desafio terapêutico. *An Bras Dermatol*. 2018;93(2):279-81.

Araujo-Pires AC, Francisconi CF, Biguetti CC, Cavalla F, Aranha AMF, Letra A, et al. Simultaneous analysis of t helper subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tr1 and Tregs) markers expression in periapical lesions reveals multiple cytokine clusters accountable for lesions activity and inactivity status. *J Appl Oral Sci*. 2014;22(4):33646.

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

Arju R, Kothadia JP, Kaminski M, Abraham S, Giashuddin S. Jorge Lobo's disease: a case of keloidal blastomycosis (lobomycosis) in a nonendemic area. *Ther Adv Infect Dis*. 2014;2(3-4):91-6.

Ayres M, Ayres Jr M, Ayres DL, Santos AAS. *BioEstat 3.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; 2003.

Azevedo CMPS, Marques SG, Santos DWCL, Silva RR, Silva NF, Santos DA, et al. Squamous cell carcinoma derived from chronic chromoblastomycosis in Brazil. *Clin Infect Dis*. 2015;60(10):1500-4.

Azevedo MCS, Rosa PS, Soares CT, Fachin LRV, Baptista IMFD, Woods WJ, et al. Analysis of immune response markers in Jorge Lobo's disease lesions suggests the occurrence of mixed t helper responses with the dominance of regulatory t cell activity. *PLoS One*. 2015;10(12):e0145814.

Azulay RD, Azulay DR. *Dermatologia*. 7a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2017. p.546-7.

Bancroft JD, Gamble M, editors. *Theory and practice of histological techniques*. 5a. ed. London: Elsevier; 2007. p.125-38.

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.

Baruzzi RG, Lacaz CS, Souza FAA. História natural da doença de Jorge Lobo: ocorrência entre índios Caiabi (Brasil Central). *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 1979;21(6):302-38.

Baruzzi RG, Marcopito LF. Doença de Jorge Lobo. In: Veronesi R, Focaccia R, editores. *Tratado de infectologia*. São Paulo: Atheneu; 1997. p.1116-9.

Baruzzi RG, Marcopito LF, Michalany NS, Livianu J, Pinto NRS. Early diagnosis and prompt treatment by surgery in Jorge Lobo's disease (keloidal blastomycosis). *Mycopathologia*. 1981;74(1):51-4.

Baruzzi RG, Rodrigues DA, Michalany NS, Salomão R. Squamous-cell carcinoma and Lobomycosis (Jorge Lobo's disease). *Int J Dermatol*. 1989;28(3):183-5.

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

Belda Jr W, Casolato ATS, Luppi JB, Passero LFD. Managing chromoblastomycosis with acitretin plus imiquimod: a case report on the improvement of cutaneous lesions and reduction of the treatment time. *J Dermatol*. 2021b;48(10):1612-5.

Belda Jr W, Criado PR, Casteleti P, Passero LFD. Chromoblastomycosis evolving to sarcomatoid squamous cell carcinoma: a case report. *Dermatol Reports*. 2021a;13(2):9009.

Belda Jr W, Criado PR, Passero LFD. Case report: Treatment of chromoblastomycosis with combinations including acitretin: a report of two cases. *Am J Trop Med Hyg*. 2020;103(5):1852-4.

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.

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

Borges JR, Lacarrubba F, Paula HM, Ianhez M, Garcia-Zapata MTA. In-vivo reflectance confocal microscopy in patients with chromoblastomycosis. *Int J Infect Dis.* 2021;113:297-9.

Breda LCD, Breda CNS, Almeida JRF, Paulo LNM, Jannuzzi GP, Menezes IG, et al. Fonsecaea pedrosoi conidia and hyphae activate neutrophils distinctly: requirement of TLR-2 and TLR-4 in neutrophil effector functions. *Front Immunol.* 2020;11:540064.

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. Lobomycosis. In: Trying SK, Lupi O, Hengge UR, editors. *Tropical dermatology.* São Paulo: Elsevier; 2006. p.207-9.

