

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ELISÂNGELA DE SOUZA SANTOS DIAS

**IMUNOEXPRESSÃO DE FATOR DE CRESCIMENTO  
ENDOTELIAL VASCULAR EM PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

ALFENAS/MG  
2022

**ELISÂNGELA DE SOUZA SANTOS DIAS**

**IMUNOEXPRESSÃO DE FATOR DE CRESCIMENTO  
ENDOTELIAL VASCULAR EM PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).  
Área de concentração: Estomatologia

**Orientador:** Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann

**Coorientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carine Ervolino de Oliveira

ALFENAS/MG  
2022

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central

Dias, Elisângela de Souza Santos .

Imunoexpressão de fator de crescimento endotelial vascular em paracoccidiodomicose / Elisângela de Souza Santos Dias. - Alfenas, MG, 2022.

64 f. : il. -

Orientador(a): João Adolfo Costa Hanemann.

Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2022.

Bibliografia.

1. Paracoccidiodomicose. 2. VEGF. 3. Imunoistoquímica. I. Hanemann, João Adolfo Costa, orient. II. Título.

**IMUNOEXPRESSÃO DE FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR EM  
PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Odontologia.

Aprovada em: 18 de fevereiro de 2022.

**Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann**

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

**Profa. Dra. Natália Galvão Garcia**

Instituição: Centro Universitário de Lavras

**Prof. Dr. Alessandro Antônio Costa Pereira**

Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Natália Galvão Garcia, Usuário Externo**, em 18/02/2022, às 16:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alessandro Antônio Costa Pereira, Professor do Magistério Superior**, em 18/02/2022, às 16:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **João Adolfo Costa Hanemann, Professor do Magistério Superior**, em 18/02/2022, às 16:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0674321** e o código CRC **627F810E**.

Dedico a Deus, ao meu esposo e a minha filha pelo apoio na execução deste trabalho e também aos meus pacientes que me proporcionaram conhecimento e motivação em busca de mais aprendizado.

## AGRADECIMENTOS

Nesse momento tão especial em minha vida agradeço a todos que estiveram presentes nessa jornada e puderam contribuir de todas as formas possíveis para me ajudar a transformar o que era apenas um sonho e desejo, em uma realidade concluída com muito louvor.

Agradeço ao meu melhor amigo em especial, aquele que me inspira, me renova, me dá forças, me orienta e me conduz, aquele que me transmite calma e paz, ele que é a minha fonte inesgotável de sabedoria, sem ele coisa alguma teria sentido no meu viver, então lhe agradeço de todo o meu coração, e de toda minha alma e com todo o meu entendimento, muito obrigada Espírito Santo por me amar e ser meu melhor amigo.

Ao meu esposo **Itamar** pela paciência, pelos conselhos, pelo carinho e em especial, por acreditar em meu potencial e me apoiar em todos os momentos. Sempre estando ao meu lado me apoiando, motivando e aconselhando, a sua presença me acalma e me traz confiança.

À minha filhinha **Annelyse**, presente de Deus para nossas vidas. Ela é o motivo de toda minha dedicação e motivação.

Ao meu orientador e mentor **Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann**, pessoa ímpar, que tem todo meu respeito e admiração como pessoa e profissional, dotado de uma tamanha sabedoria e possuidor de um coração acolhedor, que me falta adjetivos para qualifica-lo. Em um momento da minha vida profissional onde eu estava totalmente sem orientação e foco, Deus, o colocou no meu caminho, uma pequena conversa que tivemos foi um divisor de águas para minha vida. Por isto deixo os meus puros e sinceros agradecimentos ao Prof. João Adolfo, seus ensinamentos mudaram a minha vida.

À **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carine Ervolino de Oliveira**, minha coorientadora, pelas sugestões e auxílio durante a realização deste trabalho.

Aos meus familiares e amigos, em especial a **Juliana**, que de várias maneiras e em diversos momentos puderam contribuir positivamente para que eu pudesse estar concluindo com êxito o tão sonhado título de Mestre.

Ao **Prof. Dr. Denismar Alves Nogueira** pela realização das análises estatísticas.

À **Dr.<sup>a</sup> Marta Miyazawa** pelas sugestões e críticas apresentadas durante o Exame de Qualificação e auxílio na redação do artigo científico.

Aos servidores e terceirizados da UNIFAL, pela atenção e carinho, em especial à **Sra. Luciana Esteves Pereira**, pela confiança e excelente convívio durante toda esta etapa.

À servidora **Sra. Maria Ângela Rodrigues** pela sua disponibilidade e grande contribuição quando da seleção da amostra.

Aos meus colegas de mestrado pela oportunidade do convívio, em especial a mestra **Laura Cruz Mamani**, porque além de colega tornou-se uma grande amiga.

Aos **pacientes da Clínica de Estomatologia** que depositaram sua confiança nos diagnósticos e tratamentos a eles propostos.

À **Universidade Federal de Alfenas**, ao corpo docente e todos os profissionais da instituição, pelo ensino de qualidade oferecido e pela prestação de serviço à população.

Por fim, a todos que acreditaram e estiveram ao meu lado durante esta jornada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma infecção fúngica profunda, sistêmica, causada pelo fungo do gênero *Paracoccidioides*. Microscopicamente, esta doença apresenta um epitélio hiperplásico pseudoepiteliomatoso com áreas de microabscesso, com intenso infiltrado inflamatório polimorfonuclear, e tecido conjuntivo com intenso infiltrado inflamatório mononuclear difuso. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é uma glicoproteína pró-inflamatória de 45kDa, que é expressa no citoplasma e na membrana de vários tipos celulares com uma importante função nas etapas do processo angiogênico. Constituiu-se proposição do presente estudo avaliar a prevalência de lesões bucais da paracoccidioidomicose diagnosticadas no Laboratório de Anatomopatologia Bucal da UNIFAL-MG no período de 1998 a 2020; analisar, através da imuno-histoquímica, a expressão do VEGF nas lesões bucais da paracoccidioidomicose e comparar a imunoexpressão deste marcador com os aspectos clínicos e microscópicos apresentados por estas lesões. Os resultados revelaram que houve um total de 98 casos de PCM diagnosticados, sendo a maioria em pacientes do gênero masculino, leucodermas e com idade média de 50,2 anos. Os locais mais acometidos foram a gengiva e o rebordo alveolar. Nos 83 casos em que foi realizada a análise microscópica, hiperplasia pseudoepiteliomatosa, áreas de microabscessos, infiltrado inflamatório mononuclear intenso e difuso e as células gigantes multinucleadas inflamatórias (CGMIs) estavam presentes em praticamente quase todos os casos. Observou-se ainda que os fungos, na maioria dos casos, estavam presentes nas três localizações, a saber: dispersos pelo tecido conjuntivo, no interior das CGMIs e nas áreas de microabscessos. Não foi possível correlacionar a imunoexpressão do VEGF com as variáveis clínicas e microscópicas. Com base nos resultados, conclui-se que a paracoccidioidomicose em mucosa bucal é uma condição patológica relativamente incomum e que, em nossa amostra, a imunoexpressão do fator de crescimento endotelial vascular foi discreta e observada em um número reduzido de casos.

**Palavras-chave:** Paracoccidioidomicose; VEGF; Imunohistoquímica.



## ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a deep systemic fungal infection caused by the fungus of the genus *Paracoccidioides*. Microscopically, this disease shows hyperplastic pseudoepitheliomatous epithelium with areas of microabscess, intense polymorphonuclear inflammatory infiltrate, and connective tissue with intense diffuse mononuclear inflammatory infiltrate. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) is a 45kDa pro-inflammatory glycoprotein expressed in the cytoplasm and cell membrane of various cell types with main role in the angiogenic process. The purpose of the present study are to evaluate the prevalence of oral lesions of PCM diagnosed in the Laboratory of Oral Anatomopathology of UNIFAL-MG from 1998 to 2020; to analyze immunohistochemically the expression of VEGF in oral lesions of PCM; to compare the immunoexpression of VEGF with the clinical and microscopic aspects of these lesions. Our results showed a total of 98 cases of PCM diagnosed in our service, predominantly in male, Caucasian, and mean age of 50.2 years. It occurred more frequently at the gingiva and alveolar ridge. Microscopic analysis was performed in 83 cases and presented pseudoepitheliomatous hyperplasia, areas of microabscesses, intense and diffuse mononuclear inflammatory infiltrate, and multinucleated giant cells (MGCs) were present in almost all cases. It was also observed that in most cases, the fungi were present in three locations: dispersed throughout the connective tissue, inside the MGCs, and in the areas of microabscesses. It was not possible to correlate VEGF immunoexpression with clinical and microscopic variables. Based on the results, it is concluded that paracoccidioidomycosis in the oral mucosa is a relatively uncommon pathological condition and that, in our sample, the immunoexpression of vascular endothelial growth factor was mild and observed in a reduced number of cases.

**Keywords:** Paracoccidioidomycosis; VEGF; Immunohistochemistry.

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-</b>	Distribuição do número de casos de PCM por ano do diagnóstico.....	36
<b>Gráfico 2-</b>	Distribuição dos casos de paracoccidiodomicose bucal segundo a cor da pele dos pacientes informada.....	37
<b>Gráfico 3-</b>	Distribuição do número de casos de paracoccidiodomicose bucal segundo a faixa etária dos pacientes.....	38
<b>Gráfico 4</b>	Diferentes localizações acometidas pelas lesões bucais da paracoccidiodomicose.....	39
<b>Gráfico 5-</b>	Alterações microscópicas encontradas nos casos de paracoccidiodomicose bucal.....	41

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1-</b>	Aspecto clínico característico da paracoccidiodomicose bucal, representado pela estomatite moriforme.....	20
<b>Figura 2-</b>	Aspectos microscópicos característicos da paracoccidiodomicose, destacando-se uma hiperplasia pseudoepiteliomatosa bem exuberante.....	31
<b>Figura 3-</b>	Áreas de microabscessos apresentando inúmeras estruturas esféricas com membranas birrefringentes compatíveis com o fungo <i>Paracoccidioides spp.</i> .....	32
<b>Figura 4-</b>	Granuloma imunogênico constituído por infiltrado mononuclear com predomínio de linfócitos e macrófagos, além de CGMIs do tipo Langhans contendo fungos no seu interior. Nota-se também a presença de fibrosamento periférico.....	32
<b>Figura 5-</b>	Estruturas esféricas com membrana birrefringente compatíveis com o <i>Paracoccidioides sp</i> dispersas pelo tecido conjuntivo e no interior de CGMIs.....	33
<b>Figura 6-</b>	Células imunomarcadas pelo VEGF compatíveis com macrófagos.....	42
<b>Figura 7-</b>	Imunomarcção pelo VEGF em parede vascular de um vaso neoformado.....	43
<b>Figura 8-</b>	Imunomarcção pelo VEGF predominantemente em áreas de pseudomembrana serofibrinosa.....	43
<b>Figura 9-</b>	Ausência de imunomarcção pelo VEGF nos fungos localizados no interior de CGMIs do tipo Langhans.....	44
<b>Figura 10-</b>	Imunomarcção pelo VEGF no plasma intravascular.....	44

