

MAYSA DE VASCONCELOS BRITO

**AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA DENSIDADE DE VASOS
E EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO CELULAR DA
MICROVASCULATURA DE LESÕES NA DOENÇA DE JORGE
LOBO**

Belém-PA
2013

MAYSA DE VASCONCELOS BRITO

**AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA DENSIDADE DE VASOS
E EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO CELULAR DA
MICROVASCULATURA DE LESÕES NA DOENÇA DE JORGE
LOBO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais da Universidade Federal do Pará, como requisito final para obtenção do Grau de Doutor em Doenças Tropicais.

**Orientador: Prof. Dr. Juarez Simões
Quaresma**

Belém
Março/2013

Brito, Maysa de Vasconcelos.

Microvasculatura da Lesão na Doença de Jorge Lobo: Uma Avaliação Imunohistoquímica da Densidade de Vasos e Expressão de Moléculas de Adesão Celular / Maysa de Vasconcelos Brito – Belém, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Pará. Núcleo de Medicina Tropical. Área de Concentração: Doenças Tropicais. Linha de Pesquisa: Imunopatologia na Doença de Jorge Lobo.

MAYSA DE VASCONCELOS BRITO

**AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA DENSIDADE DE VASOS
E EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO CELULAR DA
MICROVASCULATURA DE LESÕES NA DOENÇA DE JORGE
LOBO**

Banca examinadora:

Prof. Dra. Hellen Thais Fuzii

Núcleo de Medicina Tropical/NMT – UFPA

Prof. Dr. Jorge Pereira da Silva

Faculdade de Farmácia – UFPA

Prof. Dra. Francisca Regina Oliveira Carneiro

Centro de Ciências Biológicas da Saúde - UEPA

Prof. Dra. Tinara Leila de Souza Aarão

Núcleo de Medicina Tropical/NMT – UFPA

Belém, 27 de março de 2013

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Laboratório de Imunopatologia do Núcleo de medicina Tropical/NMT da Universidade Federal do Pará, com o auxílio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo e CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

“...Para o homem que se engaja na pesquisa não há alegria que se compare à descoberta, por mais insignificante que ela possa parecer. É isso que o faz seguir adiante...”

Sir Alexander Fleming

Dedico esta tese

Aos meus pais Célia e Haroldo

Ao meu marido Francisco

A minha filha Yasmin

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, fonte maior de esperança e guia nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador, Dr. Juarez Quaresma por ter me aceitado como sua aluna, pelo apoio e confiança na execução deste trabalho;

À Dra. Hellen, pelo carinho, pelos momentos de descontração nas fases difíceis, pelas conversas, apoio, incentivo, por interferir sempre na hora certa...

Ao Dr. José Antônio Diniz, por todos os seus ensinamentos laboratoriais, científicos e de vida, pelas conversas, risadas, broncas, incentivo, apoio...

À Dra Carla Pagliari, pela maneira com que me recebeu em seu laboratório, sempre tão solícita, prestativa. Sem medir esforços, fez o possível para suprir todas as necessidades, dúvidas e pendências durante a execução do trabalho.

À Dra. Mírian Soto pelas sugestões e análise histopatológica.

Aos colegas do laboratório de Moléstias Infecciosas, Luciana, Aline, Mônica, Rosana.

Aos colegas do laboratório de microscopia eletrônica, Leilane, Alice, Natalie, Ana Paula, Ygor, Francinete. Em especial, Elis, Stephany e Tamirys que trabalharam diretamente comigo.

Ao Prof. Cristovam Diniz pelas reuniões científicas sempre muito proveitosas. Aprendi muito nesse período.

Ao Daniel Diniz pela imensa ajuda em alguns experimentos.

Aos colegas do laboratório de imunopatologia, George, Jorge, Mara, Beatriz, Paulo Ygor, Luiz Fernando, Rafael, Marizelli, Fabíola, Esther, Adriana, Juliana...

À nova companheira de aventuras, Tinara Aarão. Muito obrigada pela amizade, conselhos, apoio, incentivo...

À antiga e sempre nova amiga Michele Amaral.

Ao programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais e
Universidade federal do Pará.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste
trabalho.

RESUMO

A doença de Jorge Lobo é uma micose rara de inflamação crônica que provoca lesão na pele sem disseminação visceral. Essa doença é causada pelo fungo *Lacazia loboi*. Sua ocorrência é predominante em regiões de clima quente e úmido, sendo a maior parte dos casos registrados na região Amazônica brasileira. As observações histopatológicas mostram grande quantidade de fungos no local da lesão, havendo um rico infiltrado macrófagico, com presença de células gigantes e limitada presença de linfócitos. A migração de leucócitos para o sítio inflamatório induzida por *Lacazia loboi* é supostamente coordenada por citocinas e quimiocinas que auxiliadas por vasos sanguíneos e linfáticos influencia a migração celular induzindo a expressão de moléculas de adesão. No presente trabalho investigamos possíveis alterações microvasculares associadas à infecção por *Lacazia loboi* no local da lesão que podem interferir na evolução dos aspectos clínicos dos pacientes. Dessa forma, avaliamos a densidade dos vasos sanguíneos e linfáticos, bem como a expressão das moléculas ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina. Nossos resultados mostraram que na doença de Jorge Lobo, há uma reduzida quantidade de vasos sanguíneos e linfáticos, quando comparado a pele controle. Houve um maior número de vasos expressando ICAM-1, sendo também observado maior número de vasos expressando a molécula VCAM-1, embora em quantidade menos proeminente que ICAM-1. Não observamos diferença na expressão de E-selectina. Juntos nos resultados apontam para uma alteração na microvasculatura local o que pode interferir no desenvolvimento de uma resposta imune celular eficiente e justificar a presença do fungo limitada ao local da lesão.

Palavras-chaves: doença de Jorge Lobo, microvasculatura, ICAM-1, VCAM-1, E- selectina.

ABSTRACT

Jorge Lobo's disease is a rare mycosis of chronic inflammation that causes injury to the skin without visceral dissemination. This disease is caused by the fungus *Lacazia loboi*. Its occurrence is prevalent in regions of hot and humid, with most cases reported in the Brazilian Amazon region. The histopathological findings showed lots of fungi at the site of injury, with a rich macrophages infiltrate with giant cells and limited presence of lymphocytes. The migration of leukocytes to the inflammatory site induced *Lacazia loboi* is supposedly coordinated by cytokines and chemokines that aided by blood and lymph vessels influence cell migration inducing the expression of adhesion molecules. In this paper we investigate possible microvascular changes associated with infection by *Lacazia loboi* at the site of injury that may interfere with the clinical evolution of patients. Therefore, we assessed the density of blood vessels and lymphatic vessels, as well as expression of molecules ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin. Our results showed that in Jorge Lobo's disease, there is a reduced amount of blood and lymph vessels, when compared to control skin. There was a larger number of vessels expressing ICAM-1, being also higher number of vessels expressing the molecule VCAM-1, although in much less prominent ICAM-1. There were no differences in the expression of E-selectin. Together the results point to a change in the local microvasculature which may interfere with the development of an effective cellular immune response and justify the presence of the fungus confined to the injury site.

Keywords: Jorge Lobo's disease, microvasculature, ICAM-1, VCAM-1, E-selectin.

LISTA DE ABREVIATURAS

- BSA** - soro-albumina-bovina
- CD68** – grupo de diferenciação tipo 68
- CGM** - células gigantes multinucleadas
- DJL** – doença de Jorge Lobo
- EIA** – Imunoreação enzimática
- ELISA** - Enzyme-linked immuno sorbent assay
- FGF** - fator de crescimento de fibroblastos
- GP43** – glicoproteína 43
- HE** - coloração de hematoxilina-eosina
- ICAM-1** - molécula de adesão intercelular-1
- IFN- γ** – interferon γ
- iNOS** – Óxido nítrico sintase induzida
- LFA-1** – função do leucócito associado ao antígeno 1
- MAC-1** – antígeno 1 do macrófago
- PBS** – solução salina tamponada
- PIGF** – fator de crescimento de plaquetas
- TGF- β** – fator de crescimento tumoral β
- Th1** – linfócito T helper tipo 1
- Th2** – linfócito T helper tipo 2
- TNF- α** – fator de necrose tumoral alfa
- VCAM-1** – molécula de adesão celular-vascular 1
- VEGF** – fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Micrografia da presença do fungo *Lacazia loboi* na lesão humana. Intensa presença do fungo na lesão em formas individual (setas) e catenulada (elipse). Notar presença de fungos vivos (seta fina) e mortos (seta larga). Cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina. Aumento 400x. 30

FIGURA 2: Micrografia das alterações na epiderme encontradas durante doença de Jorge Lobo. (A) Epiderme conservada. (B) Epiderme retificada atrófica com formação subepidérmica de faixa de Grenz (setas). (C) Eliminação transmigração epidérmica dos fungos. (D) Acantose/hiperqueratose. Cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina. Aumento 200x em (A), (B) e (D). Aumento de 400x em (C). 31

FIGURA 3: Micrografia mostrando o infiltrado de células na derme durante doença de Jorge Lobo. (A) Infiltrado rico em macrófagos, com presença de macrófagos finamente granular (seta), células gigantes e raros linfócitos. (B) Célula gigante contendo em seu interior corpos asteroides. (C) Presença de plasmócitos. (D) Presença de eosinófilo. Cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina. Aumento: (A) 630x e (B), (C) e(D) 400x. 33

FIGURA 4: Micrografia da marcação imunohistoquímica de vasos da microvasculatura na lesão durante doença de Jorge Lobo. (A) marcação do antígeno CD34 (setas), evidenciando o endotélio dos vasos. (B) marcação do antígeno podoplanina (D2-40) (setas) específico do endotélio linfático. Aumento: (A) 100x (B) 400x. 35

FIGURA 5: Densidade total de vasos na lesão durante doença de Jorge Lobo. * $p < 0,05$ em comparação com o controle. DJL: grupo de casos de doença de Jorge Lobo. CTL: grupo controle. 35

FIGURA 6: Análise da densidade de vasos sanguíneos e linfáticos da lesão na doença de Jorge Lobo. * $p < 0,05$ em comparação com o controle. DJL: grupo de casos de doença de Jorge Lobo. CTL: grupo controle. 37

FIGURA 7: Micrografia da marcação imunohistoquímica de moléculas de adesão celular na lesão durante doença de Jorge Lobo. (A) Células endoteliais expressando ICAM-1 (B) Células endoteliais expressando VCAM-1. (C) Células endoteliais expressando E-selectina. Aumento 400x. 38

FIGURA 8: Análise da expressão de moléculas de adesão celular na lesão durante doença de Jorge Lobo. (A) vasos expressando ICAM-1. (B) vasos expressando VCAM-1. (C) vasos expressando E-selectina. * $p < 0,05$ em comparação com o controle. DJL: grupo de casos de doença de Jorge Lobo. CTL: grupo controle..... 40

FIGURA 9: Percentual de expressão de moléculas de adesão celular na lesão durante doença de Jorge Lobo. * $p < 0,05$ em comparação com os outros grupos. %: percentual..... 41

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. JUSTIFICATIVA	03
3. REFERENCIAL TEÓRICO	04
3.1 DOENÇA DE JORGE LOBO	04
3.1.1 Histórico	04
3.1.2 Etiologia	04
3.1.3 Epidemiologia	06
3.1.4 Aspectos clínicos	07
3.1.5 Aspectos histopatológicos.....	08
3.1.6 Patogenia	09
3.1.7 Imunologia	10
3.2 O SISTEMA MICROVASCULAR CUTÂNEO.....	12
3.3 INFLAMAÇÃO CUTÂNEA E ENDOTÉLIO.....	14
3.4. MIGRAÇÃO CELULAR E MOLÉCULAS DE ADESÃO	16
3.5. ANGIOGÊNESE E LINFOGÊNESE NA INFLAMAÇÃO.....	18
3.6. DISFUNÇÃO ENDOTELIAL NAS DOENÇAS	19
4. OBJETIVOS	23
5. METODOLOGIA	24
5.1 CASUÍSTICA.....	24
5.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	24
5.3 IMUNOHISTOQUÍMICA	25
5.4 ANÁLISE QUANTITATIVA DA MARCAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA ..	27
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
5.6 ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA	28
6. RESULTADOS	29
6.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DA CASUÍSTICA ESTUDADA.....	29
6.2 ANÁLISE ANATOMO-PATOLÓGICA DOS CASOS DE DOENÇA DE JORGE LOBO	30
6.3 DENSIDADE MICROVASCULAR	34

6.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO CELULAR (MACs)	37
7. DISCUSSÃO	42
8. CONCLUSÕES	51
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1. INTRODUÇÃO

A doença de Jorge Lobo é uma micose dérmica de evolução crônica, causada pelo fungo *Lacazia loboi*. Foi descrita pela primeira vez, em 1931, por Jorge de Oliveira Lobo, em um paciente pernambucano que vivia como seringueiro na Amazônia e apresentava lesões nodulares, salientes, confluentes e duras, localizadas na região lombossacral (LOBO, 1931). Apresenta também outras denominações, como lobomicose, blastomicose queiloide, granulomatose blastomicoide, blastomicose da Amazônia e lacaziose.

O fungo *Lacazia loboi* é um agente ainda pouco estudado, principalmente devido às dificuldades no seu isolamento e sua manutenção em cultura. Isso reflete no nível de conhecimento sobre os aspectos fisiopatogênicos da lobomicose, o qual atualmente ainda é limitado.

Observa-se em geral que a lesão na doença de Jorge Lobo apresenta rica fibrose, ausência de granulomas bem formados e grande quantidade de fungo. Dessa forma existem evidências de que essa doença apresenta resposta celular deficiente, com resposta humoral bem estabelecida o que parece conduzir para a manifestação clínica da doença (BRITO; QUARESMA, 2007).

A manutenção da infecção e estabelecimento de um padrão de resposta celular dominante é influenciada pela ativação dos vasos. Diversas doenças inflamatórias estão associadas a uma vasculatura hiperativa ou insuficiente, tais como dengue, psoríase, dermatite atópica, dano na pele por luz ultravioleta (HUGGENBERGER; DETMAR, 2011)

Vasos endoteliais e linfáticos parecem exercer importante função nas enfermidades inflamatórias agudas e crônicas. Na pele inflamada, a remodelagem

vascular consiste de uma maior permeabilidade, ampliação da rede de vasos com aumento do fluxo sanguíneo e influxo de células inflamatórias. Durante inflamação crônica, o endotélio ativado expressa quimiocinas, citocinas e moléculas de adesão que leva ao rolamento, adesão estável e migração de leucócitos para a pele (KIM et al., 2013).

A pele, durante o processo de infecção pelo *Lacazia Lobo* e estabelecimento da doença, passa por diversas alterações histopatológicas. Na doença de Jorge Lobo, ainda não foi estudada a atividade dos vasos endotelial e linfático no estabelecimento da inflamação crônica que se desenvolve frente à infecção pelo fungo.

2. JUSTIFICATIVA

A doença de Jorge Lobo é uma micose profunda que interfere no campo psicossocial dos indivíduos acometidos. Essa doença emergente necessita de maior atenção das políticas de saúde. Antes se acreditava que era restrita apenas a América do Sul, hoje há registro de casos em várias partes do mundo incluindo América Central, América do Norte, África e Europa. O Brasil é líder mundial em casos de Doença de Jorge Lobo.

Vários fatores podem interferir no controle e combate a infecção causada pelo *L. loboi*. A resposta imunológica possivelmente é relevante para determinar o curso clínico e o prognóstico da doença.

Há crescentes evidências de que vasos sanguíneos e linfáticos exercem importantes funções nos processos inflamatórios agudos e crônicos, entretanto até o presente momento na literatura não há registro de estudo sobre o papel do endotélio na doença de Jorge Lobo. Neste sentido o endotélio vascular *in loco* e a interação dos seus ligantes com ligantes das células inflamatórias sanguíneas, contribui de maneira central nessa resposta específica. Conhecer as alterações vasculares e a estreita relação que ocorre entre o endotélio e as células do sistema imunológico pode nos ajudar a definir o caminho que leva a evolução clínica da doença de Jorge Lobo. O melhor entendimento da patogenia da doença poderá auxiliar na elaboração de esquemas terapêuticos eficazes.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 DOENÇA DE JORGE LOBO

3.1.1 Histórico

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

Por muitos anos essa doença foi considerada acometer somente a espécie humana e especificamente limitada a América Latina. Entretanto, essas convicções foram invalidadas em 1971, quando foi registrado pela primeira vez um caso da doença em um golfinho na costa da Flórida (MIGAKI et al., 1971) e em seguida com a descrição de dois casos humanos na África (AL-DARAJI et al., 2008) e mais recentemente de um caso na Europa (PAPADAVID et al., 2012).

