



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO
DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Michelle de Campos Soriani Azevedo

**Participação das células Th1, Th2, Th17 e T regulatórias na
doença de Jorge Lobo: análise do perfil de expressão
gênica nas lesões**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestre(a) em Doenças
Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Ida Maria Foschiani Dias Baptista
Coorientadora: Profa. Dra. Andrea de Faria Fernandes Belone
Coorientadora: Profa. Dra. Ana Paula Fávaro Trombone Garlet

**Botucatu
2015**

Michelle de Campos Soriani Azevedo

Participação das células Th1, Th2, Th17 e T
regulatórias na doença de Jorge Lobo: análise do perfil
de expressão gênica nas lesões

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre(a) em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Ida Maria Foschiani Dias Baptista
Coorientadora: Profa. Dra. Andrea de Faria Fernandes Belone
Coorientadora: Profa. Dra. Ana Paula Fávaro Trombone Garlet

Botucatu
2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Azevedo, Michelle de Campos Soriani.

Participação das células Th1, Th2, Th17 e T regulatórias na doença de Jorge Lobo : análise do perfil de expressão gênica nas lesões / Michelle de Campos Soriani Azevedo. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Ida Maria Foschiani Dias Baptista
Coorientador: Andrea de Faria Fernandes Belone
Coorientador: Ana Paula Fávaro Trombone Garlet
Capes: 40101096

1. Blastomicose queloidiana. 2. Expressão gênica. 3. Pele - Infecções. 4. Tecidos (Anatomia e fisiologia) - Infecções.

Palavras-chave: Doença de Jorge Lobo; Th1; Th17; Th2; Tregulatórias.

Michelle de Campos Soriani Azevedo

Participação das células Th1, Th2, Th17 e T regulatórias na doença de Jorge Lobo:
análise do perfil de expressão gênica nas lesões

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre
em Doenças Tropicais

Orientador: Profa. Dra. Ida Maria Foschiani Dias Baptista

Comissão examinadora

Profa. Dra. Andrea de Faria Fernandes Belone
Instituto Lauro de Souza Lima – Bauru/SP

Profa. Dra. Luciane Alarcão Dias-Melicio
Faculdade de Medicina de Botucatu – Botucatu/SP

Profa. Dra. Fátima Regina Vilani-Moreno
Instituto Lauro de Souza Lima – Bauru/SP

Botucatu, 30 de Junho de 2015.

Dedicatória

Dedico este trabalho...

A Deus,

por ter me dado sabedoria para desenvolvê-lo, e por colocar em minha vida as melhores pessoas para compartilhar comigo esta caminhada.

Ao meu amado esposo Danilo Pires de Azevedo,

por me acompanhar desde sempre em todos os momentos, acreditando, me motivando e compreendendo todos os esforços exigidos para a concretização deste sonho.

Aos meus queridos pais José Roberto e Vasni,

pelos conselhos, por todo apoio, por acreditar e aceitar os meus sonhos (por mais malucos que eles pudessem parecer) e me auxiliar em tudo que foi possível para esta realização.

À minha queridíssima irmã Mariana,

pelo estímulo e companheirismo, sempre acreditando na minha capacidade.

Agradecimentos

À **Profa. Dra. Ida Maria Foschiani Dias Baptista**, por aceitar minha orientação e possibilitar o desenvolvimento deste trabalho.

As minhas queridas orientadoras, **Dra. Andrea de Faria Fernandes Belone, Dra. Ana Paula Fávaro Trombone e Dra. Patrícia Sammarco Rosa**, por acreditar e confiar em mim me proporcionando a oportunidade de seguir em frente, por todos os ensinamentos, paciência, carinho e amizade infinitos.

Ao **Instituto Lauro de Souza Lima e todos os seus funcionários**, por me acolherem com tanto carinho, me proporcionando enorme crescimento pessoal.

Ao **Dr. Cleverson Teixeira Soares**, pela colaboração e auxílio científico.

Aos **funcionários e amigos da Seção de Anatomia Patológica**, por terem me recebido como parte da equipe e principalmente pelo auxílio na execução desse trabalho.

As **companheiras de mestrado (Priscila Medeiros, Amanda, Beatriz e Eloise), estagiárias e aprimorandos**, pelos momentos de descontração, desabafos e amizade compartilhados na sala de estudos.

À amiga e aluna de iniciação científica **Natália Mortari Ramuno**, pelo incentivo e auxílio no início deste trabalho.

À **Universidade do Sagrado Coração (USC)**, principalmente ao técnico do laboratório de biologia molecular **Wilson Orcini**, pela colaboração e disponibilidade do espaço para realização de parte deste trabalho.

À querida amiga **Luciana Fachin**, meu carinho especial, por me ensinar e auxiliar com seus conselhos e doces palavras, sempre que precisei de um ombro amigo.

À amiga **Carolina Vendramini**, pela confiança e amizade, e também pelas trocas de experiência laboratorial.

As alunas de iniciação científica e amigas **Amanda Devides e Maria... Malange**, pela confiança e pelo auxílio durante a execução dos trabalhos.

As amigas **Luiza Pinheiro e Patrícia Gigliotti**, pela amizade e por dividir comigo os quilômetros de estrada, fazendo com que o caminho ficasse mais leve.

Ao **Dr. William J. Woods e equipe do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas do Acre**, pela colaboração no projeto e auxílio na coleta das amostras.

Aos **pacientes**, pela colaboração e confiança em nosso grupo.

Aos **professores e funcionários do programa de pós-graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu**, por todo ensinamento transmitido e auxílio sempre pronto.

Aos **colegas de disciplina**, pela amizade, troca de conhecimentos e por todo companheirismo durante as aulas.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela bolsa proporcionada, possibilitando assim a realização deste trabalho.

Ao **José Martins da Silva Júnior** (Projeto Golfinho Rotador), Centro de Mamíferos Aquáticos/ICMBio – Fernando de Noronha, que prontamente respondeu aos meus contatos.

Ao **Prof. Gustavo Garlet (FOB/USP)**, pelo grande auxílio científico, paciência e amizade.

Ao **Pedro**, por dividir comigo em muitos momentos a atenção da mamãe Ana Paula.

À **Luna**, por compartilhar comigo os momentos mais difíceis e sempre ser tão carinhosa sem nunca pedir nada em troca.

Enfim, todo meu carinho e sincera gratidão a todos aqueles que de alguma forma me auxiliaram na realização deste trabalho...

...Muito obrigada a todos!

*"Uma paixão forte por qualquer objeto
assegurará o sucesso, porque o desejo pelo objetivo
mostrará os meios. "*

William Hazlitt

Resumo

AZEVEDO, M. C. S. **Participação das células Th1, Th2, Th17 e T regulatórias na doença de Jorge Lobo: análise do perfil de expressão gênica nas lesões.** 2015. 72 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2015.

A doença de Jorge Lobo é uma infecção crônica, que afeta a pele e tecidos subcutâneos, cujo agente etiológico é o fungo *Lacazia loboi*. Dependendo da localização das lesões, pode ser classificada como localizada, multifocal ou disseminada e no que diz respeito aos aspectos imunológicos, estudos relatam predominância do perfil Th2 nos pacientes, além de maior frequência de células positivas para TGF- β e IL-10 no infiltrado inflamatório presente nas lesões. Porém, com a descoberta de outros perfis como Treg e Th17, outras subpopulações podem estar envolvidas na imunopatogênese da doença. Diante disso, com o intuito de explicar a imunorregulação entre estas subpopulações, este estudo teve por objetivo avaliar o papel das células Treg, Th1, Th2 e Th17, por meio da expressão de mRNA. No total, 114 amostras [pacientes portadores de lesão única (55), pacientes portadores de lesões múltiplas (47) e controles saudáveis (12)] foram avaliadas quanto a expressão gênica de alvos relacionados aos perfis Th1 (T-bet, IFN- γ), Th2 (GATA3, IL-5, IL-4, IL-13, IL-33), Th17 (IL-17F) e T regulatório (TGF- β 1, FoxP3, CTLA4, IL-10). Os resultados obtidos neste estudo demonstraram expressão significativamente maior de TGF- β 1, IL-10, CTLA4, FoxP3, T-bet e IL-17F, e significativamente menor de GATA3 e IL-4 em todos os portadores da doença avaliados. Adicionalmente, ao avaliar a expressão entre os grupos de lesão única (forma localizada) e lesões múltiplas (formas multifocais e disseminadas), TGF- β 1 e IL-5 apresentaram expressão significativamente maior nos pacientes com lesão única e múltiplas, respectivamente. Em resumo, constatamos que a ação desta população está relacionada à capacidade de inibir a resposta antifúngica modulando principalmente a expressão de citocinas envolvidas na proteção, tais como, IFN- γ e IL-17F.

Palavras-chave: Doença de Jorge Lobo, Th1, Th2, Th17, Treg, Expressão gênica

Abstract

AZEVEDO, M. C. S. **Participation of Th1, Th2, Th17 and regulatory T cells in Jorge Lobo's disease:** analysis of gene expression profile in lesions. 2015. 72 f. Thesis (Master) – Faculty of Medicine of Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2015.

Jorge Lobo's disease is a chronic disease that affect the skin and subcutaneous tissues, whose etiologic agent is the fungi *Lacazia loboi*. Depending on localization of lesions, it can be classified as localized, multifocal or disseminated. In respect to immunologic aspects, previous studies show the predominance of Th2 profile in patients, in addition to more frequent TGF- β and IL-10 positive cells in the inflammatory infiltrate present in lesions. However, the increased understanding about T regulatory (Treg) and Th17 profiles suggest that other subpopulation of cells can be involved in the immunopathogenesis of Jorge Lobo's disease. Aiming at explaining the immunoregulation caused by these subpopulations, this study had as objective to evaluate the role of Treg, Th1, Th2 and Th17, through mRNA expression. A total of 114 samples [single lesion patients (55), multiple lesion patients (47) and healthy controls (12)] were evaluated by gene expression of targets associated to Th1 (T-bet, IFN- γ), Th2 (GATA3, IL-5, IL-4, IL-13, IL-33), Th17 (IL-17F) and T regulatory (TGF- β 1, FoxP3, CTLA4, IKZF2, IL-10) profiles. The results obtained in this study demonstrated significant higher expression of TGF- β 1, IL-10, CTLA4, FoxP3, T-bet and IL-17F, and significant lower expression of GATA3 and IL-4 in all patients. Additionally, the expression comparing single lesions (localized form) and multiple lesions (multifocal and disseminated forms) patients showed significant higher levels of TGF- β 1 and IL-5, respectively, in single and multiple lesions patients. In summary, the role of the Treg population is associated with inhibition of the antifungal activity, thus modulating mainly the expression of cytokines associated protection against fungal infection, such as IFN- γ and IL-17F.

Key words: Jorge Lobo's disease, Th1, Th2, Th17, Treg, Gene Expression

Sumário

1. Introdução	11
2. Revisão da literatura	13
3. Objetivo	30
4. Manuscrito	32
4.1 Regulatory T Cells Inhibit the Antifungal Response in Jorge Lobo's Disease	32
4.2 Abstract	33
4.3 Author Summary	33
4.4 Introduction	34
4.5 Materials and Methods	35
4.5.1 Selection of samples	35
4.5.2 Extraction and analysis of the quality / RNA integrity	36
4.5.4 Standard curve	36
4.5.5 Real time PCR reactions	37
4.5.6 Analysis of results	38
4.6 Results	38
4.6.1 Selection of samples	38
4.6.2 Gene expression	38
4.6.3 Correlation analysis	46
4.7 Discussion	48
4.8 Acknowledgments	51
4.9 References	51
5. Conclusão	57
Referências	59
Anexo	72
Apêndice	75

Introdução

1. Introdução

A doença de Jorge Lobo (DJL) é uma infecção crônica, endêmica da região amazônica, que afeta principalmente a pele e tecidos subcutâneos, cujo agente etiológico é o fungo leveduriforme *Lacazia loboi*.

Nos pacientes as lesões cutâneas podem apresentar-se sob o aspecto queloidiforme, verruciforme, gomoso ou ulceroso, e dependendo da distribuição das mesmas são classificadas como localizadas (restritas a uma única área), multifocais (em um membro ou segmento de membro) ou disseminadas (envolvendo várias regiões anatômicas). Até o momento não há um tratamento totalmente eficaz para a doença, sendo o diagnóstico precoce e a remoção cirúrgica das lesões as melhores condutas terapêuticas.

Em busca de respostas para as diferentes manifestações nos pacientes, estudos avaliando os aspectos imunológicos, relatam predominância do perfil Th2 (T helper 2) nestes indivíduos, além de maior frequência de células positivas para TGF- β (transforming growth factor beta) e IL-10 (Interleucina 10) no infiltrado inflamatório presente nas lesões. Entretanto, como os estudos relacionados ao tema são escassos, pesquisas adicionais são necessárias para elucidar a participação de diferentes subpopulações celulares na DJL, tais como células Th17 e Treg (T regulatório). Adicionalmente, o entendimento da imunorregulação envolvida nesta doença poderá contribuir para novas abordagens diagnósticas.

Assim, este projeto teve por objetivo avaliar, por meio de expressão gênica, a participação das células Th1, Th2, Th17 e Treg nas diferentes formas clínicas da DJL.

Revisão da literatura

2. Revisão da literatura

A DJL é uma infecção granulomatosa de evolução crônica, que afeta a pele e os tecidos subcutâneos, cujo agente etiológico é o fungo leveduriforme *Lacazia loboí*. Descrita pela primeira vez em 1931 no Recife, Pernambuco, a doença foi observada como lesões nodulares, com 19 anos de evolução, na região lombossacral de um seringueiro da região amazônica, e acreditando tratar-se de uma forma atenuada da paracoccidioidomicose (PCM), o médico dermatologista Jorge de Oliveira Lobo a denominou como “blastomicose queloidiana” (Lobo, 1931).

O termo “doença de Jorge Lobo” foi utilizado pela primeira vez por Fialho em 1938 ao descrever um paciente procedente do estado do Amazonas que apresentava nódulos queloidiformes na orelha, com 12 anos de evolução, que acreditava tratar-se de uma doença diferente da PCM (Fialho, 1938).

Também denominada como lacaziose, lobomicose, blastomicose queloidiforme, granuloma blastomicóide, blastomicose da Amazônia, blastomicose tipo Jorge Lobo, *miraip* ou *piraip* (o que arde, em tupi), lepra-dos-Caiabi ou falsa-lepra, trata-se de uma doença endêmica da região amazônica e predominante no Brasil (Lacaz et al., 1986; Rodriguez-Toro, 1993; Brito, Quaresma, 2007).

Quanto à prevalência da DJL, dados referentes ao ano de 2006 relataram 490 casos no mundo, sendo 318 destes no Brasil (Brito, Quaresma, 2007). Adicionalmente, em 2012, dois estudos distintos relataram 494 (sendo 322 no Brasil) (Brito, 2012) e 550 casos (Papadavid et al., 2012) de DJL no mundo. Também neste contexto, Woods et al. (2010) referiram 249 casos de pacientes tratados no Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas do Acre (HCAC) em Rio Branco/Brasil, onde atualmente são tratados 376 pacientes (comunicação pessoal). Deste modo, por não se tratar de uma doença de notificação compulsória e potencialmente subdiagnosticada, é difícil caracterizá-la como problema de saúde pública (Brito, Quaresma, 2007; Woods et al., 2010; Brito, 2012).

Casos da doença foram observados na Colômbia, Suriname, Guiana Francesa, Guiana, Venezuela, Panamá, Costa Rica, Peru, Equador, Bolívia, Honduras, México (Rodriguez-Toro, 1993; Brito, Quaresma, 2007; Paniz-Mondolfi et al., 2007; Talhari, Talhari, 2012), Estados Unidos (EUA), Canadá e África do Sul, além de relatos na França e na Grécia (Symmers, 1983; Burns et al., 2000; Elsayed et al., 2004; Al-Daraji et al., 2008; Papadavid et al., 2012; Paniz-Mondolfi et al., 2012), sendo o caso

mais recente registrado em Nova York (EUA) em 2014 (Arju et al., 2014) (Figura 1).