## LISTA DE ABREVEATURAS

<b>AIDS</b>	Acquired Immunodeficiency Syndrome
<b>CD34</b>	Cell Surface Adhesion Molecule 34
<b>CGMIs</b>	Células Gigantes Multinucleadas Inflamatórias
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>HE</b>	Hematoxilina e Eosina
<b>HIV</b>	Human Immunodeficiency Virus
<b>ICAM</b>	Intracellular Adhesion Molecule
<b>MGCs</b>	Multinucleated Giant Cells
<b>MVD</b>	Microvessel Density
<b>PAS</b>	Periodic Acid – Schiff
<b>PBS</b>	Myophilized Bovine Serum
<b>PCM</b>	Paracoccidioidomicose
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>POM</b>	Primary Oral Melanoma
<b>UFs</b>	Unidades da Federação
<b>VEGFR-1</b>	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1
<b>VEGFR-2</b>	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2
<b>VEGFR-3</b>	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor
<b>VPF</b>	Vascular Permeability Factor
<b>PLGF</b>	Placental Growth Factor
<b>VEGF-A</b>	Vascular Endothelial Growth Factor- A
<b>VEGF-B</b>	Vascular Endothelial Growth Factor- B
<b>VEGF-C</b>	Vascular Endothelial Growth Factor- C
<b>VEGF-D</b>	Vascular Endothelial Growth Factor- D
<b>VEGF-E</b>	Vascular Endothelial Growth Factor- E
<b>VEGF-F</b>	Vascular Endothelial Growth Factor- F
<b>µm</b>	Micrometros

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Paracoccidioidomicose.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2</b>	<b>Fator de Crescimento Endotelial Vascular.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3</b>	<b>Expressão do Fator de Crescimento Endotelial Vascular em lesões bucais.....</b>	<b>25</b>
<b>2.4</b>	<b>Fator de Crescimento Endotelial Vascular e Paracoccidioidomicose.....</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>29</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>29</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
<b>4.1</b>	<b>Questões éticas.....</b>	<b>30</b>
<b>4.2</b>	<b>Casuística e seleção da amostra.....</b>	<b>30</b>
<b>4.3</b>	<b>Análise microscópia qualitativa.....</b>	<b>30</b>
<b>4.4</b>	<b>Reação imunoistoquímica.....</b>	<b>33</b>
<b>4.5</b>	<b>Análise da imunexpressão do VEGF.....</b>	<b>34</b>
<b>4.6</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>53</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>54</b>
	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>61</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença granulomatosa sistêmica que pode afetar diversos órgãos do corpo humano, destacando-se pulmões, linfonodos, glândulas adrenais, pele e a mucosa bucal. Esta condição infecciosa é causada por fungos termicamente dimórficos do gênero *Paracoccidioides* e das espécies *P. brasiliensis* e *P. Lutzii* (SHANKAR *et al.*, 2011). A PCM é adquirida pela inalação dos esporos do fungo afetando primariamente os pulmões (DEVELOUX, 2017).

Os fungos *P. brasiliensis* e *P. lutzii* são dimórficos e se apresentam sob duas formas: micélio e levedura. A forma de micélio é saprófita e encontrada na natureza a uma temperatura de 25°C. Tem um crescimento lento (3-4 semanas), produzindo propágulos de conídios infecciosos que são inalados nos pulmões, onde a transição para a forma de levedura patogênica ocorre, um passo essencial para o estabelecimento da infecção (BRUMMER *et al.*, 1993; SAN-BLAS, 1993; SAN-BLAS *et al.*, 2002). A forma de levedura está presente no exsudato dos tecidos do hospedeiro e cresce em cultura a 37°C (RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008).

Esta transição morfológica é determinante para a instalação da doença. Apesar de ser a forma parasitária e patogênica, a leveduriforme não é infecciosa e nem transmissível entre os humanos. Somente a forma micelial e propágulos de conídios encontrados na natureza é que podem infectar os seres humanos (ABREU E SILVA *et al.*, 2013; SHANKAR *et al.*, 2011). A manifestação primária da PCM consiste no envolvimento crônico pulmonar, podendo estar associada a alterações mucocutâneas. O aparecimento de lesões orais em pacientes com PCM, cerca de aproximadamente 80% dos casos da doença, se manifesta em sua forma crônica (BRAZÃO- SILVA *et al.*, 2011; MARQUES, 2012;).

Microscopicamente, as lesões orais apresentam tecido epitelial hiperplásico, intenso infiltrado inflamatório com a formação de granulomas constituídos por células epitelioides, representando uma resposta imunocelular a fim de prevenir a disseminação do fungo no organismo. O desenvolvimento das manifestações clínicas e a evolução da doença não dependem apenas da virulência da cepa infectante, mas também da

resposta imunológica desencadeada além dos fatores genéticos do hospedeiro (ABREU E SILVA *et al.*, 2013; BOCCA *et al.*, 2013; FORTES *et al.*, 2011).

A angiogênese é um processo bastante complexo regulado por fatores de inibição e de estimulação da proliferação vascular. O desequilíbrio desses fatores envolvidos na angiogênese leva ao desenvolvimento de um processo patológico. Vários fatores de crescimento estão relacionados com a angiogênese, dentre estes o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (APTE, CHEN, FERRARA, 2019; PEACH *et al.*, 2018).

O Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) é constituído por moléculas endógenas pró-angiogênicas com a importante função de regular a formação de vasos sanguíneos tanto no processo fisiológico, quanto no processo patológico. Estes fatores de crescimento são constituídos por glicoproteínas diméricas que atuam direta e seletivamente através dos receptores VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3, que predominantemente são expressos no endotélio vascular. A ligação do VEGF a esses receptores causa influxo de cálcio citoplasmático, elevando sua concentração em até quatro vezes, alterando a forma, a divisão e a migração celular. O aumento da permeabilidade das vênulas às macromoléculas permite que proteínas plasmáticas atravessem para o meio extracelular, causando a formação de fibrinogênio e deposição de gel de fibrina que atua como uma importante matriz provisória para o crescimento de novos vasos sanguíneos. Esta característica torna o VEGF um importante mediador da angiogênese (FÁTIMA; PAPA, 2010; LU *et al.*, 2018; PIRES *et al.*, 2016; VALIATTI *et al.*, 2011).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Paracoccidioidomicose

A PCM é uma doença infecciosa granulomatosa causada pela inalação do fungo dimórfico *Paracoccidioides*. Através das análises molecular e filogenética e das características morfológicas de numerosos isolados de *Paracoccidioides*, atualmente duas espécies, *P. brasiliensis* e *P. Lutzii*, têm sido diretamente relacionadas com esta doença (GIRARDI; SCROFERNECKER, 2016; MENESES-GARCIA *et al.*, 2002 QUEIROZ- TELLES *et al.*, 2017; SHANKAR *et al.*, 2011).

Esta patologia foi inicialmente descrita em 1908 por Adolfo Lutz que sugeriu a denominação “Doença de Lutz”. Posteriormente, em 1912, Afonso Splendore sugeriu o nome “Zymonema brasiliense” e, somente em 1930, Floriano de Almeida distinguiu seu agente etiológico do *Coccidioides immitis*, propondo o nome *Paracoccidioides brasiliensis*. Oficialmente, esta doença foi reconhecida como PCM pela Organização Mundial de Saúde somente em 1971. Recentemente, utilizando-se técnicas de biologia molecular, o *P. brasiliensis* foi classificado no filo Ascomycota, ordem Onygenales e família Onygenacea (ALMEIDA; JORGE-JÚNIOR; SCULLY, 2003; RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008).

Esses fungos são encontrados no solo de países da América Latina estendendo-se desde o México, ao norte, até a Argentina ao sul, sendo endêmico nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil (ALMEIDA; JORGE-JÚNIOR; SCULLY, 2003; BORBA *et al.*, 2005; GOLDANI; WIRTH, 2017; SHANKAR *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2007). A infecção é autóctone e restrita ao continente americano. A incidência da doença no Brasil, maior detentor dos casos, é observada com maior intensidade nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (VERLI *et al.*, 2005). Tal endemismo é atribuído às condições locais do solo (umidade, rico em matéria orgânica, recoberto por vegetação e com temperaturas em torno de 20°C) que propiciam um ambiente favorável para o crescimento do fungo (SILVA *et al.*, 2007). A PCM representa a maior causa incapacitante e de morte entre trabalhadores rurais adultos jovens, com idade entre 30



a 50 anos, durante o período de vida mais produtivo. Ambos os sexos podem ser contaminados, entretanto há maior predileção para o sexo masculino sendo a proporção homem- mulher de 11:1(CAIXETA *et al.*, 2018).

O curso clínico da doença pode se dar sob a forma aguda/ subaguda (juvenil) e crônica (adulta). A forma aguda/ subaguda da paracoccidioidomicose afeta crianças, adolescentes e adultos jovens. A sintomatologia se desenvolve em curto período de tempo, em aproximadamente dois meses. Esta forma clínica de PCM evolui rapidamente e dissemina a infecção para vários órgãos e sistemas. A maioria dos sintomas envolve o sistema fagocítico mononuclear, incluindo linfadenomegalia (local ou generalizada), que pode apresentar supuração, fistulização e hepatoesplenomegalia; além de lesões cutâneas ou mucosas e raramente envolvimento pulmonar. Febre, perda de peso e anorexia são frequentemente observadas nesta manifestação clínica. O envolvimento das membranas mucosas é pouco frequente, ocorrendo em 17 a 20% dos casos e o envolvimento pulmonar é ainda mais raro, cerca de 5 a 10% (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017).

A forma adulta ocorre em mais de 90% dos casos, principalmente em pacientes do gênero masculino, progride lentamente e pode levar meses a anos para se manifestar clinicamente. Afeta inicialmente os pulmões causando uma morbidade significativa devido ao comprometimento da função pulmonar. Em seguida, a doença pode disseminar para outros órgãos e tecidos produzindo lesões secundárias nas membranas mucosas (bucal e nasal), pele, linfonodos e glândulas adrenais. Quando o fungo adere e invade as células epiteliais, ele deixa de ser reconhecido pelo sistema imunológico, o que pode facilitar sua disseminação pelo corpo sem ser reconhecido (MENDES-GIANNINI *et al.*, 2008).

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

Patologias como: neoplasias, tuberculose, Doença de Chagas, leishmaniose e AIDS podem apresentar-se concomitantes à PCM, elevando a taxa de mortalidade

devido ao comprometimento generalizado do sistema imunológico ( BELLÍSSIMO-RODRIGUES; MACHADO; MARTINEZ, 2011; LOTH *et al.*, 2011). Entretanto, em pacientes soropositivos para o HIV, ocorre uma baixa incidência de PCM, provavelmente devido ao uso excessivo de antifúngicos em pacientes infectados pelo HIV (ALMEIDA; JORGE-JÚNIOR; SCULLY, 2003).

Estudos utilizando o teste intradérmico com a paracoccidioidina revelaram que o número de pacientes diagnosticados clinicamente com PCM representa apenas uma pequena porção de indivíduos infectados. Além dos fatores inerentes ao hospedeiro e ao fungo mencionados anteriormente, o fato do indivíduo infectado nas primeiras décadas de vida não estar mais residindo na área endêmica quando a doença se manifestou, contribuem para o atraso no diagnóstico (RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008).

Uma vez nos pulmões, as células epiteliais e macrófagos residentes são a primeira linha de defesa que interage com o *Paracoccioides*. Entretanto, apesar do ambiente hostil, os macrófagos podem servir de abrigo para a sobrevivência intracelular dos fungos e sua proliferação. Contudo, para ocorrer a disseminação hematogênica extrapulmonar para órgãos e tecidos como baço, fígado, gânglios linfáticos, mucosa oral, nasal e pele; a adesão e invasão do epitélio celular e da lâmina basal das proteínas se faz necessário (BRUMMER *et al.*, 1993; MENDES- GIANNINI *et al.*, 2008; SAN-BLAS *et al.*, 2002).

O *P. brasiliensis* pode levar à formação de um complexo granulomatoso pulmonar que, na maioria dos casos, regride espontaneamente com o estabelecimento da imunidade específica do hospedeiro. A infecção primária é quase sempre subclínica em indivíduos com sistema imune competente. Caso o hospedeiro torne-se imunocomprometido, poderá haver uma reativação tardia resultando em infecção crônica (RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008).