3.1.2 Etiologia

O agente etiológico da doença de Jorge Lobo pertence à ordem *Onygenales*, família *Ajellomycetaceae* e assemelha-se em diversos aspectos com o *Paracoccidioides brasiliensis*.

A classificação taxonômica deste fungo sempre foi um desafio para os pesquisadores. Sua denominação variou constantemente devido a uma diversidade de critérios empregados:

- *Glenosporella lobo* (FONSECA & LEÃO: 1940);
- *Blastomyces lobo* (VANBREUSEGHEM: 1952);
- *Glenosporopsis amazônica* (FONSECA: 1943);
- *Paracoccidioides lobo* (ALMEIDA; LACAZ, 1948);
- *Loboa lobo* (CIFERRI et al., 1956);
- *Lacazia lobo* (TABORDA et al., 1999).

Taborda et al., em 1999, propuseram colocar o fungo em novo gênero, denominado *Lacazia*, passando o agente dessa doença a se chamar *Lacazia lobo*, binômio introduzido como uma homenagem ao Professor Carlos da Silva Lacaz, pela sua grande contribuição na história da micologia brasileira. A criação deste nome foi apoiada, também, por estudo filogenéticos realizados por Herr et al. (2001).

Microscopicamente, *L. lobo* possui forma globóide, com espessas paredes de duplo contorno, refringentes, medindo 5 a 6 x 12 a 14 µm. São frequentes aspectos em rosário ou catenulados, em cadeias ramificadas ou não, de três, cinco, oito ou mais células, e formas em halteres, unidas por túbulo conector. Análises ultraestruturais revelaram membrana celular espessa, trilaminar e parasitos não-seccionados com superfície serrada (ABREU; MIRANDA, 1972). Além disso, foram observados macrófagos repletos de parasitos em cujo citoplasma havia mitocôndrias, ribossomas, retículo endoplasmático granular e vacúolos. Havia também “formas involutivas vazias”, parasitos fagocitados com parede espessada e projeções lameliformes radiadas e fragmentos da cápsula parasitária em vacúolos dos macrófagos (SESSO; BARUZZI, 1988; SESSO et al., 1988).

3.1.3 Epidemiologia

Essa micose é prevalente em regiões tropicais e subtropicais de clima quente e úmido, especialmente na Amazônia brasileira onde é endêmica. É também identificada em outros onze países da América Latina: Colômbia, Venezuela, Guyana, Guyana Francesa, Equador, Costa Rica, Panamá, Peru, Bolívia e México. Há casos esporádicos registrados na África, Europa, Estados Unidos e Canadá (RAMOS-E-SILVA et al., 2009).

A doença de Jorge Lobo é típica de região neotropical, sendo a região amazônica brasileira a mais acometida. É difícil estabelecer com exatidão o número de casos da doença, por não ser de notificação compulsória, no entanto estima-se que há 490 casos relatados no mundo, sendo 318 encontrados no Brasil, incluindo os 61 índios da tribo Caiabi (BRITO; QUARESMA, 2007; OPROMOLLA, 1999).

Provavelmente o habitat natural do *Lacazia loboi* está nas áreas de florestas tropicais e subtropicais, com clima quente e úmido, alto índice pluviométrico e temperatura em torno de 24° C.

A doença não distingue grupo populacional humano, predomina no sexo masculino (90% dos casos), entre os que exercem atividades no meio rural como seringueiros, garimpeiros, agricultores, caçadores, mateiros, indígenas, entre outros, pois há maior exposição aos fatores de risco. Entre os índios Caiabi, no Brasil, há um predomínio feminino em 32% dos casos, pois as atividades agrícolas das mulheres na floresta são comuns nesta tribo (PRADINAUD; TALHARI, 1996).

A faixa etária predominante é entre 20 e 40 anos, apesar de haver relatos na 5ª década de vida e poucos em crianças (BARUZZI et al., 1979).

3.1.4 Aspectos clínicos

A apresentação clínica é variável com lesões polimórficas que podem ser simples ou múltiplas.

Clinicamente a lesão inicial é de uma pápula que conflui dando origem à placa ou nódulo. O quadro clínico clássico é de lesão queloidiana, dura, lisa, semi-esférica, cor castanho-amarronzado, isolada ou confluyente, formando massas multilobulares, recobertas de pele íntegra, lisa, brilhante, com telangectasias e nítida delimitação com a pele sã. Outros aspectos observados são lesões verrucosas, ulceradas, gomos, esclerodermiformes, maculares e infiltrativas (FUCHS et al., 1990; OPROMOLLA, 1999b).

O polimorfismo lesional é o mais encontrado no exame clínico, principalmente nos casos de longa evolução. Pode haver pontos enegrecidos na superfície das lesões, correspondendo à eliminação transepidérmica do fungo como ocorre em outras micoses profundas, a exemplo da cromoblastomicose (MIRANDA et al., 2010; OPROMOLLA et al., 2000).

As lesões localizam-se em ordem de frequência nos membros inferiores, pavilhão auricular e membros superiores. Nos membros inferiores ocorrem principalmente lesões polimórficas e sua alta incidência talvez decorra da maior exposição às injúrias. Nas orelhas observamos infiltração difusa, nódulos, telangectasias e até deformidades (LOUREIRO et al., 1971).

Os tipos clínicos podem ser classificados em monomórficos e polimórficos. As lesões cutâneas podem ser localizadas, multifocais ou disseminadas. Avaliando as lesões podemos classificá-las como brandas (menores de 5 cm), moderadas (entre 6

e 15 cm) e graves (maiores de 16 cm) ou a combinação desses tipos de lesão (BRITO, 2006).

A doença, portanto, tem um amplo espectro de manifestações clínicas. Em um estudo com os índios Caiabi foi sugerida uma classificação em dois grupos polares: hiperérgica (máculas e gomas) e hipoérgica (queloidiforme). Foram também propostas classificações conforme distribuição em formas isoladas ou localizadas e formas disseminadas (BRITO; QUARESMA, 2007; LACAZ et al., 1986; BARUZZI et al., 1979; MACHADO, 1972).

3.1.5 Aspectos histopatológicos

Habitualmente, na histopatologia, observa-se atrofia da epiderme e nos casos vegetante-verrucosos hiperplasia epitelial e hiperqueratose. No entanto a epiderme pode estar normal, com aplainamento das cristas interpapilares, ou ulcerada. A membrana basal está espessada (BRITO; QUARESMA, 2007).

Na derme observam-se vasos dilatados e infiltrado inflamatório granulomatoso, nodular e difuso, rico em histiócitos (muitos xantomizados devido a polissacarídeos e/ou lipídios intracelulares), além de linfócitos, células epitelióides, células gigantes tipo Langerhans e tipo corpo estranho com citoplasma repleto de parasitos e em menor quantidade, eosinófilos e plasmócitos. Neutrófilos e necrose são raros. As estruturas nervosas estão íntegras nos interstícios do conjuntivo e no granuloma (OPROMOLLA et al., 2000; BRITO; QUARESMA, 2007).

Nos estudos sobre DJL há vários relatos de macrófagos com citoplasma de aspecto espumoso ou granular, semelhantes às células de Gaucher, possivelmente resultante do acúmulo de fragmentos do fungo, que após ser endocitado, sofre ação

das enzimas lisossomais dos macrófagos. Na microscopia ótica esses macrófagos adquirem um aspecto espumoso (SESSO; BARUZZI, 1988).

Corpos asteróides foram relatados presentes no infiltrado granulomatoso nas células multinucleadas, como é observado em outras doenças granulomatosas (MICHALANY; LAGONEGRO, 1963).

Na coloração de hematoxilina-eosina (HE) observa-se um grande número de células fúngicas isoladas ou em cadeia, intra ou extracelulares, com aspecto semelhante ao já descrito no item agente etiológico. Aspectos morfológicos pouco encontrados como pseudo-hifas já foram observados (SESSO et al., 1993).

Conforme Vilani-Moreno et al. (2005), na histopatologia da DJL há predomínio de histiócitos, presença de células gigantes multinucleadas (CGM) e muitos fungos, alguns deles com aspecto de inviabilidade. Os linfócitos são esparsos e os neutrófilos raros, configurando o granuloma do tipo corpo estranho. Não há um arranjo celular característico, mas os linfócitos estão próximos de histiócitos e CGM formando pequenos focos ou agrupados ao redor de vasos.

3.1.6 Patogenia

A patogenia da DJL ainda não é bem esclarecida, não havendo cultivo do agente em laboratório e os experimentos em animais ainda não têm resultados consistentes (BRITO; QUARESMA 2007).

Admite-se que a pele seja a porta de entrada para o fungo através de solução de continuidade por traumatismos com fragmentos vegetais, picadas de insetos ou de cobra. O período de incubação é incerto, em média de um a dois anos (LACAZ et al., 1986). O *L. loboi* parece manter-se viável em materiais diversos como vegetais,

solo e água. Transmissão inter-humana não está comprovada, inclusive nos casos com convívio íntimo e prolongado da mesma família (OPROMOLLA, 1999b).

Uma vez na derme, o fungo replica-se lentamente, um processo que parece iniciar após o fungo ser fagocitado por célula fagocíticas mononucleares. Levantou-se a hipótese de que esse processo poderia explicar o longo período de incubação e o lento desenvolvimento de lesões (VILANI-MORENO et al., 2005).

Após a lesão inicial, há um período de multiplicação lenta do fungo, com permanência da infecção restrita ao local da lesão. Todavia, há descrições de casos raros em que ocorreu disseminação do fungo. Embora os mecanismos de disseminação permaneçam não esclarecidos, a disseminação por contiguidade da via hemato-linfática parece ser um importante mecanismo (PANÍZ-MONDOLFI et al., 2012). A descrição de um caso com metástase testicular na literatura fortemente sugere a possibilidade de disseminação hematogênica (RODRÍGUEZ-TORO, 1993; PRADINAUD, 1998).

3.1.7 Imunologia

Na doença de Jorge Lobo, os estudos abordando os aspectos imunológicos são ainda escassos. A imunohistoquímica constitui uma importante ferramenta para avaliar o padrão de resposta imune tecidual nas lesões, entretanto ainda tem sido pouco explorada.

São poucos os relatos sobre a imunidade na doença de Jorge Lobo e muitas das hipóteses são baseadas em estudos realizados em outros tipos de micoses como a paracoccidiodomicose, dadas certas semelhanças entre esses fungos.

Landman et al. (1988) observaram antigenicidade cruzada entre *L. loboi* e *P.*

brasiliensis, empregando método imunoenzimático com anticorpo policlonal de coelho anti-*P. brasiliensis* em lesões cutâneas de portadores de doença de Jorge Lobo.

As células de Langerhans foram avaliadas no local da lesão. A análise quantitativa dessas células não diferiu significativamente quando comparado ao grupo controle, parecendo a atuação dessas células estar inibida durante a infecção por *Lacazia loboi* (QUARESMA et al., 2010).

A imunidade celular está parcialmente deprimida, mas a imunidade humoral não está afetada nos pacientes com doença de Jorge Lobo (PECHER; FUCHS, 1988; PECHER et al., 1979).

Segundo Vilani-Moreno et al. em 2004, os monócitos de pacientes portadores de doença de Jorge Lobo são hábeis em fagocitar o *L. loboi*, à semelhança aos indivíduos saudáveis.

Camargo et al. (1998) relataram que soro de coelho contaminado com *P. brasiliensis* reage com material histológico de biópsias de pacientes com Doença de Jorge Lobo, e soro de pacientes com doença de Jorge Lobo reagem com *P. brasiliensis* nas culturas de imunofluorescência indireta. Entretanto não conseguiram definir os antígenos envolvidos nesta antigenicidade cruzada. ELISA e EIA identificaram que o gp43, antígeno maior do *P. brasiliensis* foi reconhecido pelo soro da doença de Jorge Lobo, sugerindo representar o principal antígeno da reação cruzada ou que seria compartilhado entre os dois fungos. Esse assunto será melhor entendido quando se tornar possível a cultura in vitro do *L. loboi* (VIDAL et al., 1997; CAMARGO et al., 1998).

Na doença de Jorge Lobo há positividade para CD68 e intensa marcação para TGF- β que inibe a expressão de IFN- γ . O marcador CD68 é responsável pela atividade metabólica microbicida celular e apesar de presente, mostrou-se em menor quantidade que a esperada. O aumento de TGF- β , induz a fibrose, fato este que poderia retratar o aspecto clínico preponderante; a forma queloidiana, assim como a ausência de granulomas bem formados, padrão histopatológico frequente nessa enfermidade (XAVIER et al., 2008).

Conforme relatos de Vilani-Moreno et al. em 2004, pacientes com doença de Jorge Lobo apresentam alterações no perfil das citocinas, representadas por predomínio do perfil Th2, o que poderia alterar a capacidade de regulação dos mecanismos responsáveis pela contenção do *L. loboi*. Mais recentemente mostrou que a expressão de TNF- α e INOS está inibida na lesão dos pacientes (VILANI-MORENO et al., 2011).

Futuras investigações poderão avaliar melhor a participação de citocinas e respostas imunológicas local na interação célula-fungo, para elucidar a patogênese da doença de Jorge Lobo.

3.2 O SISTEMA MICROVASCULAR CUTÂNEO

A pele é mais do que uma barreira física inerte entre o indivíduo e o meio ambiente. Esse grande órgão possui uma rede de componentes físicos, químicos e imunológicos que auxiliam na manutenção da integridade. Em caso de dano, componentes imunológicos incitam uma intensa reação de defesa que integram respostas inatas e adaptativas. Eventos de respostas inatas frequentemente

determinam a qualidade e quantidade das respostas imunes adaptativas (BANGERT et al., 2011).

Dando suporte para essas reações imunológicas, a camada dérmica da pele abriga vasos sanguíneos e linfáticos que constituem a microvasculatura cutânea.

Os vasos sanguíneos e linfáticos diferem nas suas características funcionais e estruturais. O sistema vascular sanguíneo é fechado, sendo formado por um sistema circulatório, que contém uma bomba cardíaca, artérias, capilares e veias. Ao contrário, o sistema linfático é aberto, se inicia em túbulos de fundo cego, unidirecional, que flui de forma contrária ao fluxo sanguíneo (KARPANEN; ALITALO, 2008).

Vasos sanguíneos conduzem células sanguíneas, nutrientes, hormônios e oxigênio para os tecidos, enquanto que a vasculatura linfática remove macromoléculas, micróbios e outras substâncias do espaço intersticial (MABY et al., 2008).

O sistema linfático representa uma via acessória, através do qual os líquidos conseguem fluir do espaço intersticial para dentro do sangue. E, ainda mais importante, os linfáticos podem carrear proteínas e grandes partículas de matéria para longe dos espaços teciduais, os quais não poderiam ser removidos por absorção direta e penetrar no capilar sanguíneo (PODGRABINSKA et al., 2002).

Os capilares linfáticos não contém membrana basal contínua e apresentam poros intercelulares, que permitem a permeabilidade de fluidos e células imunológicas, como células de Langerhans. As células endoteliais linfáticas nos capilares se ancoram nas fibras colágenas na matriz extracelular através de fibras elásticas, que mantém os vasos patentes e são responsáveis pelo aumento do

diâmetro luminal dos linfáticos, quando o volume de fluido intersticial está aumentado (GIRARD et al., 2012).

3.3 INFLAMAÇÃO CUTÂNEA E ENDOTÉLIO

Frente ao reconhecimento de invasão por patógenos como um fungo, é desencadeada uma resposta imediata. Essa resposta é denominada inflamação, a qual constitui um complexo mecanismo de defesa no qual leucócitos migram dos vasos para pele com a finalidade de destruir o agente que potencialmente pode causar injúria tecidual. A inflamação aguda é uma resposta benéfica e limitada, a inflamação crônica, por outro lado é um fenômeno persistente que pode levar ao dano tecidual (GABAY, 2006). A inflamação crônica é um processo comumente observado em muitas enfermidades, entre elas na doença de Jorge Lobo.

