

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

CLENIVALDO ALVES CAIXETA

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO ESTRÓGENO E DA PROGESTERONA
EM LESÕES BUCAIS DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

ALFENAS/MG
2017

CLENIVALDO ALVES CAIXETA

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO ESTRÓGENO E DA PROGESTERONA
EM LESÕES BUCAIS DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre do Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas da Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Odontologia
Orientador: Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann
Coorientador: Prof. Dr. Alessandro A. Costa Pereira

ALFENAS/MG
2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

C138e Caixeta, Clenivaldo Alves.

Expressão imuno-histoquímica do estrógeno e da progesterona em lesões bucais da paracoccidiodomicose / Clenivaldo Alves Caixeta. -- Alfenas/MG, 2017.

89 f. : il. –

Orientador: João Adolfo Costa Hanemann.

Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) – Universidade Federal de Alfenas, 2017.

Bibliografia.

1. Paracoccidiodomicose. 2. Estrógenos. 3. Progesterona. 4. Macrófagos. 5. Sistema imunológico. I. Hanemann, João Adolfo Costa. II. Título.

CDD - 616.969

Ficha Catalográfica elaborada por Ronan Lázaro Gondim



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG
Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 - Alfenas/MG - CEP 37130-000



CLENIVALDO ALVES CAIXETA

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO ESTRÓGENO E DA PROGESTERONA
EM LESÕES BUCAIS DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Mestre em
Ciências Odontológicas pela Universidade
Federal de Alfenas. Área de concentração:
Odontologia.

Aprovado em: 19 / 12 / 2017

Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Assinatura: João Adolfo C. Hanemann

Prof. Dr. Noé Vital Ribeiro Júnior
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Assinatura: Noé Vital Ribeiro Júnior

Prof. Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
ICB/UNIFAL-MG

Assinatura: Luiz Cosme Cotta Malaquias

Dedico este trabalho a Deus, por estar sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis e ter me dado forças para superar todas as dificuldades. Aos meus pais, irmãos e sobrinhos, por terem compreendido que era hora de mudar os caminhos da minha vida. E também jamais poderia deixar de dedicar este trabalho aos meus grandes amigos que estão ao meu lado há tantos anos.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus pela oportunidade que recebi de realizar este sonho e de me sentir como se tivesse nascido novamente. Passei por momentos muito difíceis nos últimos anos, mas sempre mantive a fé que as coisas melhorariam, e se hoje consigo terminar mais esta etapa da vida é graças a ele que consegui.

Aos meus pais e irmãos pela compreensão que tiveram comigo quando resolvi fazer uma completa mudança na minha vida. Não foi fácil, mas com perseverança e apoio destas pessoas que sempre estiveram ao meu lado consegui superar as adversidades.

Agradeço aos amigos que caminharam sempre ao meu lado, me apoiando e incentivando quando eu mais precisei. Neste grupo tenho a obrigação de incluir uma pessoa que foi absolutamente determinante em minha vida, o Professor Dr. João Adolfo Costa Hanemann. Respeito enormemente esta pessoa maravilhosa, mas além de tudo não posso o considerar apenas um professor, mas um grande amigo que tive o prazer de conhecer nesta vida. Há tantos anos já o conheço e nunca perdemos o contato e 10 anos depois de conhecê-lo tive o prazer de ser seu orientado. O meu muito obrigado por tudo.

Agradeço ao Professor Dr. Alessandro Antônio Costa Pereira por quem sempre tive um carinho enorme, desde a época de graduação e por quem tive excelentes oportunidades de aprender muito com ele. Sempre me atendeu muito bem e me ajudou em tudo que foi possível.

À Professora Dr^a. Marina Lara de Carli pela imensa colaboração desde a qualificação até as fases mais decisivas deste trabalho, sempre demonstrando grande sabedoria e disposição.

Ao Professor Dr. Noé Vital Ribeiro Júnior pelas inúmeras oportunidades de trabalhar ao seu lado e pelos enormes ensinamentos transmitidos.

Ao Professor Dr. Denismar Alves Nogueira que sempre esteve disposto para ajudar desde nas etapas iniciais dos resultados até a análise estatística final deste trabalho.

Ao Professor Dr. Felipe Fornias Sperandio pela sua importante participação nos artigos científicos e que ajudaram a me enriquecer este trabalho desde o período de qualificação.

À Professora Dra. Livia Maris Ribeiro Paranaíba pela sua importante participação na banca de qualificação, com questionamentos sensatos e coerentes que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Dra. Marta Miyazawa pelas importantes contribuições e sugestões durante as fases de resultados, discussão e conclusões.

À Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, na figura de sua pró-reitora, Prof^a. Dr^a. Eva Burger.

À Instituição Unifal-MG por fazer parte da minha vida para sempre. Aqui é minha segunda casa. Graduação e Pós-graduação nesta instituição maravilhosa e que também fica nesta cidade que eu amo.

À Faculdade de Odontologia, na figura do seu diretor, Prof. Dr. Edmêr Silvestre Pereira Júnior pela oportunidade oferecida.

A todos funcionários. Não vou citar nomes, pois eu poderia esquecer alguém, mas sem essas pessoas nada é possível de ser feito.

Aos colegas e amigos do Mestrado, em especial aos companheiros de departamento Nelson, Mayara, Joyce e Bianca, com quem sempre compartilhei conhecimentos e experiências.

À CAPES, pelo incentivo financeiro depositado neste trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho. Muito obrigado!

RESUMO

A paracoccidiodomicose (PCM) é uma infecção causada pelos fungos do gênero *Paracoccidioides*. A forma crônica é a mais comum e acomete principalmente os pulmões, mas pode se disseminar para outros órgãos produzindo lesões secundárias. Constitui-se uma doença de saúde pública com alto impacto econômico por comprometer a saúde dos trabalhadores durante sua fase produtiva, podendo chegar ao ponto de causar a sua morte. Essa doença é marcada por uma forte predileção pelo gênero masculino e essa diferença ocorre em virtude do 17β -estradiol exercer um efeito inibidor na transformação da forma de micélio em levedura. Os objetivos deste estudo foram avaliar a existência de receptores de estrógeno alfa (ER1) e receptores de progesterona (PR) em lesões orais da PCM crônica e procurar correlacionar com a quantidade de fungos e com o CD163 em homens e mulheres. Foram utilizados 32 fragmentos de biopsias da mucosa bucal de pacientes diagnosticados com a PCM, obtidos do Laboratório de Anatomopatologia da Unifal-MG e que foram submetidos à análise imuno-histoquímica pelos marcadores ER1, PR, Anti-*Pb* e CD163. Os resultados obtidos foram tabulados e realizou-se a análise estatística com os testes não paramétricos do coeficiente de correlação de Spearman e o Teste de Mann-Whitney, com um nível de significância de 5%. O ER1 foi expresso apenas em mulheres e, quando foi correlacionado com a quantidade de fungos, apresentou uma correlação positiva significativa ($r= 0,6844$, $p= 0,0034$). O PR foi expresso em ambos os gêneros, porém não apresentou correlação com a quantidade de fungo ($p= 0,8343$). A quantidade de fungos e a expressão do CD163 entre os gêneros não se mostraram significativas (respectivamente, $p= 0,8802$ e $p= 0,9699$). Os resultados indicaram que o ER1 pode ser mais expresso em mulheres e que a expressão deste hormônio está correlacionada positivamente com a quantidade de fungos. O PR foi expresso em ambos os gêneros e não mostrou nenhuma correlação com o ER1 e a quantidade de fungos. O CD163 não apresentou correlação com nenhum dos imunomarcadores.

Palavras-chave: Paracoccidiodomicose. Estrógeno. Progesterona. Macrófagos.
Imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is an infection caused by fungi of the genus *Paracoccidioides*. The chronic form is the most common and affects mainly the lungs, but can spread to other organs producing secondary lesions. It constitutes a public health disease with high economic impact by compromising the health of workers during their most productive lifespan, and may even lead to their death. PCM is marked by a strong predilection for males and this difference occurs as a result of the 17 β -estradiol inhibitory effect on mycelium turns into the pathogenic form of the yeast. The objectives of the present study were to evaluate the immunostaining of estrogen receptors alpha (ER1) and progesterone receptor (PR) in oral lesions of chronic PCM and correlate with the amount of fungi and CD163 expression in men and women. Third-two fragments of oral mucous membrane biopsy of patients diagnosed with PCM were included in the study. The specimens were obtained from the Laboratory of Oral Pathology of Unifal-MG and were subjected to immunohistochemical analysis by markers ER1, PR, *Pb* and CD163. The results were tabulated and the statistical analysis was performed using the nonparametric tests Spearman correlation coefficient and the Mann-Whitney Test, with a significance level of 5%. The ER1 was found only in women. A significant positive correlation was observed between estrogen and amount of fungi ($r = 0.6844$, $p = 0.0034$). Regarding PR was expressed in both genders, but showed no correlation with the amount the fungi ($p = 0.8343$). Moreover, there was no difference between genders considering oral fungal cell number and CD163 immunostaining ($p = 0.8802$ and $p = 0.9699$, respectively). The results indicated that the ER1 may be more expressed in women and that the expression of this hormone is positively correlated with the amount of fungi. The PR was expressed in both genders and showed no correlation with the ER1 and the amount of fungi. The CD163 showed no correlation with any of the immunomarkers.

Keywords: Paracoccidioidomycosis. Estrogens. Progesterone. Macrophages.
Immunohistochemical.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Vias de ativação dos macrófagos.....	31
Figura 2 -	Relação entre níveis hormonais e a taxa de incidência de doenças autoimunes.....	37
Figura 3 -	Aspectos microscópicos da PCM	48
Figura 4 -	Aspectos microscópicos da PCM	48
Figura 5 -	Aspectos microscópicos dos granulomas densos.....	50
Figura 6 -	Aspectos microscópicos dos granulomas frouxos.....	50
Figura 7 -	Ilustração da captura dos campos utilizando o software AxioVision Rel 4.8.2 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).....	54
Figura 8 -	Imagem imunomarcador ER1 após captura com o software.	54
Gráfico 1 -	Dados demográficos dos pacientes envolvidos no estudo....	56
Gráfico 2 -	Representação gráfica da dispersão do ER1 e do Anti- <i>Pb</i> em ambos os gêneros com o coeficiente de correlação de Spearman e sua significância.....	58
Figura 9 -	Expressão imuno-histoquímica do anticorpo ER1.....	59
Figura 10 -	Expressão imuno-histoquímica do Anti- <i>Pb</i>	59
Gráfico 3 -	Representação gráfica da dispersão do ER1 e do Anti- <i>Pb</i> em mulheres com o coeficiente de correlação de Spearman e sua significância.....	60
Gráfico 4 -	Representação gráfica da dispersão do ER1 e do PR em ambos os gêneros com o coeficiente de correlação de Spearman e sua significância.....	61
Gráfico 5 -	Representação gráfica da dispersão do ER1 e do CD163 em ambos os gêneros com o coeficiente de correlação de Spearman e sua significância.....	61
Figura 11 -	Expressão imuno-histoquímica do CD163	62
Figura 12 -	Expressão imuno-histoquímica do PR.....	62
Gráfico 6 -	Representação gráfica da dispersão do ER1 e do PR em mulheres com o coeficiente de correlação de Spearman e sua significância.....	63

Gráfico 7 -	Representação gráfica da dispersão do ER1 e do CD163 em mulheres com o coeficiente de correlação de Spearman e sua significância.....	64
Gráfico 8 -	Representação gráfica da dispersão do PR e do Anti- <i>Pb</i> em ambos os gêneros com o coeficiente de correlação de Spearman e sua significância.....	64
Gráfico 9 -	Representação gráfica da dispersão do PR e do Anti- <i>Pb</i> em mulheres com o coeficiente de correlação de Spearman e sua significância.....	65
Gráfico 10 -	Representação gráfica da dispersão do PR e do Anti- <i>Pb</i> em homens com o coeficiente de correlação de Spearman e sua significância.....	66
Gráfico 11 -	Representação gráfica da dispersão do PR e do CD163 em ambos os gêneros com o coeficiente de correlação de Spearman e sua significância.....	66
Gráfico 12 -	Representação gráfica da dispersão do PR e do CD163 em mulheres com o coeficiente de correlação de Spearman e sua significância.....	67
Gráfico 13 -	Representação gráfica da dispersão do PR e do CD163 em homens com o coeficiente de correlação de Spearman e sua significância.....	68
Gráfico 14 -	Representação gráfica da dispersão do CD163 e do Anti- <i>Pb</i> em ambos os gêneros com o coeficiente de correlação de Spearman e sua significância.....	68
Gráfico 15 -	Representação gráfica da dispersão do CD163 e do Anti- <i>Pb</i> em mulheres com o coeficiente de correlação de Spearman e sua significância.....	69
Gráfico 16 -	Representação gráfica da dispersão do CD163 e do Anti- <i>Pb</i> em homens com o coeficiente de correlação de Spearman e sua significância.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anti-CD163 -	Anticorpo para receptor CD163
Anti-Pb -	Anticorpo contra <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
ATPS -	3-aminopropil trietoxisilano
CD45 -	Proteína CD45
CD68 -	Proteína CD68
CD163 -	Proteína CD163
CGMs -	Células Gigantes Multinucleadas
C-L -	Conídio-Levedura
DES -	Dietilestilbestrol
DNA -	Ácido desoxirribonucleico
ER -	Receptor de estrógeno
ER1 -	Receptores do hormônio α -estradiol
ER2 -	Receptores do hormônio β -estradiol
E2 -	Estrógeno
GATA-3 -	Fator de transcrição de ação "trans" específico de células T
GlcNAc -	N-acetil-glucosamina
Gp-43 -	Glicoproteína de 43 kDa específica do <i>Pb</i>
HE -	Hematoxilina e eosina
HIV -	Vírus da Imunodeficiência Humana
HRT -	Terapia de reposição hormonal
IFN-γ -	Interferon gama
IgA -	Imunoglobulina A
IgE -	Imunoglobulina E
IgG -	Imunoglobulina G
IL-1 -	Interleucina 1
IL-1β -	Interleucina 1 beta
IL-2 -	Interleucina 2
IL-4 -	Interleucina 4
IL-5 -	Interleucina 5
IL-6 -	Interleucina 6
IL-10 -	Interleucina 10
IL-12 -	Interleucina 12

L-M -	Levedura-Micélio
LPS -	Lipopolissacarídeo
M-C-L -	Micélio-Conídio-Levedura
M-L -	Micélio-Levedura
mM -	Milimolar
MMPs -	Metaloproteinases de matriz
M/H -	Mulher e homem
M1 -	Macrófagos com ativação “clássica”
M2 -	Macrófagos com ativação “alternativa”
NK -	Células “natural killer”
PAS -	Ácido Periódico de Schiff
Pb -	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PB 01 -	<i>Paracoccidioides lutzii</i>
PBS -	Tampão fosfato-salino
PCM -	Paracoccidioidomicose
pH -	Potencial hidrogeniônico
PI -	<i>Paracoccidioides lutzii</i>
PR -	Receptor de progesterona
RNA_m -	Ácido Ribonucleico mensageiro
S1, PS2, PS3 e PS4 -	Complexo de espécies do <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
T-bet -	Fator de transcrição T-box
T CD4⁺ -	Linfócitos T “auxiliares”
TGF-β -	Fator de crescimento transformador beta
Th1 -	Subtipo 1 de linfócitos T “auxiliares”
Th2 -	Subtipo 2 de linfócitos T “auxiliares”
TNF-α -	Fator de necrose tumoral alfa
UFC -	Unidade formadora de colônia
Unifal -	Universidade Federal de Alfenas
μM -	Micrometros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Paracoccidiodomicose.....	16
2.2	Ação do estrógeno e da progesterona sobre os tecidos.....	24
2.3	Aspectos imunológicos.....	29
2.4	Ação dos hormônios sobre a resposta imunológica.....	36
3	OBJETIVOS	46
4	MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1	Questões éticas.....	47
4.2	Casuística, seleção e preparo da amostra.....	47
4.3	Análise microscópica qualitativa.....	49
4.4	Reação imuno-histoquímica.....	51
4.5	Análise imuno-histoquímica.....	53
4.6	Análise estatística.....	55
5	RESULTADOS	56
6	DISCUSSÃO	71
7	CONCLUSÕES	77
	REFERÊNCIAS	78
	ANEXO	87

1 INTRODUÇÃO

A paracoccidiodomicose (PCM) é uma micose sistêmica profunda, endêmica na América Latina e causada pelos fungos dimórficos do gênero *Paracoccidioides* (RESTREPO et al., 2011; SHANKAR et al., 2011). É uma doença restrita aos países latino-americanos, sendo que 80% do total de casos registrados são no Brasil (SHANKAR et al., 2011; SIFUENTES-OSORNIO; CORZO-LEÓN; PONCE-DE-LEÓN, 2012). A infecção ocorre pela inalação de propágulos de conídios ou fragmentos de micélios e acomete principalmente trabalhadores rurais que cultivam o solo (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993).

A doença pode se manifestar principalmente sob as formas aguda e crônica (SHIKANAY-YASUDA et al., 2006). A forma aguda acomete mais indivíduos jovens e com distribuição igual entre os gêneros (SHANKAR et al., 2011). Já a forma crônica acomete indivíduos entre 30 e 60 anos, representa mais de 90% dos casos e acomete preferencialmente homens numa razão de 11:1 (RESTREPO et al., 2011; SHANKAR et al., 2011). A infecção primária ocorre nos pulmões, mas se houver a disseminação dos fungos, outros órgãos e tecidos poderão desenvolver lesões secundárias, dentre eles a mucosa bucal (ALMEIDA; JORGE-JÚNIOR; SCULLY, 2003; SHIKANAY-YASUDA et al., 2006).

A ampla predileção da PCM crônica para o gênero masculino é atribuída, dentre outros fatores, à presença dos hormônios femininos que impedem a transformação da forma de micélio em levedura (SHANKAR et al., 2011). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o hormônio Estradiol (E2) possui um efeito inibitório na transição morfológica Micélio-Levedura (M-L), indicando que os hormônios femininos exercem uma influência direta sobre o desenvolvimento da doença (RESTREPO et al., 1984; SALAZAR; RESTREPO; STEVENS, 1988). A descoberta da existência de um receptor para o estrógeno no citosol do micélio foi um achado muito importante, pois permitiu compreender como ele atua promovendo a inibição do dimorfismo e conferindo maior proteção às mulheres (LOOSE et al., 1983).

Alguns órgãos e tecidos do corpo humano, como por exemplo as glândulas mamárias e a vagina, apresentam receptores para o estrógeno e sofrem influência direta dos seus efeitos, sendo chamados de “órgãos-alvos” ou “tecidos-alvos”. No entanto, diversos outros tecidos também demonstraram apresentar receptores de estrógenos, como músculo cardíaco, músculo liso, pulmão e fígado (ENMARK et al.,

1997; FAIRWEATHER; FRISANCHO-KISS; ROSE, 2008; LUKITIS et al., 2007). Alguns estudos indicaram que os receptores de estrógeno (ER) também estão presentes na mucosa bucal e em glândulas salivares, e que eles estão presentes em um número maior do que se pensava anteriormente (LEIMOLA-VIRTANEN et al., 2000; VALIMAA et al., 2004).

A presença destes receptores em tecidos “não-alvos” é importante e pode ajudar a compreender como os hormônios esteroides femininos podem exercer influência sobre estes tecidos oferecendo maior proteção ou predispondo ao aparecimento de algumas doenças, como tem sido visto em doenças tropicais infecciosas como a amebíase, a PCM e a leishmaniose (BERNIN; LOTTER, 2014); doença periodontal (WANG; MCCAULEY, 2016); e também em doenças autoimunes, como a artrite reumatoide e o lúpus eritematoso (FAIRWEATHER; CIHAKOVA, 2009; STRAUB, 2007).

Na PCM, o estrógeno atua exercendo um efeito protetor impedindo a transição M-L, porém a instalação e o desenvolvimento da doença no hospedeiro estão diretamente relacionados à integridade do sistema imunológico e a capacidade deste em eliminar o fungo (WANKE; AIDÉ, 2009). Um padrão de resposta imune celular T helper 1 (Th1) leva a uma produção de citocinas pró-inflamatórias que promovem a ativação de macrófagos M1 pela “via clássica”, além de ativar linfócitos T auxiliares (T CD4+) e T citotóxicos (T CD8+), resultando em granulomas densos, poucos fungos e infecção benigna localizada (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

Já o padrão de resposta imune T helper 2 (Th2), é marcado pela ativação de macrófagos M2 pela “via alternativa”, presença de citocinas anti-inflamatórias, baixa produção de células T e altos títulos de anticorpos, sendo incapazes de conter a propagação da infecção (RESTREPO et al., 2011). Além disso, no momento do diagnóstico da doença também pode ser notada uma linfopenia que ocorre pela diminuição de T CD4+, levando a uma menor produção de citocinas e conseqüentemente menor resistência à infecção. Para a PCM, a resposta imune específica ou humoral não é significativa e desempenha apenas um papel coadjuvante (ABREU E SILVA et al., 2013).

A resposta inflamatória contra os fungos se dará através da formação de um granuloma formado por grandes quantidades de macrófagos, células dendríticas e linfócitos, e que constitui uma resposta imune específica para tentar impedir a disseminação dos patógenos (BRITO; FRANCO, 1994). A sua formação está

condicionada à resposta imunológica do hospedeiro, sendo classificados em densos ou frouxos, e que poderão conferir respectivamente maior ou menor resistência (ABREU E SILVA et al., 2013).

Os macrófagos são as principais células que irão atuar na PCM e expressam em sua superfície uma superfamília de receptores *scavenger*, dentre eles o CD163 (FABRIEK; DIJKSTRA; VAN DEN BERG, 2005; VAN DEN HEUVEL et al., 1999). O CD163 é um receptor expresso em altos níveis pelos M2 e serve para a diferenciação entre M1 e M2 (HEUSINKVELD; VAN DER BURG, 2011). Os M2 podem ser identificados pelo anticorpo CD163 através de análise imuno-histoquímica (CARLI et al., 2016).

O sistema imune também possui uma estreita relação com o sistema reprodutor, especialmente em fêmeas, onde os hormônios sexuais atuam promovendo diversos efeitos, entre eles o estímulo à produção de anticorpos de várias classes (GROSSMAN, 1984). Mulheres também apresentam melhor resposta inflamatória frente às infecções, porém estão mais sujeitas a terem doenças autoimunes (SALEM, 2004; STRAUB, 2007).

O estrógeno (E2) tem sido associado com a supressão de citocinas pró-inflamatórias e estimulação de citocinas anti-inflamatórias (STRAUB, 2007). Esse efeito imunomodulador sobre as citocinas está correlacionado com a polarização das respostas Th1 e Th2 dos macrófagos (FAIRWEATHER; CIHAKOVA, 2009). Este padrão de resposta imune está diretamente relacionado com a apresentação clínica da PCM, onde pacientes com resposta imune Th2 tem sido relacionada a casos mais graves, e Th1 com a doença mais localizada (PARISE-FORTES et al., 2011; RESTREPO et al., 2011; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

Recentemente, estudos em camundongos também têm sido realizados para tentar ajudar a compreender melhor a diferença no padrão de resposta entre machos e fêmeas. Os resultados têm demonstrado claramente que o ambiente hormonal interfere na resposta imune, principalmente através das observações em animais castrados (ARISTZÁBAL et al., 2002; PINZAN et al., 2010).

Sendo assim, essa complexa interação entre o sistema imune e os hormônios esteroides pode ajudar a entender as diferentes respostas imunes de homens e de mulheres, e auxiliar a explicar a grande diferença de casos de PCM entre os gêneros (SHANKAR et al., 2011).

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura será dividida em tópicos e abordará os seguintes assuntos: paracoccidioidomicose, ação do estrógeno e da progesterona sobre os tecidos, aspectos imunológicos e ação dos hormônios sobre a resposta imunológica.

2.1 Paracoccidioidomicose

A PCM foi inicialmente descrita em 1908 por Adolfo Lutz que, na ocasião, observou a presença de lesões bucais e linfadenopatia cervical em dois pacientes, denominando como “Doença de Lutz”. Em 1912, Afonso Splendore realizou a caracterização morfológica e biológica do patógeno e sugeriu o nome *Zymonema brasiliensis* para os fungos. Somente em 1930, Floriano de Almeida propôs o nome de *Paracoccidioides brasiliensis*. O nome blastomicose sul-americana foi usado por muito tempo, mas foi retirado após descobertas de algumas áreas da América Central e do México também apresentarem a doença, e assim, apenas em 1971 que a Organização Mundial de Saúde reconheceu definitivamente com o nome de paracoccidioidomicose (ABREU E SILVA et al., 2013; ALMEIDA; JORGE-JÚNIOR; SCULLY, 2003; RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008).

A doença é causada pelos fungos termodimórficos do gênero *Paracoccidioides* (ARANTES et al., 2016). Por muitos anos acreditou-se que o *Paracoccidioides brasiliensis* (*Pb*) era a única espécie deste gênero, entretanto, análises moleculares identificaram que o *Pb* não é uma espécie única, mas um complexo de quatro espécies filogenéticas (S1, PS2, PS3 e PS4) com diferentes traços evolutivos e distribuição geográfica (COLOMBO et al., 2011). Recentemente, outras análises foram realizadas com o objetivo de estabelecer relações filogenéticas do *Pb*, porém revelaram a existência de uma nova espécie, a PB01, que recebeu o nome de *Paracoccidioides lutzii* (*Pl*) (SHANKAR et al., 2011). Desta forma, atualmente tanto o *Pb* (e suas subespécies) quanto o *Pl* podem causar a PCM (ARANTES et al., 2016).

Esses fungos estão presentes na América Latina, sendo encontrados desde o norte do México até o sul da Argentina (ALMEIDA; JORGE-JÚNIOR; SCULLY, 2003; SHANKAR et al., 2011; SILVA et al., 2007). A infecção é restrita ao continente americano e as espécies apresentam diferentes distribuições globais. Para o

complexo *Pb*, o subtipo S1 já foi isolado no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela; o PS2 no Brasil e Venezuela e o PS3 é encontrado apenas na Colômbia (ARANTES et al., 2016; SIFUENTES-OSORNIO; CORZO-LEÓN; PONCE-DE-LEÓN, 2012). Já a espécie *Pl*, foi registrada apenas no Brasil, em todos os estados do Centro-Oeste, Rondônia, Pará e casos isolados no Espírito Santo, São Paulo e Paraná (ARANTES et al., 2016).

O Brasil é o país mais afetado com mais de 80% dos casos registrados, seguido por Colômbia, Venezuela, Equador e Argentina (SHANKAR et al., 2011). Existem três áreas de endemicidade, sendo uma grande área que compreende todos estados do Sudeste, Centro-Oeste (principalmente Goiás e Mato Grosso do Sul) e Sul (desde o Paraná até o norte do Rio Grande do Sul). Uma segunda área endêmica está localizada ao longo da fronteira oriental da região amazônica, incluindo os Estados do Pará, Maranhão e Tocantins e a terceira área que se tornou mais relevante desde final dos anos 90 e que abrange a região amazônica ocidental e principalmente o estado de Rondônia (MARTINEZ, 2015).

