



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS**

DEBORAH ABEN-ATHAR UNGER

**IMUNOEXPRESSÃO PARA CD1a EM LESÕES CUTÂNEAS NA
DOENÇA DE JORGE LOBO**

BELÉM

2009

DEBORAH ABEN-ATHAR UNGER

**IMUNOEXPRESSÃO PARA CD1a EM LESÕES CUTÂNEAS NA
DOENÇA DE JORGE LOBO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical, da Universidade Federal do Pará para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Arival Cardoso de Brito

BELÉM

2009

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)-
Biblioteca do Núcleo de Medicina Tropical**

Unger, Deborah Aben-Athar

Imunoexpressão para CD1a em lesões cutâneas na
Doença de Jorge Lobo / Deborah Aben-Athar Unger;
orientador, Arival Cardoso de Brito. - 2009

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará.
Núcleo de Medicina Tropical. Programa de Pós-
Graduação em Doenças Tropicais. Belém, 2009.

1. Lobomicrose. I. Brito, Arival Cardoso de, orient.

II. Título.

CDD: 20. ed. 616. 969

Ficha catalográfica elaborada por Valdenira de Jesus NMT/UFPA

DEBORAH ABEN-ATHAR UNGER

Imunoexpressão para CD1a em lesões cutâneas na doença
de Jorge Lobo

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical, da Universidade Federal do Pará para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Arival Cardoso de Brito

DATA DE APROVAÇÃO: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Arival Cardoso de Brito/ livre docente UFPA/orientador

Prof Dra Marília Brasil Xavier/UFPA

Prof Dra Francisca Regina Carneiro/ UEPA

Prof. Dra Edna Aoba Yassui Ishikawa/UFPA

Às minhas queridas filhas Myriam, Rivka e Hannah que são a razão da minha vida .

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder a vida, e por estar sempre presente ao meu lado.

Aos meus pais, Jacob e Cota, que me criaram com muito amor e me ensinaram todos os bons valores da vida.

Ao meu querido e amado marido Leão; pela compreensão, companheirismo, incentivo e apoio que sempre deu em todos os meus projetos .

Ao Prof. Dr. Arival Cardoso de Brito, exemplo de profissional, que além de mestre, é um grande amigo, pela orientação e confiança em todas as fases da concretização desta pesquisa, estando sempre disposto para esclarecer minhas dúvidas.

Ao Dr. Juarez Quaresma pela amizade e grande colaboração em várias fases deste trabalho, e que juntamente com a Dra Carla Pagliari realizaram os exames imuno-histoquímicos .

Aos meus amigos Clivia Carneiro, querida companheira de várias etapas da vida pessoal, acadêmica e profissional; Liliane Carneiro e Rogério Benjamin cuja amizade iniciou no curso de mestrado .

À amiga Sigalit Israel, Geraldo e Gilberto pela colaboração na organização deste trabalho.

Aos pacientes que fizeram parte deste estudo.

Aos funcionários do departamento de dermatologia da UFPA e do Núcleo de Medicina Tropical pela disponibilidade em ajudar.

RESUMO

A Doença de Jorge Lobo (DJL) é uma micose crônica causada pelo fungo *Lacazia loboi*, descrita em vários países da América do Sul, sendo que na Amazônia brasileira é se que se concentra o maior número de casos. A apresentação clínica mais comum é a de lesão queloidiana, localizada principalmente nos membros inferiores em homens que exercem atividade agrícola. O fungo pode ser identificado pelo exame micológico direto e anatomopatológico. O principal objetivo deste trabalho foi investigar o possível papel das células de Langerhans (CL) na patogênese da doença, em amostras de tecido de lesões cutâneas, usando técnica imuno-histoquímica. Foram selecionados trinta e três prontuários com os respectivos blocos parafinados das biópsias de pele de pacientes com DJL, (grupo 1) registrados no serviço de dermatologia da Universidade Federal do Pará no período de 1955 a 2005. O grupo controle foi composto de 10 blocos parafinados de pele sem doença dermatológica (grupo 2) e 42 blocos de portadores de paracoccidioidomicose(PCM) (grupo 3). Na análise dos prontuários dos pacientes, foram coletados dados em relação à idade, sexo, procedência, profissão, localização e tipo clínico das lesões . As células de Langerhans foram identificadas por imuno-histoquímica utilizando anticorpo anti-CD1a (Serotec). Os pacientes eram em sua maioria homens (84, 8%), lavradores (72, 7%) com faixa etária entre 46-65 anos, com predominância de lesões queloidianas (81, 8%), nos membros inferiores (45, 5%). O número de células positivas foi analisada estatisticamente. As CL foram visualizadas ao longo da epiderme em todas as biópsias da DJL. A morfologia e o número de células, não diferiram em relação à pele normal ($p > 0,05$), e encontravam-se aumentadas quando comparadas com as de portadores de PCM ($p < 0,05$). As células de Langerhans estavam presentes nas lesões cutâneas da DJL e na pele sem doença dermatológica de maneira similar, não sofrendo alterações numéricas ou morfológicas, diferentemente do que ocorreu na PCM. Estes resultados sugerem que na DJL os fungos provavelmente apresentam algum mecanismo escapatório, que os livram da apresentação de antígenos pelas células de Langerhans.

Palavras chave: Doença de Jorge Lobo, *Lacazia loboi*, imunologia, células dendríticas.

ABSTRACT

Jorge Lobo's disease (DJL) is a chronic infection caused by the fungus *Lacazia loboi*, endemic in South America, especially in the Brazilian Amazon region. The most common clinical presentation is parakeloidal lesion located mainly in the lower limbs in men who practice agricultural activity. The fungus can be identified by both mycological and anatomopathological examination. The main objective of this study was to investigate the possible role of Langerhans' cells (LC) in the pathogenesis of the disease in tissue samples from skin lesions, using immunohistochemical technique. Thirty-three medical records were selected with their respective paraffin blocks of skin biopsies from patients with DJL (group 1) registered in the dermatology service at the Federal University of Para in the period from 1955 to 2005. The control group consisted of 10 paraffin blocks from normal skin (group 2) and 42 blocks from patients with paracoccidioidomycosis (PCM) (Group 3). In the analysis of patient medical records data were collected regarding age, sex, origin, profession, location and clinical type of the lesions. Langerhans cells were identified by immunohistochemistry using anti-CD1a antibody (Serotec). Patients were mostly men (84, 8%), farmers (72. 7%) aged between 46-65 years, with predominance of parakeloidal lesions (81. 8%) in the lower limbs (45. 5%). The number of positive cells was statistically analyzed. The LC were visualized along the epidermis in all biopsies from Jorge Lobo's disease. The morphology and the number of cells, did not differ from normal skin ($p > 0. 05$), and was increased when compared to the PCM lesions ($p < 0. 05$). Langerhans cells were present in Jorge Lobo's disease skin lesions similarly to the way they are in normal skin, not suffering any numerical or morphological alterations, unlike what occurred in PCM. These results suggest that in DJL fungi probably present some escape mechanism of the local immune system to evade the antigen presentation by Langerhans' cells.

Keywords: Lacaziosis, *Lacazia loboi*, immunology, dendritic cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição dos pacientes com DJL quanto ao gênero.....	35
Figura 2 – Distribuição dos pacientes com DJL quanto à faixa etária	35
Figura 3 – Distribuição dos pacientes com DJL quanto à profissão	36
Figura 4 – Distribuição dos pacientes com DJL quanto à procedência	36
Figura 5 – Doença de Jorge Lobo, lesão queloidiana	37
Figura 6 – Doença de Jorge Lobo, lesão verrucosa	37
Figura 7 – Distribuição dos pacientes com DJL quanto ao tipo clínico de lesão	38
Figura 8 – Distribuição dos pacientes com DJL quanto à localização das lesões	38
Figura 9 – Doença de Jorge Lobo, localização labial	39
Figura 10 – Fotomicrografia de lesão de DJL. Células de Langerhans epidérmicas imunomarcadas com anticorpo anti CD1a. Streptavidina-biotina 200x	40
Figura 11 – Fotomicrografia de pele sem doença dermatológica . Células de Langerhans epidérmicas imunomarcadas com anticorpo antiCD1a. Streptavidina-biotina 200x.....	40
Figura 12 – Fotomicrografia de lesão de PCM. Células de Langerhans epidérmicas imunomarcadas com anticorpo anti CD1a. Streptavidina –biotina 200x	40
Figura 13 – Quantificação dos níveis de CD1a em relação a idade dos pacientes	41
Figura 14 – Quantificação dos níveis de CD1a nos grupos (1-DJL; 2-pele sem doença dermatológica; 3A-PCM com granuloma bem organizado; 3B-PCM com granuloma pobremente organizado.....	43

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Análise comparativa entre os valores de CD1a conforme às formas clínicas das lesões na DJL.....41
- Tabela 2** – Análise comparativa entre os valores de CD1a conforme a localização das lesões na DJL.....42
- Tabela 3** – Análise descritiva dos níveis de CD1a nos grupos 1; 2; 3A e 3B.....42

LISTA DE SIGLAS

APCs	Células apresentadoras de antígenos (<i>Antigen Presenting cells</i>)
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
CBM	Cromoblastomicose
CD4	Marcador de linfócitos T auxiliares (<i>Cluster of Differentiation 4</i>)
CD8	Marcador de linfócitos T supressores (<i>Cluster of Differentiation 8</i>)
CL	Célula de Langerhans
DJL	Doença de Jorge Lobo
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNCB	Dinitroclorobenzeno
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FSCMPA	Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará
H&E	Hematoxilina e Eosina.
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	Antígeno Leucocitário humano (<i>Human leukocyte Antigen</i>)
INFγ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
MHC	Complexo de histocompatibilidade molecular
DF-BE	Diacetato de fluoresceína-brometo de etídio
NK	Células <i>natural killer</i> .
NMT	Núcleo de Medicina Tropical
PAP	Peroxidade antiperoxidase
PCM	Paracoccidiodomicose
PPD	Reação a tuberculina
TCR	Receptor de antígeno da célula T
TGF β	Fator transformador de crescimento beta
TGF	Fator transformante de crescimento.
Th1	Linfócitos T auxiliares 1
Th2	Linfócitos T auxiliares 2
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UFPA	Universidade Federal do Pará

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3	REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1	DEFINIÇÃO E SINONÍMIA	16
3.2	HISTÓRICO.....	16
3.3	EPIDEMIOLOGIA	16
3.4	ETIOPATOGENIA.....	18
3.5	CLÍNICA.....	20
3.6	DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL	21
3.7	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	21
3.8	TRATAMENTO	23
3.9	IMUNOLOGIA NA DOENÇA DE JORGE LOBO.....	24
3.10	IMUNOLOGIA NAS OUTRAS MICOSES PROFUNDAS	27
3.11	CÉLULAS DE LANGERHANS E CD1a	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	TIPO DE ESTUDO E POPULAÇÃO ESTUDADA.....	31
4.2	PROCEDIMENTO DIAGNÓSTICO	31
4.3	ANÁLISE DOS PRONTUÁRIOS.....	31
4.4	TÉCNICA DE IMUNOMARCAÇÃO EM TECIDO	32
4.5	GRUPOS CONTROLES	32
4.6	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	32
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
4.8	ASPECTOS ÉTICOS	33
4.9	DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA	34
5	RESULTADOS	35
5.1	ACHADOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS.....	35
5.2	ACHADOS IMUNOHISTOQUÍMICOS.....	39
6	DISCUSSÃO	44

7 CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS.....	50
APÊNDICE.....	60
ANEXOS.....	61

1 INTRODUÇÃO

A doença de Jorge Lobo (DJL) ou lacaziose é uma micose profunda cutânea / subcutânea de evolução crônica causada pelo fungo *Lacazia loboi*. (*L. loboi*) (TABORDA et al., 1999a; BRITO, 2006). Até o momento foram totalizados 490 casos da doença, destes, 318 ocorridos no Brasil, a maioria deles na Amazônia brasileira, sendo o estado do Pará detentor de grande número de pacientes (RODRIGUEZ-TORO, 1989; RODRIGUEZ-TORO; TELLEZ, 1992; BURNS, 2000; BRITO; QUARESMA, 2007).

Compromete preferencialmente lavradores do sexo masculino que se infectam a partir de traumatismos na pele por fragmentos vegetais (BARUZZI, 1984; TALHARI, 1981; LACAZ et al., 1986) . O aspecto clínico clássico é o de lesão queloidiana marrom acastanhada localizada preferencialmente nos membros inferiores, pavilhões auriculares e membros superiores (FUCHS, 1990; AZULAY; AZULAY, 2006).

O diagnóstico é baseado no exame micológico direto e anátomo patológico, onde se observam células leveduriformes com membrana dupla refringente, isoladas, gemulantes ou em cadeias, medindo 6-12 µm de diâmetro (BARUZZI, 1979; BRITO, 2006; TALHARI, 1981). O fungo ainda não foi cultivado em meios artificiais (WOORDARD, 1972; VILANI-MORENO et al., 2003), e várias tentativas de reproduzir a doença em animais de laboratório tem sido efetuadas . O tratamento da patologia representa um desafio; já que a mesma não responde ao arsenal terapêutico existente para as micoses em geral. Quando as lesões são de pequeno tamanho, a exérese cirúrgica possibilita a cura da doença (CACERES; RODRIGUEZ-TORO, 1991; PRADINAUD, 1998).

Pecher e Fuchs (1988) sugeriram uma imunodeficiência celular em pacientes com DJL. Há poucos estudos na literatura caracterizando o perfil de resposta imune humoral e celular *in situ*, especialmente o envolvimento das diferentes células imunes nas infecções cutâneas por *L. loboi* (YATES et al., 2007) .

O papel da resposta imune na evolução de muitas doenças cutâneas

infeciosas tem sido descrito, sendo que as células de Langerhans (CL) tem grande importância (NESTLE; BURG, 1999; ROMANI et al., 2006). Estas células estão localizadas na epiderme e são CD1a positivas (CD1a+) pela imuno-histoquímica. A proteína CD1 pertence à família de glicoproteínas transmembrana, expressa em associação com a $\beta 2$ microglobulina que está relacionada com moléculas apresentadoras de antígenos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) da classe I (BIEBER et al., 1988, NESTLE; NICKOLOFF, 1995; ROMANI et al, 2008).

A estrutura das proteínas CD1 e sua expressão predominante como células apresentadoras de antígenos especializadas, engrandece a hipótese que estas proteínas representem uma terceira linha de moléculas apresentadoras de antígenos (MARTIN, et al., 1987). Estudos recentes em humanos e ratos, tem identificado células T que especificamente reconhecem antígenos lipídicos e glicolipídicos estranhos apresentados por proteínas CD1 (YATES et al., 2007, BRIGL; BRENNER, 2004).

Por ser o Brasil, em especial a região Amazônica o foco principal da DJL, é imprescindível adicionar conhecimentos sob vários aspectos da doença para um melhor entendimento e abordagem da mesma, já que no estado do Pará foram descritos muitos casos desta micose (BRITO; QUARESMA, 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a imunexpressão tecidual para células de Langerhans (CD1a+), na doença de Jorge Lobo .

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Quantificar a imunomarcção de células CD1a+ em amostras teciduais obtidas de blocos parafinados de lesões de portadores da DJL.

Traçar um perfil clínico e epidemiológico dos pacientes portadores de DJL.

Comparar os achados imuno-histoquímicos das lesões de DJL com os controles portadores de paracoccidiodomicose (PCM) e de pele de indivíduos sem doença dermatológica

Descrever a quantificação de CD1a entre as formas clínicas e as localizações das lesões na DJL.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3. 1 DEFINIÇÃO E SINONÍMIA

A doença de Jorge Lobo (DJL) é uma micose profunda cutânea/subcutânea de evolução crônica causada pelo fungo *Lacazia loboi* (TABORDA et al., 1999a; BRITO, 2006).

É também denominada blastomicose queloidiana, granuloma micótico de Lobo, blastomicose amazônica, lobomicose, lepra dos Caiabi, falsa lepra e lacaziose (LACAZ et al., 1986; SILVA, 1994; PRADINAUD; TALHARI, 1996).

3. 2 HISTÓRICO

A doença foi descrita pela primeira vez por Jorge Lobo em 1931 na cidade de Recife-PE, em paciente procedente da região amazônica (LEITE, 1967; CALDWELL et al., 1975; OPROMOLLA et al., 2000b; FUCHS et al., 1990). Em 1950, Trejos e Romero na Costa Rica diagnosticaram o primeiro caso fora do Brasil (PRADINAUD, 1998).

3. 3 EPIDEMIOLOGIA

É doença típica da região neotropical, tendo seu foco principal na Amazônia brasileira, acrescido de numerosos casos já registrados nas áreas amazônicas dos países limítrofes como Colômbia, Guiana Francesa, Suriname,

Venezuela, Costa Rica e Peru; todos inseridos no mesmo complexo biogeográfico de clima quente e úmido (temperatura de 19-34°) e elevado índice pluviométrico (RODRIGUEZ-TORO, 1989; RODRIGUEZ-TORO; TELLEZ, 1992; BURNS et al., 2000).

Um caso da doença foi reportada nos Estados Unidos, onde o paciente havia viajado para praticar rapel na Venezuela 7 anos antes de surgir a lesão no tórax, onde foi exposto à alta pressão de água nas cataratas (BURNS et al., 2000). Na Europa houve apenas um caso registrado acometendo homem que tratava golfinhos em aquário, com surgimento de nódulos no dorso da mão. (SYMMERS, 1983).

Em 1971 foi registrado o primeiro caso de lesão de DJL em golfinhos, o que leva à possibilidade da transmissão poder ocorrer no meio aquático, onde o fungo provavelmente é saprófita (CALDWELL et al., 1975; RODRIGUEZ-TORO, 1993 BURNS et al., 2000).

Há relato de sete casos da doença envolvendo 2 espécies de golfinhos; *Tursiops truncatus* e *Sotalia guianensis* que foram reportados na Flórida, costa do Texas, sul do Brasil e estuário do rio Suriname (BARUZZI et al., 1979).

Não há evidência de maior susceptibilidade à infecção em determinado grupo étnico (VILANI-MORENO et al., 2005). O período de incubação varia de 1-2 anos, podendo chegar até 7 anos como no caso do paciente americano (PECHER, 1994).

A doença acomete principalmente trabalhadores rurais que vivem em contato com a vegetação e o solo, sendo os lavradores do sexo masculino na faixa etária de 21 a 40 anos os mais acometidos, que se contaminam a partir de traumatismos na pele por fragmentos vegetais (BARUZZI et al., 1979; TALHARI, 1981; LACAZ, 1986)

Fato importante a ser ressaltado é que a doença apresentava alta prevalência entre a população indígena da tribo Caiabi, com vários casos relatados no período de 1953 a 1972, quando eles habitavam o território situado entre os rios Arinos e Teles Pires, formadores do rio Tapajós no Estado do Mato Grosso. Ao serem transferidos para o Parque Nacional Indígena do Xingu não houve aparecimento de novos casos da doença entre os indivíduos da tribo, sugerindo que

outros fatores além da predisposição genética; como hábitos de vida (pinturas corporais) e condições ambientais estejam envolvidos no aparecimento da doença (BARUZZI et al., 1979; OPROMOLLA; BARUZZI, 2005; MARCOS et al., 2005).

Não existem relatos de contágio inter-humano. Experimentalmente, Borelli realizou inoculação em voluntário humano produzindo lesão nodular de crescimento progressivo da qual foi retirado material para inocular animais, não reproduzindo a doença (TABORDA et al., 1999b). Há casos descritos de inoculação cirúrgica acidental e ainda de inoculação humana acidental atribuída ao contato com golfinhos (*Tursiops truncatus*) (BRUN, 1999; OPROMOLLA, 1999b).

Segundo Brito e Quaresma (2007), o número de casos descritos vem aumentando lentamente e segundo dados epidemiológicos, a doença tem baixa prevalência. Por se tratar de doença de evolução crônica e não ser de notificação compulsória, há a possibilidade de haver prevalência oculta.

Recente revisão realizada, totalizou 490 casos da doença, assim distribuídos no Brasil e no mundo: 318 casos no Brasil (incluindo 61 em índios Caiabi), 50 casos na Colômbia, 34 no Suriname, 23 na Venezuela, 21 na Costa Rica, 16 na Guiana Francesa, 13 no Panamá; Peru e Bolívia com 4 e 3 casos respectivamente, 2 casos no Equador e Guiana e finalmente; México, Europa, Estados Unidos e Canadá com descrição de 1 caso cada (BRITO; QUARESMA, 2007).

3.4 ETIOPATOGENIA

Em 1940, Fonseca Filho e Ára Leão isolaram o agente etiológico. *Glenosporella lobo*, *Blastomyces lobo*, *Glenosporopsis amazônica*, *Paracoccidioides lobo* e *Loboa lobo* foram denominações dadas ao patógeno (LEITE, 1967; BARUZZI et al., 1979). Taborda et al. (1999b) classificaram o fungo como *Lacazia lobo*, argumentando que as designações prévias eram taxonomicamente inválidas.

Herr et al., (2001) analisaram filogeneticamente o *L. loboi* através do seqüenciamento de seu DNA (utilizando a amplificação da subunidade 18S do DNA ribossomal e 600 pb do gene da quitina sintetase 2 do DNA genômico das células leveduriformes) e observaram que este é taxonomicamente relacionado ao *Paraccocidioides brasiliensis* e que pertence à, ordem Onygenales, juntamente com o *Blastomyces dermatitides*, *Histoplasma capsulatum* e *Emmonsia parva*.