O processo de resposta inflamatória é auxiliado por uma microvasculatura local que integra vasos sanguíneos e linfáticos, os quais promovem dilatação dos capilares para aumento do fluxo sanguíneo, modificações estruturais da microvasculatura que resulta em escape das proteínas plasmáticas da corrente sanguínea e transporte de leucócitos através do endotélio (HUGGENBERGER; DETMAR, 2011).

Os vasos sanguíneos e linfáticos são formados por uma fina camada de células endoteliais. Essas células no local da infecção são participantes e reguladores ativos do processo inflamatório (POBER; SESSA, 2007).

A complexa interação entre as células residentes da pele e o patógeno dispara a produção de vários mediadores inflamatórios que podem ser divididos em sete grupos: aminas vasoativas, peptídeos vasoativos, fragmentos dos componentes

do complemento, mediadores lipídicos, citocinas, quimiocinas e enzimas proteolíticas (LON et al., 2012). Em resposta a esses mediadores inflamatórios produzidos localmente, células endoteliais microvasculares tornam-se ativadas, secretando citocinas e quimiocinas inflamatórias adicionais, intensificando quimiotaxia de leucócitos e proporcionando maior capacidade de adesão à camada endotelial do vaso, o que favorece a migração de leucócitos para o local da infecção (DANESE et al., 2007).

As propriedades das células endoteliais modificam-se durante a transição da inflamação aguda e crônica e durante a transição da imunidade inata para adaptativa. Quando a infecção é persistente, células efetoras mais especializadas passam a fazer parte do processo inflamatório. Trabalhos tem mostrado que as células endoteliais, nesse processo, podem participar atuando na apresentação de antígeno a células T de memória e efetoras circulantes, já que podem expressar altos níveis de moléculas MHC-I, MHC-II, e de moléculas co-estimulatórias – tais como ligantes para ICOS, 4-1BB e OX40 – que estão envolvidas na formação e ativação de células T de memória (CHOI et al., 2004; SHIAO et al., 2005). Outra mudança funcional está associada à capacidade dessas células de participar na polarização das respostas inflamatórias associadas com a imunidade adaptativa (AUSTRUP et al., 1997; CHAPLIN et al., 2002). Além disso, existem diferenças específicas entre células endoteliais da microvasculatura de diferentes tecidos, incluindo diferenças nos produtos secretados, na expressão das moléculas de adesão e na resposta molecular as citocinas (CRAIG et al., 1998; HILLYER et al., 2003; POBER; SESSA, 2007).

3.4. MIGRAÇÃO CELULAR E MOLÉCULAS DE ADESÃO

O endotélio, estimulado por mediadores inflamatórios, permanece ativado nas inflamações agudas e crônicas. Durante a ativação endotelial há um elevado aumento da expressão de moléculas de adesão celular (MACs) na sua superfície que permite a migração leucocitária o qual é um processo multipasso que envolve basicamente três etapas: ativação e rolamento, adesão e transmigração endotelial (MCEVER E ZHU, 2010; MULLER, 2011; SIMON; GREEN, 2005). As MACs são glicoproteínas expressas na superfície das células, as quais medeiam o contato entre célula e a matriz extracelular ou entre duas células. Elas estão agrupadas em quatro superfamílias: integrinas, selectinas, imunoglobulinas e caderinas (ELANGBAN et al., 1997; ROJAS; AHMED, 1999).

As integrinas são glicoproteínas transmembranas, compostas por dois heterodímeros não-covalentes designados como unidade α e β . A subunidade α compreende LFA-1 (CD11a), MAC-1 (CD11b) e Gp150,95 (CD11c). O conjunto das três moléculas de adesão é denominado complexo CD11/CD18 (ALBELDA; BUCK, 1990; HUTTENLOCHER et al., 1995). As integrinas participam da adesão leucocitária ao endotélio, quimiotaxia e fagocitose. Na subunidade β , as integrinas compõem três subfamílias: $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$. A subfamília $\beta 1$ de integrinas é também denominada VLA; a $\beta 2$ é a LeuCAM e a $\beta 3$ constitui as citoadesinas. As integrinas também participam da organização tissular e são receptores para outras moléculas de adesão (BAZAN-SOCHA et al., 2005).

A família das selectinas é representada por três receptores compostos de glicoproteínas transmembrana tipo I dependente de Ca com um domínio extracelular tipo lectina. As selectinas tem como função a fixação inicial dos leucócitos ao

endotélio vascular, promovendo rolamento. As selectinas são classificadas de acordo com seu sítio de expressão. L-selectina é expresso em linfócitos. P-selectina é expresso em plaquetas e células endoteliais. E-selectina é expressa em células endoteliais ativadas. E-selectina não é constitutivamente expressa por células endoteliais; sua expressão é estimulada por moléculas inflamatórias como TNF- α , IL-1 e LPS (JUBELI et al., 2012; McEVER; ZHU, 2010; ROMANO, 2005).

A superfamília das imunoglobulinas consiste em proteínas da superfície celular que contêm um ou mais domínios Ig. Estão incluídos nesta superfamília anticorpos, receptores de células T, proteínas MHC e co-receptores CD4+, CD8+, CD28, receptores Fc nos linfócitos e várias moléculas de adesão celular. Os membros desta família abrangem as moléculas VCAM-1, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, PECAM-1 e MAd-CAM-1 (BUCK, 1992). ICAM-1 é amplamente distribuído em leucócitos, células endoteliais, fibroblastos e células epiteliais. VCAM-1 é expresso em monócitos, células endoteliais e células sinoviais. ICAM-1 e VCAM-1 estão envolvidos na firme adesão de leucócitos a superfície apical das células endoteliais. Também tem sido evidenciado que a ligação de ICAM-1 e VCAM-1 na célula endotelial estimulam um aumento de íons cálcio livres citosólicos que ajuda a separar as células endoteliais, sendo importante para o processo de diapedese (MULLER, 2009; MULLER, 2011).

A família das caderinas é constituída de proteínas que estão envolvidas no estabelecimento e manutenção das conexões intercelulares,mediando a adesão célula-célula. As células endoteliais expressam N-caderina e VE-caderina. A caderina ancorada atua como um regulador negativo para o processo de diapedese (GAVARD, 2009; ELANGBAM et al., 1997)

3.5. ANGIOGÊNESE E LINFOGÊNESE NA INFLAMAÇÃO

A falha da resposta inicial para resolver a infecção leva à inflamação e à produção de fatores que aumentam o fluxo sanguíneo para o tecido inflamado, o que sustenta a viabilidade das células inflamatórias que produzem esses fatores. Se células efetoras especializadas do sistema imune adaptativo falham para erradicar a infecção, então nas doenças inflamatórias crônicas podem ser efetuadas duas alterações adicionais: angiogênese e linfogênese (ZGRAGGEN et al., 2013).

A angiogênese é iniciada pela migração das células endoteliais que revestem as vênulas no tecido e, finalmente, resulta em um plexo de novos capilares sanguíneos. A linfogênese é o crescimento dos vasos linfáticos a partir de vasos sanguíneos pré-existentes ou vasos linfáticos pré-existentes. Mais provavelmente esse processo também pode ocorrer por ação de células progenitoras. O programa que leva a formação e crescimento de vasos linfáticos é ainda pouco conhecido, diferente da variada informação disponível sobre o processo de proliferação dos vasos sanguíneos (MOUTA; HEROUT, 2003).

Leucócitos afetam muitos processos angiogênicos, pois produzem muitos fatores envolvidos nesse processo tais como VEGF, PlGF, FGF, ANG-2, EGF, TGF- β 1, MCP-1 e várias interleucinas e proteinases. Além disso, eles também podem gerar inibidores da angiogênese. A participação dos leucócitos na promoção ou finalização da angiogênese depende do balanço entre esses moduladores (CARMELIET, 2003).

A molécula mais importante que controla a morfogênese dos vasos sanguíneos chama-se fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A). VEGF-A é necessário para a quimiotaxia e diferenciação de precursores de células,

proliferação de células endoteliais e remodelagem angiogênica (POBER; SESSA, 2007).

A vasculatura linfática forma uma rede de terminais linfáticos que coleta fluido rico em proteínas que sai dos vasos sanguíneos e é então drenado pelo sistema linfático. A perda de função linfática em humanos como resultado de doença hereditária, dano dos vasos linfáticos ou remoção cirúrgica dos linfonodos causa linfedema. Enquanto o VEGF-A apresenta importante função no crescimento dos vasos sanguíneos, VEGF-C funciona como um importante regulador da linfangiogênese. VEGF-C promove a diferenciação de células endoteliais linfáticas PROX1+ (fator de transcrição e diferenciação de células endoteliais linfáticas) induzindo proliferação e sobrevivência dessas células (KARKKAINEN et al., 2004; ADAMS; ALITALO, 2007)

A remoção de estímulos antigênicos causa regressão de vasos, especialmente quando vasos foram recentemente formados. A regressão do vaso pode ser fisiológica ocorrendo quando a vasculatura nascente consiste de muitos vasos. Entretanto, a regressão anormal dos vasos contribui para a patogênese de numerosas doenças, como aterosclerose, doença de Crohn, diabetes, e osteoporose (CARMELIET, 2003).

3.6. DISFUNÇÃO ENDOTELIAL NAS DOENÇAS

Entende-se por disfunção endotelial como ativação do endotélio, ou seja, como uma mudança de um fenótipo quiescente para um que envolve a alteração vascular por resposta de defesa do hospedeiro com perda parcial ou completa do balanço entre os mediadores inflamatórios (DEANFIELD et al., 2007; GIRIBELA et

al., 2011). A disfunção endotelial pode resultar em: abertura dinâmica das junções intercelulares, desorganização da barreira, destruição das células endoteliais ou remodelagem vascular.

Disfunção endotelial é considerada um importante evento na gênese de diversas doenças. Na artrite reumatoide, células endoteliais sinoviais são ativadas e exibem aumento do extravasamento, angiogênese e apoptose, contribuindo para o recrutamento de leucócitos, edema e destruição das articulações (GONZÁLEZ-GAY; GONZÁLEZ-JUANATEY, 2012).

Eventos similares ocorrem na psoríase, onde células endoteliais ativamente exibem moléculas de adesão para o recrutamento de leucócitos, forma novos vasos e media a inflamação (BATYCKA-BARAN et al., 2012; LOWE et al., 1995).

Na esclerose múltipla, a migração transendotelial de leucócitos ativados é uma das alterações mais iniciais. A exposição do endotélio às células imunes rompe a barreira hemato-encefálica, por junções célula-célula desorganizadas, intensificando a adesão endotelial de leucócitos e migração (ANDJELKOVIC et al., 1998).

O endotélio promove inflamação do intestino através de mecanismos comparáveis com a mucosa normal. Microvasos na mucosa cronicamente inflamada demonstram importantes alterações na doença inflamatória do intestino: a microvasculatura é intensamente expandida, exibe uma arquitetura anormal, adere mais leucócitos, interage intimamente com plaquetas, é procoagulante e angiogênica. Todas essas características refletindo na patogênese da doença (HATOUM et al., 2003).

Nas doenças infecciosas um evento que pode acontecer é disfunção endotelial por ruptura da barreira que pode ser induzida por liberação de mediadores ativos. A desorganização da barreira endotelial sanguínea é um passo importante na migração de leucócitos. Durante a malária, achados recentes sugerem que a transferência de antígenos do Plasmodium para as células endoteliais induz ativação imune antígeno específica, dispara a produção de mediadores inflamatórios promovendo a destruição da barreira endotelial (JAMBOU et al., 2010; RAZAKANDRAINIBE et al., 2012).

Eventos similares foram observados na infecção pelo vírus Dengue. Quando um alto título desse vírus toca as células endoteliais, ocorre um infiltrado de macrófagos, mudanças na permeabilidade e hemorragia, que resulta em intensa expressão de ICAM-1, produção de mediadores inflamatórios, principalmente TNF- α e óxido nítrico, provocando dano na barreira endotelial (GREEN; ROTHMAN, 2006; LIU et al., 2011; LIN et al., 2005).

Alterações endoteliais também foram estudadas na leishmaniose tegumentar e visceral. Lipofosfoglicano (LPG) presente na superfície de *Leishmania* parece modular a adesão endotelial de monócitos, inibindo a expressão das moléculas expressão das moléculas ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina (LO et al., 1998). Foram observadas alterações na integridade dos vasos sanguíneos dermais e antígenos de leishmania no lúmen do endotélio (LUGO-YARBUH et al., 2003). Na leishmaniose visceral, parece ocorrer uma pronunciada vascularização do baço com participação ativa de monócitos nesse processo (YURDAKUL et al., 2011).

Na hanseníase foram encontrados diferentes padrões da microvasculatura no infiltrado da lesão nas formas tuberculóide e lepromatosa da doença (ANTUNES et al., 2000).

Nas infecções provocadas por fungos a disfunção endotelial tem sido pouco estudada. Durante disseminação hematogênica, *Candida albicans* adere ao endotélio e inicia uma reação pró-inflamatória aumentando a expressão de ICAM-1, VCAM-1, E-selectina e IL-8, sendo a expressão de ICAM-1 independente de TNF- α e IL-1 (OROZCO et al., 2000; PHAN et al., 2009). Durante infecção experimental por conídios de *Paracoccidioides brasiliensis* há participação das moléculas ICAM-1, VCAM-1, CD18 e Mac-1 no processo inflamatório interferindo na patogenia da paracoccidioidomicose (GONZALEZ et al., 2005). Na doença de Jorge Lobo, não há estudos que relatem alterações endoteliais na lesão de pacientes.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL:

Estudar as possíveis alterações microvasculares associadas à infecção por *Lacazia loboi* no local da lesão de pacientes com diagnóstico confirmado de Doença de Jorge Lobo.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Caracterizar as alterações histopatológicas da lesão cutânea de pacientes;
- Determinar a densidade de vasos sanguíneos e linfáticos na biópsia de pele na Doença de Jorge Lobo;
- Determinar a densidade de vasos ativados a partir da detecção das moléculas de adesão ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina nas lesões cutâneas de pacientes com Doença de Jorge Lobo.

5. METODOLOGIA

5.1 CASUÍSTICA

Foram selecionados do arquivo do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, biópsias de pele de lesões cutâneas de 24 pacientes mantidas em blocos de parafina com diagnóstico de doença de Jorge Lobo, realizadas antes de intervenção terapêutica. O diagnóstico foi embasado no quadro clínico dos pacientes, exame micológico direto e exame histopatológico, de acordo com o laudo emitido em cada amostra.

Foram critérios de exclusão, amostras de paciente não diagnosticada com doença de Jorge Lobo, casos com co-infecção com HIV e pacientes que estivessem realizando algum tipo de tratamento no momento da biópsia.

Foram utilizados como controle, biópsias de pele de 8 indivíduos sadios sem significativa alteração histopatológica. Estas biópsias foram selecionadas do arquivo do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

5.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Os blocos de parafina dos casos de Doença de Jorge e Lobo e controle em estudo foram submetidos à microtomia com obtenção de cortes histológicos seccionadas a uma espessura de 4 μ m, colhidos em lâminas de vidro previamente preparadas com solução adesiva de 3 amino-propyltriethoxy-silane (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO/USA) . Algumas lâminas foram coradas com Hematoxilina-eosina, para que fossem realizadas as avaliações morfológicas, e outras foram submetidas

a análise imunohistoquímica a partir de anticorpos específicos contra os marcadores ICAM-1, VCAM-1, E-selectina, CD34 e podoplamina (D2-40).