A endemicidade no território brasileiro é justificada pelas condições locais do solo (úmido, rico em matéria orgânica e recoberto por vegetação) e pelo clima tropical ou subtropical com temperaturas entre 17°C e 24°C. A presença de verões chuvosos e invernos secos também são fatores que propiciam um ambiente favorável para o crescimento do fungo e sua posterior dispersão através dos ventos (BOCCA et al., 2013; RESTREPO et al., 2011; SILVA et al., 2007). O nicho ecológico do fungo ainda não está completamente esclarecido, mas acredita-se que seja o solo, principalmente pelo fato dos micélios serem saprófitas e também porque os seus hospedeiros silvestres (*Dasyus novemcinctus* e *Cabassous centralis*) vivem em íntimo contato com o mesmo (BOCCA et al., 2013).

A ocorrência de relatos de casos de PCM em locais fora da América Latina, incluindo Estados Unidos, Japão e Europa, estão associados a indivíduos que moraram ou visitaram áreas endêmicas. Recentemente, tem-se notado um aumento no número destes casos e esse aumento tem sido atribuído ao crescimento das atividades de ecoturismo, viagens internacionais e fenômeno da imigração, além do aumento da população mundial (SIFUENTES-OSORNIO; CORZO-LEÓN; PONCE-DE-LEÓN, 2012).

A PCM acomete principalmente trabalhadores que cultivam o solo contaminado pelo fungo, como atividades agrícolas (café, tabaco e algodão),

terraplanagem, preparo do solo, práticas de jardinagem e transporte de produtos vegetais (COLOMBO et al., 2011; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). Recentemente, o desmatamento e a grande expansão da agricultura e pecuária no estado de Rondônia, também foram associados com um aumento do número de casos nesta região (MARTINEZ, 2015). Entretanto, novas práticas agrícolas como a plantação de cana-de-açúcar, podem mudar esse cenário em certas regiões do Brasil, com consequente diminuição da incidência, uma vez que, o uso de pesticidas (incluindo antifúngicos derivados dos azóis) e a prática das queimadas, podem combinar para a eliminação dos fungos presentes no solo (COLOMBO et al., 2011; SIFUENTES-OSORNIO; CORZO-LEÓN; PONCE-DE-LEÓN, 2012).

A PCM representa uma importante causa incapacitante e de morte entre trabalhadores adultos jovens, com idade variando entre 30 e 60 anos, com predomínio para a quarta década, sendo que este é o período de vida mais produtivo (SHANKAR et al., 2011; WANKE; AIDÉ, 2009). Indivíduos com menor nível socioeconômico, condições higiênicas precárias, maior grau de desnutrição, além do uso de tabaco e álcool estão entre os mais afetados. Esses fatores contribuem para uma maior debilidade do sistema imunológico e favorecem assim a manifestação da doença (ABREU E SILVA et al., 2013; CAMARGO; FRANCO, 2000; MARTINEZ, 2015; PARISE-FORTES et al., 2011).

Os fungos *Pb* e *Pl* são dimórficos e se apresentam nas formas de micélios e leveduras. Os micélios (M) são encontrados na natureza a uma temperatura de 25°C, produzem colônias de crescimento lento (3-4 semanas) e são a forma infectante. As leveduras (L) são parasitárias, estão presentes nos exsudatos dos tecidos do hospedeiro e crescem em culturas a 37°C. A diferenciação morfológica micélio-conídio-levedura (M-C-L) é vital para a sua patogênese. Micélios e conídios não possuem virulência, mas uma vez transformados em leveduras tornam-se patógenos agressivos (SHANKAR et al., 2011).

A infecção ocorre pela inalação de conídios (C) ou de propágulos de micélios que chegam ao epitélio alveolar e, neste local, a uma de temperatura de 37°C, acionam seu dimorfismo resultando em mudanças na sua parede celular levando a transformação para a forma parasitária de levedura (SHANKAR et al., 2011). Na maioria das vezes, a infecção é adquirida nas primeiras duas décadas de vida, mas dificilmente apresentam manifestações clínicas terminando por resolverem espontaneamente. Entretanto, o fungo pode persistir de forma latente e

potencialmente pode ser reativado numa fase mais tardia, frequentemente entre 30 e 50 anos (SHIKANAY-YASUDA et al., 2006). Apesar de ser a forma parasitária e patogênica, a levedura não é infecciosa e a transmissão entre os humanos não ocorre (BOCCA et al., 2013; BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993; MARTINEZ, 2015).

A instalação e o desenvolvimento da PCM estão condicionados à presença de alguns fatores como: tempo de exposição, quantidade de inóculos, patogenicidade e virulência do fungo; e fatores genéticos, nutricionais e imunes do hospedeiro no momento da infecção ou quando da reativação de focos latentes (ABREU E SILVA et al., 2013; WANKE; AIDÉ, 2009). Outras condições predisponentes são o alcoolismo e a nicotina; o primeiro por estar associado à desnutrição e imunossupressão, e o segundo por promover um desequilíbrio na relação Th1/Th2, favorecendo a infecção pelo patógeno (ABREU E SILVA et al., 2013). Finalmente, um fator de grande importância é a presença do hormônio 17-beta-estradiol, que atua na modulação da expressão de genes que irão regular o dimorfismo fúngico durante a transição de M-L (SHANKAR et al., 2011). Se este hormônio estiver em níveis adequados no momento da infecção, os propágulos infecciosos não serão capazes de se transformar em levedura no tecido e a progressão para a doença não irá ocorrer (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993).

Poucas horas após os conídios ou fragmentos de micélio chegarem ao epitélio alveolar, eles passam a adquirir a forma de levedura, com formato ovoides e que se reproduzem por brotamento ou gemulação (SHANKAR et al., 2011). Os fungos apresentam uma camada birrefringente, sendo que na forma de levedura a camada externa é formada pela α -1,3-glucana e na forma de micélio pela β -1,3-glucana. A camada interna da parede celular é espessa e é formada por quitina justaposta à membrana citoplasmática (ALMEIDA; JORGE-JÚNIOR; SCULLY, 2003). A patogenicidade e capacidade de invasão do fungo parecem estar associadas com a α -1,3-glucana e com algumas proteases como a Gp-43, que é uma glicoproteína de 43 kDa que apresenta efeitos proteolíticos sobre o colágeno, a elastina e a caseína (PARISE-FORTES et al., 2011) e é o principal antígeno secretado pelo *Pb* além de ser o mais específico para o diagnóstico desta infecção (RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008). O *Pl* não expressa o Gp43 o que pode dificultar o diagnóstico laboratorial (ARANTES et al., 2016).

O curso clínico da doença pode ocorrer sob as formas: infecção subclínica, aguda (juvenil), crônica (adulta) e residual. A infecção subclínica é aquela onde não são encontrados nenhum sinal clínico, apesar do teste reativo para a paracoccidioidina apresentar resultado positivo. Não são observadas diferenças entre os gêneros, indicando que homens e mulheres estão igualmente infectados (RESTREPO et al., 2011).

A forma aguda predomina em crianças e adolescentes, mas eventualmente pode acometer indivíduos adultos até os 35 anos de idade e representa menos de 10% dos casos (SHANKAR et al., 2011). É a forma mais severa da doença, desenvolve-se dentro de poucas semanas ou meses e manifesta-se principalmente como hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, lesões osteoarticulares e tegumentares e apresenta distribuição igual entre os gêneros masculino e feminino (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). Por comprometer o sistema mononuclear fagocitário, pode levar a significativos níveis de mortalidade (BORGES-WALMSLEY et al., 2002).

A forma crônica ocorre em mais de 90% dos casos, manifesta-se principalmente em pacientes do gênero masculino (razão 11:1), com idade variando entre 30 e 60 anos, possui progressão lenta e que pode levar meses a anos para se manifestar clinicamente (SHANKAR et al., 2011). Afeta inicialmente os pulmões e pode levar a uma morbidade significativa devido ao comprometimento da função pulmonar. A infecção pode ficar restrita aos pulmões (unifocal) ou se disseminar por via linfática ou hematogênica, levando a forma multifocal, onde vários órgãos e tecidos irão apresentar lesões secundárias, sendo as mucosas bucal e nasal, pele, linfonodos e glândulas adrenais, os locais mais comumente acometidos pela infecção (SHIKANAY-YASUDA et al., 2006).

Atualmente, essa micose é considerada multissistêmica, independentemente da presença ou não de sinais/sintomas em um só órgão (SHANKAR et al., 2011). Quando o fungo adere e invade as células epiteliais ele deixa de ser reconhecido pelo sistema imunológico, o que pode facilitar sua disseminação pelo corpo sem ser reconhecido (MENDES-GIANNINI et al., 2008).

A forma residual também é reconhecida e representa as sequelas das infecções prévias da forma crônica progressiva da doença. Essa condição dificilmente responde ao tratamento antifúngico por causa da intensa fibrose desenvolvida. Dentre as sequelas incluem: cor pulmonale, incapacidade pulmonar progressiva,

microstomia, perfuração do palato, disfonia, alterações fibrosas na laringe e traqueia (RESTREPO et al., 2011).

As diferentes manifestações clínicas, incluindo a assintomática, resultam de fatores relacionados ao hospedeiro, tais como idade, gênero e estado imunológico, bem como características do agente infeccioso, especialmente sua virulência (MENDES-GIANNINI et al., 2008; RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008; UNTERKIRCHER et al., 2004).

Em muitas situações, os pacientes com PCM podem apresentar outras doenças concomitantes, como a tuberculose e a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, o que pode fazer a taxa de mortalidade elevar por causa de um maior comprometimento generalizado do sistema imunológico (LOTH et al., 2011). A tuberculose é a doença mais comumente associada, podendo estar presente em até 15% dos casos (MARTINEZ, 2015). Muitas vezes a PCM pode ser confundida com a tuberculose e tratada como se fosse esta, na ausência de confirmação de teste microbiológico. Além disso, também tem sido relatado que, em situações onde ambas condições estão presentes, e o paciente estiver fazendo uso de rifampicina e itraconazol simultaneamente para o tratamento destas enfermidades, que os níveis sanguíneos de itraconazol são impressionantemente diminuídos (RESTREPO et al., 2011).

A PCM tem uma incidência surpreendentemente baixa em pacientes soropositivos para o vírus da imunodeficiência humana (HIV), provavelmente explicado pela menor prevalência de HIV em áreas de zona rural e também pelo uso extensivo de antifúngicos em pacientes infectados pelo vírus (ALMEIDA; JORGE-JÚNIOR; SCULLY, 2003). Outras comorbidades infecciosas que podem acontecer são: enteroparasitoses, exacerbação infecciosa da doença pulmonar obstrutiva crônica, leishmaniose, hanseníase, sífilis, doença de Chagas e outras micoses. Comorbidades não-infecciosas como o Linfoma de Hodgkin ou outros carcinomas também podem estar presentes (SHIKANAY-YASUDA et al., 2006).

O diagnóstico é feito através da visualização do fungo em espécimes clínicos (escarro ou raspados de lesões cutâneas e mucosas) ou biópsia tecidual de algum órgão supostamente acometido. A cultura em ágar Sabouraud também pode ser utilizada, porém necessita de um tempo de crescimento geralmente superior a 30 dias (WANKE; AIDÉ, 2009). O exame radiográfico de tórax pode revelar áreas radiopacas

bilaterais e simétricas na zona média dos pulmões (padrão de asas de borboleta) associado com enfisema nas bases pulmonares (ABREU E SILVA et al., 2013).

Os critérios microscópicos para o diagnóstico de PCM são presença de hiperplasia pseudoepiteliomatosa; microabscessos intraepiteliais; presença de reação granulomatosa composta por células gigantes multinucleadas (CGMs) e um infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear, além de eosinófilos e neutrófilos; e, principalmente, a presença de estruturas circulares de parede birrefringente, correspondente ao fungo (SILVA et al., 2007). Brotamentos simples ou múltiplos com a presença da célula-mãe cercada por “brotos” também pode ser encontrada. Estas estruturas podem ser observadas em cortes histológicos corados pela técnica hematoxilina-eosina (HE), mas são mais facilmente identificadas quando coradas pelo ácido periódico de Schiff (PAS) ou pela técnica de Gomori-Grocott (ALMEIDA; JORGE-JÚNIOR; SCULLY, 2003; RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008).

O emprego de técnicas moleculares também tem contribuído muito para um correto diagnóstico, em virtude de sua alta especificidade e sensibilidade, particularmente quando se utiliza sondas de ácido desoxirribonucleico (DNA). Estas técnicas incluem a identificação molecular dos fungos através da imuno-histoquímica e da amplificação do DNA ribossomal pela Reação em Cadeia da Polimerase (ALMEIDA; JORGE-JÚNIOR; SCULLY, 2003).

A sorologia é importante no auxílio do diagnóstico e também no monitoramento do paciente durante o tratamento antimicótico (WANKE; AIDÉ, 2009). O uso de exoantígenos produzidos por diferentes cepas dos gêneros *Paracoccidioides* já estão sendo utilizados para aumentar a especificidade dos testes sorológicos, mas ainda necessitam ser melhorados (BOCCA et al., 2013). A imunodifusão dupla e a contraimunoeletroforese são boas alternativas. Já o ensaio de imunoabsorção enzimático (ELISA) não deve ser utilizado por causa de sua baixa especificidade, necessitar de uma cuidadosa padronização e ter uma interpretação de resultados mais difícil (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). Por causa do *Pi* não expressar a Gp43, a sorologia em muitos casos não é positiva, apesar do paciente estar infectado com o *Pb* (ARANTES et al., 2016).

Os testes intradérmicos são utilizados para mapear e quantificar a relevância da PCM em certas áreas endêmicas e não devem ser usados para diagnóstico da doença. Pacientes que já tiveram contato com o fungo em algum momento podem apresentar reação intradérmica positiva à paracoccidioidina ou à Gp43. A

porcentagem de indivíduos infectados pode variar de 0,9-82%, dependendo da localização geográfica e da população envolvida (COLOMBO et al., 2011). Para trabalhadores rurais de áreas endêmicas, população com maior risco de contrair a infecção, essa taxa pode variar de 50-75% (NUCCI; COLOMBO; QUEIROZ-TELLES, 2009). Magalhães et al. (2014) realizaram um estudo em 542 habitantes da zona rural no município de Alfenas – MG e encontraram uma positividade para a paracocidioidina de 46,67%, sendo que 56,30% eram do gênero masculino.

A PCM crônica possui ampla predileção para o gênero masculino (11:1), como foi demonstrado por diversos estudos epidemiológicos (SHANKAR et al., 2011). Essa diferença é explicada pela presença dos hormônios femininos que impedem a transformação da forma de micélio em levedura, quando o fungo entra em contato com o hospedeiro (RESTREPO et al., 1984). O fato de homens e mulheres estarem igualmente expostos ao fungo, porém diferentemente afetados pela doença; e a prevalência da doença clínica em pré-púberes ou mulheres pós-menopáusicas ser igual à encontrada em homens, demonstra claramente o efeito protetor dos hormônios (SHANKAR et al., 2011).

O acometimento primário se dá nos pulmões, mas o fungo pode se disseminar para vários órgãos, entre eles a mucosa bucal (MENDES-GIANNINI et al., 2008). As lesões bucais se caracterizam por uma hiperplasia granular eritematosa, entremeada por pontos hemorrágicos purpúreos e um aspecto superficial rugoso denominado “estomatite moriforme” (ALMEIDA; JORGE-JÚNIOR; SCULLY, 2003; SILVA et al., 2007). O envolvimento dos lábios causa um aumento pronunciado na espessura e consistência, conhecido como macroqueilia (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). Geralmente, estas lesões tendem a ser múltiplas e podem envolver lábios, gengiva, mucosa jugal, palato, língua e assoalho bucal (ALMEIDA; JORGE-JÚNIOR; SCULLY, 2003).

O diagnóstico diferencial deve incluir principalmente o carcinoma de células escamosas, devido ao aspecto clínico semelhante e uma associação das duas doenças com álcool e tabaco. A presença de lesões multifocais e dor na PCM podem contribuir para a diferenciação clínica (ABREU E SILVA et al., 2013). Também devem ser incluídos no diagnóstico diferencial linfoma, tuberculose, sarcoidose, sífilis, granulomatose de Wegener, actinomicose cervicofacial, histoplasmose, criptococose e leishmaniose (ABREU E SILVA et al., 2013; ALMEIDA; JORGE-JÚNIOR; SCULLY, 2003; RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008).

O tratamento é dividido em duas fases: ataque e manutenção. A fase de ataque objetiva reduzir os sinais, sintomas e a carga parasitária, visando recuperar a imunidade celular do paciente. A fase de manutenção é feita por tempos prolongados para evitar a recorrência da doença (PALMEIRO; CHERUBINI; YURGEL, 2005).

As medicações antifúngicas que podem ser usadas são os polienos (anfotericina B), derivados sulfamídicos (sulfadiazina) ou derivados azólicos (cetoconazol, fluconazol e itraconazol). A associação sulfametoxazol-trimetropin é a mais utilizada para formas leves e moderadas em tratamentos ambulatoriais, mas possuem a desvantagem de necessitar um longo período de tempo (até 24 meses) para o tratamento (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). O itraconazol é atualmente o mais indicado para as formas leves e moderadas, necessita menor tempo (6-12 meses), mas apresentam custo elevado e não estão disponíveis no Sistema Único de Saúde. A anfotericina B deve ser reservada para casos graves e refratários, devido a sua elevada toxicidade sistêmica (COLOMBO et al., 2009).

Além do tratamento medicamentoso, medidas de suporte geral como controle de outras infecções que estejam associadas, tratamento odontológico, nutrição adequada e encorajamento para cessar uso de tabaco e álcool, e reabilitação das sequelas, são fundamentais para a completa cura, que deverá incluir aspectos clínicos, imaginológicos e imunológicos (RESTREPO et al., 2011; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

Como sequelas, podem ser citadas a fibrose pulmonar (presente em 50% pacientes com infecção crônica), redução na função das glândulas supra-renais (e conseqüentemente desenvolvimento da doença de Addison), comprometimento do sistema nervoso central, fibrose nas mucosas com microstomia e estenose da traqueia, disfonia e obstrução laríngea (SHIKANAI-YASUDA, et al., 2006).

2.2 Ação do estrógeno e da progesterona sobre os tecidos

O estrógeno e a progesterona são moléculas hidrofóbicas que se ligam aos seus receptores intracelulares. O mecanismo de ação desses hormônios está relacionado com sua absorção pelas “células-alvo” e sua interação com receptores citoplasmáticos, formando um complexo com o receptor do hormônio que é transportado para o núcleo e podendo assim estimular a síntese proteica (AGHA-HOSSEINI; TIRGARI; SHAIGAN, 2006).

A utilização de modelos humanos e animais demonstrou que os hormônios podem influenciar na resposta imune e na progressão de certas doenças infecciosas tropicais, como amebíase, PCM e leishmaniose (BERNIN; LOTTER, 2014).

Baseados em dados epidemiológicos, Loose et al. (1983) levantaram a hipótese de que o ambiente hormonal do hospedeiro poderia afetar diretamente a patogenicidade da PCM. Os autores demonstraram a existência de uma proteína de ligação ao estrógeno no citosol do micélio e que esta tem um importante papel na inibição da transformação da forma de micélio à levedura, justificando assim a baixa incidência de casos em mulheres adultas.

Após esta descoberta, Restrepo et al. (1984) realizaram um estudo *in vitro* e procuraram investigar se o hormônio Estradiol (E2) seria capaz de inibir as transições morfológicas M-L e L-M. Os autores encontraram que o E2 em concentrações relevantes atua especificamente na transição M-L, mas não na transição L-M. Este mesmo estudo também realizou um ensaio espectrofotométrico com o objetivo de avaliar se o E2 teria efeito também na inibição do crescimento das leveduras. Os resultados revelaram que o E2 não interferiu no crescimento, portanto o E2 só apresenta efeito inibitório na transição M-L. Desta forma, concluíram que as fêmeas adultas podem exercer uma influência direta no estabelecimento da doença através do bloqueio da transição de micélio em leveduras, mas uma vez que esta transição já tinha ocorrido, o E2 não promove efeito protetor.

Posteriormente, Salazar; Restrepo; Stevens, (1988) procuraram investigar *in vivo* os efeitos da inibição do E2 na transição M-L, pois até então as pesquisas eram feitas apenas com fragmentos de micélios e esta forma poderia não ser a mais infectante. Utilizando-se de técnicas específicas para separar conídios, procuraram avaliar o papel do E2, do dietilestilbestrol (DES) e de hormônios sexuais análogos à testosterona (17 α -estradiol, tamoxifeno e hidroxitamoxifeno). Obtiveram como resultados que a conversão C-L foi reduzida quando as concentrações de E2 estavam mais altas. O estrógeno sintético foi ligeiramente menos inibidor e os outros hormônios não interferiram na conversão normal de conídios em leveduras.

A relação entre a concentração dos hormônios e seus efeitos em níveis fisiológicos não apresentam uma concordância exata, pelo menos em estudos *in vitro*. Alguns fatores deste sistema podem afetar a atividade hormonal, como: a interação com componentes do ágar, o efeito do ambiente microaerofílico, diferenças entre a afinidade dos ligantes para células intactas e células interrompidas. Além disso, no

sistema *in vivo*, outros fatores podem estar atuando, como a presença de E2 e progesterona circulantes que podem promover um efeito adicional, um fungo intacto pode concentrar hormônio ou a função pode ser regulada com apenas alguns receptores ocupados (SHANKAR et al., 2011).

Ambos os gêneros podem ser infectados, entretanto a PCM é muito mais prevalente em homens (RESTREPO et al., 2011). Aristizábal et al. (1998) realizaram um estudo *in vivo* e demonstraram o efeito dos hormônios femininos sobre a transição C-L. Utilizando-se de 3 ratos machos e 03 fêmeas que haviam sido infectados por via intranasal para simular a infecção natural, notaram que após intervalos de 24 e 96 horas a transição da forma C-L em machos já ocorria. Nos exames histopatológicos dos pulmões dos machos após 2, 4 e 6 semanas pós-infecção, foram encontradas reação granulomatosa, plasmócitos e linfócitos e, nas fêmeas, foi encontrado pequeno número de linfócitos e ausência de formação granulomatosa. O mesmo estudo revelou também que o sexo, a castração e a castração com reconstituição hormonal inversa influenciaram o padrão histopatológico de resposta do hospedeiro frente ao *Pb*. Esses resultados indicaram que o sistema imunológico possui diferenças na eficácia entre os sexos, que o ambiente hormonal facilitou a síntese de citocinas pelas células B e T e que o E2 contribuiu para a ativação dos macrófagos. Desta forma, os autores concluíram que os estrógenos, além de possuírem uma atividade inibitória que impede a transição C-L, têm um importante papel na resposta imune através da ativação de células de defesa.

Algumas doenças da cavidade bucal apresentam predileção pelo gênero feminino (AGHA-HOSSEINI; TIRGARI; SHAIGAN, 2006; MEURMAN; TARKKILA; TIITINEN, 2009). Whitaker; Bouquot, (1994), estudando Lesões Periféricas de Células Gigantes, verificaram se tais lesões apresentavam receptores para estrógeno e progesterona, uma vez que um grande número de lesões ocorria em gestantes. Não conseguiram detectar a presença desses receptores, indicando que os hormônios ovarianos não desempenham papel no desenvolvimento/crescimento dessas lesões, no entanto algumas evidências sugeriram que os hormônios podem influenciar secundariamente. Outro estudo, realizado com o mesmo objetivo, constatou que a sensibilidade, a variedade e a distribuição dos receptores nos tecidos são mais importantes do que a simples presença e que essas lesões podem ser condicionadas pelo sexo (GUNHAM et al., 1998).

A presença e distribuição de ER e PR também foram investigadas em Lesão Periférica de Células Gigantes, Granuloma Piogênico e Fibroma Ossificante Periférico, lesões com predileção para o gênero feminino (AGHA-HOSSEINI; TIRGARI; SHAIGAN, 2006). Os autores encontraram um baixo número de receptores e concluíram que isto pode ser devido a uma pequena sensibilidade dos anticorpos utilizados ou até mesmo que tais lesões não necessitam dos ER e PR para seu desenvolvimento.

Os hormônios femininos promovem alterações na saliva de mulheres durante o período de gravidez, porém os efeitos dos esteroides sexuais masculinos em glândulas salivares são pouco conhecidos. Laine et al. (1993) analisaram a presença de receptores androgênicos humanos em glândulas salivares saudáveis e concluíram que as glândulas salivares humanas são androgênio-dependentes e que existe uma dificuldade de obter anticorpos específicos para esses receptores, fato este que tem limitado o uso da técnica.

A mucosa bucal e as glândulas salivares são sensíveis à ação de estrógenos, apesar da expressão dos receptores ainda ser controversa (VALIMAA et al., 2004). Sendo assim, estes autores procuraram verificar a imunoexpressão dos receptores alfa (ER1) e beta estradiol (ER2) nos tecidos de glândulas salivares e mucosa bucal. O ER1 não foi detectado e o ER2 foi amplamente marcado em todos os tecidos (principalmente queratinócitos, ácinos e ductos glandulares). Estes achados sugerem que o ER2 atue regulando a fisiologia dos tecidos, dos ácinos, ductos e epitélio bucal.

Esses efeitos dos ER2 sobre determinados tecidos podem auxiliar a explicar a sensibilidade destes tecidos bucais ao estrógeno e os possíveis efeitos benéficos da terapia de reposição hormonal (HRT) sobre os sintomas orais em pacientes que estejam em menopausa (VALIMAA et al., 2004; SAWCZUK et al., 2014). Nesta fase, o epitélio oral torna-se mais permeável a agentes nocivos e é mais propenso a danos mecânicos. A atividade secretora das glândulas salivares torna-se diminuída e causa dificuldade de autolimpeza da mucosa, dos dentes, aumentando o risco à cárie e facilitando a penetração e colonização de fungos e bactérias. Com isso, Sawczuk et al. (2014) procuraram investigar a presença do ER2 em amostras de tecidos da mucosa bucal de pacientes antes da HRT e depois de 3, 6 e 12 meses de terapia. Nas primeiras seis semanas não houve diferenças, mas após 3, 6 e 12 meses os ER2 tiveram uma maior expressão, além de terem sido encontrados em todos os pacientes.

Leimola-Virtanen et al. (1997) investigaram os efeitos do estrogênio sobre a mucosa bucal em mulheres que se encontravam em ciclo menstrual e em menopausa, e também se existiriam receptores para o estrogênio nas células epiteliais da mucosa bucal. Encontraram padrões celulares quase idênticos em jovens e pós-menopausa, sugerindo que o estrogênio pode não ser o único fator a causar mudanças na maturação de células epiteliais bucais. Com o anticorpo utilizado não conseguiram detectar a presença dos receptores na mucosa bucal.

A ação seletiva dos hormônios esteroides sobre o metabolismo de “tecidos-alvos” depende da presença de receptores de alta afinidade e é esta ligação que permitirá o controle das funções estruturais celulares. Ojanotko-Harri et al. (1992) avaliaram a mucosa bucal, um tecido “não-alvo”, e encontraram que esta não é um tecido tão sensível para hormônios esteroidais como outros órgãos clássicos. Os autores sugeriram que a não expressão desses receptores pode estar relacionada a um número de receptores abaixo do limite de detecção no tecido gengival ou porque os anticorpos não foram sensíveis ao método utilizado.