Por muitos anos, a DJL foi considerada limitada a América Latina e seu acometimento relacionado somente aos humanos. Porém, em 1971, um golfinho da espécie *Tursiops truncatus* foi identificado na costa da Flórida como sendo portador do fungo (Migaki et al., 1971). Além deste, animais da mesma espécie também infectados foram encontrados no Brasil, Venezuela, Colômbia, Equador, Peru, EUA e Espanha (Bessesen et al., 2014). Outros acometimentos também foram observados nas regiões tropicais e de transição em animais das espécies *T. aduncus* (Japão) e *Sotalia guianensis* (Suriname e Brasil) (Figura 1) (Paniz-Mondolfi et al., 2012).



Figura 1. Distribuição dos casos de DJL em humanos e golfinhos. (Fonte: Google Maps <<http://www.google.com.br/maps>>. (Adaptado: Paniz-Mondolfi et al., 2012)

Estes animais apresentavam lesões semelhantes às observadas em humanos (Figura 2) com aparência úlcero-crostosas, acinzentadas, esbranquiçadas ou levemente rosadas; localizadas na cauda, dorso, cabeça e nadadeiras; sem descrições de lesões viscerais, sendo chamada doença lobomicose-*símile* (em inglês: *lobomycosis-like disease* - LLD). Adicionalmente, golfinhos com lesões e análise histopatológica sugestivas de DJL, apresentaram no soro anticorpos contra os mesmos antígenos utilizados nos ensaios sorológicos para humanos e

camundongos infectados (Migaki et al., 1971; Woodard, 1972; De Vries, Laarman, 1973; Caldwell et al., 1975; Dudok Van Heel, 1977; Symmers, 1983; Bossart, 1984; Reif et al., 2006; Mendoza et al., 2008).

Até o momento não existem relatos da micose em golfinhos de água doce, como por exemplo nas espécies *Sotalia fluviatilis*, comum nos afluentes do Rio Orinoco (Venezuela), ou *Inia geoffrensis* que habita o Rio Amazonas (Brasil), regiões estas endêmicas para a doença em humanos (Lacaz et al., 1986; Paniz-Mondolfi, Sander-Hoffmann, 2009). Entretanto, a doença ocorre de forma endêmica nos golfinhos que vivem em Indian River Lagoon, na Flórida (EUA), região não endêmica para humanos (Reif et al., 2006). Adicionalmente, a observação do fungo em golfinhos do Oceano Índico, no oeste do Oceano Pacífico e na costa da Carolina do Norte, associada a casos humanos autóctones na África e na costa da Europa, podem indicar que o nicho ecológico do fungo esteja se expandindo, apesar das diferenças geográficas na distribuição dos casos (Reif et al., 2013).

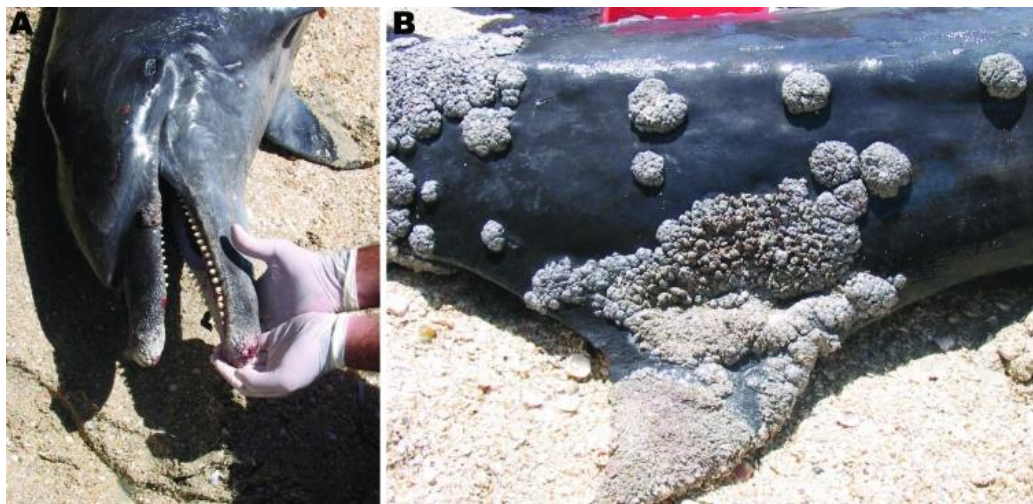


Figura 2. Aspectos clínicos das lesões da LLD em cetáceos. A: Lesão no rostro. B: Extensa lesão na nadadeira dorsal (Fonte: Bermudez et al., 2009).

É difícil conhecer a história natural e a forma de infecção da doença, mas as evidências sugerem que um dos reservatórios do fungo na natureza seja a água (Lacaz et al., 1986). Um fato que reforça essa hipótese foi o aparecimento da doença em um paciente da Geórgia (EUA), alguns anos após banhar-se em uma cachoeira na Venezuela (Burns et al., 2000). Outro fato que reforça esta hipótese é a presença do fungo em esponjas marinhas da espécie *Mycale armata* coletadas em

algumas regiões do Hawaii (EUA) (Li, Wang, 2009).

As regiões endêmicas para a doença em humanos são as de florestas tropicais com densa vegetação, geralmente com altitude entre 200 e 250 metros acima do nível do mar, clima equatorial quente e úmido, opulência hidrográfica (rios, baías, igarapés) e pluviosidade entre 1.000 e 2.500 mm/ano (Brito, Quaresma, 2007; Bermudez et al., 2009; Brito, 2012).

Afetando principalmente trabalhadores florestais, fazem parte do grupo de risco seringueiros, garimpeiros, caçadores, mateiros, agricultores, pescadores e outros, que mantêm contato constante com a vegetação, água e solo, principalmente na região amazônica, onde se acredita que o fungo tenha uma fase saprofítica sob a forma de micélio, embora nunca tenha sido identificado nestes ambientes. Adicionalmente, a impossibilidade do cultivo do *L. loboi* em meios artificiais aumenta a dificuldade da determinação e avaliação do seu nicho ecológico (Herr et al., 2001; Brito, Quaresma, 2007).

Mais frequente em indivíduos do sexo masculino (90% dos casos relatados) (Paniz-Mondolfi et al., 2007; Talhari, Talhari, 2012), provavelmente devido às condições de trabalho extradomiciliar, a doença acomete principalmente a faixa etária entre 21 e 40 anos, o que coincide com a época de maior produtividade laborativa dos indivíduos (Lacaz et al., 1986), embora casos tenham sido descritos em todas as faixas etárias, inclusive em crianças (Machado, 1966; Baruzzi et al., 1979; Pradinaud, 1984; Lacaz et al., 1986). Adicionalmente, a doença tem sido relatada em brancos, negros e índios, não sendo observada correlação entre etnia e susceptibilidade à infecção, porém, no estado do Acre, onde há o maior número de casos documentados da doença, existe a prevalência em indivíduos de pele morena ou negra, provavelmente devido ao fato de representarem a maior parte da população do estado (Woods et al., 2010).

Neste contexto, destaca-se a alta prevalência da micose entre a população indígena Caiabi, onde até o momento foram descritos 63 casos, sendo 39 homens e 24 mulheres (Floriano, 2014). Um dos primeiros relatos a este respeito foi realizado no ano de 1848, em indígenas que habitavam o norte do estado do Mato Grosso, próximo ao Rio Teles Pires, onde aproximadamente 60 casos foram descritos (Steinen, 1894). Entretanto, após serem transferidos para o Parque Indígena do Xingu, não se observou o aparecimento de novos casos da doença em descendentes ou cônjuges dos indivíduos acometidos (Lacaz et al., 1986; Steinen,

1894), sugerindo que o contato com o fungo no ambiente e a pré-disposição genética, possam estar envolvidos com a doença (Brito, Quaresma, 2007).

Embora não totalmente esclarecida, acredita-se que a forma de contaminação com o *L. loboi* esteja relacionada a traumatismos cutâneos (Brito, Quaresma, 2007; Woods et al., 2010). Inúmeros pacientes quando indagados a respeito do início da lesão referem-se a ferimentos pré-existentes provocados por trauma, picada de serpente ou inseto, o que é comum em regiões tropicais (Brito, Quaresma, 2007; Paniz-Mondolfi et al., 2012). Casos de infecção acidental também já foram descritos (Azulay et al., 1970; Symmers, 1983; Rosa et al., 2009), além de um caso de inoculação experimental em humanos (Borelli, 1962), porém, não há relatos de transmissão de animal-humano ou inter-humana, mesmo em situações de longo convívio e ou em membros da mesma família, inclusive entre os Caiabis (Lacaz et al., 1986).

O *L. loboi* é um fungo imperfeito, pertencente à ordem *Onygenales* e família *Ajellomycetaceae* (Taborda et al., 1999a; Herr et al., 2001). Através de estudos moleculares e da microscopia eletrônica foi demonstrado que se trata de um fungo dimórfico, taxonômica e filogeneticamente muito próximo ao *Paracoccidioides brasiliensis* (Herr et al., 2001; Vilela et al., 2005; Mendoza et al., 2005). Por meio da coloração de Fontana-Masson, é possível detectar melanina na parede do *L. loboi* diferente da observada no *P. brasiliensis* e em ascomicetos (Bishop et al., 2012), motivo pelo qual Taborda et al. (1999b) propuseram um novo gênero e sugeriram a denominação "*Lacazia loboi*", a qual foi adotada neste estudo. Dada em homenagem ao micologista Carlos da Silva Lacaz e ao dermatologista Jorge Oliveira Lobo (Paniz-Mondolfi et al., 2007; Ramos-e-Silva et al., 2009) a nomenclatura tem sido apoiada, também por Herr et al. (2001) com base em seus estudos filogenéticos.

Estudos adicionais demonstraram que a parede da célula fúngica cora-se pela prata metenamina de Grocott (PM), na qual a parede torna-se cinzenta ou negra (Opromolla et al., 1999c; Brito, Quaresma, 2007), e assim foi possível constatar que a coloração irregular dos fungos está diretamente relacionada com sua degeneração, e que o material granuloso observado nos cortes histológicos corresponde à poeira argentófila no interior das células (Sesso, Baruzzi, 1988; Opromolla et al., 1999c).

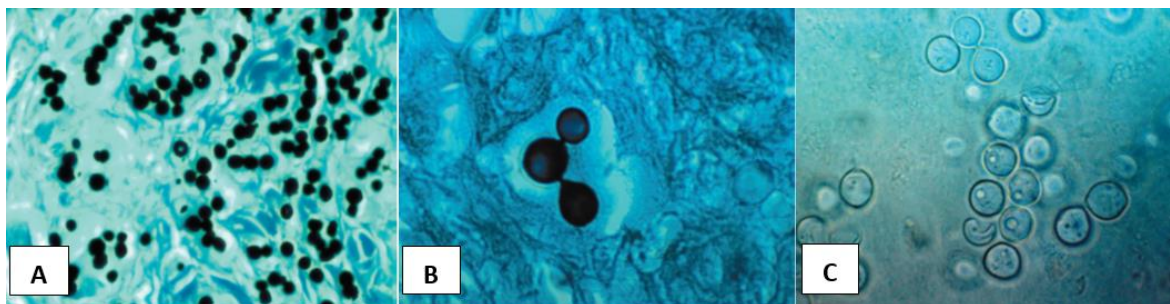


Figura 3. Aspectos morfológicos do *L. loboi*. A: Fungos isolados e em cadeia (Grocott 400x); B: Aspecto micromorfológico do fungo em brotamento; C: Exame micológico direto (Potassium Hydroxide - Dimethyl Sulfoxide - KOH-DMSO 400x) (Fonte: Brito, Quaresma, 2007).

Na histologia das lesões, o fungo é encontrado de forma abundante apresentando-se como células arredondadas ou ovais medindo de 6 a 12µm de diâmetro, podendo originar cadeias de blastoconídios de parede celular espessa com duplo contorno bastante refringente (Brito, 2012). Além de multinucleado, seu citoplasma tem aspecto homogêneo ou granular com núcleos basofílicos ou anfifílicos, onde são encontradas as mitocôndrias, retículo endoplasmático, ribossomos, vesículas, gotículas de lipídios e um grande corpo globular denso (Furtado et al., 1967; Woodard, 1972; Sesso, Baruzzi, 1988; Elgart, 1996; Enokihara et al., 1997).

A reprodução do *L. loboi* ocorre por gemulação simples e também por brotamento em dois ou mais pontos distintos da cápsula, onde frequentemente observa-se o aspecto de rosário ou formas catenuladas (3 a 8 ou mais células), conectadas por pequenas estruturas tubulares (Rodriguez-Toro, 1993; Burns et al., 2000; Herr et al., 2001; Pang et al., 2004; Brito, Quaresma, 2007; Papadavid et al., 2012), não sendo observados filamentos à microscopia óptica (Saint-Blancard et al., 2000). Ocasionalmente, pode ocorrer a formação de pseudohifas (Dias et al., 1970; Wiersema, 1971), porém hifas nunca foram observadas (Talhari, Talhari, 2012).

O *L. loboi* é considerado um parasita intracelular obrigatório e os resultados do sequenciamento genômico indicaram que o fungo é parte de um grupo de agentes patogênicos eucariotas que apresenta decadência evolutiva, com perda significativa de material genético resultando em adaptação diminuída e menor variabilidade genética (Mendoza et al., 2005). Baseado na ausência de inflamação aguda ou

necrose, conforme observado em micoses profundas, sugere-se que o fungo seja um parasita de baixa virulência, que até o momento, não pode ser cultivado *in vitro* (Opromolla, Nogueira, 2000). Por este motivo, diferentes modelos animais foram utilizados para ensaios experimentais, tais como, quelônios amazônicos, tatus, cobaias, ratos, coelhos, camundongos, entre outros (Azulay et al., 1968a; Azulay et al., 1968b; Sampaio, Dias, 1977; Opromolla et al., 1999b; Opromolla, Nogueira, 2000; Madeira et al., 2000; Madeira et al., 2003). Atualmente o modelo experimental em camundongos BALB/c, no qual fungos viáveis são inoculados no coxim plantar, é considerado o melhor método para experimentação da DJL (Vilani-Moreno, Opromolla, 1997; Vilani-Moreno et al., 2003), pois, após 8 meses de inoculação, induz lesões semelhantes às observadas em humanos, com grande quantidade de fungos (Madeira et al., 2000). Adicionalmente, esta metodologia permite a manutenção do fungo, além de ser utilizada como padrão para experimentação no que se refere à doença (Belone et al., 2002) e no teste de drogas antifúngicas (Rosa, 2005).

Quanto aos aspectos clínicos, pacientes com a DJL podem apresentar lesões queloidiformes, verruciformes, gomosas ou ulcerosas, além de manchas, placas, lesões esclerodermiformes infiltradas e atróficas cicatriciais, podendo em alguns casos, ser confundidas com hanseníase ou mesmo leishmaniose cutânea (Tubilla et al., 2008; Paniz-Mondolfi et al., 2012; Talhari, Talhari, 2012). Ainda com relação as lesões, estas podem apresentar coloração normo, hipo ou hiperocrômicas, podendo ser observadas como pele íntegra, de cor vinhosa, eritemato-pardacenta, lisa, brilhante, ou com telangiectasias recobrimdo as lesões nodulares (Talhari et al., 1981; Rodríguez-Toro, 1993; Vilani-Moreno et al., 2005; Brito, Quaresma, 2007; Paniz-Mondolfi et al., 2007; Talhari, Talhari, 2012; Brito, 2012).

Com relação à distribuição anatômica, as lesões podem ser classificadas como localizadas (restritas a uma única área), multifocais (em um membro ou segmento de membro) e disseminadas (envolvendo várias regiões anatômicas) (Figura 4), sendo que os nódulos de aspecto queloidiano, lenticulares ou em placas são as formas mais frequentes (Opromolla *et al.*, 2000).

Na DJL, não se observam alterações no quadro geral do paciente, exceto em casos de ulceração não espontânea, geralmente ocasionadas por traumas secundários (Silva, 1974; Opromolla et al., 1999a), associados a infecções bacterianas, podendo evoluir para o desenvolvimento de carcinoma espinocelular

(CEC) (Brito, Quaresma, 2007; Nogueira et al., 2013), sendo esta condição responsável pelos dois casos de óbito confirmados em decorrência da doença (Baruzzi et al., 1989).