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

Brito AC, Bittencourt MJS, Gonçalves TS, Cavalcante RH. Doença de Jorge Lobo com degeneração para carcinoma espinocelular: relato de caso. *An Bras Dermatol.* 2022;97(1):93-5.

Brito AC, Enokihara MMSS, Miranda MFR, Carneiro FA, Faria FP, Dalur ES. Jorge Lobo's disease agent: observations by transmission and scanning electron microscopes. *Acta Microsc.* 1999;8(Suppl C):S407-8. (Presented at 18th Congress of the Brazilian Society for Microscopy and Microanalyses; 1999).

Brito AC, Quaresma JAS. Lacaziose (doença de Jorge Lobo): revisão e atualização. *An Bras Dermatol.* 2007;82(5):461-74.

Brun AM. Lobomycosis in three Venezuelan patients. *Int J Dermatol*. 1999;38(4):302-5.

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*. 2000;38(3):1283-5.

Caldwell DK, Caldwell MC, Woodard JC, Ajello L, Kaplan W, McClure HM. Lobomycosis as a disease of the Atlantic bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus*, Montagu, 1821). *Am J Trop Med Hyg*. 1975;24(1):105-14.

Carneiro FRO, Fischer TRC, Brandão CM, Pagliari C, Duarte MIS, Quaresma JAS. Disseminated infection with *Lacazia loboi* and immunopathology of the lesional spectrum. *Hum Pathol*. 2015;46(2):334-8.

Castro LF, Ferreira MC, Silva RM, Blotta MHSL, Longhi LNA, Mamoni RL. Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. *J Infect*. 2013;67(5):470-85.

Castro LGM, Salebian A, Lacaz CS. Células fúngicas permanecem viáveis por até doze dias em lesões de cromomicose tratadas pela criocirurgia com nitrogênio líquido. *An Bras Dermatol*. 2003;78(3):279-82.

Choy E, Rose-John S. Interleukin-6 as a multifunctional regulator: inflammation, immune response, and fibrosis. *J Scleroderma Relat Disord*. 2017;2(Suppl 2):S1–5.

Ciferri R, Azevedo PC, Campos S, Carneiro LS. *Taxonomy of Jorge Lobo's disease fungus*. Recife: Instituto de Micologia da Universidade de Recife; 1956. (Publicação; 53).

Conant NF, Howell Jr A. The similarity of the fungi causing South American blastomycosis and North American blastomycosis. *J Invest Dermatol*. 1941;5:353-70.

Correia RTM, Criado PR, Valente NYS, Martins JEDC. Chromoblastomycosis: study of 27 cases and review of medical literature. *An Bras Dermatol*. 2010;85(4):448–54.

Criado PR, Careta MF, Valente NYS, Martins JEC, Rivitti EA, Spina R, et al. Extensive long-standing chromomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi*: three cases with relevant improvement under voriconazole therapy. *J Dermatolog Treat*. 2011;22(3):167-74.

D'Ávila SCGP, Pagliari C, Duarte MIS. The cell-mediated immune reaction in the cutaneous lesion of chromoblastomycosis and their correlation with different clinical forms of the disease. *Mycopathologia*. 2003;156(2):51-60.

Diniz JAP, Teixeira CEC, Soares MCP, Brito AC, Silva JP. Ultrastructural aspects of *Lacazia loboi*. *Acta Microsc*. 2001;12(Suppl C):S103-4. (Presented at 17th Congress of the Brazilian Society for Microscopy and Microanalyses; 2001).

Dudakov JA, Hanash AM, Van Den Brink MRM. Interleukin-22: immunobiology and pathology. *Annu Rev Immunol*. 2015;33:747-85.

Duhen T, Geiger R, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol*. 2009;10(8):857-63.

Esterre P, Queiroz-Telles F. Management of chromoblastomycosis: novel perspectives. *Curr Opin Infect Dis*. 2006;19(2):148-52.

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 Invest*. 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.