Os aspectos clínicos da PCM podem se apresentar de forma localizada e branda até disseminada, severa e progressiva, com evolução fatal. Com a inalação dos fungos, estes penetram o trato respiratório e se instalam nos pulmões resultando em PCM pulmonar em 80 a 90% dos casos, podendo ser frequentemente bilateral e localizada na metade inferior dos pulmões. Os sintomas nesta fase são inespecíficos e os

pacientes podem apresentar tosse crônica, expectoração, dispneia, dor torácica e hemoptise associada a sintomas sistêmicos como perda de peso, febre e anorexia. A infecção pode se apresentar assintomática, regredir espontaneamente, progredir para a doença ou permanecer num estado de latência (RAMOS-E-SILVA; SARAIA, 2008).

Estudos de sequenciamento de multilocus tem mostrado várias espécies do agente etiológico da Paracoccidioidomicose. O complexo *P. brasiliensis* compreende quatro grupos: espécie filogenética 1(S1), espécie filogenética 2(PS2), espécie filogenética 3(PS3), espécie filogenética 4(SP4) e a espécie biológica *Paracoccidioides Lutzii*. Estudos epidemiológicos apoiam uma ampla gama para os agentes que compõe o complexo *P. brasiliensis*, em especial o grupo S1(S1a e S1b), que são predominantemente encontrados no Sul da América Latina, especialmente no Sul e Sudeste do Brasil, Argentina e Paraguai. A espécie PS2 possui relatos esporádicos na Venezuela e na Região Sudeste do Brasil, enquanto que a espécie *P. Lutzii* apresenta um epicentro na Região Centro-Oeste do Brasil (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017).

O diagnóstico da PCM é baseado na detecção dos fungos, *P. brasiliensis* ou *P. Lutzii*, através de métodos convencionais incluindo exames diretos, cultura, histopatológicos de amostras coradas com hematoxilina- eosina (HE), ácido periódico de Schiff (PAS) e Grocott- Gomori e testes sorológicos que demonstram a presença de anticorpos circulantes nos soros, atuando como um coadjuvante no acompanhamento do paciente durante o tratamento antimicótico. Métodos e ensaios baseados em PCR para detecção específica de antígenos foi desenvolvido por laboratórios de referência, mas não está disponível na grande maioria dos centros médicos da América Latina. O envolvimento pulmonar deve ser confirmado através de exame radiográfico. Técnicas moleculares têm permitido um diagnóstico de alta especificidade e sensibilidade, utilizando-se sondas de DNA. Estas técnicas incluem a identificação molecular do *P. brasiliensis* através da imunohistoquímica e da amplificação do DNA ribossômico pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (ARRUDA *et al.*, 2018).

Microscopicamente, para a confirmação do diagnóstico de PCM, se faz necessário os seguintes critérios: hiperplasia pseudoepiteliomatosa, microabscessos intra-epiteliais, reação granulomatosa composta por células gigantes multinucleadas inflamatórias e um infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear (linfócitos e

plasmócitos), além de neutrófilos; e, principalmente, a presença de estruturas esféricas de parede birrefringente correspondentes a morfologia do fungo *Paracoccidioides* (; CARLI *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2007.). Estas estruturas podem ser observadas em cortes histológicos corados pela Hematoxilina e Eosina, mas são melhor identificadas quando coradas pelo PAS ou pela técnica de Grocott- Gomori (ALMEIDA; JORGE-JÚNIOR; SCULLY, 2003; AZENHA *et al.*, 2012; GIRARDI; SCROFERNECKER, 2016; LOPEZ-MARTINEZ *et al.*, 2014; RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008).

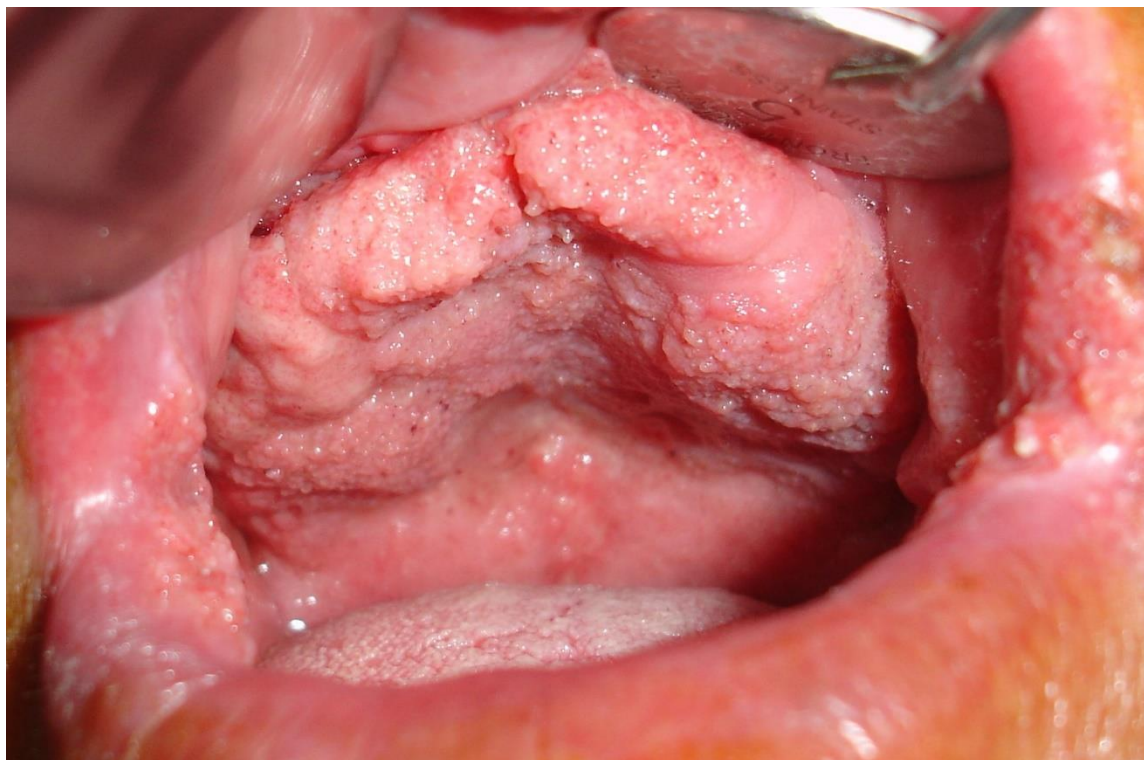
A configuração morfológica da reação granulomatosa também depende da imunidade do hospedeiro. Em indivíduos imunocompetentes, observa-se granulomas epitelioides compactos, bem definidos, com poucos fungos e infecção localizada. Naqueles que apresentam comprometimento imunológico, a inflamação granulomatosa é desorganizada, com grandes números de fungos, granulomas frouxos, mal definidos, com exsudação supurativa e áreas de necrose, e conseqüentemente com disseminação do fungo (FORTES *et al.*, 2011; LOPERA *et al.*, 2011).

A orofaringe pode ser o primeiro local anatômico de manifestações depois dos pulmões e lesões nesta região são comuns. As manifestações clínicas clássicas são: lesões granulares, eritematosas ou ulceradas circundadas por bordas serrilhadas com uma fina borda hemorrágica. A cavidade oral pode estar afetada em um ou vários locais, sendo a gengiva e o palato as regiões de maior prevalência (TRINDADE *et al.*, 2017; WEBBER *et al.*, 2014). A cavidade oral é um ambiente ideal para o crescimento de microrganismos, pois esta apresenta uma temperatura de aproximadamente 37°C, umidade, alta concentração e disponibilidade frequente de nutrientes, condições que favorecem a adesão e a colonização de biofilmes microbianos (MEURMAN; TARKKILA; TIITINEN, 2009).

O comprometimento da cavidade oral com a PCM foi primeiramente descrito por Lutz, em 1908, em dois pacientes que apresentavam linfadenopatia cervical. As lesões orais se caracterizam por uma hiperplasia granular eritematosa, entremeada por pontos hemorrágicos purpúreos e um aspecto superficial rugoso denominado “estomatite moriforme” (ALMEIDA; JORGE-JÚNIOR; SCULLY, 2003; MIGLIARI *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2007) (Figura 1). Nos lábios, leva ao aparecimento de macroqueilia, representada pelo aumento pronunciado na espessura e consistência. Geralmente, as lesões orais

são múltiplas envolvendo os lábios, gengiva, mucosa jugal, palato, língua e assoalho bucal. Apesar de incomum, a PCM pode provocar perfuração do palato duro (ALMEIDA; JORGE-JÚNIOR; SCULLY, 2003).

**Figura 1-** Aspecto clínico característico da paracoccidiodomicose bucal, representado pela estomatite moriforme.



Fonte- Da autora (2022).

O diagnóstico diferencial para a PCM deve incluir o carcinoma de células escamosas, por apresentar um aspecto clínico semelhante e uma associação das duas doenças com álcool e tabaco, além do linfoma, tuberculose, sarcoidose, sífilis, actinomicose cervicofacial, histoplasmose, criptococose e leishmaniose (ABREU E SILVA *et al.*, 2013; ALMEIDA; JORGE-JÚNIOR; SCULLY, 2003; RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008).

Segundo Meurman; Tarkkila; Tiitinen (2009), é importante lembrar que o *P. brasiliensis* possui alta capacidade de invasão tecidual de uma variedade de tecidos e órgãos diferentes, além de seus mecanismos moleculares e celulares. Mendes-Giannini *et al.* (2008) relataram que a adesão dos propágulos infecciosos durante a infecção de células hospedeiras é o primeiro passo para que esse patógeno tenha uma

interatividade com estruturas superficiais que é essencial para sua colonização, invasão e crescimento. Quando o fungo adere e invade as células epiteliais ele deixa de ser reconhecido pelo sistema imunológico, o que pode facilitar sua disseminação pelo corpo sem ser reconhecido. Portanto, células epiteliais e endoteliais podem ser reservatórios do fungo e ficarem protegidas, uma vez que no interior da célula ele não é reconhecido por macrófagos e fica imune à terapia antifúngica. Sendo assim, estes autores avaliaram a interação entre o *P. brasiliensis* e as células epiteliais, enfatizando aderência, indução às alterações citoesqueléticas e diferentes marcadores moleculares superficiais. Não conseguiram elucidar completamente o mecanismo de invasão celular, mas salientaram que é importante entender qual proteína induz à invasão, quais os receptores celulares, a ligação proteínas ao endócito e os mecanismos que governam a invasão fúngica.

Estudos epidemiológicos de pacientes com paracoccidioidomicose indicam que essa doença apresenta uma forte predileção por homens podendo chegar a uma proporção de 11:1. Tal diferença se dá pela defesa hormonal presente em mulheres que é o hormônio beta estradiol. Este hormônio atua impedindo a transformação da forma micelial do fungo *Paracoccidioides* em leveduriforme. Apesar da diferença de predileção entre homens e mulheres, a exposição a este fungo é igual. Por outro lado, a prevalência da doença clínica em pré-púberes ou mulheres pós-menopáusicas é igual a encontrada em homens (SHANKAR *et al.*, 2011).

O tratamento antifúngico dos casos leves e moderados se baseia na administração do Itraconazol ou da combinação do Sulfametoxazol e Trimetropim. Infecções graves e disseminadas podem exigir uso de formulações de Anfotericina B seguida de terapia associada com o Itraconazol ou com Sulfametoxazol e Trimetropim. O tempo de tratamento dos pacientes infectados com a PCM pode variar entre 12 a 24 meses, dependendo da manifestação clínica da doença (RODRIGUES-VENDRAMINI *et al.*, 2019).