Resultados contraditórios sobre a expressão de ER em tecidos bucais também podem estar associados ao tipo de receptor pesquisado, ER1 ou ER2 (VALIMAA et al., 2004). Leimola-Virtanen et al. (2000) realizaram biópsias em mulheres pós-menopausa e mulheres saudáveis, com o objetivo de estudar a presença de ER na mucosa bucal e em glândulas salivares maiores e menores. Concluíram que a presença dos receptores em tecidos “não-alvos” é maior do que se pensava anteriormente, portanto é possível que esses tecidos respondam à presença do estrogênio.

Um estudo demonstrou que a mucosa nasal apresenta receptores de E2 e, portanto, ela também pode ser afetada (MILLAS et al., 2010). Os autores avaliaram se os contraceptivos orais influenciavam a distribuição e concentração de estrogênio nesses receptores. Foram avaliadas 64 mulheres com ciclo menstrual regular, onde metade utilizava contraceptivos orais e a outra metade não, tomando-se o cuidado para evitar aquelas que eventualmente tivessem infecção ou fizessem uso de terapia hormonal não-contraceptiva. As mulheres que usavam contraceptivos orais apresentaram diminuição do ER2 em algumas células da lâmina própria, mostrando que contraceptivos podem ter efeitos sobre fibroblastos, plasmócitos e células inflamatórias. Observaram também que os ER2 são mais predominantes em tecidos não associados à reprodução, e que existem ER nucleares nas células do epitélio

respiratório, glandular e lâmina própria e ER citoplasmáticos nas células da lâmina própria do epitélio glandular.

2.2 Aspectos imunológicos

Os hormônios femininos conferem maior proteção às fêmeas, fazendo com que os machos sejam mais acometidos pela PCM. Entretanto, esse efeito protetor se manifesta no estágio inicial da infecção quando a forma de micélio se transforma em levedura (RESTREPO et al., 1984). Após esse estágio, a instalação e o desenvolvimento da infecção no hospedeiro estão relacionados à integridade do sistema imunológico e à sua capacidade em eliminar o fungo (WANKE; AIDÉ, 2009). Além disso, a susceptibilidade genética pode resultar numa depressão da resposta imune celular, menor resistência conferida pelo granuloma e baixa produção de óxido nítrico (BORGES-WALMSLEY et al., 2002).

Certas características como virulência da cepa infectante, volume do inóculo, tipo e quantidade de citocinas produzidas durante o confronto contra as células fagocitárias também são determinantes no sucesso da implantação do fungo (PARISE-FORTES et al., 2011). Durante o processo de invasão tecidual, os fungos contam com alguns componentes antigênicos, sendo a Gp43 o principal deles, e que são responsáveis por diversos efeitos proteolíticos sobre o colágeno, a elastina e a caseína (CAMARGO; FRANCO, 2000). Porém, a presença destes componentes antigênicos contribui para a ativação das respostas imune natural e imune específica do hospedeiro, que uma vez ativadas tentarão combater o parasita impedindo que este promova a invasão aos tecidos (PARISE-FORTES et al., 2011).

A resposta imune natural ocorre através da ativação do sistema complemento e da produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, que promovem uma quimiotaxia de neutrófilos e células “natural killer” (NK), que instalarão uma resposta inespecífica (CAMARGO; FRANCO, 2000; PARISE-FORTES et al., 2011; RESTREPO et al., 2011).

Estudos em camundongos já demonstraram que os polimorfonucleares são as primeiras células a se apresentarem na infecção da PCM nos pulmões (ARISTIZÁBAL et al. 1998). Os neutrófilos possuem um importante papel nas atividades fungicida e fagocítica, principalmente nos estágios iniciais da infecção (BENARD, 2008; RESTREPO et al., 2011). Quando estimulados por certas citocinas,

promovem a liberação de metabólitos ativos, mas progressivamente com o passar do tempo eles vão sendo substituídos pelos macrófagos (PARISE-FORTES et al., 2011).

Os macrófagos são as principais células do sistema imune que irão atuar contra os fungos da PCM e, dependendo das citocinas liberadas, eles poderão atuar contribuindo para a disseminação ou contenção da doença (BENARD, 2008). Quando ativados pelo interferon gama (INF- γ) ou pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), exercerão um importante papel protetor através da liberação de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico, que podem inibir a transformação conídio-levedura. Assim, tanto o INF- γ como o TNF- α aparentemente conferem resistência através da formação de um granuloma e da produção de óxido nítrico (BORGES-WALMSLEY et al., 2002).

Paralelamente, o fungo busca escapar do sistema imune, tentando penetrar no interior de macrófagos, células epiteliais e endoteliais, através de interações de suas moléculas de superfície e receptores presentes na membrana celular (BORGES-WALMSLEY et al., 2002; MENDES-GIANNINI et al., 2008; PARISE-FORTES et al., 2011). Quando atinge o interior destas células, o fungo não é mais reconhecido e poderá ter sua multiplicação e disseminação facilitadas para diversos tecidos (MENDES-GIANNINI et al., 2008; RESTREPO et al., 2011). Uma falha na produção de NO e um menor número de linfócitos T CD4+ também podem favorecer a persistência das lesões ativas e permitir uma possível disseminação para outros órgãos (BATISTA; SOARES; LARA, 2005).

Uma resposta imune celular efetiva está associada ao padrão de resposta T helper 1 (Th1), caracterizado pela produção de interleucina 2 (IL-2), interleucina 12 (IL-12) e principalmente do INF- γ que promovem a ativação de macrófagos e linfócitos T auxiliares (T CD4+) e T citotóxicos (T CD8+). Isto resultará na formação de granulomas densos, bem definidos, com poucos fungos e infecção localizada (BENARD, 2008; MAMONI; BLOTA, 2005; PARISE-FORTES et al., 2011; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). Além dessas citocinas, o TNF- α também é liberado e atua promovendo a “ativação clássica” dos macrófagos, que passaram a ser chamados de M1. Os M1 promovem a liberação de espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico e IL-12 exercendo assim um potente efeito microbicida principalmente sobre vírus e bactérias (HEUSINKVELD; VAN DER BURG, 2011). Além destas funções, atuam também para aumentar a atividade fungicida, modular e amplificar a resposta imune e estimular a formação de um granuloma denso (MAMONI; BLOTA, 2005; PARISE-FORTES et al., 2011). Clinicamente, pacientes com esse padrão de resposta

geralmente apresentam baixos títulos de anticorpos e respostas positivas de hipersensibilidade tardia (RESTREPO, et al., 2011).

Entretanto, como a maioria dos pacientes com PCM são trabalhadores rurais e geralmente apresentam outras condições debilitantes, há uma tendência para eles apresentarem um padrão de resposta imunológica T helper 2 (Th2). Este padrão é marcado pela baixa produção de células T, altos títulos de anticorpos e resposta negativa aos testes cutâneos de hipersensibilidade tardia, sendo incapazes de conter a propagação da infecção (BENARD, 2008; PARISE-FORTES et al., 2011; RESTREPO et al., 2011). Também é notada uma significativa diminuição na produção das citocinas IL-2, IFN- γ e IL-12, aumento dos níveis de interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 10 (IL-10) e fator de transformação de crescimento beta (TGF- β), de imunoglobulina A (IgA), imunoglobulina E (IgE) e imunoglobulina G (IgG), além de uma intensa eosinofilia. Os macrófagos ativados por essas citocinas são chamados de M2 e esta via recebe o nome de “ativação alternativa”. Os M2 atuam preferencialmente na regulação da resposta imune, na eliminação de detritos, na reparação e remodelação tecidual e na angiogênese (MANTOVANI et al., 2004). Tem sido relatado também que os M2 possuem uma importante função contra patógenos extracelulares, como vermes e parasitas (Figura 2) (FAIRWEATHER; CIHAKOVA, 2009).

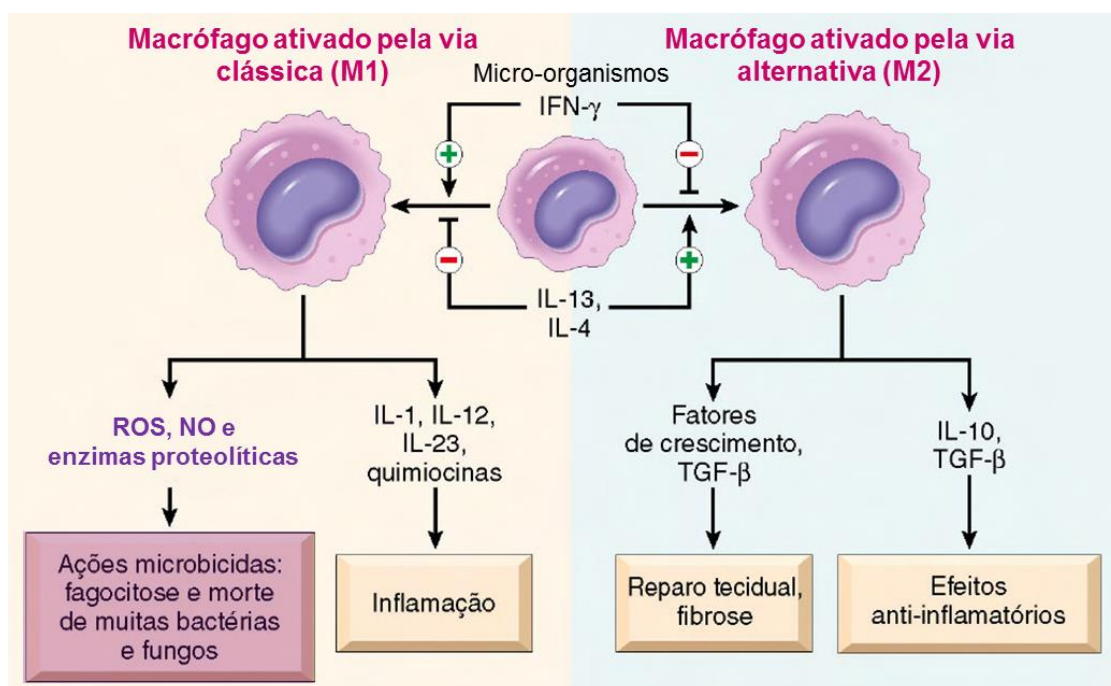


Figura 1 - Vias de ativação dos macrófagos.

Fonte: Adaptado de KUMAR; ABBAS; ASTER, (2013).

O padrão de resposta Th2 é indesejável em certas situações, como a leishmaniose, onde o aumento nos níveis de IL-4 e IL-13 são acompanhados de eosinofilia e aumento das células B (com hipergamaglobulinemia ou produção aumentada de IgE). A IL-4 pode induzir também mudanças no citoesqueleto celular, que podem levar a alterações fagocíticas e na capacidade de resposta contra fungos, bactérias, vírus e helmintos, porém, nem sempre tais mudanças são positivas (MARTINEZ; HELMING; GORDON, 2009). Para a PCM, a resposta Th2 não se mostra efetiva e contribui para o desenvolvimento da doença (PINZAN et al., 2010). Além disso, o granuloma formado é do tipo frouxo e mal definido; a inflamação granulomatosa é desorganizada e apresenta muitos fungos; é observado um alto número de brotamento de células leveduras e presença de áreas com exsudação supurativa e necrose (BORGES-WALMSLEY et al., 2002; MAMONI; BLOTTA, 2005; PARISE-FORTES et al., 2011).

Realizando-se uma associação entre o padrão de resposta e a sua apresentação clínica, nota-se que os pacientes infectados apresentam um padrão de resposta imune Th1, mantendo um equilíbrio entre parasita e hospedeiro. Para os pacientes com a forma crônica com gravidade moderada, o padrão de resposta imune é intermediário entre Th1 e Th2; e para pacientes com a forma aguda/subaguda desenvolvem o padrão Th2 (MAMONI; BLOTTA, 2005; PARISE-FORTES et al., 2011). Entender essa diferença no padrão de resposta é importante porque permite compreender a necessidade de ter um tratamento mais prolongado em hospedeiros com resposta celular mais fraca, onde há persistência de fungos no interior de granulomas, e estes podem sofrer reativação em algum momento (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

A mudança de resposta Th1 para Th2 pode acontecer e é comum em situações onde uma infecção aguda passa à crônica. Assim, a ativação dos macrófagos também não é definitiva, e um M1 pode-se transformar em M2 e vice-versa, dependendo das condições do ambiente local (FAIRWEATHER; CIHAKOVA, 2009). Após se instituir uma terapia antifúngica, um padrão de resposta Th2 pode passar a Th1, uma vez que a carga fúngica é reduzida e há uma maior proliferação de linfócitos e um aumento na produção de citocinas Th1, especialmente o INF- γ (RESTREPO et al., 2011). Paralelamente, se a infecção persistir, muitas vezes haverá uma mudança de Th1 para Th2, como uma resposta imune adaptativa que evolui de aguda para crônica. Além disso, certos microrganismos podem estimular macrófagos

M2 numa tentativa de evitar uma resposta imune mais agressiva do hospedeiro (FAIRWEATHER; CIHAKOVA, 2009). Especificamente para a PCM, por se tratar de uma infecção crônica de longa persistência, o número de M2 vai aumentando com o passar do tempo (CARLI et al., 2016).

A resposta imune específica ou humoral é caracterizada pela ativação policlonal das células B e por uma hipergamaglobulinemia, no entanto para a PCM ela desempenha um papel apenas coadjuvante (ABREU E SILVA et al., 2013). Apesar de que muitos pacientes com a doença se apresentem imunodebilitados, altos níveis de anticorpos IgA, IgG (específicos Anti-*Pb*) e IgE são encontrados nesses pacientes. Esses anticorpos atuam especificamente nos granulomas e nos imunoprecipitados de antígenos, facilitando a eliminação e impedindo a difusão de componentes fúngicos (RESTREPO, et al., 2011). A hiperatividade dos plasmócitos atua também aumentando a opsonização e potencializando a atividade fagocítica dos fagócitos (CAMARGO; FRANCO, 2000).

As influências do microambiente determinam se a resposta terá M1 ou M2. Os tipos de citocinas produzidas e o equilíbrio entre elas também podem inverter essa polarização (HEUSINKVELD; VAN DER BURG, 2011). A citocina IL-10 é mais negativa neste processo, atua bloqueando a expressão da imunidade mediada pelo INF- γ e IL-12, e diminuindo a atividade fungicida dos macrófagos (BENARD, 2008). Contrariamente, a síntese de IFN- γ e TNF- α leva à ativação de M1 e instalação de um padrão de resposta Th1 que resulta no controle da disseminação fúngica (BURGER et al., 2013).

Indivíduos que vivem em áreas endêmicas, mas que não são infectados, parecem ser protegidos pelo eixo IL-12 e INF- γ (BENARD, 2008). Tem sido relatado também que, em certas circunstâncias, o *Pb* pode induzir precocemente a uma síntese de citocinas com atividades anti-inflamatórias, como o TGF- β e a IL-10, que podem suprimir a resposta dos macrófagos e, assim, permitir a instalação, reprodução e disseminação para os tecidos (BURGER et al., 2013).

Uma importante resposta frente a alguns patógenos ou irritantes persistentes é a formação do granuloma (BRITO; FRANCO, 1994). Ele é composto por um agrupado de macrófagos, células epitelioides e linfócitos; e sua formação representa um importante papel na defesa do hospedeiro contra a infecção, principalmente através da liberação de citocinas (ABREU E SILVA et al., 2013). As CGMs também podem ser encontradas nos granulomas, especialmente em casos de PCM, onde

estão envolvidas no sequestro e destruição dos fungos e agentes irritantes presentes nos tecidos (NASCIMENTO et al., 2008). Em granulomas que apresentam em seu interior fungos ou parasitas, é comum encontrar também eosinófilos (BRITO; FRANCO, 1994).

Os granulomas podem ser classificados em densos ou frouxos, e sua configuração morfológica é dependente da imunidade do hospedeiro (BRITO; FRANCO, 1994; PARISE-FORTES et al., 2011). Em indivíduos com resposta celular preservada, observa-se granulomas densos contendo CGMs, células epitelioides, macrófagos organizados centralmente, linfócitos na periferia circundados por colagenização e um menor número de fungos no interior, sendo mais comumente encontrados nas formas mais localizadas da doença. Naqueles que apresentam comprometimento imunológico nota-se granulomas frouxos, apresentando áreas com microabscessos, necrose, edema e um maior número de fungos dispersos nos tecidos, ocorrendo nos casos mais graves da doença (ABREU E SILVA et al., 2013; KAMINAGAKURA et al., 2007; PARISE-FORTES et al., 2011). No entanto, um estudo que buscou correlacionar o tipo de granuloma e a quantidade de fungos presentes em fragmentos de biopsias de PCM oral não revelou diferenças significativas entre as variáveis (PEDREIRA et al., 2016).

A susceptibilidade ou resistência do hospedeiro frente aos fungos é um aspecto importante para a formação dos granulomas. Estudos realizados em camundongos demonstraram que o tipo de granuloma e as citocinas liberadas são diferentes entre espécies de ratos susceptíveis e resistentes à PCM. Nos ratos susceptíveis, o granuloma se mostrou frouxo e continha muitos fungos viáveis; enquanto que, no grupo resistente, o granuloma formado foi denso e apresentava-se encapsulado e alguns fungos degenerados no interior. Os autores realizaram também uma medida semiquantitativa, e confirmaram que a área dos granulomas e da área relativa que apresentava o *Pb*, eram 1,2x e 1,9x maiores nos ratos susceptíveis. Além disso, houve predominância de expressão do INF- γ e TNF- α no granuloma denso de ratos resistentes e TGF- β no granuloma frouxo de ratos susceptíveis (BURGER et al., 2013).

Nos casos de PCM oral, parece haver uma maior tendência para formação de granulomas frouxos. Carli et al. (2016), numa casuística de 48 casos, classificaram 71% como granulomas frouxos e 29% em densos. Outro estudo que incluiu 26 casos

mostrou um equilíbrio maior, mas também uma maior ocorrência de granulomas frouxos (53,8%) do que densos (46,2%) (PEDREIRA et al., 2016).

Os macrófagos expressam em sua superfície uma superfamília de receptores *scavenger* ricos em cisteína (SRCR), que são caracterizados por sua grande capacidade de ligar ao ligante (FABRIEK; DIJKSTRA; VAN DEN BERG, 2005). Dentre esses receptores podemos citar o CD68 e o CD163. O CD 68 é uma glicoproteína transmembrana de 110kDa de função desconhecida sendo altamente expressa por monócitos humanos e macrófagos teciduais. O anticorpo contra CD68 marca monócitos e macrófagos em ampla variedade de tecidos (HOLNESS; SIMMONS, 1993). Já o CD163 é uma glicoproteína transmembrana de 130 kDa que foi identificada como um receptor endocítico para complexos haptoglobina-hemoglobina, sendo um biomarcador de ativação muito útil para macrófagos em várias condições patológicas, inclusive doenças inflamatórias (MOLLER, 2012; VAN DEN HEUVEL et al., 1999). É restrito a monócitos e macrófagos, sendo as interleucinas 6 (IL-6) e IL-10 capazes de induzir sua expressão, e o INF- γ e TNF- α capazes de promover sua inibição. Assim, o CD163 atua suprimindo a resposta imune e contribuindo para a resolução da inflamação, demonstrando que está mais expresso na ativação alternativa por M2 (FABRIEK; DIJKSTRA; VAN DEN BERG, 2005; MOLLER, 2012).

Geralmente, os monócitos humanos são CD163-positivos, mas expressam baixos níveis de CD163 e, contrariamente, os macrófagos M2 teciduais são fortemente marcados pelo anticorpo CD163 (MOLLER, 2012). Estes elevados níveis de CD163 expressos em macrófagos teciduais e, em sua maioria, em macrófagos M2 apresentam importante relação no processo de cura, reconhecimento a patógenos, estimulação à angiogênese e remoção de detritos (FABRIEK; DIJKSTRA; VAN DEN BERG, 2005).

A identificação de macrófagos com o CD68 não permite identificar qual subtipo específico (M1 ou M2). Já o CD163 é um receptor expresso em altos níveis pelos M2 e serve para diferenciação entre M1 e M2 (HEUSINKVELD; VAN DER BURG, 2011). Eles expressam o receptor CD163, que permite ser identificado pelo anticorpo CD163 através de análise imuno-histoquímica (CARLI et al., 2016).

Ultimamente, diversos estudos têm sido desenvolvidos utilizando de análise imuno-histoquímica para verificar a presença destes receptores. Kaminagakura et al. (2007) realizaram um estudo com o objetivo de identificar quais eram as células inflamatórias mais presentes nas lesões de PCM oral. Encontraram que o CD68 e o

CD45 foram os mais expressos, indicando que os macrófagos e os linfócitos T são as células mais comumente encontradas na PCM. Outros estudos utilizaram-se do CD163 para verificar se a quantidade de M2 estava relacionada como tipo de granuloma. Estes estudos não evidenciaram uma associação do tipo de granuloma com a quantidade de M2 visto que, tanto granulomas densos quanto frouxos, se mostraram fortemente marcados pelo CD163 (CARLI et al., 2016; PEDREIRA et al., 2016).

Estudos anteriores já haviam demonstrado que os macrófagos são as células do sistema imune mais presentes nos casos de PCM (BENARD, 2008). No entanto, havia uma necessidade de se entender quais macrófagos são dominantes nestes casos, se M1 ou M2. Assim, Carli et al. (2016), utilizando o CD163, demonstraram que os M2 são as células predominantes nas lesões orais de PCM, uma vez que ficou evidente a positividade para todos os casos presentes no seu estudo. Neste mesmo trabalho, utilizaram também o Anti-*Pb* com finalidade de quantificar os fungos, porém não encontraram uma correlação entre a marcação por CD163 e a quantidade de fungos.

2.4 Ação dos hormônios sobre a resposta imunológica

O sistema imunológico interage com todos os outros sistemas do corpo, sendo que as mais intrigantes inter-relações ocorrem entre o sistema imune e o sistema reprodutor. A resposta do sistema imune de fêmeas é maior do que os machos, e esta diferença provavelmente é mediada pela ação de hormônios esteroides sexuais sobre receptores imunorreativos presentes nas populações celulares (GROSSMAN, 1984). A diminuição nos níveis de E2 e PR promove diversas alterações no sistema imune, e isto é comprovado quando se realiza ovariectomia em modelos animais ou em mulheres na menopausa, que tendem a apresentar artrite e outras doenças autoimunes de início tardio (STRAUB, 2007). Além disso, os hormônios sexuais, especialmente o estrógeno, atuam também estimulando a produção de várias classes de anticorpos (GROSSMAN, 1984).

O gênero pode afetar a susceptibilidade ou resistência contra uma série de doenças (STRAUB, 2007). Mulheres apresentam melhor resposta inflamatória o que leva a um maior controle de infecções do que os homens, entretanto estão mais relacionadas às doenças autoimunes, como por exemplo, a artrite reumatoide e a

esclerose múltipla, que estão mais relacionadas à resposta pró-inflamatória Th1. Porém, em períodos de gravidez onde os níveis de estrógeno se elevam, nota-se uma melhora significativa destas condições, evidenciando um efeito anti-inflamatório (SALEM, 2004; STRAUB, 2007). Também pode-se notar que algumas doenças se agravam na menopausa, decorrentes de uma maior liberação de citocinas pró-inflamatórias que ocorrem em detrimento da queda de E2 e outros esteroides gonadais (Figura 2) (CUZZOCREA et al., 2000; STRAUB, 2007).

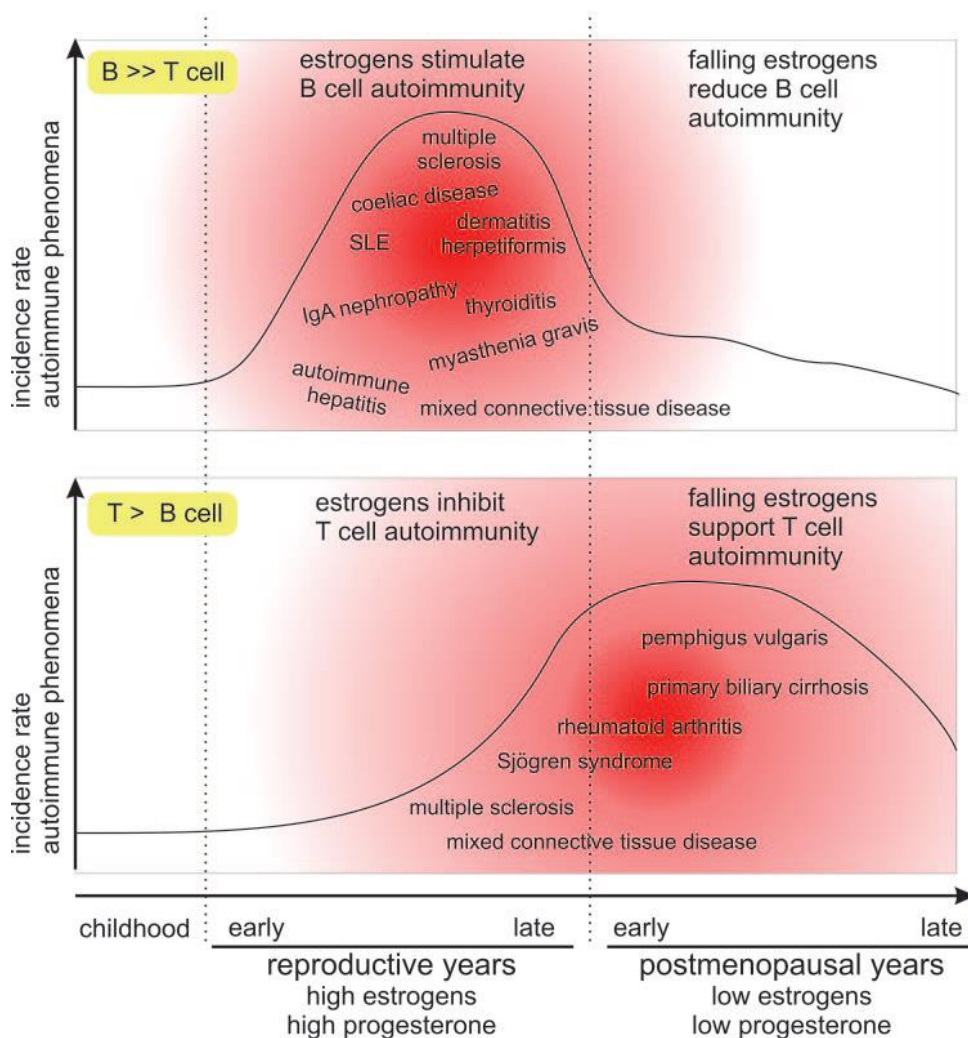


Figura 2 - Relação entre os níveis hormonais e a taxa de incidência de doenças autoimunes em mulheres.