Félix F, Van Bresse MF, Van Waerebeek K. Role of social behaviour in the epidemiology of lobomycosis-like disease (LLD) in estuarine common bottlenose dolphins from Ecuador. *Dis Aquat Organ*. 2019;134(1):75-87.

Fenoglio D, Dentone C, Parodi A, Di Biagio A, Bozzano F, Vena A, et al. Characterization of T lymphocytes in severe COVID-19 patients. *J Med Virol*. 2021;93(9):5608-13.

Fialho A. Blastomicose do “tipo Jorge Lobo”. *O Hospital*. 1938;14(4):903-18.

Fisher M, Talhari AC, Reinel D, Talhari S. Lobomykose. *Der Hautartz*. 2002;53:677-81.

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. *Parasitologia médica: parasitas e doenças parasitárias do homem*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1943.

Fonseca Filho O, Leão AEA. Contribuição para o conhecimento dos granulomatoses blastomycoides: o agente etiológico da doença de Jorge Lôbo. *Rev Med Cirug Brasil*. 1940;48:147-58

Fonseca OJM, Lacaz CS. Estudo de culturas isoladas de Blastomicose queloidiforme (doença de Jorge lobo): denominação ao seu agente etiológico. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 1971;13(4):225-51.

Franzen AJ, Cunha MML, Miranda K, Hentschel J, Plattner H, Silva MB, et al. Ultrastructural characterization of melanosomes of the human pathogenic fungus *Fonsecaea pedrosoi*. *J Struct Biol*. 2008;162(1):75-84.

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

Fujita H. The role of IL-22 and Th22 cells in human skin diseases. *J Dermatol Sci*. 2013;72(1):3-8.

Furtado AN, Andrade HS, Pandini ET, Motta J, Frasson PHL, Falqueto A. Doença de Jorge Lobo: relato de caso e revisão de literatura. *Rev Patol Trop*. 2014;42(4):459-67.

Gadelha SQ, Almeida GE, Gadelha AR, Souza MLG, Figueiras VV. Keloid-like lesions in a farmer from Amazonas. *JAAD Case Rep*. 2021;10:57-9.

Garcia M, Chanlin R, Blanchet D, Demar M, Couppie P, Blaizot R. An atypical keloid in a Brazilian man. *Med Sante Trop*. 2019;29(4):377-80.

Gideon HP, Phuah JY, Myers AJ, Bryson BD, Rodgers MA, Coleman MT, et al. Variability in tuberculosis granuloma t cell responses exists, but a balance of pro- and anti-inflammatory cytokines is associated with sterilization. *PLoS Pathog*. 2015;11(1):e1004603.

Gonçalves FG, Rosa PS, Belone AFF, Carneiro LB, Barrosa VLQ, Bispo RF, et al. Multidrug therapy for leprosy can cure patients with lobomycosis in Acre State, Brazil: a proof of therapy study. *Am J Trop Med Hyg*. 2020;104(2):634-9.

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

Grant SM, Clissold SP. Itraconazole: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in superficial and systemic mycoses. *Drugs*. 1989;37(3):310-44.

Grupo do Consenso de Criptococose. Consenso em criptococose - 2008. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41(5):524-44.

Gutiérrez-Bautista JF, Rodríguez-Nicolas A, Rosales-Castillo A, Jiménez P, Garrido F, Anderson P, et al. Negative clinical evolution in COVID-19 patients is frequently accompanied with an increased proportion of undifferentiated Th cells and a strong underrepresentation of the Th1 subset. *Front Immunol*. 2020;11:596553.

Harty JT, Tvinnereim AR, White DW. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:275-308.

Hedrich CM, Bream JH. Cell type-specific regulation of IL-10 expression in inflammation and disease. *Immunol Res*. 2010;47(1-3):185-206.

Hernández-Hernández F, Bievre C, Camacho-Arroyo I, Cerbon MA, Dupont B, Lopez-Martinez R. Sex hormone effects on *Phialophora verrucosa* in vitro and characterization of progesterone receptors. *J Med Vet Mycol*. 1995;33(4):235-9.

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;39(1):309-14.