À microscopia óptica, o fungo apresenta-se em grande quantidade sob forma arredondada ou ovalada, com parede celular espessa bem refringente e citoplasma granular ou homogêneo medindo 6-12 µm de diâmetro. O parasita se reproduz por gemulação simples e comumente se apresenta em grande número sob forma catenulada ou em rosário, com 2-8 células (LACAZ, 1986; LACAZ, 1994; HERR, 2001).

Os estudos com microscopia eletrônica revelam que o *L. loboi* apresenta sua parede celular trilaminar cuja camada externa é revestida por escamas, com vários núcleos e com seu citoplasma composto por retículos endoplasmáticos, ribossomos, mitocôndrias, vesículas e gotas lipídicas; além de serem descritas formas desprovidas de conteúdo parasitário denominadas “involutivas”; presença de fragmentos da cápsula parasitária em vacúolos de macrófagos e parasitas fagocitados (WOODARD, 1972; SESSO; BARUZZI, 1988; SESSO et al., 1993; DINIZ et al., 2001).

Os mecanismos envolvidos na suscetibilidade e resistência do hospedeiro frente ao *L. loboi* ainda não estão elucidados. Entre os diversos mecanismos sugeridos, encontra-se a constituição genética dos indivíduos (SILVA; FERASÇOLI, 2004).

Marcos et al. (2001) ao avaliar a frequência de anticorpos do complexo HLA em portadores de DJL, demonstrou uma associação entre os antígenos HLA-DQ3 e a micose.

Lacaz et al. (1986) chamaram atenção para variabilidade da resposta à infecção causada pelo fungo. Alguns pacientes manifestam precocemente a forma disseminada da doença enquanto outros apresentam lesão isolada ou localizada que assim permanecem por vezes indefinidamente.

3.5 CLÍNICA

O aspecto clínico clássico é o de lesão queloidiana dura, lisa, hemisférica marrom-acastanhada, isolada ou confluyente formando massas multilobuladas de evolução muito lenta (GROSSANS; PRADINAUD, 1979). Podem ocorrer lesões maculosas, papulosas, infiltrativas, verrucosas, ulcerosas, gomosas (SILVA et al., 1996) ou esclerodermiformes, acompanhadas de ardor e prurido (SILVA; BRITO, 1994; OPROMOLLA; BARUZZI, 2005), sendo que algumas vezes o paciente apresenta mais de um tipo de lesão (OPROMOLLA et al., 1999b; VILANI-MORENO et al., 2005). As úlceras parecem ser ocasionadas mais por traumatismos, portanto, clinicamente secundárias.

Opromolla e Baruzzi (2005) propuseram uma classificação em formas localizadas, multifocais (em um membro ou segmento de membro) e disseminadas (envolvendo regiões anatômicas distintas).

As lesões se restringem à pele e tecido celular subcutâneo, ficando geralmente restritas ao local do início da doença; podendo surgir lesões novas por contigüidade ou propagação por via linfática. Em pequeno número de casos há disseminação cutânea da doença (FUCHS et al., 1990).

Os membros inferiores são os locais mais acometidos, seguido dos pavilhões auriculares e membros superiores (BRITO, 2006; AZULAY; AZULAY, 2006). O hábito de carregar palha e madeira nos ombros talvez seja o responsável para que o pavilhão auricular seja uma localização comum das lesões, que em geral são unilaterais (LACAZ et al., 1986).

Já foram descritos casos com localizações atípicas como região nasal (PRADINAUD, 1998), malar, testicular (BRUN, 1999; CACERES; TORO, 1991), labial (LOUREIRO et al., 1971) e bolsa escrotal (RODRIGUEZ-TORO; TELLEZ, 1992).

Via de regra não há comprometimento do estado geral, a não ser nas formas disseminadas da doença quando ocorre infecção secundária de lesões

ulceradas, ocasionadas principalmente por traumatismos.

O surgimento de carcinoma espinocelular em lesões de DJL foi descrito em 2 índios Caiabis (BARUZZI et al., 1989; SAMPAIO; RIVITTI, 2007) .

Segundo alguns autores, o comprometimento dos linfonodos regionais ocorre em 10-25% dos casos (AZULAY et al., 1976). No entanto é difícil avaliar a incidência de envolvimento de linfonodos na DJL, até porque não é rotina no exame clínico do paciente a palpação dos mesmos (OPROMOLLA et al., 2003).

3. 6 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

O diagnóstico diferencial deve ser feito com quelóides verdadeiros, xantomas, sarcoidose, hanseníase virchowiana, leishmaniose anérgica difusa (NALOVIC; PRADINAUD, 1996; PRADINAUD, 1998), cromoblastomicose (CBM), paracoccidioidomicose , tuberculose cutânea, metástases cutâneas e carcinoma espinocelular (PRADINAUD, 1998; BRUN, 1999).

3. 7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Ao exame micológico direto se observam células leveduriformes com membrana dupla refringente isoladas, gemulantes ou em cadeias, medindo 6-12 µm de diâmetro (BARUZZI, 1979; TALHARI, 1981). A fita gomada é utilizada no diagnóstico da DJL assim como no de outras micoses profundas como a PCM e CBM. (MIRANDA; SILVA, 2005). O fungo até o momento não foi cultivado em meios artificiais (VILANI-MORENO et al., 2003, OPROMOLLA, 2000a).

O exame histopatológico é caracterizado por epiderme atrófica com

retificação das cristas interpapilares. Algumas vezes é possível observar no estrato córneo, por mecanismo de eliminação transepidérmica, a presença do fungo entre as escamas e escamo crostas, traduzidos clinicamente por pontos negros na pele que recobrem as lesões, achado encontrado principalmente na CBM (PRADINAUD; TALHARI, 1996; SAMPAIO; RIVITTI, 2007).

Na derme, é possível observar: faixa de Unna, vasos dilatados e neoformados, fibrose e denso infiltrado composto de linfócitos, histiócitos espumosos ricos em parasitas, células epitelióides, numerosas células gigantes dos tipos LANGHANS e corpo estranho, eosinófilos e plasmócitos (LEITE, 1967; BRITO, 2006). A reação exsudativa não é freqüente no quadro microscópico e a necrose quase sempre está ausente (VILANI-MORENO et al., 2005). O estroma é fibroplásico e apresenta granulomas formados pela coalescência de células epitelióides e multinucleadas, envolvidas e separadas por fibras colágenas, o que é melhor evidenciado pela coloração de tricrômico de Gomori (BRITO; QUARESMA, 2007). Corpos asteróides podem ser encontrados no infiltrado granulomatoso, em células multinucleadas tipo LANGHANS e de corpo estranho (MICHALANY, 1995).

Grande número de células fúngicas intra e extracelulares são vistas pela coloração hematoxilina-eosina (HE), porém estas não são iguais quanto ao seu conteúdo intra citoplasmático. Os fungos na sua maioria apresentam-se como se fossem “cápsulas vazias” que possivelmente representariam fungos inviáveis ou formas involutivas do *L. loboi*, como referem Sesso e Baruzzi (1988), quando os estudaram ultraestruturalmente. Taborda et al.(1999a) através de coloração histoquímica de Fontana-Masson, demonstraram a presença de melanina constitutiva na parede celular do fungo, que o protegeria contra o ataque de células imunes e estaria relacionado a maior resistência a agentes fungicidas e fungistáticos.

Pelo método da pratametenamida (Gomori- Grocott), os fungos são demonstrados facilmente, pois são os únicos elementos observados sobre uma coloração de fundo; contudo sua coloração não é uniforme e com freqüência se vê ao lado dos fungos pouco corados ou em locais aparentemente sem fungos, quantidades variáveis de substância granulosa argentófila que estaria relacionada com a digestão dos mesmos, e não um simples precipitado do corante durante a técnica de coloração (OPROMOLLA et al., 1999a).

O azul tripan pode ser utilizado como método de coloração da cápsula do fungo, a qual se cora de azul celeste (SAMPAIO et al., 1971).

Através da microscopia eletrônica foi verificado que as células macrofágicas estavam repletas de um material eletrodense que corresponderia à parede do fungo, corroborando com a possibilidade de que o material granuloso observado nos cortes histológicos estivesse relacionado com sua própria destruição, sendo que nos locais de maior número de fungos com “cápsula vazia” haveria maior quantidade deste material que representaria restos do parasita destruído no interior dos macrófagos (SESSO; BARUZZI, 1988; SESSO et al., 1993; BRITO et al., 1999).

Diversos autores tem tentado a inoculação do *Lacazia loboi* em animais de laboratório; no entanto, não existe um modelo animal aceito como ideal para reprodução experimental dessa micose. Foram realizadas inoculações do fungo no tecido celular subcutâneo da bolsa jugal do hamster (OPROMOLLA et al., 2000a) e em camundongos BALB/c (MADEIRA et al., 2000). Nestes últimos foi realizada a contagem do número de fungos, índice de viabilidade antes e após a inoculação, e verificado a presença de lesões macroscópicas e achados histopatológicos semelhantes ao humano podendo constituir um bom modelo experimental para o estudo da DJL, principalmente com relação às pesquisas terapêuticas.

Vários estudos tem sido realizados no intuito de determinar a viabilidade do *L. loboi* utilizando diferentes métodos de coloração como o diacetato de fluoresceína – brometo de etideo (DF-BE), azul tripan e lactofenol azul algodão; além de investigar a influência da temperatura e de diferentes soluções na sua viabilidade. Os resultados mostraram que a coloração mais sensível na determinação da viabilidade foi a DF-BE e que a temperatura seria um fator importante no crescimento do fungo, devendo variar entre 4°C à temperatura ambiente (VILANI –MORENO; OPROMOLLA, 1997).

3. 8 TRATAMENTO

O tratamento de escolha para lesões isoladas é a exérese cirúrgica,

que possibilitaria a cura da doença (CACERES; RODRIGUEZ-TORO, 1991; PRADINAUD, 1998), com margem de segurança para evitar recidivas (BARUZZI, 1979; CÁCERES; RODRIGUEZ –TORO, 1991). Instrumentos contaminados durante a cirurgia podem induzir reinfecção (PRADINAUD, 1998).

Sulfas, anfotericina B, 5- fluorocitosina, miconazol, cetoconazol e itraconazol foram utilizados não mostrando resultados satisfatórios (CUCÉ et al., 1980; OPROMOLLA, 2005).

Em 1978 Silva utilizou pela primeira vez a clofazimina na dose de 200 mg/dia por 3-6 meses e observou redução da quantidade de fungos e regressão de parte das lesões. Outros estudos mostram que quando utilizada na dose de 200-600 mg/dia proporcionou melhora parcial das lesões em cerca de 4 meses (BARUZZI et al., 1979; TALHARI, 1981).

Rosa (2003) avaliou a eficácia do itraconazol, terbinafina e terbinafina formulada com ciclodextrina no tratamento de camundongos BALB/c inoculados com o *L. loboi*, tendo observado uma discreta superioridade de eficácia com o uso da terbinafina. Em 2006, Bustamante utilizou posaconazol em paciente peruiano, com melhora das lesões.

Em suma, nenhuma das drogas mencionadas se mostrou eficaz no sentido de levar à cura definitiva da DJL com regressão ou cicatrização das lesões dermatológicas e a destruição do agente etiológico (TALHARI; NEVES, 1995). Alguns autores sugerem que um antifúngico potente combinado a um imunomodulador para melhorar o sistema imune celular seria promissor para terapêutica (PECHER; FUCHS, 1988).

3.9 IMUNOLOGIA NA DOENÇA DE JORGE LOBO

O conhecimento a respeito dos aspectos imunológicos desta micose ainda são escassos, possivelmente pelo fato de seu agente não ter sido cultivado em meios artificiais (VILANI-MORENO, 2002).

Estudos tem demonstrado que o *L. loboi* apresenta antígenos comuns com *Paracoccidioides brasiliensis*, bem como com células leveduriformes do *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cândida albicans* e a forma miceliana do *Coccidioides immitis*. Desse modo, são empregados nas avaliações sorológicas (SILVA; FERAÇOLI, 2004).

Silva et al (1968) utilizou como substrato antigênico, células leveduriformes do *P. brasiliensis* para reações de imunofluorescência indireta, onde foi verificado que ocorreu reação cruzada com soro de paciente portador da DJL em 55, 2% dos casos.

Quatorze pacientes portadores da micose foram estudados através da eletroforese e imunoeletroforese, que demonstrou na maioria, níveis normais de imunoglobulinas IgG, IgA e IgM (PECHER et al., 1979).

A presença da glicoproteína de 43KDa (GP-43) em extratos de lesões cutâneas da DJL, foi demonstrada através de provas imunoquímicas; sendo que a GP-43 é um dos antígenos dominantes do *P. brasiliensis* (VIDAL et al., 1997; VILELA et al., 2005). Estudo semelhante foi realizado por Puccia e Travassos (1991) utilizando soro de pacientes com PCM, histoplasmose e DJL através do método ELISA e reação de imunoprecipitação.

Foi demonstrado que além dos soros dos pacientes com DJL reagirem positivamente com o antígeno GP-43, também reconheciam em menor frequência e intensidade proteínas de 36 e 70 KDa (CAMARGO et al., 1998).

A imunidade celular é considerada a de maior importância na proteção do organismo contra os fungos (BARUZZI et al., 1979).

A resposta imune celular foi avaliada em pacientes com DJL usando PPD (reação a tuberculina), histoplasmina, tricofitina e candidina; além de teste de contato com dinitroclorobenzeno (DNCB), cujos resultados evidenciaram que pacientes portadores da micose apresentam uma diminuição na capacidade de resposta imune celular em relação ao DNCB que foi negativo em 83, 3% dos casos (PECHER et al., 1979).

Pecher e Fuchs (1988) avaliaram a resposta imune celular através da reação cutânea retardada à antígenos bacterianos e fúngicos (com resposta negativa variando entre 35 a 58%; exceto na reação à tuberculina que houve

positividade em 92%); sensibilização ao DNCB (onde 92% dos pacientes não tiveram reação) e rejeição a enxertos cutâneos (tempo médio de 17 dias), cujos resultados sugerem que pacientes com DJL apresentam parcial deficiência imune celular.

A composição celular do granuloma induzido pelo *L. loboi* bem como a participação da resposta imune na gênese e desenvolvimento do mesmo até o presente não é conhecida (VILANI-MORENO, 2002). Esterre et al. (1991) avaliaram 3 pacientes com DJL e observaram no infiltrado celular uma predominância de macrófagos, poucos linfócitos CD4+ e ausência de linfócitos B.

Vilani-Moreno (2002) avaliou a composição celular do infiltrado inflamatório e quantificou citocinas em sobrenadante de cultura de células mononucleares e soro sanguíneo de 15 pacientes com a micose, provenientes do estado do Acre. Os resultados revelaram que o infiltrado inflamatório era composto principalmente de histiócitos e células gigantes multinucleadas, além de grande número de fungos. A frequência de células encontradas foi a seguinte: histiócitos CD68+ > linfócitos T CD3+ > linfócitos T CD4+ > linfócitos T CD8+ > células NK CD57+ > plasmócitos CD79+ > linfócitos B CD20+; e a quantificação de citocinas mostrou ↓ IL 2 e ↑ IL4 e IL6; sugerindo que pacientes com DJL apresentam alterações no perfil de citocinas, representadas por predomínio de Th2 o que poderia alterar os mecanismos regulatórios na contenção do fungo.

Estudos envolvendo a interação hospedeiro–parasita na doença são escassos. Recentemente foi avaliada a atividade fagocítica dos monócitos sanguíneos frente ao *L. loboi*. O resultado não diferiu com o do grupo controle, demonstrando que os monócitos são hábeis em fagocitar o fungo (VILANI-MORENO et al., 2004).

Recente análise imuno-histoquímica de lesões cutâneas em 25 pacientes com DJL foi realizada, cujos resultados revelaram fraca positividade para CD68+ que é um marcador de atividade de macrófago, bem como intensa marcação para TGFβ que é uma citocina com importante efeito supressor de macrófagos e indutora de fibrinogênese e apoptose em algumas linhagens celulares. O padrão de imunomarcação para macrófagos mostrou positividade coincidente com o infiltrado inflamatório granulomatoso ao longo de toda a lesão, já a marcação para TGFβ foi

observada em áreas focais do infiltrado inflamatório (BRITO; QUARESMA, 2007; XAVIER et al., 2008).

3. 10 IMUNOLOGIA NAS OUTRAS MICOSES PROFUNDAS

Em relação a outras micoses como na CBM, estudos imunológicos tem sido realizados a fim de caracterizar a reação tecidual mediada por células em lesões cutâneas da doença, correlacionando com as diferentes formas clínicas (GIMENES et al., 2006) . Dois tipos de reações teciduais foram observadas; uma com formação de granuloma supurativo com muitas células fúngicas nas lesões representadas por placas verrucosas, com expressão de IL10, refletindo portanto perfil de resposta imune Th2, e outra; caracterizada por granuloma tuberculóide com poucos fungos em lesões atróficas, com expressão de INF γ (Th1), conseqüentemente com boa resposta imune (D' AVILLA et al., 2002).

Sotto et al., (2004) demonstraram que principalmente macrófagos, mas também células de Langerhans e dendrócitos dérmicos XIIIa+, funcionam como células apresentadoras de antígenos na CBM. Achados semelhantes foram observados na PCM (PAGLIARI; SOTTO, 2002 e 2003; PAGLIARI, 2002, GIMENES et al, 1987).

Na PCM, ocorrem diferentes modelos de resposta imune de acordo com várias formas clínicas da doença (CALISH et al., 1998; FORNARI et al., 2001; MOTA, 1985). Estudos com modelo murino experimental, mostraram dentre outros aspectos, que a ativação policlonal de células B assim como a produção de altos títulos de anticorpos específicos indicam doença progressiva; entretanto a produção de alguns tipos de imunoglobulinas como IgG2a está relacionado a imunidade protetora. Além disso, a secreção de IL12 e INF γ seriam protetores e a dominância ou a secreção precoce de IL10 e TGF β estariam relacionados a susceptibilidade (CALISH et al., 1998).

Células mononucleares de sangue periférico de pacientes com formas

aguda e crônica de PCM, produzem baixos níveis de IL2 e INF γ e altos níveis de IL 10 (BERNARD et al., 2001). Na PCM, ocorre diminuição marcante no número de células de Langerhans, quando comparado a indivíduos sadios (GIMENES et al., 1987).

Antígenos comuns entre *L. loboi* e *P. brasiliensis* podem ser detectados por meio de soro de coelho contra um antígeno metabólico do *P. brasiliensis*, usando técnica de peroxidase-antiperoxidase (PAP) (LANDMAN, 1988).

FIGUEIREDO et al. (1993) demonstraram que pacientes infectados por *P. brasiliensis* tem altos títulos de TNF, entretanto o estímulo para sua produção e o papel do mesmo no processo infeccioso é desconhecido.

3. 11 CÉLULAS DE LANGERHANS E CD1a

Desde a década passada, estudos têm evidenciado que uma variedade de células imunocompetentes com morfologia dendrítica exerciam um importante papel na resposta imune natural (HEADINGTON, 1990).

A pele possui um sistema imunológico especializado constituído de linfócitos e células apresentadoras de antígenos (APCs), que são células dendríticas, tanto na epiderme como na derme; dentre elas, as células de Langerhans (CL) (MURPHY et al., 1986, NESTLE et al., 1998, BOS; KAPSENBERG, 1986). A função mais importante das células dendríticas é a de apresentadora de antígenos.

As CL foram descritas pela primeira vez em 1868 por Paul Langerhans, em Berlim, sendo originárias da medula óssea. Correspondem 2 a 8% das células epidérmicas distribuindo-se da camada basal à granulosa, sendo encontradas em maior número na suprabasal, não estabelecendo adesão através de desmossomos com os ceratinóticos. Representam a variante epitelial das células dendríticas e ocorrem em muitos epitélios humanos e murinos, cujo o número varia de 600-1200/mm². Um adulto apresenta cerca de 2×10^9 células (ROMANI, 2008,

BANCHEREAU, 2000).

Além da epiderme, as CL são encontradas nas mucosas (nasal, oral, esofágica, vaginal, intestinal); em órgãos linfóides como baço, timo e linfonodos e na derme normal, constituindo um dos principais componentes do sistema imunológico cutâneo (ROMANI, 2006; IWASAKI, 2007).

São responsáveis pelo reconhecimento, internalização, processamento e apresentação de antígenos solúveis e haptenos presentes na epiderme.

As CL são células processadoras – apresentadoras de antígenos que, em seu estágio não ativado, tem importante ação fagocítica, internalizando antígenos e processando-os, o que provoca transformações que a fazem perder o potencial fagocítico, mas que aumentam sua capacidade apresentadora de antígeno para os linfócitos T, desse modo, produzindo uma resposta imunológica (NESTLE; NICKOLOFF, 1995; AZULAY; AZULAY, 2006).

Na microscopia óptica pode ser visualizada como uma célula de núcleo convoluto e citoplasma claro; e na microscopia eletrônica, são encontrados pequenas estruturas em forma de raquete, denominadas de grânulos de Birbeck, considerados marcadores ultraestruturais exclusivos das CL, que funcionam como fagolisossomos (STINGL et al 1980; ABBAS; LINCHTMAN, 2005).

Os grânulos de Birbeck são encontrados em maior quantidade nas CL humanas quando comparadas às murinas, e seu principal revestimento molecular é a molécula langerina/CD207 (ROMANI, 2008; STING, 1990).