Os prejuízos nos pacientes são em sua maioria estéticos, porém algumas vezes, prejuízos funcionais também são observados, podendo ser incapacitantes em um número significativo de pacientes (Lacaz et al., 1986; Paniz-Mondolfi et al., 2007).



Figura 4. Formas clínicas características da DJL. A: Forma localizada; B: Forma multifocal; C: Forma disseminada. (Fotos: Dra. Patrícia Sammarco Rosa – ILSL/Bauru).

Quanto ao estabelecimento da doença, o aparecimento das lesões cutâneas apresenta evolução lenta, provavelmente ocorrendo após um período de incubação de 1 a 2 anos, porém variações nesse período, com progressão de até 50 anos, também foram descritas (Symmers, 1983; Lacaz et al., 1986; Burns et al., 2000). Inicialmente as lesões podem apresentar-se muito pequenas, o que leva o paciente, na maioria dos casos, a não procurar por assistência médica (Lacaz et al., 1986). Grande parte dos indivíduos acometidos comparece ao serviço de saúde anos após do aparecimento inicial da lesão, motivado pelo aumento de tamanho ou surgimento de novas lesões que podem, ao longo do tempo, desfigurar grandes áreas do corpo (Woods et al., 2010; Paniz-Mondolfi et al., 2012).

Geralmente os pacientes não apresentam sintomas, mas podem queixar-se de ligeiro ardor e intenso prurido nas lesões, principalmente nas fases iniciais, e mais

tardamente a sensação de anestesia ou hipoestesia (Lacaz et al., 1986; Baruzzi et al., 1989; Rodríguez-Toro, 1993; Pradinaud, Talhari, 1996; Woods et al., 2010), podendo, por este motivo, ser confundida com hanseníase virchowiana (Lobo, 1966).

Para o diagnóstico da doença, os critérios baseiam-se fundamentalmente na histologia (Paniz-Mondolfi et al., 2007), e a confirmação se dá pela observação do fungo nos tecidos por meio de exame micológico direto (Michalany, Lagonegro, 1963; Brito, Quaresma 2007; Tubilla et al., 2008). Na análise histológica observa-se um processo histiocitário difuso com células epitelióides e células gigantes tipo corpo estranho e Langhans, com numerosos fungos intracelulares, distribuídas em todas as direções do derma. Adicionalmente, focos de neutrófilos linfócitos e plasmócitos estão distribuídos irregularmente (Figura 5). No derma profundo encontram-se grandes células poligonais, de citoplasma vacuolar, espumoso e de núcleo compacto. As fibras colágenas estão aumentadas formando, às vezes, feixes que avançam no derma, dividindo-se e separando campos celulares (Nery-Guimarães, Macedo, 1950; Opromolla et al., 2000).

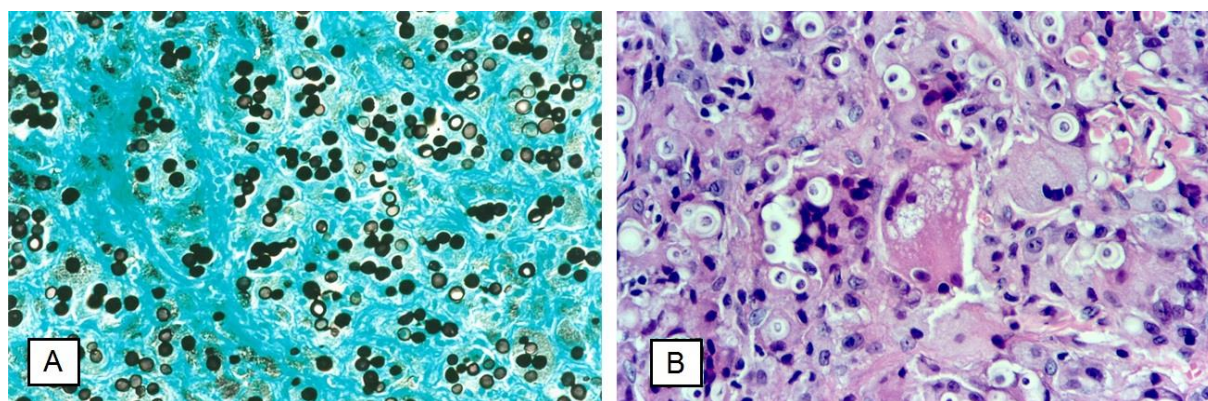


Figura 5. Aspectos histopatológicos da doença DJL. A: Coloração pela prata metenamina de Grocott. B: Coloração pela hematoxilina-eosina. (Fonte: Seção de Anatomia Patológica – ILSL/Bauru).

O diagnóstico precoce tem papel fundamental no resultado do tratamento, uma vez que não existe, até o momento, um tratamento totalmente eficaz, especialmente em casos de doença disseminada (Bruto, Quaresma, 2007; Paniz-Mondolfi et al., 2012). Atualmente, a remoção cirúrgica com grandes margens (onde possível), ainda representa a melhor conduta terapêutica, principalmente em lesões isoladas,

proporcionando um aumento significativo da qualidade de vida do paciente (Woods et al., 2010), porém casos de recidiva são comumente observados (Wiersema, Niemel, 1965; Restrepo, 1994, Miranda et al., 2010, Talhari, Talhari, 2012). Assim, inúmeras condutas terapêuticas empregando diferentes drogas têm sido utilizadas, porém a maioria dos resultados não se mostraram satisfatórios (Woods et al., 2010). Dentre estas abordagens, destacam-se a clofazimina, apesar de não ser totalmente efetiva, e o itraconazol, que tem sido usado como terapia adjuvante para prevenir recidivas em pacientes que tiveram lesões removidas cirurgicamente (Carneiro et al., 2009). Alternativamente, a poliquimioterapia (rifampicina, clofazimina e dapsona) utilizada em pacientes com hanseníase, os quais também eram portadores da DJL, apresentou boa efetividade, com melhora das lesões que se referiam à DJL (Woods et al., 2005; Woods et al., 2010).

O trabalho mais recente publicado neste sentido, empregou o tratamento com posaconazol relatando cura do paciente e inferindo a utilização de novos triazólicos de amplo espectro como um tratamento promissor (Bustamante et al., 2013). Cabe ressaltar que a resposta imune do indivíduo parece ter importante papel no desenvolvimento e tratamento da doença (Ramos-e-Silva, Lima, 2011). Existe a hipótese de que o *L. loboi* possa representar um parasita oportunista aproveitando as condições de hospedeiro imunocomprometido, ou que, a deficiência da resposta imune ocorra devido à infecção, com o fungo se multiplicando muito lentamente em paralelo à deficiência imunológica do hospedeiro, fato este observado em golfinhos infectados que mostraram comprometimento da imunidade adaptativa (Reif et al., 2009).

Tendo em vista que o fungo apresenta tropismo pela pele, as regiões anatômicas de maior acometimento são geralmente as áreas mais expostas e frias do corpo (Herr et al., 2001; Paniz-Mondolfi et al., 2007), e os traumas sugerem importante fator para a infecção (Talhari et al., 1981). Em sua maioria as lesões se apresentam no pavilhão auricular em geral unilateral, sem o comprometimento da cartilagem (Opromola et al., 2000) seguida dos membros (principalmente inferiores), sendo descritas também na face, tronco, pescoço e região lombossacral (Lupi et al., 2005; Brito, Quaresma, 2007; Paniz-Mondolfi et al., 2007; Talhari, Talhari, 2012;).

Em alguns casos, acredita-se que o progresso das lesões se dê por autoinoculação, sendo observados nódulos menores ao redor da lesão inicial (Talhari, Talhari, 2012). Algumas lesões apresentam características cicatriciais,

sendo observada a presença do fungo ao longo de anos de evolução, podendo em alguns pacientes, tornar-se atróficas com poucos fungos observados no tecido (Machado, 1972). A regressão espontânea na DJL parece muito rara (Lawrence, Ajello, 1986; Baruzzi et al., 1989) e não existem na literatura outros relatos de cura espontânea da doença (Baruzzi et al., 1982), além dos observados por Machado (1972), onde descreve a regressão espontânea de lesões maculosas da DJL entre os índios Caiabis (Machado, 1972).

Uma vez na derme, o processo de replicação do fungo parece iniciar-se após fagocitose pelas células mononucleares, o que pode explicar o longo período de incubação e a lenta evolução da doença (Vilani-Moreno et al., 2005; Talhari, Talhari, 2012). Em relação aos anexos cutâneos e terminações nervosas, existem relatos da destruição decorrente da invasão da derme pelo maciço infiltrado histiocitário (Dudok Van Heel, 1977; Lacaz, et al., 1986). No entanto, observa-se a presença de filetes neurais íntegros no interior de infiltrados inflamatórios densos com numerosas células fúngicas, sem comprometimento de vasos ou anexos da pele, e com preservação do tecido celular subcutâneo (Opromolla et al., 1999a; Opromolla et al., 2000; Vilani-Moreno et al., 2005).

As diversas formas de lesões observadas nos pacientes com DJL sugerem uma variabilidade na resposta imunológica do hospedeiro frente ao *L. loboi*, semelhante ao que ocorre em outras doenças infecciosas como, por exemplo, a hanseníase (Opromolla et al., 1999a; Silva, Ferasçoli, 2004). Na DJL, alguns pacientes precocemente desenvolvem a forma disseminada, que é menos comum (Xavier et al., 2006), e outros apresentam lesão localizada, e assim, se mantêm por longos períodos (Lacaz et al., 1986; Marcos et al., 2005). A forma de disseminação do fungo ainda não é completamente compreendida, porém existe a suspeita da ocorrência de uma rota linfo/hematogênica, geralmente sem comprometimento de mucosas ou órgãos internos (Baruzzi et al., 1981; Paniz-Mondolfi et al., 2007; Woods et al., 2010).

Estudos anteriores sugerem que os pacientes com DJL possuam uma deficiência parcial da resposta imune celular, o que levaria a uma maior susceptibilidade à doença (Pecher, Fuchs, 1988). Com o intuito de analisar possíveis deficiências no sistema imunológico, a atividade fagocítica de monócitos sanguíneos frente ao *L. loboi* foi avaliada, porém, semelhante aos indivíduos saudáveis, as células dos pacientes foram capazes de fagocitar o fungo (Vilani-Moreno et al.,

2004).

Estudos adicionais, demonstraram que nas lesões cutâneas ocorre a presença de células mononucleares e um infiltrado composto por histiócitos, linfócitos Natural Killers (NK), plasmócitos, linfócitos B, linfócitos T CD3+, linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+ (Lacaz et al., 1986; Opromolla et al., 1999a, Vilani-Moreno et al., 2005), sendo a distribuição de linfócitos T semelhante ao que ocorre na hanseníase virchowiana (linfócitos T helper e citotóxicos difusamente distribuídos entre os macrófagos) onde, a distribuição de linfócitos está associada a eventos relacionados à falha de mecanismos de regulação necessários para conter o agente patogênico sugerindo uma possível explicação para o grande número de fungos nas lesões (Vilani-Moreno et al., 2005).

Até o momento acredita-se que o predomínio do perfil Th2 favoreça o estabelecimento da DJL, pois, conforme demonstrado em estudos anteriores ocorre a predominância deste perfil nos pacientes, com maiores níveis de IL-4, porém, as citocinas IL-1 β , TNF- α (tumor necrosis fator alpha), IL-10 e IFN- γ (Interferon gamma) não apresentaram diferença significativa sugerindo que os pacientes apresentam um perfil de citocinas com predomínio Th2 o que poderia modificar a capacidade de regulação dos mecanismos responsáveis pela contenção do patógeno (Vilani-Moreno et al., 2004). Adicionalmente, as células mononucleares de pacientes com formas disseminadas produziram maior quantidade de IFN- γ que os pacientes com formas localizadas. Na DJL, é possível que as células NK produzam IFN- γ , que ativa os macrófagos, sendo o fungo destruído por este mecanismo (Vilani-Moreno et al., 2005). Adicionalmente, analisando-se a expressão de algumas citocinas em biópsias de pele, observou-se presença elevada de TGF- β 1, seguida por IL-10, e uma expressão mínima de TNF- α e iNOS (Inducible nitric oxide synthase) nos pacientes (Vilani-Moreno et al., 2011). A ausência de granulomas bem formados nas lesões suporta a hipótese de que o TGF- β tem papel importante na patogênese da infecção por *L. loboi*, seja inibindo a resposta imune celular mediada por macrófagos ou induzindo fibroses (Brito, Quaresma, 2007; Talhari, Talhari, 2012).

Atualmente existem poucos estudos quanto ao perfil da resposta imunológica na DJL, na verdade, pouco se sabe sobre a imunidade antifúngica em geral, principalmente quando comparado aos conhecimentos sobre a imunidade contra bactérias e vírus (Abbas et al., 2012), porém, sabe-se que além dos perfis Th1 e Th2, outras subpopulações podem estar envolvidas, tais como, Th17 e Treg

(Romani, 2011). Na resposta imunológica contra fungos, os principais mediadores da imunidade inata são os neutrófilos e macrófagos, enquanto que na imunidade adaptativa, as células Th1 e Th17 estão relacionados à resposta protetora, com produção de IFN- γ e IL-17, respectivamente, os quais estimulam a atividade antifúngica de macrófagos e células polimorfonucleares (Ito, 2011; Müller et al., 2007). Por outro lado, citocinas como IL-4 e IL-13, relacionadas ao perfil Th2, juntamente com as células Treg, favorecem as infecções fúngicas (Müller et al., 2007; Netea et al., 2004).

De fato, as células Th17 tem ocupado um papel de destaque na resposta imune contra fungos, esta subpopulação tem como citocinas prototípicas a IL-17e IL-22. Tais células são fenotipicamente distintas das células Th1 e Th2, requerendo um ambiente de citocinas e fatores de transcrição específicos para sua diferenciação e função, tais como a IL-6, TGF- β , IL-23 e ROR γ t (RORC em humanos, RAR-related orphan receptor C). Tanto IL-23 como IL-1 podem amplificar ainda mais a diferenciação de células Th17, e estas quando totalmente diferenciadas, expressam diversas citocinas efectoras as quais incluem IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-26 e fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF – granulocyte macrophage colony stimulating factor). Células Th17 tem sido associadas a um número crescente de doenças inflamatórias crônicas e com base nessas observações, acredita-se que fibroblastos, células epiteliais e células endoteliais sejam um importante alvo para IL-17A e IL-17F, sendo a contribuição destas citocinas para a doença ligado ao papel destas células na patologia. A sinalização de IL-17A e IL-17F ocorre através do sinal dos receptores IL-17RA e receptor de cadeias de IL-17RC, respectivamente. A sinalização destes receptores induz a produção de CXCR2 (chemokine C-X-C motif receptor 2) e G-CSF (granulocyte - colony stimulating fator) e a ativação através desta via pode aumentar a proliferação das células e a expressão das proteínas antimicrobianas. Além das células T, também existem outras fontes de IL-17 que incluem células NK, mastócitos e neutrófilos (Miossec, Kolls, 2012).

Adicionalmente, conforme acima mencionado, as células Tregs também ocupam papel importante na resposta imune. Dentre os diversos subtipos de células com funções supressoras ou regulatórias, uma pequena população (~10%) de células T CD4⁺ (cluster of differentiation 4), que coexpressam constitutivamente a cadeia α (CD25) do receptor de IL-2 (IL-2R) foram inicialmente descritas em 1970

como fundamentais para a supressão de respostas autoimunes (Gershon, Kondo, 1970; Jonuleit, Schmitt, 2003; Shevach et al., 2008). As células CD4+CD25+ foram inicialmente reconhecidas pela sua habilidade em inibir a proliferação de células autorreativas (Suri-Payer et al., 1998; Takahashi et al., 1998; Tang, Bluestone, 2008). Além disso, diversos estudos têm demonstrado o papel das células Treg CD4+CD25+ na supressão e regulação da resposta imune em condições de inflamação e infecção, prevenindo ou atenuando efeitos deletérios de respostas exageradas, como dano tecidual ou até mesmo a morte. Além da expressão constitutiva de CD25, tais células são caracterizadas por apresentarem o seguinte fenótipo: CD5high, GITR+ (glucocorticoid-induced TNFR family related), CD38+, CD103+, CD45low (Shevach et al., 2008; Tang, Bluestone, 2008). Além desses marcadores, a expressão do fator de transcrição FoxP3 (Forkhead box P3) é característica das células Treg CD4+CD25+, sendo indispensável para seu desenvolvimento.