5.3 IMUNOHISTOQUÍMICA

Para imunomarcção do endotélio empregamos a técnica de imunohistoquímica segundo Hsu et al. (1981) com metodologia parcialmente modificada e padronizada pelo Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Dessa forma, os cortes histológicos passaram por etapas de desparafinização em que foram incubados em estufa a 56°C por 24 horas, um banho de xilol a temperatura ambiente (TA) por 20 minutos e novamente banho de xilol a TA por 10 minutos. Posteriormente, os cortes foram hidratados em concentrações decrescentes de etanol (100%, 95%, 70%) por 5 minutos cada, lavados por 5 minutos cada em água corrente, água destilada e em tampão “fosfate buffer saline” (PBS) pH 7,4. O bloqueio de peroxidase endógena será realizado em câmara escura com três incubações em água oxigenada 3% por 10 minutos cada, e em seguida os preparados foram novamente lavados como anteriormente. A exposição antigênica, quando necessária, foi realizada por meio de calor úmido durante 20 minutos a 95°C mergulhado em tampão “Target Retrieval Solution” (Dako) pH= 9 ou pH=6 conforme padronização do anticorpo. Os cortes foram novamente submetidos à lavagem como citado anteriormente. Para bloqueio das proteínas inespecíficas, os cortes foram incubados a 37°C em solução de leite desnatado 10% (Molico – Nestlé) por 30 minutos em água corrente, água destilada e tampão PBS pH= 7,4 em média 5

minutos cada. Em seguida, os cortes foram incubados a 4°C com anticorpo primário específico (quadro 1) ao antígeno pesquisado, diluído em solução de soro-albumina-bovina (BSA) a 1% por 12 horas.

Quadro 1- Informações características dos anticorpos primários utilizados

Anticorpo	Clone	Fabricante/código	Exposição antigênica	Diluição
Ig de camundongo anti-CD34 humano	QBEnd/10	Novocastra/NCL-L- END	Calor úmido em tampão "target retrieval solution" (DAKO) pH9	1:50
Ig de camundongo anti-D2-40 (podoplanina) humano	D2- 40	DAKO/M3619	-----	1:100
Ig de camundongo anti-CD54 (ICAM-1) humano	23G12	Novocastra/NCL-CD54-307	Calor úmido em tampão "target retrieval solution" (DAKO) pH9	1:50
Ig de cabra anti-CD106 (VCAM-1) humano	-----	R&D systems/ BBA19	Calor úmido em tampão "target retrieval solution" (DAKO) pH6	1:1000
Ig de camundongo anti-CD62-E (E-selectina)	16G4	Novocastra/ NCL-CD62-E-382	Calor úmido em tampão "target retrieval solution" (DAKO) pH6	1:50

A incubação com os anticorpos primários foi realizada 2 lavagens com tampão PBS pH=7,4 por cinco minutos cada. A metodologia de detecção e amplificação diferiu para cada anticorpo primário. Para as lâminas marcadas com o anticorpo primário anti-VCAM-1 aplicou-se o método LSAB em que incubou-se a 37°C com anticorpo secundário biotilado (Biotinilated link universal, DAKO, A/S, Dinamarca) por 30 minutos, seguida de incubação a 37°C com o complexo estreptoavidina-biotina HRP (DAKO, A/S, Dinamarca) por 30 minutos. Para as lâminas marcadas com os anticorpos primários anti-CD34, anti-ICAM-1 e anti-E-selectina aplicou-se o método polímero indireto, utilizando-se o kit Novolink

(Novocastra) em que se incubou a 37°C com anticorpo secundário por 30 minutos, seguida de incubação a 37°C com anticorpo terciário marcado com polímero ligado a peroxidase. Para as lâminas marcadas com o anticorpo primário anti-D2-40 (podoplanina) aplicou-se o método polímero indireto, utilizando-se o kit Envision (DAKO) em que incubou-se a 37°C com anticorpo secundário marcado com polímero ligado a peroxidase por 30 minutos. Após esta lavagem, a reação foi revelada com solução cromógena de diaminobenzidina (3,3'- diaminobenzidine) 0,03% acrescida de 1,2 ml de água oxigenada 3%. A intensidade de cor foi controlada ao microscópio óptico através dos controles positivos (amígdala) que acompanhou cada reação. Os preparados assim processados foram lavados em água corrente por 10 minutos e contra-corados com Hematoxilina de Harris por 15 segundos, lavados em água corrente e desidratados em etanol. A montagem das lâminas foi feita com resina Permount (FISHER scientific, Fair Lawn, USA).

5.4 ANÁLISE QUANTITATIVA DA MARCAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA

Para análise imunohistoquímica dos antígenos em todas as amostras o parâmetro consistiu na positividade da marcação, sendo consideradas positivas as células que exibiram coloração acastanhada no citoplasma. Após tratamento imunohistoquímico, os vasos imunorreativos foram analisados quantitativamente por um observador.

A análise quantitativa dos vasos imunomarcados foi avaliada pela contagem utilizando-se um retículo graduado com área de 1 cm² dividido em 10 porções de 1 mm² adaptado a ocular do microscópio óptico (Nikon Eclipse 200). As leituras foram feitas no aumento de 400x. O retículo foi posicionado em toda extensão da derme

que coincidiam com a área do retículo. Foram considerados 12 campos de forma randomizada por amostra.

Foi feita a somatória do número de vasos imunomarcados, a divisão pelo número de campos (divisão por 12) e o resultado foi dividido por 0,0625 (área do graticulo), totalizando o número de células/mm².

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação de valores quantitativos de cada grupo analisado foi feita usando testes não paramétricos, sendo usando o teste Mann Whitney para comparação entre doença e controle. Diferenças entre os grupos individuais foram consideradas significantes quando a probabilidade de igualdade era menor que 0,0001 ($p < 0,0001$) e quando a probabilidade de não haver relação era menor que 0,05. Todos os procedimentos estatísticos foram realizados utilizando o programa Graph Pad Prism versão 6.0 para Windows (Graph Pad Software, San Diego, CA).

5.6. ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA

A realização deste trabalho foi aprovada pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o protocolo de pesquisa número 191/12 atendendo as exigências da legislação brasileira, conforme as resoluções do Conselho Nacional de Saúde nº196/96 e 347/05 sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos. O presente estudo após aprovação ao Comitê de Ética obedeceu a todos os procedimentos de biossegurança.

6. RESULTADOS

6.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DA CASUÍSTICA ESTUDADA

A idade média dos pacientes foi de 52 anos, variando entre 22 anos a 89 anos, sendo 8, 33% mulheres e 91,66% homens (Tabela 1).

TABELA 1: Distribuição por sexo e idade de 24 casos de doença de Jorge Lobo

PACIENTE	IDADE	SEXO
302-98	43	MASCULINO
353-98	70	MASCULINO
382-98	28	MASCULINO
24-99	60	MASCULINO
230-99	35	MASCULINO
252-99	40	MASCULINO
530-99	65	MASCULINO
680-99	89	FEMININO
1009-99	45	MASCULINO
1207-99	85	MASCULINO
041-00	58	MASCULINO
604-00	55	MASCULINO
861-00	22	FEMININO
980-00	35	MASCULINO
1177-00	45	MASCULINO
1529-00	50	MASCULINO
1531-00	36	MASCULINO
2484-00	65	MASCULINO
2485-00	68	MASCULINO
194-01	46	MASCULINO
419-01	35	MASCULINO
1273-01	34	MASCULINO
2057-01	71	MASCULINO
868-02	58	MASCULINO

6.2 ANÁLISE ANÁTOMO-PATOLÓGICA DOS CASOS DE DOENÇA DE JORGE LOBO

Com o intuito de melhor estudar os casos selecionados para o presente estudo, obtivemos inicialmente cortes histológicos corados pela hematoxilina-eosina. Realizamos, então, uma análise, em conjunto, dos principais dados anátomo-patológicos observados.

Em nosso estudo, verificamos em todas as preparações examinadas, a grande riqueza dos parasitos com dupla membrana bem individualizada. Formas individuais e catenuladas foram observadas frequentemente, notamos também a presença de fungos vivos e mortos na lesão (figura 1).

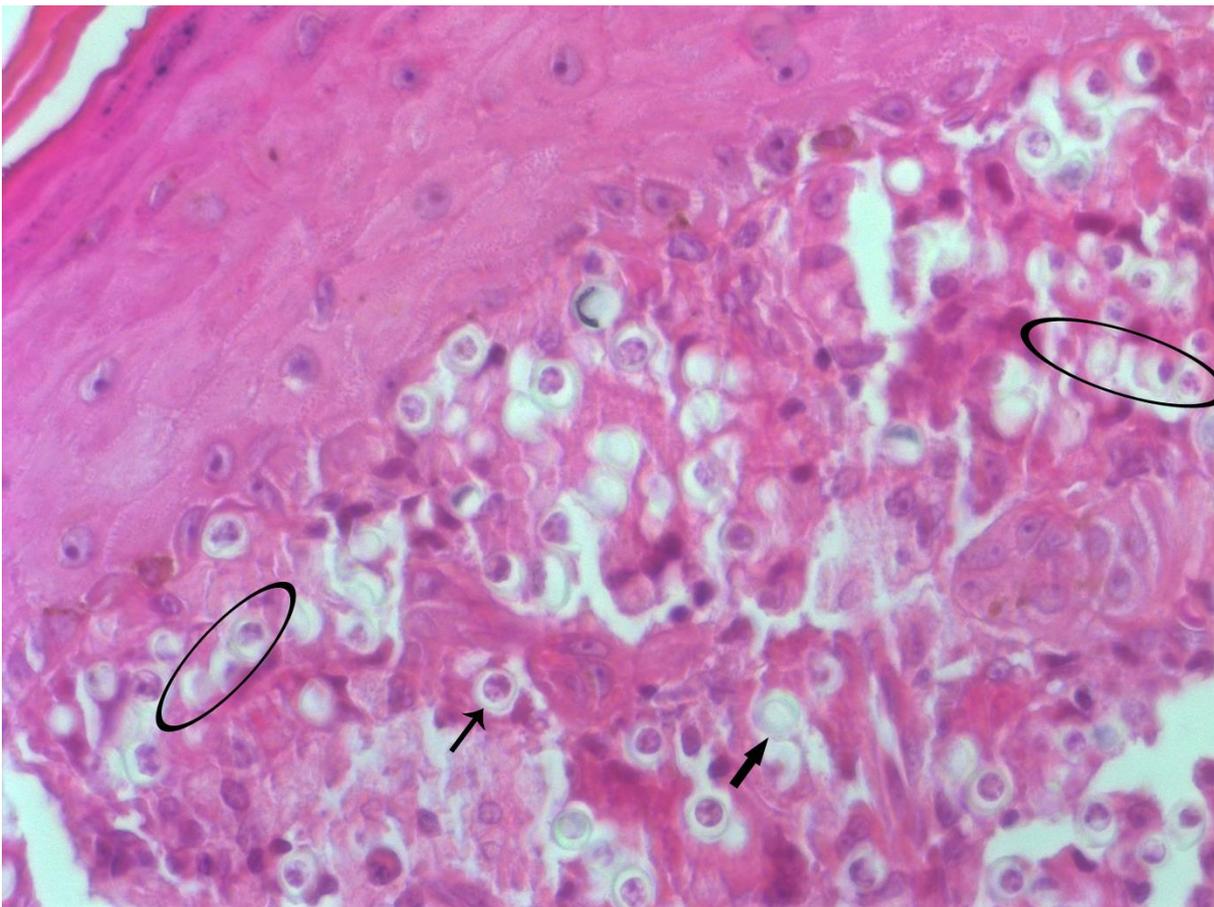


Figura 1: Micrografia da presença do fungo *Lacazia loboi* na lesão humana. Intensa presença do fungo na lesão em formas individual (setas) e catenulada (elipse). Notar presença de fungos vivos (seta fina) e mortos (seta larga). Cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina. Aumento 400x.

A análise histológica mostrou casos evidenciando epiderme retificada atrófica, acantose/hiperqueratose ou epiderme preservada (Figura 2).

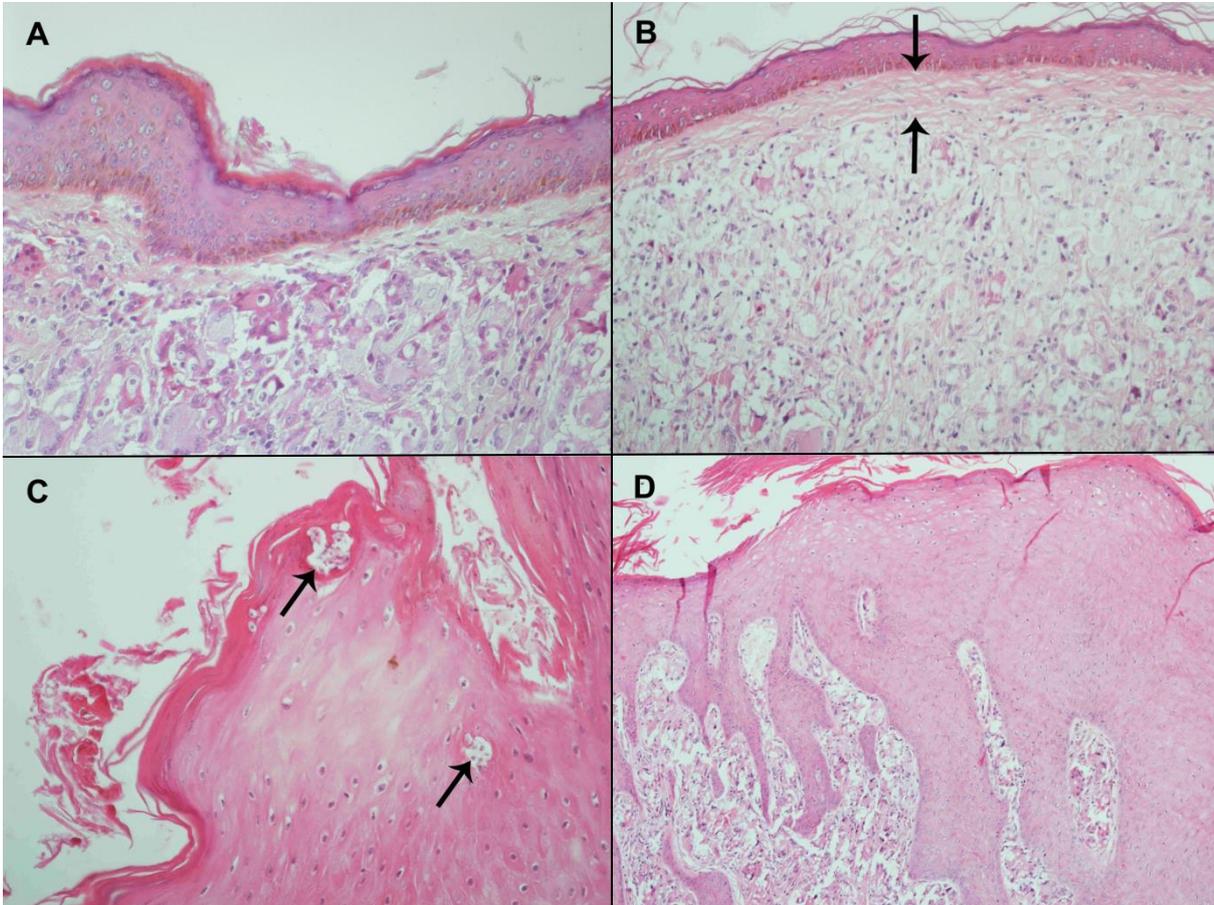


FIGURA 2: Micrografia das alterações na epiderme encontradas durante doença de Jorge Lobo. (A) Epiderme conservada. (B) Epiderme retificada atrófica com formação subepidérmica de faixa de Grenz (setas). (C) Eliminação transmigração epidérmica dos fungos. (D) Acanthose/hiperqueratose. Cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina. Aumento 200x em (A), (B) e (D). Aumento de 400x em (C).

Conforme demonstrado na tabela 3, foi encontrada epiderme retificada atrófica em 66,66% dos casos (n=16), evidenciando formação da chamada faixa de Grens, uma fina camada de colágeno subepidérmica. Em menor frequência, 25% dos casos (n=6), por outro lado, observamos acantose e hiperqueratose, evento oposto de alteração da epiderme em que ocorre grande espessamento da epiderme por maior quantidade de células na camada espinhosa (acantose) e na camada

córnea (hiperqueratose). Em algumas lesões foi observado processo de eliminação transepidérmica do fungo. Em 8,33% dos casos (n=2), ainda, observamos aspecto preservado da epiderme.