No gráfico superior, observamos que os níveis mais altos dos hormônios estão associados com uma maior incidência de doenças autoimunes relacionadas com os autoanticorpos produzidos pelas células B. No gráfico inferior, notamos que a queda dos níveis hormonais pós-menopausa favorece o desenvolvimento de doenças autoimunes relacionadas às células T.

Fonte: Adaptado de STRAUB, (2007).

Durante o período reprodutivo, as mulheres apresentam respostas imunes e humorais mais vigorosas que os homens. O declínio da função ovariana está associado com o aumento espontâneo de citocinas pró-inflamatórias da resposta Th1, justificando muitas vezes a necessidade de reposição hormonal (SALEM, 2004). Apesar das doenças autoimunes serem mais comuns em mulheres, quando afetam homens tendem a ser mais graves. A justificativa para isso se baseia na influência que os hormônios exercem sobre o padrão de resposta imune e sobre as citocinas que são liberadas (FAIRWEATHER; ROSE, 2004).

Tem sido relatado que o estrógeno pode aumentar a resistência contra diversos patógenos, como *Pneumococcus*, *Mycoplasma*, *Paracoccidiodes*, *Plasmodium* e *Trypanosoma*; e diminuir para outros, como *Listeria*, *Chlamydia*, *Neisseria*, *Gonorrhoeae* e *Salmonella* (SALEM et al., 1999).

Estes exemplos evidenciam claramente que os hormônios possuem um papel imunomodulador e atuam estimulando ou suprimindo, influenciando assim no desenvolvimento de diversas doenças. No entanto, esses efeitos parecem ser contraditórios, pois diversos estudos mostram que o E2 apresenta um efeito anti-inflamatório (CARLSTEN et al., 1989; DIMAYUGA et al., 2005; FAIRWEATHER; FRISANCHO-KISS; ROSE, 2008; SALEM et al., 1999; SALEM; HOSSAIN; NOMOTO, 2000; STRAUB, 2007) e outros um efeito pró-inflamatório (BENGTSSON et al., 2004; CHAO et al., 1996; SALEM, 2004; SHANKAR et al., 2011). Esta divergência nos resultados também pode estar relacionada ao grupo que está sendo estudado, onde alguns trabalhos têm resultados baseados em doenças infecciosas ou autoimunes em humanos e outros em modelos experimentais em camundongos. Nestes estudos, uma maior atenção concentra-se principalmente no padrão de citocinas liberadas, nos níveis hormonais, no tipo de resposta Th1 e Th2, e em doenças autoimunes ou infecciosas que apresentam diferentes incidências entre os sexos.

Os estrógenos agem sobre seus receptores que estão expressos em uma variedade de células, tecidos e órgãos “alvos” ou “não-alvos”. Dentre os tecidos não-alvos podemos citar: glândulas salivares, tireoide, músculo cardíaco, músculo liso, células endoteliais, colágeno, pulmão e fígado (ENMARK et al., 1997; FAIRWEATHER; FRISANCHO-KISS; ROSE, 2008; LUKITIS et al., 2007). Importante também citar a presença destes receptores em macrófagos, células T CD4+ e T CD8+, que estão diretamente relacionadas com a resposta imune (SALEM, 2004).

Os efeitos anti-inflamatórios dos estrógenos, sua influência na polarização das respostas Th1 e Th2 dos macrófagos e sua função na resposta imune têm sido contraditórios. Muitos relatos indicam que o estrógeno não só estimula anticorpos, mas também aumenta IL-4, IL-10 e TGF- β , aumentando a fibrose (FAIRWEATHER; CIHAKOVA, 2009). Além disso, alguns tratamentos com E2 têm demonstrado diminuir a resposta Th1 em machos e fêmeas, e isto pode suportar a ideia do efeito modulatório que o hormônio pode exercer (FAIRWEATHER; FRISANCHO-KISS; ROSE, 2008).

O efeito dicotômico do estrógeno foi demonstrado em ratos, onde o tratamento com 17 β -estradiol suprimiu a resposta tipo hipersensibilidade tardia, mas estimulou a produção de anticorpos, evidenciando que o seu efeito sobre as funções das células T e B são diferentes (CARLSTEN et al., 1989). O efeito anti-inflamatório do E2 *in vivo* tem sido associado, entre outras ações, a uma inibição na migração de neutrófilos e monócitos para áreas inflamadas, proporcionando uma inflamação menos grave (STRAUB, 2007).

Um estudo em camundongos demonstrou que os efeitos anti-inflamatórios do E2 podem ocorrer principalmente através da diminuição do edema e eritema e da redução da migração de células para o local, além de contribuir para a diminuição da produção de TNF- α (SALEM; HOSSAIN; NOMOTO, 2000). Outro estudo realizado em ratos tratados com E2 também encontrou uma diminuição significativa na expressão de citocinas típicas do padrão Th1. A polarização da resposta para Th2 foi relacionada à inibição das citocinas pró-inflamatórias (IL-2, IL-12, TNF- α e IFN- γ) e estimulação das citocinas anti-inflamatórias (IL-10, IL-4, IL-13, TGF- β e arginase-1). Entretanto, esses animais estiveram relacionados a uma maior dificuldade de conter a progressão da infecção de *Listeria* (SALEM, 2004).

O E2 em doses anticoncepcionais promoveu alterações no número e nas funções dos macrófagos contra a infecção de *Listeria monocytogenes*. Foi notado que o hormônio promoveu um aumento da atividade fagocítica dos macrófagos na fase inicial, mas nas fases da infecção que requerem a ajuda de células T, o padrão de resposta imune dos camundongos não foi eficiente para o controle da infecção de *Listeria monocytogenes*. Observou-se também um crescimento mais rápido no grupo tratado do que no grupo controle, sugerindo assim que além dos efeitos modulatórios sobre os macrófagos, o E2 também pode produzir efeitos nas funções das células T e NK. Ficou evidente ainda a inibição que o E2 promoveu sobre a liberação de IL-12 e TNF- α pelos macrófagos e, INF- γ pelas células T, que desempenham papéis

importantes na resposta Th1 contra bactérias intracelulares, enquanto aumentou as citocinas IL-4 e IL-10, típicas da resposta Th-2, demonstrando que o E2 pode deslocar a resposta tipo Th1 para Th2 (SALEM et al., 1999).

Os níveis hormonais têm se mostrado tão importantes que, em certas situações como ciclo menstrual, ovariectomia e mulheres que estejam fazendo HRT, o sistema imunológico pode apresentar uma resposta consideravelmente alterada (CHAO et al., 1994). Em níveis normais, o E2 também pode suprimir as citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α , e em níveis mais elevados como em grávidas, diminuir a IL-12 e o TNF- α , com consequente aumento de IL-4 e IL-10, e deslocando assim para uma resposta imune Th2 (STRAUB, 2007).

Uma ampla revisão abordando os efeitos dos hormônios sobre os diversos órgãos, tecidos e células, enfatizou que em diferentes níveis são observados diferentes efeitos (STRAUB, 2007). Em níveis fisiológicos, o E2 se mostrou possuir um efeito anti-inflamatório, caracterizado pela produção das citocinas IL-4, IL-10, TGF- β , TIMP (inibidor tecidual das MMPs) e osteoprotegerina. Em níveis elevados (gravidez), o E2 atuou inibindo as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1, IL-6 e MCP-1 (proteína de quimioatração dos monócitos); a produção de iNOS (óxido nítrico sintetase induzida); as MMPs (metaloproteinases matriz) e a atividade de células NK, levando a inibição de vários eventos do processo inflamatório. Na menopausa, quando os níveis do E2 e de outros esteroides gonadais apresentam-se diminuídos, houve um predomínio de citocinas pró-inflamatórias. Este evento é coincidente com o aumento da incidência da osteoporose e da artrite reumatoide em mulheres nesta idade, uma vez que os baixos níveis do E2 não fornecem um efeito protetor sobre a inibição da reabsorção óssea e a supressão da inflamação. Em suma, as mulheres em idade reprodutiva são protegidas devido à supressão que o E2 exerce sobre as células T, ao passo que na menopausa a falta deste pode predispor a reabsorções ósseas, dentre outros efeitos.

Outras diferentes células parecem sofrer efeitos diretos dos estrógenos. As células de Kupffer têm se mostrado serem sensibilizadas pelo E2, e este efeito pode ser o principal responsável pelo melhor resultado de mulheres durante infecções bacterianas, fazendo com que elas possuam um menor risco de sepse quando comparadas com os homens (STRAUB, 2007). As células basais da micróglia, que são responsáveis pela iniciação e manutenção da resposta imune do cérebro, parecem que também sofrem influência dos E2, onde este estimula a liberação de

maiores quantidades de IL-10 e promove a inibição do TNF- α e IFN- γ (DIMAYUGA et al., 2005).

O E2 também tem sido relacionado com a estimulação da produção de anticorpos pelas células B, além do aumento nos níveis de IL-4, IL-10 e TGF- β (FAIRWEATHER; FRISANCHO-KISS; ROSE, 2008). Essa estimulação na produção de anticorpos pelas células B tem se mostrado que não está relacionada à concentração de E2 circulantes (STRAUB, 2007).

Alguns tratamentos com E2 têm demonstrado diminuir a resposta Th1 em machos e fêmeas, e isto pode suportar a ideia do efeito modulatório que o hormônio pode exercer (FAIRWEATHER; FRISANCHO-KISS; ROSE, 2008).

Os homens tendem a ter uma inflamação geralmente mais grave, com consequente aumento da mortalidade. Eles podem apresentar doenças autoimunes antes de 50 anos de idade e são caracterizadas pela inflamação aguda, o aparecimento de autoanticorpos e uma resposta imune Th1. É possível de se notar nos machos uma mudança gradual de Th1 para Th2 com a idade, com um consequente aumento da fibrose crônica. Já, em mulheres, as doenças autoimunes tendem a aparecer clinicamente após os 50 anos, onde os níveis do E2 diminuem, e são caracterizadas pela produção de anticorpos, estão associados com uma fase crônica, fibrótica e vinculadas a uma resposta Th2 (FAIRWEATHER; FRISANCHO-KISS; ROSE, 2008).

Contrariamente, outros estudos têm demonstrado que os estrógenos têm um papel predominantemente pró-inflamatório favorecendo uma resposta Th1 (SHANKAR et al., 2011).

Salem (2004) relatou que o E2 em níveis fisiológicos desloca o eixo de Th1/Th2 em direção a Th1, com aumento de citocinas pró-inflamatórias (IL-12 e IFN- γ) e diminuição da anti-inflamatórias. Em níveis farmacológicos, o estrógeno desloca a resposta imune em direção ao padrão Th2, levando a supressão das citocinas Th1 e aumento das Th2. O autor apoia sua teoria pelo fato de que na gravidez há um agravamento de algumas doenças infecciosas mediadas por Th1 e de doenças autoimunes mediada por Th2 (como o LES); além de ser notada também uma melhora em doenças mediadas por Th1 (como a artrite reumatoide).

Os possíveis efeitos dos hormônios esteroides sobre a atividade fagocitária dos macrófagos também já foram investigados (CHAO et al., 1996). Os autores encontraram que os efeitos são dose-dependentes e estão relacionados com o tempo

de ação. Em níveis fisiológicos, o E2 e a progesterona aumentam a atividade fagocítica, porém em níveis elevados esses hormônios não apresentaram resultados significativos, quando comparados ao grupo controle. Em contraste, a testosterona e a hidrocortisona não afetaram o processo, concluindo assim que o efeito estimulatório sobre os macrófagos podem melhorar a resposta imune das fêmeas frente a certos tipos de infecção.

O efeito do E2 sobre as células dendríticas, importantes células que atuam na apresentação de antígenos e sinalização para células T, também já foi avaliado. Os resultados mostraram que o E2 estimulou a produção de IL-6 que promoveu um desequilíbrio na resposta Th1/Th2, deslocando para Th1, justificando assim porque as mulheres são mais frequentemente afetadas por doenças autoimunes. Porém, o E2 não modulou a secreção da IL-12, uma das citocinas responsáveis pela polarização da resposta (BENGTSSON et al., 2004).

A presença de uma resposta imune celular efetiva e o tipo de polarização apresentado estão diretamente relacionados ao combate e controle da infecção causada pelo *Pb* (PARISE-FORTES et al., 2011; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). O padrão de resposta imune Th2 é predominante em pacientes com a forma disseminada da doença, enquanto pacientes apenas infectados mostram um padrão Th1 (PARISE-FORTES et al., 2011; RESTREPO et al., 2011; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). Nas formas mais graves da PCM, além de ser observada uma resposta Th2, o E2 pode influenciar não apenas na inibição da transição C-L, mas também na resposta imune do hospedeiro através da ativação de macrófagos e levar a um aumento da atividade fungicida. Sendo assim, as respostas em homens e mulheres são diferentes e isso pode auxiliar a explicar a grande diferença de casos da doença entre os gêneros (SHANKAR et al., 2011).

Vários estudos também têm relatado que os andrógenos afetam diretamente a resposta imunológica. Alguns estudos demonstram que a testosterona possui um efeito imunossupressor estimulando a resposta Th2, fazendo com que homens tenham um risco aumentado no desenvolvimento de doenças infecciosas quando comparados com as mulheres (CARLSTEN et al., 1989; SHANKAR et al., 2011; STRAUB, 2007). Porém, outro estudo demonstrou que a testosterona está relacionada com efeitos pró-inflamatórios, e promove uma resposta Th1 em homens (FAIRWEATHER; FRISANCHO-KISS; ROSE, 2008).

Alguns estudos com camundongos têm tentado explicar as diferenças na resposta imune entre machos e fêmeas, e como ela se comporta frente ao *Pb*. Um destes estudos demonstrou que os ratos machos apresentam um infiltrado inflamatório predominantemente composto por neutrófilos, ao passo que nas fêmeas apenas macrófagos foram encontrados. Os autores levantaram como hipótese de que o E2 além de produzir uma atividade inibitória na transição C-L, pode ter um efeito modulador na resposta imune através de uma síntese de citocinas que promovem a ativação dos macrófagos, tendo assim um importante papel no padrão de resposta do hospedeiro (ARISTIZÁBAL et al., 1998).

Aristizábal et al. (2002) relataram que os machos apresentaram uma infecção progressiva, com intenso infiltrado inflamatório crônico, formação de granulomas e presença de leveduras, ao passo que as fêmeas mostraram uma restrição a proliferação e progressão da doença, e exibiram uma pequena reação inflamatória e ausência de leveduras. Os animais castrados exibiram baixa capacidade de restringir a progressão da doença, através de uma ligeira reação inflamatória contendo linfócitos, plasmócitos, ausência de granulomas e leveduras. Os ratos machos castrados e reconstituídos inversamente com 17 β -Estradiol tiveram uma infecção inicialmente restrita, mas progressiva doença após a infecção, e apresentaram intenso infiltrado inflamatório crônico, granulomas frouxos, CGMs e abundantes leveduras. Finalmente, as fêmeas castradas e reconstituídas inversamente com testosterona não apresentaram capacidade para restringir a doença, e mostraram granulomas densos, células epitelioides e CGMs, além de pequenas leveduras presentes. Concluíram que a mudança no ambiente hormonal por castração ou reconstituição inversa resulta em falta de proteção contra o *Pb*. Este mesmo estudo indicou que o sistema imunológico age de forma diferente entre os sexos sendo que, nas fêmeas, o ambiente hormonal pode promover a síntese e liberação de citocinas pelas células T e B, e que o 17 β -Estradiol quando em níveis fisiológicos contribuem para a ativação dos macrófagos. Também foi relatado o benefício do 17 β -Estradiol no efeito de aumentar a resistência da resposta imune inata, só é relevante quando a infecção é iniciada por conídios ou micélios e, uma vez adquirida a infecção, os hormônios não parecem ter nenhuma relevância.

Além disso, os efeitos dos hormônios parecem ser dose-dependentes, onde em diferentes condições hormonais são esperadas diferentes respostas. Isto ficou evidenciado pelo fato de que as fêmeas normais se mostraram resistentes ao

desenvolvimento da infecção, enquanto os animais castrados não conseguiram restringir a progressão da doença. Também foi notado que as fêmeas castradas apresentaram menor resistência aos fungos demonstrando que o hormônio é importante na defesa inata do hospedeiro, como nos casos das fêmeas normais (ARISTIZÁBAL et al., 2002).

Um estudo foi realizado para avaliar a diferença na resposta imune entre camundongos machos e fêmeas frente ao *Pb*. Utilizando-se de cultura de células do baço que foram infectadas com paracoccina, encontraram que nas fêmeas há uma alta produção de INF- γ , citocina característica da resposta Th1, e que nos machos são encontrados níveis mais elevados de IL-10, uma citocina típica da resposta Th2. Para os animais castrados e reconstituídos inversamente, verificaram que as células produziram as citocinas do hormônio reconstituente e não do sexo. Além disso, a carga fúngica no fígado e pulmões de camundongos machos foi significativamente maior do que em fêmeas, sugerindo que os hormônios controlam o desenvolvimento das leveduras. A possível diferença nas funções fagocítica e fungicida entre macrófagos de machos e fêmeas e o efeito estimulante da paracoccina sobre os macrófagos também foram avaliados neste mesmo estudo. Não foram encontradas diferenças quanto à função fagocítica, mas a atividade fungicida dos macrófagos das fêmeas foi superior devido a uma liberação de óxido nítrico em níveis 50% maior neste grupo. Sugeriram como hipótese que o E2 aumenta a glicosilação das proteínas da membrana, conduzindo a um aumento do nível de glicano na superfície celular dos macrófagos, resultando no aumento de ligação da lecitina fúngica e aumento produção de óxido nítrico 50% maior nas fêmeas. A paracoccina foi capaz de estimular os macrófagos de ambos os sexos, mas sendo a resposta das fêmeas maior (PINZAN et al., 2010).

McEwen et al. (1987) realizaram um estudo em 83 camundongos de ambos os sexos que haviam sido infectados com o *Pb* por via intranasal. Os animais foram sacrificados em intervalos de até 6 meses e os resultados revelaram que a infecção se mostrou progressiva, indicando um número crescente de fungos viáveis. Também foi notado que as fêmeas apresentaram um maior número de unidades formadoras de colônias (UFC) após 2 e 4 meses da inoculação. Os demais períodos de sacrifício que foram analisados não revelaram diferenças significativas entre os sexos. Os autores concluíram que existe uma clara diferença na susceptibilidade dos animais em relação ao sexo, porém atribuíram os resultados ao fato de que os camundongos podem não

ser os animais mais adequados para demonstrar o efeito protetor exercido pelos hormônios.

Os resultados até o momento são controversos, mas apontam para uma evidente influência do ambiente hormonal sobre os tipos de citocinas liberadas e o padrão de resposta imune que será desenvolvido. Por se tratar de uma doença endêmica na região de Alfenas – MG e constituir-se num problema de saúde pública e que afeta trabalhadores durante sua fase produtiva, podendo inclusive levar à morte, é importante buscar uma melhor compreensão dos efeitos dos hormônios femininos sobre a patogênese da PCM. A obtenção de novas informações poderá ajudar a esclarecer porque existe uma predileção tão maior pelo gênero masculino e, a partir deste ponto, contribuir para o desenvolvimento de possíveis métodos de prevenção e tratamento desta doença.

3 OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram avaliar a expressão imunohistoquímica dos receptores de estrógeno alfa, progesterona, CD163 e Anti-*Pb* em fragmentos de biópsias de lesões bucais da PCM crônica e comparar as possíveis correlações entre as expressões desses receptores e as eventuais diferenças entre mulheres e homens.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O material e métodos desta dissertação abordará os seguintes assuntos: questões éticas; casuística, seleção e preparo da amostra; análise microscópica qualitativa; reação imuno-histoquímica; análise imuno-histoquímica e análise estatística.

4.1 Questões éticas

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Unifal-MG, sob o protocolo 2.073.701 (Anexo).

4.2 Casuística, seleção e preparo da amostra

As amostras incluídas neste estudo foram obtidas dos arquivos do Laboratório de Anatomopatologia Bucal da Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG), cujos diagnósticos foram estabelecidos no período de 1997 a 2015. Todos os casos com diagnóstico definitivo de paracoccidiodomicose foram levantados e revistos por 2 patologistas experientes (JACH e AACP). Os dados demográficos dos pacientes foram extraídos das fichas de exame anatomopatológico enviadas pelos profissionais juntamente com a biópsia para fins de diagnóstico.

Foram estabelecidos os seguintes critérios de inclusão:

- 1) Tecido embocado em parafina e em bom estado para análise histológica;
- 2) Diagnóstico de PCM baseado na presença de hiperplasia pseudoepiteliomatosa; áreas de microabscessos; presença de CGMs e estruturas esféricas com membrana birrefringente compatíveis com o *Pb* (SILVA et al., 2007) (FIGURAS 3 e 4).

Inicialmente, foram selecionados 16 casos em pacientes do gênero feminino que preenchiam os critérios acima descritos. Em seguida, selecionou-se outros 16 casos de pacientes do gênero masculino que foram pareados levando-se em conta idades semelhantes. Todos os dados foram analisados sem conhecimento prévio dos dados clínicos dos pacientes.

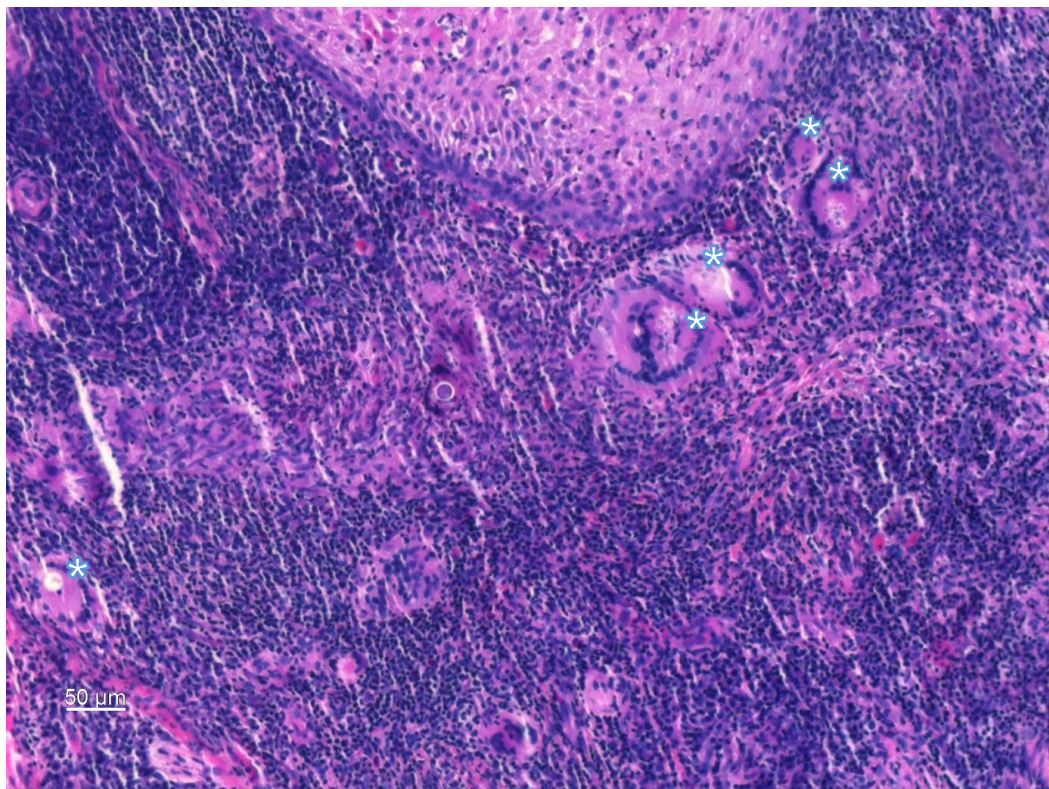


Figura 3 - Aspectos microscópicos da PCM: infiltrado inflamatório mononuclear intenso e difuso; presença de CGMs inflamatórias (*).

Fonte: Do autor.

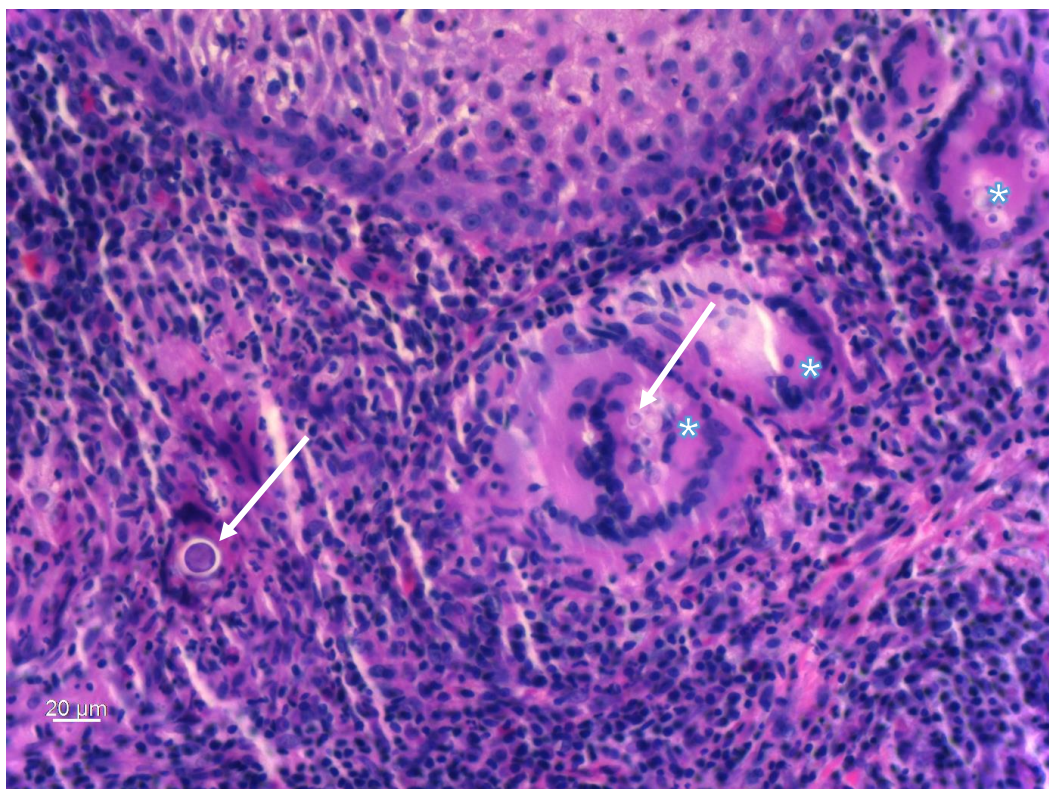


Figura 4 - Aspectos microscópicos da PCM: Em maior aumento, observam-se CGMs (*); estruturas esféricas com parede birrefringente, compatíveis com o fungo *Pb* (setas), espalhados pelo tecido conjuntivo ou no interior das CGMs.

Fonte: Do autor.

4.3 Análise microscópica qualitativa

Foram confeccionados cortes microscópicos de 5 micrometros (μm) obtidos a partir de biópsias de fragmentos de mucosa bucal dos 32 pacientes que foram selecionados. Em seguida, realizou-se a coloração pela técnica da Hematoxilina e Eosina, seguindo-se os procedimentos histotécnicos de rotina do Laboratório de Anatomopatologia da Unifal-MG, e procedeu-se a montagem em lâminas de vidro para rotina.