Células Treg expressam altos níveis de marcadores de ativação, incluindo CD25 e proteína induzida por glucocorticóides TNF relacionada com o receptor GITR (Shimizu et al., 2002). Dois subgrupos Tregs FoxP3+ já foram identificados, Treg naturais (nTreg) que são geradas no timo, e estão envolvidas no controle da resposta imune (incluindo resposta a patógenos), enquanto as células Treg induzidas (iTreg) diferenciam-se a partir de células Teff em resposta a antígenos (Takahashi, et al., 1998; Chen et al., 2003). Uma vez ativadas, as células Treg suprimem a proliferação de outras células T (direta ou indiretamente) atuando sobre células apresentadoras de antígeno (APCs), ou ainda bloqueando ou diminuindo a produção de mediadores inflamatórios por células T e APCs. Embora haja controvérsia quanto a seus mecanismos de ação, acredita-se que possa exercer suas funções de maneira dependente do contato célula-célula através da molécula inibitória CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4), ou através da produção de citocinas, como TGF- β , IL-10 e IL-35 (Baecher-Allan, Hafler, 2004; Wan, Flavell, 2007).

O TGF- β , produzido por macrófagos e células Th3, inibe a expressão do óxido nítrico (NO) e IFN- γ reduzindo a eficácia microbicida e suprimindo as respostas das células Teff (Quaresma et al., 2008). Além disso, esta citocina inibe a produção de IFN- γ e IL-1 α além de moléculas reativas de oxigênio e nitrogênio, diminuindo a capacidade de lise dos macrófagos. Adicionalmente, pode promover a proliferação

de células T CD8⁺, estimulando a produção de anticorpos IgA e o processo de fibrose (Floriano, 2014). Já a molécula CTLA-4 é encontrada na superfície de células Th, regulando negativamente o sistema imune, e é constitutivamente expresso em células Treg, atuando como um regulador negativo da ativação de células T. Em conjunto, esses dados fornecem evidências que Treg desempenhariam um papel no controle da resposta imune local e sistêmica em pacientes com doenças granulomatosas induzida por fungos como, por exemplo, a PCM (Cavassani et al., 2006).

Assim, a homeostase do sistema imune depende do equilíbrio entre as respostas que controlam a infecção e as respostas que previnem a inflamação. Sabe-se que as Treg desempenham um papel crucial na supressão da resposta imunológica a auto antígenos, na prevenção de doenças autoimunes e no controle de respostas imunes contra bactérias, vírus, parasitas e fungos (Mills, 2004). Adicionalmente, as Treg tem papel bem definido em relação à supressão das subpopulações Th1 e Th2, onde células FoxP3⁺CD4⁺CD25⁺ tem a habilidade suprimir a proliferação e função de outras células, incluindo Teff, células B, macrófagos e dendríticas, por meio da produção de citocinas supressoras, tais como, IL-10 e TGF- β (Chen, et al, 2003).

Quanto aos perfis Th1 e Th2, são subtipos bem definidos/estudados de células TCD4⁺, e estão relacionados aos mecanismos de resposta imune celular e humoral, respectivamente. O IFN- γ é a principal citocina produzida pelas células Th1, e que juntamente com a citocina IL-12 estimulam a diferenciação do fenótipo Th1 ativando os fatores de transcrição STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1) e T-bet (T cell specific T-box transcription factor) (via IFN- γ), e STAT4 (via IL-12). Em relação ao perfil Th2, as citocinas prototípicas são IL-4, IL-5, IL-13 e IL-33, sendo que IL-4 estimula o desenvolvimento deste perfil, ativando o fator de transcrição STAT6, o qual em conjunto com os sinais via TCR (receptor de células T), induz a expressão do fator de transcrição de GATA3 (GATA binding protein 3), que regula a diferenciação do perfil Th2, amplificando a expressão dos genes para as citocinas prototípicas deste perfil (Abbas et al., 2012).

Diante do que foi acima exposto, é certo que além dos clássicos perfis Th1 e Th2, outras subpopulações podem estar envolvidas na imunopatogênese da DJL, tais como Th17 e Treg, e assim como ocorre na hanseníase, estas subpopulações celulares indicam que as citocinas produzidas localmente nas lesões podem

determinar a disseminação e/ou severidade da doença. Assim, diante da escassez de estudos relacionados à DJL, determinar a presença das células Th1, Th2, Th17 e Treg poderá contribuir para o entendimento da imunorregulação envolvida nesta doença, e este entendimento poderá futuramente contribuir para novas abordagens terapêuticas, como por exemplo, o uso de vacinas.

Objetivo

3. Objetivo

- Avaliar por meio de expressão gênica a participação das células Th1, Th2, Th17 e Treg nas diferentes formas clínicas da doença de Jorge Lobo.

Manuscrito

4. Manuscrito

4.1 Regulatory T Cells Inhibit the Antifungal Response in Jorge Lobo's Disease

Michelle de C. S. Azevedo^{1,2}, Patricia S. Rosa^{2#a}, Cleverson T. Soares², Luciana R. V. Fachin², Ida Maria F. D. Baptista^{1,3}, William J. Woods⁴, Gustavo P. Garlet⁵, Ana Paula F. Trombone^{6¶}, Andrea de F. F. Belone^{2¶*}

¹Departamento de Doenças Tropicais, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil

²Departamento de Patologia, Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, São Paulo, Brazil

³Departamento de Microbiologia, Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, São Paulo, Brazil

⁴Serviço Especializado em Dermatologia, Hospital das Clínicas do Acre, Rio Branco, São Paulo, Brazil

⁵Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, São Paulo, Brazil

⁶Departamento de Ciências da Saúde, Universidade do Sagrado Coração, Bauru, São Paulo, Brazil

^{#a}Current Address: Divisão de Pesquisa e Ensino, Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, São Paulo, Brazil.

* Corresponding author

E-mail: abelone@ilsl.br (AFFB)

¶These authors contributed equally to this work.

4.2 Abstract

Jorge Lobo's disease (JLD) is a chronic infection that affects the skin and subcutaneous tissues, whose etiologic agent is the fungi *Lacazia loboi*. According to the localization, the lesions are classified as localized, multifocal and disseminated. There isn't an effective treatment for the disease, therefore, early diagnosis and surgical removal are the best therapeutic conducts. Previous studies evaluating the immunological response in patients show predominance of Th2 profile, in addition, major frequency of positive TGF- β and IL-10 cells in the lesions. Therefore, the objective of this study was to evaluate the participation of Th1, Th2, Th17 and regulatory T cells in JLD using mRNA expression. In order to accomplish that, biopsies of lesions of patients were selected, and diagnosis confirmed by histopathology. A total of 114 samples was analyzed by expression of TGF- β 1, FoxP3, CTLA4, IKZF2, IL-10, T-bet, IFN- γ , GATA3, IL-4, IL-5, IL-13, IL-33, IL-17F and IL-22 normalized by GAPDH. Results showed major expression of FoxP3, CTLA4, TGF- β 1, IL-10, T-bet and IL-17F in patients. In reference to GATA3 and IL-4, the expression was lower in patients. Upon evaluation of the expression among the forms, TGF- β 1 was highly expressed in patients with single lesions and IL-5 in patients with multiple lesions. When markers were compared, a negative correlation was observed between TGF- β 1 and IFN- γ , IL-4, IL-17F and IL-22. These results show the participation of Treg in Jorge Lobo's disease since regulatory T cells inhibit the IFN- γ production and modulate the participation of Th17 in lesions. In addition, the results suggest that Th17 cells are not associated with protection. It is likely that because *L. loboi* is an intracellular organism, the predominant recruitment of neutrophils characteristic of this profile would not efficiently eliminate the fungi.

4.3 Author Summary

Jorge Lobo's disease is a skin infection that mainly affects forest workers in the Amazon region. Its etiological agent is the fungus *Lacazia loboi*. With approximately 550 documented cases in the world, the form of transmission is not yet fully known, but it is believed to result from trauma on the skin. Once the fungus penetrates the skin, the host immune system mounts the response responsible for

eliminating the pathogen. T cells, among other cell types, are important components of the adaptive immune response, and can be subdivided into different cell subpopulations as Th1, Th2, Th17 and T regulatory and these may be responsible for activating the immune response during infection. This study has as objective to elucidate the role of different populations of T cells in the lesions of patients with Jorge Lobo's disease. The increased understanding about this role will help in the search for new treatments for the disease.

4.4 Introduction

Jorge Lobo's disease (JLD) is a chronic infection that affects mainly the skin and the subcutaneous tissues, and its etiologic agent is the fungus *Lacazia loboi*. Despite being endemic in the Amazon region [1,2,3], the JLD has been diagnosed in Central America, North America, Europe and South Africa [3,4,5,6], and by the year 2012, 550 cases were detected worldwide [5]. In Brazil, a country located in the Amazon region, 322 cases were detected, and among them 249 cases from the state of Acre [7,8]. Evidences suggest that the form of contamination with the fungus *L. loboi* is skin trauma [3,7], affecting mainly ear pavilion, face, upper and lower limbs [9,10].

Currently, the diagnosis is made through clinical evaluation of patients consisting of the macroscopic examination of lesions, which may present with keloid-like, verruciform, gummy aspects or ulcerative lesions [11,12]. The fungus can be detected in skin lesion by histopathological and mycological examination [3]. The clinical forms of the disease are classified according to its distribution in localized (confined to a single area), multifocal (in a limb or limb segment) or disseminated (involving several anatomical regions) [13,14]. The histological analysis reveals a granulomatous process, with intense diffuse histiocytic reaction, with large numbers of multinucleated giant cells, foreign body and/or Langerhans [15] type cells, and a cell infiltrate composed by a few T lymphocytes (CD4 and CD8), NK cells, plasma cells and B lymphocytes [15]. In addition, numerous fungi are observed in both, inside foreign body type giant cells and in the syncytial formation [14].

Early diagnosis of JLD plays a key role in the outcome of treatment, since there isn't, to date, a fully effective treatment [3,16], especially in cases of disseminated disease. In this context, surgical removal is currently the best treatment

available, especially for isolated lesions, providing a significant increase in patient's quality of life [16]. In spite of that, relapses are commonly observed [4,17,18,19].

It is well known that the immune response plays an essential role in the development of fungal diseases, and depending on the T cell subpopulation involved, there will be or not an effective antifungal response. In this context, the Th1 and Th17 type responses are associated with protection profile with IFN- γ (Th1 profile) and IL-17 (Th17 profile) production, which, respectively, stimulate the antifungal activity of macrophages and recruit phagocytes to the inflammatory site [20]. On the other hand, cytokines such as IL-4 and IL-13 related to Th2 response, together with regulatory T cells, promote fungal infections [21,22]. Currently, there are a few studies addressing the immunological aspects of Jorge Lobo's disease, and the mechanisms that favor its spread are still unknown [13,23]. However, it is believed that the predominance of Th2 profile facilitate the establishment of JLD because high levels IL-4 were detected in the PBMC culture supernatants of patients with JLD previously stimulated with *L. loboi* [24]. Additionally, the analysis of the inflammatory infiltrate showed a higher frequency of TGF- β 1 and IL-10 positive cells in lesions of JLD patients, which at that time were related to Th2 profile [25,26].

Given the scarcity of studies on JLD and in order to understand the immunoregulatory mechanisms involved in this disease, in this study, the cytokine expression profiles related to Th1, Th2, Th17 and regulatory T cells were evaluated in skin lesions and correlated with the evolution of the disease (to single or multiple lesions).

4.5 Materials and Methods

4.5.1 Selection of samples

For this study, 102 biopsies of skin lesions of JLD of patients (confirmed by histopathology) were selected from bank of biological samples of the Department of Pathology of the Lauro de Souza Lima Institute. Patients were attended at the Specialized Dermatology Service of Hospital das Clínicas of Acre where samples were collected and stored in RNAlater at -80°C. For this selection, the data bank was consulted regarding gender and classification of clinical forms of the patients (localized, multifocal or disseminated) based on clinical features and histopathological analysis. For the present analysis and because of the similarity in

number and aspect of multifocal or disseminated lesions, the gene expression analysis included multifocal and disseminated forms into a group termed as patients with multiple lesions (M) and the localized form known as patients with a single localized lesion (U).

Furthermore, as the control study, 12 biopsies from healthy individuals undergoing cosmetic surgery were used. All procedures were carried out after the approval of the Scientific and Research Ethics Committees of Lauro de Souza Lima Institute under the numbers, CEP ILSL n ° 368005 and n ° 251/13 CC ILSL respectively. Written informed consent was obtained from all participants.

4.5.2 Extraction and analysis of the quality / RNA integrity

Biopsies (previously stored in RNAlater) were cut in small fragments individually with a scalpel and transferred into tubes containing ceramic beads (CK28 - Bertin Technologies). Then, 700µl of QIAzol reagent (Qiagen) was added for homogenization and lysis of the samples in the Precellys24 system (Bertin Technologies) run at one pulse (6500 rpm) of 10 seconds followed by 5 minutes of incubation at 4°C. The cycle was repeated 3 times.

Total RNA was extracted using the Mini kit miRNeasy and Qiacube apparatus according to the manufacturer's specifications (Qiagen) and recovered in 30µl of ultrapure water. The quantification and purity (ratio 260/280) of the samples were evaluated in the 2000 NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) and samples ratio equal to or close to 2 were considered appropriate. Samples integrity evaluation was performed using the 2100 Bioanalyzer system (GE Healthcare Bio-Sciences) and the Agilent RNA 6000 Nano kit. Appropriate RNA samples were those with Integrity Number (RIN) greater than or equal to 5.

4.5.3 cDNA synthesis

Complementary DNA (cDNA) was synthesized by a reverse transcription reaction using the QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) using 1µg RNA according to the manufacturer's specifications.

4.5.4 Standard curve

For each of the selected targets, gene expression standard curves were run in triplicate using a pool of 8 samples (2 samples of each form, including healthy

controls) diluted from 1:2 to 1:10 with 5 or 6 points beginning at 50 or 100ng concentration. The genes were: Treg [TGF- β 1 (Hs00998133_m1), FoxP3 (Hs01085834_m1), CTLA4 (Hs03044418_m1), IL-10 (Hs00961622_m1) and IKZF2 (Hs00212361_m1)], Th1 [T-bet (TBX21-Hs00203436_m1) and IFN- γ (Hs00989291_m1)], Th2 [GATA3 (Hs00231122_m1), IL-5 (Hs01548712_g1), IL-4 (Hs00174122_m1), IL-13 (Hs00174379_m1) and IL-33 (Hs00369211_m1)], and Th17 [IL-17F (Hs00369400_m1) and IL22 (Hs01574154_m1)]. In order to choose the best dilution for the samples, the following parameters were considered: C_T variation of less than 0.5 between the triplicate, R^2 greater than 0.9, efficiency between 95 and 105% and slope close or equal to 3.3. The ideal point dilution was the one in the intersection in the Y curve, as suggested in the MIQE Guidelines [27].

4.5.5 Real time PCR reactions: Evaluation of the expression of mRNA encoding cytokines and transcription factors

All samples (cDNA) were subjected to Real Time PCR reactions (chain reaction in real time polymerase) for the detection of mRNA for GAPDH (Hs03929097_g1), constitutive expression gene (endogenous control), used to check both quality of cDNA, as well as for the standardization (ΔC_T). Assays were performed in duplicates in the ViiA7 apparatus (Applied Biosystems/USA) using reagents TaqMan™ Gene Expression Master Mix and TaqMan™ Gene Expression Assays, as determined by the manufacturer (Life Technologies) and the reaction mix consisted of 5 μ L of Taqman™ Gene Expression Master Mix (10x), 0.5 μ L of Taqman™ Gene Expression Assay (20x), 3.5 μ L ultrapure H₂O (DNase and RNase free) and 1 μ L cDNA sample and the reactions were carried out as follows: 2 minutes at 50°C, 10 minutes at 95°C, and forty cycles of 15 seconds at 95°C, 1 minute at 60°C (Annealing Temperature). Reactions were performed in duplicate in specific Real Time PCR 96 wells plates.