Tabela 3: Distribuição dos aspectos histológicos da epiderme na lesão de pacientes com doença de Jorge Lobo

Presença de características histológicas	Aspectos histopatológicos da epiderme			
	Epiderme atrófica	Epiderme retificada	Acantose/ Hiperqueratose	Epiderme conservada
%	66,66		25	8,33
N	16		6	2

A observação histológica da derme mostrou fundamentalmente em todos os casos intensa e maciça infiltração de macrófagos, com presença de macrófagos finamente granular, formação de células gigantes sem formação de granuloma, com esparsa presença de linfócitos. Encontramos presença de corpos asteróides em dois casos. Em algumas lesões observamos presença de plasmócitos e eosinófilo (figura 3).

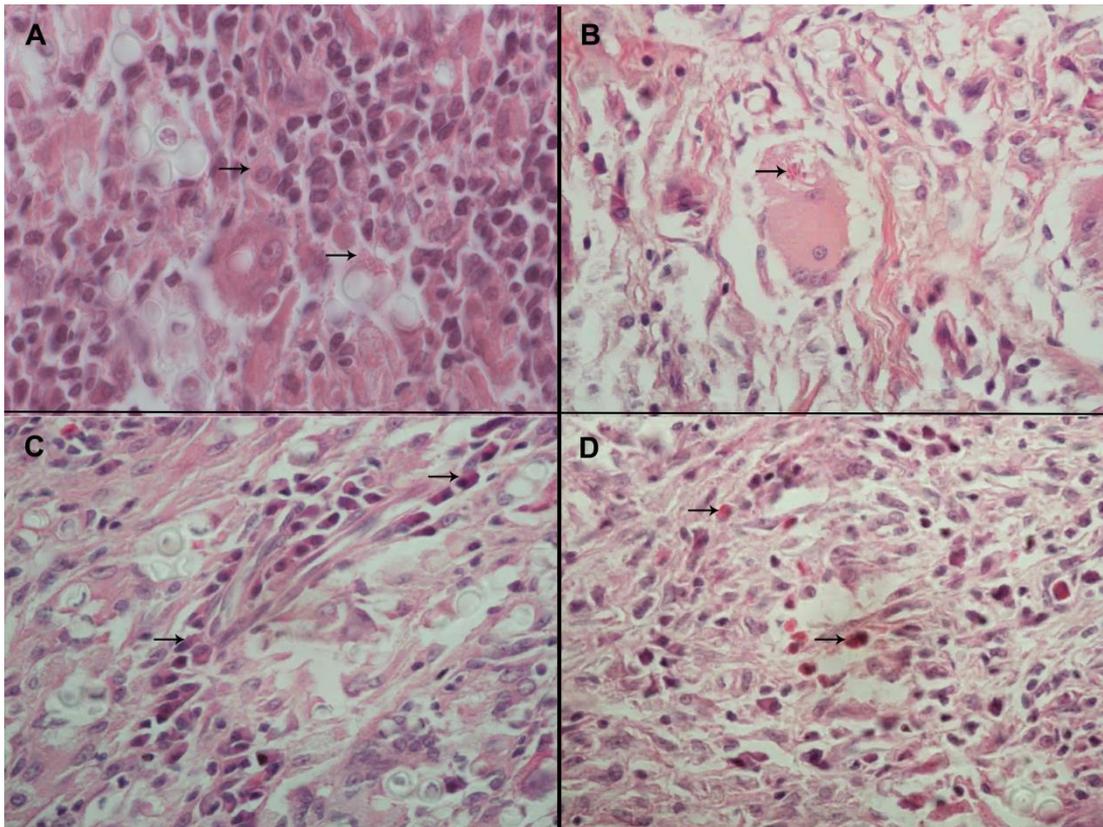


FIGURA 3: Micrografia mostrando o infiltrado de células na derme durante doença de Jorge Lobo. (A) Infiltrado rico em macrófagos, com presença de macrófagos finamente granular (seta), células gigantes e raros linfócitos. (B) Célula gigante contendo em seu interior corpos asteroides. (C) Presença de plasmócitos. (D) Presença de eosinófilo. Cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina. Aumento: (A) 630x e (B), (C) e(D) 400x.

Na tabela 4, a análise da derme mostrou que macrófagos finamente granulados estiveram presentes em quantidade rara em 37,5% (n=9), moderada em 33,33% (n=8), intensa em 16,66 (n=4) e apresentaram-se ausentes em 12,5% (n=3). A formação de células gigantes foi observada em todos os casos, estando em presença rara em 41,66% (n=10), moderada em 29,16% (n=7) e intensa em 16,66% (n=4). Formação de corpos asteroides foram observados em 2 casos. O infiltrado de linfócitos, em geral, foi baixo variando predominantemente entre raro e moderado, sendo observado presença rara em 41,66% (n=9), moderada em 45,66 (n=11) e

ausentes em 12,5% (n=3). Em menor frequência observou-se eosinófilos, plasmócitos e em um caso houve presença de neutrófilo. Eosinófilos estiveram presentes de forma rara em 16,66% (n=4), moderada em 4,16% (n=1) e ausente em 79,16% (n=19). Plasmócitos foram predominantemente ausentes em 83,33% (n=20) dos casos, sendo detectado presença rara em 4,16% dos casos (n=1), moderada em 8,33% (n=2) casos e intensa em 4,16% (n=1). Presença de quantidade moderada de neutrófilos foi observada em apenas 4,16% (n=1) dos casos. Observou-se fibrose moderada em 37,5% (n=9) dos casos e presença de fibras colágenas em 33,33% (n=8).

Tabela 4: Distribuição do infiltrado celular na lesão de pacientes com doença de Jorge Lobo

Infiltrado celular	Ausente		Raro		Moderado		Intenso	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Macrófagos	-	-	-	-	-	-	24	100
Macrófagos finamente granular	3	12,5	9	37,5	8	33,33	4	16,66
Células gigantes	-	-	10	41,66	7	29,16	7	29,16
Linfócitos	3	12,5	10	41,66	11	45,66	-	-
Eosinófilos	19	79,16	4	16,66	1	4,16	-	-
Plasmócitos	20	83,33	1	4,16	2	8,33	1	4,16
Neutrófilo	23	95,83	-	-	1	4,16	-	-

Legenda: N – número de casos % - percentual

6.3 DENSIDADE MICROVASCULAR

A densidade microvascular sanguínea e linfática foi determinada por meio da marcação imunohistoquímica dos antígenos endoteliais CD34 (pan-endotelial) e D2-40 (endotélio linfático) (Figura 4).

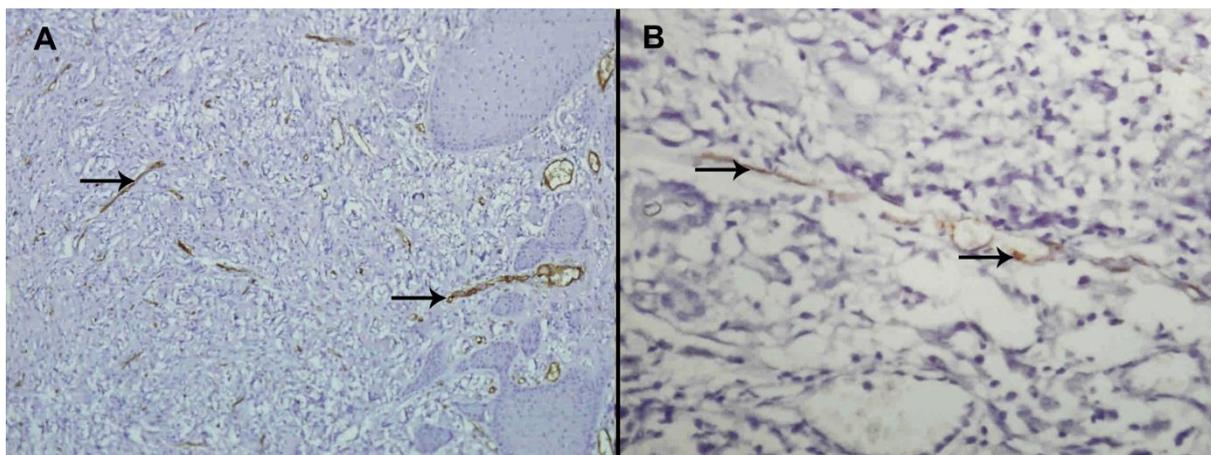


FIGURA 4: Micrografia da marcação imunohistoquímica de vasos da microvasculatura na lesão durante doença de Jorge Lobo. (A) marcação do antígeno CD34 (setas), evidenciando o endotélio dos vasos. (B) marcação do antígeno podoplanina (D2-40) (setas) específico do endotélio linfático. Aumento: (A) 100x (B) 400x.

Inicialmente avaliamos a marcação total vasos endoteliais das lesões e comparamos com pele normal. Verificamos uma redução do número de vasos nas lesões dos pacientes. A densidade de vasos sanguíneos foi de 66, 22 (\pm 20, 65) vasos /mm² na lesão dos pacientes e de 177, 66 (\pm 64,5) vasos /mm² nas amostras de pele normal (figura 5).

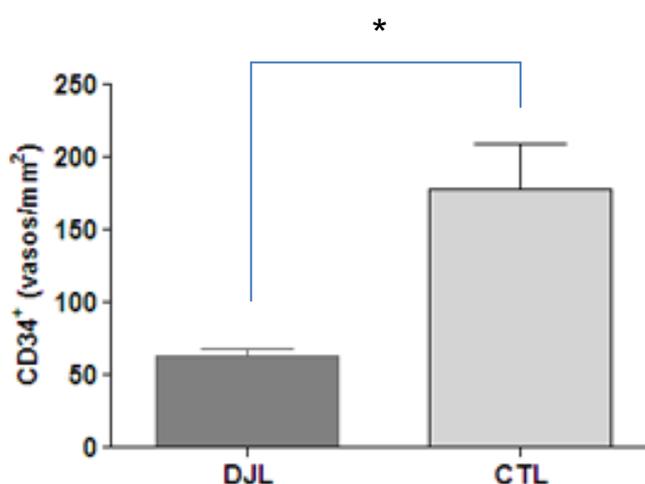


FIGURA 5: Densidade total de vasos na lesão durante doença de Jorge Lobo. * $p < 0,05$ em comparação com o controle. DJL: grupo de casos de doença de Jorge Lobo. CTL: grupo controle.

Em seguida, avaliamos especificamente a densidade dos vasos sanguíneos e linfáticos. Os vasos sanguíneos foram detectados em todos os casos em estudo, concentrando-se na maior parte na camada papilar da derme. A quantificação imunohistoquímica mostrou que a média da densidade de vasos sanguíneos foi de 62,66 ($\pm 20,30$) vasos/mm² na lesão dos pacientes e de 169,66 ($\pm 66,38$) nas amostras de pele normal. A análise comparativa da densidade desses vasos dos casos com o grupo controle mostrou que na infecção por *Lacazia loboi* houve uma redução da densidade de vasos sanguíneos no local da lesão (figura 6A).

Os vasos linfáticos mostraram-se ainda menos presentes na lesão dos pacientes, estando ausente sua detecção em 41,66% dos casos (n=10). Nos casos em que houve a detecção dos vasos linfáticos, observamos presença na camada reticular da derme. A quantificação imunohistoquímica mostrou que a média da densidade de vasos linfáticos foi de 3,55 ($\pm 5,84$) vasos/mm² na lesão dos pacientes e de 8 ($\pm 2,17$) vasos/mm² nas amostras de pele normal. Apenas 1 caso mostrou densidade linfática em torno de 25 vasos/mm². A análise comparativa da densidade desses vasos dos casos com o grupo controle mostrou que a infecção por *Lacazia loboi* afeta a densidade de vasos linfáticos demonstrando-se reduzida no local da lesão (figura 6B).

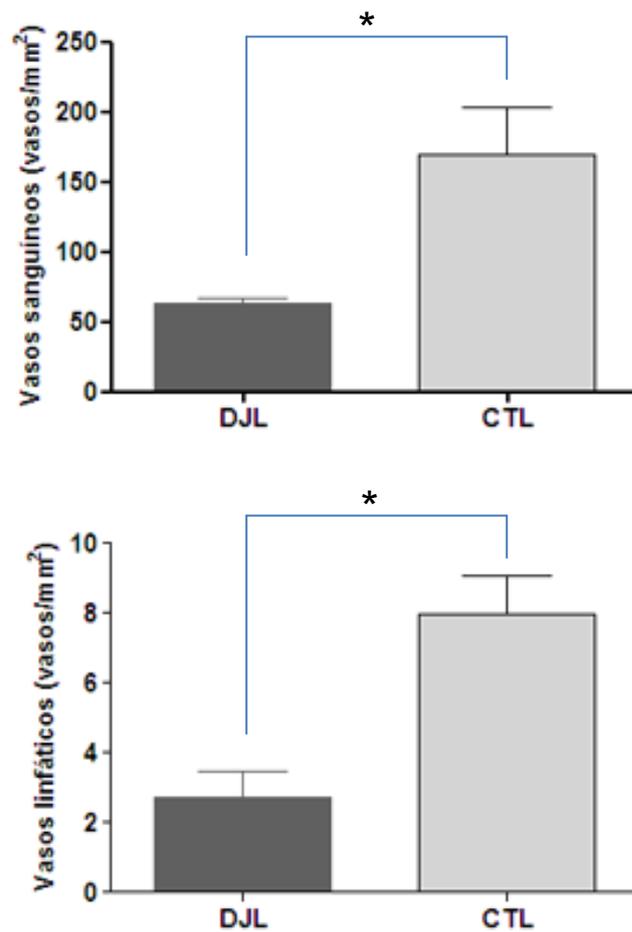


FIGURA 6: Análise da densidade de vasos sanguíneos e linfáticos da lesão na doença de Jorge Lobo. * $p < 0,05$ em comparação com o controle. DJL: grupo de casos de doença de Jorge Lobo. CTL: grupo controle.

6.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO CELULAR (MACs)

Para avaliar a ativação endotelial foram realizadas marcações dos antígenos para ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina (figura 7).

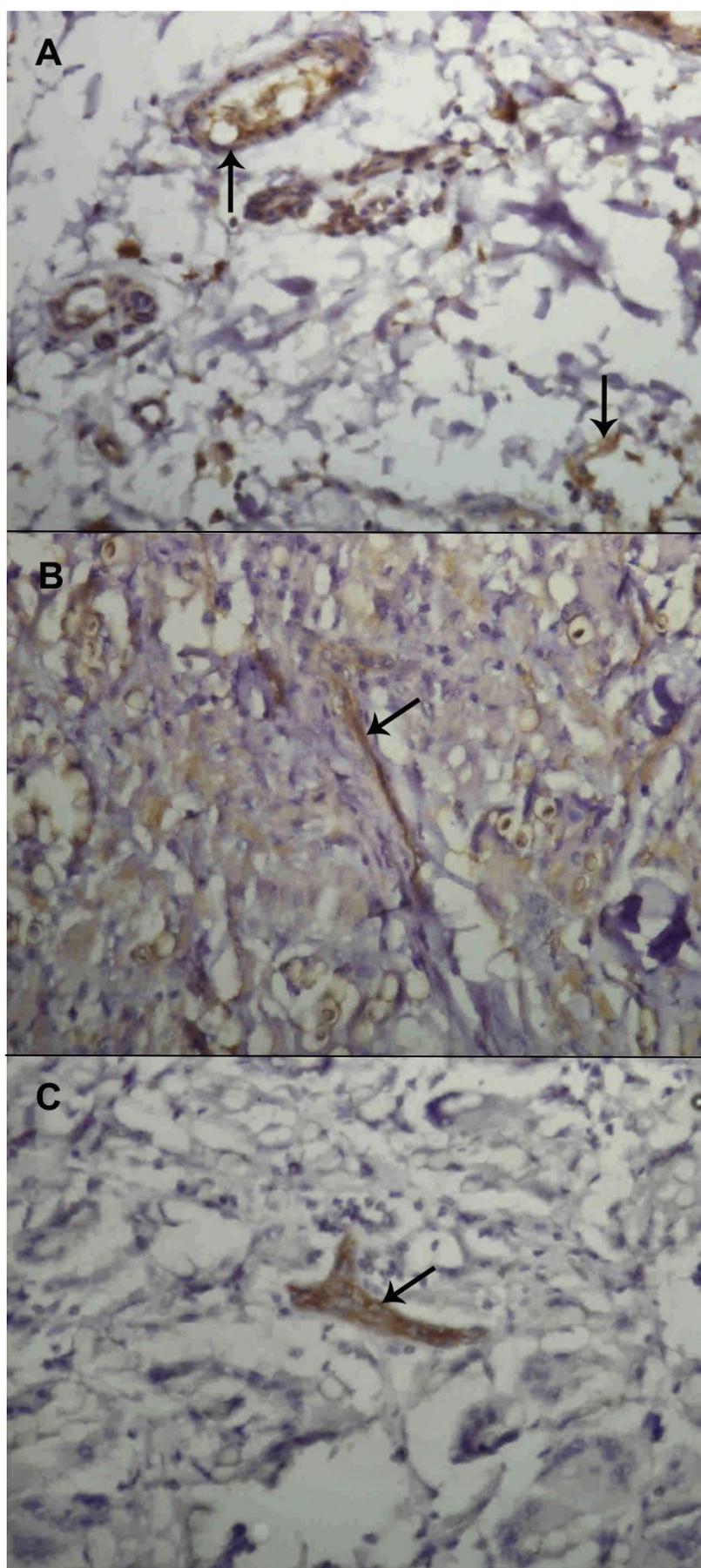


FIGURA 7: Micrografia da marcação imunohistoquímica de moléculas de adesão celular na lesão durante doença de Jorge Lobo. (A) Células endoteliais expressando ICAM-1 (B) Células endoteliais expressando VCAM-1. (C) Células endoteliais expressando E-selectina. Aumento 400x.