Hornberger MM, Farnsworth GS, Vilela R, Mendoza L, Bandino JP. Extensive, multifocal lobomycosis. *J Cutan Pathol*. 2021:1-3.

Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem.* 1981;29(4):577-80.

Hu J, Wang Y, Xie L. Potential role of macrophages in experimental keratomycosis. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(5):2087-94.

Huang XW, Xu MN, Dai SQ, Zeng K, Li L. Case Report: short-term application of topical imiquimod is practical for chromoblastomycosis. *Am J Trop Med Hyg.* 2021;105(6):1696-7.

Hutchins AP, Diez D, Miranda-Saavedra D. The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: recent developments and future challenges. *Brief Funct Genomics.* 2013;12(6):489-98.

Jeunon T, Rodrigues PAJB, Rocha TCG, Bezerra MO, Galhardo MCG, Valle ACF. Multiple confluent reddish nodules. *Dermatol Pract Concept.* 2013;3(3):15-20.

Jia L, Wu C. The biology and functions of Th22 cells. *Adv Exp Med Biol.* 2014;841:209-30.

Jiang Q, Yang G, Xiao F, Xie J, Wang S, Lu L, et al. Role of Th22 cells in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Front Immunol.* 2021;12:688066.

Kagami S, Rizzo HL, Lee JJ, Koguchi Y, Blauvelt A. Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2010;130(5):1373-83.

Kanashiro-Galo L, Alexandre AF, Tafuri WL, Barboza TC, Quaresma JAS, Brito AC, et al. Lacaziosis: immunohistochemical evaluation of elements of the humoral response in cutaneous lesions. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2020;62:e75.

Kanashiro-Galo L, Pagliari C, Barboza TC, Brito AC, Xavier MB, Oliveira CMM, et al. Th17 and regulatory T cells contribute to the in situ immune response in skin lesions of Jorge Lobo's disease. *Med Mycol.* 2016;54(1):23-8.

Koehler A, Heidrich D, Pagani DM, Corbellini VA, Scroferneker ML. Melanin and chromoblastomycosis agents: characterization, functions, and relation with antifungals. *J Basic Microbiol.* 2021;61(3):203-11.

Lacaz CS, Baruzzi RG, Rosa MCB. *Doença de Jorge Lobo*. São Paulo: USP/IPSIS; 1986.

Lacaz CS, Rodrigues MC, Porto, E. Paracoccidioides loboii x Loboia loboii: uma questão de nomenclatura médica. *An Bras Dermatol.* 1994;69(2):143-4.

Lan Y, Lu S, Zhang J. Retinoid combined with photodynamic therapy against hyperkeratotic chromoblastomycosis: a case report and literature review. *Mycoses.* 2021;64(1):18-23.

Langeron M, Vanbreuseghem R. *Mycologie humaine et animale: techniques*. Paris: Mason et Cie; 1952. p.490-1.

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.

Leeyaphan C, Hau C, Takeoka S, Tada Y, Bunyaratavej S, Pattanaprichakul P, et al. Immune response in human chromoblastomycosis and eumycetoma – focusing on human interleukin-17A, interferon-gamma, tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and human beta-defensin-2. *Mycoses.* 2016;59(12):751-6.

Leite MC. *Doença de Jorge Lobo: estudo de uma auto-inoculação [trabalho de conclusão de curso]*. Belém: Universidade Federal do Pará; 1993.

Lima ACC, Santos DWCL, Hirata SH, Nishikaku AS, Enokihara MMSS, Ogawa MM. Therapeutic management of subcutaneous phaeohyphomycosis and chromoblastomycosis in kidney transplant recipients: a retrospective study of 82 cases in a single center. *Int J Dermatol.* 2022;61(3):346-51.

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

Liu Y, Yang B, Zhou M, Li L, Zhou H, Zhang J, et al. Memory IL-22-producing CD41 T cells specific for *Candida albicans* are present in humans. *Eur J Immunol.* 2009;39(6):1472-9.

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

Loureiro AAP, Brito AC, Silva D. Micose de Jorge Lobo de localização insólita. *An Bras Dermatol.* 1971;46(1):1-6.