Once positivity for the GAPDH was confirmed, the expression of mRNA encoding cytokines and transcription factors characteristic of Treg profiles (TGF- β 1, FoxP3, CTLA4, IKZF2 and IL-10), Th1 (T-bet and IFN- γ), Th2 (GATA3, IL-5, IL-4, IL-13 and IL-33) and Th17 (IL-17F and IL-22) were also analyzed by the Real Time PCR reactions using the TaqMan™ assays Gene Expression Assays, previously standardized by the manufacturer (Life Technologies) containing primers and probes specific for each target.

4.5.6 Analysis of results

Statistical analysis of the ΔC_T values (value C_T endogenous gene (GAPDH) - C_T target value) were carried out using the Mann Whitney U test, and linear regression test, using the GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad, San Diego, CA).

4.6 Results

4.6.1 Selection of samples

In total, 114 samples kept in the bank of biological samples collected between 2008 and 2013 were considered adequate for analysis. Of samples considered appropriate, 55 correspond to the localized form, 20 to multifocal form, and 27 corresponded to the disseminated form. Besides, 12 healthy controls were used for evaluation of gene expression. Therefore, the group of patients with multiple lesions (M) consisted of 47 patients and with single lesion (U) 55 patients.

4.6.2 Gene expression

Regarding the results of gene expression related to T-bet and IFN- γ targets, both of Th1 profile, the transcription factor T-bet (Fig. 1A) showed significantly higher expression in patients than in controls ($p < 0.0001$). But for IFN- γ cytokine (Fig. 1C) there was no significant difference between the two groups. Additionally, for both targets, no significant difference was observed when comparing the U and M forms (Fig. 1B and 1D).

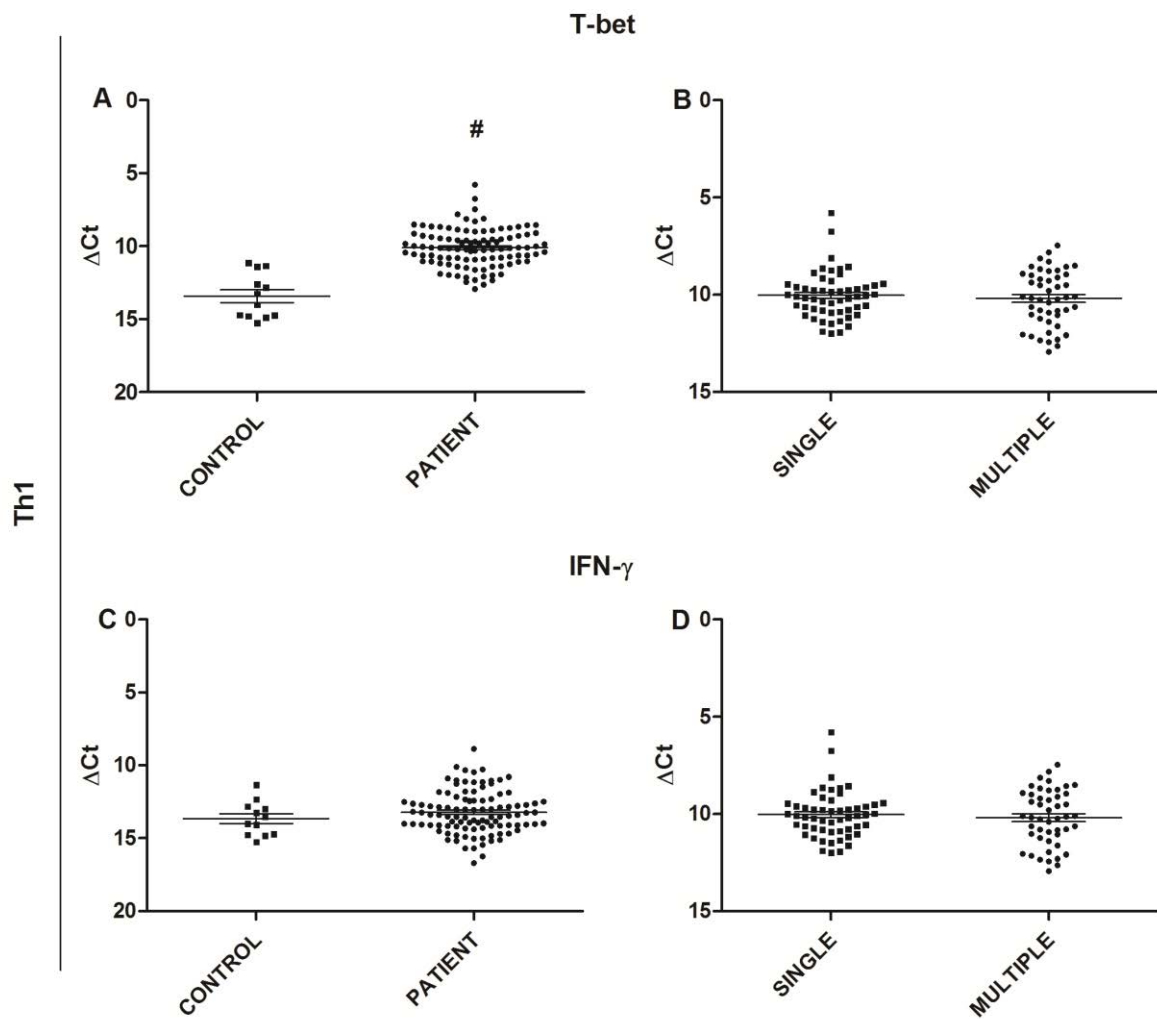


Figure 1. Gene expression analysis for targets related to the Th1 profile. (A) Comparison between JLD patients and healthy controls in respect to T-bet transcription factor. (B) Comparison between patients with single lesion and multiple lesions in respect to the transcription factor T-bet. (C) Comparison between patients with JLD and healthy controls in respect to IFN- γ cytokine. (D) Comparison between patients with single lesion and multiple lesions in respect to IFN- γ cytokine. Statistical analysis: Mann Whitney U test (# $p \leq 0.05$).

Regarding Th17 profile, the selected target was IL-17F. This prototypical cytokine showed significantly higher expression ($p=0.0168$) in patients when compared to the patient groups and controls (Fig. 2A). However, there was no significant difference when comparing U and M forms (Fig. 2B). When the expression of IL-22 cytokine was analyzed, there was no significant difference between patients and controls, and the same was observed for the U and M forms (Fig. 2C and 2D).

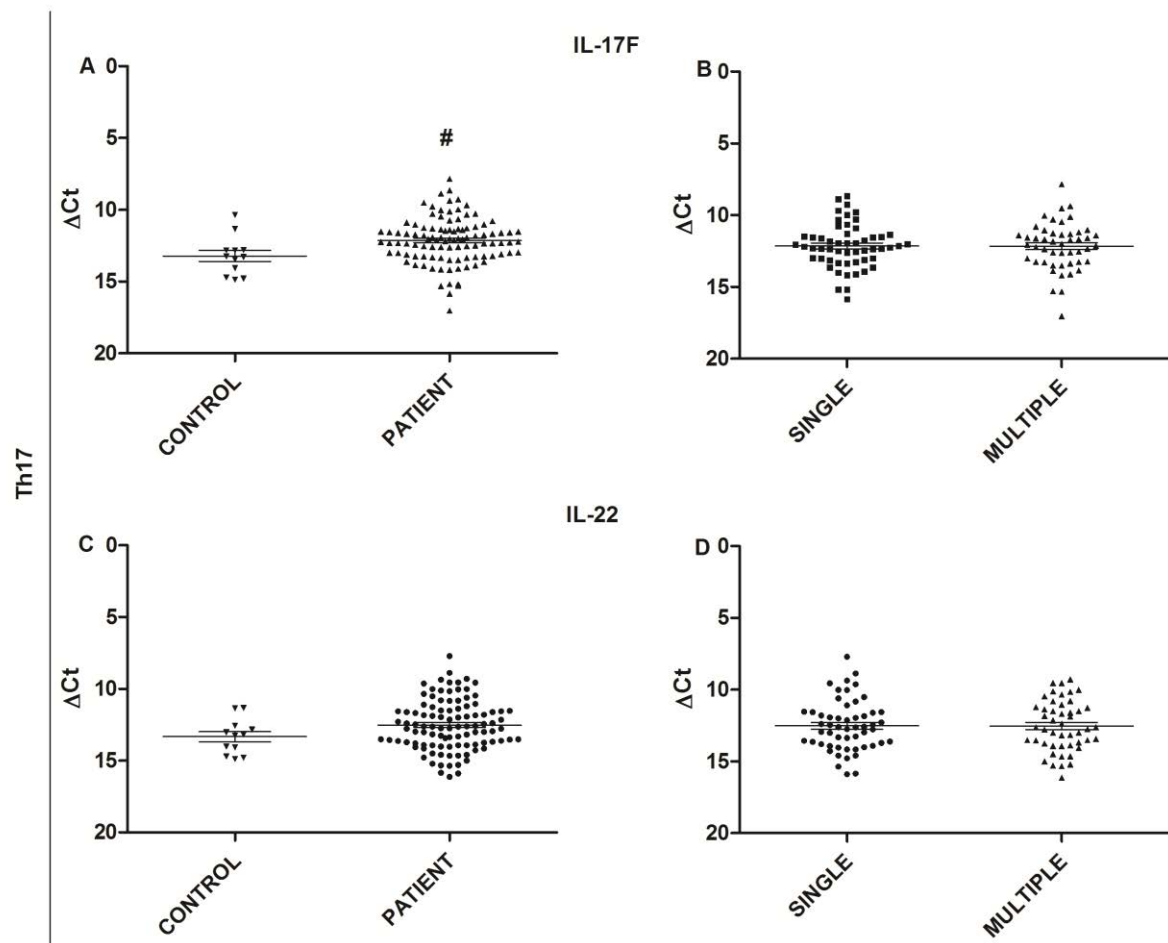


Figure 2. Gene expression analysis of targets related to Th2 profile. (A) Comparison between JLD patients and healthy controls in respect to GATA3 transcription factor. (B) Comparison between patients with single lesions and multiple lesions in respect to GATA3 transcription factor. (C) Comparison between JLD patients and healthy controls with respect to IL-4 cytokine. (D) Comparison between patients with single lesions and multiple lesions relative to IL-4 cytokine. (E) Comparison between JLD patients with healthy controls in respect to IL-5 cytokine. (F) Comparison between patients with single lesion and multiple lesions with respect to IL-5 cytokine. (G) Comparison between JLD patients with healthy controls in respect to IL-13 cytokine (H) Comparison between patients with single lesion and multiple lesions in respect to the IL-13 cytokine. (I) Comparison between JLD patients with healthy controls in respect to IL-33 cytokine. (J) Comparison between patients with single lesion and multiple lesions in respect to the IL-33 cytokine. Statistical analysis: Mann Whitney U test (# $p \leq 0.05$).

Regarding targets related to Th2 profile, the transcription factor GATA3 ($p=0.0089$) and the cytokine IL-4 ($p=0.0399$) showed significantly lower expression in patients compared to controls (Fig. 3A and 3C), whereas for IL-5 targets, IL-13 and IL-33 there was no significant difference between patients and controls (Fig. 3E, 3G and 3I). Similarly, when comparing the U and M forms no significant difference for IL-13 and IL-33 targets (Fig. 3H and 3J) were observed. Regarding the cytokine IL-5, as mentioned above, there was no significant difference between patients and controls (Fig. 3E). On the other hand, significantly higher expression (Fig. 3F) was observed in the M group compared to the U group ($p=0.0144$).

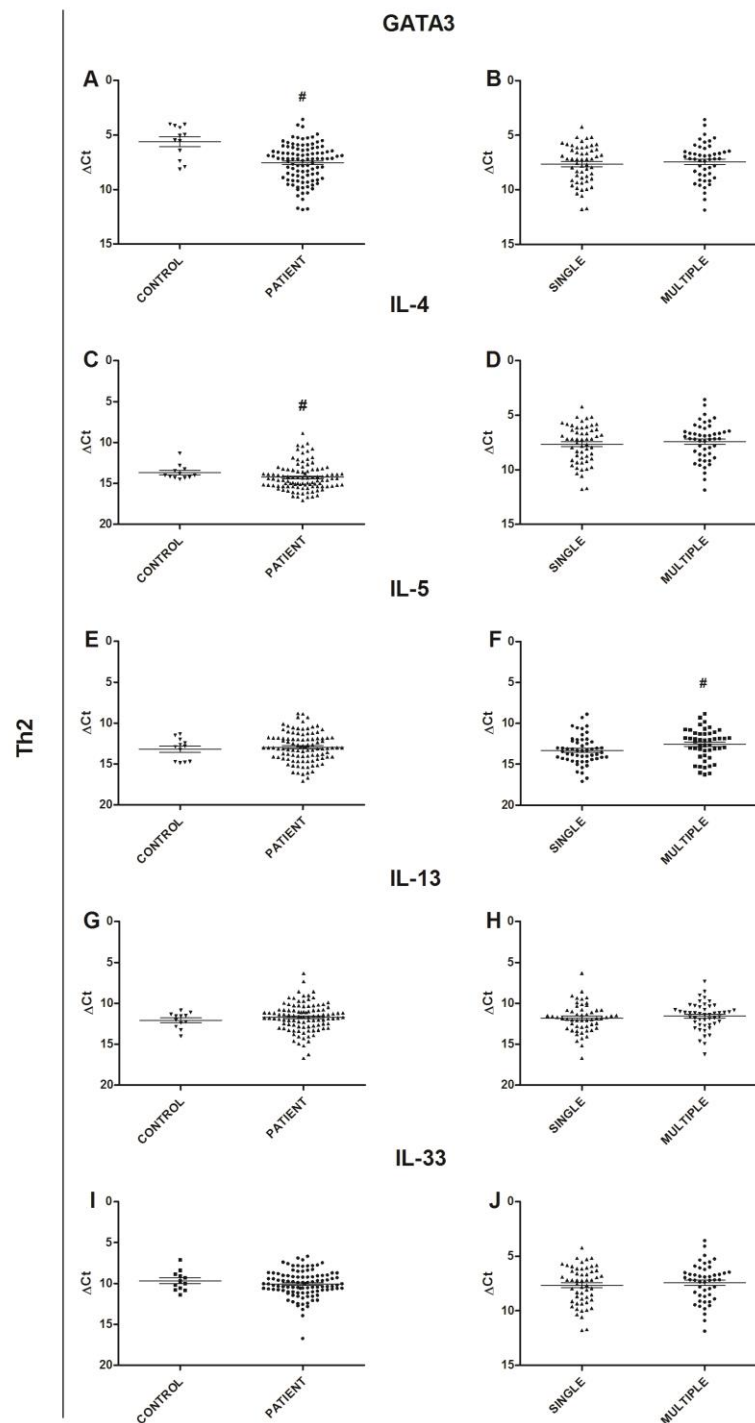


Figure 3. Gene expression analysis of targets related to Th17 profile. (A) Comparison between JLD patients with healthy controls in respect to IL-17F cytokine. (B) Comparison between patients with single lesion and multiple lesions in respect to IL-17F cytokine. (C) Comparison between JLD patients with healthy controls in respect to IL-22 cytokine. (D) Comparison between patients with single lesion and multiple lesions in respect to the IL-22 cytokine. Statistical analysis: Mann Whitney U test (# $p \leq 0.05$).

Regarding the results of gene expression related to the specific targets of the Treg profile, TGF- β 1 ($p<0.0001$), IL-10 ($p<0.0001$), CTLA4 ($p=0.0018$) and FoxP3 ($p=0.0025$) had significantly higher expression in patients than in controls (Fig. 4A, 4C, 4E and 4G). For IKZF2 target no significant difference was observed (Fig. 4I). In addition, while evaluating the expression in patients M and U, the TGF- β 1 cytokine (Fig. 4H) showed significantly higher expression in patients from group U ($p=0.0059$). For other targets (IKZF2, IL-10, FoxP3 and CTLA4), there was no significant difference when compared to the U and M forms (Fig. 4B, 4D, 4F and 4J).