## 2.2 Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)

A angiogênese é um processo essencial para a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. É um fenômeno complexo com a participação de inúmeras moléculas e fatores de crescimento que irão estimular e ou inibir esta neovascularização, que se encontra presente tanto em processos fisiológicos como em processos patológicos. A formação de novos vasos sanguíneos é essencial para o transporte de nutrientes aos tecidos e órgãos; entretanto, a neoformação descontrolada de vasos sanguíneos pode promover ou propiciar o desenvolvimento de vários processos patológicos. Em relação aos processos fisiológicos, associados à angiogênese, teremos a ovulação, desenvolvimento do corpo lúteo, embriogênese, crescimento tecidual, desenvolvimento mamário na lactação, inflamação, cicatrização e resposta imune. Além da fisiologia supracitada, a etiologia e a patogênese de muitas doenças estão associadas a uma resposta dos fatores pró e antiangiogênicos persistente que ocorre por um aumento dos mediadores ou deficiência dos inibidores da angiogênese, como por exemplo neoplasias, metástases, psoríase, doenças oculares, entre outras que apresentam alteração deste mecanismo (APTE, CHEN, FERRARA, 2019; POLVERINI, 1995; VALIATTI *et al.*, 2011; VEMPATI; POPEL; GABHANN, 2014).

Este processo angiogênico envolve uma série de etapas sequenciais. A matriz extracelular e a membrana basal ao redor das células endoteliais são degradadas pelas proteases ativadas, permitindo o extravasamento de células endoteliais na matriz circulante. Estas células se proliferam e migram para o meio extracelular. Pela polarização das células endoteliais, em migração, um lúmen é formado dando origem a um vaso sanguíneo imaturo que irá se estabilizar por recrutamento de células murais e geração da matriz extracelular. Este processo angiogênico é controlado por diversos fatores de crescimento endotelial, dentre estes fatores encontra-se o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF). Os vasos alvos dos fatores angiogênicos são os capilares venosos e as vênulas terminais, estes vasos apresentam um pequeno calibre e células endoteliais sobre uma lâmina basal coberta por uma camada descontínua de pericitos e células musculares lisas (HILLEN, GRIFFIOEN, 2007).

Dentre as moléculas pró-angiogênicas endógenas, o VEGF é o principal regulador da formação de vasos sanguíneos em condições de normalidade e em processos patológicos. Inicialmente, o VEGF foi denominado de Fator de Permeabilidade Vascular (VPF) devido à sua capacidade em aumentar a permeabilidade dos vasos sanguíneos. Estudos subsequentes identificaram os efeitos adicionais do VPF nas células endoteliais, passando então a ser denominado VEGF (PEACH *et al.*, 2018).

A expressão do fator de crescimento endotelial vascular é regulada por processos transcricionais e pós-transcricionais, sendo a hipóxia considerada um dos mais importantes estimuladores de expressão do VEGF, hormônios, microRNAs e outros fatores angiogênicos (FATIMA; PAPA, 2010).

O VEGF é constituído por glicoproteínas diméricas que inclui o fator de crescimento placentário (PLGF), VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e VEGF-F. O fator de crescimento endotelial vascular atua direta e seletivamente através dos receptores VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3, que predominantemente são expressos no endotélio vascular. A ligação do VEGF a esses receptores causa influxo de cálcio citoplasmático, elevando sua concentração em até quatro vezes, altera a forma, a divisão e a migração celular. O aumento da permeabilidade das vênulas às macromoléculas permite que proteínas plasmáticas atravessem para o meio extracelular, causando a formação de fibrinogênio e deposição de gel de fibrina que atua como uma importante matriz provisória para o crescimento de novos vasos sanguíneos. Este aumento da permeabilidade microvascular pode preceder ou acompanhar a angiogênese em diversos processos fisiológicos e patológicos. Esta característica torna o VEGF um importante mediador da angiogênese (DIKICI *et al.*, 2020; FÁTIMA; PAPA, 2010; LU *et al.*, 2018; PIRES *et al.*, 2016; VEMPATI; POPEL; GABHANN, 2014).

O VEGF-A tem sido considerado o fator de crescimento endotelial vascular dominante na angiogênese e no desenvolvimento de vários processos patológicos. Este fator apresenta as isoformas VEGF121, VEGF165, VEGF189 e VEGF206. A sinalização deste fator de crescimento endotelial vascular ocorre por meio de seus receptores VEGF R1/ R2 que irão regular as atividades de várias quinases, além de



levar a proliferação celular, migração, sobrevivência e permeabilidade vascular. Também é considerado um estimulante da neurogênese em estudos *in vivo* e *in vitro*, além de desempenhar um papel importante na migração nervosa (APTE, CHEN, FERRARA, 2019; KEIFER-JR, O'CONNOR; BOULIS, 2014).

Estudos sobre o VEGF-B demonstraram que este fator de crescimento também pode servir como fatores de sobrevivência para os neurônios corticais e da retina. Li et al. (2008) relataram que camundongos tratados com o VEGF-B recombinante humano após lesão por esmagamento do nervo óptico aumentam o número de células ganglionares da retina sofrendo apoptose, além de mostrar sobrevivência de neurônios cortical em acidente vascular cerebral (KEIFER-JR; O'CONNOR; BOULIS, 2014).

Da família do VEGF, o VEGF-C e o VEGF-D são glicoproteínas secretadas que exibem uma estrutura homóloga e que podem promover a linfangiogênese e angiogênese através de seus receptores específicos, o VEGF receptor-2 (VEGFR-2) e o VEGF receptor-3 (VEGFR-3). Entretanto, estes fatores de crescimento endotelial apresentam um diferencial quanto a ligação aos seus receptores, mecanismos regulatórios, padrão de expressão durante o desenvolvimento e em tecidos adultos de camundongos, bem como em tumores humanos (STACKER; ACHEN, 2018).

O VEGF-C tem sido considerado o principal fator de crescimento endotelial vascular relacionado à linfangiogênese durante o desenvolvimento embrionário. A alta expressão do VEGF-C em cânceres, também está intimamente ligado à linfangiogênese e está altamente associado a invasão linfática e desenvolvimento de metástases. Níveis séricos de VEGF-C estão associados significativamente com a dislipidemia, um fator importante no desenvolvimento de doenças cardiovasculares (KEIFER-JR; O'CONNOR; BOULIS, 2014; WADA *et al.*, 2020).

O VEGF-D é um mitógeno para as células endoteliais promovendo o crescimento e remodelação de vasos sanguíneos e linfáticos, por esta razão, está diretamente associado a muitos processos patológicos de doenças pulmonares ao câncer. Sua aplicação terapêutica é considerada relevante em várias condições clínicas, por esta razão têm sido realizadas pesquisas no desenvolvimento de reagentes para manipular a sinalização do VEGF-D em doenças que são objetos de programas de ensaios

clínicos em câncer, medicina cardiovascular e indicações oculares (STACKER; ACHEN, 2018).

O VEGF-D atua como um importante modificador no metabolismo das lipoproteínas sendo essencial na atividade hepática. A administração adenoviral do VEGF-D induz angiogênese no miocárdio suíno e está sendo testado para o tratamento de angina refratária em humanos. Estudos observacionais recentes sugerem que os níveis circulantes de VEGF-D estão associados com a incidência da insuficiência cardíaca, fibrilação atrial e isquêmica. Apesar dos níveis de VEGF-D circulante não estarem bem esclarecidos, o seu aumento pode representar uma adaptação às demandas do sistema linfático para remoção do excesso de fluido do espaço extra vascular dos pulmões e tecidos periféricos (WADA *et al.*, 2020).

Quando estes fatores de crescimento (VEGF-C e VEGF-D) se ligam aos seus receptores (VEGFR2/ VEGFR3) de células endoteliais linfáticas, induz a uma cascata de transdução intracelular resultando no bloqueio da apoptose, proliferação e migração celular. Recentemente, estudos demonstraram que em alguns carcinomas, principalmente da região de cabeça e pescoço, os VEGF-C e VEGF-D associados a uma rede linfática são preditores significativos de envolvimento linfonodal e influenciam no prognóstico destes pacientes (KEIFER-JR; O'CONNOR; BOULIS, 2014; STACKER; ACHEN *et al.*, 2018; WADA *et al.*, 2020).

### **2.3 Expressão do Fator de Crescimento Endotelial Vascular em lesões bucais**

O VEGF tem sido usado como marcador imunohistoquímico em muitas patologias orais como as doenças periodontais, melanoma oral primário, sífilis, granuloma piogênico, entre outras. Vasconcelos *et al.* (2016) analisaram a relação da imunoexpressão do VEGF e HIF1  $\alpha$  na doença periodontal e em tecidos gengivais saudáveis. As análises foram feitas em fragmentos de tecido gengival acometidos por periodontite e gengivite e em espécimes de gengiva saudável. Os resultados revelaram uma imunorreatividade nuclear e citoplasmática nas células inflamatórias e endoteliais. Neste estudo, uma alta porcentagem de VEGF em células imunopositivas foi observada em casos de periodontite e gengivite, entretanto, a expressão desta proteína atingiu

níveis mais baixos em locais saudáveis. Os resultados deste estudo sugerem que o VEGF é um fator importante na iniciação e progressão da gengivite para periodontite e que isto se deve a associação do aumento da inflamação e a capacidade de promover a expansão vascular e angiogênese.

Bragado *et al.* (1999) analisaram o aumento da expressão do VEGF em Granulomas Piogênicos. Os resultados demonstraram um padrão definido e semelhante de positividade na expressão do VEGF em todas as amostras testadas. Entretanto, os autores verificaram uma maior expressão do VEGF em áreas constituídas por uma proliferação de células endoteliais dentro do estroma mas sem formação do lúmen capilar enquanto que, em vasos com lúmen bem desenvolvidos, a positividade do VEGF obteve uma menor marcação. O fato que a produção do VEGF parece estar limitada às células endoteliais precursoras ou imaturas antes do completo desenvolvimento dos vasos, leva a possibilidade que o VEGF pode atuar como fator autócrino na estimulação do endotélio vascular.

Simonetti *et al.* (2013) estudaram a correlação entre o prognóstico de melanoma oral primário (POM) através da expressão do VEGF e HIF-1 $\alpha$  e a densidade de microvascularização (MVD). Estes autores observaram que houve um aumento significativo da MVD e uma maior expressão de VEGF e HIF-1  $\alpha$  no endotélio vascular localizado próximo ao *front* de invasão tumoral comparada com as células intratumorais. Os dados do estudo confirmaram a importância destes marcadores em relação a sobrevida dos pacientes com POM, ou seja, verificou-se que aqueles que apresentaram uma imunexpressão mais forte tiveram pior prognóstico.

Pires *et al.* (2016) analisaram os aspectos clínico-patológicos e a expressão imunohistoquímica da molécula de adesão intracelular-1 (ICAM- 1), do VEGF e do CD34 em 15 casos de lesões orais da sífilis secundária. A imunexpressão do VEGF e da ICAM-1 foi observada em células endoteliais e em leucócitos e a microdensidade vascular foi similar nas regiões superficiais e profundas do tecido conjuntivo. Com base nos resultados, os autores sugeriram que processos mediados por ICAM-1 e mecanismos pró-angiogênicos mediados por CD34 e VEGF participam no desenvolvimento e na progressão das lesões orais da sífilis secundária.

## 2.4 Fator de Crescimento Endotelial Vascular e Paracoccidioidomicose

Ferreira *et al.* (2009) analisaram o efeito da irradiação laser de baixa intensidade (Hélio-Neônio) sobre a deposição de matriz extracelular, a expressão de citocinas e a angiogênese em lesões paracoccidioidomycóticas experimentais. Os resultados demonstraram que as lesões que receberam a irradiação expressaram o VEGF nos vasos sanguíneos presentes enquanto que, nas lesões não-tratadas, a expressão do VEGF foi observada apenas numa pequena área no centro das lesões. Os autores sugeriram que, embora a hipóxia seja considerada como um importante fator desencadeador para a transcrição de fatores angiogênicos; a hipóxia severa, prolongada e espalhada pelos tecidos em lesões não-irradiadas foi capaz de impedir o processo de cura destas feridas. Por outro lado, a irradiação laser ao eliminar a hipóxia tecidual estimulou o metabolismo celular aeróbico e acelerou o reparo tecidual.