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

Marcos EVC, Souza FC, Torres EA, Lauris JRP, Oprommola DVA. Estudo de associação entre antígenos leucocitários humanos e doença de Jorge Lobo. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005;38(5):399-401.

Marques SG, Silva CM, Saldanha PC, Rezende MA, Vicente VA, Queiroz-Telles F, et al. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from the shell of babassu coconut (*Orbignya phalerata* Martius) in the Amazon region of Maranhão, Brazil. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi.* 2006;47(4):305-11.

Meira DA, Pereira PC, Marcondes-Machado J, Mendes RP, Barraviera B, Pellegrino Júnior J, et al. The use of glucan as immunostimulant in the treatment of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg.* 1996;55(5):496-503.

Michalany J. Corpos asteroides nas lesões granulomatosas com especial referência à blastomicose ou doença de Jorge Lobo. *Rev Assoc Med Bras.* 1955;2(1):61-8.

Miller GF, Owens IW. Ultrastructural characterization of the agent of systemic yeast infection of ome monkeys. *M Mycol.* 1999;37(2):139-45.

Miranda MFR, Silva AJG. Vinyl adhesive tape also effective for direct microscopy diagnosis of chromomycosis, lobomycosis and paracoccidioidomycosis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005;52(1):39-43.

Mitra A, Raychaudhuri SK, Raychaudhuri SP. Functional role of IL-22 in psoriatic arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(2):R65.

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

Moreira-Teixeira L, Redford PS, Stavropoulos E, Ghjilard N, Maynard CL, Weaver CT, et al. T cell-derived IL-10 impairs host resistance to *mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol.* 2017;199(2):613-23.

Nogralles KE, Zaba LC, Shemer A, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Kikuchi T, et al. IL-22-producing "T22" T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing T(H)17 T cells. *J Allerg Clin Immunol.* 2009;123(6):1244-52.

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.

Opromolla DVA, Baruzzi RG. Doença de Jorge Lobo. In: Coura JR. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p.1185-92.

Opromolla DVA, Belone AFF, Taborda PR, Rosa PS. Lymph node involvement in Jorge Lobo's disease: report of two cases. *Int J Dermatol*. 2003;42(12):938-41.

Opromolla DVA, Belone AFF, Taborda PRO, Taborda VBA. Correlação clinicopatológica em 40 casos novos de Lobomicose. *An Bras Dermatol*. 2000;75(4):425-34.

Opromolla DVA, Nogueira MES. Inoculation of *Lacazia loboi* into the subcutaneous tissue of the hamster cheek pouch. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2000;42(3):119-23.

Opromolla DVA, Taborda PRO, Taborda VBA, Viana S, Furtado JF. Lobomicose: relato de 40 casos novos. *An Bras Dermatol*. 1999b;74(2):135-41.

Opromolla DVA, Vilani-Moreno FR, Belone AFF. A doença de Jorge Lobo e a coloração pela prata metenamina. *An Bras Dermatol*. 1999a;74(4):345-9.

Ouyang W, O'Garra A. IL-10 family cytokines IL-10 and IL-22: from basic science to clinical translation. *Immunity*. 2019; 50(4):871-91.

Owczarczyk-Saczonek A, Krajewska-Włodarczyk M, Kasprowicz-Furmańczyk M, Placek W. Immunological memory of psoriatic lesions. *Int J Mol Sci*. 2020;21(2):625.

Pagliari C, Kanashiro-Galo L, Silva AAL, Barboza TC, Criado PR, Duarte MIS, et al. Plasmacytoid dendritic cells in cutaneous lesions of patients with chromoblastomycosis, lacaziosis, and paracoccidioidomycosis: a comparative analysis. *Med Mycol.* 2014;52(4):397-402.

Pasqualotto AC, Jaskulski Filho SD, Sena MG, Santos AFD, Severo MMS. Posaconazole for lobomycosis. *Braz J Infect Dis.* 2021;25(2):101576.

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.