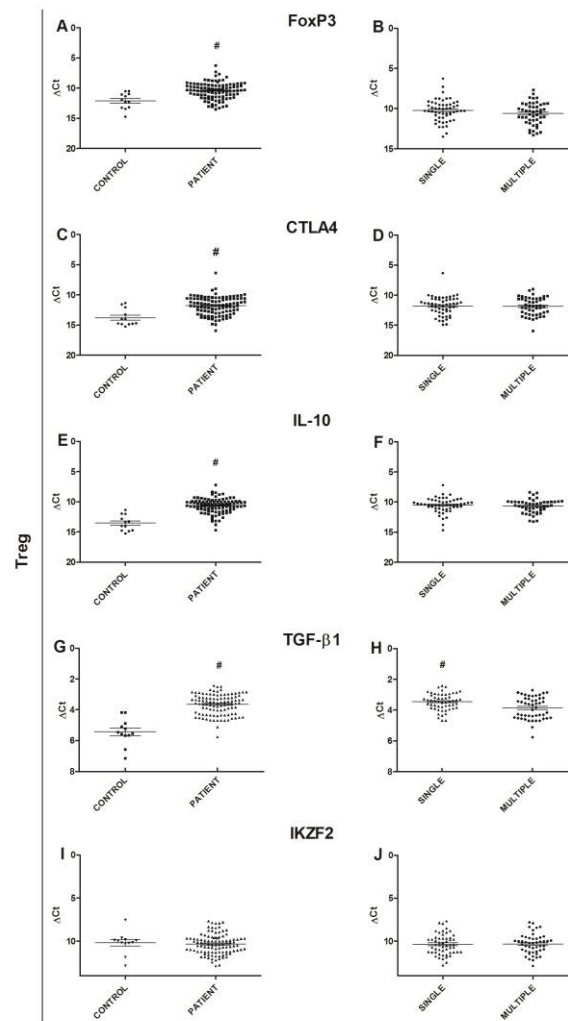


Figure 4. Gene expression analysis of targets related to Treg profile. (A) Comparison between JLD patients and healthy controls with respect to the transcription factor FoxP3. (B) Comparison between patients with single lesion and multiple lesions in respect to the FoxP3 transcription factor. (C) Comparison between JLD patients and healthy controls in respect to CTLA4 marker. (D) Comparison between patients with single lesion and multiple lesions in respect to CTLA4 marker. (E) Comparison between patients and healthy controls JLD in respect to IL-10 cytokine. (F) Comparison between patients with single lesions and multiple lesions in respect to IL-10 cytokine. (G) Comparison between JLD patients with healthy controls in respect to TGF- β 1 cytokine (H) Comparison between patients with single lesion and multiple lesions in respect to TGF- β 1 cytokine. (I) Comparison between JLD patients with healthy controls in respect to IKZF2 marker. (J) Comparison between patients with single lesion and multiple lesions in respect to IKZF2 marker. Statistical analysis: Mann Whitney U test (# $p \leq 0.05$).

4.6.3 Correlation analysis

After the targets correlation analysis, several positive correlations were observed and negative correlations were observed between TGF- β 1 and IFN- γ , IL-4, IL-17F and IL-22 and the same was observed for IL-22 and GATA3 as demonstrated in Table 1.

Table 1. Linear regression and significance among the targets related to the Th1, Th2, Th17 and Treg profiles based on ΔC_T values.

Target	IL-10	TGFB1	CTLA4	IKZF2	IFNG	TBX21	GATA3	IL-4	IL-5	IL-13	IL-33	IL-17F	IL-22
FoxP3	p<0,0001* r ² 0,1717	p=0,1014 r ² 0,02661	p<0,0001* r ² 0,4137	p<0,0001* r ² 0,222	p=0,0005* r ² 0,1164	p<0,0001* r ² 0,2383	p<0,0001* r ² 0,2295	p=0,0023* r ² 0,08933	p=0,0203* r ² 0,05272	p<0,0001* r ² 0,1551	p<0,0001* r ² 0,1617	p=0,162 r ² 0,01946	p=0,0382* r ² 0,04226
IL-10		p=0,5679 r ² 0,00327	p<0,0001* r ² 0,1977	p<0,0001* r ² 0,1426	p<0,0001* r ² 0,2439	p<0,0001* r ² 0,2576	p=0,0095* r ² 0,06536	p=0,0002* r ² 0,1311	p=0,0041* r ² 0,07941	p=0,0018* r ² 0,093	p=0,011* r ² 0,06288	p=0,0322* r ² 0,04508	p=0,0548 r ² 0,03638
TGFB1			p=0,5498 r ² 0,00358	p=0,0134* r ² 0,05962	p=0,0294# r ² 0,04654	p=0,1295 r ² 0,02284	p=0,8606 r ² 0,000309	p=0,0248# r ² 0,04936	p=0,1297 r ² 0,02281	p=0,5854 r ² 0,00298	p=0,6419 r ² 0,00217	p=0,0371# r ² 0,04275	p=0,0063# r ² 0,07221
CTLA4				p<0,0001* r ² 0,1969	p<0,0001* r ² 0,352	p<0,0001* r ² 0,3015	p<0,0001* r ² 0,1633	p<0,0001* r ² 0,3006	p<0,0001* r ² 0,155	p<0,0001* r ² 0,1952	p<0,0001* r ² 0,1688	p=0,0017* r ² 0,09387	p<0,0001* r ² 0,1808
IKZF2					p<0,0001* r ² 0,1535	p=0,0025* r ² 0,08787	p<0,0001* r ² 0,1626	p=0,0004* r ² 0,1193	p=0,0042* r ² 0,07906	p=0,0027* r ² 0,08678	p=0,0318* r ² 0,04528	p=0,249 r ² 0,01327	p=0,1492 r ² 0,02069
IFNG						p<0,0001* r ² 0,286	p=0,0002* r ² 0,1284	p<0,0001* r ² 0,4664	p<0,0001* r ² 0,2583	p<0,0001* r ² 0,1649	p=0,0005* r ² 0,1162	p=0,0002* r ² 0,1278	p=0,4982 r ² 0,00469
TBX21							p<0,0001* r ² 0,229	p<0,0001* r ² 0,1756	p=0,0089* r ² 0,06654	p=0,0076* r ² 0,06905	p=0,0015* r ² 0,09648	p=0,0981 r ² 0,02713	p=0,4675 r ² 0,0054
GATA3								p<0,0001* r ² 0,1952	p=0,003* r ² 0,08487	p=0,0235* r ² 0,05024	p<0,0001* r ² 0,1748	p=0,1676 r ² 0,01896	p=0,033# r ² 0,04554
IL-4									p<0,0001* r ² 0,4403	p=0,0001* r ² 0,14	p<0,0001* r ² 0,1599	p=0,0001* r ² 0,141	p=0,4929 r ² 0,00481
IL-5										p<0,0001* r ² 0,2294	p=0,0045* r ² 0,07808	p<0,0001* r ² 0,2524	p=0,5017 r ² 0,00461
IL-13											p=0,1107 r ² 0,02524	p<0,0001* r ² 0,1842	p=0,2169 r ² 0,01552
IL-33												p=0,112 r ² 0,02506	p=0,4327 r ² 0,00629
IL-17F													p=0,505 r ² 0,00500

* Positive correlation - # Negative correlation

4.7 Discussion

Given the scarcity of studies related to immune response against the fungus *L. loboi*, after analysis of a significant number of lesions from patients with JLD this study contributes to the understanding of the immunoregulation involved in Th1, Th2, Th17 and Treg cell subpopulations.

The results obtained by comparing patients and controls, demonstrate that most analyzed targets related to Treg cells (FoxP3, CTLA-4, IL-10 and TGF- β 1) showed increased expression in patients, confirming other studies that have suggested that Treg cells control the immune response by inducing immunosuppression and maintenance of the fungus [28]. Indeed, in other fungal diseases [28], for example, paracoccidioidomycosis, it has been shown that Treg cells act as immunosuppressor cells, since individuals with active disease expressed more Treg positive cells than healthy controls, besides elevated levels of expression of regulatory markers [29]. In addition, Treg migration to the site of infection would benefit the pathogen by induction of a chronic disease, that is, the persistence of the fungus over long periods, which has been a characteristic of some infectious diseases, including schistosomiasis [30], leishmaniasis [31], paracoccidioidomycosis [28] and Jorge lobo's disease.

Furthermore, because the TGF- β 1 and IL-10 are able to inhibit IFN- γ , IL-2, IL-12 and TNF- α synthesis, as well as the differentiation of Th1 lymphocytes (which is associated with protection), this would justify the fact that, despite an increase in the T-bet transcription factor in patients, IFN- γ expression did not differ between the groups. This result evidences the suppression role of T regulatory cells in the Th1 profile and the negative correlation between TGF- β 1 and IFN- γ cytokine, thus enhancing the inhibitory role of regulatory T cells. As *L. loboi* is an intracellular organism [6,32,33], IFN- γ is critical for the activation of macrophages and

elimination of the fungus, so, high amounts of IFN- γ are necessary to induce a protective immune response, and this fact was not observed in lesions of JLD patients.

Regarding the Th17 cells, their contribution is controversial. Some studies show that they are protective, working on the elimination of fungi [34,35,36], while others studies associate the Th17 response to survival and multiplication of the organisms [37,38,39]. In the present work it has been suggested that Th17 cells are not associated with protection, because there was increased expression of IL-17 cytokine in patients. In fact, considering that *L. loboi* is an intracellular fungus, the predominant neutrophil recruitment characteristic of this profile, would not be effective in eliminating the fungi. Additionally, the recruitment of monocytes in lower degree, also resulting from IL-17 expression, may not be as efficient for the activation of macrophages without the proper IFN- γ production. Probably, the studies that showed that Th17 cells contribute to elimination of the fungi [35,36] may have analyzed the response to facultative intracellular fungi, which would justify the effective role of neutrophils recruited resulting from IL-17 production.

Additionally, in this study, similarly to IFN- γ , a negative correlation was demonstrated between TGF- β 1 and IL-17 and IL-22 cytokines. The interaction between Treg and Th17 cells in fungal diseases remains controversial [40], in the case of candidiasis, for example, Treg cells can both inhibit Th17 response [41] or favor it [42]. In this study, despite the inhibition of IL-17 because of TGF- β 1, IL-17 expression was higher in patients, however, no difference of IL-22 expression was shown between controls and patients may be due to the inhibitory effect of TGF- β 1.

The TGF- β 1 inhibitory effect was also observed in the Th2 profile, given its negative correlation with the IL-4 cytokine. Classically, in the immune response to fungi, the Th2 type responses harmful to the host, as they are related to increased fungal burden [34,43,44]. Cytokines such as IL-4 and IL-13 inhibit the Th1 response and induce the alternative

macrophage activation resulting in an anti-inflammatory action, a process which would favor the multiplication of *L. loboi*. However, IL-4 and GATA3 transcription factor expression were lower in patients, while there were no differences for other targets analyzed (IL-5, IL-13 and IL-33), thereby reinforcing the key role of regulatory T cells, and not of Th2 cells, facilitating the multiplication and persistence of *L. loboi*.

In this work, besides comparing the expression of targets between controls and patients, the expression between single and multiple forms of JLD were also evaluated. As patients with multiple and disseminated forms have clinical similarities, and often multiple forms progress to disseminated disease, for the purpose of immune response analysis both forms were grouped and compared to the single form of the disease, as this usually does not progress to other forms. In this analysis, only TGF- β 1 and IL-5 showed significant different expression, with higher expression in single lesion and multiple lesions groups, respectively. Higher TGF- β 1 expression in the single lesion group was not expected, because considering that this cytokine is associated with immunosuppression, higher levels were expected to be detected in the multiple lesions group. Nevertheless, in this case TGF- β 1 may be associated with fibrosis, and this process may be more evident in the single form of JLD, favoring the containment of the granulomas, but additional studies are needed to clarify this finding. On the other hand, the IL-5 cytokine did not differ between controls and patients; however, it showed higher expression in the multiple forms, indicating that this cytokine may influence the dissemination of the disease. The role of IL-5, which is associated with eosinophil recruitment and survival, has been associated with susceptibility to lung infection with *C. neoformans* [45]. Furthermore, recently it has been shown that eosinophils produce IL-4, thus contributing to the development of the Th2 response which is not considered protective for fungal infections [46]. However, JLD is characterized by skin lesions presenting numerous macrophages and giant cells, eosinophils, however, are scarce and do not

have a prominent role in lesions, thus IL-5 role in JLD has to be elucidated.

In conclusion, regulatory T cells demonstrated by IL-10, TGF- β 1 and CTLA-4 expression can inhibit the expression of other cytokines associated with Th1, Th2 and Th17 profiles. Additionally, for the intracellular fungus *L. loboi*, the protective immune response depends on adequate IFN- γ production for efficient activation of macrophages. Thus, the understanding of immunoregulation involved in JLD can contribute to new therapeutic approaches because there isn't yet an effective treatment for the disease.

4.8 Acknowledgments

We thank the team of Specialized Dermatology Service of Hospital das Clínicas of Acre, for their help with samples collect of patients and health controls.

4.9 References

1. Lacaz CS, Baruzzi RG, Rosa MCB. Doença de Jorge Lobo. São Paulo: USP-IPSIS;1986.
 2. Rodríguez-Toro G. Lobomycosis. Int J Dermatol. 1993;32(5):325-32.
 3. Brito AC, Quaresma JAS. Lacaziose (doença de Jorge Lobo): revisão e atualização. An Bras Dermatol. 2007;82:461-74.
 4. Talhari S, Talhari C. Lobomycosis. Clin Dermatol. 2012;30:420-4.
 5. Papadavid E, Dalamaga M, Kapniari I, Pantelidaki E, Papageorgiou S, Pappa V, et al. Lobomycosis: A case from Southeastern Europe and review of the literature. J Dermatol Case Rep. 2012;3:65-9.
 6. Arju R, Kothadia JP, Kaminski M, Abraham S, Giashuddin S. Jorge Lobo's disease: a case of keloidal blastomycosis (lobomycosis) in a nonendemic area. Ther Adv Infect Dis. 2014;2(3-4):91-96
 7. Woods WJ, Belone AF, Carneiro LB, Rosa PS. Ten years experience with Jorge Lobo's disease in the state of Acre. Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2010;52:273-8.
-

-
8. Brito AC. Lacaziose (Doença de Jorge Lobo). In: Zaitz C, Campbell I, Marques AS, Ruiz LRB, Framil VMS. Compêndio de Micologia Médica. 2ª ed. p. 219-31. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2012.
 9. Herr RA, Tarcha EJ, Taborda PR, Taylor JW, Ajello L, Mendoza L. Phylogenetic analysis of *Lacazia loboi* places this previously uncharacterized pathogen within the dimorphic *Onygenales*. J Clin Microbiol. 2001;39:309-14.
 10. Paniz-Mondolfi AE, Reyes-Jaimes O, Dávila-Jones L. Lobomycosis in Venezuela. Int J Dermatol. 2007;46:180–5.
 11. Paniz-Mondolfi A, Talhari C, Hoffmann LS, Connor DL, Talhari S, Bermudez-Villapol L, et al. Lobomycosis: an emerging disease in humans and delphinidae. Mycoses 2012;55:298–309.
 12. Tubilla LHM, Schettini APM, Eiras JC, Graça CZA, Frota MZM. Lacaziose simulando hanseníase dimorfa tuberculóide. An Bras Dermatol 2008;83(3):261-263.
 13. Opromolla DVA, Taborda PROW, Taborda VBA, Viana S, Furtado JF. Lobomycose: relato de 40 casos novos. An Bras Dermatol 1999;74:135-141.
 14. Opromolla DVA, Belone AFF, Taborda PRO, Taborda VBA. Correlação clinicopatológica em 40 casos novos de lobomycose. An bras Dermatol 2000;75(4):425-434.
 15. Vilani-Moreno FR, Belone AFF, Soares CT, Opromolla DVA. Immunohistochemical characterization of the cellular infiltrate in Jorge Lobo's disease. Rev Iberoam Micol 2005;22:44-49.
 16. Paniz-Mondolfi A, Talhari C, Hoffmann LS, Connor DL, Talhari S, Bermudez-Villapol L, et al. Lobomycosis: an emerging disease in humans and delphinidae. Mycoses 2012;55:298–309.
 17. Wiersema JP, Niemeel PLA. Lobo's disease in Surinam patients. Trop Geogr Med. 1965;17:89-111.
 18. Restrepo A. Treatment of tropical mycoses. J Am Acad Dermatol. 1994;31(3 Pt 2):S91-S102.
-