Pavanelli *et al.* (2011), avaliando a ação do cis-[RU(bpy)<sub>2</sub>(NO)SO<sub>3</sub>](PF<sub>6</sub>) na paracoccidioidomicose experimental, não observaram diferenças significativas no número de células que expressaram o VEGF dentre os animais tratados e controles.

Recentemente, Finato *et al.* (2020) investigaram a interação de três compostos antifibróticos (pentoxifilina, azitromicina e talidomida) associados ao itraconazol ou ao cotrimoxazol em fibrose pulmonar induzida em modelo murino de PCM pulmonar. Foram avaliadas as concentrações pulmonares dos seguintes marcadores: TGF-beta1, CCL3, INF-gama, TNF-alfa, IL-10, VEGF, IL-6, IL-1beta, IL-17 e IL-2 nos homogenados pulmonares. Os resultados reforçaram o papel anti-fibrótico da pentoxifilina na PCM murina quando associada com itraconazol, mas não com o cotrimoxazol, devido a desregulação da inflamação pulmonar. Por outro lado, a azitromicina associada ao cotrimoxazol, mas não ao itraconazol, demonstrou um efeito antifibrótico por induzir uma resposta pró-inflamatória regulada pela IL-10. Além disso, a fibrose pulmonar foi intensificada pela talidomida associada ao itraconazol ou ao cotrimoxazol, devido a inflamação não-regulada e às concentrações elevadas dos mediadores pró-fibróticos CCL3 e VEGF.

Donanzam *et al.* (2020) avaliaram o papel de exoantígenos do *Paracoccidioides spp* (*P. brasiliensis* e *P. lutzii*) na proliferação e produção de citocinas e fatores de

crescimento pelos fibroblastos pulmonares. Cada concentração de exoantígeno induziu diferentes reações nos fibroblastos pulmonares. Porém, os resultados obtidos demonstraram que os exoantígenos induziram uma proliferação significativa de fibroblastos pulmonares murinos e humanos. Todas as concentrações de exoantígenos promoveram diminuição dos níveis de IL-6 e VEGF em fibroblastos murinos. Os autores concluíram que os componentes do *P. brasiliensis* e do *P. lutzii* interferiram na fibrogênese agindo diretamente na biologia dos fibroblastos pulmonares.

Vale ressaltar ainda que, até o momento, não foram encontrados na literatura estudos avaliando a expressão do VEGF em lesões bucais da PCM, justificando assim a realização deste trabalho.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Constituiu-se proposição do presente estudo avaliar a prevalência de lesões bucais da paracoccidiodomicose diagnosticadas no Laboratório de Anatomopatologia Bucal da UNIFAL-MG no período de 1998 a 2020.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Analisar, através da imunohistoquímica, a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) nas lesões bucais da paracoccidiodomicose e comparar a imunoexpressão deste marcador com os aspectos clínicos e microscópicos apresentados por estas lesões.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Questões éticas**

O presente projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Unifal-MG, CAAE 40286520.1.0000.5142 (APÊNDICE A).

### **4.2 Casuística e seleção da amostra**

Foi realizado um levantamento de todas as lesões bucais de paracoccidiodomicose diagnosticadas e arquivadas no Laboratório de Anatomopatologia Bucal da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), no período de 1998 a 2020. Foram coletados, das fichas de solicitações de exames enviadas pelos profissionais ao laboratório, os dados demográficos dos pacientes, como: gênero, idade, cor, profissão, hábitos nocivos relacionados à cavidade bucal (tabagismo e etilismo), a localização da lesão, o aspecto clínico e o respectivo diagnóstico clínico sugerido pelo profissional. O diagnóstico microscópico bem como o número do laudo anatomopatológico também foram registrados (APÊNDICE B).

### **4.3 Análise microscópica qualitativa**

Para a análise microscópica, foram utilizados cortes microscópicos de cinco micrometros ( $\mu\text{m}$ ) de espessura, corados em Hematoxilina e Eosina (HE) e montados em lâminas arquivadas no Laboratório de Anatomopatologia Bucal da Unifal-MG, oriundos de fragmentos de biópsias enviadas ao referido laboratório com finalidade diagnóstica.

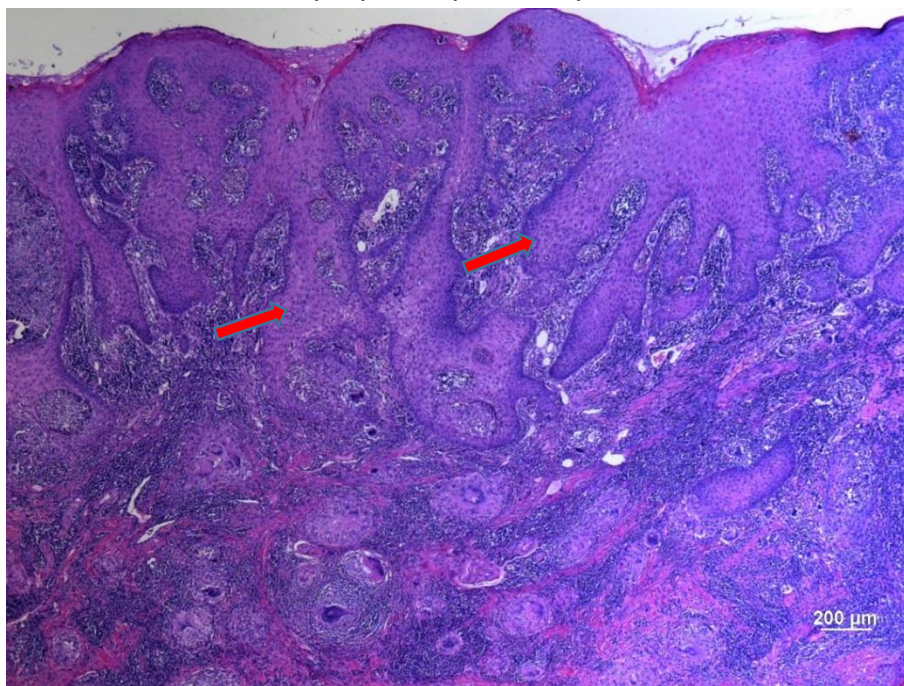
A análise microscópica das lesões foi realizada individualmente por dois examinadores, utilizando-se um microscópio óptico binocular (AxioLab- Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) contendo uma lente objetiva N-Achroplan de 40X/0,65, resultando num aumento final de 400X.

Para a análise microscópica, utilizou-se os seguintes critérios histopatológicos, como proposto por Carli *et al.* (2015); Silva *et al.* (2007):

1. Presença de hiperplasia pseudoepiteliomatosa (Figura 2);
2. Presença de áreas de microabscessos intraepiteliais (Figura 3);
3. Presença de reação granulomatosa constituída por células gigantes multinucleadas inflamatórias (CGMIs) e infiltrado inflamatório contendo células mononucleares e polimorfonucleares (Figura 4);
4. Presença de estruturas esféricas e com a parede celular birrefringente correspondendo ao fungo (Figura 5).

Além destas alterações microscópicas suficientes para o diagnóstico, observou-se também a intensidade e a localização do infiltrado inflamatório, os tipos das células gigantes multinucleadas inflamatórias (Langhans ou corpo estranho) e as diferentes localizações dos fungos (dispersos no tecido conjuntivo, no interior das células gigantes multinucleadas ou nas áreas de microabscessos).

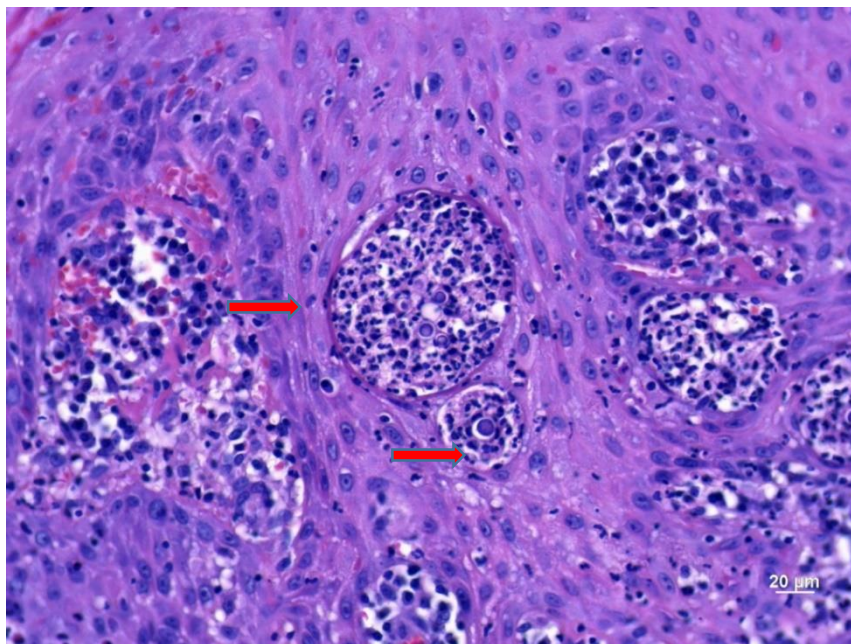
**Figura 2-** Aspectos microscópicos característicos da paracoccidioidomicose, destacando-se uma hiperplasia pseudoepiteliomatosa bem exuberante.



Fonte- Da autora (2022).

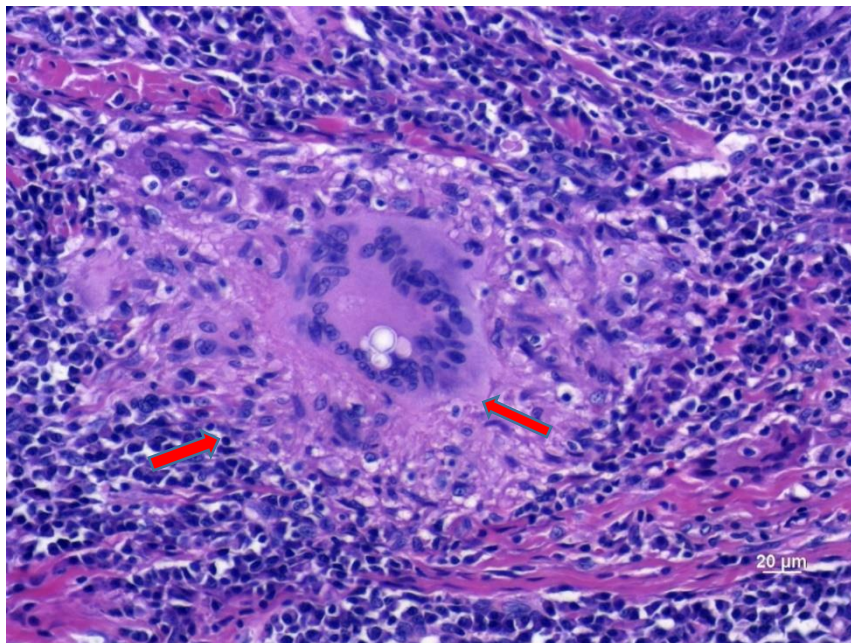


**Figura 3-** Áreas de microabscessos apresentando inúmeras estruturas esféricas com membranas birrefringentes compatíveis com o fungo *Paracoccidioides* spp.