Pecher SA. Deep mycosis in Latin America. *Med Trop.* 1994;54(4):411-5.

Pickert G, Neufert C, Leppkes M, Zheng Y, Wittkopf N, Warntjen M, et al. STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J Exp Med.* 2009;206(7):1465–72.

Pradinaud R. *Loboa lobo*. In: Collien L, Balows A, Sussman M, editors. *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections*. New York: Oxford University Press; 1998. v. 4, p.585-94.

Pradinaud R. Lobomycoses: maladie de Jorge Lobo. In: *Encyclopédie Medico Chirurgicale: maladies infectieuses*. Paris: Elsevier; 1977. v. 8126A, n. 10, p.1-6.

Pradinaud R, Talhari S. Lobomycosis (Maladie de Jorge Lobo). *Mal Infect.* 1996;8:608-10.

Pulverer G, Korth H. *Cryptococcus neoformans*: pigmentbildung aus verschiedenen polyphenolen. *Med Microbiol Immunol.* 1971;157:46-51.

Quaresma JAS, Barros VLRS, Pagliari C, Fernandes ER, Guedes F, Takakura CFH, et al. Revisiting the liver in human yellow fever: virus-induced apoptosis in hepatocytes associated with TGF-beta, TNF-alpha and NK cells activity.

Virology. 2006;345(1):22-30.

Queiroz-Telles F. Chromoblastomycosis: a neglected tropical disease. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2015;57(Suppl.19):46-50.

Queiroz-Telles F, Esterre P, Perez-Blanco M, Vitale RG, Salgado CG, Bonifaz A. Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Med Mycol*. 2009;47(1):3-15.

Queiroz-Telles F, Fahal AH, Falci DR, Caceres DH, Chiller T, Pasqualotto AC. Neglected endemic mycoses. *Lancet Infect Dis*. 2017a;17(11):e367-77.

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

Queiroz-Telles F, Nucci M, Colombo AL, Tobón A, Restrepo A. Mycoses of implantation in Latin America: an overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Med Mycol*. 2011;49(3):225-36.

Rocha G, Drolhe E, Rutowitsch M. Doença de Jorge Lobo. *An Bras Dermatol Sifilogr*. 1941;17(1):54.

Rodriguez-Toro G. Enfermedad de Jorge Lobo o blastomycosis queloidiana: nuevos aspectos de la entidad em Colombia: revision. *Biomédica*. 1989;9(3-4):133-46.

Rodriguez-Toro G. Lobomycosis. *Int J Dermatol*. 1993;32(5):325-32.

Romani L, Howard DH. Mechanisms of resistance to fungal infections. *Curr Opin Immunol*. 1995;7(4):517-23.

Sá VC, Silva TA, Reis CMS, Cunha FQ, Figueiredo F, Bocca AL. The pattern of immune cell infiltration in chromoblastomycosis: involvement of macrophage inflammatory protein-1 alpha/CCL3 and fungi persistence. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2007;49(1):49-53.

Sabat R. IL-10 family of cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21(5):315-24.

Sampaio SAP, Rivitti EA. *Dermatologia*. 2a ed. São Paulo: Artes Médicas; 2000. p.544-5: Micoses profundas.

Santos DWCL, Azevedo CMPS, Vicente VA, Queiroz-Telles F, Rodrigues AM, Hoog GS, et al. The global burden of chromoblastomycosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021;15(8):e0009611.

Santos DWCL, Vicente VA, Weiss VA, Hoog GS, Gomes RR, Batista EMM, et al. Cromoblastomicose em área endêmica do Brasil: uma análise clínico-epidemiológica e uma rede mundial de haplótipos. *J Fungi*. 2020;6(4):204.

Seder RA, Gazzinelli RT. Cytokines are critical in linking the innate and adaptative immune responses to bacterial, fungal and parasitic infection. *Adv Intern Med*. 1999;44:353-88.

Sendrasoa FA, Razanakoto NH, Rakotoarisaona MF, Andrianarison M, Raharolahy O, Rasamoelina T, et al. Clinical aspects of previously treated chromoblastomycosis: a case series from Madagascar. *Int J Infect Dis*. 2020;101:228-32.