-
19. Miranda MFR, Costa VS, Bittencourt MJS, Brito AC. Transepidermal elimination of parasites in Jorge Lobo's disease. *An Bras Dermatol*. 2010;86(2):39-43.
 20. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 7ª ed. Rio de Janeiro:Elvieser; 2012.
 21. Müller U, Stenzel W, Köhler G, Werner C, Polte T, Hansen G, et al. IL-13 induces disease-promoting type 2 cytokines, alternatively activated macrophages and allergic inflammation during pulmonary infection of mice with *Cryptococcus neoformans*. *J. Immunol*. 2007;179:5367-5377.
 22. Netea MG, Suttmüller R, Hermann C, VanDerGraaf CA, VanDer Meer JW, VanKrieken JH, et al. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J. Immunol*. 2004;172:3712-3718.
 23. Marcos EVC, Souza FC, Torres EA, Lauris JRP, Opromolla DVA. Estudo da associação entre antígenos leucocitários humanos e doença de Jorge Lobo. *Rev Soc Bras de Med Tropical*. 2005;38(5):399-401.
 24. Vilani-Moreno FR, Lauris JR, Opromolla DVA. Cytokine quantification in the supernatant of mononuclear cell cultures and in blood serum from patients with Jorge Lobo's disease. *Mycopathologia*. 2004;158(1):17-24.
 25. Xavier MB, Ferreira MMR, Quaresma JAS, Brito AC. HIV and leishmaniasis, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(3):526-7.
 26. Vilani-Moreno FR, Belone AFF, Lara VS, Venturini J, Lauris JRP, Soares CT. Detection of cytokines and nitric oxide synthase in skin lesions of Jorge Lobo's disease patients. *Med Mycol*. 2011;Early Online:1-6.
 27. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009 Apr;55(4):611-22. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797. Epub 2009 Feb 26.
 28. Silva AA, Sotto MN, Duarte MI, Pagliari C. Regulatory T cells in cutaneous lesions of patients with Paracoccidioidomycosis. *Microb Pathog*. 2013;65:36-40.
-

-
29. Ferreira MC, de Oliveira RT, da Silva RM, Blotta MH, Mamoni RL. Involvement of regulatory T cells in the immunosuppression characteristic of patients with paracoccidioidomycosis. *Infect Immun*. 2010;78(10):4392-401
 30. Zaccane P, Burton O, Miller N, Jones FM, Dunne DW, Cooke A. *Schistosoma mansoni* egg antigens induce Treg that participate in diabetes prevention in NOD mice. *Eur J Immunol*. 2009 Apr;39(4):1098-107. doi: 10.1002/eji.200838871.
 31. Costa DL, Guimarães LH, Cardoso TM, Queiroz A, Lago E, Roselino AM, et al. Characterization of regulatory T cell (Treg) function in patients infected with *Leishmania braziliensis*. *Hum Immunol*. 2013 Dec;74(12):1491-500. doi: 10.1016/j.humimm.2013.08.269. Epub 2013 Aug 28.
 32. Burns RA, Roy JS, Woods C, Padhye AA, Warnock D. Report of the first human case of lobomycosis in the United States. *J Clin Microbiol*. 2000;38:1283-5.
 33. Rosa PS, Soares CT, Belone AFF, Vilela R, Ura S, Filho MC, et al. Accidental Jorge Lobo's disease in a worker dealing with *Lacazia loboi* infected mice: a case report. *Journal of Medical Case Reports*. 2009;3:67.
 34. Romani L. Immunity to fungal infection. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(4):275-88.
 35. Huang W, Na L, Fidel PL, Schwarzenberger P. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J. Infect. Dis*. 2004; 190:624–631.
 36. Espinosa V, Rivera A. Cytokines and the regulation of fungus-specific CD4 T cell differentiation. *Cytokine* 2012; 58: 100–106.
 37. Zelante T, De Luca A, Bonifazi P, Montagnoli C, Bozza S, Moretti S, et al. IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. *Eur. J. Immunol*. 2007. 37: 2695–2706.8
-

-
38. Koh AY, Kohler JR, Coggshall KT, Van Rooijen N, Pier GB. Mucosal damage and neutropenia are required for *Candida albicans* dissemination. *PLoS Pathog.* 2008. 4: e35.9
 39. MacCallum DM, Castillo L, Brown AJ, Gow NA, Odds FC. Early-expressed chemokines predict kidney immunopathology in experimental disseminated *Candida albicans* infections. *PLoS One.* 2009;4:e6420.
 40. Whibley N, Gaffen SL. Brothers in Arms: Th17 and Treg Responses in *Candida albicans* Immunity. *PLoS Pathog.* 2014.4;10(12):e1004456.
 41. De Luca A, Montagnoli C, Zelante T, Bonifazi P, Bozza S, Moretti S, et al. Functional yet balanced reactivity to *Candida albicans* requires TRIF, MyD88, and IDO-dependent inhibition of Rorc. *J Immunol.* 2007 Nov 1;179(9):5999-6008.
 42. Chen X, Oppenheim JJ. Th17 cells and Tregs: unlikely allies. *J Leukoc Biol.* 2014 Feb 21. [Epub ahead of print]
 43. Hube B. Fungal adaptation to the host environment. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 347–349 (2009).
 44. Bourgeois C, Kuchler K. Fungal pathogens-a sweet and sour treat for toll-like receptors. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;22;2:142.
 45. Holmer SM, Evans KS, Asfaw YG, Saini D, Schell WA, Ledford JG, et al. Impact of Surfactant Protein D, Interleukin-5, and Eosinophilia on Cryptococcosis *Infect Immun.* 2014 Feb; 82(2): 683–693. doi: 10.1128/IAI.00855-13
 46. Piehler D, Stenzel W, Grahner A, Held J, Richter L, Köhler G, et al. Eosinophils Contribute to IL-4 Production and Shape the T-Helper Cytokine Profile and Inflammatory Response in Pulmonary Cryptococcosis. *Am J Pathol.* 2011 Aug; 179(2): 733–744. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.04.025
-

Conclusão

5. Conclusão

Diante dos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

- O perfil Th2, representado principalmente pela citocina IL-4, demonstrou expressão significativamente menor nos pacientes portadores de DJL. Analisando a influência deste perfil entre as diferentes formas da doença, a citocina IL-5 foi mais expressa nos pacientes com lesões múltiplas quando comparada aos pacientes com lesão única, sugerindo a participação do perfil Th2 na disseminação das lesões.
 - Em relação ao perfil Th1, o fator de transcrição T-bet foi significativamente expresso, porém, a citocina IFN- γ característica deste perfil, não apresentou diferença significativa entre pacientes e controles;
 - A IL-17F, citocina prototípica do perfil Th17, apresentou expressão significativamente maior nos pacientes que nos controles, porém, neste estudo, esta citocina não foi associada a proteção contra a infecção fúngica.
 - As células Treg inibem resposta antifúngica na DJL, modulando principalmente a expressão das citocinas IFN- γ e IL-17F.
-

Referências

Referências

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Imunidade contra micro-organismos. "In": Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Imunologia celular e molecular. Tradução 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012.345-64.

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

Arju R, Kothadia JP, Kaminski M, Abraham S, Giashuddin S. Jorge Lobo's disease: a case of keloidal blastomycosis (lobomycosis) in a nonendemic area. *Therapeutic Advances in Infectious Disease* 2014;2(3-4):91-96

Azulay RD, Andrade LC, Carneiro JA. Micose de Jorge Lobo. Contribuição ao seu estudo experimental – Inoculações no homem e animais de laboratório e investigação imunológica. Hospital (Rio J). 1968a;73(4):1165-72.

Azulay RD, Andrade LC, Silva D, Carneiro J. Reprodução experimental da blastomicose de Jorge Lôbo. An. Bras. Derm. 1968b;43:261-6.

Azulay RD, Carneiro JA, Andrade LC. Blastomicose de Jorge Lobo. Contribuição ao estudo da etiologia, inoculação experimental, imunologia e patologia da doença. An Bras Dermatol. 1970;45:47-66.

Baecher-Allan C, Hafler DA. Suppressor T cells in human diseases. The Journal of experimental medicine. 2004;200:273-6.

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

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

Baruzzi RG, Marcopito LF, Vicente LS, Michalany NS. Jorge Lobo's disease (keloidal blastomycosis) and tinea imbricata in Indians from the Xingu National Park, Central Brazil. Trop Doctor. 1982;12:13-5.

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

Belone AF, Madeira S, Rosa PS, Opromolla DV: Experimental reproduction of the Jorge Lobo's disease in BALB/c mice inoculated with

Lacazia loboi obtained from a previously infected mouse. Mycopathologia.2002;155:191-4.

Beriou G, Costantino CM, Ashley CW, Yang L, Kuchroo VK, Baecher-Allan C, Hafler DA. IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function Blood 2009;113:4240–4249.

Bermudez L, Van Bressem M, Reyes-Jaimes O, Sayegh AJ, Paniz-Mondolfi AE. Lobomycosis in man and lobomycosis-like disease in bottlenose dolphin, Venezuela. Emerg Infect Dis. 2009;15(8):1301-3.

Bessesen BL, Oviedo L, Burdett Hart L, Herra-Miranda D, Pacheco-Polanco JD, Baker L, Saborío-Rodríguez G, Bermúdez-Villapol L, Aceved-Gutiérrez A. Lacaziosis-like disease among bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* photographed in Golfo Dulce, Costa Rica. Dis Aquat Organ. 2014;107(3):173-80.

Bishop JA, Nelson AM, Merz WG, Askin FB, Riedel S. Evaluation of the detection of melanin by the Fontana-Masson silver stain in tissue with a wide range of organisms including *Cryptococcus*. Hum Pathol. 2012;43(6):898-903.

Borelli D. Lobomycosis experimental. Derm Venez. 1962;3:72-82.

Bossart GD. Suspected acquired immunodeficiency in an Atlantic bottlenose dolphin with chronic-active hepatitis and lobomycosis. J Amer Vet Med Assoc. 1984;185:1413-4.

Bourgeois C, Kuchler K. Fungal pathogens-a sweet and sour treat for toll-like receptors. Front Cell Infect Microbiol. 2012;22;2:142.

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

Brito AC. Lacaziose (Doença de Jorge Lobo). In: Zaitz C, Campbell I, Marques AS, Ruiz LRB, Framil VMS. Compêndio de Micologia Médica. 2ª ed. p. 219-31. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2012.

Burns RA, Roy JS, Woods C, Padhye AA, Warnock D. Report of the first human case of lobomycosis in the United States. J Clin Microbiol. 2000;38:1283-5.

Bustamante B, Seas C, Salomon M, Bravo F. Case report: Lobomycosis successfully treated with posaconazole. Am J Trop Med Hyg. 2013;88(6):1207-8.

Caldwell DK, Caldwell MC, Woodard JC, Ajello L, Kaplan W, McLure HM.

Lobomycosis as a disease of the Atlantic bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus* Montagu, 1821). *Am J Trop Med Hyg.* 1975;24:105-114.

Campbell DJ, Koch MA. Treg cells: patrolling a dangerous neighborhood. *Nat Med.* 2011; 4;17(8):929-30.

Carneiro FP, Maia LB, Moraes MAP, Magalhães AV, Vianna LMS, Zancanaro PCQ, Reis CM. Lobomycosis: diagnosis and management of relapsed and multifocal lesions. *Diagn Microbiol Inf Dis.* 2009;65:62-4.

Cavassani KA, Campanelli AP, Moreira AP, Vancim JO, Vitali LH, Mamede RC, Martinez R, Silva JS. Systemic and local characterization of regulatory T cells in a chronic fungal infection in humans. *J Immunol.* 2006;1;177(9):5811-8.

Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* 2003. 198: 1875–1886.

Chen X, Oppenheim JJ. Th17 cells and Tregs: unlikely allies. *J Leukoc Biol.* 2014;21.

De Vries GA, Laarman JJ. A case of Lobo's disease in the dolphin *Sotalia guianensis*. *J Aquat Mammals.* 1973;1:26-33.

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

Dudok van Heel WH. Successful treatment in a case of lobomycosis (Lobo's disease) in *Tursiops truncatus* (mont.) at the dolfinarium, Harderwijk. *Aquat Mammals.* 1977;5:8-15.

Elgart ML. Unusual subcutaneous infections. *Dermatol Clin.* 1996;14(1):105-11.

Elsayed S, Kuhn SM, Barber D, Church DL, Adams S, Kasper R. Human Case of Lobomycosis. *Emer Infec Disea.* 2004;10:715-8.

Enokihara MMSS, Dalur ES, Maeda SM, Baruzzi RG, Michalany N. The Jorge Lobo's disease behavior during twenty years and the electron microscopy analysis. *Acta Microsc.* 1997;6(Supp B): 522-3.

Espinosa V, Rivera A. Cytokines and the regulation of fungus-specific CD4 T cell differentiation. *Cytokine* 2012; 58: 100–106.

Ferreira MC, de Oliveira RT, da Silva RM, Blotta MH, Mamoni RL. Involvement of regulatory T cells in the immunosuppression characteristic of patients with paracoccidioidomycosis. *Infect Immun.* 2010;78(10):4392-401.

Fialho AS. Blastomicose tipo Jorge Lobo. *O Hospital.* 1938;14:903-18.

Floriano MC. Doença de Jorge Lobo entre os índios Caiabi: epidemiologia, análise histopatológica e imuno-histoquímica nas diferentes apresentações clínicas. [Tese de doutorado] – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. São Paulo, 2014.

Furtado JS, Britto T, Freymuller E. Structure and reproduction of *Paracoccidioides lobo*. *Mycologia.* 1967;59:286-94.

Gavin MA, Torgerson TR, Houston E, DeRoos P, Ho WY, Stray-Pedersen A, Ocheltree EL et al., Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006. 103: 6659–6664.

Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology.* 1970;18:723-37.

Geuking MB, Cahenzli J, Lawson MA, Ng DC, Slack E, Hapfelmeier S, McCoy KD et al., Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses. *Immunity* 2011. 34: 794– 806.

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

Higgins SC, Lavelle EC, McCann C, Keogh B, McNeela E, Byrne P, O’Gorman B et al., Toll-like receptor 4-mediated innate IL-10 activates antigen-specific regulatory T cells and confers resistance to bordetella pertussis by inhibiting inflammatory pathology. *J. Immunol.* 2003; 171:3119–3127.

Huang W, Na L, Fidel PL, Schwarzenberger P. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J. Infect. Dis.* 2004; 190:624–631.

Hube, B. Fungal adaptation to the host environment. *Curr. Opin. Microbiol.*

12, 347–349 (2009).

Ito JT. Cell immunity and vaccines against invasive fungal diseases. *Immunol. Invest.* 2011;40:825-38.

Jonuleit H, Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol.* 2003;171:6323-7.

Koh AY, Kohler JR, Coggshall KT, Van Rooijen N, Pier GB. Mucosal damage and neutropenia are required for *Candida albicans* dissemination. *PLoS Pathog.* 2008. 4: e35.9

Kroetz DN, Deepe GS Jr. CCR5 dictates the equilibrium of proinflammatory IL-17+ and regulatory Foxp3+ T cells in fungal infection. *J Immunol.* 2010;1;184(9):5224-31.

Lacaz CS, Baruzzi RG, Rosa MCB. Doença de Jorge Lobo. São Paulo: USP-IPSI;1986.

Lathrop SK, Bloom SM, Rao SM, Nutsch K, Lio CW, Santacruz N, Peterson DA et al., Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature* 2011. 478: 250–254.

Lawrence DN, Ajello L. Lobomycosis in Western Brazil: report of a clinical trial with ketoconazole. *Am J Trop Med Hyg.* 1986;35(1):162-6.

Leite JM. Doença de Jorge Lobo. Contribuição ao seu estudo anátomo-patológico. [tese]. Belém: Faculdade de Medicina e Cirurgia do Pará; 1954.

Li Q, Wang G. Diversity of fungal isolates from three Hawaiian marine sponges. *Microbiol. Res.* 2009;164:233-241.