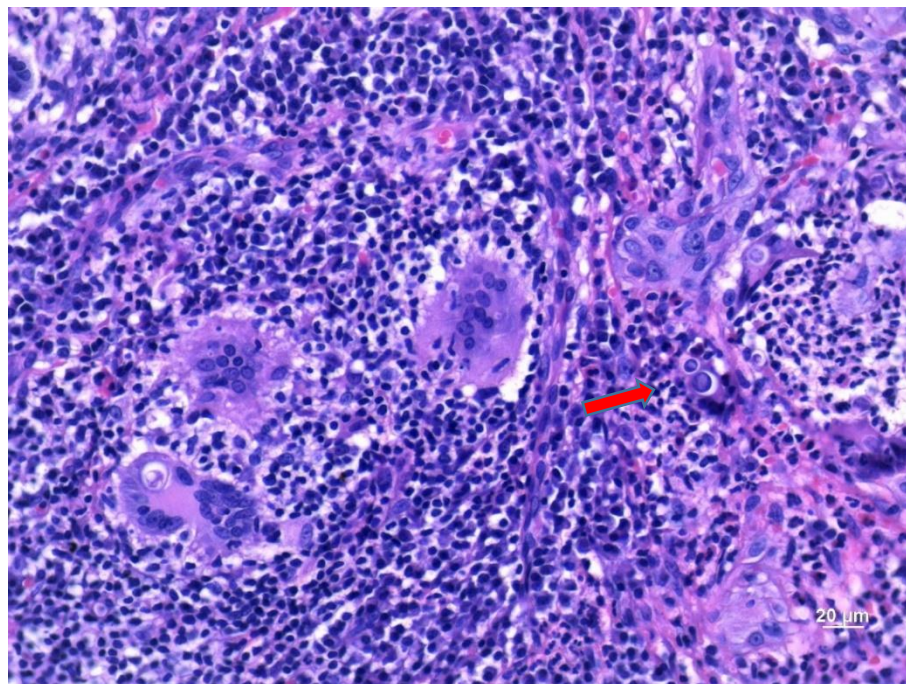
Fonte- Da autora (2022).

**Figura 4-** Granuloma imunogênico constituído por infiltrado mononuclear com predomínio de linfócitos e macrófagos, além de CGMIs do tipo Langhans contendo fungos no seu interior. Nota-se também a presença de fibrosamento periférico.



Fonte- Da autora (2022)

**Figura 5-** Estruturas esféricas com membrana birrefringente compatíveis com o *Paracoccidoides spp* dispersas pelo tecido conjuntivo e no interior de CGMIs.



Fonte- Da autora (2022).

#### 4.4 Reação imunoistoquímica

Foram confeccionados cortes de três micrometros ( $\mu\text{m}$ ) de espessura e colocados em lâminas silanizadas para a reação imunoistoquímica, seguindo-se os protocolos do ANATOMED Instituto de Anatomia Patológica de Bauru-SP.

Os cortes microscópicos foram desparafinados em Xilol realizando-se duas trocas de cinco minutos cada. Em seguida foram hidratados em álcoois em concentrações decrescentes: absoluto; 90%; 70%; 50%; até água corrente e, posteriormente, lavados em água corrente por cinco minutos.

Na próxima etapa, foram colocados 420 mililitros de água destilada na câmara de recuperação da Panela Pascal, a uma temperatura de  $118^{\circ}\text{C}$ , por dois minutos. Aguardou-se chegar à temperatura de  $90^{\circ}\text{C}$  por 10 segundos e retirou-se a pressão restante. Em seguida, abriu-se a tampa da panela e colocou-se a cuba com as lâminas em temperatura ambiente por 20 minutos. Os cortes foram, posteriormente, lavados e mantidos em água destilada até o passo seguinte.

A peroxidase endógena foi inativada utilizando-se o peróxido de hidrogênio a 3% em PBS, por dez minutos, e após este tempo os cortes foram lavados com água destilada. O anticorpo primário VEGF (M7273, clone VG1; Dako, Carpinteria, CA, EUA; diluição 1:150) foi aplicado e os cortes acondicionados em uma câmara umidificada numa geladeira, na temperatura 4°C, e deixadas *overnight*. Depois da incubação com os anticorpos primários, as lâminas foram lavadas com PBS. Após a lavagem, foi aplicado o polímero de ligação (EnViosion Flex HRP. Dako, Carpinteria, CA, EUA) e deixado por 40 minutos em temperatura ambiente. Após o tempo de ação do Envision Flex HRP, as lâminas foram novamente lavadas com PBS, o excesso foi aspirado e aplicado diaminobenzidina (Dako, Glostrup, Dinamarca) como cromogênio por 10 minutos em temperatura ambiente. A contracoloração foi realizada com a Hematoxilina de Harris diluída por dois minutos.

Controles positivo e negativo, através da omissão do anticorpo primário, foram usados em todas as reações. Foram incluídos para comparação cortes de placenta humana.

#### **4.5 Análise da imunoexpressão de VEGF**

A análise da imunoexpressão do VEGF em paracoccidiodomicose foi realizada utilizando-se o software de captura de imagens (AxioVision Rel. 4.8.2- Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) instalado em um microcomputador. Para a aquisição das imagens, utilizou-se uma câmera fotográfica digital (AxioCamMRc 1.4 Mb- Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) acoplada a um microscópio óptico binocular (AxioLabCarl Zeiss, Göttingen, Alemanha) contendo uma lente objetiva N-Achroplan de 40X/0,65; resultando num aumento final de 400X.

A análise imunoistoquímica semiquantitativa foi feita de acordo com Klein et al. (1999) através da determinação de escores. Inicialmente, analisou-se a porcentagem de células marcadas, a saber:

- Escore 0: ausência de marcação;
- Escore 1: até 30% das células marcadas;
- Escore 2: entre 30 e 60% das células marcadas;

- Escore 3: Mais de 60% das células marcadas.

Em seguida, avaliou-se a intensidade da marcação, representada por 0: ausência de marcação; 1: marcação fraca; 2: marcação moderada e 3: marcação forte. Para a determinação dos Escores Finais de marcação, multiplicou-se o escore da porcentagem de células marcadas pela intensidade da marcação, cujos valores variou de 0 a 9. Esta análise foi realizada por dois examinadores independentes, como proposto por Klein et al. (2001).

#### **4.6 Análise estatística**

Os registros das informações demográficas dos pacientes portadores de paracoccidiodomicose bucal e os parâmetros microscópicos foram armazenados em um banco de dados, elaborado em planilha eletrônica do Microsoft Excel. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico para microcomputador SPSS for Windows, versão 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

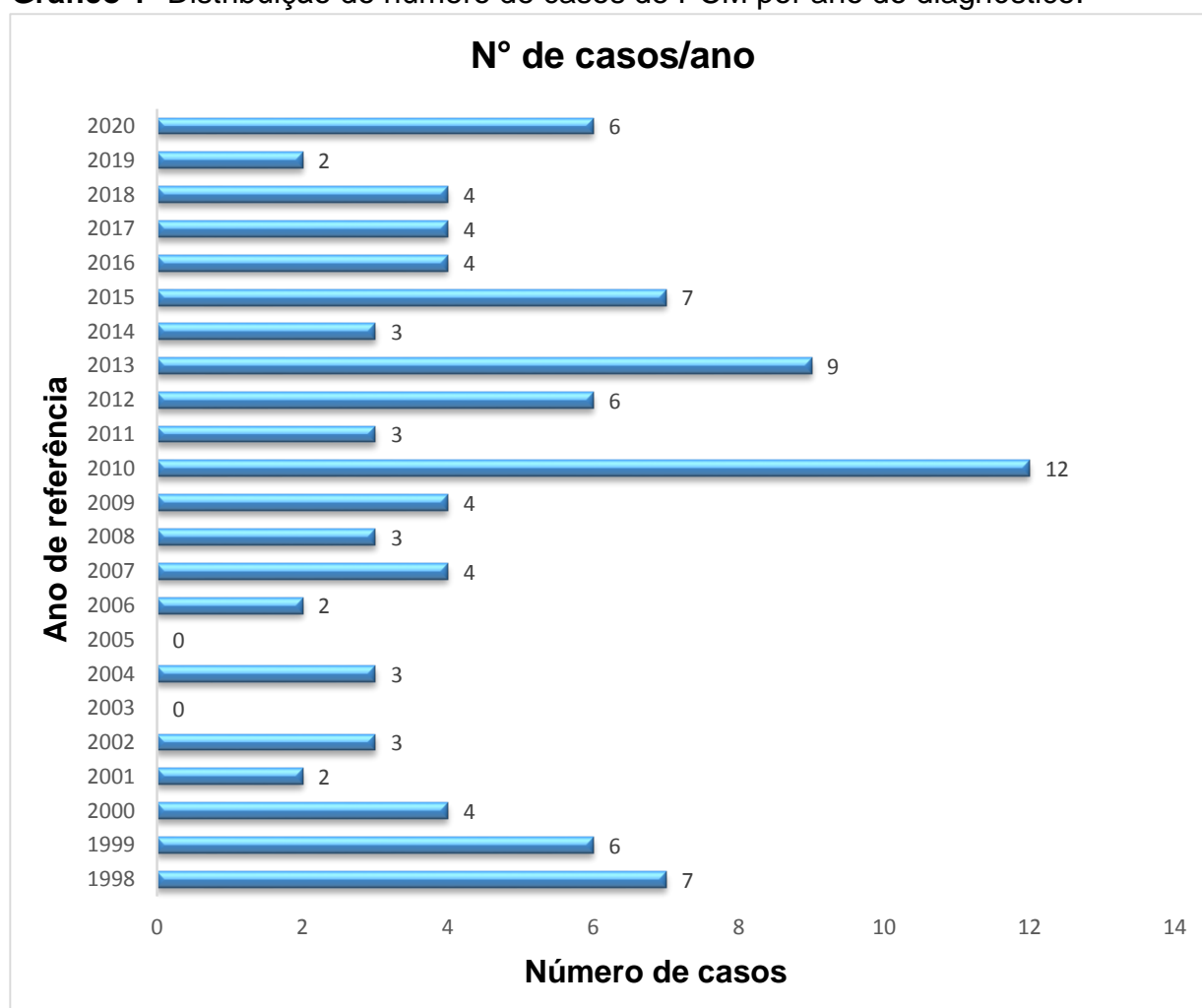
Para se comparar as variáveis categóricas em tabelas de contingência, o teste de frequências do qui-quadrado foi adotado e quando uma frequência esperada foi menor do que 5, aplicou-se o teste exato de Fisher. Considerou-se o nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ) para os testes estatísticos.

## 5 RESULTADOS

De um total de 10.667 laudos anatomopatológicos emitidos, no período de janeiro de 1998 até dezembro de 2020, no Laboratório de Anatomopatologia Bucal da Unifal-MG, foram diagnosticados 98 (0,92%) casos em 98 pacientes com paracoccidiodomicose bucal.

Em relação ao ano do diagnóstico, o maior número de casos ocorreu em 2010 (12 casos), seguido pelos anos de 2013 (9 casos) e 2015 (7 casos). O Gráfico 1 descreve a relação de números de casos por ano do diagnóstico.