Sesso A, Baruzzi RG. Interaction between macrophage and parasite cells in lobomycosis: the thickened cell wall of *Paracoccidioides loboii* exhibits apertures to the extracellular milieu. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 1988;20(3):537-48.

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.

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 DB, Brito AC. Formas clínicas não usuais da micose de Lobo. *An Bras Dermatol.* 1994;69(2):133-6.

Silva EA, Ferasçoli MO. Frequências relativas dos fenótipos eritrocitários ABO e Lewis na doença de Jorge Lobo. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2004;26(1):23-7.

Silva JP, Silva MB, Campelo SR, Salgado UI, Diniz JAP, Esterre P, et al. TGF-beta plasma levels in chromoblastomycosis patients during itraconazole treatment. *Cytokine.* 2010;51(2):202-6.

Silveira EL, Sousa JR, Aarão TLS, Fuzii HT, Dias Jr LB, Carneiro FRO, et al. New immunologic pathways in the pathogenesis of leprosy: role for Th22 cytokines in the polar forms of the disease. *J Am Acad Dermatol.* 2015;72(4):729-30.

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.

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, Sousa RPM, Aarão TLS, Dias Jr LB, Carneiro FRO, Quaresma JAS. Response of iNOS and its relationship with IL-22 and STAT3 in macrophage activity in the polar forms of leprosy. *Acta Trop.* 2017;171:74–9.

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.

Sousa MGT, Belda Jr W, Spina R, Lota PR, Valente NS, Brown GD, et al. Topical application of imiquimod as a treatment for chromoblastomycosis. *Clin Infect Dis.* 2014;58(12):1734-7.

Speakman EA, Dambuza IM, Salazar F, Brown GD. T Cell antifungal immunity and the role of c-type lectin receptors. *Trends Immunol.* 2020;41(1):61-76.

Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med.* 2007;13(2):139-45.

Stewart AJ, Jones RD. Pseudo-Gaucher cells in myelodisplasia. *J Clin Patol.* 1999;52(12):917-8.

Taborda PR, Taborda VA, McGinnis MR. *Lacazia loboi* gen. nov., comb. nov., the etiologic agent of Lobomycosis. *J Clin Microbiol.* 1999;37(6):2031-3.

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

Talhari S. Doença de Jorge Lobo. In: Talhari S, Neves RG. *Dermatologia tropical*. Rio de Janeiro: Medsi; 1995. p.237-53.

Talhari S, Cunha MG, Schettini AP, Talhari AC. Deep mycosis in Amazon region. *Int J Dermatol*. 1988;27(7):481-4.

Terra F, Torres M, Fonseca Filho O, Arêa Leão AE. Novo tipo de dermatite verrucosa: micose por *Acrotheca* com associação de leishmaniose. *Brasil Med*. 1922;36:363-8.

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.

Torres-Guerrero E, Arenas R, Castro RH. Cromoblastomicose por *Cladosporium langeronii*: diagnóstico molecular de um agente previamente diagnosticado como *Fonsecaea pedrosoi*. *An Bras Dermatol*. 2018;93(3):475-6.

Tsuneto LT, Arce-Gomez B, Petzl-Erler ML, Queiroz-Telles F. HLA-A29 and genetic susceptibility to chromoblastomycosis. *J Med Vet Mycol*. 1989;27(3):181-5.

Tubilla LHM, Schettini APM, Eiras JC, Graça CZA, Frota MZM. Lacaziose simulando hanseníase dimorfa tuberculoide. *An Bras Dermatol*. 2008;83(3):261-3.

Van Belle AB, Heusch M, Lemaire MM, Hendrickx E, Warnier G, Dunussi-Joannopoulos K, et al. IL-22 is required for imiquimod-induced psoriasiform skin inflammation in mice. *J Immunol*. 2012;188(1):462-9.

Vilani-Moreno FR. *Imunopatologia da doença de Jorge Lobo: composição celular do infiltrado inflamatório e quantificação de citocinas em sobrenadante de cultura de células mononucleares e soro sanguíneo [tese]*. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2002.