A análise microscópica foi realizada sem o conhecimento prévio dos dados clínicos dos pacientes, utilizando-se um microscópio óptico binocular (AxioLab - Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha). Os granulomas foram classificados em densos e frouxos, conforme preconizado por Abreu e Silva et al. (2013). Para ser considerado um granuloma frouxo (F), os cortes histológicos deveriam apresentar necessariamente: presença de áreas de microabscessos, necrose, edema e fungos dispersos no tecido. Para o granuloma denso (D), foram considerados os seguintes critérios: a presença de CGMs, células epitelioides e macrófagos organizados centralmente; linfócitos na periferia e áreas de colagenização mais periférica (FIGURAS 5 e 6).

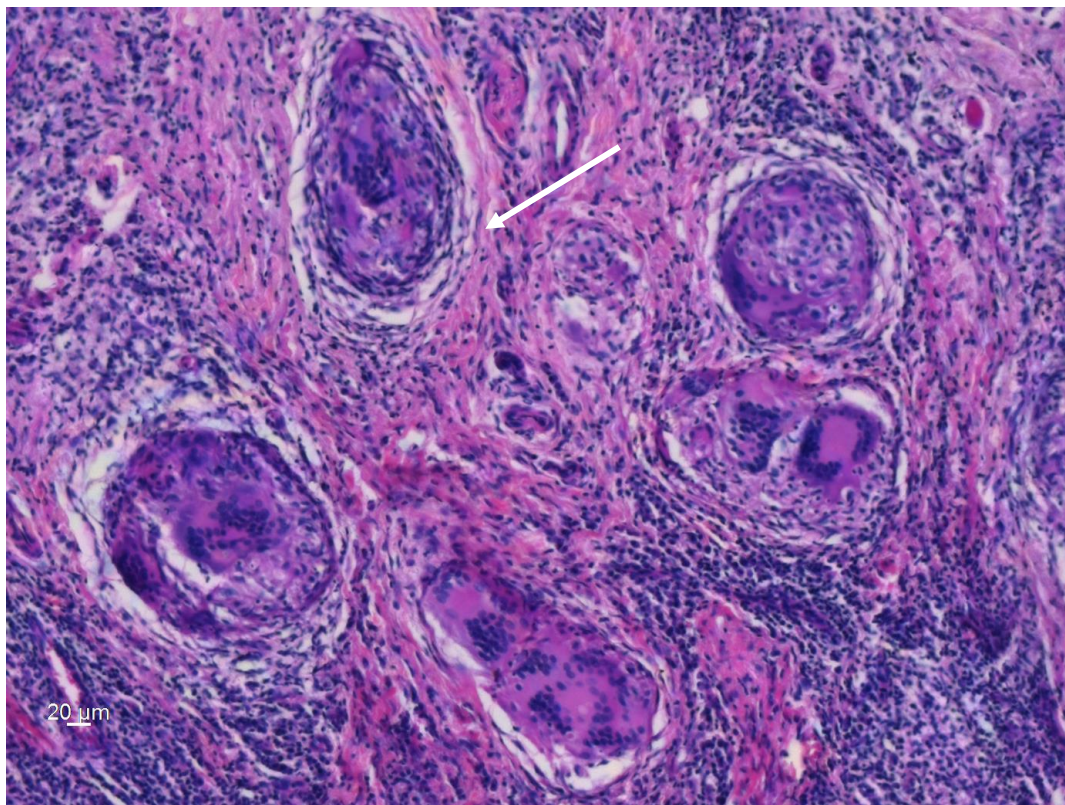


Figura 5 - Aspectos microscópicos do granuloma denso: presença de CGMs, células epitelioides, macrófagos, linfócitos e áreas de colagenização (seta).

Fonte: Do autor.

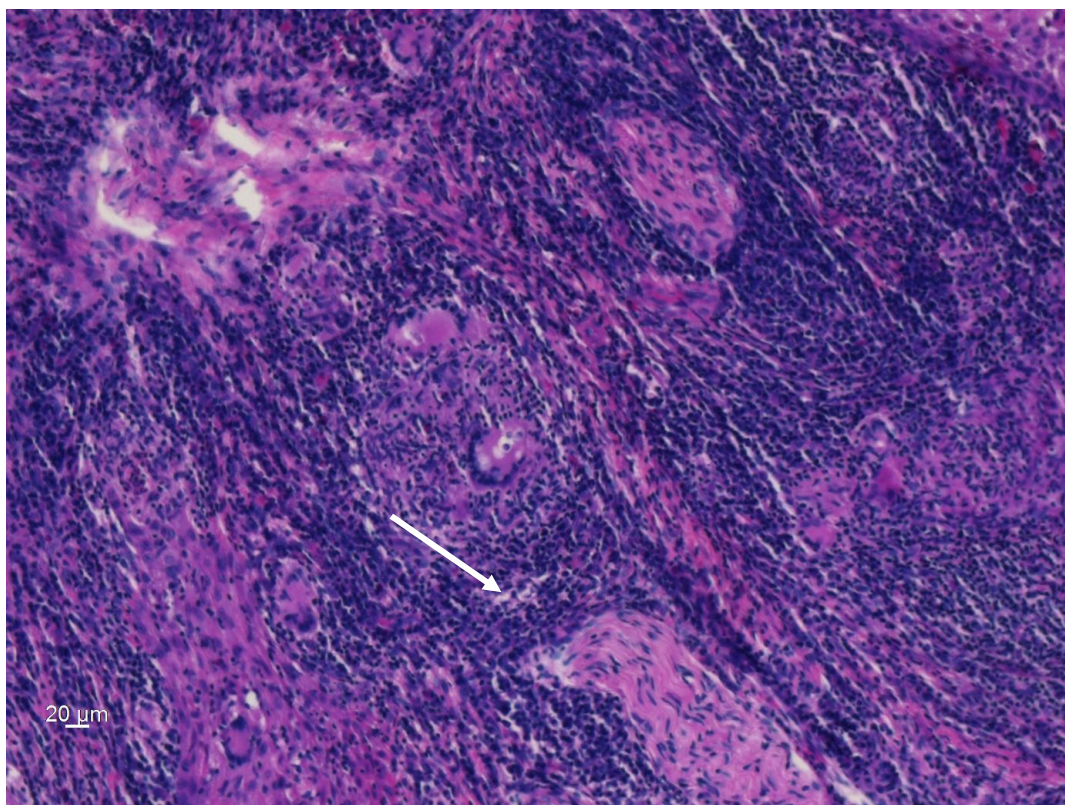


Figura 6 - Aspectos microscópicos do granuloma frouxo: presença de fungos dispersos nos tecidos, áreas necrose, microabscessos e edema (seta).

Fonte: Do autor.

4.4 Reação imuno-histoquímica

As reações imuno-histoquímicas foram realizadas manualmente conforme descrito por Norton; Jordan; Yeomans, (1994), seguindo o protocolo do Laboratório de Patologia do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo-SP).

Foram utilizados para as reações imuno-histoquímicas 4 cortes microscópicos de 3 µm de espessura, sendo montados 2 cortes em cada lâmina de vidro silanizada, tomando-se o cuidado para manter uma distância entre os cortes, evitando assim possíveis reações indesejáveis.

Inicialmente foi efetuada a desparafinização com xilol (Panreac Quimica S.L.U, ref. 131769.1611, Barcelona, Espanha), a 60 °C em estufa de secagem e a temperatura ambiente por 20 minutos cada etapa, seguidos de etanol seriado decrescente (Merck, ref. 1.00983.1000, Darmstadt, Alemanha) por 5 minutos em cada cuba na cabine de segurança química. Em seguida, procedeu-se a lavagem das lâminas em água corrente e destilada. A recuperação do antígeno foi realizada com solução tampão citrato 10 mM pH 6,0 (ácido cítrico monoidratado, 1.00244.1000, Citrato de tri-sódio, 1.06448.1000, Merck, Darmstadt, Alemanha), no cooktop até a ebulição na panela de pressão (Rochedo, A La Carte 4 ½ litros). A panela foi fechada e aguardou-se a liberação do vapor saturado. Foram cronometrados 3 minutos, a panela foi esfriada sob água corrente até a despressurização total e procedeu-se a lavagem das lâminas em água corrente e destilada.

Em seguida, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 6% (Quimesp, ref. P011.09.201, Guarulhos, São Paulo), com 4 trocas de 5 minutos cada. Lavagem em água corrente, destilada e solução salina tamponada com fosfatos (PBS-phosphate buffered saline) 10 mM pH 7,4 por 5 minutos. Foram aplicados os anticorpos primários (TABELA 1), diluídos em tampão PBS contendo soroalbumina bovina (BSA) 1% (Inlab, ref. 1870, São Paulo) e azida sódica a 0,1% (Merck, ref. 6688, Rio de Janeiro), em diluições previamente estabelecidas. Realizou-se a incubação durante 30 minutos a 37 °C na estufa e por 18 horas em geladeira a 5 °C em câmara úmida. Foi processada a lavagem em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada e as lâminas foram incubadas com o NovoLink (NovoLink Max Polymer, Leica Biosystems Newcastle Ltd, RE7280-k, Newcastle Upon Tyne, Reino Unido) por 30 minutos a 37° C. Foi executada a lavagem

com tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada e incubação das lâminas com NovoLink Polymer do kit por 30 minutos a 37° C.

Após esta etapa, procedeu-se a lavagem em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada e então as lâminas foram incubadas em solução substrato cromógeno: 100 mg de 3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, D-5637, St Louis, MO, EUA); 1 mL Dimetilsulfóxido (J T Baker, 9224-03, Center Valley, PA, EUA); 1 mL H₂O₂ 6%; 100 mL PBS; por 5 minutos a 37 °C, ao abrigo da luz. Em seguida, realizou-se a lavagem em água corrente com água destilada e efetuou-se a contracoloração com Hematoxilina de Harris por 30 segundos. Procedeu-se a lavagem em água corrente, destilada e diferenciação em água amoniacal por 3 segundos. Foi realizada a lavagem em água corrente, destilada e desidratação em etanol seriado crescente e xilol na cabine de segurança química. Foi efetuada a montagem das lâminas com lamínula e Entellan (Merck, 1.07961, Alemanha) em cabine de segurança química, e finalmente a inativação da solução de DAB que foi descartada conforme as normas do Instituto Adolfo Lutz. Como controles positivos foram utilizados tecidos de carcinoma ductal de mama, para o ER1 e PR, tonsila para o CD163 e um fragmento de PCM bucal para o Anti-*Pb*. Como controles negativos, utilizou-se os mesmos cortes omitindo-se os anticorpos primários.

Tabela 1 – Anticorpos primários utilizados.

Marcador	Anticorpo	Diluição	Fabricante
ER1	SP1 monoclonal em coelho	1:100	Thermo Fischer Scientific Neomarkers, RM9101-S, Fremont, CA, EUA
PR	PgR636 monoclonal em camundongo	1:200	Dako, M3569, Glostrup Dinamarca
CD163	10 D6	1:500	Vector Labs cat#VP-C374, Burlingame, CA, EUA
<i>Pb</i>	Policlonal	1:200	Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, SP, Brasil

Fonte: Do autor

4.5 Análise imuno-histoquímica

As lâminas coradas pelos marcadores ER1, PR, CD163 e Anti-*Pb* foram analisadas em microscópio óptico binocular (AxioLab - Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) com objetivas de 10X, 20X e 40X, percorrendo toda a extensão do corte. Com o auxílio de um programa de captura de imagens (AxioVision Rel. 4.8.2- Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha), foram capturados 10 campos consecutivos de cada amostra (FIGURAS 7 e 8). Para a aquisição destas imagens, utilizou-se uma câmera fotográfica digital (AxioCamMRC 1.4 Mb - Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) que estava acoplada ao um microscópio óptico binocular (AxioLab - Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) contendo uma lente objetiva N-Achroplan de 40X/0,65; resultando num aumento final de 400X.

As imagens capturadas foram analisadas por um examinador sem que o mesmo tivesse acesso aos dados clínicos dos pacientes. Para os ER1 e PR, o grau de imunopositividade foi determinado através de um índice semiquantitativo, onde foi considerada a densidade de marcação nuclear e citoplasmática para o ER1 e a marcação nuclear para o PR. Foram utilizados os seguintes escores: 0 - ausência de marcação; 1 - marcação discreta ou fraca; 2 - marcação moderada e 3 - marcação forte; como proposto por Günhan et al. (1998).

As análises para o CD163 foram desenvolvidas como proposto por Parise-Fortes et al. (2006), considerando-se a porcentagem de células inflamatórias positivas: 0 – negativo, ausência de células imunomarcadas; 1 – leve, de 10-30% de células imunopositivas; 2 – moderada, de 40-60%; e 3 – intenso, de 70-100%.

A quantificação dos fungos foi realizada através da imunomarcação com o Anti-*Pb* nos 10 campos que haviam sido capturados. Foi realizada uma somatória dos valores obtidos em cada campo e em seguida foi realizada a média aritmética para se chegar a um valor único. Somente foram quantificados os fungos considerados viáveis e que apresentavam sua morfologia totalmente preservada. Quando houve células em estágio reprodutivo por gemulação, estas foram contadas como apenas uma única célula, como preconizado por Batista; Soares; Lara, (2005).

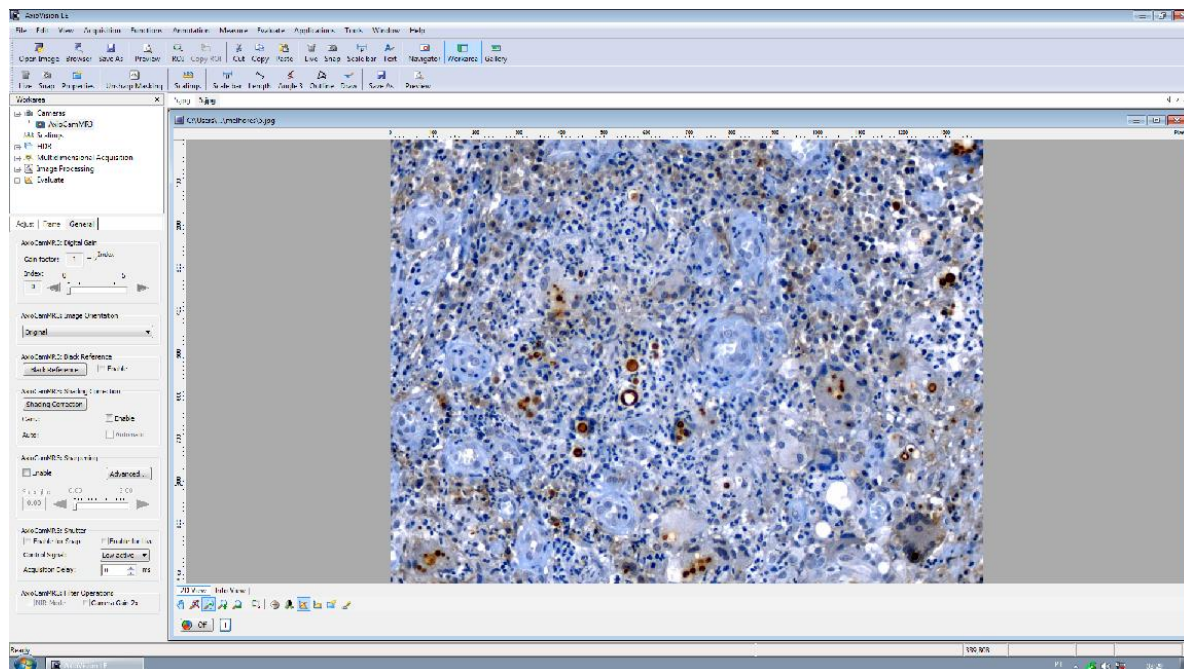


Figura 7 - Ilustração da captura dos campos utilizando o software AxioVision Rel 4.8.2 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).
Fonte: Do autor.

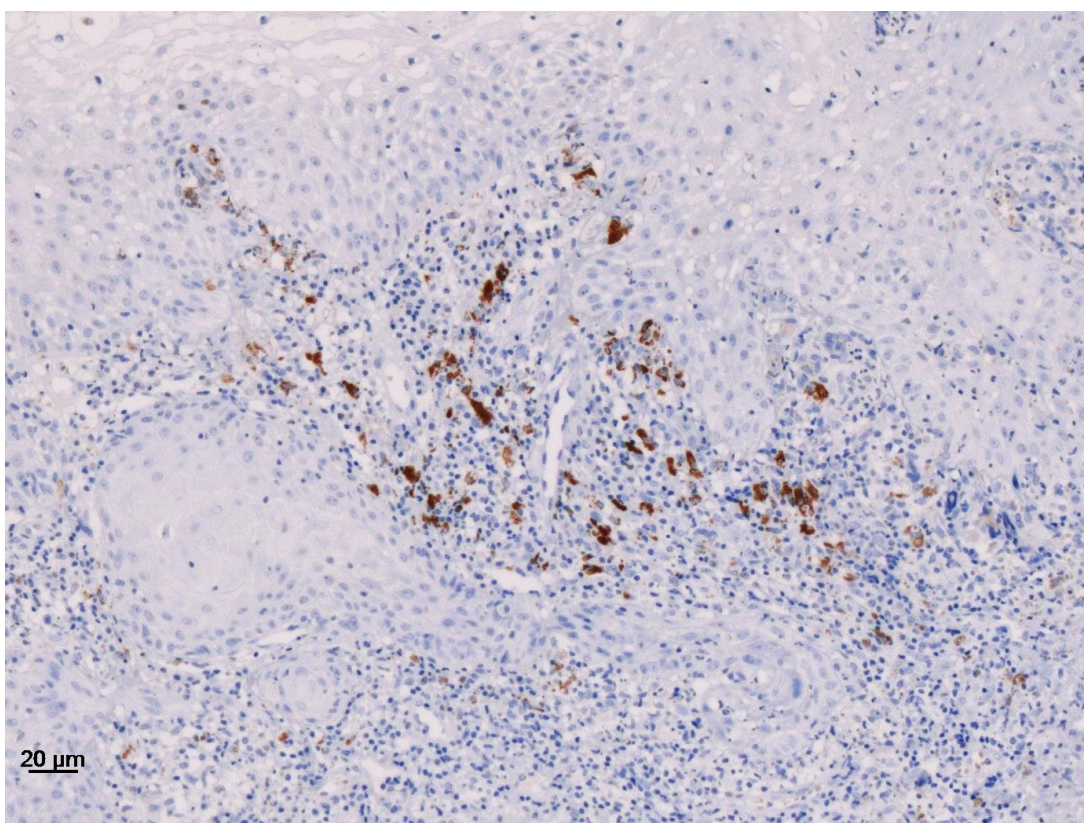


Figura 8 - Ilustração do imunomarcador ER1 capturado com o software AxioVision Rel 4.8.2 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).
Fonte: Do autor.

4.6 Análise estatística

Os registros das informações demográficas e microscópicas dos pacientes foram armazenados num banco de dados, elaborado numa planilha eletrônica do Microsoft Excel.

Para os imunomarcadores ER1, PR, CD163 e Anti-*Pb*, as imagens foram inicialmente capturadas e em seguida analisadas por um examinador com um intervalo de 30 dias entre as duas avaliações. O grau de concordância para a repetibilidade foi estimado pelo coeficiente Kappa de Cohen (TABELA 2). A análise dos resultados das avaliações do Anti-*Pb*, CD163, ER1 e PR das 32 amostras foram realizadas de maneira independente.

Tabela 2 – Valores coeficiente Kappa.

Kappa (K)	Concordância
<0,00	Pobre
0,0-0,20	Ligeira
0,21-0,40	Considerável
0,41-0,60	Moderada
0,61-0,80	Substancial
0,81-1,00	Excelente

Fonte: Landis; Koch (1977).

As análises de concordância foram realizadas pelo software R (Core Team 2016), pacote Irr: (GAMER; LEMON; SINGH, 2012).

As estatísticas descritivas foram obtidas e as variáveis de interesse foram testadas pelo teste Mann-Whitney para a comparação entre os gêneros e pelo coeficiente de correlação de Spearman para a análise entre os diferentes imunomarcadores em cada gênero. Também foi empregado o Teste Exato de Fischer para a análise estatística entre os diferentes tipos de granulomas em homens e mulheres. Todos os testes foram realizados utilizando-se o programa estatístico BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007), considerando-se um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

No período de 1997 a 2015, foram diagnosticados no Laboratório de Anatomopatologia Bucal da Unifal-MG 81 casos de PCM, de um total de 7592 casos, perfazendo uma percentagem 1,07%. Destes 81 casos, apenas 32 foram incluídos no estudo, sendo 16 do gênero masculino e 16 do feminino, obedecendo-se os critérios de inclusão já descritos. A idade mínima foi de 21 e a máxima de 79 anos, com uma média de 46,7 anos; sendo que para o gênero masculino a média foi de 46,2 anos e 47,1 anos para o gênero feminino. Observou-se também que a faixa etária mais prevalente para a PCM foi de 41 a 50 anos (GRÁFICO 1).

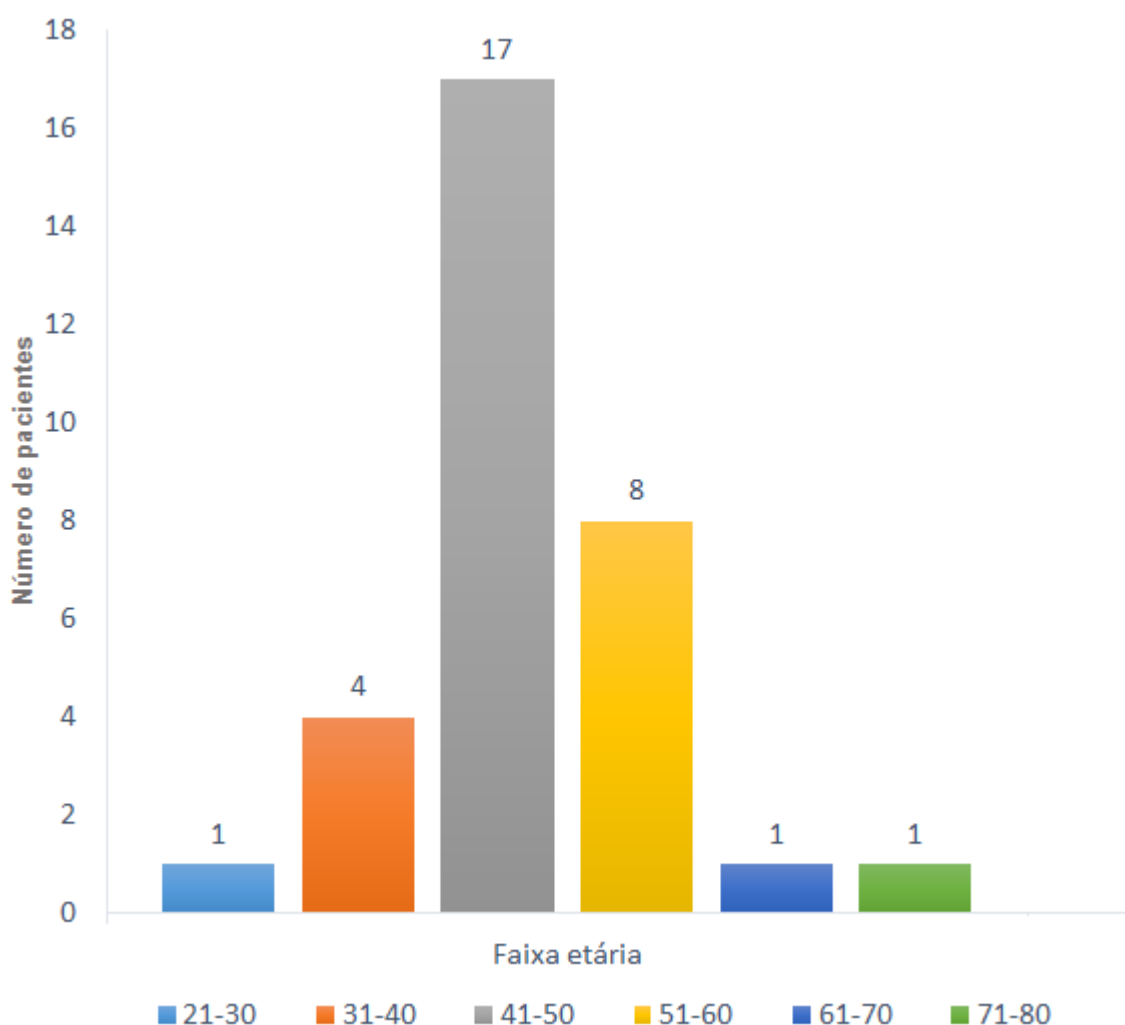


Gráfico 1 - Dados demográficos dos pacientes envolvidos no estudo.
Fonte: Do autor.

Os resultados das análises de concordância obtidos pelo coeficiente Kappa foram os seguintes: Anti-*Pb* K= 0,7856; CD163 K= 0,775; ER1 K= 1 e PR k= 0,9556. A média geral de concordância se mostrou substancial para o Anti-*Pb* e o CD163, e excelente para os marcadores ER1 e PR.

Inicialmente foi realizada a análise dos resultados obtidos para a classificação dos granulomas em frouxo e denso. Houve predominância dos granulomas frouxos em ambos os gêneros, sendo que em mulheres eles representaram 81,25% (13/16 casos) e nos homens 62,50% (10/16 casos). Foi realizada a análise estatística pelo Teste Exato de Fischer para avaliar a diferença entre os gêneros, no entanto esta não se mostrou significativa ($p=0,4331$). Os granulomas também foram avaliados com relação aos imunomarcadores ER1, PR, CD163 e Anti-*Pb* através do teste de Mann-Whitney, no entanto não apresentou nenhum resultado significativo.

Os resultados das análises imuno-histoquímicas dos marcadores ER1, PR, CD163 e Anti-*Pb* para homens e mulheres, bem como sua mediana e o valor de p estão descritos na Tabela 3. Analisando-se inicialmente a expressão do imunomarcador ER1 entre mulheres e homens, verificou-se que o ER1 foi expresso apenas nas mulheres, sendo positivo em 4 casos (25%). No entanto, a mediana para ambos os gêneros foi de 0 e o teste de Mann-Whitney não revelou diferença estatística entre os gêneros ($p= 0,2278$). Comparando-se a expressão do marcador PR entre mulheres e homens, verificou-se que o imunomarcador foi expresso em ambos os gêneros, sendo que a mediana para as mulheres foi de 0,25 e a dos homens de 0,10. Entretanto esta diferença não se mostrou ser significativa entre os gêneros ($p= 0,4856$) (Tabela 3).

Quando se comparou a expressão do marcador CD163 entre mulheres e homens, verificou-se que a mediana para ambos os gêneros foi de 3,0 e os testes estatísticos não revelaram nenhuma diferença para este imunomarcador ($p= 0,9699$). Analisando-se a expressão do imunomarcador Anti-*Pb* entre mulheres e homens, verificou-se que as mulheres apresentaram uma mediana de 9,15 e os homens de 7,20 para a quantidade de fungos, no entanto esta diferença não se mostrou ser significativa ($p= 0,8802$) (TABELA 3).