Apesar de já ter sido descrita há 140 anos, somente recentemente o papel funcional das células de Langerhans *in vivo* vem sendo estudado. Não está totalmente claro se prevalece à função imunogênica ou tolerogênica. *In vitro*, são potentes indutoras de células T citotóxicas (TROMBETA; MELLMAN, 2005).

Recentemente um novo tipo de células dendríticas apresentadoras de antígenos tem sido identificadas na derme de humanos e murinos. São chamadas de células dendríticas dérmicas, que estão em maior número que as células de Langerhans epidérmicas e expressam baixos níveis de CD1a, que é um marcador fenotípico das CL (NESTLE et al, 1994; HEADINGTON; CERIO, 1990, NESTLE; BURG, 1999).

Dentre os marcadores de superfície das CL, está o CD1a que é uma molécula de 49KD da família da classe I do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) associada a β 2 microglobulina, cuja principal função é a de apresentação de antígenos à alguns linfócitos (BIEBER et al., 1988, BRIGL; BRENNER, 2004). Além da apresentação de peptídios associados ao MHC, há mais um sistema de apresentação de antígenos especializados em apresentar antígenos lipídicos. A molécula não polimórfica semelhante à classe I CD1 é expressa em várias APCs e epitélios e apresenta antígenos lipídicos à populações incomuns de linfócitos T não restritivos ao MHC (MARTIN et al., 1987).

Estudos com linhas clonadas derivadas de linfócitos T indicam que várias células podem reconhecer antígenos lipídicos apresentados por CD1. Estas incluem linfócitos T CD4 +, CD8+, CD4- e CD8- expressando o TCR $\alpha\beta$ tão bem quanto $\gamma\delta$ (ABBAS; LINCHTMAN, 2005).

Um subgrupo de linfócitos T expressam marcadores de células NK (*natural killers*), chamadas NK-T e reconhecem lipídios associados a CD1. No entanto, não se sabe se as respostas restritas a CD1 contra os antígenos lipídicos são componentes importantes da defesa do hospedeiro contra os microorganismos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4. 1 TIPO DE ESTUDO E POPULAÇÃO ESTUDADA

Realizou-se um estudo transversal prioritariamente descritivo de caráter retrospectivo. Foram incluídos 33 casos de doença de Jorge Lobo (grupo 1), atendidos no ambulatório do Serviço de Dermatologia do Hospital Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará (FSCMPA) / Universidade Federal do Pará (UFPA), no período de 1955 a 2005.

4. 2 PROCEDIMENTO DIAGNÓSTICO

Foi feita análise do material incluso em parafina proveniente de 33 pacientes com idade entre 25-80 anos de ambos os sexos. O diagnóstico havia sido confirmado pelo exame histopatológico e a identificação do agente no tecido, seguindo protocolo de Bancroft, 2007

4. 3 ANÁLISE DOS PRONTUÁRIOS

Foi realizada a revisão dos prontuários dos pacientes para a coleta de dados em relação à idade, sexo, procedência, atividade profissional, localização de apresentação clínica das lesões (APÊNDICE).

4.4 TÉCNICA DE IMUNOMARCAÇÃO EM TECIDO

A técnica imuno-histoquímica para caracterizar a ativação tecidual de CD1a nas células, seguiu o protocolo original descrito por Hsu et al em 1981. A reação imunohistoquímica foi realizada utilizando o anticorpo anti-CD1a (Serotec), através do método de estreptavidina-biotina. Como cromógeno foi utilizada a 3, 3 diaminobenzidina (Sigma) e os cortes foram contracolorados com hematoxilina (ANEXO A). Para análise quantitativa das células positivas, foi utilizado um graticulo padrão com subdivisão 10x10 em uma área de 0, 0625 mm² (aumento de 400X). As células foram avaliadas para determinar a fração de área epidérmica com positividade para CD1a. A fração de área epidérmica foi obtida através da divisão entre o número de pontos na imunomarcacão positiva (numerador) pelo número de pontos totais sobre a epiderme (denominador)

4.5 GRUPOS CONTROLES

Os grupos controles foram constituídos por 10 blocos parafinados de biópsias de pele procedentes de indivíduos sem doença dermatológica (grupo 2) e 42 blocos provenientes de biópsias de lesões cutâneas de paracoccidiodomicose (grupo 3) sendo este último subdividido em grupo 3A (n=22) onde os granulomas apresentavam-se bem organizados e o 3B (n=20) com granulomas pobremente organizados.

4.6 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram selecionados os blocos com melhor estado de conservação e quantidade adequada de fragmento cutâneo. Foram excluídos os blocos que após o

processamento mostraram-se inadequados para análise.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados foram estruturados em um banco de dados no programa Microsoft Excel 2007, no qual também foram confeccionados tabelas e gráficos para representação dos dados. Posteriormente foram analisados nos programas Graph Pad Prism versão 3.00 e Bioestat 5.0 para a geração de resultados estatísticos que comprovassem a associação de variáveis pertinentes ao estudo, considerando o intervalo de confiança (IC) 95% e nível α 5% (p -valor \leq a 0,05)

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

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

A correlação linear de Pearson foi utilizada para verificar a associação linear entre os níveis de CD1a e a idade da doença que foi medida através do grau e direção do coeficiente de correlação linear (r). O teste de Mann-Whitney foi usado para comparar os níveis de CD1a entre os grupos.

4.8 ASPECTOS ÉTICOS

O trabalho foi submetido ao parecer do comitê de ética de projeto de pesquisa envolvendo seres humanos do Núcleo de Medicina Tropical (NMT), atendendo a todas as exigências da resolução 196/96-CNS/MS, e foi considerado

aprovado por este comitê, sob o número do protocolo 044/2006 – CEP/NMT.

4.9 DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

Para obtenção de fotomicrografias foi utilizado um sistema CARL ZEISS composto de microscópio binocular e um sistema automático de fotografia. A câmera utilizada foi *Canon power shot A620*.

Para as fotos clínicas foi utilizada a câmera Nikon Coolpix de 5 Megapixels que foram cedidas pelo Prof. Dr. Arival Cardoso de Brito.

5 RESULTADOS

5.1 ACHADOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS

Dos 33 pacientes estudados, 84,8% eram do sexo masculino (Figura 1), com predomínio da faixa etária de 46 a 65 anos com 51,5% dos casos (Figura 2), agricultores (72,7%) (Figura 3), e procedentes principalmente do nordeste paraense (51,5%) (Figura 4).

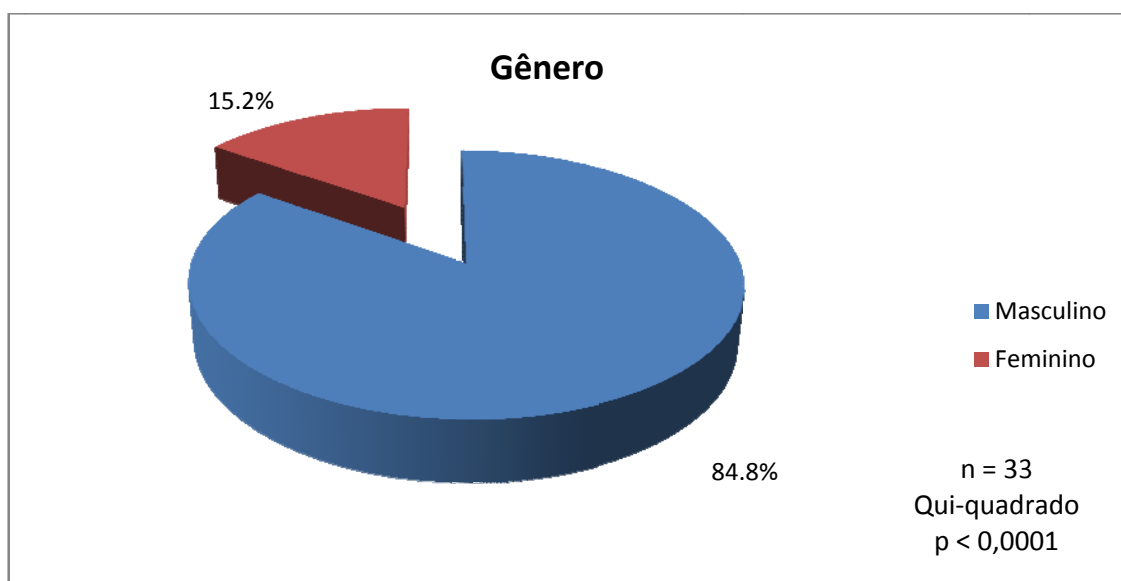


Figura 1 – Distribuição dos pacientes com DJL quanto ao gênero
Fonte : Protocolo de pesquisa (2009)

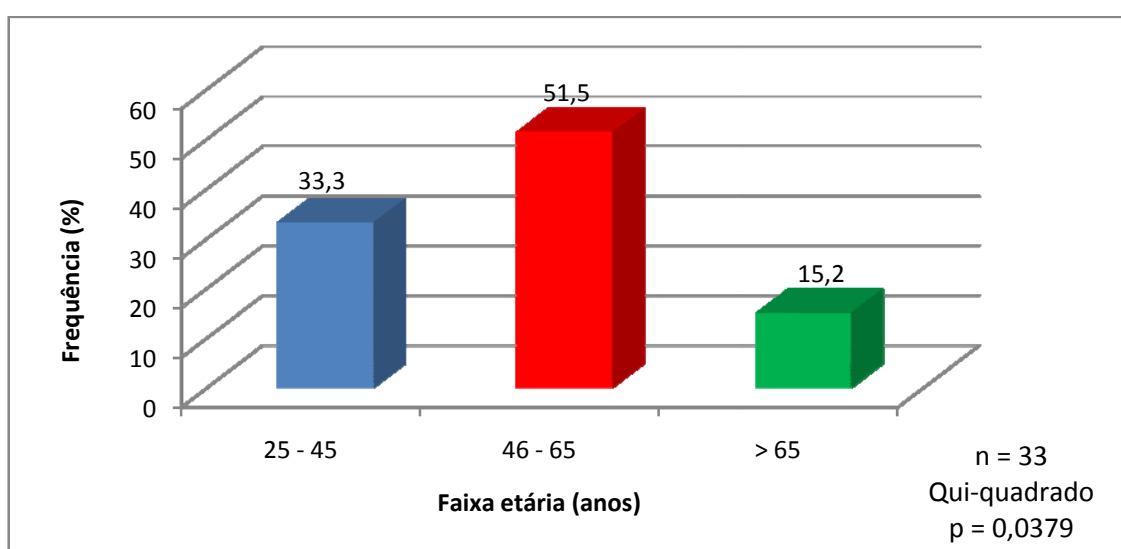


Figura 2 – Distribuição dos pacientes com DJL quanto a faixa etária
Fonte: Protocolo de pesquisa (2009)

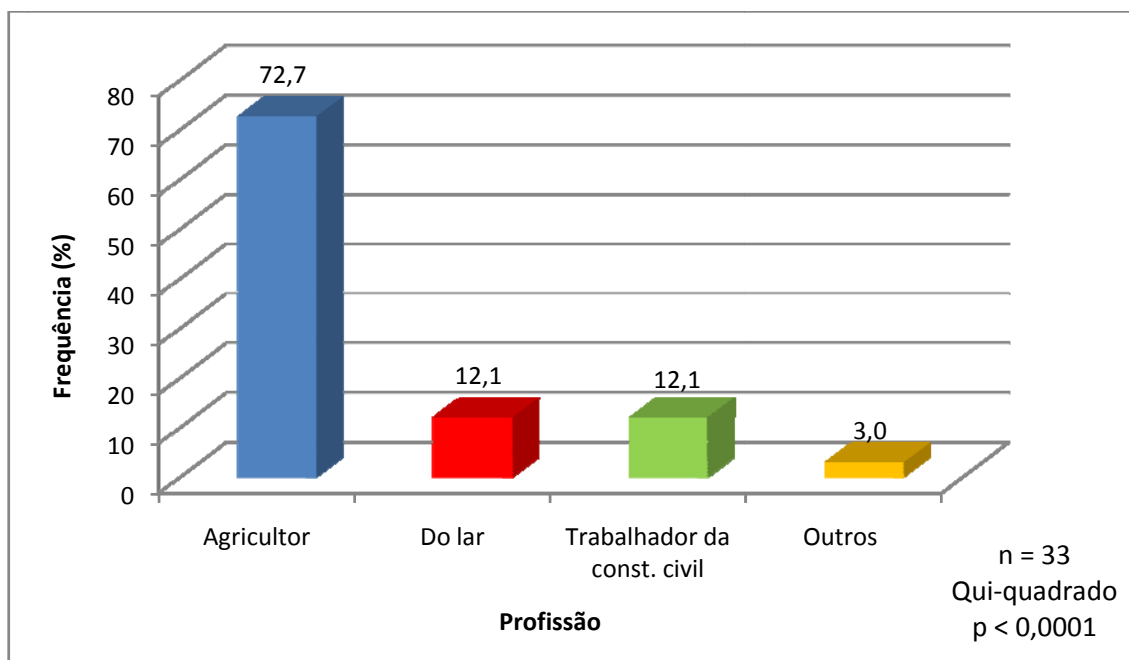


Figura 3 – Distribuição dos pacientes com DJL quanto à profissão
Fonte: Protocolo de pesquisa (2009)

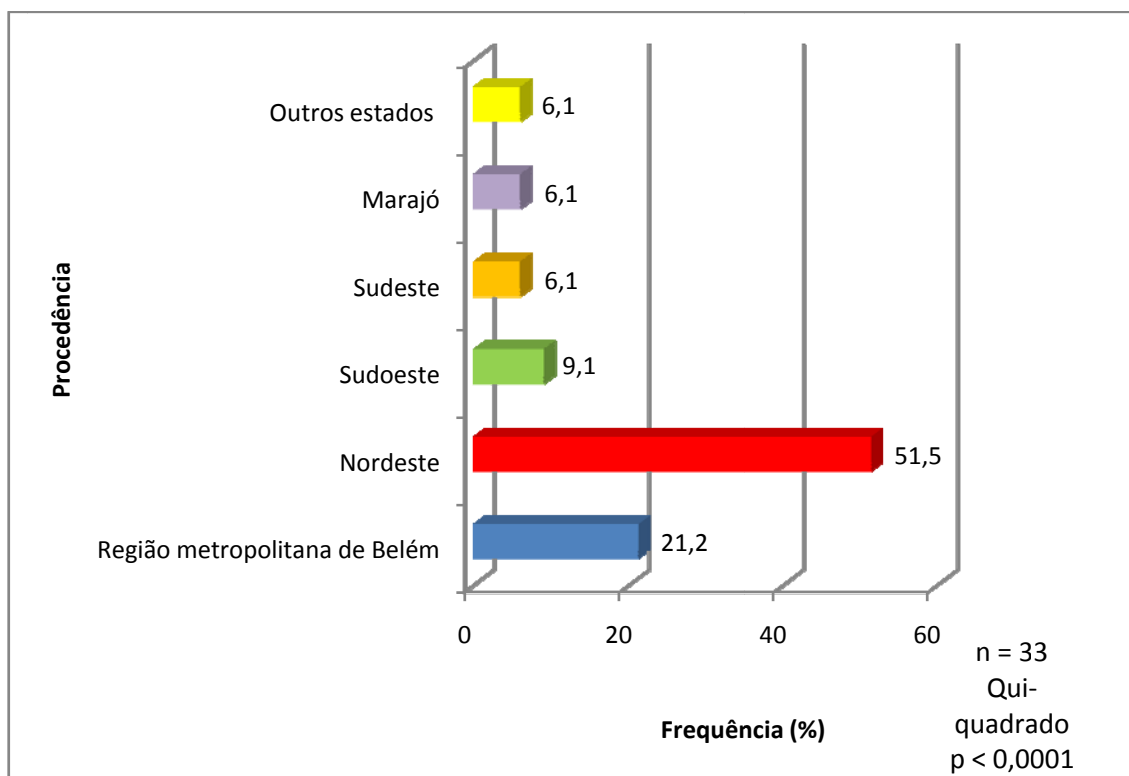


Figura 4 – Distribuição dos pacientes com DJL quanto à procedência
Fonte: Protocolo de pesquisa (2009)

Quanto a apresentação clínica, a forma queloidiana (Figura 5) foi a predominante com 81, 8% (27) dos casos, seguida pela forma verrucosa (Figura 6) em 18, 2% (6) dos casos (Figura 7).



Figura 5: Doença de Jorge Lobo, lesão queloidiana
Cortesia do Prof. Dr. Arival de Brito

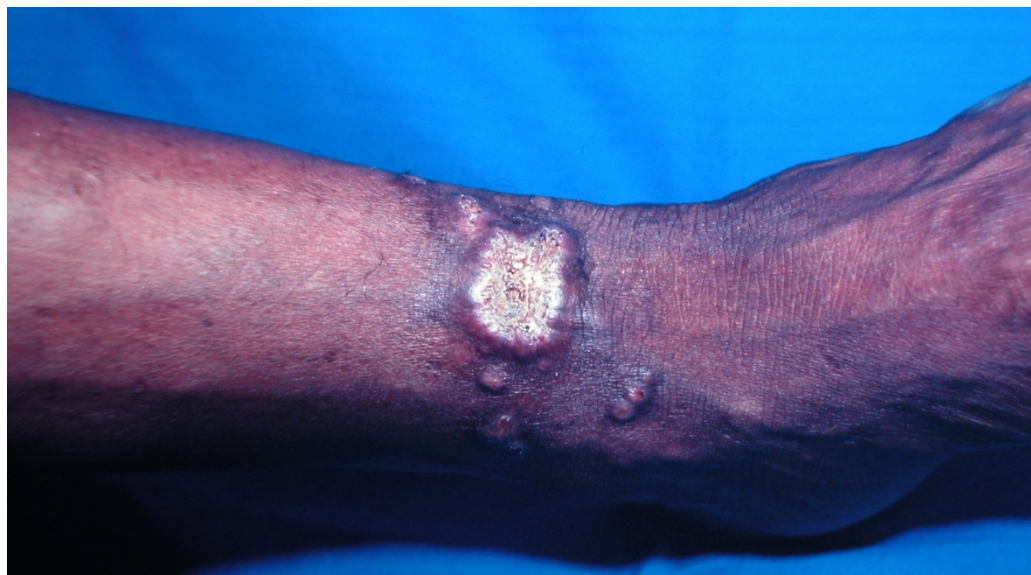


Figura 6: Doença de Jorge Lobo, lesão verrucosa
Cortesia do Prof. Dr. Arival de Brito

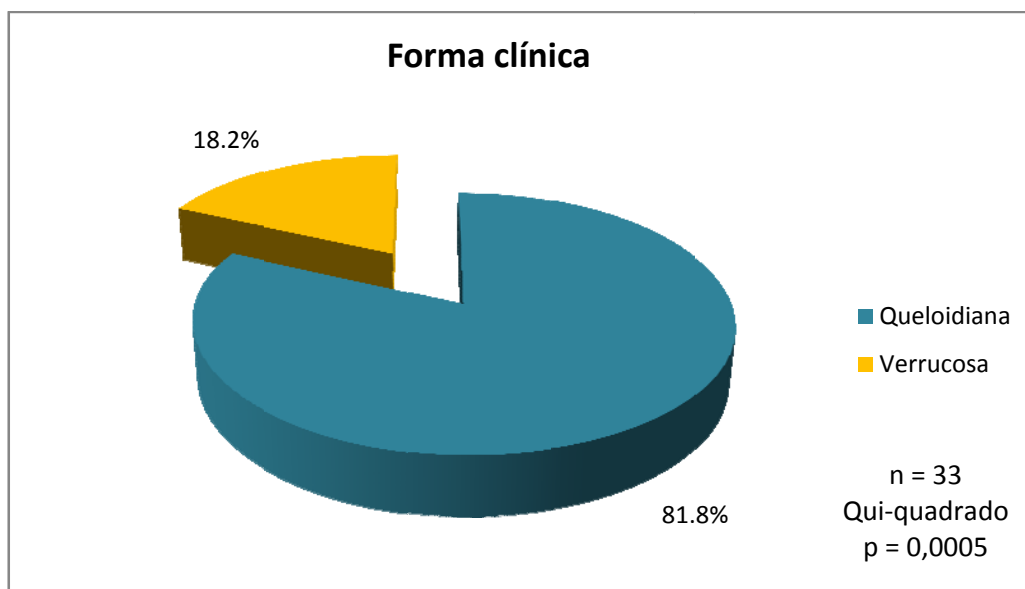


Figura 7 - Distribuição dos pacientes com DJL quanto ao tipo clínico de lesão
Fonte: Protocolo de pesquisa (2009).

Com relação aos sítios das lesões, ocorreu uma predominância nos membros inferiores, com 45,5% e no pavilhão auricular (15,2%). Uma pequena parte dos pacientes, 6,1% apresentou lesões disseminadas (Figura 8). Na face, houve um caso de localização insólita que foi no lábio (Figura 9).