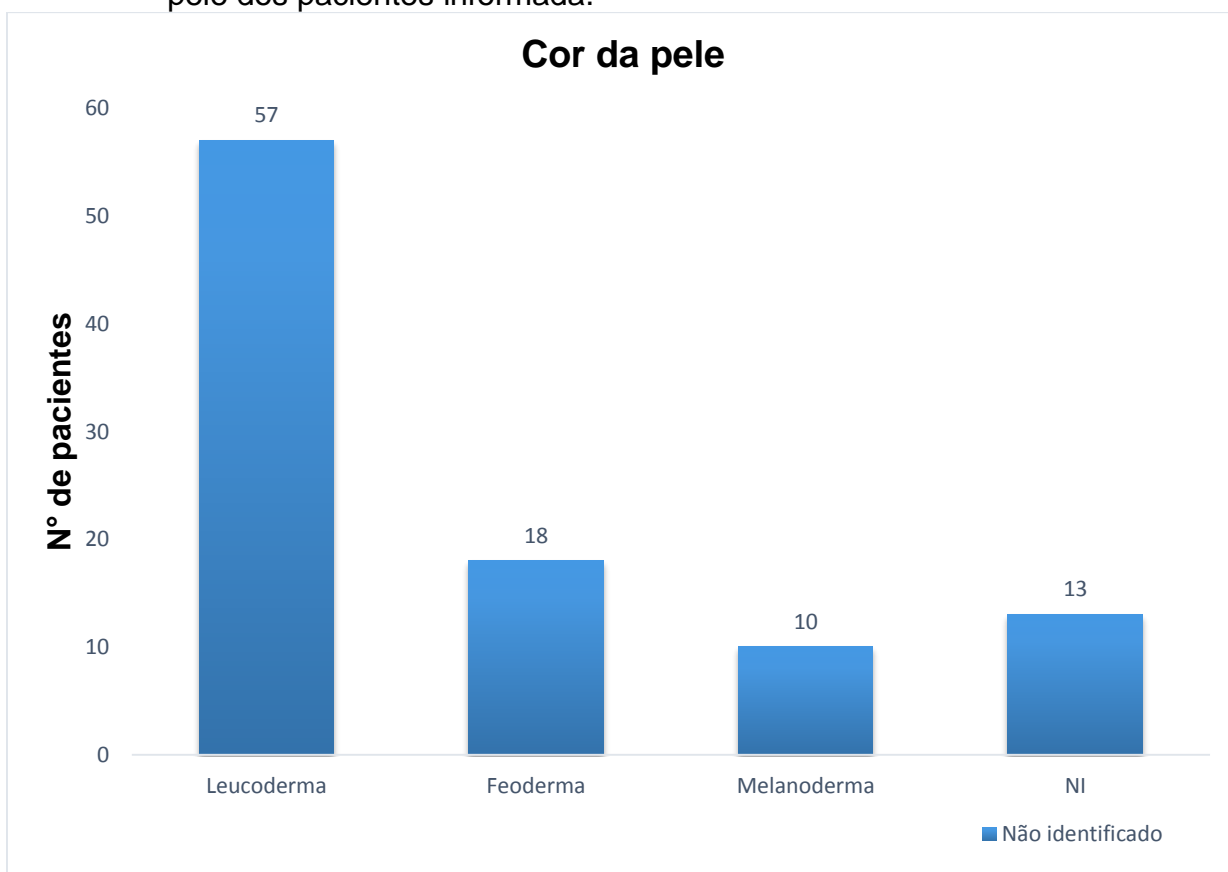
**Gráfico 1-** Distribuição do número de casos de PCM por ano do diagnóstico.



Fonte- Elaborado pela autora (2022).

A paracoccidioidomicose acometeu com maior frequência, 76,5% (75 casos), o gênero masculino e apenas 23,5% (23) dos casos ocorreu em mulheres. Em relação à cor da pele dos pacientes portadores de PCM, 57 (58,2%) eram leucodermas, 18 (18,4%) feodermas, 10 (10,2%) melanodermas e a cor da pele de 13 (13,2%) pacientes não foi informada nas fichas de biópsia, como demonstrado no Gráfico 2.

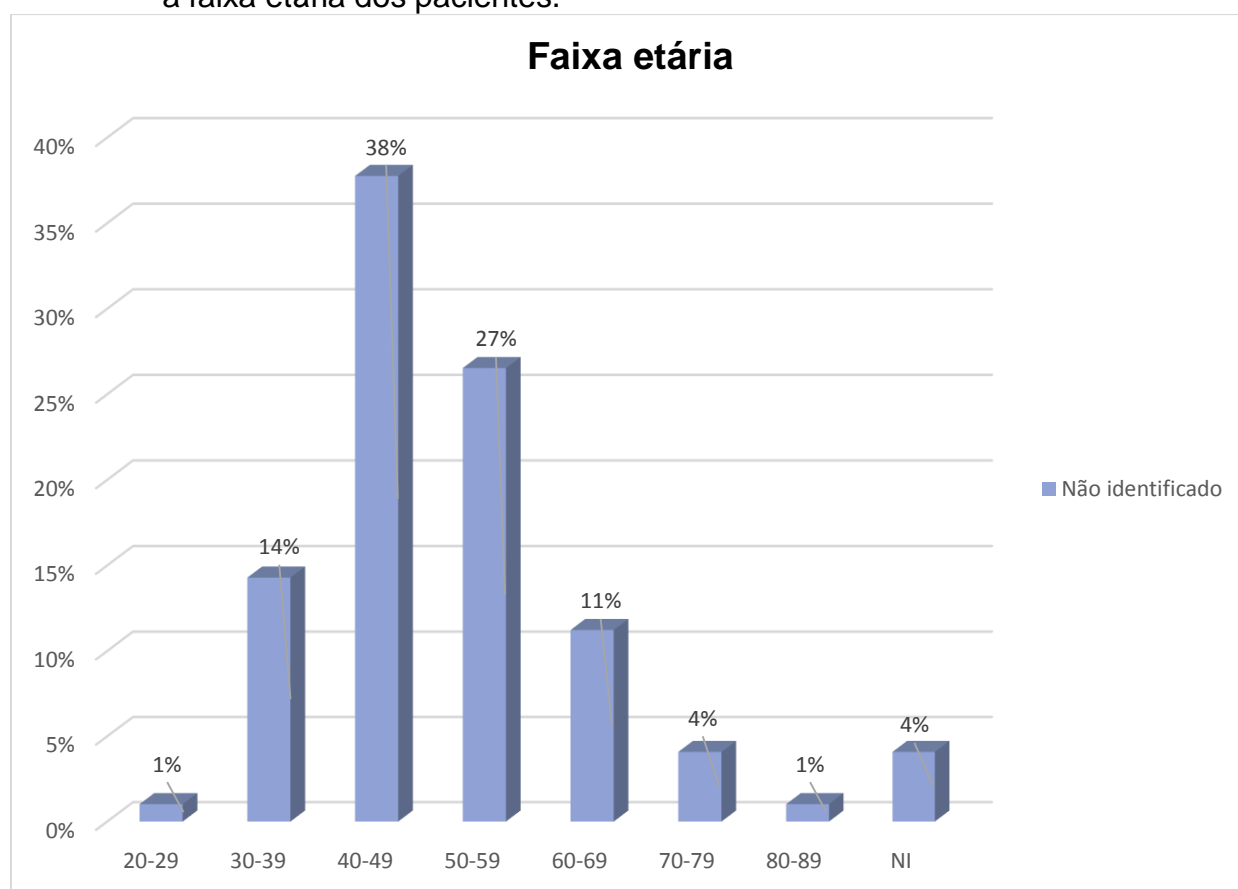
**Gráfico 2-** Distribuição dos casos de paracoccidioidomicose bucal segundo a cor da pele dos pacientes informada.



Fonte- Elaborado pela autora (2022).

A idade dos pacientes diagnosticados com PCM variou de 21 a 80 anos, com uma idade média de 50,2 anos. O maior número de casos foi diagnosticado na quarta e na quinta décadas de vida, conforme descrito no Gráfico 3. Setenta e nove (80%) pacientes apresentavam-se com 40 anos ou mais no momento do diagnóstico. Apenas 15 (16%) casos foram diagnosticados em pacientes com menos de 40 anos e em 4 (4%) fichas não foram relatadas as idades dos pacientes.

**Gráfico 3-** Distribuição do número de casos de paracoccidiodomicose bucal segundo a faixa etária dos pacientes.

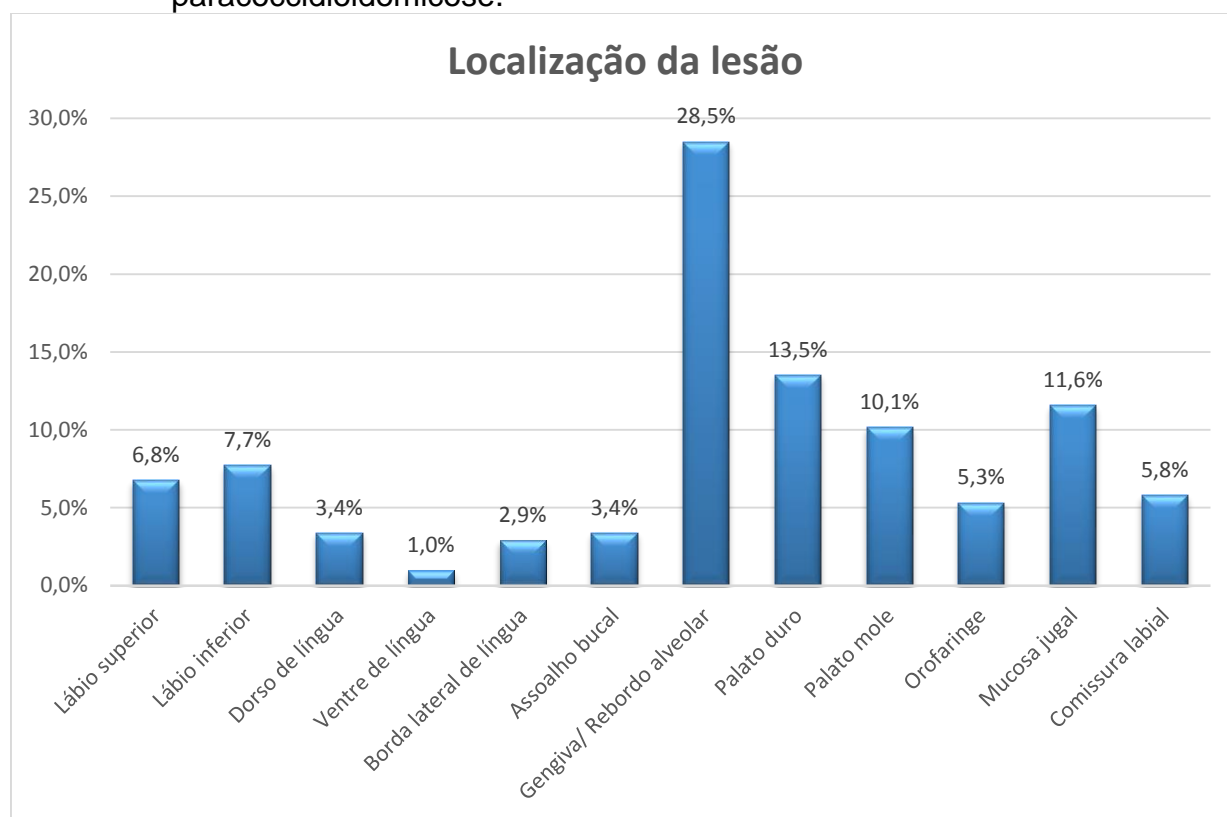


Fonte- Elaborado pela autora (2022).

Quanto aos hábitos nocivos dos pacientes, observamos que na maioria das fichas de biópsias enviadas ao laboratório pelo profissional que realizou a biópsia não constavam informações sobre o consumo de tabaco e álcool. Dos 98 laudos analisados, 13 (13,2%) pacientes relataram ser ou já terem sido fumantes, 7 (7,2%) pacientes relataram ser ou terem sido etilistas e em 80 (80%) fichas dos pacientes não foram relatadas informações sobre os hábitos nocivos.

Em relação à localização, 59 (28,5%) pacientes desenvolveram lesões da paracoccidiodomicose em gengiva e/ou rebordo alveolar. O palato duro foi acometido em 28 casos (13,5%) e a mucosa jugal em 24 casos (11,6%), como ilustrado no Gráfico 4.

**Gráfico 4-** Diferentes localizações acometidas pelas lesões bucais da paracoccidiodomicose.



Fonte- Elaborado pela autora (2022).



Em nossa casuística, as apresentações clínicas relatadas pelos profissionais quando da descrição das lesões de paracoccidiodomicose foram: estomatite moriforme em 89 casos (91%), periodontite associada à estomatite moriforme em três casos (3%) e úlcera vegetante em apenas um caso (1%). Em cinco casos (5%) não foram descritas as apresentações clínicas das lesões.