Detectamos significativamente maior número de vasos contendo células endoteliais que exibiram expressão da molécula de adesão ICAM-1 ($p < 0,0001$) na sua superfície quando comparado com o grupo controle. A quantificação imunohistoquímica mostrou que a média de vasos que expressam a molécula ICAM-1 foi de 27,58 ($\pm 15,32$) vasos/ mm^2 na lesão dos pacientes, enquanto que na pele normal não foram detectados vasos com células expressando essa molécula. Observamos ainda que além das células endoteliais, outros tipos celulares também evidenciaram marcação para ICAM-1 (figura 8A).

O número de vasos contendo células expressando VCAM-1 também se mostrou significativamente maior em relação ao grupo controle ($p = 0,0375$). A análise quantitativa mostrou que a lesão dos pacientes apresentou média de 7,55 ($\pm 6,2$) vasos/ mm^2 que exibiram marcação para VCAM-1, enquanto que na pele normal a média foi de 1,6 ($\pm 1,6$) vasos/ mm^2 (figura 8B).

Diferentemente, o número de vasos marcados para E-selectina não diferiu significativamente entre pele controle e infectada. 46% dos casos avaliados ($n=11$) não exibiram vasos marcados para E-selectina. A análise quantitativa mostrou que a lesão dos pacientes apresentou média de 4,66 (± 11) vasos/ mm^2 que exibiram marcação para E-selectina. A pele normal não exibiu vasos marcados (figura 8C).

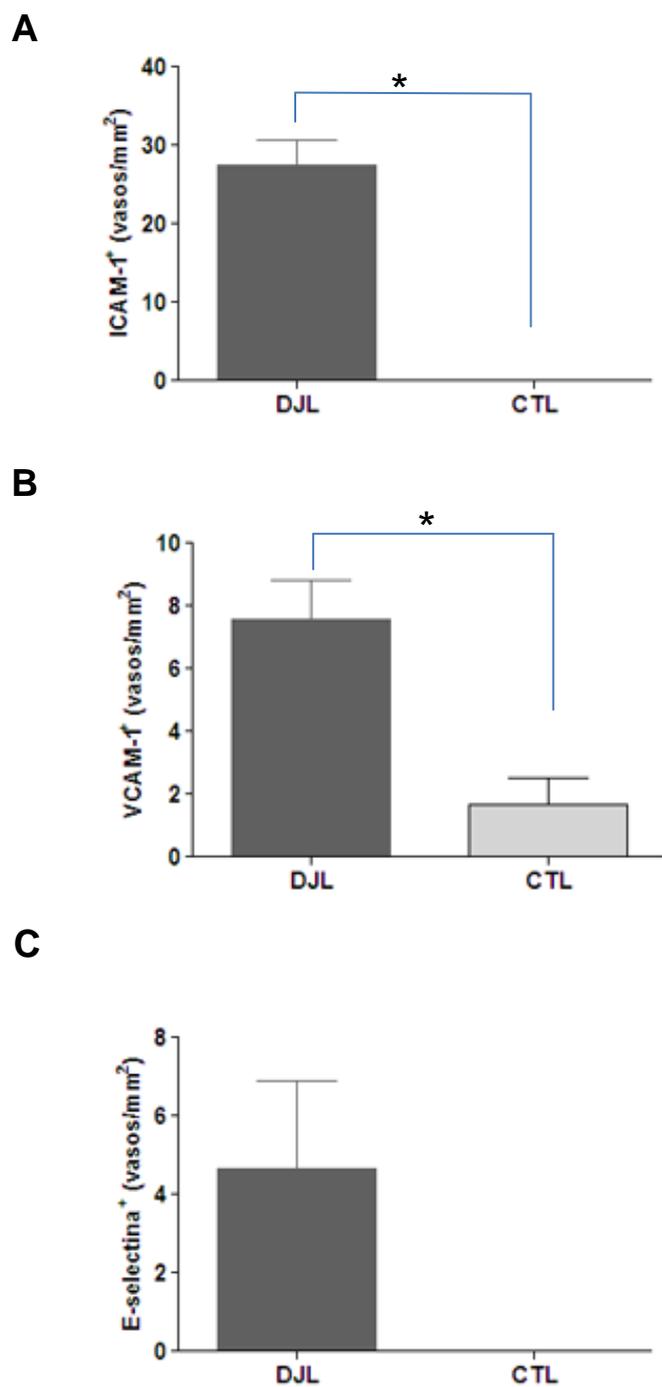


FIGURA 8: Análise da expressão de moléculas de adesão celular na lesão durante doença de Jorge Lobo. (A) vasos expressando ICAM-1. (B) vasos expressando VCAM-1. (C) vasos expressando E-selectina. * $p < 0,05$ em comparação com o controle. DJL: grupo de casos de doença de Jorge Lobo. CTL: grupo controle.

Com a finalidade de melhor analisar o grau de expressão das MACs estudadas nos vasos nos casos de doença de Jorge Lobo, determinamos o percentual de expressão de cada molécula em relação à densidade total de vasos. Verificamos que houve um maior percentual de vasos expressando a molécula ICAM-1, havendo diferença significativa quando comparada com a expressão de VCAM-1 e E-selectina (figura 9).

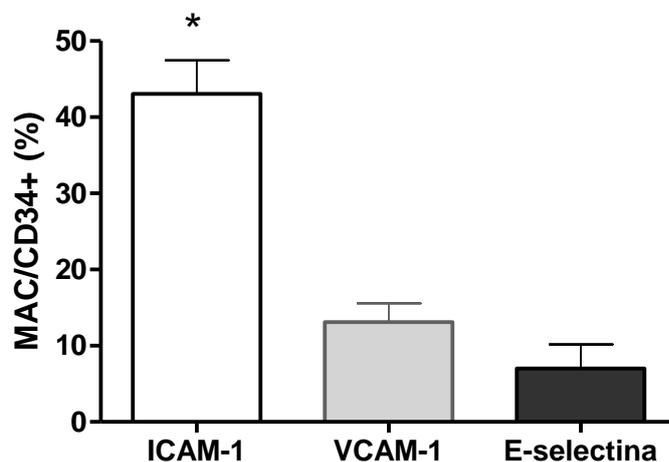


FIGURA 9: Percentual de expressão de moléculas de adesão celular na lesão durante doença de Jorge Lobo. * $p < 0,05$ em comparação com os outros grupos. %: percentual

7. DISCUSSÃO

A doença de Jorge Lobo é uma micose rara causada pelo fungo *Lacazia loboi* que acomete a pele. O processo dinâmico entre o agente patogênico e o hospedeiro resulta em uma doença inflamatória crônica, cujos aspectos fisiopatogênicos ainda não são bem compreendidos. Até onde conhecemos, o sistema vascular cutâneo ainda não havia sido estudado na doença de Jorge Lobo, sendo avaliado no presente trabalho alguns dos seus aspectos.

A utilização da técnica imunohistoquímica empregada no presente trabalho como ferramenta metodológica apresenta-se apropriada e valiosa para estudar o sistema microvascular cutâneo na doença de Jorge Lobo, uma vez que até o presente momento não se conseguiu cultivar o fungo *Lacazia loboi*, limitando as metodologias experimentais para estudo dos aspectos biológicos do fungo e da sua relação com o hospedeiro.

Os casos de doença de Jorge Lobo estudados nesse trabalho mostraram que a casuística envolve predominantemente maior percentual de pacientes do sexo masculino com idade média de 52 anos. Em um levantamento efetuado com um total de 125 casos, observou-se 92% (n=115) dos casos pertencentes ao sexo masculino e 8% (n=10) dos casos pertencentes ao sexo feminino (NAZARÉ, 1976). Essas observações corroboram com o percentual encontrado em nossos casos. Quanto à idade, segundo Baruzzi et al. (1979) há uma maior concentração de casos da doença de Jorge Lobo no grupo etário de 21 a 40 anos, considerando-se o início da doença. A idade média dos nossos casos foi baseada na idade no momento da coleta o que pode ter contribuído para uma média de idade acima de 40 anos.

Inicialmente foi realizada uma avaliação histopatológica da lesão dos casos em estudo. Observamos que na maior parte dos casos ocorreu epiderme retificada atrófica e em menor número de casos observamos evento contrário de acantose e hiperqueratose, além de casos de epiderme preservada. Essas alterações histopatológicas corroboram com os achados de Opromolla et al. (2000), que com uma casuística de 40 casos também verificaram maior ocorrência de epiderme retificada atrófica.

Na epiderme outro evento observado foi a eliminação transepidérmica do fungo. Eliminação transepidérmica representa o processo pelo qual a pele se liberta de células inflamatórias, componentes tissulares, material estranho e microorganismos (MIRANDA et al., 2010). Em outros estudos sobre doença de Jorge Lobo esse processo também foi mencionado por Pradinaud e Talhari (1996), Opromolla et al. (2000) e mais recentemente por Miranda et al. (2010).

Na derme observamos grande quantidade de fungo e de macrófagos presente na lesão, linfócitos e outros tipos celulares apresentaram-se em menor quantidade ou ausente, semelhante ao descrito em outros trabalhos (OPROMOLLA et al., 2000; BARUZZI et al., 1979).

Nossos dados revelam que na doença de Jorge Lobo há alterações microvasculares no local da lesão. Diversas doenças dermatológicas estão associadas a uma vasculatura hiperativada ou insuficiente. Entre elas, estão muitas doenças inflamatórias da pele tais como psoríase, rosácea, dermatite de contato (CARMELIET, 2003). As alterações microvasculares já foram também descritas em outras doenças infecciosas, tais como dengue, malária e febre hemorrágica

(MARTINA et al., 2009; VAN DER HEYDE et al, 2006; CONNOLLY-ANDERSEN et al, 2011).

A análise quantitativa da imunomarcagem para D2-40 e CD34 demonstrou que na lesão dos pacientes de doença de Jorge Lobo houve menos vasos sanguíneos e linfáticos por unidade de área quando comparado ao grupo controle. Isso significa que a infecção por *Lacazia loboi* parece promover uma redução na densidade de vasos no local da lesão.

O evento de regressão dos vasos ou inibição da angiogênese, entre as doenças causadas por fungo, foi observado na aspergilose pulmonar invasiva. Nesse estudo, foi demonstrado que metabólitos secundários do fungo *Aspergillus fumigatus* inibe a diferenciação e migração endotelial, bem como formação do tubo capilar *in vitro*. Além disso, foi demonstrado que a gliotoxina tem uma função específica na mediação da atividade antiangiogênica de *A. fumigatus* (BEN-AMI et al., 2009). É interessante avaliar em trabalhos posteriores se *Lacazia loboi* induz a regressão dos vasos de forma direta ou indireta.

Quanto aos vasos linfáticos, embora a inflamação possa ser caracterizada como mecanismo promotor da linfangiogênese, há situações em que não se verifica esse fenômeno (MOUTA;HEROULT, 2003). Em nosso estudo foi marcante a redução da densidade de vasos linfáticos na lesão de doença de Jorge Lobo. O vaso linfático, até o momento, tem sido pouco explorado no estudo das doenças. Sua atividade foi avaliada na psoríase, mostrando que há aumento do número de vasos linfáticos na placa psoriática (FIEDLER et al., 2008). Esses vasos também tiveram densidade aumentada na artrite no modelo murino e no homem, esse evento foi intensificado após terapia padrão com infliximab (POLZER et al., 2008). Assim como

observado na doença de Jorge Lobo, o dano cutâneo por luz UV provoca redução de vasos linfáticos que leva a formação de edema (KAJYIA et al., 2007).

A remodelagem vascular é controlada por mediadores pró e anti-angiogênico. Entre os diversos sistemas de sinalização que controlam a estabilidade vascular, destacamos a família TGF- β . Na doença de Jorge Lobo, estudos imunohistoquímicos revelaram intensa marcação para TGF- β provavelmente produzido por macrófagos, queratinócitos, células T, células dendríticas e fibroblastos (VILANI-MORENO et al., 2005; XAVIER et al., 2008). Além da ação anti-inflamatória, TGF- β exerce importantes funções no desenvolvimento vascular, sendo seus efeitos altamente dependentes do microambiente. Em baixas concentrações, TGF- β é estimulatório das funções endoteliais, enquanto em altas concentrações pode inibir a proliferação endotelial e migração atenuando estímulos angiogênicos e limitando o crescimento do vaso (MANDRIOTA et al., 1996; MURAKAMI, 2012; PARDALI et al., 2010). Portanto, a regressão dos vasos observada em nossos resultados corrobora com a intensa produção de TGF- β e riqueza de macrófagos no local da lesão descrita na literatura o qual pode ser um fator positivo para a redução da densidade de vasos.

Uma provável explicação molecular para a regressão de vasos sanguíneos e linfáticos na doença de Jorge Lobo seria a perda de matriz extracelular e degradação de fibras elásticas induzida no processo inflamatório levando ao desprendimento do endotélio (BALUK et al., 2007; SAWANE; KAJYIA, 2012).

Expandindo a interpretação dos nossos resultados, essas alterações na densidade dos vasos sanguíneos e linfáticos encontradas no presente trabalho podem explicar alguns pontos ainda obscuros no entendimento atual da patogenia

da doença de Jorge Lobo. A perda de vasos sanguíneos pode levar a hipóxia tecidual, resultando em fibrose e dependendo da intensidade da hipóxia, pode resultar em necrose, características já observadas nos exames histopatológicos dessa doença (OPROMOLLA et al., 2000). É provável que o fungo *Lacazia loboi* seja bem adaptado a ambientes com baixo teor de oxigênio, já que é encontrado no solo (GRAHL et al., 2012; RAMOS-E-SILVA et al., 2009). A perda de vasos linfáticos resulta em acúmulo de líquido intersticial devido à drenagem linfática insuficiente levando a formação de um edema e provavelmente interfere no influxo de células dendríticas e montagem de uma resposta imune adaptativa adequada. A atividade das células de Langerhans foi avaliada na doença de Jorge Lobo por marcação imunohistoquímica, não havendo diferença morfológica e do número de células quando comparado com a pele normal, o que evidencia inibição da maturação celular e da capacidade migratória das células de Langerhans (QUARESMA et al., 2010).

Outro ponto ainda mais importante, a reduzida densidade de vasos na lesão pode explicar porque mesmo com uma quantidade tão elevada de fungo no local da lesão é rara ocorrência de disseminação para outros órgãos. O registro de disseminação ocorreu em um caso na Costa Rica em um homem com lesões na perna esquerda há mais de 47 anos, associadas à linfangite e tumoração testicular (AZULAY et al., 1976).

O presente trabalho também avaliou funcionalmente a microvasculatura da pele, a partir da detecção de moléculas de adesão na célula endotelial. Sabe-se que células endoteliais microvasculares no sítio da inflamação são componentes ativos no processo inflamatório. Estas células ativadas expressam moléculas de adesão

que tem papel importante no recrutamento de células (POBER; SESSA, 2007). Nesse contexto, foi realizada detecção das moléculas de adesão ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina, sendo determinada a densidade de vasos que expressam essas moléculas.