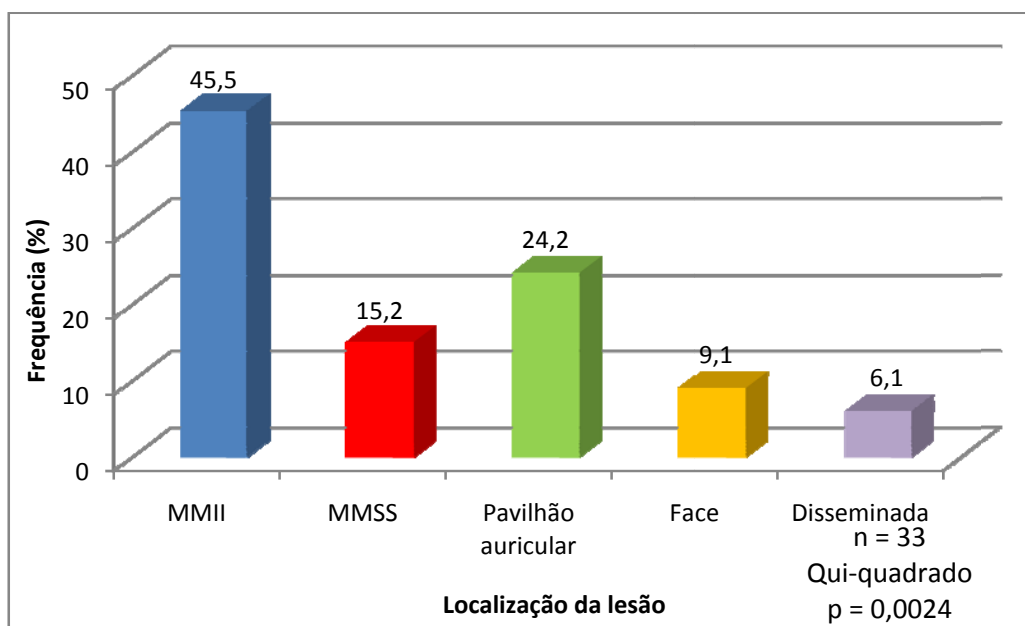


Figura 8 - Distribuição dos pacientes com DJL quanto a localização das lesões
MMII = membros inferiores MMSS = membros superiores Disseminada = mais de 1 sítio anatómico
Fonte: Protocolo de pesquisa (2009).



Figura 9 - Doença de Jorge lobo- localização labial
Cortesia do Prof. Dr Arival Cardoso de Brito

5. 2- ACHADOS IMUNOHISTOQUÍMICOS

O exame imuno-histoquímico evidenciou que as células de Langerhans foram visualizadas ao longo de toda a epiderme em todos os casos. A morfologia e o número das células de Langerhans não diferiram nos portadores da DJL (Figura 10) e nos de pele de indivíduos sem doença dermatológica (Figura 11).

Nos portadores de PCM, seja o grupo onde os granulomas apresentavam-se bem organizados ou os com granulomas pobremente organizados, houve uma diminuição do número de células, com alterações morfológicas das mesmas (Figura 12).

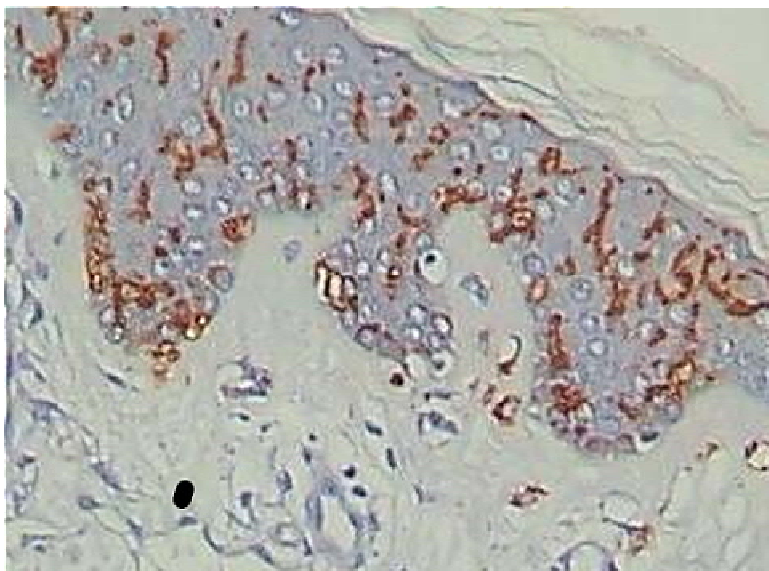


Figura 10 – Fotomicrografia de lesão de DJL – Células de Langerhans epidérmicas imunomarcadas com anticorpo anti-CD1a. Streptavidina-biotina 200x.

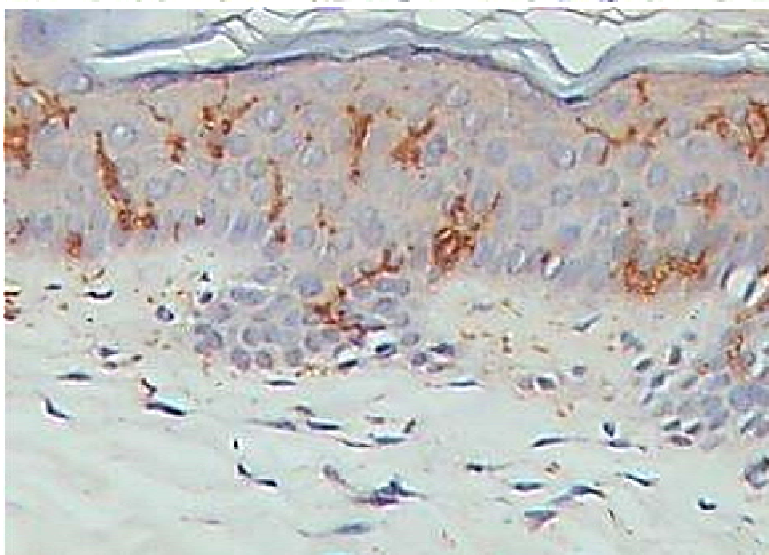


Figura 11 – Fotomicrografia de pele de indivíduos sem doença dermatológica – Células de Langerhans epidérmicas imunomarcadas com anticorpo anti-CD1a. Streptavidina-biotina 200x.

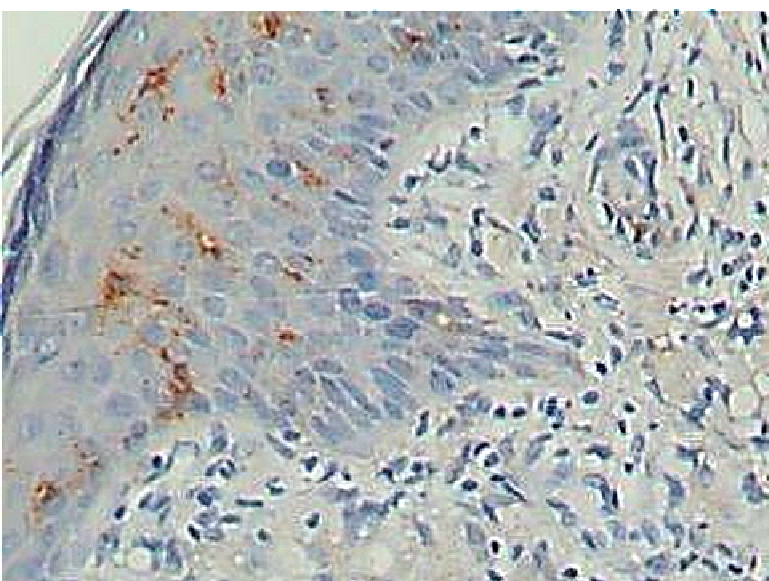


Figura 12 – Fotomicrografia de lesões de PCM – Células de Langerhans epidérmicas imunomarcadas com anticorpo anti-CD1a. Streptavidina-biotina 200x

Através da correlação Linear de Pearson, verificou-se uma tendência à redução dos títulos de CD1a com o avançar da idade (Figura 13).

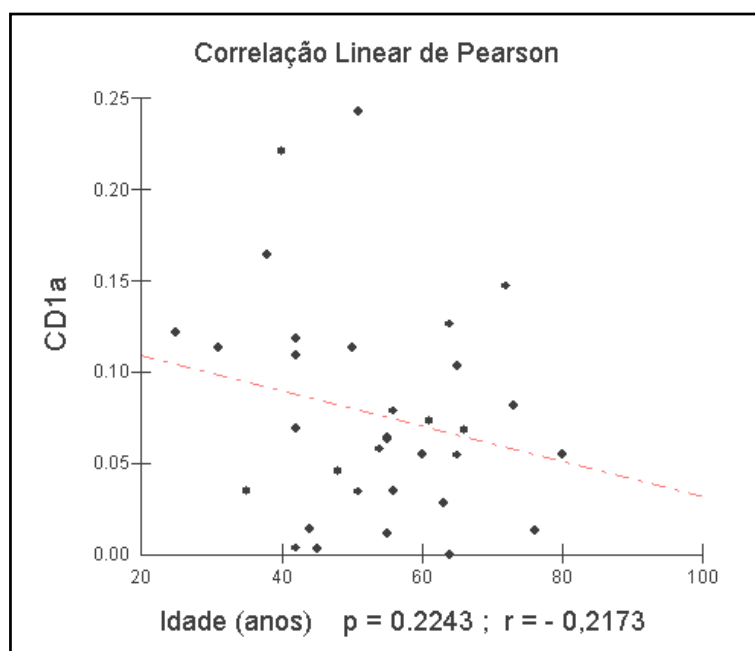


Figura 13 – Quantificação dos níveis de CD1a em relação a idade
Fonte protocolo de pesquisa (2009)

A análise comparativa entre os valores de CD1a com a forma clínica das lesões (Tabela 1) e quanto à localização (Tabela 2), mostrou os seguintes valores:

Tabela 1 – Análise comparativa entre os valores de CD1a conforme às formas clínicas das lesões na DJL

Estatística Descritiva	CD1a	
	Quelodiana	Verrucosa
Tamanho da amostra	27	6
Mínimo	0.0031	0
Máximo	0.221	0.2428
Variação	0.2179	0.2428
Média Aritmética	0.069	0.1098
Mediana	0.0635	0.1174
Desvio Padrão	0.0519	0.0815

Mann Whitney (p = 0,0996)

Tabela 2 – Análise comparativa entre os valores CD1a, conforme a localização das lesões na DJL.

Estatística Descritiva	CD1a		
	Membros	Pavilhão auricular	Outros
Tamanho da amostra	21	8	4
Mínimo	0	0.0128	0.0031
Máximo	0.2428	0.1093	0.0813
Variação	0.2428	0.0965	0.0782
Média Aritmética	0.0941	0.0546	0.0275
Mediana	0.0786	0.0547	0.0128
Desvio Padrão	0.0637	0.0305	0.0362
Correlações	Teste	p – valor	
Membros x Pavilhão auricular	Mann-Whitney	0.0592	
Membros x Outros sítios	Mann-Whitney	0.027	
Pavilhão auricular x Outros sítios	Mann-Whitney	0.0871	

A análise descritiva e quantitativa dos valores de CD1a entre os grupos estudados estão expostos na Tabela 3 e Figura 14

Tabela 3– Análise descritiva dos níveis de CD1a nos grupos 1, 2, 3A e 3B

Estatística descritiva	Grupos estudados - CD1a			
	DJL (Grupo 1)	Pele sem doença dermatológica (Grupo 2)	PCM com gran. bem organizado (Grupo 3A)	PCM com gran. pobremente organizado (Grupo 3B)
Média ± DP	0.07644 ± 0.05902	0.1182 ± 0.07141	0.04122 ± 0.05186	0.02648 ± 0.02613
Mediana	0.0639	0.0992	0.02205	0.01715
Variação	0-0.2428	0.0325-0.2474	0-0.1972	0.0002-0.0754

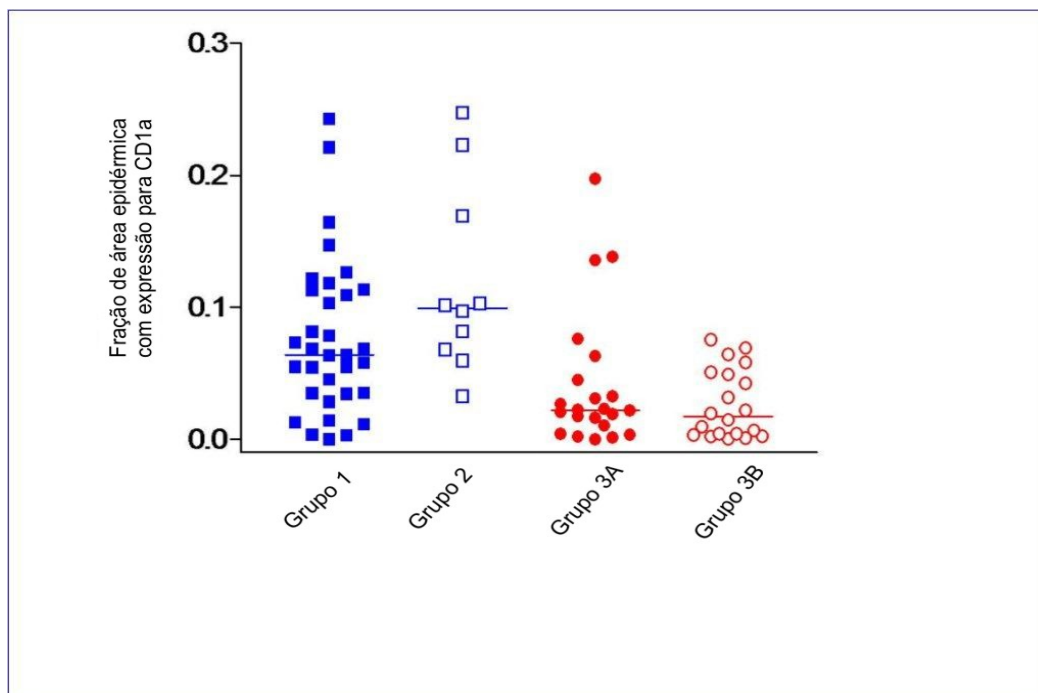


Figura 14- Quantificação dos níveis de CD1a nos grupos (1-DJL; 2-pele sem doença dermatológica; 3A-PCM com granuloma bem organizado; 3B-PCM com granuloma pobremente organizado)

Fonte: Protocolo de pesquisa (2009)

6 DISCUSSÃO

As áreas de extensas florestas juntamente com uma exuberante bacia hidrográfica, aliadas ao clima quente e úmido, fazem da região amazônica um meio ideal de manutenção e viabilidade de um grande número de agentes fúngicos potencialmente patogênicos para o homem (PECHER, 1994). A proximidade da população amazônica com rios, florestas e cultivo de terra, nos leva a acreditar que estes fungos são transmitidos através da água, solo e vegetação e inoculados na pele através de traumatismos, iniciando um longo período de infecção, até o aparecimento das primeiras lesões após alguns anos. Os mais suscetíveis então seriam homens que habitam a zona rural e exercem atividades agrícolas. O relato da doença em golfinhos inoculados com *Lacazia loboi*, demonstra a estreita relação ecológica deste fungo com água e conseqüentemente com o meio ambiente da região amazônica (CALDWELL et al., 1975; BARUZZI et al., 1979).

Nesta série de casos, os achados epidemiológicos foram semelhantes aos encontrados na literatura, demonstrando um maior acometimento de indivíduos do sexo masculino (84,8%), agricultores (72,7%), procedentes do nordeste do estado do Pará .

Em relação a idade, a faixa de 46 a 65 anos foi a mais acometida (51,5%); seguida da faixa de 25 a 45 anos, na qual estavam inseridos 11 dos 33 pacientes avaliados .

A maioria dos pacientes estudados encontravam-se em uma faixa etária maior que a descrita na literatura, provavelmente pela demora na procura do atendimento médico, devido as lesões clínicas serem pouco ou assintomáticas, que via de regra não comprometem o estado geral, aliado ao fato dos doentes serem predominantemente de zona rural, terem acesso restrito a saúde e condições financeiras precárias.

O maior número de pacientes oriundos do nordeste do estado do Pará pode ser justificado pela maior facilidade em chegar ao serviço médico especializado quando comparado aqueles de outras localidades rurais, onde o acesso é mais difícil.

Infecções cutâneas causadas por fungos de invasibilidade limitada são geralmente caracterizados por evolução crônica, com um tempo de evolução longo, e por isso é de se esperar que os pacientes acometidos sejam adultos.

Observamos um predomínio de lesões clínicas de aspecto queloidiano presentes na grande maioria dos casos (81, 8%), semelhante a outros estudos (LACAZ et al., 1986, GROSSANS; PRADINAUD, 1979; TALHARI, 1981).

Os membros inferiores foram a localização mais comum, pelo fato de estarem mais suscetíveis aos traumas, e no presente estudo foi encontrada em 45, 5%% dos casos, seguida do pavilhão auricular.

Fato interessante foi a ocorrência na face, de lesão no lábio, que é bastante rara, em um dos pacientes estudados, com apenas 1 relato na literatura, cujo doente tinha o hábito de palitar os dentes com gravetos sendo que provavelmente a forma de inoculação foi devido a traumatismos por corpos vegetais (LOUREIRO et al., 1971).

A degeneração carcinomatosa das lesões pode ocorrer (BARUZZI et al., 1989; SAMPAIO; RIVITTI, 2007). Em três pacientes estudados foi encontrado carcinoma espinocelular sobrepondo as lesões clínicas.

Pecher et al., (1979) sugerem que a DJL esteja associada a uma resposta imune deficiente apesar de que grande quantidade de estruturas fúngicas são fagocitadas por macrófagos e células gigantes. Por outro lado, não há estudos mostrando disseminação ou agravamento das lesões nos casos associados à imunodeficiência celular grave, como é o caso da infecção HIV/AIDS (XAVIER et al., 2006).

Realizamos um estudo em 25 portadores da micose, onde foi evidenciado uma intensa imunoexpressão de TGF β , que é uma citocina eminentemente imunossupressora de macrófagos e indutora de fibrinogênese e apoptose em algumas linhagens celulares. É possível que o estímulo na fibrinogênese seja o responsável para que a forma clínica mais comum de apresentação da doença seja a queloidiana (XAVIER et al., 2008) (ANEXO B).

A influência da resposta imune na evolução de várias doenças cutâneas infecciosas tem sido descrito (PECHER; FUCHS, 1988; PAGLIARI; SOTTO, 2003). Muitos estudos tem caracterizado o papel da resposta imune celular

e humoral no curso da lepra, leishmaniose e PCM, com importante variação quantitativa e qualitativa da resposta durante os diferentes estágios da doença (PAGLIARI; SOTTO, 2003; AMPREY et al., 2004; XAVIER et al., 2006).

Dentre as micoses profundas, a PCM tem imunologia bem conhecida, sendo a imunidade mediada por células (macrófagos ativados) a principal linha de defesa. Recentemente o uso de anticorpos monoclonais tem permitido a quantificação dos linfócitos T em material de biópsias de pacientes. As citocinas que participam da resposta imunitária podem ser classificadas como do tipo Th1 ou Th2, segundo o perfil dos linfócitos T (ROMAGNANI, 1996; CALISH et al., 1998; ALMEIDA; LOPES, 2001). Citocinas de padrão Th1 (IL-2, IL-12 e INF γ) estariam relacionadas com a resistência do hospedeiro contra o fungo, e as de padrão Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 e TGF β) estariam relacionadas à suscetibilidade ao fungo (MOTA et al., 1985; BERNARD et al., 2001). Células mononucleares de sangue periférico de pacientes com formas agudas e crônicas de PCM, produzem baixos níveis de IL-2 e INF γ e altos níveis de IL-10 (CALISH et al, 1998; BERNARD et al., 2001).

Antiseros policlonais produzidos contra *P. brasiliensis* tem sido utilizados, já que estes tem capacidade de reagir com os antígenos do *L. loboi* presentes nos tecidos das lesões cutâneas da DJL, devido a reações antigênicas cruzadas entre os 2 fungos. Através do método PAP, foram evidenciados antígenos comuns entre ambos os fungos (LANDMAN et al., 1988).

Além destas evidências, o *P. brasiliensis* está filogeneticamente relacionado ao *L. loboi*, sendo ambos pertencentes à ordem Onygenales (HERR, 2001), por este motivo, blocos parafinados de portadores de PCM foram utilizados como grupo controle patológico.

As células apresentadoras de antígenos exercem um importante papel nesta interação e tem sido recentemente envolvidas na determinação do curso das doenças infecciosas (PAGLIARI; SOTTO, 2003; AMPREY et al., 2004 XAVIER et al., 2006). Sieling et al., (2007) após analisarem biópsias de lesões cutâneas provenientes de sete pacientes com lepra tuberculóide e seis com a forma lepromatosa, observaram intensa expressão de proteína CD1a em todas as amostras dos pacientes com a forma tuberculóide, enquanto que nas lesões de lepra lepromatosa, a detecção de CD1a foi rara. A expressão de CD1a foi sete vezes

maior na forma tuberculóide quando comparada a forma lepromatosa.

A diferenciação quantitativa que foi encontrada a respeito das células dendríticas, que estaria correlacionada com a forma clínica da lesão, confirma a diversidade da resposta imune que seria dependente da interação inicial entre as células T e células apresentadoras de antígenos.

A diminuição no número, e a alteração na morfologia das células de Langerhans nas lesões de PCM demonstraram uma provável inativação das mesmas pelos produtos fúngicos, ou a migração para a derme para processar os antígenos (PAGLIARI; SOTTO, 2003). Já na DJL, as CL estavam presentes morfológicamente similares às da pele normal, tendo o mesmo ocorrido em relação ao números das mesmas. Poderíamos supor então que na DJL, o fungo teria alguns mecanismos escapatórios que manteriam as células de Langerhans na epiderme e subverteriam o sistema imune local para livrar-se da apresentação de antígeno por estas células.