Tabela 3 - Mediana dos anticorpos ER1, PR, CD163 e *Pb* em mulheres e homens e seu respectivo valor *p*.

Marcador	Mulheres	Homens	<i>p</i>*
ER1	0,0	0,0	0,2278
PR	0,25	0,10	0,4856
CD163	3,0	3,0	0,9699
<i>Pb</i>	9,15	7,20	0,8802

Fonte: Do Autor

Legenda: * valor de *p* obtido pelo teste de Mann-Whitney

Quando se comparou a análise entre os imunomarcadores ER1 M/H (Mulheres + Homens) em relação ao Anti-*Pb* M/H (Mulheres + Homens), verificou-se que houve uma correlação positiva ($r=0,4597$), que foi significativa ($p=0,0081$) (GRÁFICO 2). O aumento da expressão deste hormônio esteve relacionado com um maior número de fungos, exceto para um caso, onde o alto número de fungos não esteve correlacionado com a expressão do ER1. As Figuras 9 e 10 ilustram os imunomarcadores ER1 e Anti-*Pb*.

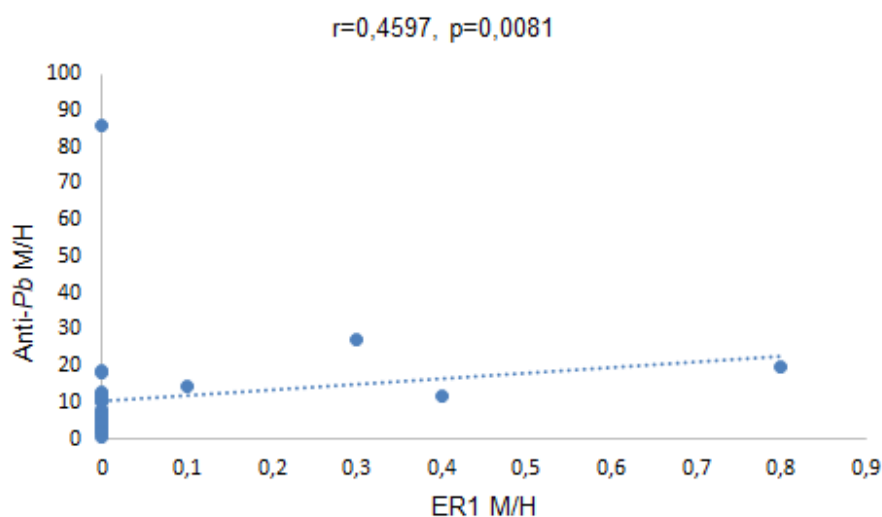


Gráfico 2 – Representação gráfica da dispersão do ER1 e do Anti-*Pb* em ambos os gêneros com o coeficiente de correlação de Spearman e sua significância.

Fonte: Do autor.

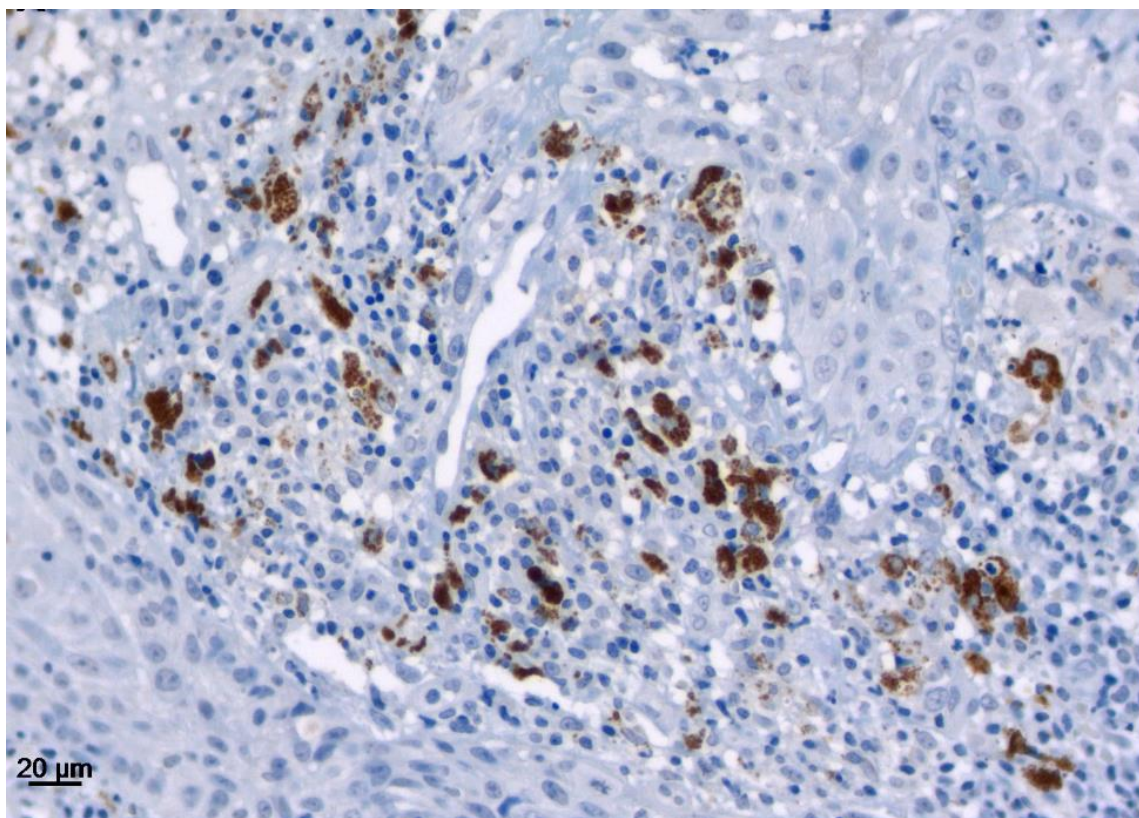


Figura 9 - Expressão imuno-histoquímica do anticorpo ER1.
Fonte: Do autor

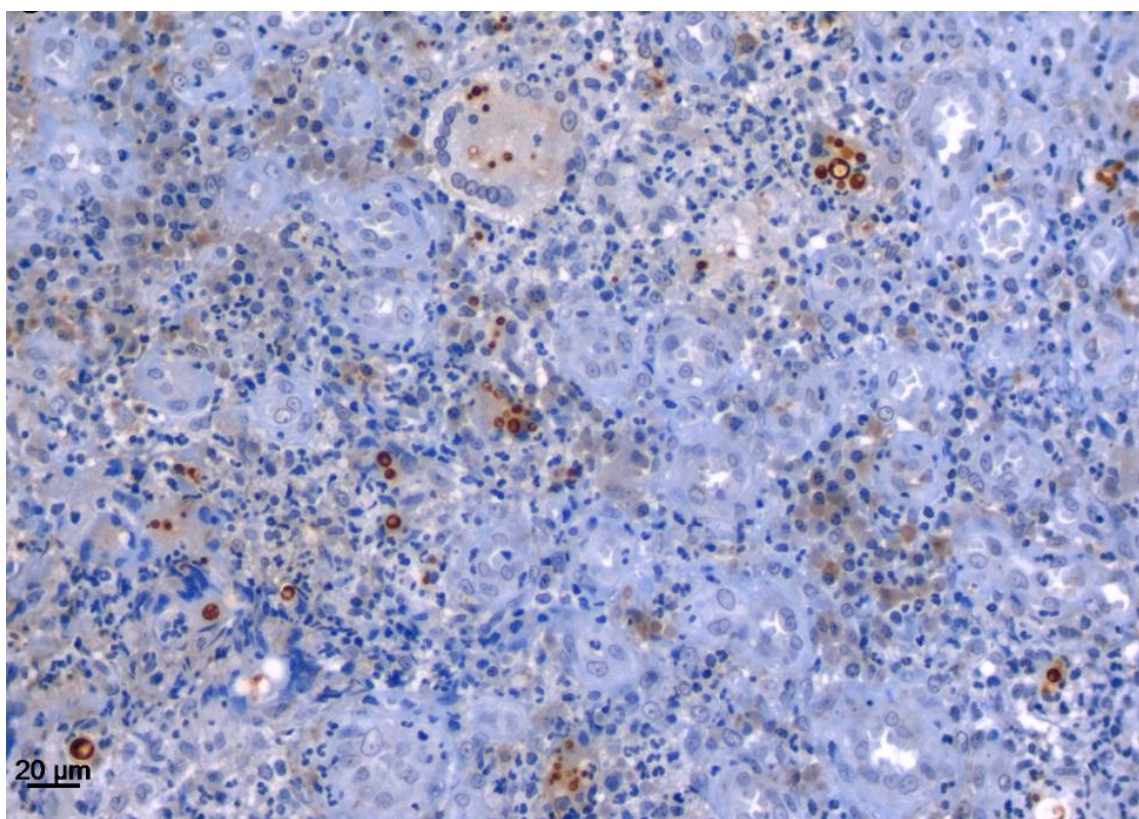


Figura 10 - Expressão imuno-histoquímica do Anti-*Pb*.
Fonte: Do autor

Analisando-se a expressão dos marcadores ER1 e Anti-*Pb* em mulheres, verificou-se que houve uma correlação positiva ($r=0,6844$) e que foi significativa para os imunomarcadores ($p=0,0034$). O gráfico 3 demonstra que a maior expressão do ER1 esteve relacionada com uma maior quantidade de fungos expressos pelo Anti-*Pb*. Notamos também que os casos com menor quantidade de fungos relacionavam-se com a ausência de expressão pelo imunomarcador.

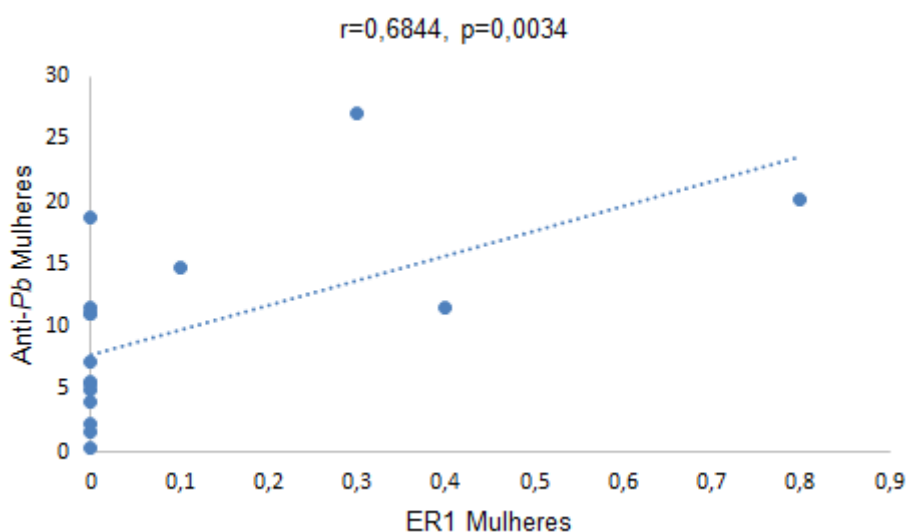


Gráfico 3 – Representação gráfica da dispersão do ER1 e do Anti-*Pb* em mulheres com o coeficiente de correlação de Spearman e sua significância.

Fonte: Do autor.

Quando se comparou a análise entre os imunomarcadores ER1 em relação ao PR em mulheres e homens, verificou-se que houve uma correlação positiva ($r=0,2232$), porém sem significância estatística ($p=0,2195$) (GRÁFICO 4). Podemos notar também que em alguns casos o PR esteve expresso em níveis mais altos, mas o ER1 não foi expresso. Sendo assim o aumento dos níveis de ER1 não se correlacionou com o aumento dos níveis de PR. A Figura 11 ilustra o imunomarcador PR.

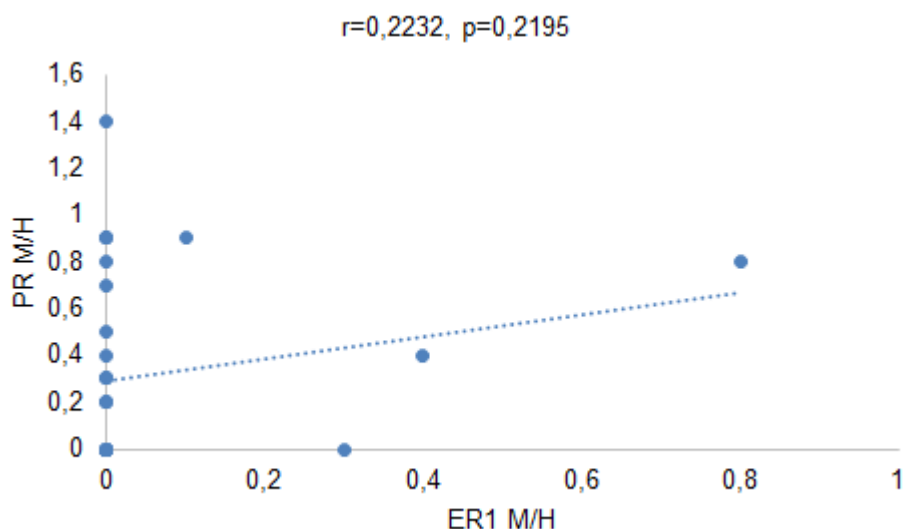


Gráfico 4 – Representação gráfica da dispersão do ER1 e do PR em ambos os gêneros com o coeficiente de correlação de Spearman e sua significância.

Fonte: Do autor.

Quando se comparou a análise entre os imunomarcadores ER1 em relação ao CD163 em mulheres e homens, verificou-se que houve uma correlação positiva ($r=0,2487$), mas sem significância estatística ($p=0,1697$) (GRÁFICO 5). Notamos que o aumento da expressão do ER1 não se correlacionou com uma maior marcação pelo CD163. A Figura 12 ilustra o imunomarcador CD163.

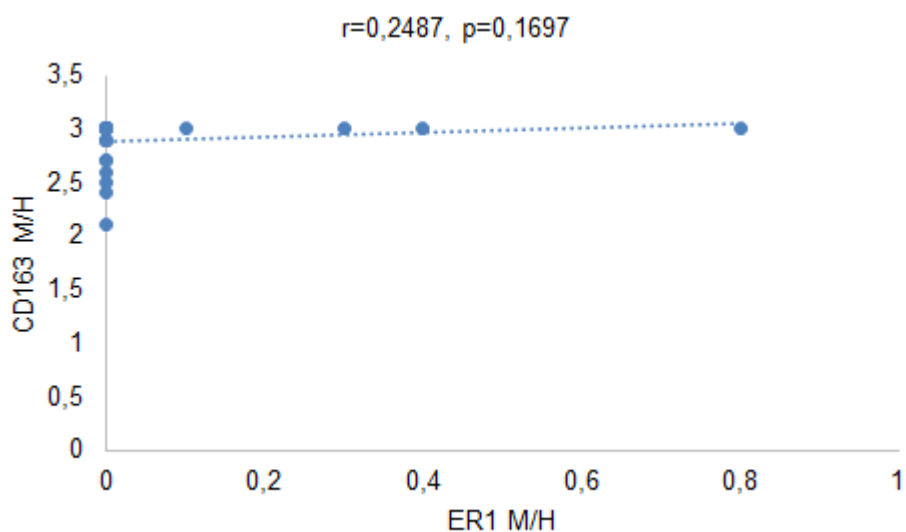


Gráfico 5 – Representação gráfica da dispersão do ER1 e do CD163 em ambos os gêneros com o coeficiente de correlação de Spearman e sua significância.

Fonte: Do autor.

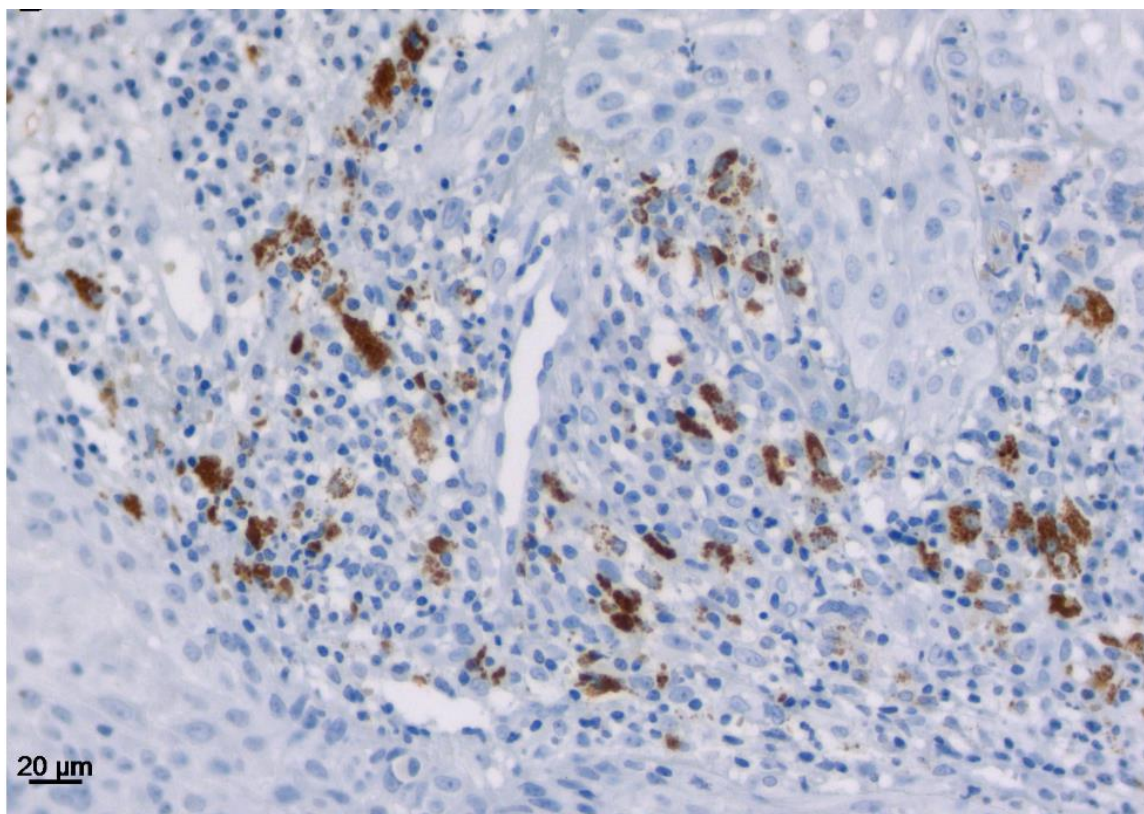


Figura 11 - Expressão imuno-histoquímica do anticorpo PR.
Fonte: Do autor

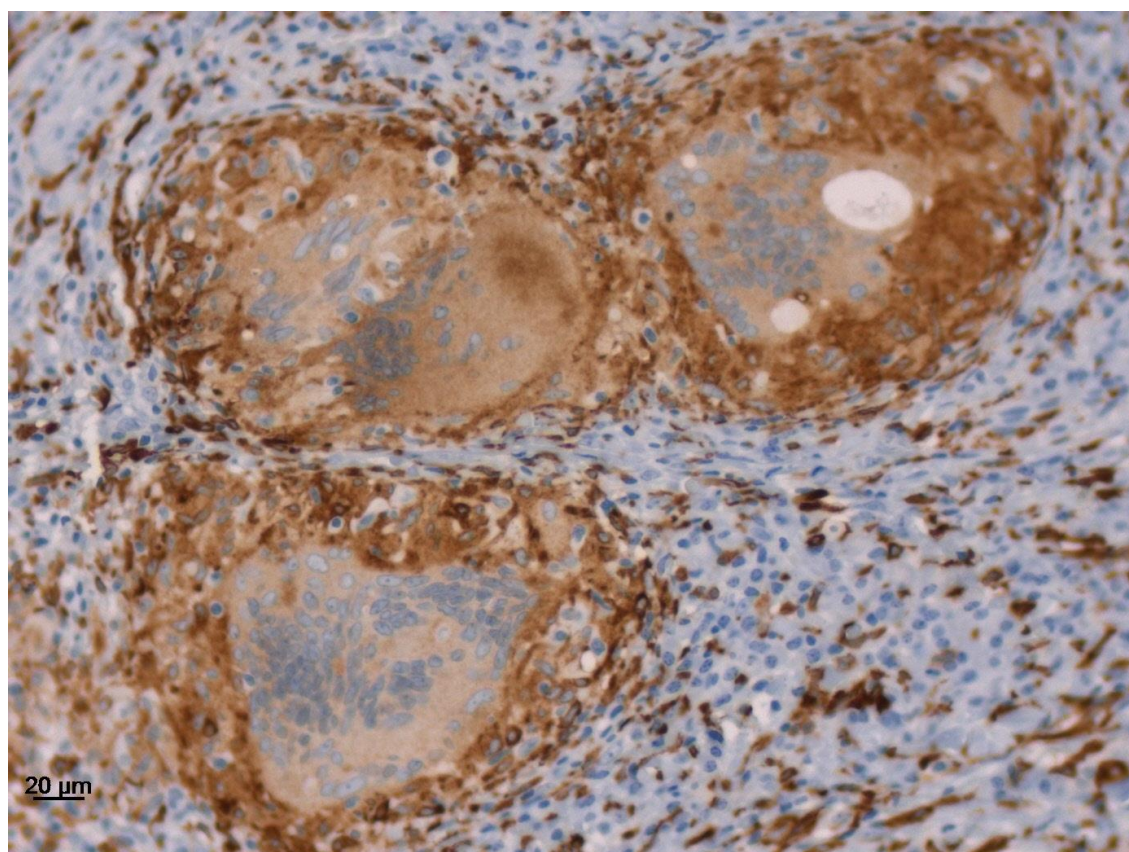


Figura 12 - Expressão imuno-histoquímica do anticorpo CD163.
Fonte: Do autor.

Comparando-se a expressão dos imunomarcadores ER1 em relação ao PR em mulheres, verificou-se que em três casos ambos os marcadores foram expressos. O PR foi expresso em outros seis casos (alguns com scores repetidos) onde o ER1 não se mostrou positivo. Também notamos que em apenas um caso o ER1 foi positivo e o PR negativo. Não houve diferença estatística entre os imunomarcadores ($r=0,1944$, $p=0,4706$) (GRÁFICO 6).

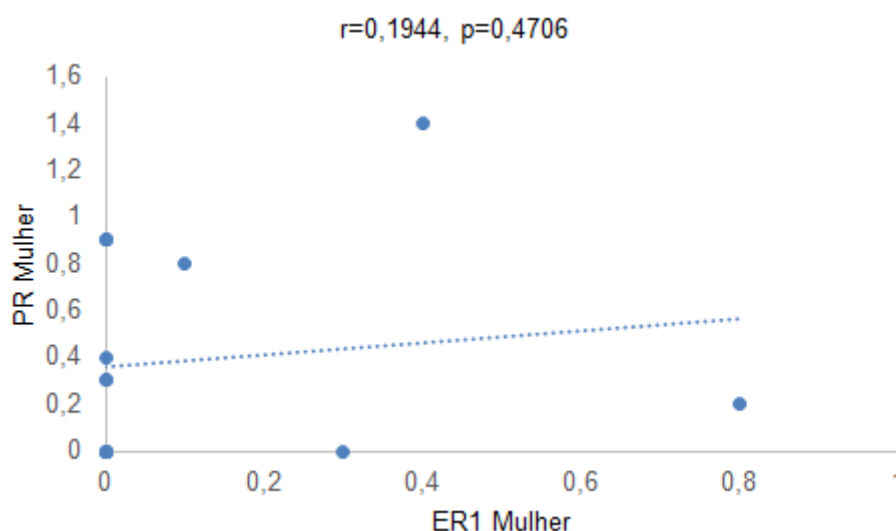


Gráfico 6 – Representação gráfica da dispersão do ER1 e do PR em mulheres com o coeficiente de correlação de Spearman e sua significância.

Fonte: Do autor.

Analisando-se a expressão do imunomarcador ER1 em relação ao CD163 em mulheres, verificou-se que nos casos onde o ER1 esteve expresso, os valores do CD163 se encontraram entre 2,9 e 3,0. O aumento da expressão do ER1 esteve relacionado com uma maior intensidade de marcação do CD163, porém esta não demonstrou uma correlação significativa entre os imunomarcadores ($r=0,3762$, $p=0,1508$) (GRÁFICO 7).

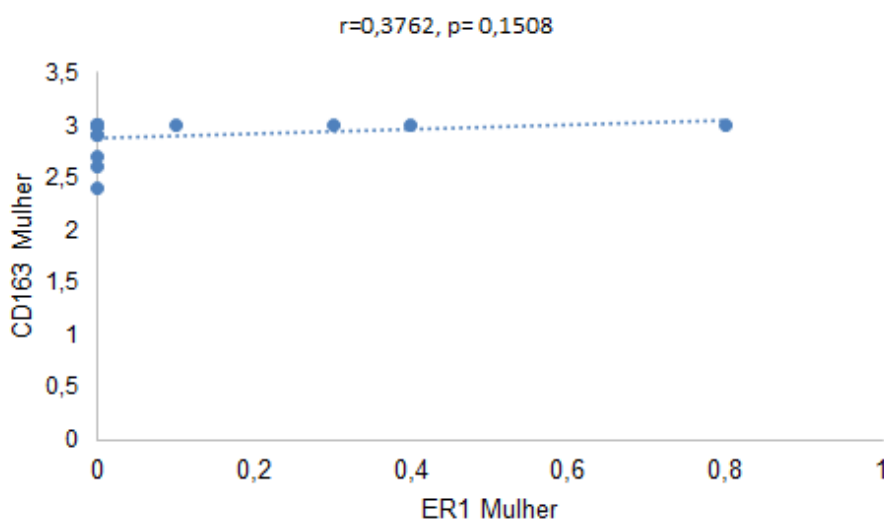


Gráfico 7 - Representação gráfica da dispersão do ER1 e do CD163 em mulheres com o coeficiente de correlação de Spearman e sua significância.

Fonte: Do autor.

Analisando-se a expressão do marcador PR M/H em relação ao Anti-*Pb* M/H, notamos que a correlação entre os marcadores se mostrou ligeiramente positiva ($r=0,0385$), no entanto não foi significativa ($p=0,8348$). Observamos também que o aumento da expressão do PR nem sempre esteve relacionado ao aumento do número de fungos, sendo que nos dois casos que apresentaram maior expressão do Anti-*Pb*, o PR não esteve expresso. Além disso, alguns casos onde o PR esteve mais expresso a quantidade de fungos se mostrou baixa, evidenciando assim a falta de correlação entre os marcadores (GRÁFICO 8).