Nossos resultados mostraram aumento significativo do número de vasos marcados para as moléculas ICAM-1 e VCAM-1, mas não de E-selectina, quando comparado com o controle, evidenciando a participação dessas moléculas no recrutamento de leucócitos no local da infecção na doença de Jorge Lobo. Esse padrão de expressão de moléculas de adesão difere do encontrado na infecção por outros fungos. *C. albicans* estimula a expressão de ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina (FILLER et al., 1996). Na infecção por *A.fumigatus*, a hifa, mas não o conídio, estimulou células endoteliais a expressar E-selectina e VCAM-1, mas não estimulou a expressão de ICAM-1 (CHIANG et al., 2008). Essa diferença pode ser reflexo da fina regulação entre essas moléculas com citocinas e quimiocinas produzidas durante a infecção interferindo diretamente no recrutamento celular e na resposta imunológica local.

Em nosso estudo não detectamos expressão significativa da molécula E-selectina nas lesões. É conhecido que E-selectina media o contato inicial de células Th1 e Th17 com endotélio ativado, mas não células Th2, estando expressa em alta densidade no lúmen da membrana plasmática de células endoteliais vasculares no sítio da inflamação (ALCAIDE et al., 2012; AUSTRUP et al., 1997; BONDER et al., 2006). Na doença de Jorge Lobo, há evidências de que a resposta imune celular está prejudicada (AZULAY et al., 1970; PECHER; FUCKS, 1988). Dessa forma,

sugerimos que o comprometimento dessa resposta poderia estar associado à baixa expressão de E-selectina encontrada nas lesões.

ICAM-1 e VCAM-1 foram as moléculas de adesão que se mostraram significativamente presentes em um maior número de vasos em relação ao controle, estando ICAM-1 expresso em um percentual mais elevado. A ligação de ICAM-1 e VCAM-1 a integrinas de superfície de leucócitos permite a firme adesão dessas células à camada endotelial dos vasos. Essas moléculas são importantes componentes moduladores do tráfego celular para os tecidos periféricos e órgãos linfoides promovendo uma resposta imune efetora. Evidências recentes, entretanto, apontam para dupla função das moléculas de adesão nas respostas imunológicas. Estudo usando o modelo de hipersensibilidade de contato examinou a adesão de células T efetora e T regulatórias (Treg) nos vasos da derme, mostrando que a adesão de células Treg foi altamente dependente de ICAM-1 e que esse processo foi acompanhado em paralelo com elevados níveis de TGF- β na pele (DEANE et al., 2012). Além disso, foi demonstrado que células progenitoras mesenquimais as quais exibem potente atividade imunossupressora, alterando a função de diferentes células imunológicas, tais como macrófagos, células dendríticas e células T, apresenta em sua superfície elevada expressão das moléculas ICAM-1 e VCAM-1 na presença de citocinas pró-inflamatórias (REN et al., 2010).

Nossos dados apontam a molécula ICAM-1 como um importante componente no recrutamento de leucócitos na doença de Jorge Lobo. Em estudo realizado com infecção experimental por *Paracoccidioides brasiliensis* foi demonstrada a participação no recrutamento de leucócitos da molécula ICAM-1 contribuindo para o infiltrado inflamatório inicial composta principalmente por neutrófilos e macrófagos

(GONZALEZ et al., 2005). Outro trabalho, avaliando o recrutamento de células T CD4+ e CD8+ no pulmão de camundongo infectado por *P. brasiliensis*, mostrou que ICAM-1 está envolvido no controle da replicação do fungo (MOREIRA et al., 2006).

No entanto, a lesão na infecção por *Lacazia loboi*, diferente da encontrada na infecção por *P. brasiliensis*, apresenta pequena quantidade de linfócito, é provável haver diferenças no balanço de citocinas e quimiocinas presentes no microambiente da infecção o que pode interferir na sua atuação no tipo celular infiltrante. Outros estudos precisam ser realizados para melhor elucidar a atuação de ICAM-1 na doença de Jorge Lobo.

Como foi comentado anteriormente, na doença de Jorge Lobo há uma intensa produção de TGF- β nas lesões. Em células endoteliais humanas, foi mostrado que o nível elevado de TGF- β inibe a expressão de E-selectina, mas não interfere na expressão de ICAM-1 e VCAM-1 (GAMBLE et al., 1993). A citocina TGF- β parece participar de forma ativa na patogenia da doença de Jorge Lobo, interferindo na densidade microvascular nas lesões, bem como na expressão da molécula E-selectina. Nossos dados dão maior suporte à importância da participação do TGF- β nessa doença. Quaresma et al. (2008) já haviam chamado atenção para a atuação do TGF- β na fibrogênese e imunodeficiência local.

Assim, os dados obtidos no presente trabalho indicam que na doença de Jorge Lobo há uma disfunção microvascular no local da lesão que refletem na evolução da apresentação clínica. A pele lesionada apresenta uma densidade reduzida de vasos que parece conter o fungo no local da infecção e interferir na recirculação adequada de células e na montagem apropriada de uma resposta adaptativa. Por outro lado, há ainda uma ativação endotelial, com importante

participação da molécula ICAM-1 e inibição da E-selectina que permite a manutenção do processo infeccioso.

Dessa forma, propomos o modelo de que *Lacazia loboi* dribla a ação do sistema imune por estimular intensa produção de TGF- β o que resulta em inibição da expressão de E-selectina, da maturação das células de Langerhans no local da infecção criando um microambiente imunossupressor com deficiente resposta imune celular. Além disso, há uma ativação endotelial principalmente evidenciada pela expressão de ICAM-1 que provavelmente associada à produção de quimiocinas é responsável pela presença marcante de macrófagos. Associado a esse processo, TGF- β induz fibrose, interferindo na densidade da microvasculatura, levando a destruição de vasos, principalmente linfático, formação de edema, hipóxia tecidual e retenção de células, bem como manutenção do fungo restrito ao local da infecção.

O presente trabalho amplia nossa visão sobre os eventos imunopatogênicos envolvidos na cronicidade da doença de Jorge Lobo, ao mesmo tempo em que aponta a necessidade de aprofundar a pesquisa nesse tema. Há uma necessidade em melhor entender o processo de redução da densidade dos vasos, melhor caracterizar as citocinas e quimiocinas produzidas, bem como possíveis reguladores positivos e negativos da angiogênese e linfogênese produzidos no microambiente local.

8. CONCLUSÕES

- A análise histopatológica dos casos de doença de Jorge Lobo mostrou diferentes alterações da epiderme, havendo ocorrência de acantose/hiperqueratose e epiderme retificada atrófica;
- A análise histopatológica dos casos de doença de Jorge Lobo mostrou grande quantidade de fungo e intenso infiltrado de macrófagos, com rara formação de células gigantes e pequena quantidade de linfócitos;
- A densidade total de vasos mostrou-se reduzida no local da infecção quando comparado com o controle;
- A densidade de vasos sanguíneos e linfáticos mostrou-se reduzida no local da infecção quando comparado com o controle;
- Na doença de Jorge Lobo houve maior número de vasos expressando significativamente a molécula ICAM-1 e VCAM-1 quando comparado com o controle;
- Na doença de Jorge Lobo não houve diferença significativa do número de vasos expressando a molécula E-selectina, quando comparado com o controle;
- Na doença de Jorge Lobo houve maior percentual de vasos expressando a molécula ICAM-1, quanto comparado com o percentual de vasos expressando VCAM-1 e E-selectina.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU WM, MIRANDA JL. Microscopia eletrônica scanning: agente da micose de Jorge Lobo. **An Bras Dermatol.** 47:115-24, 1972.
- ADAMS RH, ALITALO K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 8(6):464-78, 2007.
- ALBELDA SM, BUCK CA. Integrins and other cell adhesion molecules. **FASEB J.** 4(11):2868-80, 1990.
- ALCAIDE P, MAGANTO-GARCIA E, NEWTON G, TRAVERS R, CROCE KJ, BU DX, LUSCINSKAS FW, LICHTMAN AH. Difference in Th1 and Th17 lymphocyte adhesion to endothelium. **J Immunol.**188(3):1421-30, 2012.
- AL-DARAJI WI, HUSAIN E, ROBSON A Lobomycosis in African patients. **Br J Dermatol.** 159(1):234-6, 2008.
- ALMEIDA FP, LACAZ CS. Blastomicose "tipo Jorge Lobo". **An Fac Med Univ Sao Paulo.** 24:5-37, 1948.
- ALMEIDA FP, LACAZ CS. Blastomicose "tipo Jorge Lobo". **Rev Paul Med.** 32:161-2, 1948.
- ANDJELKOVIC AV, PACHTER JS. Central nervous system endothelium in neuroinflammatory, neuroinfectious, and neurodegenerative disease. **J Neurosci Res.** 51(4):423-30, 1998.
- ANTUNES SL, MOTTA E, DE ALMEIDA SM, GALLO ME, NERY JA, LENZI HL. Distinct patterns of microvasculature in the cutaneous lesions of leprosy. **Int J Lepr Other Mycobact Dis.** 68(2):143-51, 2000.
- AUSTRUP F, VESTWEBER D, BORGES E, LÖHNING M, BRÄUER R, HERZ U, RENZ H, HALLMANN R, SCHEFFOLD A, RADBRUCH A, HAMANN A. P- and

E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues. **Nature**. 385(6611):81-3, 1997.

AZULAY RD, CARNEIRO JA, ANDRADE LC. Blastomicose de Jorge Lobo. Contribuição ao estudo da etiologia, inoculação experimental, imunologia e patologia da doença. **An Bras Dermatol**. 45:47-66, 1970.

AZULAY RD, CARNEIRO JA, CUNHA MGS, REIS LT. Keloidal blastomycosis (Lobo's disease) with lymphatic involvement: a case report. **Int J Dermatol**. 15:40-2, 1976.

BALUK P, FUXE J, HASHIZUME H, ROMANO T, LASHNITS E, BUTZ S, VESTWEBER D, CORADA M, MOLENDINI C, DEJANA E, MCDONALD DM. Functionally specialized junctions between endothelial cells of lymphatic vessels. **J Exp Med**. 204(10):2349-62, 2007.

BANGERT C, BRUNNER PM, STINGL G. Immune functions of the skin. **Clin Dermatol**. 29(4):360-76, 2011.

BARUZZI RG, LACAZ CS, DE SOUZA FA. A história natural da doença de Jorge Lobo. Ocorrência entre índios Caiabi (Brasil Central). **Rev Inst. Med Trop Sao Paulo**. 21:303-38, 1979.

BATYCKA-BARAN A, PAPROCKA M, KRAWCZENKO A, DUŚ D, SZEPIETOWSKI JC. Increased number of circulating endothelial cells (CECs) in patients with psoriasis - preliminary report. **J Eur Acad Dermatol Venereol**. 7, 2012.

BAZAN-SOCHA S, BUKIEJ A, MARCINKIEWICZ C, MUSIAL J. Integrins in pulmonary inflammatory diseases. **Curr Pharm Des**. 11(7):893-901, 2005.

BEN-AMI R, LEWIS RE, LEVENTAKOS K, KONTOYIANNIS DP. *Aspergillus fumigatus* inhibits angiogenesis through the production of gliotoxin and other secondary metabolites. **Blood**. 114(26):5393-9, 2009.

- BONDER CS, CLARK SR, NORMAN MU, JOHNSON P, KUBES P. Use of CD44 by CD4+ Th1 and Th2 lymphocytes to roll and adhere. **Blood**. 107(12): 4798-806, 2006.
- BRITO AC. Lobomycosis. In: Tying SK, Lupi O, Hengge UR, eds. **Tropical Dermatology**. São Paulo: Elsevier; 2006. p.207-9.
- BRITO AC, QUARESMA JA. Lacaziose (doença de Jorge Lobo): revisão e atualização. **An. Bras. Dermatol**. 82 (5): 461-474, 2007.
- BUCK CA. Immunoglobulin superfamily: structure, function and relationship to other receptor molecules. **Semin Cell Biol**. 3(3):179-88, 1992.
- CAMARGO, Z. P; BARUZZI, R.G; MAEDA, S.M; FLORIANO, M.C. Antigenic relationship between *Loboa lobi* and *Paracoccidioides brasiliensis* as shown by serological methods. **Medical Mycology**, 36: 413-417, 1998.
- CARMELIET P. Blood vessels and nerves: common signals, pathways and diseases. **Nat Rev Genet**. 4(9):710-20, 2003.
- CHAPLIN DD. Cell cooperation in development of eosinophil-predominant inflammation in airways. **Immunol Res**. 26(1-3): 55-62, 2002.
- CHIANG LY, SHEPPARD DC, GRAVELAT FN, PATTERSON TF, FILLER SG. *Aspergillus fumigatus* stimulates leukocyte adhesion molecules and cytokine production by endothelial cells in vitro and during invasive pulmonary disease. **Infect Immun**. 76(8):3429-38, 2008.
- CHOI J, ENIS DR, KOH KP, SHIAO SL, POBER JS. T lymphocyte-endothelial cell interactions. **Annu Rev Immunol**. 22:683-709, 2004.
- CIFERRI R, CARNEIRO LS, CAMPOS S, AZEVEDO PC. Advance in the knowledge of the fungus of Jorge Lobo's disease. **J Trop Med Hyg**. 1956;59:214-5.

- CONNOLLY-ANDERSEN AM, MOLL G, ANDERSSON C, AKERSTRÖM S, KARLBERG H, DOUAGI I, MIRAZIMI A. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus activates endothelial cells. **J Virol.** 85(15):7766-74, 2011.
- CRAIG LE, SPELMAN JP, STRANDBERG JD, ZINK MC. Endothelial cells from diverse tissues exhibit differences in growth and morphology. **Microvasc Res.** 55(1): 65-76, 1998.
- DANESE S, DEJANA E, FIOCCHI C. Immune regulation by microvascular endothelial cells: directing innate and adaptive immunity, coagulation, and inflammation. **J Immunol.** 178(10):6017-22, 2007.
- DEANE JA, ABEYNAIKE LD, NORMAN MU, WEE JL, KITCHING AR, KUBES P, HICKEY MJ. Endogenous regulatory T cells adhere in inflamed dermal vessels via ICAM-1: association with regulation of effector leukocyte adhesion. **J Immunol.** 188(5):2179-88, 2012.
- DEANFIELD JE, HALCOX JP, RABELINK TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. **Circulation.** 115:1285-95, 2007.
- ELANGBAM CS, QUALLS CW JR, DAHLGREN RR. Cell adhesion molecules--update. **Vet Pathol.** 34(1):61-73, 1997.
- FIEDLER E, HELMBOLD P, MARSCH WC. Increased vessel density in psoriasis: involvement of lymphatic vessels in the papillary dermis. **Br J Dermatol.** 159(1):258-61, 2008.
- FILLER SG, PFUNDER AS, SPELLBERG BJ, SPELLBERG JP, EDWARDS JE JR. *Candida albicans* stimulates cytokine production and leukocyte adhesion molecule expression by endothelial cells. **Infect Immun.** 64(7): 2609-17, 1996.
- FONSECA FILHO, O., LEÃO, A. E. A. Contribuição para o conhecimento das Granulomatoses blastomycoides: agente etiológico da doença de Jorge Lobo. **Revista Médico –Cirúrgica Brasileira** 48: 147-158, 1940.

- FONSECA FILHO O. Parasitologia médica. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**; 1943. p.706.
- FUCHS J, MILBRADT R, PECHER SA. Lobomycosis (keloidal blastomycosis): case reports and overview. **Cutis**. 46:227-34, 1990.
- GABAY C. Interleukin-6 and chronic inflammation. **Arthritis Res Ther**. 8 (2):S3, 2006.
- GAMBLE JR, KHEW-GOODALL Y, VADAS MA. Transforming growth factor-beta inhibits E-selectin expression on human endothelial cells. **J Immunol**. 150(10):4494-503, 1993.
- GAVARD J. Breaking the VE-cadherin bonds. **FEBS Lett**. 583(1):1-6, 2009.
- GIRARD JP, MOUSSION C, FÖRSTER R. HEVS, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. **Nat Rev Immunol**. 12(11):762-73, 2012.
- GIRIBELA C, GENGO R, HONG V, CONSOLIM-COLOMBO F. Endothelial function and dysfunction: pathophysiology and perspectives for use in research and clinical practice. **Rev Bras Hipertens** 18(1): 27-32, 2011.
- GONZÁLEZ-GAY MA, GONZÁLEZ-JUANATEY C. Inflammation, endothelial function and atherosclerosis in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther**. 14(4):122, 2012.
- GONZALEZ A, LENZI HL, MOTTA EM, CAPUTO L, SAHAZA JH, COCK AM, RUIZ AC, RESTREPO A, CANO LE. Expression of adhesion molecules in lungs of mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Microbes Infect**. 7(4): 666-73, 2005.
- GRAHL N, SHEPARDSON KM, CHUNG D, CRAMER RA. Hypoxia and fungal pathogenesis: to air or not to air? **Eukaryot Cell**. 11(5):560-70, 2012.
- GREEN S, ROTHMAN A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. **Curr Opin Infect Dis**. 19(5):429-36, 2006.