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, Rosa PS, Madeira S, Opromolla DVA. Evaluation of the vital staining method for *Lacazia loboi* through the experimental inoculation of BALB/c mice. *Med Mycol*. 2003;41(3):211-6.

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 loboi* em biópsias de pacientes portadores da doença de Jorge Lobo. *An Bras Dermatol*. 1997;72(5):433-7.

Vilani-Moreno FR, Silva LM, Opromolla DVA. Evaluation of the phagocytic activity of peripheral blood monocytes of patients with Jorge Lobo's disease. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2004;37(2):165-8.

Vilela R, Mendoza L, Rosa PS, Belone AFF, Madeira S, Opromolla DVA, et al. Molecular model for studying the uncultivated fungal pathogen *Lacazia loboi*. *J Clin Microbiol*. 2005;43(8):3657-61.

Voidaleski MF, Gomes RR, Azevedo CMPS, Lima BJFS, Costa FF, Bombvassaro A, et al. Environmental screening of Fonsecaea agents of chromoblastomycosis using rolling circle amplification. *J Fungi*. 2020;6(4):290.

Witte E, Witte K, Warszawska K, Sabat R, Wolk K. Interleukin-22: a cytokine produced by T, NK and NKT cell subsets, with importance in the innate immune defense and tissue protection. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21(5):365-79.

Wolk K, Haugen HS, Xu W, Witte E, Waggle K, Anderson M, et al. IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN-gamma are not. *J Mol Med*. 2009;87(5):523-36.

Xavier MB, Ferreira MMR, Quaresma JAS, Brito A. HIV and lacazioses, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(3):526-7.

Xavier MB, Libonati RMF, Unger D, Oliveira C, Corbett CEP, Brito AC, et al. Macrophage and TGF-beta immunohistochemical expression in Jorge Lobo's disease. *Hum Pathol*. 2008;39(2):269-74.

Xuan X, Zhang L, Tian C, Wu T, Ye H, Cao J, et al. Interleukin-22 and connective tissue diseases: emerging role in pathogenesis and therapy. *Cell Biosci*. 2021;11(1):2.

Yamanaka K-I, Mizutani H. The role of cytokines/chemokines in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Curr Probl Dermatol*. 2011;41:80-92.

Yang CS, Chen CB, Lee YY, Yang CH, Chang YC, Chung WH, et al. Chromoblastomycosis in Taiwan: a report of 30 cases and a review of the literature. *Med Mycol*. 2018;56(4):395-405.

Yang XY, Wang HY, Zhao XY, Wang LJ, Lv QH, Wang QQ. Th22, but not Th17 might be a good index to predict the tissue involvement of systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol*. 2013;33(4):767-74.

Yu PJ, Ferrari G, Galloway AC, Mignatti P, Pintucci G. Basic fibroblast growth factor (FGF-2): the high molecular weight forms come of age. *J Cell Biochem.* 2007;100(5):1100-8.

Zelante T, Iannitti R, De Luca A, Romani L. IL-22 in antifungal immunity. *Eur J Immunol.* 2011;41(2):270-5.

Zenewicz LA, Flavell RA. Recent advances in IL-22 biology. *Int Immunol.* 2011;23(3):159-63.

Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, Karow M, Flavell RA. Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. *Immunity.* 2007;27(4):647-59.

Zhang N, Pan HF, Ye DQ. Th22 in inflammatory and autoimmune disease: prospects for therapeutic intervention. *Mol Cell Biochem.* 2011;353(1-2):41-6.

Zhu A, Han H, Zhao H, Hu J, Jiang C, Xie F, et al. Increased frequencies of Th17 and Th22 cells in the peripheral blood of patients with secondary syphilis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012;66(3):299-306.

Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Ann Rev Immunol.* 2010;28:445-89.

Zhu X, Zhu J. CD4 T helper cell subsets and related human immunological disorders. *Int J Mol Sci.* 2020;21(21):8011.