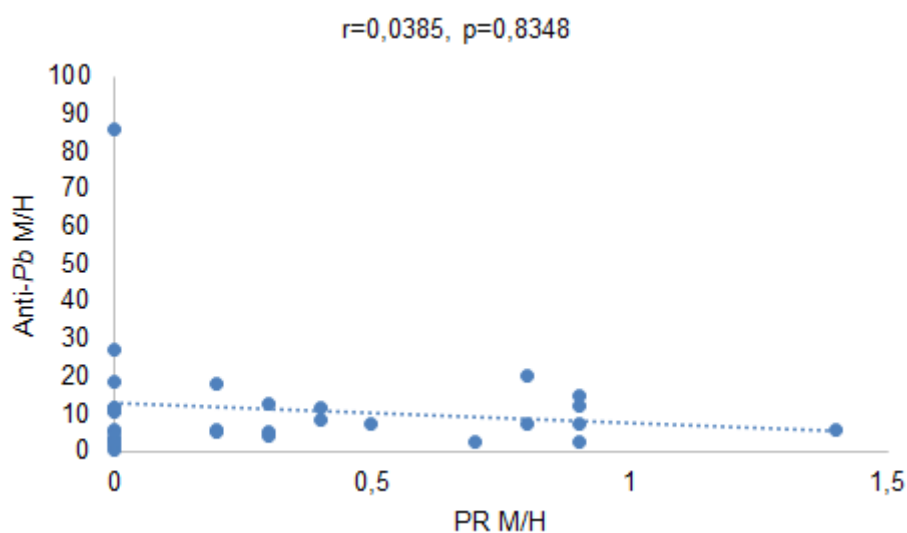


Gráfico 8 - Representação gráfica da dispersão do PR e do Anti-*Pb* em ambos os gêneros com o coeficiente de correlação de Spearman e sua significância.

Fonte: Do autor.

Nos gráficos 9 e 10, ilustramos a comparação entre as expressões dos imunomarcadores PR em relação ao Anti-*Pb*, em mulheres e homens, respectivamente. Em mulheres, verificamos que nos casos com maior quantidade de fungos (mais do que 10) não houve uma distribuição uniforme, sendo que em alguns casos o PR foi expresso e em outros não. A correlação se mostrou negativa ($r = -0,0324$), no entanto esta não foi significativa ($p = 0,9052$). Sendo assim, não podemos afirmar que o aumento da expressão de PR está relacionado com uma menor quantidade de fungos. Em homens, quando o PR foi correlacionado com o Anti-*Pb*, notamos que nos casos onde o PR não foi expresso que a quantidade de fungos era pequena (menor que 10 fungos), exceto para um caso que apresentou uma alta marcação pelo Anti-*Pb*. A correlação entre os marcadores se mostrou positiva ($r = 0,1495$), porém não foi significativa ($p = 0,5806$).

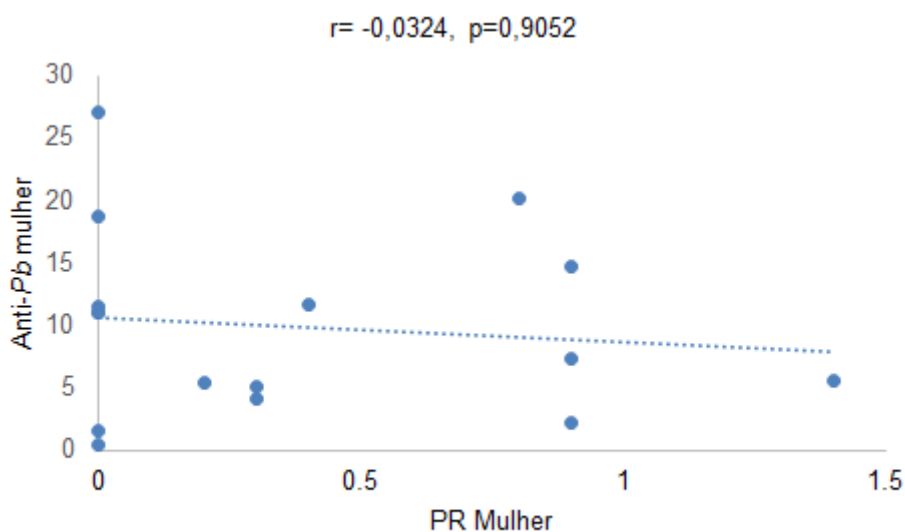


Gráfico 9 – Representação gráfica da dispersão do PR e do Anti-*Pb* em mulheres com o coeficiente de correlação de Spearman e sua significância.

Fonte: Do autor.

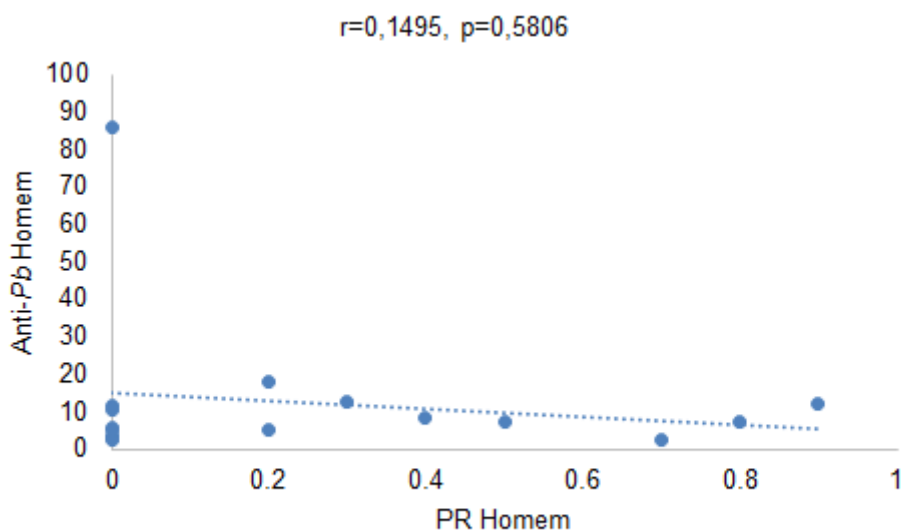


Gráfico 10 – Representação gráfica da dispersão do PR e do Anti-Pb em homens com o coeficiente de correlação de Spearman e sua significância.

Fonte: Do autor.

Analisando-se a expressão do marcador PR M/H em relação ao CD163 M/H, verificou-se que, nos casos onde o PR foi expresso, os valores do CD163 se mantiveram entre 2,4 e 3,0; havendo uma maior predominância para os escores 3,0. A correlação entre os marcadores se mostrou positiva ($r=0,1322$), porém não se mostrou significativa ($p= 0,4708$) (GRÁFICO 11).

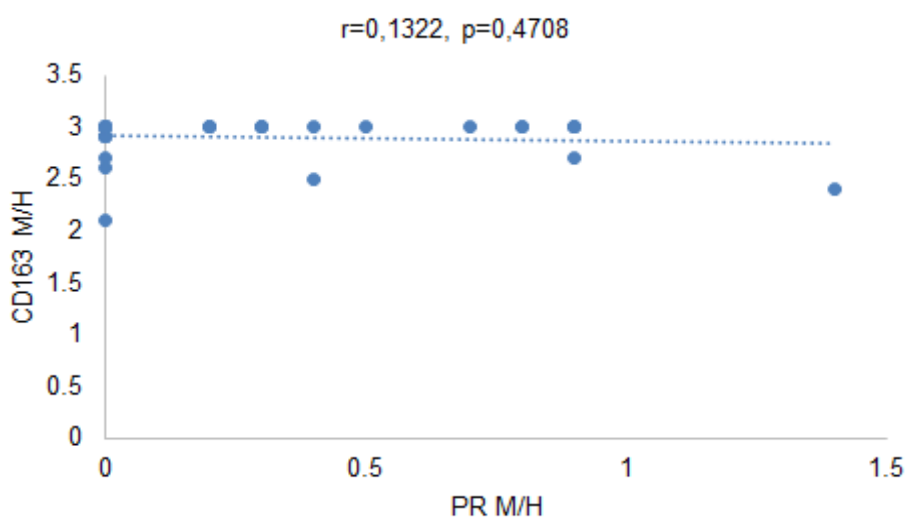


Gráfico 11 – Representação gráfica da dispersão do PR e do CD163 em ambos os gêneros com o coeficiente de correlação de Spearman e sua significância.

Fonte: Do autor.

A análise da expressão do marcador PR em relação ao CD163 em mulheres, demonstrou que os maiores valores expressos pelo PR estiveram relacionados com uma menor marcação pelo CD163. Notamos também que em alguns casos o CD163 apresentou score 3,0 e que o PR não foi expresso. A correlação entre os imunomarcadores se mostrou ligeiramente negativa ($r = -0,075$), no entanto não foi significativa ($p = 0,7824$) (GRÁFICO 12).

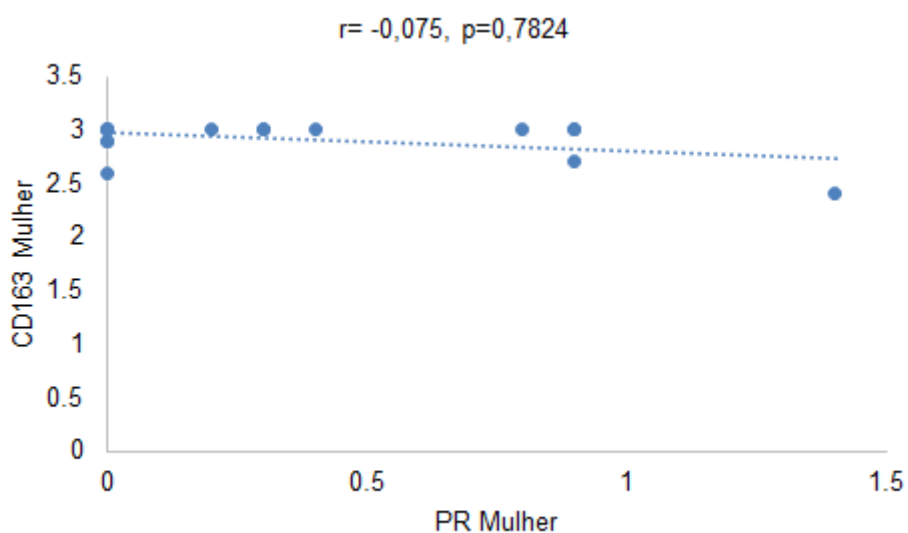


Gráfico 12 – Representação gráfica da dispersão do PR e do CD163 em mulheres com o coeficiente de correlação de Spearman e sua significância.

Fonte: Do autor.

Analisando a expressão do marcador PR em relação ao CD163 em homens, notamos que a maioria dos scores do CD163 foi próximo a 3,0 independentemente da expressão do PR. O coeficiente de correlação de Spearman não revelou significância entre os imunomarcadores ($r = 0,3540$, $p = 0,1785$) (GRÁFICO 13).

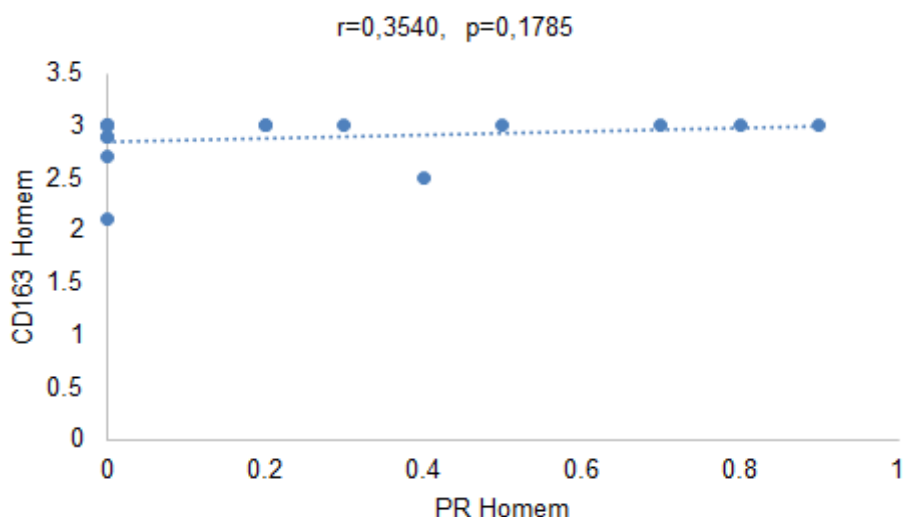


Gráfico 13 – Representação gráfica da dispersão do PR e do CD163 em homens com o coeficiente de correlação de Spearman e sua significância.

Fonte: Do autor.

Comparando-se a expressão do marcador CD163 M/H em relação ao Anti-*Pb* M/H, verificou-se que os maiores valores para o CD163, nem sempre estiveram relacionados com a maior quantidade de fungos. A correlação se mostrou positiva, porém não foi estatisticamente significativa entre os imunomarcadores ($r=0,2413, p=0,1834$) (GRÁFICO 14).

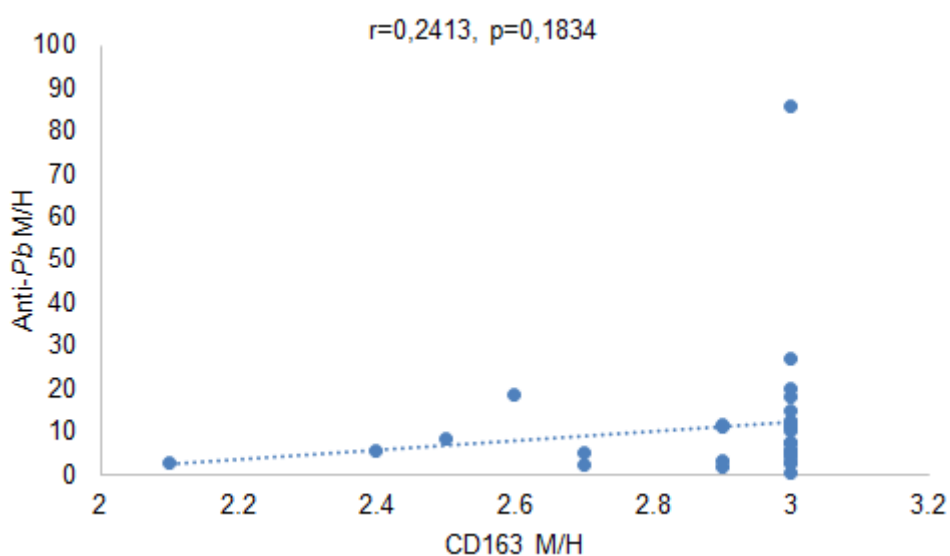


Gráfico 14 – Representação gráfica da dispersão do CD163 e do Anti-*Pb* em ambos os gêneros com o coeficiente de correlação de Spearman e sua significância.

Fonte: Do autor.

Analisando-se a expressão entre os imunomarcadores CD163 e Anti-*Pb* em mulheres, verificou-se que os maiores valores para o CD163 estiveram relacionados com a maior quantidade de fungos, com exceção para um caso que apresentou um score de 2,6 para o CD163 e esteve associado a uma maior quantidade de fungos. Não houve correlação significativa ($r= 0,1621$, $p= 0,5486$) (GRÁFICO 15).

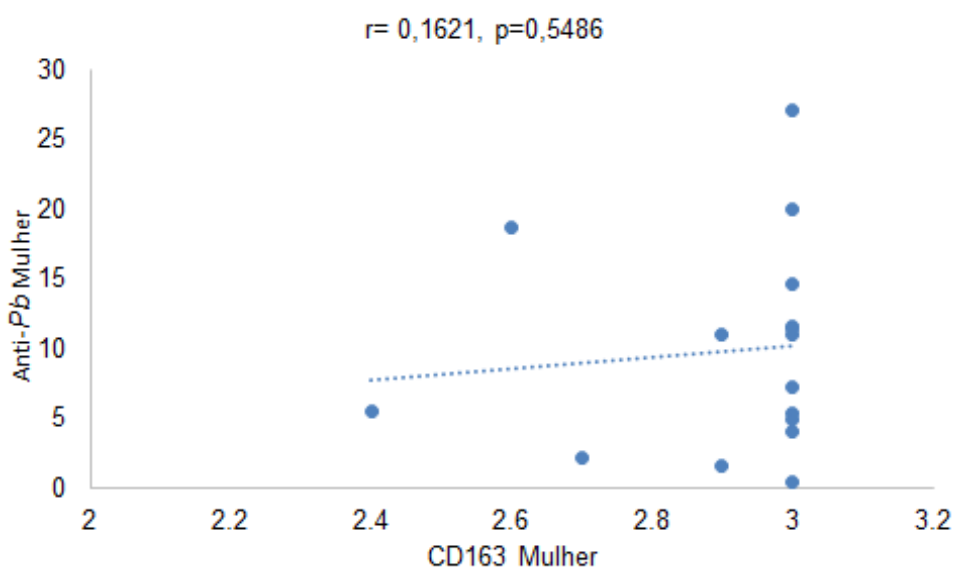


Gráfico 15 – Representação gráfica da dispersão do CD163 e do Anti-*Pb* em mulheres com o coeficiente de correlação de Spearman e sua significância.

Fonte: Do autor.

Analisando-se a expressão do marcador CD163 em relação ao Anti-*Pb* em homens, verificou-se que os maiores valores para o CD163, em sua maioria, estiveram relacionados com a maior quantidade de fungos. A correlação mostrou-se positiva ($r=0,3081$), porém não foi significativa ($p= 0,2456$) (GRÁFICO 16).

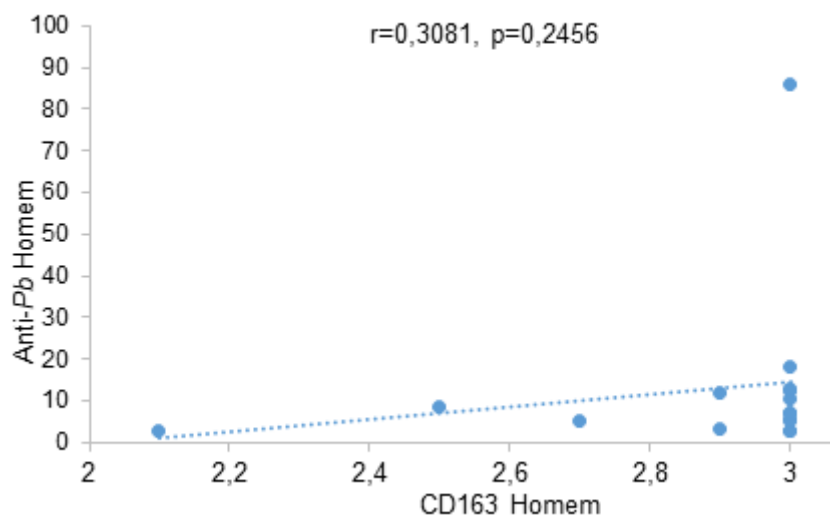


Gráfico 16 – Representação gráfica da dispersão do CD163 e do Anti-*Pb* em homens com o coeficiente de correlação de Spearman e sua significância.

Fonte: Do autor.

5 DISCUSSÃO

A PCM apresenta uma alta prevalência no Brasil, sobretudo na região sudeste (ARANTES et al., 2016; MARTINEZ, 2015; SIFUENTES-OSORNIO; CORZO-LEÓN; PONCE-DE-LEÓN, 2012). Essa doença é endêmica na região Sul de Minas Gerais e, recentemente, um estudo realizado em Alfenas demonstrou que 46,67% de seus participantes apresentaram reatividade positiva ao teste intradérmico (MAGALHÃES et al., 2014). A presença de um solo fértil e um grande número de trabalhadores no campo que cultivam o solo são alguns dos fatores que podem ajudar a explicar a alta incidência desta doença na região (SILVA et al., 2007). Também é notado um amplo predomínio para o desenvolvimento da PCM crônica em indivíduos com a faixa etária entre 30-60 anos (SHANKAR et al., 2011). Neste estudo, dos 32 casos de PCM selecionados, 29 se encontraram nesta faixa etária, evidenciando um maior acometimento da doença para adultos jovens.

Conforme foi descrito na metodologia, houve um pareamento entre os gêneros e a quantidade de pacientes homens e mulheres selecionados foi igual neste estudo. Entretanto, se considerarmos a quantidade total de pacientes diagnosticados com PCM no Laboratório de Anatomopatologia Bucal da Unifal-MG desde 1997, é de 81 casos, sendo 65 casos em homens e 16 em mulheres, levando a uma razão de 4:1, demonstrando um maior acometimento em homens, em conformidade com outros estudos (MARTINEZ, 2015; RESTREPO et al., 2006; SHANKAR et al., 2011; SIFUENTES-OSORNIO; CORZO-LEÓN; PONCE-DE-LEÓN, 2012).

Todos os casos foram diagnosticados exclusivamente pela presença de lesões orais, seguindo-se os critérios microscópicos descritos por Abreu e Silva et al. (2013). Inicialmente foram avaliados e classificados os tipos de granulomas, onde foi observada uma predominância para granulomas frouxos em relação aos densos em ambos os gêneros. No entanto, a variável gênero não influenciou no tipo de granuloma formado ($p= 0,4331$). Também não foram encontrados resultados significativos quando os tipos de granulomas foram avaliados com os imunomarcadores ER1, PR, CD163 e Anti-*Pb*. Alguns estudos demonstraram que uma menor quantidade de fungos é encontrada em granulomas densos e maiores quantidades de fungos em granulomas frouxos (BORGES-WALMSLEY et al., 2002; MAMONI; BLOTA, 2005; PARISE-FORTES et al., 2011; SHIKANAY-YAKSUDA et al., 2006). No entanto, nosso trabalho não revelou nenhuma correlação entre o tipo de granuloma com a quantidade

de fungos, assim como os estudos de Abreu e Silva et al. (2013), Carli et al. (2016) e Pedreira et al. (2016). A ausência de correlação com o ER1 e o PR pode indicar que os hormônios não sejam determinantes no tipo de granuloma a ser formado. As influências do microambiente (MANTOVANI et al., 2004) e susceptibilidade ou resistência do hospedeiro frente ao fungo (BURGER et al., 2013) têm sido descritos como os principais fatores que podem influenciar na formação desses granulomas.

O estrógeno e a progesterona são moléculas hidrofóbicas reguladoras que se ligam aos seus receptores intracelulares, resultando em um composto de hormônio-receptor, que é transportado para o núcleo e dá início a síntese de uma proteína específica (SHANKAR et al., 2011). Esses hormônios podem atuar na resposta imune e contribuir para a evolução de algumas doenças infecciosas tropicais como amebíase, leishmaniose e PCM (BERNIN; LOTTER, 2014). Nosso estudo revelou que o estrógeno esteve expresso em apenas algumas mulheres, sendo positivo em 25% dos casos.

Existem dois subtipos diferentes de ER chamados ER1 e ER2 (STRAUB, 2007); o primeiro não foi descrito na mucosa oral normal (GRIMM et al., 2016, VALIMAA et al., 2004), enquanto o segundo foi amplamente encontrado em queratinócitos orais e glândulas salivares acinares e células ductais (VALIMAA et al., 2004). Dessa forma, nossos resultados mostraram, pela primeira vez, a presença de ER1 em PCM oral e confirmando que a expressão de ER1 pode ser estimulada pela inflamação presente nos tecidos orais, conforme foi mencionado por Valimaa et al. (2004). O ER1 apresentou uma densidade de coloração predominantemente fraca no epitélio oral e células inflamatórias, semelhante ao que foi encontrado por Günham et al. (1998), que descreveu a expressão de ER1 nestes mesmos tipos celulares, porém em Lesões Periféricas de Células Gigantes. No entanto, estes autores observaram que algumas células gigantes do tipo osteoclasto também se mostraram positivas para a expressão do ER1, em contraste com nossas descobertas observadas na PCM oral. A distinta expressão de ER1 nas CGMs pode ser explicada devido a diferentes fenótipos, uma vez que as CGMs na PCM oral são predominantemente CD163+ e constituída por macrófagos M2 (PEDREIRA et al., 2016).

Alguns fungos patogênicos podem sofrer efeito dos vários hormônios do hospedeiro e assim estes hormônios podem exercer um efeito direto no desenvolvimento dessas doenças (SHANKAR et al., 2011). Dessa forma, nossos resultados revelaram uma correlação positiva significativa entre ER1 e quantidade de

fungos para as mulheres ($r = 0,6844$, $p = 0,0034$), ou seja, a maior expressão de ER1 foi associada com um maior número de fungos no tecido oral. Está bem estabelecido que a resistência das mulheres adultas para desenvolver a PCM é devido a inibição que o estrógeno exerce sobre a transição da forma de micélio para levedura (RESTREPO et al., 1984); no entanto, após o início da doença, esse hormônio não demonstrou exercer qualquer efeito inibitório sobre o crescimento dos fungos (ARISTIZABAL et al., 2002), corroborando com nossos resultados. Além disso, a maior resistência das mulheres contra processos infecciosos tem sido atribuída à alta produção de anticorpos (STRAUB, 2007), porém, na PCM a hipergamaglobulinemia assume apenas papel coadjuvante e não é efetiva para eliminar o *Pb* (ABREU E SIVA et al., 2013).

O 17 β -estradiol (E2) é o mais ativo dos hormônios estrógenos, sendo o principal responsável pela inibição da transição M-L (RESTREPO et al., 1984). Além deste efeito direto sobre os fungos, ele apresenta um potencial para modular as respostas inflamatórias de células Th1 e Th2 (LAMBERT et al., 2004). O E2 também demonstrou possuir um efeito anti-inflamatório nas diferentes células mediadas por seu receptor ER1, como a redução do TNF- α e da IL-6 e aumento da IL-4 (LAMBERT et al., 2004; SANTOS et al., 2017). A presença destas citocinas no ambiente favorece uma polarização em direção a uma resposta imune padrão Th2, que se caracteriza pela baixa liberação de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6; ativação de macrófagos M2 estimulados pelas IL-4 e IL-13; e a maior produção de citocinas anti-inflamatórias IL-10, TGF- β e arginase-1 (MOSSER; EDWARDS, 2008).

Tem sido descrito que macrófagos não polarizados expressam tanto ER1 quanto o ER2 (CAMPESI et al., 2017; KHAN et al., 2005). No entanto, o E2 estimula somente a expressão do ER1 em macrófagos e não tem nenhum resultado sobre níveis ER2 neste tipo de células (LAMBERT et al., 2004; 2005; MURPHY et al., 2009). Além disso, sob o estímulo das IL-4 e IL-13, os macrófagos M2 exibiram um aumento transitório nos níveis de RNAm do ER1 (LAMBERT et al., 2004; TONIOLO et al., 2015). Uma vez que os macrófagos M2 são as principais células inflamatórias presentes na PCM oral (CARLI et al., 2016) e o microambiente Th2 é predominante em pacientes com a PCM doença (MAMONI; BLOTTA, 2015), o estrógeno pode ter um papel fundamental na modulação da resposta imune através dos ER1, contribuindo para a manutenção da PCM após o seu início, tanto em homens quanto em mulheres.

O outro hormônio esteroide avaliado neste estudo foi a progesterona e, contrariamente ao ER1, este hormônio esteve expresso em ambos os gêneros. Apesar das mulheres terem apresentado maior número de casos e medianas das marcações mais altas, não houve diferença estatística entre os gêneros ($p = 0,4856$). As marcações exibiram colorações predominantemente fracas sobre células inflamatórias. Resultados semelhantes foram encontrados por Khan et al. (2005), que evidenciaram a fraca expressão da PR em macrófagos CD68. Contrariamente aos nossos achados, outros estudos não conseguiram detectar a presença de PR em Lesões Periféricas de Células Gigantes (GÜNHAM et al., 1998; WHITAKER; BOUQUOT, 1994). Contrastando com o ER1, a expressão de PR não apresentou nenhuma correlação com a quantidade de fungos presentes nos tecidos ($p = 0,8343$). Durante a gravidez, há um aumento expressivo nos níveis de PR, o que favorece alguns efeitos estimulantes da resposta Th2, principalmente através da produção das IL-4, IL-5 e IL-10 pelos linfócitos (STRAUB, 2007). As pacientes do gênero feminino incluídas neste estudo não estavam grávidas e, provavelmente apresentavam níveis reduzidos do PR, o que pode explicar a ausência de correlação entre os imunomarcadores avaliados.