- HATOUM OA, BINION DG, OTTERSON MF, GUTTERMAN DD. Acquired microvascular dysfunction in inflammatory bowel disease: Loss of nitric oxide-mediated vasodilation. **Gastroenterology**. 125(1):58-69, 2003.
- 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**. 39: 309-14, 2001.
- HILLYER P, MORDELET E, FLYNN G, MALE D. Chemokines, chemokine receptors and adhesion molecules on different human endothelia: discriminating the tissue-specific functions that affect leucocyte migration. **Clin Exp Immunol**. 134(3):431-41, 2003.
- 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**. 29(4):577-80, 1981.
- HUGGENBERGER R, DETMAR M. The cutaneous vascular system in chronic skin inflammation. **J Investig Dermatol Symp Proc**. 15(1):24-32, 2011.
- HUTTENLOCHER A, SANDBORG RR, HORWITZ AF. Adhesion in cell migration. **Curr Opin Cell Biol**. 7(5):697-706, 1995.
- JAMBOU R, COMBES V, JAMBOU MJ, WEKSLER BB, COURAUD PO, GRAU GE. *Plasmodium falciparum* adhesion on human brain microvascular endothelial cells involves transmigration-like cup formation and induces opening of intercellular junctions. **PLoS Pathog**. 6(7):e1001021, 2010.
- JUBELI E, MOINE L, VERGNAUD-GAUDUCHON J, BARRATT G. E-selectin as a target for drug delivery and molecular imaging. **J Control Release**. 158(2):194-206, 2012.
- KAJIYA K, KUNSTFELD R, DETMAR M, CHUNG JH. Reduction of lymphatic vessels in photodamaged human skin. **J Dermatol Sci**. 47(3):241-3, 2007.

- KARKKAINEN MJ, HAIKO P, SAINIO K, PARTANEN J, TAIPALE J, PETROVA TV, JELTSCH M, JACKSON DG, TALIKKA M, RAUVALA H, BETSHOLTZ C, ALITALO K. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. **Nat Immunol.** 5(1):74-80, 2004.
- KARPANEN T, ALITALO K. Molecular biology and pathology of lymphangiogenesis. **Annu Rev Pathol.** 3:367-97, 2008.
- KIM YW, WEST XZ, BYZOVA TV. Inflammation and oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. **J Mol Med (Berl).** 91(3):323-8, 2013.
- LACAZ CS, BARUZZI RG, ROSA MCB. Doença de Jorge Lobo. São Paulo: **USP-IPSI**; 1986.
- LIN CF, CHIU SC, HSIAO YL, WAN SW, LEI HY, SHIAU AL, LIU HS, YEH TM, CHEN SH, LIU CC, LIN YS. Expression of cytokine, chemokine, and adhesion molecules during endothelial cell activation induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1. **J Immunol.** 174(1): 395-403, 2005.
- LIU IJ, CHIU CY, CHEN YC, WU HC. Molecular mimicry of human endothelial cell antigen by autoantibodies to nonstructural protein 1 of dengue virus. **J Biol Chem.** 286(11):9726-36, 2011.
- LOBO, J. Um caso de blastomicose produzido por uma espécie nova encontrada em Recife. **Revista Médica de Pernambuco.** 1:763-775,1931.
- LO SK, BOVIS L, MATURA R, ZHU B, HE S, LUM H, TURCO SJ, HO JL. *Leishmania* lipophosphoglycan reduces monocyte transendothelial migration: modulation of cell adhesion molecules, intercellular junctional proteins, and chemoattractants. **J Immunol.** 160(4):1857-65, 1998.
- LON HK, LIU D, JUSKO WJ. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling in inflammation. **Crit Rev Biomed Eng.** 40(4):295-312, 2012.

- LOUREIRO AAP, BRITO AC, SILVA D. Micose de Jorge Lobo de localização insólita. **An Bras Dermatol.** 46:1-6, 1971.
- LOWE PM, LEE ML, JACKSON CJ, TO SS, COOPER AJ, SCHRIEBER L. The endothelium in psoriasis. **Br J Dermatol.** 132(4):497-505, 1995.
- LUGO-YARBUH A, VALERA M, ALARCÓN M, MORENO E, PREMOLI-PERCOCO G, COLASANTE C. Detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in vascular endothelium lesions of patients with localized cutaneous leishmaniasis. **Invest Clin.** 44(1):61-76, 2003.
- MABY H, HAJJAMI E, PETROVA TV. Developmental and pathological lymphangiogenesis: from models to human disease. **Histochem Cell Biol** 130:1063–1078, 2008.
- MACHADO PA. Polimorfismo das lesões dermatológicas na blastomicose de Jorge Lobo entre os índios Caiabi. **Acta Amaz.** 1972;2:93-7.
- MANDRIOTA SJ, MENOUD PA, PEPPER MS. Transforming growth factor beta 1 down-regulates vascular endothelial growth factor receptor 2/flk-1 expression in vascular endothelial cells. **J Biol Chem.** 271(19):11500-5, 1996.
- MARTINA BE, KORAKA P, OSTERHAUS AD. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. **Clin Microbiol Rev.** 22(4):564-81, 2009.
- MCEVER RP, ZHU C. Rolling cell adhesion. **Annu Rev Cell Dev Biol.** 26:363-96, 2010.
- MIGAKI G, VALÉRIO MG, IRVINE B, GARDNER FM. Lobo's disease in an Atlantic bottle-nosed dolphin. **J Amer Vet Med Assoc.** 159:578-82, 1971.
- MIRANDA, MARIO F. R. et al . Eliminação transepidérmica de parasitas na doença de Jorge Lobo. **An. Bras. Dermatol.** Rio de Janeiro, v. 85, n. 1, Feb. 2010 .

- MICHALANY J, LAGONEGRO B. Corpos asteróides na blastomicose de Jorge Lobo. A propósito de um novo caso. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. 5:33-6, 1963.
- MOREIRA AP, CAMPANELLI AP, CAVASSANI KA, SOUTO JT, FERREIRA BR, MARTINEZ R, ROSSI MA, SILVA JS. Intercellular adhesion molecule-1 is required for the early formation of granulomas and participates in the resistance of mice to the infection with the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Am J Pathol**. 169(4):1270-81, 2006.
- MOUTA C, HEROULT M. Inflammatory triggers of lymphangiogenesis. **Lymphat Res Biol**. 1(3):201-18, 2003.
- MURAKAMI M. Signaling required for blood vessel maintenance: molecular basis and pathological manifestations. **Int J Vasc Med**. 2012: 293641, 2012.
- MULLER WA. Mechanisms of transendothelial migration of leukocytes. **Circ Res**.105(3): 223-30, 2009.
- MULLER WA. Mechanisms of leukocyte transendothelial migration. **Annu Rev Pathol**. 6: 323-44, 2011.
- NAZARÉ IP. Micose de Lobo [tese]. Belém: ` Universidade Federal do Pará; 1976.
- OPROMOLLA DVA, BELONE AFF, TABORDA PRO, TABORDA VBA. Correlação clinicopatológica em 40 casos novos de lobomicose. **An. Bras. Dermatol**. 75 (4): 425-434, 2000.
- OPROMOLLA DVA, TABORDA PRO, TABORDA VBA, VIANA S, FURTADO JF. Lobomicose: relato de 40 casos novos. **An Bras Dermatol**. 74:135-41, 1999.
- OPROMOLLA DVA, VILANI-MORENO FR, BELONE AFF. A doença de Jorge Lobo e a coloração pela prata-metenamina. **An Bras Dermatol**. 74:345-9, 1999 b.

- OROZCO AS, ZHOU X, FILLER SG. Mechanisms of the proinflammatory response of endothelial cells to *Candida albicans* infection. **Infect Immun.** 68(3):1134-41, 2000.
- PANIZ-MONDOLFI, A., TALHARI, C., SANDER HOFFMANN, L., CONNOR, D. L., TALHARI, S., BERMUDEZ-VILLAPOL, L., HERNANDEZ-PEREZ, M. AND VAN BRESSEM, M. F. Lobomycosis: an emerging disease in humans and delphinidae. **Mycoses**, 55: 298–309, 2012.
- PAPADAVID E, DALAMAGA M, KAPNIARI I, PANTELIDAKI E, PAPAGEORGIU S, PAPPA V, TSIRIGOTIS P, DERVENOULAS I, STAVRIANEAS N, RIGOPOULOS D. Lobomycosis: A case from Southeastern Europe and review of the literature. **J Dermatol Case Rep.** 6(3):65-9, 2012.
- PARDALI E, GOUMANS MJ, DIJKE P. Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease. **Trends Cell Biol.** 20(9):556-67, 2010.
- PHAN QT, FILLER SG. Endothelial cell stimulation by *Candida albicans*. **Methods Mol Biol.** 470:313-26, 2009.
- PECHER, S.A; CROCE, J; FERRI, R.G. Study of humoral and cellular immunity in lobomycosis. **Allergologia et Immunopathologia.** 7: 439-434, 1979.
- PECHER, S.A; FUCHS, J. Cellular immunity in Lobomycosis (Keloidal blastomycosis). **Allergologia et Immunopathologia.** 16: 413-415, 1988.
- POBER JS, SESSA WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nat Rev Immunol.** 7(10):803-15, 2007.
- PODGRABINSKA S, BRAUN P, VELASCO P, KLOOS B, PEPPER M, JACKSON D, SKOBE M Molecular characterization of lymphatic endothelial cells. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 99(25): 16069–16074, 2002.
- POLZER K, BAETEN D, SOLEIMAN A, DISTLER J, GERLAG DM, TAK PP, SCHETT G, ZWERINA J. Tumour necrosis factor blockade increases

lymphangiogenesis in murine and human arthritic joints. **Ann Rheum Dis.** 67(11):1610-6, 2008.

PRADINAUD R. *Loboa lobi*. In: Collier L, Balows A, Sussman M, eds. *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections*. New York: Oxford University Press. 585-94, 1998.

PRADINAUD R, TALHARI S. Lobomycose. In: **Encyclopedie Medico Chirurgicale**, Maladies Infectieuses. Paris: Elsevier. 8608-10:1-6, 1996.

QUARESMA JA, DE OLIVEIRA E, CARDOSO DE BRITO A. Is TGF-beta important for the evolution of subcutaneous chronic mycoses? **Med Hypotheses.** 70(6):1182-5, 2008.

QUARESMA JA, UNGER D, PAGLIARI C, SOTTO MN, DUARTE MI, DE BRITO AC. Immunohistochemical study of Langerhans cells in cutaneous lesions of the Jorge Lobo's disease. **Acta Trop.** 114(1): 59-62, 2010.

RAMOS-E-SILVA M, AGUIAR-SANTOS-VILELA F, CARDOSO-DE-BRITO A, COELHO-CARNEIRO S. Lobomycosis. Literature review and future perspectives. **Actas Dermosifiliogr.** 100 Suppl 1:92-100, 2009.

RAZAKANDRAINIBE R, PELLEAU S, GRAU GE, JAMBOU R. Antigen presentation by endothelial cells: what role in the pathophysiology of malaria? **Trends Parasitol.** 28(4):151-60, 2012

REN G, ZHAO X, ZHANG L, ZHANG J, L'HUILLIER A, LING W, ROBERTS AI, LE AD, SHI S, SHAO C, SHI Y. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. **J Immunol.** 184(5):2321-8, 2010

RODRIGUEZ-TORO G. Lobomycosis. **Int J Dermatol.** 1993;32:324-32.

- ROJAS AI, AHMED AR. Adhesion receptors in health and disease. **Crit Rev Oral Biol Med.** 10(3):337-58, 1999.
- ROMANO SJ. Selectin antagonists: therapeutic potential in asthma and COPD. **Treat Respir Med.** 4(2):85-94, 2005.
- SAWANE M, KAJIYA K. Ultraviolet light-induced changes of lymphatic and blood vasculature in skin and their molecular mechanisms. **Exp Dermatol.** 21 (1):22-5, 2012.
- SESSO A, AZEVEDO RA, BARUZZI RG. Lanthanum nitrate labelling of the outer cell wall surface of phagocytized *Paracoccidioides lobo* in human lobomycosis. **J Submicrosc Cytol Pathol.** 20:769-72, 1988.
- SESSO A, BARUZZI RG. Interaction between macrophage and parasite cells in lobomycosis. The thickened cell wall of *Paracoccidioides lobo* exhibits apertures to the extracellular milieu. **J Submicrosc Cytol Pathol.** 20:537-48, 1988.
- SESSO A, FARIA, FP, BARUZZI RG. The causative agent of Jorge Lobo's disease, the fungus *P. lobo* (= *Loboa lobo*) may be seen extracellularly tightly encircled by histiocytes: observations at the transmission and scanning electron microscopes. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo,** São Paulo. 35 (3), 1993.
- SHIAO SL, MCNIFF JM, POBER JS. Memory T cells and their costimulators in human allograft injury. **J Immunol.** 175(8):4886-96, 2005.
- SIMON SI, GREEN CE. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. **Annu Rev Biomed Eng.** 7:151-85, 2005.
- TABORDA PR, TABORDA VA, MCGINNIS MR. *Lacazia lobo* gen.nov., comb. nov., the etiologic agent of lobomycosis. **J Clin Microbiol.** 37:2031-3, 1999.
- VANBREUSEGHEN, R. Guide pratique de Mycologie médicale et vétérinaire. Paris: Masson, p. 53-55, 1966.

- VAN DER HEYDE HC, NOLAN J, COMBES V, GRAMAGLIA I, GRAU GE. A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. **Trends Parasitol.** 22(11):503-8, 2006.
- VIDAL, M.S.M; PALACIOS, S.A; MELO, N.T; LACAZ, C.S. Reactivity of anti-gp43 antibodies from *Paracoccidioides brasiliensis* antiserum with extracts from cutaneous lesions of Lobo's disease. Preliminary note. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.** 39: 35-37, 1997.
- VILANI-MORENO FR, BELONE AF, SOARES CT, OPROMOLLA DV. Immunohistochemical characterization of the cellular infiltrate in Jorge Lobo's disease. **Rev Iberoam Micol.** 22(1):44-9, 2005.
- VILANI-MORENO, F. R; SILVA, L. M. S.; OPROMOLLA, D. V. A. Evaluation of the phagocytic activity of peripheral blood monocytes of patients with Jorge Lobo's disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** 37: 165-168, 2004.
- VILANI-MORENO FR, BELONE ADE F, LARA VS, VENTURINI J, LAURIS JR, SOARES CT. Detection of cytokines and nitric oxide synthase in skin lesions of Jorge Lobo's disease patients. **Med Mycol.** 49(6):643-8, 2011.
- XAVIER MB, LIBONATI RM, UNGER D, OLIVEIRA C, CORBETT CE, DE BRITO AC, QUARESMA JA. Macrophage and TGF-beta immunohistochemical expression in Jorge Lobo's disease. **Hum Pathol.** 39(2):269-74, 2008.
- YURDAKUL P, DALTON J, BEATTIE L, BROWN N, ERGUVEN S, MAROOF A, KAYE PM. Compartment-specific remodeling of splenic micro-architecture during experimental visceral leishmaniasis. **Am J Pathol.** 179(1):23-9, 2011.

ZGRAGGEN S, OCHSENBEIN AM, DETMAR M. An important role of blood and lymphatic vessels in inflammation and allergy. **J Allergy (Cairo)**. 2013:6723-81, 2013.