Dados parciais deste trabalho foram apresentados em forma de pôster no congresso internacional de dermatologia em Buenos Aires (C), e publicado na revista *Acta Tropica* em 2010 (ANEXO D).

Nestlé e Nickoloff (1995), demonstraram que as células dendríticas epidérmicas quando ativadas, teriam a função de regular as respostas T e B. Além disso, as células dendríticas seriam importantes para a indução da tolerância imunológica antígeno específica, e para a regulação do tipo de resposta imune mediada por células T (YATES et al., 2007; NESTLE; BURG, 1999).

Verificou-se uma tendência á redução dos títulos de CD1a com o avançar da idade, porém houve uma dispersão considerável, não havendo caráter significativo nesta distribuição, concluindo-se então que não há relação significativa entre os níveis de CD1a e a idade dos pacientes.

Apesar de se ter observado uma contagem maior dos níveis de CD1a nos pacientes com a forma clínica verrucosa em relação aos com a forma queloidiana, a análise estatística não mostrou significância, o que nos leva a crer que a forma clínica não interfere na quantificação dos níveis de CD1a.

Já em relação a localização das lesões, observou-se um nível de CD1a mais elevado nos membros inferiores quando comparado à lesões em outros

sítios (face), porém, nossa casuística não é suficientemente grande para se afirmar tal fato, necessitando de estudos adicionais.

Em suma, a possível influência do fungo na resposta imune local pelas células de Langerhans, seria o provável responsável pela pobre eficácia na terapêutica da doença, apesar de ter bom prognóstico em relação a disseminação sistêmica e a risco de vida. A maioria dos pacientes apresentam múltiplas lesões quando chegam para atendimento especializado devido a distância dos centros urbanos, a impossibilidade de se afastarem de suas atividades por questões financeiras, e pelo fato da doença ser assintomática; o que dificulta ainda mais o manejo terapêutico deles.

7 CONCLUSÃO

A análise da imunoexpressão para CD1a nas lesões cutâneas da doença de Jorge Lobo, sugerem as seguintes conclusões para a amostra estudada:

A doença está relacionada às atividades agrícolas, é mais incidente no nordeste paraense, acomete principalmente o sexo masculino entre 46 e 65 anos de idade, apresentando com maior frequência lesões queloidianas nos membros inferiores .

A idade dos pacientes e a forma clínica da doença parecem não influenciar na quantificação dos níveis de CD1a.

Os níveis de CD1a diferiram de acordo com a localização das lesões.

As células de Langerhans estão presentes nas lesões cutâneas da doença de Jorge Lobo de maneira similar aquelas encontradas na pele sem doença dermatológica. Diferentemente do que ocorreu na Paracoccidioidomicose, estas não sofreram alterações numéricas ou morfológicas.

Na doença de Jorge Lobo, as células de Langerhans parecem não estar relacionadas a resposta imune local, mostrando a necessidade de se estudar outra população de células apresentadoras de antígenos .

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LINCHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro (RJ): Elsevier, 2005. 580 p.

ALMEIDA, S. R.; LOPES, J. D. The low efficiency of dendritic cells and macrophages from mice susceptible to *Paracoccidioides brasiliensis* in inducing a Th1 response. **Brazilian Journal Medical and Biological Research**, v. 34, p. 529-537, 2001.

AMPREY, J. L.; SPATH, G. F.; PORCELL, S. A. Inhibition of CD1 expression in human dendritic cells during intracellular infection with *Leishmania donovani* **Infections Immunology**, v. 72, p. 589-92, 2004.

AYRES, M.; AYRES, M. J.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. **BioEstat 5. 0**. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Sociedade civil Mamirauá, Belém (Pa) 2007.

AZULAY, R. D.; AZULAY, D. R. **Dermatologia**. 4. ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, 2006. 381-2 p.

AZULAY, R. D, CARNEIRO, J. A; CUNHA, M. G; REIS, L. T. Keloidal blastomycosis (Lobo's disease) with lymphatic involvement: a case report. **International Journal of Dermatology**, v. 15, p. 40-42, 1976.

BANCHEREAU, J.; BRIERE, F.; CAUX, C; DAVOUST, J; LEBECQUES. L Y. L.; PULENDRAN, B.; PALUCKA, K. Immunobiology of dendritic cells. **Annual Reviews. Immunology**, v. 18, p. 767-811, 2000.

BANCROFT, J. D.; GAMBLE M. **Theory and practice of histological techniques**. 5. ed. London (UK): Elsevier, 2007. 125-38p.

BARUZZI, R. G. A Doença de Jorge Lobo. Aula proferida no VI Curso Nacional de Dermatopatologia, São Paulo, 11-14 julho 1984.

BARUZZI, R. G.; RODRIGUES, D.; MICHALANY, N.; SALOMÁTO, R. Squamous-cell carcinoma and Lobomycosis (Jorge Lobo's disease). **International Journal of Dermatology**, v. 28, n. 3, p. 183-185, 1989.

BARUZZI, R. G.; LACAZ, C. S.; SOUZA, F. A. A. História natural da doença de Jorge Lobo. Ocorrência entre índios Caiabi (Brasil Central). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 21, p. 302-338, 1979.

BERNARD, G.; NEVES, C. P.; GRYSCHER, R. C; DUARTE, A. J. Imbalance of IL-12, INF-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human

paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, v. 13, p. 248-252, 2001.

BIEBER, T; RING, J; BRAUN-FALCO, O. Comparison of different methods for enumeration of Langerhans cells in vertical cryosections of human skin. **British Journal of Dermatology**, v. 118, p. 385-392, 1988.

BOS, J. D.; KAPSENBERG, M. L. The skin immune system. **Immunology Today**, v. 17, p. 235-240, 1986.

BRIGL, M.; BRENNER, M. CD1 : Antigen presentation and T cell function. **Annual Reviews Immunology**, v. 22, p. 817-90, 2004

BRITO, A. C.; ENOKIHARA, M. M. S. S; MIRANDA, M. F. R.; CARNEIRO, F. A.; FARIA, F. P.; DALUR, E. S. Jorge Lobo's disease agent: observations by transmission and scanning electron microscopes. **Acta Microscopica**. In: XVIII Congress of the Brazilian Society for Microscopy and Microanalyses, S407- 1999.

BRITO, A. C. Lobomycosis. In: TRYING, S. K.; LUPI, O.; HENGGE, U. R. **Tropical Dermatology**. USA: Elsevier, 2006, p. 207-209.

BRITO, A. C; QUARESMA, J. A. S. Lacaziose (Doença de Jorge Lobo): revisão e atualização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 5, p. 461-74, 2007.

BRUN, A. M. Lobomycosis in three venezuelan patients. **International Journal of Dermatology**, v. 38, p. 298-305, 1999.

BURNS, R. A.; ROY, S.; WOODS, C.; PADHYES, A. A.; WARNOCK, D. W. Report of the first human case of lobomycosis in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 1283-1285, 2000

BUSTAMANTE, B. Posaconazole therapy for lobomycosis: preliminary report of a peruvian case. P-O199. Presented at the 16th **congress of international society for human and animal mycology**, Paris France, June 25-29, 2006.

CÁCERES, S; TORO, R. Lobomycosis de 35 años de evolución. **Revista de la Sociedad Colombiana de Dermatología**, v. 1, n. 2, p. 43-45, 1991.

CALDWELL, D. K.; CALWELL, M. C.; WOODARK, J. C.; AJELLO, L.; KAPLAN, W.; McCLURE, M. Lobomycosis as a disease of the Atlantic bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus* Montagu, 1821). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 24, n. 1, p. 105-114, 1975.

CALICH, V. L. G.; VAZ, C. A. C; BURGER, E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis*

infection. **Immunity to fungi**, v. 149, p. 407-417, 1998.

CAMARGO, Z. P.; BARUZZI, R. G.; MAEDA, S. M.; FLORIANO, M. C. Antigenic relationship between *Loboa lobo* and *Paracoccidioides brasiliensis* as shown by serological methods. **Medical Mycology**, v. 36, p. 413-417, 1998.

CUCÉ, L. C.; WROCLAWSKI, E. L.; SAMPAIO, S. A. P. Treatment of paracoccidioidomycosis, candidiasis, chromomycosis, lobomycosis and mycetoma with ketoconazole. **International Journal of Dermatology**, v. 19, p. 405-408, 1980.

D'ÁVILA, S. C. G. P.; PAGLIARI, C.; DUARTE, M. I. S. The cell-mediated immune reaction in the cutaneous lesion of chromoblastomycosis and their correlation with different clinical forms of the disease. **Mycopathologia**, v. 156, p. 51-60, 2002.

DIAS, L. B.; SAMPAIO, M. M.; SILVA, D. Jorge Lobo's disease. Observations on its epidemiology and some unusual morphological forms of the fungus. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 12, p. 8-15, 1970.

DINIZ, J. A. P.; TEIXEIRA, C. E.; SOARES, M. C.; BRITO, A. C.; SILVA, J. P. Ultrastructural aspects of *Lacazia lobo*. **Acta Microscopica**. In: XVII Congress of the Brazilian Society for Microscopy and Microanalyses, 2001.

ESTERRE, P.; PRADINAUD, R.; RAVISSE, P. Étude immunohistochimique de La lesion cutanée de lobomycose **Medical Mycology**, v. 1, p. 276-83, 1991.

FIGUEIREDO, F.; ALVES, L. M. C.; SILVA, C. L. Tumor necrosis factor production *in vivo* and *in vitro* in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the cell wall fractions thereof. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 93, p. 189-194, 1993.

FORNARI, M. C.; BAVA, A. J.; GUERENO, M. T.; BERARDI, V. E. SILAF, M. R.; NEGRONI, R. High serum Interleukin-10 and Tumor Necrosis Factor Alpha levels in chronic paracoccidioidomycosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, p. 1036-1038, 2001.

FUCHS, J.; MILDBRAT, R.; PECHER, A. S. Lobomycosis (keloidal blastomycosis): case reports and overview. **Cutis**, v. 46, p. 227-234, 1990.

GIMENES, M. F.; TAUSK, F.; GIMENEZ, M. M.; GIGLI, I. Langerhans cells in paracoccidioidomycosis **Archives of Dermatology**, v. 123, p. 479-481, 1987.

GIMENES, V. M. F.; CRIADO P. R.; MARTINS, J. E. C.; ALMEIDA, S. R. Cellular immune response of patients with chromoblastomycosis undergoing antifungal therapy. **Mycopathologia**, v. 162, p. 97-101, 2006.

GONÇALVES, M. G. Orientações Básicas sobre Apresentação e Normalização de Trabalhos Acadêmicos. Belém, Pará, 2005.

GROSSHANS, E. M.; PRADINAUD, R. Dermatologie in Franzosisch-Guayana. **Der Hautarzt**. v. 30, p. 443-45, 1979.

HAUBOLD, E. M.; ARONSOS, J. F.; COWAN, D. F.; MCGINNIS, M. R.; COOPER, C. R. Isolation of fungal rDNA from bottlenose dolphinskin infected with *Loboa lobo*. **Medical Mycology**, v. 36, p. 263-267, 1998

HEADINGTON, J. T.; CERIO, R. Dendritic cells and the dermis. **American Journal of Dermatopathology**, v. 12, n. 3, p. 217-220, 1990.

HERR, R. A.; TARCHA, E. J.; TABORDA, P. R.; TAYLOR, J. W.; EJELLO, L. MENDONZA, L. Phylogenetic analysis of *Lacazia lobo* places this previously uncharacterized pathogen within the dimorphic Onygenales. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 309-314, 2001.

HSU, S. M.; RAINE, L; FAGNER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex(ABC) in immunoperoxidase technique : a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedure. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 29, p. 577-80, 1981.

IWASAKI, A. Mucosal dendritic cells. **Annual Reviews Immunology**, v. 25, p. 381-418, 2007.

LACAZ, C. S.; BARUZZI, R. G.; ROSA, M. C. B. **Doença de Jorge Lobo**. São Paulo: Editora da USP-IPISIS Gráfica e Editora, 1986. 92p.

LACAZ, C.; RODRIGUES, M. C; PORTO, E. *Paracoccidioides lobo* x *Loboa lobo*: uma questão de nomenclatura médica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 69, n. 2, p. 143-144, 1994.

LANDMAN, G.; VELUDO, M. A.; LOPES, J. A.; MENDES, E. Crossed-antigenicity between the etiologic agents of lobomycosis and paracoccidioidomycosis evidenced by an immunoenzymatic method (PAP). **Allergologia et Immunopathologia**, v. 16, p. 215-218, 1988.

LEITE, J. M. Doença de Jorge Lobo (Estudo clínico-patológico com apresentação de cinco casos). **Atas do Simpósio sobre Biota Amazônica**, V. 6 (patologia), p. 161-176, 1967.

LOUREIRO, A. A. P.; BRITO, A. C.; SILVA, D. Micose de Jorge Lobo de localização

insólita. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 46, n. 1, p. 1-6, 1971.

MADEIRA, S.; OPROMOLLA, D. V. A.; BELONE, A. F. F. Inoculation of BALB/c mice with *Lacazia loboi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, p. 239-243, 2000.

MARCOS, E. V. C. : Doença de Jorge Lobo e sua relação com os antígenos do sistema HLA. Botucatu, 2001. Tese de Mestrado. Universidade Estadual Paulista.

MARCOS, E. V. C.; SOUZA, F. C.; TORRES, E. A. Estudo de associação entre antígenos leucocitários humanos e doença de Jorge Lobo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, n. 5, p. 399-401, 2005.

MARTIN, L. H; CALABI, F.; LEFEBVRE, F. A. et al. Structure and expression of the human thymocyte antigens CD1 a, CD1b and CD1c. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 84, p 9189-90, 1987.

MICHALANY, J. Corpos asteróides nas lesões granulomatosas com especial referencia a blastomicose ou doença de Jorge Lobo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 2, p. 61-68, 1995.

MIRANDA, M. F. R; SILVA, A. J. G. Vinyl adhesive tape also effective for direct microscopy diagnosis of chromomycosis, lobomycosis and paracoccidiodomycosis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 52, p. 39-43, 2005.

MOTA, N. G.; REZKALLAHLWASSO, M. T.; PERACOLO, M. T.; ANDI, R. C. MENDES, E. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidiodomycosis. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, p. 765-772, 1985.

MURPHY, G. F.; MESSAD, D.; FONFERKO, E.; HANCOCK, W. W. Phenotypic transformation of macrophages to Langerhans cells in the skin. **American Journal of Pathology**, v. 123, p. 401-406, 1986.

NALOVIC, K.; PRADNAUD, R. Anergic cutaneous leishmaniasis versus lobomycosis. **International Journal of Dermatology**, v. 35, n. 6, p. 438-440, 1996.

NESTLE, F. O.; BURG, G. Dendritic cells: role in skin diseases and therapeutic applications. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 24, p. 204-207, 1999.

NESTLE, F. O.; FILGUEIRA, L.; NICKOLOFF, B. J.; BURG, G. Human dermal dendritic cells process and present soluble protein antigens. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 110, p. 762-766, 1998.

NESTLE, F. O.; NICKOLOFF, B. J. Dermal dendritic cells are important members of the skin immune system. **Advances Experimental Medicine and Biology**, v. 378, p. 111-116, 1995.

OPROMOLLA, D. V. A.; VILANI-MORENO, F. R.; BELONE, A. F. F. A doença de Jorge Lobo e a coloração pela prata metenamina **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 74, p. 345-349, 1999a.

OPROMOLLA, D. V. A.; TABORDE, P. R. O.; TABORDA, V. B. A.; VIANA, S.; FURTADO, J. F. Lobomycose: relato de 40 casos novos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 74, p. 135-141, 1999b.

OPROMOLLA, D. V. A.; NOGUEIRA, M. E. S. Inoculation of *Lacazia loboi* into the subcutaneous tissue of the hamster cheek pouch. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, n. 3, p. 119-123, 2000a.

OPROMOLLA, D. V. A.; BELONE, A. F.; TABORDA, P. R. O.; TABORDA, V. B. A. Correlação clinicopatológica em 40 casos novos de Lobomycose. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 75, n. 4, p. 425-434, 2000b.

OPROMOLLA, D. V. A.; BELONE, A. F.; TABORDA, P. R. O.; ROSA, P. S. Lymph node involvement in Jorge Lobo's disease: report of two cases. **International Journal of Dermatology**, v. 42, p. 938-941, 2003.

OPROMOLLA, D. V. A.; BARUZZI, R. G. Doença de Jorge Lobo. In: COURA, J. R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, 2005. 1185-92p.

PAGLIARI, C. Células dendríticas e perfil de citocinas em lesões cutâneas na Paracoccidioidomicose. São Paulo, 2002. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

PAGLIARI, C.; SOTTO, M. N. Correlation of factor XIII a+ dermal dendrocytes with paracoccidioidomycosis skin lesions. **Medical Mycology**, v. 40, p. 407-10, 2002.

PAGLIARI, C.; SOTTO, M. N. Dendritic cells and pattern of cytokines in paracoccidioidomycosis skin lesions. **American Journal of Dermatopathology**, v. 25, n. 2, p. 107-112, 2003.

PAGLIARI, C.; STEGUN, F.; SOTTO, M. N.; DUARTE, M. I.; UNGER, D.; XAVIER, M. B.; QUARESMA, J. A.; BRITO, A. Lobomycosis: immunohistochemical study of Langerhans cells in cutaneous lesions. 21st world congress of dermatology, Buenos Aires, 2007

PECHER, S. A. Deep mycosis in Latin America. **Mèdicine Tropicale**, v. 54, n. 4, p. 411-415, 1994.

PECHER, S. A.; CROCE, J.; FERRI, R. G. Study of humoral and cellular immunity in lobomycosis. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 7, p. 439-434, 1979.

PECHER, S. A.; FUCHS, J. Cellular immunity in Lobomycosis (Keloidal blastomycosis). **Allergologia et Immunopathologia**, v. 16, p. 413-415, 1988.

PRADINAUD, R. *Loboa lobo*. In: COLLIEN, L; BALOWS, A.; SUSSMAN, M. **Topley and Wilson's microbiology and microbial infections**, vol. 4. New York: Oxford University Press, 1998. 585-94p.

PRADINAUD, R.; TALHARI, S. Lobomycosis (Maladie de Jorge Lobo). **Maladies infectieuses**, v. 8, p. 608-10, 1996.

PUCCIA, R.; SCHENKNAM, S.; GORIN, P. A. J.; TRAVASSOS, L. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*. Identification of a specific antigen. **Infection and Immunity**, v. 53, n. 1, p. 199-206, 1986.

PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L. 43-kilodalton from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis or Jorge Lobo's disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p. 1610-15, 1991.

QUARESMA, J. A.; UNGER, D.; PAGLIARI, C.; SOTTO, M. N.; DUARTE, M. I.; BRITO, A. Immunohistochemical study of Langerhans cells in cutaneous lesions of the Jorge Lobo's disease. **Acta Tropica**, v. 114, p. 59-62, 2010

ROBERT, C.; KUPPER, T. Inflammatory skin diseases, T cells and immune surveillance. **New England Journal of Medicine**, v. 341, p. 1817-28, 1999.

RODRIGUEZ-TORO, G. Enfermidade de Jorge Lobo o blastomycosis queiloidiana, novos aspectos de la entidade em Colômbia: revision. **Biomédica**, v. 9, p. 133-146, 1989.

RODRIGUEZ-TORO, G. Lobomycosis. **International Journal of Dermatology**, v. 32, n. 5, p. 324-332, 1993.

RODRIGUEZ-TORO, G.; TELLEZ, N. Lobomycosis in colombian amerindian patients. **Mycopathologia**, v. 120, p. 5-9, 1992.

ROMAGNANI, S. TH 1 and TH2 in human diseases. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 80, p. 225-235, 1996.

ROMANI, N.; EBNER, S.; TRIPP, C. H.; FLACHER, V.; KOCH, F.; STOITZNER, P. Epidermal Langerhans cells-changing views on their functions *in vivo*. **Immunology**

Letters, v. 106, p. 119-25, 2006.

ROMANI, N.; TRIPP, H. C.; RATZINGER, G.; HEUFELER, C.; KOCH, F.; SAELAND, S.; STOITZNER, P. Langerhans cells-dendritic cells of the epidermis and other epithelia. **Recent Advances in Immunology**, p. 1-44, 2008.

ROSA, P. S. Avaliação de drogas antifúngicas no tratamento de camundongos BALB/ c inoculados com o *Lacazia loboi*. Botucatu, 2003. Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia**. 3. ed. São Paulo (SP): Artes Médicas LTDA, 2007. 733-5p.

SAMPAIO, M. M.; DIAS, L. B.; SCAFF, L. Staining of pathogenic fungi with tripan blue. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 13, n. 3, p. 223-224, 1971.

SESSO, A.; BARUZZI, R. G. Interaction between macrophage and parasite cells in lobomycosis. The thickened cell wall of *Paracoccidioides loboi* exhibits apertures to the extracellular milieu. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v. 20, p. 537-548, 1988.

SESSO, A.; FARIA, F. P.; BARUZZI, R. G. The causative agent of Jorge Lobo's disease, the fungus *P. loboi* (= *Loboa loboi*) may be seen extracellularly tightly by histiocytes. Observations at the transmission and scanning electron microscopes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 35, p. 305-306, 1993.

SIELING, P. A.; LEGASPI, A.; OCHOA, M. T.; REA, T. H; MODLIN, R. L. Regulation of human T-cell homing receptor expression in cutaneous bacterial infection. **Immunology**. v. 120, p. 518-25, 2007

SILVA, D. Estudo experimental da micose de Jorge Lôbo. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 69, n. 2, p. 88-91, 1994.