Quando foram correlacionados os imunomarcadores PR e ER1, observou-se que em 75% dos casos onde o ER1 esteve expresso, que o PR também apresentou marcação positiva. A progesterona esteve mais expressa (positiva em 17 casos) e com scores médios mais altos, no entanto este resultado não foi significativo ($p = 0,4706$). Apesar disso, a progesterona tem sido mais relacionada com efeitos diretos sobre os órgãos sexuais, enquanto que o estrógeno apresenta maiores distribuições e efeitos sistêmicos (ENMARK et al., 1997).

A dificuldade de marcação pode ter acontecido devido ao baixo número de receptores, baixa sensibilidade dos anticorpos ou baixos níveis hormonais dos pacientes, dificuldades que também já foram relatadas em outros estudos (GÜNHAN et al., 1998; LEIMOLA-VIRTANEM et al., 2000). No entanto, é importante relatar que o mais importante não é a simples presença dos receptores, mas a sensibilidade, variedade e distribuição que estes apresentam nos tecidos (GÜNHAM et al., 1998).

O marcador CD163 foi fortemente expresso em mulheres e homens e não foi observada nenhuma diferença estatística entre os gêneros ($p = 0,9699$). Estes resultados indicam que independentemente do gênero, os macrófagos M2 estão amplamente presentes nas infecções crônicas da PCM, em acordo com os achados

de Carli et al. (2016). Essas células inflamatórias apresentam um papel fundamental no desenvolvimento da resposta imune contra o fungo (MURRAY; WYNN, 2011). Outro fator que tem sido descrito é que a persistência do agente agressor promove um aumento na quantidade de macrófagos M2, que induzem uma resposta imune Th2 e formação de áreas granulomatosas (FAIRWEATHER; CIHAKOVA, 2009). Sendo a PCM oral uma infecção crônica e geralmente de longa duração, seria de se esperar uma grande quantidade de macrófagos M2 nos tecidos infectados pelos fungos, independentemente do gênero, e foi exatamente essa situação que ficou evidenciada neste estudo.

No entanto, não foi observada correlação estatística significativa entre o CD163 e os imunomarcadores ER1, PR e *Pb*. Como os macrófagos M2 estão mais relacionados com efeitos anti-inflamatórios principalmente através da liberação das citocinas IL-4 e IL-10 (FAIRWEATHER; CIHAKOVA, 2009) e os hormônios estrógeno e progesterona também tem sido relacionados com efeitos anti-inflamatórios (DIMAYUGA et al., 2005; FAIRWEATHER; FRISANCHO-KISS; ROSE, 2008; SALEM et al., 1999; SALEM; HOSSAIN; NOMOTO, 2000; STRAUB, 2007), seria de se esperar que as maiores expressões dos hormônios esteroidais estivessem correlacionados com maiores expressões do CD163. Além disso, também tem sido citado que o E2 pode promover uma diminuição da função antibacteriana dos macrófagos, conforme foi visto em casos de infecção pela *Listeria monocytogenes* (SALEM et al., 1999). Contudo, esta correlação não foi notada e uma possível explicação seria de que os níveis hormonais desses pacientes se apresentaram em níveis baixos a tal ponto de não ter influenciado de forma significativa no processo inflamatório.

A PCM é uma infecção crônica, de longa duração, com predominância para os M2 (CARLI et al., 2016) e predomínio do padrão Th2 com a presença de citocinas anti-inflamatórias (MAMONI; BLOTTA, 2005; PARISE-FORTES et al., 2011). Estes eventos podem favorecer com que os fungos penetrem para o interior de macrófagos, células epiteliais e endoteliais (BORGES-WALMSLEY et al., 2002; MENDES-GIANNINI et al., 2008). No interior destas células ele deixa de ser reconhecido pelo sistema imune e pode ter sua multiplicação e disseminação facilitadas para diversos tecidos (MENDES-GIANNINI et al., 2008, RESTREPO et al., 2011). Assim, esperava-se que uma maior quantidade de fungos estivesse correlacionada com a maior expressão do CD163, no entanto não foi observada correlação significativa entre os

imunomarcadores ($p= 0,1834$). Provavelmente a presença de uma correlação não significativa ocorreu devido ao fato de que a grande maioria dos casos apresentaram marcação intensa para o CD163, ao passo que o Anti-*Pb* apresentou uma distribuição mais heterogênea, variando de 0,4 até 85,9. Assim, apesar dos fungos possuírem um potencial antigênico principalmente através da Gp-43 (PARISE-FORTES et al., 2011), as influências das citocinas no microambiente podem ser mais determinantes na atração de M2 (FAIRWEATHER; CIHAKOVA, 2009) e fazer com que essas células estejam amplamente presentes mesmo em casos com pequenas quantidades de fungos.

Sendo assim, as implicações de gênero no desenvolvimento da PCM podem ser associadas principalmente com os dois efeitos do E2: o efeito direto sobre o fungo, através da inibição da transição da forma de micélio à levedura (SHANKAR et al., 2011); e a influência exercida sobre a resposta imune do hospedeiro através da polarização para Th1 ou Th2 (STRAUB, 2007).

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados concluímos que, em lesões orais crônicas da PCM, o ER1 esteve expresso apenas em mulheres e mostrou uma correlação positiva significativa com a quantidade de fungos. Por sua vez, o PR foi observado em ambos os gêneros e mostrou uma correlação positiva não significativa para os imunomarcadores ER1, *Pb* e CD163. Finalmente, o CD163 e o *Pb* apresentaram uma correlação positiva, mas que não se mostrou ser significativa.

REFERÊNCIAS

ABREU E SILVA, M. A. et al. Important aspects of oral paracoccidioidomycosis - a literature review. **Mycoses**, v. 56, n. 3, p. 189-199, 2013.

AGHA-HOSSEINI, F.; TIRGARI, F.; SHAIGAN, S. Immunohistochemical analysis of estrogen and progesterone receptor expression in gingival lesions. **Iran J Public Health**, v. 35, n. 2, p. 38-41, 2006.

ALMEIDA, O. P.; JORGE-JÚNIOR, J.; SCULLY, C. Paracoccidioidomycosis of the mouth: an emerging deep mycosis. **Crit Rev Oral Biol Med.**, v. 14, n. 5, p. 377-83, 2003.

ARANTES, T. D. et al. Environmental mapping of *Paracoccidioides* spp. in Brazil reveals new clues into genetic diversity, biogeography and wild host association. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 10, n. 4, p. e0004606, 2016.

ARISTIZÁBAL, B. H. et al. Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice: influence of the hormonal status of the host on tissue responses. **Med Mycol.**, v. 40, n. 2, p. 169-178, 2002.

ARISTIZÁBAL, B. H. et al. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: *in vivo* inhibition in females. **Infect Immun.**, v. 66, n. 11, p. 5587-5591, 1998.

AYRES, M. et al. **BioEstat 5.0**: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: MCT; IDSM; CNPq, 2007. 364 p.

BATISTA, A.; SOARES, C.; LARA, V. Failure of nitric oxide production by macrophages and decrease in CD4+ T cells in oral paracoccidioidomycosis: possible mechanisms that permit local fungal multiplication. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 47, n. 5, p. 267-273, 2005.

BENARD, G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 209-221, 2008.

BENGTSSON, Å. K. et al. 17 β -estradiol (E2) modulates cytokine and chemokine expression in human monocyte-derived dendritic cells. **Blood**, v. 104, n. 5, p. 1404-1410, 2004.

BERNIN, H.; LOTTER, H. Sex bias in the outcome of human tropical infectious diseases: influence of steroid hormones. **J Infect Dis.**, v. 209, n. suppl 3, p. S107-S113, 2014.

BORGES-WALMSLEY, M. I. et al. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends Microbiol.**, v. 10, n. 2, Feb. 2002.

BRITO, T.; FRANCO, M. F. Granulomatous inflammation. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 36, n. 2, p. 185-192, 1994.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin Microbiol Rev.**, v. 6, n. 2, p. 89-117, 1993.

BURGER, E. et al. Cytokines expressed in the granulomatous lesions in experimental Paracoccidioidomycosis: role in host protective immunity and as fungal virulence factor. **J Clin Cell Immunol.**, v. 1, p. 2, 2013.

CAMARGO, Z. P.; FRANCO M. F. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Rev Iberoam Micol.**, v. 17, n. 2, p. 41-48, 2000.

CAMPESI, I. et al. Sex Differences in Estrogen Receptor α and β Levels and Activation Status in LPS-Stimulated Human Macrophages. **J Cell Physiol.**, v. 232, n. 2, p. 340-345, 2017.

CANO, L. E. et al. Pulmonary paracoccidioidomycosis: clinical, immunological and histopathological aspects. **Lung diseases-selected state of art reviews**. Rijeka: Intech-Europe, p. 359-91, 2012.

CARLI, M. L. et al. M2 macrophages and inflammatory cells in oral lesions of chronic paracoccidioidomycosis. **J Oral Pathol Med.**, v. 45, n. 2, p. 141-147, 2016.

CARLSTEN, H. et al. Oestradiol-and testosterone-mediated effects on the immune system in normal and autoimmune mice are genetically linked and inherited as dominant traits. **Immunology**, v. 68, n. 2, p. 209, 1989.

CHAO, T. C. et al. Steroid sex hormones regulate the release of tumor necrosis factor by macrophages. **Cell Immunol.**, v. 160, n. 1, p. 43-49, 1995.

CHAO, T. C. et al. Steroid sex hormones and macrophage function: regulation of chemiluminescence and phagocytosis. **Am J Reprod Immunol.**, v. 35, n. 2, p. 106-113, 1996.

COLOMBO, A. et al. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. **Med Mycol.**, v. 49, n. 8, p. 785-798, 2011.

COUTINHO, Z. F. et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad Saude Publica**, v.18, n.5, p.1441-54, 2002.

CUZZOCREA, S. et al. 17β -estradiol antiinflammatory activity in carrageenan-induced pleurisy. **Endocrinology**, v. 141, n. 4, p. 1455-1463, 2000.

ENMARK, E. et al. Human estrogen receptor β -gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 82, n. 12, p. 4258-4265, 1997.

FABRIEK, B. O.; DIJKSTRA, C. D.; VAN DEN BERG, T. K. The macrophage scavenger receptor CD163. **Immunobiology**, v. 210, n. 2, p. 153-160, 2005.

FAIRWEATHER, D.; CIHAKOVA, D. Alternatively activated macrophages in infection and autoimmunity. **J Autoimmun.**, v. 33, n. 3, p. 222-230, 2009.

FAIRWEATHER, D.; FRISANCHO-KISS, S.; ROSE, N.R. Sex differences in autoimmune disease from a pathological perspective. **Am J Pathol.**, v. 173, n. 3, p. 600-609, 2008.

FAIRWEATHER, D.; ROSE, N. R. Women and autoimmune diseases. **Emerg Infect Dis.**, v. 10, n. 11, p. 2005-11, 2004.

FRISANCHO-KISS, S. et al. Gonadectomy of male BALB/c mice increases Tim-3+ alternatively activated M2 macrophages, Tim-3+ T cells, Th2 cells and Treg in the heart during acute coxsackievirus-induced myocarditis. **Brain Behav Immun.**, v. 23, n. 5, p. 649-657, 2009.

GAMER, M.; LEMOM, J.; SINGH, I.F.P. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em: 14 mar. 2017.

GRIMM, M. et al. Estrogen and Progesterone hormone receptor expression in oral cavity cancer. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 21, n. 5, p. e554, 2016.

GROSSMAN, C. J. Regulation of the immune system by sex steroids. **Endocr Rev.**, v. 5, n. 3, p. 435-455, 1984.

GÜNHAN, M. et al. Estrogen and progesterone receptors in the peripheral giant cell granulomas of the oral cavity. **J Oral Sci.**, v. 40, n. 2, p. 57-60, 1998.

HEUSINKVELD, M.; VAN DER BURG, S. H. Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. **J Transl Med.**, v. 9, n. 1, p. 216, 2011.

KHAN, K. N. et al. Estrogen and progesterone receptor expression in macrophages and regulation of hepatocyte growth factor by ovarian steroids in women with endometriosis. **Hum Reprod.**, v. 20, n. 7, p. 2004-2013, 2005.

KAMINAGAKURA, E. et al. Characterization of inflammatory cells in oral paracoccidioidomycosis. **Oral Dis.**, v.13, n.4, p.434-9, Jul. 2007.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; ASTER, J.C. **Robbins Patologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, Brasil, 2013.

LAINE, M. et al. Immunohistochemical demonstration of androgen receptors in human salivary glands. **Arch Oral Biol.**, v. 38, n. 4, p. 299-302, 1993.

LAMBERT, K. C. et al. Estrogen receptor- α deficiency promotes increased TNF- α secretion and bacterial killing by murine macrophages in response to microbial stimuli in vitro. **J Leukoc Biol.**, v. 75, n. 6, p. 1166-1172, 2004.

LAMBERT, K. C. et al. Estrogen receptor α (ER α) deficiency in macrophages results in increased stimulation of CD4⁺ T cells while 17 β -estradiol acts through ER α to increase IL-4 and GATA-3 expression in CD4⁺ T cells independent of antigen presentation. **J Immunol.**, v. 175, n. 9, p. 5716-5723, 2005.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. An application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of majority agreement among multiple observers. **Biometrics**, p. 363-374, 1977.

LEIMOLA-VIRTANEN, R. et al. Estrogen response in buccal mucosa - cytological and immunohistological assay. **Maturitas**, v. 27, n. 1, p. 41-45, 1997.

LEIMOLA-VIRTANEN, R. et al. Expression of estrogen receptor (ER) in oral mucosa and salivary glands. **Maturitas**, v. 36, n. 2, p. 131-137, 2000.

LOOSE, D. S. et al. Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 80, n. 24, p. 7659-7663, Dec. 1983.

LOTH, E. et al. Occurrence of 102 cases of paracoccidioidomycosis in 18 months in the Itaipu Lake region, Western Paraná. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 44, n. 5, p. 636-637, 2011.

LUKITS, J. et al. Molecular identification, expression and prognostic role of estrogen- and progesterone receptors in head and neck cancer. **Int J Oncol.**, v. 30, n. 1, p. 155-160, 2007.

MAGALHÃES, E. M. S. Prevalence of paracoccidioidomycosis infection by intradermal reaction in rural areas in Alfenas, Minas Gerais, Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 56, n. 4, p. 281-285, 2014.

MAMONI, R. L.; BLOTTA, M. H. S. L. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. **Cytokine**, v. 32, n. 1, p. 20-29, 2005.

MANTOVANI, A. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol.**, v. 25, n. 12, p. 677-686, 2004.

MARTINEZ, F.O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. **Annu Rev Immunol.**, v. 27, p. 451-483, 2009.

MARTINEZ, R. Epidemiology of paracoccidioidomycosis. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 57, p. 11-20, 2015.

McEWEN, J. G. et al. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **J Med Vet Mycol.**, v. 25, n. 3, p. 165-175, 1987.

MENDES-GIANNINI, M. J. S. et al. Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: recent advances. **Mycopathologia**, v.165, n.4-5, p.237-248, Apr./ May 2008.

MEURMAN, J. H.; TARKKILA, L.; TIITINEN, A. The menopause and oral health. **Maturitas**, v. 63, n. 1, p. 56-62, 2009.

MILLAS, I. et al. Evaluation of estrogenic receptors in the nasal mucosa of women taking oral contraceptives. **Contraception**, v. 83, n. 6, p. 571-577, 2011.

MØLLER, H. J. Soluble CD163. **Scand J Clin Lab Invest.**, v. 72, n. 1, p. 1-13, 2012.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol.**, v. 8, n. 12, p. 958-969, 2008.

MURPHY, A. J. et al. Estradiol regulates expression of estrogen receptor ER α 46 in human macrophages. **PloS One**, v. 4, n. 5, p. e5539, 2009.

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nat Rev Immunol.**, v. 11, n. 11, p. 723-737, 2011.

NASCIMENTO, M. P. P. et al. Fungicidal activity of human monocyte-derived multinucleated giant cells induced in vitro by *Paracoccidioides brasiliensis* antigen. **Mycopathologia**, v.166, n.1, p.25-33, Jul. 2008.

NORTON, A. J.; JORDAN, S.; YEOMANS, P. Brief, high-temperature heat denaturation (pressure cooking): A simple and effective method of antigen retrieval for routinely processed tissues. **J Pathol**, v. 173, n. 4, p. 371-379, 1994.

NUCCI, M.; COLOMBO, A. L.; QUEIROZ-TELLES, F. Paracoccidioidomycosis. **Curr Fungal Infect Rep.**, v. 3, n. 1, p. 15-20, 2009.

OJANOTKO-HARRI, A. et al. Immunohistochemical detection of androgen receptors in human oral mucosa. **Arch Oral Biol.**, v. 37, n. 6, p. 511-514, 1992.

PALMEIRO, M.; CHERUBINI, K.; YURGEL, L. S. Paracoccidioidomicose: revisão da literatura. **Sci Med.**, v. 15, n. 4, p. 274-278, 2005.

PARISE-FORTES, M. R. et al. Cytokines released from blood monocytes and expressed in mucocutaneous lesions of patients with paracoccidioidomycosis evaluated before and during trimethoprim–sulfamethoxazole treatment. **Br J Dermatol.**, v. 154, n. 4, p. 643-650, 2006.

PARISE-FORTES, M. R. et al. Immunology of paracoccidioidomycosis. **An Bras Dermatol.**, v. 86, n. 3, p. 516-524, 2011.

PEDREIRA, R. P. G. et al. Oral paracoccidioidomycosis granulomas are predominantly populated by CD163+ multinucleated giant cells. **Mycopathologia**, v. 181, n. 9-10, p. 709-716, 2016.

PINZAN, C. F. et al. Immunological basis for the gender differences in murine *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **PLoS One**, San Francisco, v. 5, n. 5, p. e10757, 2010.

RAMOS-E-SILVA, M.; SARAIVA, L. E. S. Paracoccidioidomycosis. **Dermatol Clin.**, v.26, n.2, p.257-269, Apr. 2008.

RESTREPO, A. et al. Paracoccidioidomycosis. In: KAUFFMAN, C.A. et al. (edit.). **Essentials of Clinicals Mycology**. 2. ed. New York: Springer, p. 367-85, 2011.

RESTREPO, A. et al. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infect Immun.**, v. 46, n. 2, p. 346-353, 1984.

SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infect Immun.**, v. 56, n. 3, p. 711-713, 1988.

SALEM, M. L. Estrogen, a double-edged sword: modulation of TH1-and TH2-mediated inflammations by differential regulation of TH1/TH2 cytokine production. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy.**, v. 3, n. 1, p. 97-104, 2004.

SALEM, M. L. et al. Beta-estradiol-induced decrease in IL-12 and TNF- α expression suppresses macrophage functions in the course of *Listeria monocytogenes* infection in mice. **Int J Immunopharmacol.**, v. 21, n. 8, p. 481-497, 1999.

SALEM, M. L.; HOSSAIN, M. S.; NOMOTO, K. Mediation of the immunomodulatory effect of β -estradiol on inflammatory responses by inhibition of recruitment and

activation of inflammatory cells and their gene expression of TNF- α and IFN- γ . **Int Arch Allergy Immunol.**, v. 121, n. 3, p. 235-245, 2000.

SANTOS, R. S. et al. The effects of 17 alpha-estradiol to inhibit inflammation in vitro. **Biol Sex Differ.**, v. 8, n. 1, p. 30, 2017.

SAWCZUK, B. et al. Evaluation of estrogen receptor- β expression in the epithelium of the oral mucosa in menopausal women under hormone replacement therapy. **Adv Med Sci.**, v. 59, n. 1, p. 85-89, 2014.

SHANKAR, J. et al. Hormones and the resistance of women to paracoccidioidomycosis. **Clin Microbiol Rev.**, v. 24, n. 2, p. 296-313, 2011.

SHANKAR, J. et al. Influence of 17 β -estradiol on gene expression of *Paracoccidioides* during mycelia-to-yeast transition. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e28402, 2011.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Guideliness in paracoccidioidomycosis. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 39, n. 3, p. 297-310, 2006.

SIFUENTES-OSORNIO, J.; CORZO-LEÓN, D. E.; PONCE-DE-LEÓN, L. A. Epidemiology of invasive fungal infections in Latin America. **Curr Fungal Infect Rep.**, v. 6, n. 1, p. 23-34, 2012.

SILVA, C. O. et al. Gingival involvement in oral paracoccidioidomycosis. **J Periodontol.**, v.78, n.7, p.1229-34, Jul. 2007.

STOVER, E. P. et al. Estradiol-binding proteins from mycelial and yeast-form cultures of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infect Immun.**, v. 51, n. 1, p. 199-203, 1986.

STRAUB, R. H. The complex role of estrogens in inflammation. **Endocr Rev.**, v. 28, n. 5, p. 521-574, 2007.

TONIOLO, A. et al. Alternative activation of human macrophages is rescued by estrogen treatment in vitro and impaired by menopausal status. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 100, n. 1, p. E50-E58, 2015.

UNTERKIRCHER, C. S. et al. Natural antibodies in paracoccidioidomycosis. **Braz J Microbiol.**, v.35, p.59-63, 2004.

VALIMAA, H. et al. Estrogen receptor-beta is the predominant estrogen receptor subtype in human oral epithelium and salivary glands. **J Endocrinol.**, v. 180, n. 1, p. 55-62, 2004.

VAN DEN HEUVEL, M. M. et al. Regulation of CD 163 on human macrophages: cross-linking of CD163 induces signaling and activation. **J Leukoc Biol.** v. 66, n.5, p. 858-866, Nov. 1999.

WANG, C. W. J.; MCCAULEY, L. K. Osteoporosis and periodontitis. *Curr Osteoporos Rep.*, v. 14, n. 6, p. 284-291, 2016.

WANKE, B.; AIDÉ, M. A. Chapter 6-Paracoccidioidomycosis. **J Bras Pneumol.**, v. 35, n. 12, 2009.

WHITAKER, S. B.; BOUQUOT J. E. Identification and semiquantification of estrogen and progesterone receptors in pyogenic granulomas of pregnancy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, v. 78, n. 6, p. 755-760, 1994.

ZUGUCHI, M. et al. Estrogen receptor α and β in esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer Sci.**, v. 103, n. 7, p. 1348-1355, 2012.

ANEXO

ANEXO- PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALFENAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO ESTRÓGENO E DA PROGESTERONA EM LESÕES BUCAIS DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE

Pesquisador: João Adolfo Costa Hanemann

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 57633816.5.0000.5142

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.073.701

Apresentação do Projeto:

Trata-se, ao que tudo indica, de um projeto de mestrado, que tem como tema central de pesquisa a paracoccidiodomicose (PCM), uma infecção causada pelos fungos dimórficos *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*, endêmica na região de Alfenas/MG. Esta doença afeta inicialmente os pulmões e, posteriormente, pode disseminar-se para outros órgãos como a mucosa bucal, onde pode produzir lesões secundárias. Os autores apresentam a evidência baseada na literatura de que esta doença tem forte predileção pelo sexo masculino, o que se justifica em virtude dos hormônios femininos impedirem a transformação da forma de hifas em levedura, que é a forma causadora da doença. Neste contexto, o estudo se justifica pelo fato de contribuir para um melhor entendimento de como os hormônios femininos influenciam a predisposição à doença, podendo auxiliar no desenvolvimento de possíveis métodos de prevenção e tratamento.

Objetivo da Pesquisa:

Os autores têm como objetivo primário avaliar a expressão imuno-histoquímica dos receptores de estrógeno e progesterona em fragmentos de biópsias, obtidas de lesões bucais, de pacientes de ambos os gêneros portadores de Paracoccidiodomicose, sendo as amostras provenientes dos Arquivos do Laboratório de Anatomopatologia Bucal da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-

Endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700

Bairro: centro

CEP: 37.130-000

UF: MG

Município: ALFENAS

Telefone: (35)3299-1318

Fax: (35)3299-1318

E-mail: comite.etica@unifal-mg.edu.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALFENAS**



Continuação do Parecer: 2.073.701

MG). Os objetivos são claros, exequíveis e consistentes com a abordagem geral do projeto.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos para o desenvolvimento da pesquisa, uma vez que as amostras tratam-se de fragmentos de biópsias provenientes de banco de dados. Como benefícios, trazem a compreensão da patogênese da doença, de forma a contribuir com a descoberta de possíveis tratamentos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está bem escrito e referenciado, e apresenta metodologia adequada aos objetivos propostos. O cronograma foi ajustado para início das atividades em 01/06/2017.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- a. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – não se aplica
- b. Termo de Assentimento (TA) – não se aplica
- c. Termo de Assentimento Esclarecido (TAE) – não se aplica
- d. Termo de Compromisso para Utilização de Dados e Prontuários (TCUD) – presente e adequado
- e. Termo de Anuência Institucional (TAI) – presente e adequado
- f. Folha de rosto - presente e adequada
- g. Projeto de pesquisa completo e detalhado - presente e adequado
- h. Outros: Termo de dispensa do TCLE - presente e adequado
- i. Outros: Cronograma - presente e adequado

Recomendações:

As sugestões de redação na metodologia feitas na versão 1 do parecer não foram acatadas pelos autores, porém isso não implica em limitação de ordem ética para o desenvolvimento do projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Recomenda-se a aprovação do projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado do CEP acata o parecer do relator.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_753949.pdf	08/05/2017 17:21:43		Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA_DE_EXECUCAO.docx	08/05/2017 17:19:25	João Adolfo Costa Hanemann	Aceito

Endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700
Bairro: centro **CEP:** 37.130-000
UF: MG **Município:** ALFENAS
Telefone: (35)3299-1318 **Fax:** (35)3299-1318 **E-mail:** comite.etica@unifal-mg.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALFENAS



Continuação do Parecer: 2.073.701

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoPBmicoseClenivaldo08052017.docx	08/05/2017 17:09:38	João Adolfo Costa Hanemann	Aceito
Outros	Termodecompromisso.pdf	06/07/2016 11:00:26	João Adolfo Costa Hanemann	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termodecolaboracao.pdf	06/07/2016 10:59:23	João Adolfo Costa Hanemann	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	SolicitacaodedispensadeTCLE.pdf	06/07/2016 10:58:48	João Adolfo Costa Hanemann	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderostoassinada.pdf	06/07/2016 10:57:19	João Adolfo Costa Hanemann	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ALFENAS, 19 de Maio de 2017

Assinado por:
Marcela Filié Haddad
(Coordenador)

Endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700

Bairro: centro

CEP: 37.130-000

UF: MG

Município: ALFENAS

Telefone: (35)3299-1318

Fax: (35)3299-1318

E-mail: comite.etica@unifal-mg.edu.br