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

Lobo J. Contribuição ao estudo das blastomicoses. *An Bras Dermatol Siphilol* 1933; 8: 43-57.

Lobo J. Blastomicose queloidiforme. Doença de Jorge Lobo. *J Bras Med.* 1966;11(2):120-37.

Lupi O, Tying SK, McGinnis MR. Tropical dermatology: fungal tropical diseases. *J Am Acad Dermatol.* 2005;53(6):931-47.

MacCallum DM, Castillo L, Brown AJ, Gow NA, Odds FC. Early-expressed chemokines predict kidney immunopathology in experimental disseminated *Candida albicans* infections. PLoSOne. 2009;4:e6420.

Machado PA, Silveira DF. Piraip, a falsa lepra dos Caiabis. Rev Bras Leprol. 1966;34:60.

Machado PA. Regressão espontânea de lesões maculosas na blastomicose de Jorge Lôbo. Acta Amaz. 1972;2:47-50.

Madeira S, Belone AFF, Padovani CR, Opromolla DVA. Comparative experimental infection of *Lacazia loboi* in BALB/c and B10.A mice. Rev Iberoam Micol. 2003;20:55-9.

Madeira S, Opromolla DVA, Belone AFF. Inoculation of BALB/c mice with *Lacazia loboi*. Rev Inst Trop São Paulo. 2000;42:239-43.

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

Marshall NA, Culligan DJ, Johnston PW, Millar C, Barker RN, Vickers MA. CD4(+) T-cell responses to Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 1 in infectious mononucleosis and EBV-associated non-Hodgkin lymphoma: Th1 in active disease but Tr1 in remission. Br. J. Haematol. 2007. 139: 81–89.]

Mendoza L, Belone AFF, Vilela R, Rehtanz M, Bossart GD, Reif JS, Fair PA, Durden WN, Leger JS, Travassos LR, Rosa PS. Use of sera humans and dolphins with Lacaziosis and sera from experimentally infected mice for western blot analyses of *Lacazia loboi* antigens. Clinical and Vaccine Immunology. 2008;15(1):164-7.

Mendoza L, Vilela R, Rosa PS, Belone AFF. *Lacazia loboi* and *Rhinosporidium seeberi*: a genomic perspective. Rev Iberoam Micol. 2005;22:213-6.

Michalany J, Lagonegro B. Corpos asteróides na blastomicose de Jorge Lobo. A propósito de um novo caso. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1963;5(1):33-6.

Migaki G, Valerio MG, Irvine B, Gardner FM. Lobo's disease in an Atlantic bottle-nosed dolphin. J Amer Vet Med Assoc. 1971;159:578-82.

Mills KHG. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? Nat Rev Immunol. 2004;4:841-855.

Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11(10):763-76.

Miranda MFR, Costa VS, Bittencourt MJS, Brito AC. Transepidermal elimination of parasites in Jorge Lobo's disease. *An Bras Dermatol*. 2010;86(2):39-43.

Müller U, Stenzel W, Köhler G, Werner C, Polte T, Hansen G, Schütze N, Straubinger RK, Blessing M, McKenzie AN, Brombacher F, Alber G. IL-13 induces disease-promoting type 2 cytokines, alternatively activated macrophages and allergic inflammation during pulmonary infection of mice with *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol*. 2007;179:5367-77.

Nery-Guimarães F, Macedo DG. Contribuição ao estudo das blastomicoses na Amazônia (blastomicose queloidiana e blastomicose sul-americana). *Hospital* 1950; 38: 223-53.

Netea MG, Suttmüller R, Hermann C, VanDerGraaf CA, VanDer Meer JW, VanKrieken JH, Har-tung T, Adema G, Kullberg BJ. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol*. 2004;172:3712-18.

Nogueira L, Mendes L, Rodrigues CA, Santos M, Talhari S, Talhari C. Lobomycosis and squamous cell carcinoma. *An Bras Dermatol*. 2013;88(2):293-5.

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

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

Opromolla DVA, Madeira S, Belone AFF, Vilani-Moreno FR. Jorge Lobo's disease: experimental inoculation in swiss mice. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 1999b;41(6):359-64.

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

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

Pandiyan P, Conti HR, Zheng L, Peterson AC, Mathern DR, Hernandez-Santos N, Edgerton M, et al. CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells promote Th17 cells in vitro and enhance host resistance in mouse *Candida albicans* Th17 cell infection model. *Immunity* 2011. 34: 422–434.

Pang KR, Wu JJ, Huang DB, Tying SK. Subcutaneous fungal infections. *Dermatologic Therapy*. 2004;17:523-31.

Paniz-Mondolfi A, Talhari C, Hoffmann LS, Connor DL, Talhari S, Bermudez-Villapol L, Hernandez-Perez M, Van Bressem MF. Lobomycosis: an emerging disease in humans and delphinidae. *Mycoses*. 2012;55:298–309.

Paniz-Mondolfi AE, Reyes-Jaimes O, Dávila-Jones L. Lobomycosis in Venezuela. *Int J Dermatol*. 2007;46:180–5.

Paniz-Mondolfi AE, Sander-Hoffmann L. Lobomycosis in inshore and estuarine dolphins. *Emerg Inf Dis*. 2009;15(4):672-3.

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

Pasparakis M, Haase I, Frank O. Nestle. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation *Nature Reviews Immunology* 14, 289–301 (2014).

Pecher AS, Fuchs J. Cellular immunity in lobomycosis (keloidal blastomycosis). *Allergol Immunopathol*. 1988;16(6):413-5.

Pradinaud R, Talhari S. Lobomycose. In: *Encyclopedie Medico Chirurgicale, Maladies Infectieuses*. Paris: Elsevier; 1996. 8-608-A-10:1-6.

Pradinaud R. Entre le Yucatan, la Floride et la Guyane Française, la lobomycose existe-t-elle aux Antilles? *Bull Soc Path Ex*. 1984;77:392-400.

Quaresma JAS, Oliveira E, Brito AC. Is TGF- β important for the evolution of +subcutaneous chronic mycosis? *Med Hypoth*. 2008;70:1182-5.

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

Ramos-e-Silva M, Silveira Lima T. Advances in tropical diseases. *G Ital Dermatol Venereol*. 2011;146(5):353-71.

Reif JS, Mazzoil MS, McCulloch SD, Varela RA, Goldstein JD, Fair PA, Bossart GD. Lobomycosis in Atlantic bottlenose dolphins from the Indian River Lagoon, Florida. *J Am Vet Med Assoc*. 2006;228:104-8.

Reif JS, Peden-Adams MM, Romano TA, Rice CD, Fair PA, Bossart GD. Immune dysfunction in Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) with lobomycosis. *Med Mycol*. 2009;47(2):125-35.

Reif JS, Schaefer AM, Bossart GD. Lobomycosis: Risk of Zoonotic Transmission from Dolphins to Humans. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2013;13:1-5.

Restrepo A. Treatment of tropical mycoses. *J Am Acad Dermatol*. 1994;31(3 Pt 2):S91-S102.

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

Romani, L. Immunity to fungal infection. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(4):275-88

Rosa PS, Soares CT, Belone AFF, Vilela R, Ura S, Filho MC, Mendoza L. Accidental Jorge Lobo's disease in a worker dealing with *Lacazia loboi* infected mice: a case report. *Journal of Medical Case Reports*. 2009;3:67.

Rosa PS. Evaluation of anti-fungicidal drugs in the treatment of Balb/c mice inoculated with *Lacazia loboi* [thesis]. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2005;11(1):88.

Saint-Blancard P, Maccari F, Le Guyadec T, Lanternier G. La lobomycose: une mycose rarement observe en France métropolitaine. *Ann Pathol*. 2000;20(3):241-4.

Sampaio MM, Dias LB. The armadillo *Euphractus sexcinctus* as a suitable animal for experimental studies of Jorge Lobo's disease. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*. 1977;19:215-20.

Schulze B, Piehler D, Eschke M, Buttlar H, Köhler G, Sparwasser T, Alber, G. CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T cells suppress fatal T helper 2 cell immunity during pulmonary fungal infection. *European Journal of Immunology*. 2014;44(12): 3596–3604.

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

Shevach EM, Tran DQ, Davidson TS, Andersson J. The critical contribution of TGF-beta to the induction of Foxp3 expression and regulatory T cell function. *European journal of immunology*. 2008;38:915-7.

Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat. Immunol*. 2002. 3: 135–142

Silva D. Micose de Lobo. *Ars Curandi*. 1974;7:54-63.

Silva EA, Ferasçoli MO. Frequencies of ABO and Lewis blood groups in Jorge Lobo's disease. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2004;26(1):23-7.

Silva AA, Sotto MN, Duarte MI, Pagliari C. Regulatory T cells in cutaneous lesions of patients with Paracoccidioidomycosis. *Microb Pathog*. 2013;65:36-40.

Steinen K. Entre os aborígenes do Brasil Central. Publicação original em alemão, 1894. Tradução do Departamento de Cultura do Estado de São Paulo, 1940.

Suri-Payer E, Amar AZ, Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J Immunol*. 1998;160:1212-8.

Symmers WC. A possible case of Lobo's disease acquired in Europe from a bottlenosed dolphin (*Tursiops truncatus*). *Bull Soc Path Exot*. 1983;76:777-84.

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

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

Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int. Immunol*. 1998. 10: 1969–1980

Talhari S, Cunha MGS, Barros MLB, Gadelha AR. Doença de Jorge Lobo. Estudo de 22 casos novos. *Med Cut ILA*. 1981a;9:87-96.

Talhari S. Enfermedad de Jorge Lobo. Arch Argent Dermat. 1981;31(1):23-6.

Talhari S, Talhari C. Lobomycosis. Clinics in Dermatology. 2012;30:420-4.

Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. Nature immunology. 2008;9:239-44.

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

Vilani-Moreno FR, Belone AFF, Lara VS, Venturini J, Lauris JRP, Soares CT. Detection of cytokines and nitric oxide synthase in skin lesions of Jorge Lobo's disease patients. Medical mycology. 2011;Early Online:1-6.

Vilani-Moreno FR, Belone AFF, Madeira S, Opromolla DVA. Evaluation of the vital staining method for *Lacazia loboi* through the experimental inoculation of BALB/c mice. Med Mycol. 2003;41:211-6.

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

Vilani-Moreno FR, Lauris JR, Opromolla DVA. Cytokine quantification in the supernatant of mononuclear cell cultures and in blood serum from patients with Jorge Lobo's disease. Mycopathologia. 2004;158(1):17-24.

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

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

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

Wan YY, Flavell RA. 'Yin-Yang' functions of transforming growth factor-beta and T regulatory cells in immune regulation. Immunological reviews. 2007;220:199-213.

Wang R, Wan Z, Li R. Th and Treg response induced by *Aspergillus fumigatus* pulsed dendritic cells in vitro. Chin Med J

(Engl).2014;127(20):3616-22.

Whibley N, Gaffen SL. Brothers in Arms: Th17 and Treg Responses in *Candida albicans* Immunity. *PLoS Pathog*. 2014.4;10(12):e1004456.

Wiersema JP, Niemel PLA. Lobo's disease in Surinan patients. *Trop Geogr Med*. 1965;17:89-111.

Wiersema JP. Lobo's disease (keloidal blastomycosis). In: Baker RD, eds. *The pathologic anatomy of mycosis. Human infection with fungi, actinomycetes and algae*. New York: Springer-Verlag; 1971.

Woodard JC. Electron microscopic study of lobomycosis (*Loboa loboï*). *Lab Invest*. 1972;27:606-12.

Woods WJ, Belone AF, Carneiro LB, Rosa PS. Ten years experience with Jorge Lobo's disease in the state of Acre. Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2010;52:273-8.

Woods WJ, Belone AFF, Rosa PS, Ura S. Lobomycose: tratamento com poliquimioterapia multibacilar (PQT/MB). In: *Simpósio Nacional de Micologia Médica: Cromoblastomicose, Lobomycose, Paracoccidioidomicose e Criptococose*; 2005; Belém,PA. Anais.

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

Xavier MB, Libonati RMF, Unger D, Oliveira C, Corbett CEP, Brito AC, Quaresma JAS. Macrophage and TGF- β immunohistochemical expression in Jorge Lobo's disease. *Human Pathology*. 2008;39:269–74.

Zelante T, De Luca A, Bonifazi P, Montagnoli C, Bozza S, Moretti S, Belladonna, ML et al., IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. *Eur. J. Immunol*. 2007. 37: 2695–2706.8

Anexo

Anexo A – Ofício de aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética e Pesquisa do ILSL/Bauru.

INSTITUTO LAURO DE SOUZA
LIMA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Participação das células Th1, Th2, Th17 e T regulatórias na doença de Jorge Lobo: análise do perfil de expressão gênica nas lesões.

Pesquisador: MICHELLE DE CAMPOS SORIANI

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 3

CAAE: 11468412.0.0000.5475

Instituição Proponente: Instituto Lauro de Souza Lima

Patrocinador Principal: Instituto Lauro de Souza Lima

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 996.217

Data da Relatoria: 24/03/2015

Apresentação do Projeto:

Sem comentários

Objetivo da Pesquisa:

Sem comentários

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sem comentários

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem comentários

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Sem comentários

Recomendações:

Sem comentários

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem comentários

Endereço: Rod Comte João Ribeiro de Barros Km 225/226
Bairro: Caixa Postal 3021 **CEP:** 17.034-971
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3103-5855 **Fax:** (14)3103-5963 **E-mail:** etica@ilsl.br

INSTITUTO LAURO DE SOUZA
LIMA



Continuação do Parecer: 996.217

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O referido projeto aprovado em 22/08/13, recebeu parecer favorável para mudança de título na reunião do dia 10/03/15.

Informamos que não houve nenhuma alteração em seu conteúdo, seja com relação aos objetivos ou casuística e métodos.

BAURU, 24 de Março de 2015

Assinado por:
Ida Maria Foschiani Dias Baptista
(Coordenador)

Endereço: Rod Comte João Ribeiro de Barros Km 225/226

Bairro: Caixa Postal 3021

CEP: 17.034-971

UF: SP

Município: BAURU

Telefone: (14)3103-5855

Fax: (14)3103-5963

E-mail: etica@ilsil.br

Apêndices

Apêndices

Apêndice A. Termo de consentimento livre esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____ recebi dos pesquisadores responsáveis, esclarecimentos quanto ao Projeto de Pesquisa **“Participação das células Th1, Th2, Th17 e T regulatórias na doença de Jorge Lobo: análise do perfil de expressão gênica nas lesões”**, sob a coordenação da Dra. Andrea F. F. Belone.

Fui informado que o projeto pretende avaliar os aspectos imunológicos envolvidos na doença de Jorge Lobo (células T regulatórias, Th1, Th2 e Th17). Para isto, uma biópsia de pele será coletada e utilizada nos ensaios de Real Time PCR (técnica utilizada neste projeto).

Fui informado ainda que posso receber explicações adicionais dos pesquisadores assim que queira solicitar, bem como, terei acesso aos resultados da pesquisa se assim o desejar.

Devidamente informado e esclarecido, **manifesto aqui meu consentimento em participar do estudo.**

Declaro, adicionalmente, que não tenho qualquer restrição ao armazenamento do material coletado, uma vez que serei convidado a consentir novamente caso seja objeto de nova pesquisa.

Rio Branco,//.....

Assinatura do participante (ou responsável legal): _____

Nº Prontuário: _____

Telefone do participante para contato: _____

Apêndice B. Ficha de coleta

FICHA DE COLETA

Nº:	
Data:	

Nome: _____

Endereço: _____

Ocupação/Profissão: _____

Idade: _____ anos

Sexo: () Masculino () Feminino () Não declarado

FICHA DE COLETA

Nº:	
Data:	

Nome: _____

Endereço: _____

Ocupação/Profissão: _____

Idade: _____ anos

Sexo: () Masculino () Feminino () Não declarado

FICHA DE COLETA

Nº:	
Data:	

Nome: _____

Endereço: _____

Ocupação/Profissão: _____

Idade: _____ anos

Sexo: () Masculino () Feminino () Não declarado

FICHA DE COLETA

Nº:	
Data:	

Nome: _____

Endereço: _____

Ocupação/Profissão: _____

Idade: _____ anos

Sexo: () Masculino () Feminino () Não declarado