SILVA, D; BRITO, A. Formas clínicas não usuais da micose de Lôbo. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 69, n. 2, p. 133-136, 1994.

SILVA, D.; MACEDO, C.; OLIVEIRA, C.; UNGER, D. Micose de Jorge Lobo simulando forma gomosa: um caso raro. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 71, n. 3, p. 211-213, 1996.

SILVA, E.; FERASÇOLI, M. O. Frequências relativas dos fenótipos eritrocitários ABO e Lewis na Doença de Jorge Lôbo. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, p. 23-27, 2004.

SOTTO, M. N.; De BRITO, T.; SILVA, A. M.; VIDAL, M.; CASTRO, L. G. Antigen distribution and antigen-presenting cells in skin biopsies of human chromoblastomycosis. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 31, n. 1, p. 14-18, 2004.

STING, G. Dendritic cell of the skin. **Dermatologic Clinics**, v. 8, n. 4, p. 673-9, 1990.

STINGL, G.; TAMAKI, K; KATS, S. I. Origin and function of epidermal Langerhans cells. **Immunological Reviews**, v. 53, p. 149-174, 1980.

SYMMERS, W. S. T. A possible case of Lobo's disease acquired in Europe from a bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus*) **Bulletin Société Pathologie Exotique Filiates**, v. 76, p. 777-84, 1983

TABORDA, V. B A.; TABORDA, P. R. O.; MCGINNIS, M. R. Constitutive melanin in the cell wall of the etiologic agent of Lobo's disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41, p. 9-14, 1999a.

TABORDA, P. R.; TABORDA, V. A.; MCGINNIS, M. R. *Lacazia lobo* gen. nov., comb. nov., the etiologic agent of Lobomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 2031-2033, 1999b.

TALHARI, S. Enfermedad de Jorge Lobo. **Archivos Argentinos de Dermatologia**, v. 31, n. 1, p. 23-26, 1981.

TALHARI, S.; NEVES, R. G. Doença de Jorge Lobo. In: **Dermatologia Tropical**. Rio de Janeiro: Medsi, 1995. 237-53p.

TROMBETA, E. S.; MELLMAN, I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. **Annual Reviews Immunology**, v. 23, p. 975-1028, 2005.

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**, v. 39, p. 35-37, 1997.

VILANI-MORENO, F. R.; OPROMOLLA, D. V. A. Determinação da viabilidade do *Paracoccidioides lobo* em biópsias de pacientes portadores da doença de Jorge Lobo. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 72, p. 433-437, 1997.

VILANI-MORENO, F. R. Imunopatologia da Doença de Jorge Lobo: composição celular do infiltrado inflamatório e quantificação de citocinas em sobrenadante de cultura de células mononucleares e soro sanguíneo. Botucatu, 2002. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista.

VILANI-MORENO, F. R.; BELONE, A. F.; ROSA, P. S.; MADEIRA, S.; OPROMOLLA, D. V. A. Evaluation of the vital staining method for *Lacazia loboi* through the experimental inoculation of BALB/c mice. **Medical Mycology**, v. 41, p. 211-216, 2003.

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**, v. 37, p. 165-168, 2004.

VILANI-MORENO, F. R.; BELONE, A. F.; SOARES, C. T.; OPROMOLLA, D. V. A. Immunohistochemical characterization of the cellular infiltrate in Jorge Lobo's disease. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 22, p. 44-49, 2005.

VILELA, R.; MENDONZA, L.; ROSA, P.; BELONE, A. F.; MADEIRA, S.; OPROMOLLA, D. V. A.; RESENDE, M. A. Molecular model for studying the uncultivated fungal pathogen *Lacazia loboi*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 3657-61, 2005.

WOODARD, J. C. Electron microscopic study of lobomycosis (*Loboa loboi*). **Laboratory Investigation**, v. 27, p. 606-612, 1972.

XAVIER, M.; FERREIRA, M. M.; QUARESMA, J. A.; BRITO, A. C. HIV and lacaziosis, Brazil. **Emergen Infections Disease**. v. 12, p. 526-27, 2006

XAVIER, M.; LIBONATI, R. M.; UNGER, D.; OLIVEIRA, C.; CORBETT, C. E; BRITO, A. C.; QUARESMA, J. A. Macrophage and TGF- β immunohistochemical expression in Jorge Lobo's disease. **Human Pathology**, v. 39, n. 2, p. 269-74, 2008.

YATES, S. F.; PATERSON, A. M; NOLAN, K. F. et al. Induction of regulatory T cells and dominant tolerance by dendritic cells incapable of full activation. **Journal of Immunology**, v 179, p. 967-76, 2007.

APÊNDICE

Dados dos pacientes portadores de DJL atendidos no serviço de dermatologia da FSCMPA /UFPA obtidos através da análise dos prontuários e utilização de técnica imuno-histoquímica.

Paciente	CD1a	Sexo	Idade	Profissão	Procedência	Forma clínica	Localização
1.	0,0455	M	48	agricultor	Altamira-Pa	queloidiana	pavilhão auricular
2.	0,2428	M	51	agricultor	Cametá-Pa	verrucosa	MI
3.	0,0635	M	55	agricultor	S. Domingos Capim-Pa	queloidiana	MI
4.	0,0549	M	60	agricultor	Acará-Pa	verrucosa	MI
5.	0,0639	M	55	agricultor	Mocajuba-Pa	queloidiana	pavilhão auricular
6.	0,0813	M	73	agricultor	Cametá-Pa	queloidiana	MI / face
7.	0,0549	M	80	agricultor	Baião-Pa	queloidiana	MS
8.	0,0142	F	44	do lar	Marituba-Pa	queloidiana	face
9.	0,0031	M	45	braçal	Altamira-Pa	queloidiana	face
10.	0,0036	M	42	agricultor	Mocajuba-Pa	queloidiana	MS
11.	0,1262	M	64	agricultor	Altamira-Pa	verrucosa	MI
12.	0,0687	F	42	agricultor	S. Domingos Capim-Pa	queloidiana	MS / MI
13.	0	M	64	carpinteiro	Mamuri-Am	verrucosa	MI
14.	0,0128	M	76	agricultor	Cajari-MA	queloidiana	pavilhão auricular
15.	0,1216	F	25	do lar	Castanhal-Pa	verrucosa	MI
16.	0,221	M	40	agricultor	Oeiras do Pará-Pa	queloidiana	MS
17.	0,1182	M	42	agricultor	S. Domingos Capim-Pa	queloidiana	MI
18.	0,0347	M	35	mestre de obras	Mosqueiro-Pa	queloidiana	MI
19.	0,0343	M	51	agricultor	Portel-Pa	queloidiana	MI
20.	0,0733	M	61	agricultor	Cametá-Pa	queloidiana	pavilhão auricular
21.	0,0351	M	56	agricultor	Marituba-Pa	queloidiana	pavilhão auricular
22.	0,1134	M	50	agricultor	Belém-Pa	queloidiana	MS
23.	0,0786	M	56	agricultor	S. Domingos Capim-Pa	queloidiana	MS
24.	0,1029	F	65	do lar	Oeiras do Pará	queloidiana	MI
25.	0,1093	F	42	do lar	Belém-Pa	queloidiana	pavilhão auricular
26.	0,147	M	72	agricultor	Vigia-Pa	queloidiana	MI
27.	0,0544	M	65	agricultor	S. Domingos Capim-Pa	queloidiana	MI
28.	0,1131	M	31	Op. de máquina	Portel-Pa	verrucosa	MI
29.	0,1643	M	38	comerciário	Belém-Pa	queloidiana	MI
30.	0,0578	M	54	agricultor	Cametá-Pa	queloidiana	MI
31.	0,0685	M	66	agricultor	Marabá-Pa	queloidiana	pavilhão auricular
32.	0,0114	M	55	agricultor	Acará-Pa	queloidiana	lábio
33.	0,0283	M	63	agricultor	Paragominas-Pa	queloidiana	pavilhão auricular

Legenda: M = masculino; F = feminino; MI = membro inferior; MS = membro superior

ANEXO A

Estudo imuno histoquímico através do método de estreptavidina – biotina peroxidase

Etapa 1

- a) cortes histológicos de 4 μ m de espessura são obtidos a partir de material embebido em parafina e colhidos em lâminas previamente preparadas com solução adesiva de 3 amino- propyltriethoxy-silane (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO/USA, Cód A3648).
- b) submetidos a desparafinização em xilol por 20 minutos em estufa a 56 °C por 30 minutos e passados no xilol por 20 minutos em temperatura ambiente.
- c) hidratados em concentrações decrescentes de álcoois (95 %, 80% e 70%) por 5 minutos cada.
- d) lavados com água corrente, água destilada e PBS por 5 minutos cada.

Etapa 2

Bloqueio da Peroxidase Endógena

- a) os cortes são colocados em H₂O₂ a 3%, em 3 incubações de 10 minutos cada.
- b) lavados em água corrente por 5 minutos e passados em água destilada e PBS.
- c) feita recuperação antigênica de acordo com o antígeno pesquisado.
- d) lavado em água corrente, destilada e PBS
- e) incubado em leite mólico 10% por 30 min

Etapa 3

Anticorpo primário : S 100

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

Etapa 4

Anticorpo secundário:

- a) os cortes são lavados com PBS por 2 vezes de 5 minutos
- b) tratados com anticorpo secundário anti-imunoglobulina de coelho e anti-imunoglobulina de camundongo(DAKO K 492) diluição de 1: 1000 em PBS por 30 minutos a 37 °C.
- c) lavados em PBS por 2 vezes de 5 minutos cada.

Etapa 5

Anticorpo terciário

- a) os cortes são tratados com anticorpo terciário Streptavidin-Biotin-Complex(SABC) (DAKO K 492), diluição de 1: 1000 por 30 minutos a 37°C
- b) lavados em PBS por 2 vezes de 5 minutos cada

Etapa 6

Revelação por cromógenos

- a) prepara-se solução contendo 30 mg de 3, 3 Diamino-benzidina diluída em 100 ml de PBS.
- b) a solução é filtrada e misturada com 1200 microlitros de H₂O₂ a 3%
- c) os cortes são colocados nesta solução por 1, 5 a 2 minutos e posteriormente lavados em água corrente, contracorados com hematoxilina; novamente lavados em água corrente por 5 minutos, desidratados em concentrações crescentes de álcoois, diafanizados em xilol e montados em *permount*.



Original contribution

Macrophage and TGF- β immunohistochemical expression in Jorge Lobo's disease [☆]

Marília Brasil Xavier PhD^a, Rosana Maria Feio Libonati PhD^a, Débora Unger MD^b,
 Clívia Oliveira MD^b, Carlos Eduardo Pereira Corbett PhD^c,
 Arivaldo Cardoso de Brito PhD^{a,b,*}, Juarez Antonio Simões Quaresma PhD^a

^aNúcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, Belém-PA 66055-240, Brazil

^bFaculdade de Medicina/Dermatologia, Universidade Federal do Pará, Belém-PA 66055-240, Brazil

^cDepartamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP 01246-903, Brazil

Received 27 December 2006; revised 6 June 2007; accepted 18 June 2007

Keywords:

Lacaziosis;
 Immunopathology;
Lacazia loboi;
 Cytokine

Summary Jorge Lobo's disease, or lacaziosis, is a chronic deep mycosis that clinically manifests as solid, variable-sized nodular parakeloidal lesions. Few studies have characterized the in situ cellular and humoral immune response, especially the involvement of cytokines with immunosuppressive effects such as TGF- β . The objective of this paper was to analyze the expression of TGF- β in cutaneous lesions in lacaziosis and investigate its importance in the etiopathology of the disease. The results indicate that the abundance of collagen bands, together with weak immunolabeling for CD68 seen in macrophages, indicates a concomitant effect of TGF- β inhibiting macrophages and inducing fibrosis, which is responsible for the keloid aspect frequently acquired by these lesions. Finally, the evolution of the infection supports the hypothesis that TGF- β plays a fundamental role in the etiopathology of *Lacazia loboi* infection, either by inhibiting the cellular immune response mainly mediated by macrophages or by inducing fibrosis. Further studies are necessary to better characterize the phenotype of the inflammatory infiltrate as well as the participation of other cytokines and growth factors in the tissue response of the host in Jorge Lobo's disease.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Jorge Lobo's disease, or lacaziosis, formerly termed lobomycosis, is a chronic deep mycosis caused by infection with an agent of still uncertain phylogeny, that is, *Lacazia*

loboi [1,2]. The disease is more frequent in males, mainly affects individuals 21 to 40 years old, and is more prevalent on the South American continent [3]. Rare cases diagnosed in Europe were the result of accidental inoculation with contaminated material from a dolphin. Trauma and injuries or sites of insect bites facilitate penetration of the fungus. Lesion progression is slow, with new lesions arising contiguous to other lesions or through the lymphatic route [4,5].

Clinically, Jorge Lobo's disease manifests as solid, variable-sized nodular parakeloidal lesions. The lesions are most frequently located in the auricle and on the upper and

[☆] This study was supported by grants from the Conselho Nacional de Pesquisa-CNPq (to J.A.S.Q.).

* Corresponding author. Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, Belém-PA 66055-240, Brazil.

E-mail address: acdebrito@uol.com.br (A. C. de Brito).

lower limbs and consist of atrophic epidermis, with rectification of the interpapillary crests. In the dermis, a grenz zone, dilated and newly formed vessels, fibrosis, and a dense infiltrate consisting of lymphocytes, foamy histiocytes rich in parasites, epithelioid cells, numerous giant cells (especially Langhans cells), some eosinophils, and plasma cells are observed [4-6].

Although a strong relationship exists between the disease and host immunity, little is known about the systemic and tissue immune response in *L. loboi* infection. Pecher et al [7] suggested the presence of cellular immunodeficiency in patients with Jorge Lobo's disease. Few studies are available in the literature characterizing the in situ cellular and humoral immune response profile [8], especially the involvement of cytokines, some of which exert immunosuppressive effects and may predispose to infection, for example, transforming growth factor β (TGF- β).

TGF- β is a member of the family of dimeric growth factor polypeptides. All mammal cells, including epithelial, endothelial, hematopoietic, neural, and connective tissue cells, produce TGF- β and its receptors, which are related to the processes of cell regulation, proliferation and differentiation, angiogenesis, embryo development, apoptosis induction, and wound healing [9]. TGF- β is a cytokine with a strong suppressive effect on macrophages, inhibiting the expression of nitric oxide and IFN- γ , in addition to suppressing Th1- and Th2-type cellular immune responses [9,10]. Since the first reports demonstrated the inhibitory effects of TGF- β on macrophage activity, several studies have analyzed the role of this cytokine in the regulation of the immune response during infectious processes including viral, bacterial, and protozoan infections [11]. Most of these studies indicate participation of TGF- β in the genesis and progression of some infections [11-15]. Thus, analysis of the expression of TGF- β in cutaneous lesions in Jorge Lobo's disease is important for understanding the etiopathology of the disease. The purpose of this study was to investigate the role of TGF- β 1 and macrophage in formalin-fixed skin biopsies from patients with *Lacazia loboi* infection using immunohistochemical staining for TGF- β 1 and the macrophage marker CD68.

2. Materials and methods

2.1. Diagnostic procedures and histologic examination

Samples of skin lesions of Jorge Lobo's disease were obtained from biopsy specimens from 25 patients (aged 25-80 years, 24% female, 76% male) from Ambulatory of Dermatology of Federal do Para University and Santa Casa Hospital (Belem, Brazil). The diagnosis was made by histopathology and identification of the agents in the lesions. Samples were fixed in 10% neutral-buffered formalin, followed by paraffin embedding, micron-thick sectioning, and staining by hema-

toxylin and eosin and Grocott stain. Tissue samples were stained by Masson's trichrome for quantification of fibrosis. We used a grid scale with 10×10 subdivisions in an area of 0.0625 mm^2 to count 10 fields under high magnification (400 \times) in the lesion. The project was approved by the Ethics and Research boards of the Tropical Medicine Center/Universidade Federal do Pará (UFPA).

2.2. Immunologic markers

An immunohistochemistry technique to characterize the CD68 and TGF- β 1 tissue activity in the cells followed the protocol originally described by Hsu et al [16]. For quantitative analysis of the positive cells in inflammatory infiltrate we used a grid scale with 10×10 subdivisions in an area of 0.0625 mm^2 to count 10 fields under high magnification (400 \times).

2.3. Negative and positive controls

For negative and positive controls, we included 14 skin samples from patients with tuberculoid and lepromatous leprosy and 14 skin samples that showed no morphological alterations.

2.4. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney and Spearman correlation tests. The level of significance for these analyses was established at $P \leq .05$. The analysis was performed using the GraphPad Prism 3.0 software for Windows (GraphPad Software, San Diego, Calif).

3. Results

The patients, 19 men and 6 women ranging in age from 25 to 80 years (mean, 59 years), were from the Amazon region, State of Para, Brazil, and predominantly (19 patients) consisted of farmers or laborers. The time to disease progression ranged from 4 to 64 years (mean, 19.56 years). Clinically, the lesions were located predominantly on the lower limbs and face and consisted of keloid infiltrative nodular or vegetative-verrucous lesions, frequently showing exulcerations covered with hematic crusts or discharging a purulent secretion (Fig. 1A and B).

Histopathological analysis revealed rectification of the epidermal crests and a granulomatous inflammatory infiltrate dispersed through the deep dermis and subcutaneous tissue (Fig. 2A). A narrow and well-defined grenz zone was frequently observed between the epidermis and the infiltrate. The granulomatous infiltrate consisted of frequent xanthomatous histiocytes in addition to epithelioid cells, Langhans and foreign body type giant cells, and occasional plasma cells and lymphocytes. Abundant round parasitic corpuscles



Fig. 1 Jorge Lobo's disease—Lesions on the lower limbs and abdomen consisting of keloid infiltrative nodular or vegetative-verrucous aspect (A, B).

surrounded by a double membrane with an empty center and an eosinophilic nuclear structure were noted (Fig. 2B). Parasites were abundant, especially in the cytoplasm of giant cells. Grocott staining revealed the highly characteristic aspect of the parasite (Fig. 2C). Expansion of collagen areas was observed in all cases and demonstrated by Masson's trichrome stain (Fig. 2D). The fibrosis was more intense than that observed in both lepromatous and tuberculoid leprosy and had a direct correlation to TGF- β intensity ($P \leq .05$).

Positive immunolabeling with CD68 for macrophages coincided with the granulomatous inflammatory infiltrate throughout the lesion (Fig. 2E). The immunolabeling intensity was homogenous throughout the lesion and among the different specimens examined. Compared with control cases of leprosy, the immunolabeling intensity was similar to that observed for cases of lepromatous leprosy and lower than that observed for cases of tuberculoid leprosy ($P \leq .05$) (Fig. 3A).

TGF- β labeling was observed in focal areas of the lesion and was quantitatively more intense when compared with control cases of tuberculoid leprosy ($P \leq .05$) and of similar

intensity compared with cases of lepromatous leprosy ($P \geq .05$) (Fig. 3B). The immunolabeling intensity was homogenous throughout the lesion and among the cases studied (Fig. 2F).

4. Discussion

Jorge Lobo's disease is a chronic deep mycosis whose prognosis in terms of survival is good, although treatment does not lead to complete cure of the infection [4,5]. Most patients present with long disease progression. The disease is clearly more common in males, although hormonal factors do not seem to influence the progression of infection [5]. Thus, progression is theoretically more associated with activities related to the mechanism of infection rather than with genetic or specific hormonal factors. This finding is confirmed by the relatively higher frequency of Jorge Lobo's disease among women who cultivate the land in some Amazonian tribes [17,18]. On the other hand, there are no studies correlating the immune response to Jorge Lobo's disease with specific HLA loci, a fact supporting the importance of fungal ecology in the mechanism of transmission and, consequently, in the different incidence of the disease between men and women [4,5].

Some investigators have reported the importance of immune response patterns related to the clinical presentation of subcutaneous mycoses such as chromoblastomycosis and Jorge Lobo's disease [8,19]. Clinical forms of chromoblastomycosis have been associated with the occurrence of an in situ immune response with a differentiated profile of cytokine expression, theoretically associated with a higher susceptibility to more severe forms of the disease depending on the profile found [19]. In Jorge Lobo's disease, Pecher et al [7] suggested the presence of cellular immunodeficiency despite the occurrence of lesions predominantly consisting of macrophages and giant cells phagocytosing a large quantity of fungal structures. On the other hand, there are no studies reporting aggravation or dissemination of lesions in cases associated with severe cellular immunodeficiency such as patients with HIV/AIDS, with the only case described by our group showing no differentiated lesion progression [20].

Despite this histologic feature which partly demonstrates the effectiveness of the macrophage-mediated immune response, comparison of the CD68 immunolabeling intensity between cases of Jorge Lobo's disease and tuberculoid leprosy revealed less intense labeling in Jorge Lobo's disease, implying lower metabolic activity in these cells, as CD68 is a 110-kd transmembrane protein located mainly in macrophage lysosomes (Fig. 3A) [21]. In addition to this weak immunolabeling of macrophages, reactivity to TGF- β was higher in Jorge Lobo's disease than in control cases of tuberculoid leprosy and similar to that observed in cases of lepromatous leprosy (Fig. 3B). The immunosuppressive

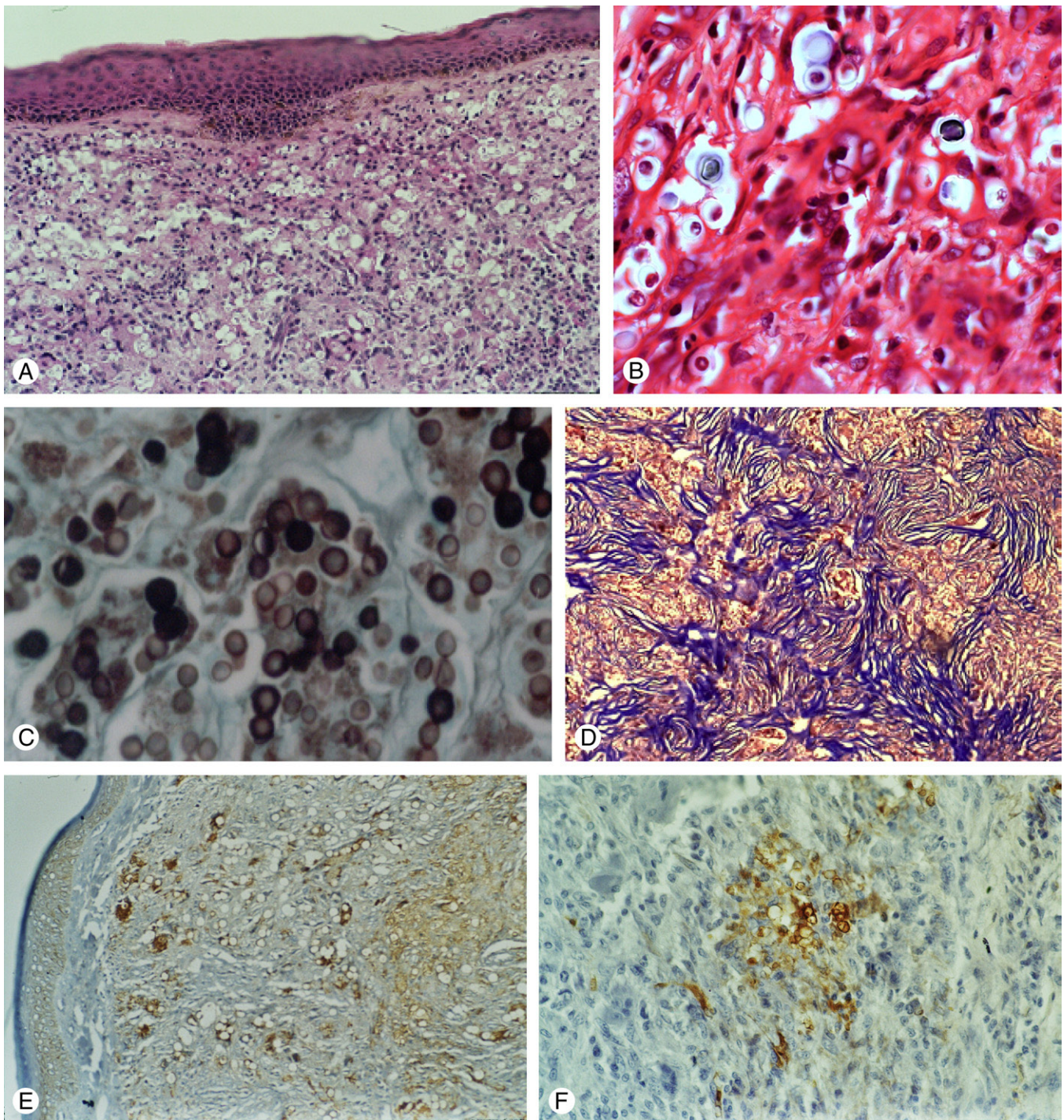


Fig. 2 Jorge Lobo's disease—Histopathology shows frequent structures of etiologic agents and abundant collagen (A-D). Immunohistochemistry with CD68 and TGF- β shows immunoreactive area in the lesions (E, F).

activity of TGF- β has been demonstrated in different models of infectious diseases [11-15]. Its ability to induce apoptosis of immune cells as well as to inhibit the cellular immune response has made TGF- β a determinant marker of susceptibility to chronic and acute infections such as leprosy, chronic hepatitis, and yellow fever [22-24]. The intense immunolabeling for TGF- β observed in cases of Jorge

Lobo's disease may explain in part the weak reactivity to CD68, as TGF- β is able to strongly inhibit macrophage activity, reducing the microbicidal efficacy of these cells. Macrophages are known to play a central role in the immune response to infection caused by various microbial agents such as mycobacteria and fungi. The microbicidal capacity of these cells is centered on the production of lytic enzymes by

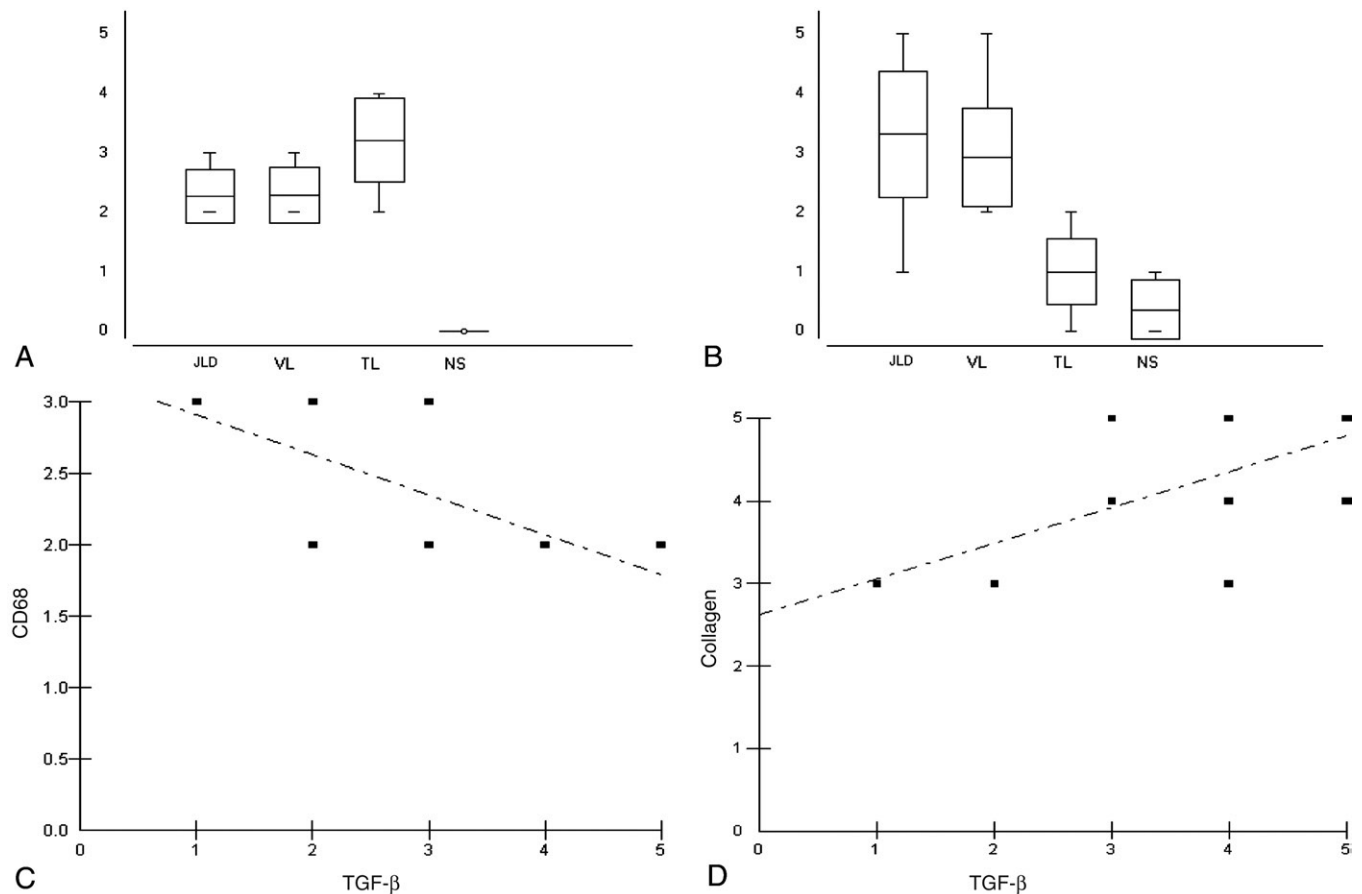


Fig. 3 Jorge Lobo's disease—Quantitative analysis with CD68 and TGF- β in lesions of Jorge Lobo's disease (JLD), Virchowian leprosy (VL), tuberculoid leprosy (TL), and normal skin (NS) (A, B). Correlation of CD68, TGF- β , and collagen proliferation in JLD, VL, TL, and NS (C, D) (Mann-Whitney and Spearman correlation test).

lysosomes that act on phagocytosed microbial agents [21]. The present data showed low cellular activity for a lysosome marker, that is, CD68, with weak reactivity in Jorge Lobo's disease. This finding may indirectly indicate a low efficacy in the activation of macrophage microbicidal factors, probably due to the activity of TGF- β (Fig. 3C).

The expansion of collagen areas observed in lesions from Jorge Lobo's disease calls attention to the ability of TGF- β to induce fibrosis in certain chronic infectious diseases such as hepatitis C [14]. In the skin, TGF- β plays a critical role in the regulation of extracellular matrix gene expression. Its overexpression is believed to contribute to the development of tissue fibrosis. The recent identification of Smad proteins, TGF- β receptor kinase substrates that translocate into the cell nucleus to act as transcription factors, has increased our understanding of the molecular mechanism underlying TGF- β action [25-28]. Immunoreactive TGF- β 1 has been observed diffusely in the dermis of mucocutaneous lesions in paracoccidioidomycosis, and the increased TGF- β 1 deposits in the fibrosis area after treatment [29]. Granulomas from tuberculous and sarcoidosis skin biopsy specimens were seen to contain cells with marked staining by antibodies to fibronectin, TGF- β , and type 1 procollagen (PCP-1) with

accentuated staining of extracellular matrix seen in both the granulomas and the peri-granulomatous regions [30]. The abundance of collagen bands in Jorge Lobo's disease, together with the weak immunolabeling for CD68 seen in macrophages, indicates a concomitant effect of TGF- β , inhibiting macrophages and inducing fibrosis, which is responsible for the keloid aspect frequently acquired by these lesions (Fig. 3D).

Finally, further studies are necessary to better characterize the phenotype of the inflammatory infiltrate as well as the participation of other cytokines and growth factors in the tissue response of the host in Jorge Lobo's disease.

References

- [1] Taborda PR, Taborda VA, McGinnis MR. *Lacazia loboi* gen.nov., comb. nov., the etiologic agent of lobomycosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37:2031-3.
- [2] Herr RA, Tarcha EJ, Taborda PR, Taylor JW, Ajello L, Mendoza L. Phylogenetic analysis of *Lacazia loboi* places this previously uncharacterized pathogen within the dimorphic Onygenales. *J Clin Microbiol* 2001;39:309-14.

- [3] Baruzzi RG, Lacaz CS, Souza FAA. História natural da doença de Jorge Lobo. Ocorrência entre os índios Caiabi (Brasil Central). *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1979;21:302-38.
- [4] Opromolla DVA, Madeira S, Belone AFF, Vilani-Moreno FR. Jorge Lobo's experimental inoculation in Swiss mice. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1999;41:359-64.
- [5] Opromolla DVA, Belone AFF, Taborda PRO, Taborda VBA. Correlação clinicopatológica em 40 casos novos de lobomycose. *An Brás Dermatol* 2000;75:425-34.
- [6] Rodriguez-Toro G. Lobomycosis. *Int J Dermatol* 1993;32:324-32.
- [7] Pecher SA, Croce J, Ferri RG. Study of humoral and cellular immunity in lobomycosis. *Allergol Immunopath* 1979;7:439-44.
- [8] Vilani-Moreno FR, Belone AF, Soares CT, Opromolla DV. Immunohistochemical characterization of the cellular infiltrate in Jorge Lobo's disease. *Rev Iberoam Micol* 2005;22:44-9.
- [9] Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 2000;342:1350-8.
- [10] Lebnan DA, Edmiston JS. The role of TGF-beta in growth, differentiation, and maturation of B lymphocytes. *Microbes Infect* 1999;1:1297-304.
- [11] Reed SG. TGF-beta in infections and infectious diseases. *Microbes Infect* 1999;1:1313-25.
- [12] Hall BS, Pereira MA. Dual role for transforming growth factor beta-dependent signaling in *Trypanosoma cruzi* infection of mammalian cells. *Infect Immun* 2000;68:2077-81.
- [13] Gantt KR, Schultz-Cherry S, Rodriguez N, et al. Activation of TGF-beta by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages. *J Immunol* 2003;170:2613-20.
- [14] Schuppan D, Krebs A, Bauer M, Hahn EG. Hepatitis C and liver fibrosis. *Cell Death Differ* 2003;1:S59-S67.
- [15] Wang H, Mengsteab S, Tag CG, et al. Transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms are associated with progression of liver fibrosis in Caucasians with chronic hepatitis C infection. *World J Gastroenterol* 2005;7:1929-36.
- [16] Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase technique: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedure. *J Histochem Cytochem* 1981;29:577-80.
- [17] Baruzzi RG, Castro RM, D'Andretta C, Carvalhal S, Ramos OL, Pontes PL. Occurrence of Lobo's blastomycosis among "Caiabi" Brazilian Indians. *Int J Dermatol* 1973;12:95-8.
- [18] Baruzzi RG, Marcopito LF, Vicente LS, Michalany NS. Jorge Lobo's disease (keloidal blastomycosis) and tinea imbricata in Indians from the Xingu National Park, Central Brazil. *Trop Doctor* 1982;12:13-5.
- [19] D'Ávila SCGP, Pagliari C, Duarte MIS. The cell-mediated immune reaction in the cutaneous lesion of chromoblastomycosis and their correlation with different clinical forms of the disease. *Mycopathol* 2003;156:51-60.
- [20] Xavier MB, Ferreira MM, Quaresma JAS, Brito AC. HIV and lacaziosis, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2006;12:526-7.
- [21] Weiss LM, Arber DA, Chang KL. CD68: a review. *Appl Immunohistochem* 1994;2:2-8.
- [22] Flisiak R, Prokopowicz D, Jaroszewicz J, Flisiak I. Plasma transforming growth factor-beta(1) in acute viral hepatitis. *Med Sci Monit* 2005;11:304-8.
- [23] Quaresma JAS, Barros VLRS, Fernandes ER, et al. Reconsideration of histopathology and ultrastructural aspects of the human liver in yellow fever. *Acta Trop* 2005;94:116-27.
- [24] Quaresma JAS, Barros VLRS, Pagliari C, et al. Revisiting the liver in human yellow fever: virus-induced apoptosis in hepatocytes associated with TGF-beta, TNF-alpha and NK cells activity. *Virology* 2006;345:22-30.
- [25] Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta signaling through the smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *J Invest Dermatol* 2002;118:211-5.
- [26] Branton MH, Kopp JB. TGF-beta and fibrosis: microbes. *Infect* 1999;1:1349-65.
- [27] Dennler S, Itoh S, Vivien D, ten Dijke P, Huet S, Gauthier JM. Direct binding of smad3 and smad4 to critical TGF-beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J* 1998;17:3091-100.
- [28] Imamura T, Takase M, Nishihara A, et al. Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature* 1997;389:622-6.
- [29] Parise-Fortes MR, Marques SA, Soares AM, Kurokawa CS, Marques ME, Peracoli MT. Cytokines release from blood monocytes and expressed in mucocutaneous lesions of patients with paracoccidioidomycosis evaluated before and during trimethoprim-sulfamethoxazole treatment. *Br J Dermatol* 2006;154:643-50.
- [30] Marshall BG, Wangoo A, Cook HT, Shaw RJ. Increased inflammatory cytokines and new collagen formation in cutaneous tuberculosis and sarcoidosis. *Thorax* 1997;52:588-91.

LOBOMYCOSIS: IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF LANGERHANS CELLS IN CUTANEOUS LESIONS

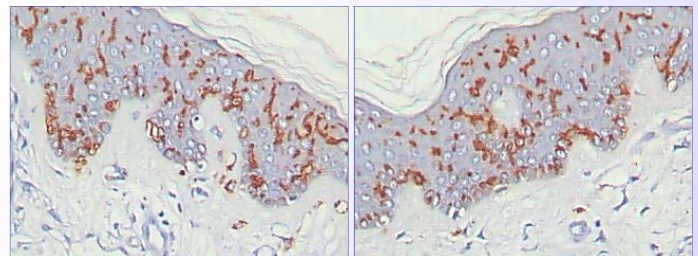
Pagliari, Carla⁽¹⁾; Stegun, Felipe⁽²⁾; Sotto, Mirian N⁽²⁾; Duarte, Maria Irma S⁽¹⁾; Unger, Débora⁽³⁾; Xavier, Marília B.⁽³⁾; Quaresma, Juarez A.S⁽³⁾; de Brito, Arival C.^{(3,4)*}.

1. Laboratory of Discipline of Pathology of Transmissible Diseases, University of São Paulo, Medical School, São Paulo, SP, Brazil
2. Division of Dermatology, University of São Paulo, Medical School, São Paulo
3. Federal University of Para, Tropical Medical Center, Belém, PA, Brazil.
4. Federal University of Para, Center of Health Sciences, Belém, PA, Brazil.

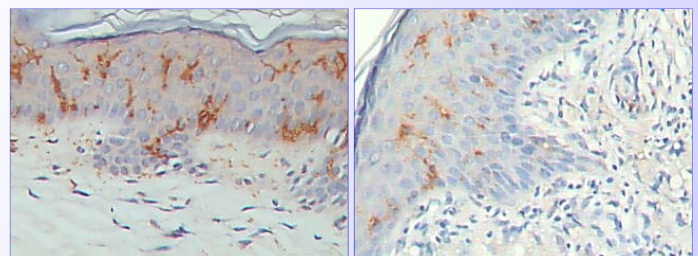
BACKGROUND/OBJECTIVES: Lobomycosis, a chronic infection caused by the fungus *Lacazia loboi*, is localized in tropical areas of Central and South America and is hyper endemic in areas of Amazonia region, Brazil. The infection is characterized by the appearance of keloid-like, ulcerated or verrucous, nodular or plaque-like cutaneous lesions. The agent is introduced directly into the dermis through a penetrating injury, such as a thorn prick or an insect bite. It is diagnosed with biopsy and, on histological examination, the lesions are composed by granulomas with multinucleated giant cells and chains of yeast-like cells. To the best of our knowledge, little is described concerning the local immune response. Considering that Langerhans cells constitute the first immunologic barrier in skin, our aim was to study this cell population in lobomycosis skin lesions.

METHODS: Thirty-three skin biopsies from patients with clinical and histopathological diagnosis of Lobomycosis constituted the group 1. The control group was constituted by ten biopsies from normal skin (group 2) and 42 biopsies from paracoccidioidomycosis (PCM) skin lesions (group 3), that share some semblances with lobomycosis. This group was characterized as presenting well-organized granulomas – group 3A (n=22) and biopsies with poorly-organized granulomas – group 3B (n=20). We performed an immunohistochemistry reaction using an anti-CD1a antibody (Serotec) and a streptavidin-biotin method. 3,3-diaminobenzidine (Sigma) was used as chromogen and the slides were counterstained with hematoxylin. Cells were evaluated by determining the epidermal area fraction with positivity for CD1a. The number of positive cells was statistically analyzed by the Graph Pad Prism version 3.00 for Windows using a Mann-Whitney test with the level of significance set at 95%.

RESULTS: Langerhans cells were visualized along the epidermis in all the cases. In biopsies from lobomycosis, the morphology and the number of Langerhans cells did not differ from normal skin ($p>0.05$). The number of this cell population was increased when compared to the PCM lesions when both groups (well- or poorly-organized granulomas) were considered ($p<0.05$). If we consider the morphology of Langerhans cells in PCM skin lesions, it is possible to observe that they present trophic alterations, a probable inactivation by fungal products or migration to the dermis to process antigens. However, in lobomycosis they are presented morphologically similar to the ones in normal skin, the same with their number. We could suppose that in lobomycosis the fungus presents some escape mechanism in order to keep Langerhans cells in epidermis and subvert the local immune system to evade the antigen presentation by those cells.

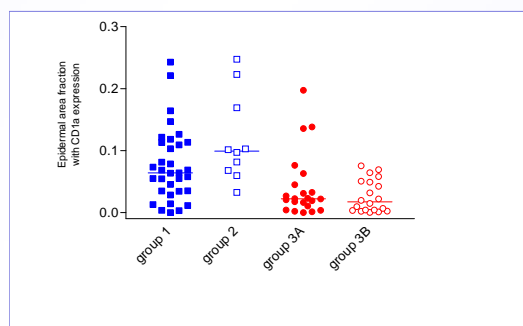


Lobomycosis – Epidermal Langerhans cells immunostained with anti-CD1a antibody. Streptavidin-biotin method x200



Normal skin - Epidermal Langerhans cells immunostained with anti-CD1a antibody. Streptavidin-biotin method x200

Paracoccidioidomycosis- Epidermal Langerhans cells immunostained with anti-CD1a antibody. Streptavidin-biotin method x200



CONCLUSION: Langerhans cells are presented in lobomycosis skin lesions similar to as they are presented in normal skin. Different from PCM, they do not suffer trophic or numerical changes. In lobomycosis, this cell population could not be related to the local immune response, what conduct us to study other cell populations as APC in these lesions.



Short communication

Immunohistochemical study of Langerhans cells in cutaneous lesions of the Jorge Lobo's disease

Juarez Antonio Simoes Quaresma^a, Debora Unger^b, Carla Pagliari^c, Mirian Nacagami Sotto^c, Maria Irma Seixas Duarte^c, Arival Cardoso de Brito^{a,b,*}

^a Laboratório de Imunopatologia, Núcleo de Medicina Tropical, UFPA, Belem-PA, Brazil

^b Disciplina de Dermatologia, Instituto de Ciências da Saúde, UFPA, Belem-PA, Brazil

^c Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, USP, Sao Paulo-SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 March 2008

Received in revised form

13 December 2009

Accepted 27 December 2009

Available online 4 January 2010

Keywords:

Lacaziosis

Lacazia loboi

Immunology

Dendritic cells

ABSTRACT

Jorge Lobo's disease is a chronic infection caused by the fungus *Lacazia loboi* endemic in South America. The infection is characterized by the appearance of parakeloidal, ulcerated or verrucous nodular or plaque-like cutaneous lesions. The histopathological aspect is characterized by poorly organized granulomas with histiocytes and multinucleated giant cells. Little is known about local immune response in lobomycosis skin lesions. Thirty-three skin biopsies from patients with Jorge Lobo's disease were selected from Ambulatory of Dermatology, UFPA. The control group was constituted by ten biopsies from normal skin. Langerhans cells were identified by immunohistochemistry using anti-CD1a antibody (Serotec). The number of positive cells was statistically analyzed. Langerhans cells were visualized along the epidermis in biopsies from Jorge Lobo's disease and the morphology and the number of Langerhans cells did not differ from normal skin ($p > 0.05$). In Jorge Lobo's disease, this cell population probably presents some escape mechanism of the local immune system to evade the antigen presentation by those cells.

© 2010 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Jorge Lobo's disease, or lacaziosis, is a chronic mycosis caused by uncultivated fungi pathogen *Lacazia loboi*, an agent phylogenetically closely related to the dimorphic pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* (Taborda et al., 1999; Vilela et al., 2005). The disease is more frequent in males, mainly affecting individuals in the age range of 21–40 years. Cases of lacaziosis have been described in various South American countries, but it assumes great importance in the Brazilian Amazon region where the largest numbers of these cases are found (Rodríguez-Toro, 1993; Pecher, 1994; Silva et al., 1996). Clinical progression is slow and characterized by parakeloidal cutaneous lesions mainly located in the auricle and lower limbs of humans (Rodríguez-Toro, 1993; Silva et al., 1996). Pecher and Funchs (1988) suggested the presence of cellular immunodeficiency in patients with Jorge Lobo's disease and few studies are available in the literature characterizing the *in situ* cellular and humoral immune response profile (Pecher and Funchs, 1988; Yates et al., 2007). The role of the immune response

in the evolutions of many skin infections disease has been described (Kharkar et al., 2007; Yates et al., 2007). The Langerhans cells (LC) have a very important role in these pathological evolutions (Nestle and Nickoloff, 1995; Azadeh and Dabiri, 2004). Langerhans cells initiate immune response by capturing and processing foreign antigens and then emigrating to the regional lymphnodes, where they present the processed antigen to naïve T cells (Hunger et al., 2004). Langerhans cells have been implicated in the maintenance of cutaneous homeostasis by inducing tolerance as well as stimulating immune responses. In many skin diseases with an enhanced influx of T lymphocytes, the total number of LCs increases in the epidermis and decreases after exposure to ultraviolet rays or toxic substances (Aberer et al., 1981; Cestari et al., 1995; Steinman and Germain, 1998; Koch et al., 2006). These cells are located in epidermis and are CD1a positive (CD1a+) by immunohistochemistry. CD1 proteins comprise a family of transmembrane glycoproteins expressed in association with β -2-microglobulin (Martin et al., 1987; Zeng et al., 1997), which are structurally related to antigen-presenting molecules of the major histocompatibility complex (MHC) class I but are encoded by a different gene locus.

The main objective of the present study was to investigate the possible role of Langerhans cells in the pathogenesis of Jorge Lobo's disease in tissue samples of skin lesions using immunohistochemistry technique.

* Corresponding author at: Núcleo de Medicina Tropical/UFPA, Av. Generalíssimo Deodoro 92, Umarizal, Belem-PA, 66055-240, Brazil.

E-mail address: acdebrito@uol.com.br (A.C. de Brito).

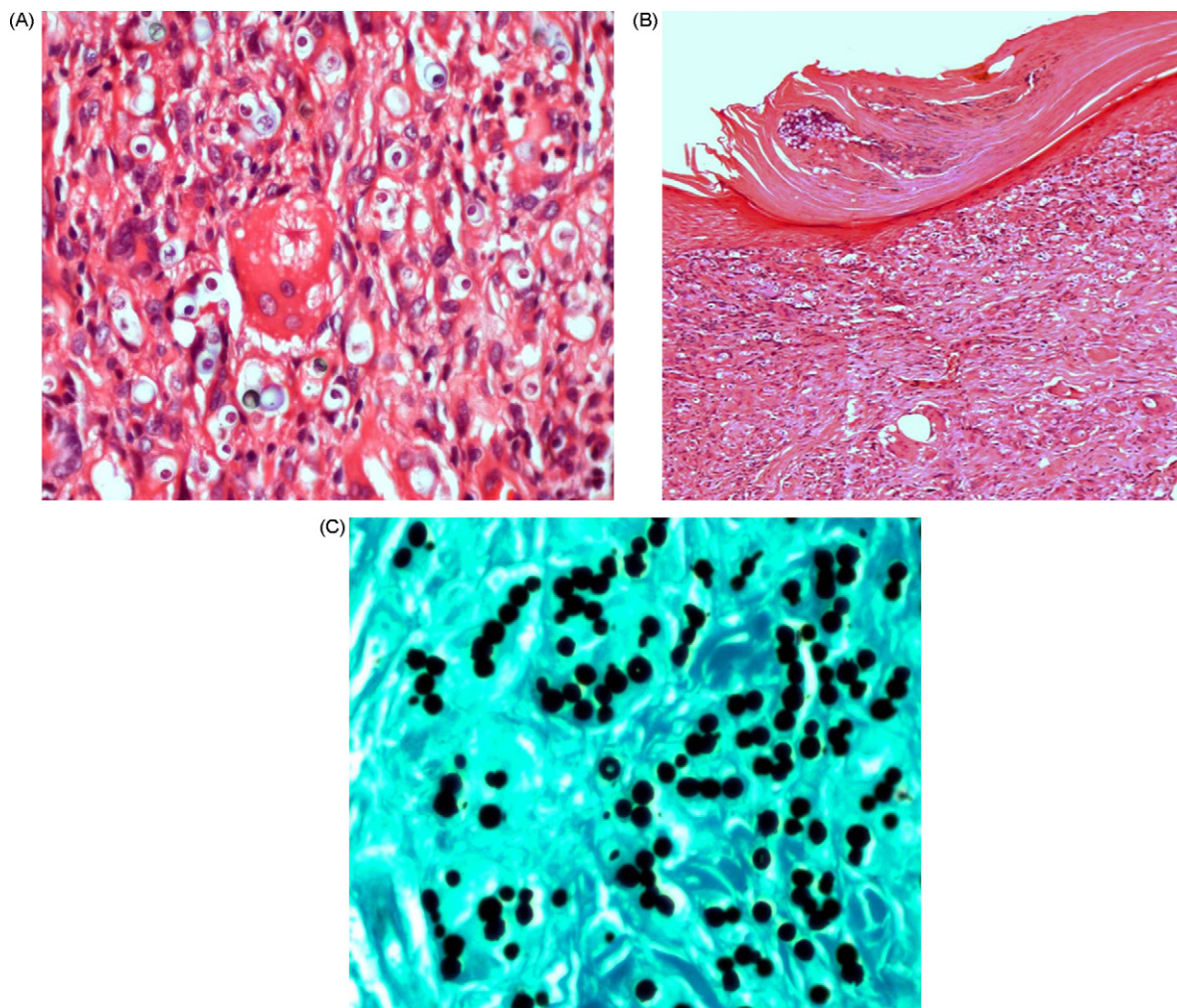


Fig. 1. Jorge Lobo's disease—Histopathological aspects shown inflammatory infiltrate of the dermis consisted of histiocytes, epithelioid cells, giant cells with parasitic corpuscles (A) frequently associated with asteroid corpuscles. Transepidermal release of the fungus in epidermis (B). Grocott stain shown fungus structures in the dermis (C) (A and C: $\times 400$; B: $\times 200$).

2. Materials and methods

2.1. Diagnostic procedures and histological examination

Samples of skin lesions of Jorge Lobo's disease were obtained by biopsy specimen of thirty-three patients from Ambulatory of Dermatology of Federal do Para University and Santa Casa Hospital (Belem, Brazil), with age between 25 and 80 years, 24% female and 76% male. The diagnosis was made by histopathologic aspects and identification of the agents in the lesions. Samples were fixed

in 10% neutral-buffered formalin, followed by paraffin embedding, micron-thick sectioned and stained by hematoxylin and eosin method and grocott stain.

2.2. Immunologic markers

We performed an immunohistochemistry reaction using an anti-CD1a antibody (Serotec) and a streptavidin-biotin method. The primary antibody is a monoclonal antibody (isotype IgG1) produced in mouse. A mouse primary antibody is first added, over-night at 4°C. The primary antibody is detected with a peroxidase-conjugated secondary antibody, applied for 15 min at room temperature. The next step is the bound peroxidase to catalyze oxidation of fluorescyl-tyramide for 15 min and finally a peroxidase-conjugated anti-fluorescein for 15 min. The negative

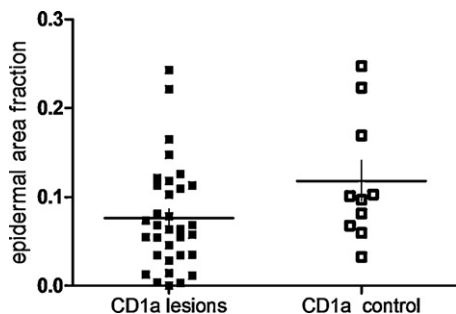


Fig. 2. Jorge Lobo's disease—Quantitative analysis of Langerhans cells in Jorge Lobo's disease and normal skin (Mann-Whitney test).

Table 1
Jorge Lobo's disease—Statistic analysis of the Langerhans cells in Jorge Lobo's disease and normal skin (Mann-Whitney test).

	JLD	NS
Mean \pm SD	0.07644 \pm 0.05902	0.1182 \pm 0.07141
Median	0.0639	0.0992
Variation	0–0.2428	0.0325–0.2474

JLD = Jorge Lobo's disease; NS = normal skin.

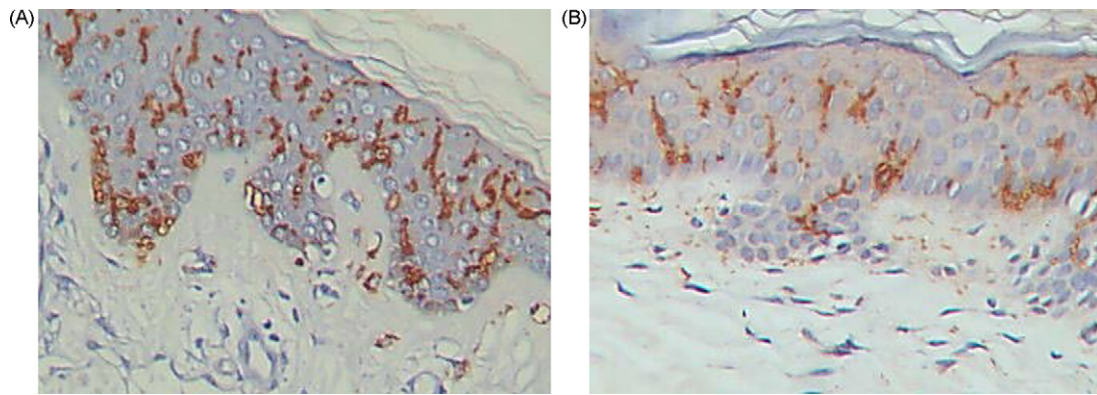


Fig. 3. Jorge Lobo's disease—Immunohistochemistry for Langerhans cells with anti-CD1a antibody shown positive cells in Jorge Lobo's disease (A) and normal skin (B). The morphology of Langerhans cells is similar to the ones in normal skin. Streptavidin–biotin method ($\times 200$).

controls were performed by omitting the primary antibody. For quantitative analysis of the positive cells we used a grid-scale with 10×10 subdivisions in an area of 0.0625 mm^2 . Cells were evaluated by determining the epidermal area fraction with positivity for CD1a (Pagliari and Sotto, 2003). The control group was constituted by ten biopsies from normal skin.

2.3. Statistical analysis and ethics aspects

The number of positive cells was statistically analyzed by the Graph Pad Prism version 3.00 for Windows using a Mann–Whitney test with the level of significance set at 95%. The project was approved by the Ethics and Research boards of the Tropical Medicine Center of Federal do Para University.

3. Results

The patients, 26 men and 7 women ranging in age from 25 to 80 years (mean of 59 years), were from the Amazon region, State of Para, Brazil, and predominantly consisted of farmers or laborers. The time of progression of the disease ranged from 4 to 64 years (mean time of 19.56 years). Clinically, the lesions were predominantly located on the lower limbs and face, and consisted of keloid infiltrative nodular or vegetative-verrucous lesions, frequently showing exulcerations covered with hematic crusts or discharging a purulent secretion.

Histopathological analysis revealed a granulomatous inflammatory infiltrate dispersed through the deep dermis and subcutaneous tissue. The granulomatous infiltrate consisted of frequent xanthomatous histiocytes, epithelioid cells, Langhans and foreign body type giant cells, lymphocytes and asteroid corpuscles (Fig. 1a). Transepidermic release of fungus also was a characteristic finding (Fig. 1b). Parasitic corpuscles surrounded by a double membrane were abundant especially in the cytoplasm of giant cells (Fig. 1c). Expansions of collagen areas were observed in all cases.

Langerhans cells were visualized along the epidermis in all the cases. The morphology of Langerhans cells in lobomycosis they are presented morphologically similar to the ones in normal skin, the same aspects is observed when we consider its number ($p > 0.05$) (Table 1) (Figs. 2 and 3a, b).

4. Discussion

Jorge Lobo's disease patients present evolutive symptoms of various years with multiple parakeloidal lesions plaques predominantly located on the lower limbs (De Brito and Quaresma, 2007). Some authors believe that the genesis of symptoms of Jorge Lobo's

disease is associated with cellular immune deficiencies (Vilani-Moreno et al., 2004a,b).

The number and morphology of Langerhans cells in PCM skin lesions, has demonstrated probable inactivation by fungal products or migration to the dermis to process antigens (Pagliari and Sotto, 2003). However, in Jorge Lobo's disease they are presented morphologically similar to the ones in normal skin, the same with their number. A similar aspect was demonstrated in previous study where the number of CD1a positive cells within the epidermis of lepromatous leprosy was not significantly different when compared with normal skin (Sieling et al., 1999). Some works have demonstrated that dendritic skin cells, when activated, are thought to have the function to regulate T and B responses (Nestle and Nickoloff, 1995). Moreover, dendritic cells may be important for the induction of immunological tolerance as well as for the regulation of the type of T-cell-mediated immune response (Yates et al., 2007). Vilani-Moreno et al. (2005) analyzing biopsy specimens obtained from 15 patients with Jorge Lobo's disease had shown that the poorly organized granuloma was constituted by histiocytes and multinucleated giant cells, and the identified immune cells showed CD68+ histiocytes, CD3+ T lymphocytes, CD4+ lymphocytes, CD8+ lymphocytes, CD57+ natural killer cells, CD79+ plasma cells, CD20+ B lymphocytes. In addition, Xavier et al. (2008) had shown high expression of TGF- β , an immunosuppressive cytokine, in the skin lesions of Jorge Lobo's disease. These findings, together with our data, suggest a possible immunoregulatory disturbance in the Jorge Lobo's patients. However, more investigations are necessary to elucidate the antigen presentation mechanism and the role of the innate immune response in Jorge Lobo's disease.

Acknowledgments

This work was supported by Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) grants 402738/2005-5 and 401223/2005-1 (to Dr. J.A.S. Quaresma).

References

- Aberer, W., Schuler, G., Stingl, G., Honigsman, H., Wolff, K., 1981. Ultraviolet light depletes surface markers of Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.* 76, 202–210.
- Azadeh, B., Dabiri, S., 2004. Langerhans cells in skin lesions of leprosy. *Iran. J. Med. Sci.* 29, 51–55.
- Cestari, T.F., Kripke, M.L., Baptista, P.L., Bakos, L., Bucana, C.D., 1995. Ultraviolet radiation decreases the granulomatous response to lepromin in humans. *J. Invest. Dermatol.* 105, 8–13.
- De Brito, A.C., Quaresma, J.A.S., 2007. Lacaziosis (Jorge Lobo's disease): review and update. *An. Bras. Dermatol.* 82, 461–474.
- Hunger, R.E., Sieling, P.A., Ochoa, M.T., Sugaya, M., Burdick, A.E., Rea, T.H., Brennan, P.J., Belisle, J.T., Blauvelt, A., Porcelli, S.A., Modlin, R.L., 2004. Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells. *J. Clin. Invest.* 113, 701–708.

- Kharkar, V., Bhor, U.H., Mahajan, S., Khopkar, U., 2007. Type I lepra reaction presenting as immune reconstitution inflammatory syndrome. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 73, 253–256.
- Koch, S., Kohl, K., Klein, E., von Bubnoff, D., Bieber, T., 2006. Skin homing of Langerhans cell precursors: adhesion, chemotaxis, and migration. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117, 163–168.
- Martin, L.H., Calabi, F., Lefebvre, F.A., Bilisland, C.A., Milstein, C., 1987. Structure and expression of the human thymocyte antigens CD1a, CD1b, and CD1c. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 9189–9190.
- Nestle, F.O., Nickoloff, B.J., 1995. Dermal dendritic cells are important members of the skin immune system. *Adv. Exp. Med. Biol.* 378, 111–116.
- Pagliari, C., Sotto, M.N., 2003. Dendritic cells and pattern of cytokines in paracoccidiodomycosis skin lesions. *Am. J. Dermatopathol.* 25, 107–112.
- Pecher, S.A., Funchs, J., 1988. Cellular immunity in lobomycosis (keliodal blastomycosis). *Allergol. Immunopathol.* 16, 413–415.
- Pecher, S.A., 1994. Deep mycoses in Latin America. *Med. Trop.* 54, 411–415.
- Rodriguez-Toro, G., 1993. Lobomycosis. *Int. J. Dermatol.* 32, 324–332.
- Sieling, P.A., Jullien, D., Dahlem, M., Tedder, T.F., Rea, T.H., Modlin, R.L., Porcelli, S.A., 1999. CD1 expression by dendritic cells in human leprosy lesions: correlation with effective host immunity. *J. Immunol.* 162, 1851–1858.
- Silva, D., Macedo, C., Oliveira, C., Unger, D., 1996. Micose de Jorge Lobo simulando forma gomosa: um caso raro. *An. Bras. Dermatol.* 71, 211–213.
- Steinman, R.M., Germain, R.N., 1998. Antigen presentation and related immunological aspects of HIV-1 vaccines. *AIDS* 12 (Suppl. A), S97–S112.
- Taborda, P.R., Taborda, V.A., McGinnis, M.R., 1999. *Lacazia loboi* gen. nov., comb. nov., the etiologic agent of lobomycosis. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2031–2033.
- Vilani-Moreno, F.R., Belone, A.F., Soares, C.T., Opromolla, D.V., 2005. Immunohistochemical characterization of the cellular infiltrate in Jorge Lobo's disease. *Rev. Iberoam. Micol.* 22, 44–49.
- Vilani-Moreno, F.R., Lauris, J.R., Opromolla, D.V., 2004a. Cytokine quantification in the supernatant of mononuclear cell cultures and in blood serum from patients with Jorge Lobo's disease. *Mycopathology* 158, 17–24.
- Vilani-Moreno, F.R., Silva, L.M., Opromolla, D.V., 2004b. Evaluation of the phagocytic activity of peripheral blood monocytes of patients with Jorge Lobo's disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 37, 165–168.
- Vilela, R., Mendonza, L., Rosa, O.S., Belone, A.F., Madeira, S., Opromolla, D.V., de Resende, M.A., 2005. Molecular model for studying the uncultivated fungal pathogen *Lacazia loboi*. *J. Clin. Microbiol.* 43, 3657–3661.
- Xavier, M.B., Libonati, R.M., Unger, D., Oliveira, C., Corbett, C.E., de Brito, A.C., Quaresma, J.A., 2008. Macrophage and TGF-beta immunohistochemical expression in Jorge Lobo's disease. *Hum. Pathol.* 39, 269–274.
- Yates, S.F., Paterson, A.M., Nolan, K.F., Cobbold, S.P., Saunders, N.J., Waldmann, H., Fairchild, P.J., 2007. Induction of regulatory T cells and dominant tolerance by dendritic cells incapable of full activation. *J. Immunol.* 179, 967–976.
- Zeng, Z., Castaño, A.R., Segelke, B.W., Stura, E.A., Peterson, P.A., Wilson, I.A., 1997. Crystal structure of mouse CD1: an MHC-like fold with a large hydrophobic binding groove. *Science* 277, 339–345.