Foram analisados também os diagnósticos clínicos sugeridos pelos profissionais e registrados nas fichas de biópsias enviadas ao laboratório. Em 67 casos (68,4%), os profissionais indicaram apenas um diagnóstico clínico. Dois diagnósticos clínicos foram sugeridos em 21 casos (21,4%), três foram sugeridos em quatro dos casos (4,1%) e em apenas três casos (3,1%) foram sugeridos quatro diagnósticos clínicos. Em três casos (3,1%) não constava na ficha do paciente o diagnóstico clínico. Os diagnósticos clínicos mais frequentemente sugeridos pelos profissionais que realizaram as biópsias foram paracoccidiodomicose (86,7%) e carcinoma espinocelular (27,5%).

A análise microscópica foi realizada em 83 casos (84,6%), uma vez que 15 casos (15,4%) não apresentavam material suficiente nos blocos de parafina que permitissem a confecção de novas lâminas e algumas lâminas do arquivo se extraviaram ou os cortes não apresentavam áreas representativas da paracoccidiodomicose. Foram também incluídos na amostra apenas os casos que preencheram os critérios diagnósticos como proposto por Silva et al. (2007). Os granulomas, quando presentes, seguiram a classificação de Abreu e Silva et al. (2013) e foram divididos em imunogênicos (densos) e não-imunogênicos (frouxos).

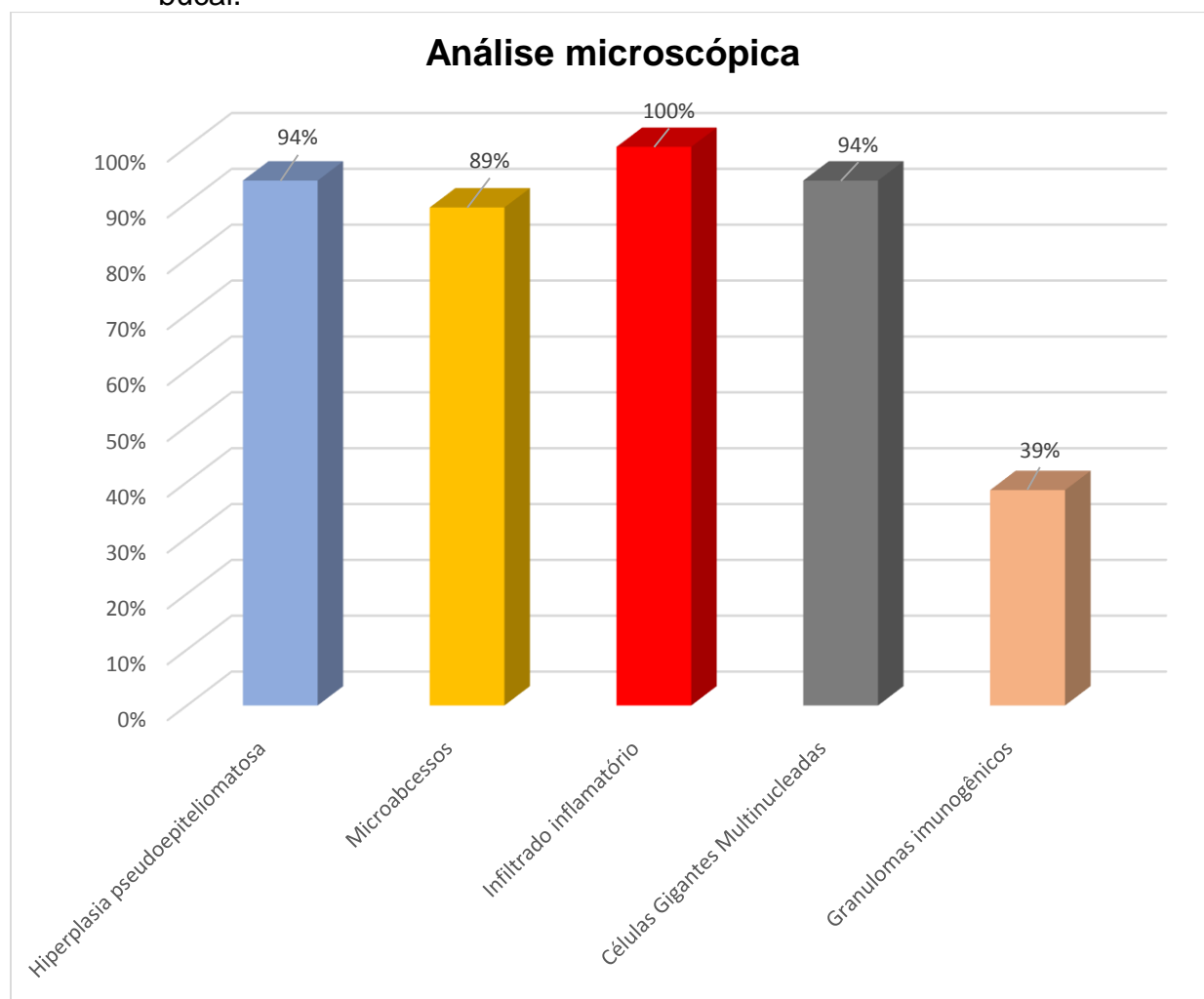
Nos 83 casos analisados, hiperplasia pseudoepiteliomatosa foi observada em 78 casos (94%), microabscessos em 74 casos (89%), infiltrado inflamatório mononuclear em todos os 83 casos (100%), CGMIs em 78 casos (94%) e granulomas imunogênicos em 32 casos (39%) (Gráfico 5). Em relação a intensidade e localização do infiltrado inflamatório, na grande maioria dos casos observou-se que era intenso e se localizava difusamente pelo tecido conjuntivo.

Com relação a localização dos fungos, em 51 casos (61,4%) os fungos foram encontrados nas três localizações, a saber: dispersos pelo tecido conjuntivo, no interior das CGMIs e nas áreas de microabscessos. Fungos dispersos pelo tecido conjuntivo apenas foram observados em 4 casos (4,8%) e, somente no interior das CGMIs,

também foram encontrados em apenas 4 casos (4,8%). Exclusivamente no interior dos microabscessos, foram encontrados somente em 3 casos (3,6%).

Quando presentes em duas localizações simultaneamente, em 13 casos (15,7%) os fungos estavam dispersos pelo conjuntivo e no interior das CGMIs. Seis casos (7,2%) apresentavam fungos dispersos pelo conjuntivo e nos microabscessos e em apenas dois casos (2,4%) no interior das CGMIs e nos microabscessos.

**Gráfico 5-** Alterações microscópicas encontradas nos casos de paracoccidioidomicose bucal.

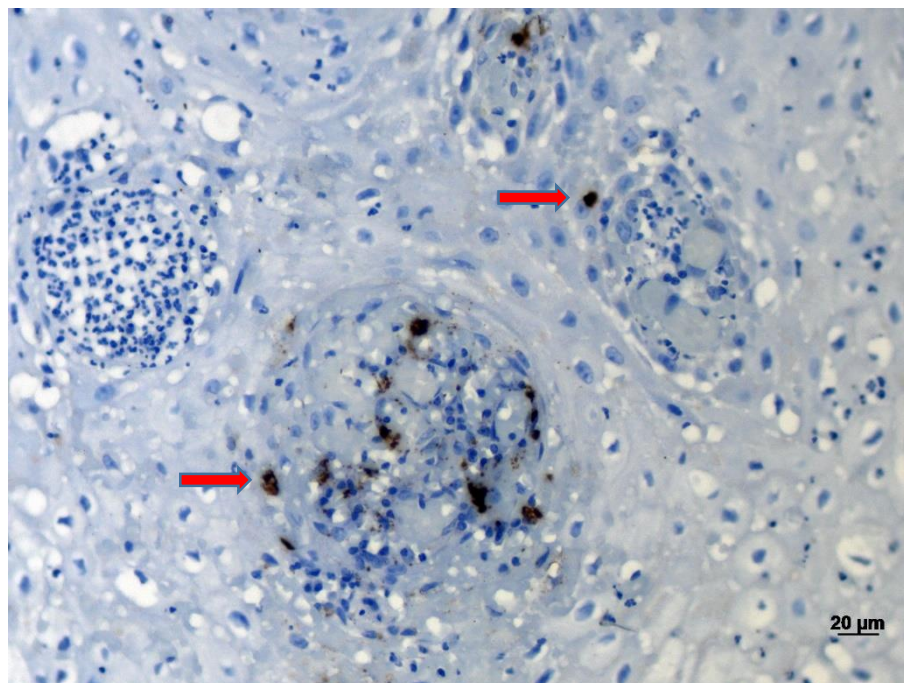


Fonte- Elaborado pela autora (2022).

Para a análise imunohistoquímica, utilizou-se os critérios de inclusão e exclusão como proposto por Klein *et al.* (1999) e Klein *et al.* (2001) através da determinação de escores. Foram selecionados 41 casos, destes apenas 10 casos apresentaram imunopositividade para o anticorpo VEGF, sendo que em sete casos (70%) a marcação apresentava intensidade discreta, em dois casos (20%) a marcação era intensa e, em apenas um caso (10%), a marcação era moderada. Quanto a quantidade de células marcadas, todos os 10 casos apresentavam menos de 30% das células imunomarcadas. Quando se multiplicou os escores obtidos pela intensidade da imunomarcação pelos escores representados pela porcentagem de células imunomarcadas, como sugerido por Klein *et al.* (2001), sete casos (70%) apresentaram escores finais “1”, dois casos (20%) escore “3” e apenas um caso (10%) escore “2”.

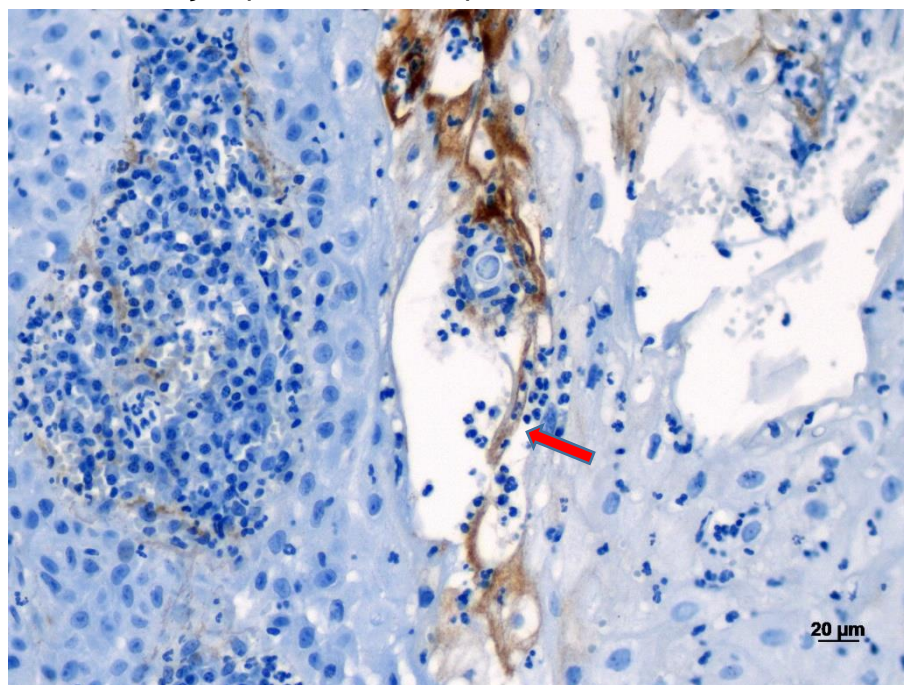
Houve um predomínio de imunomarcação nos macrófagos (Figura 6), na parede vascular (Figura 7) e, de forma mais intensa, nas áreas de pseudomembrana serofibrinosa (Figura 8). Não foram observadas marcações nos fungos *Paracoccidioides brasiliensis* (Figura 9). Além destas marcações verificou-se também imunopositividade no plasma intravascular (Figura 10).

**Figura 6-** Células imunomarcadas pelo VEGF compatíveis com macrófagos.



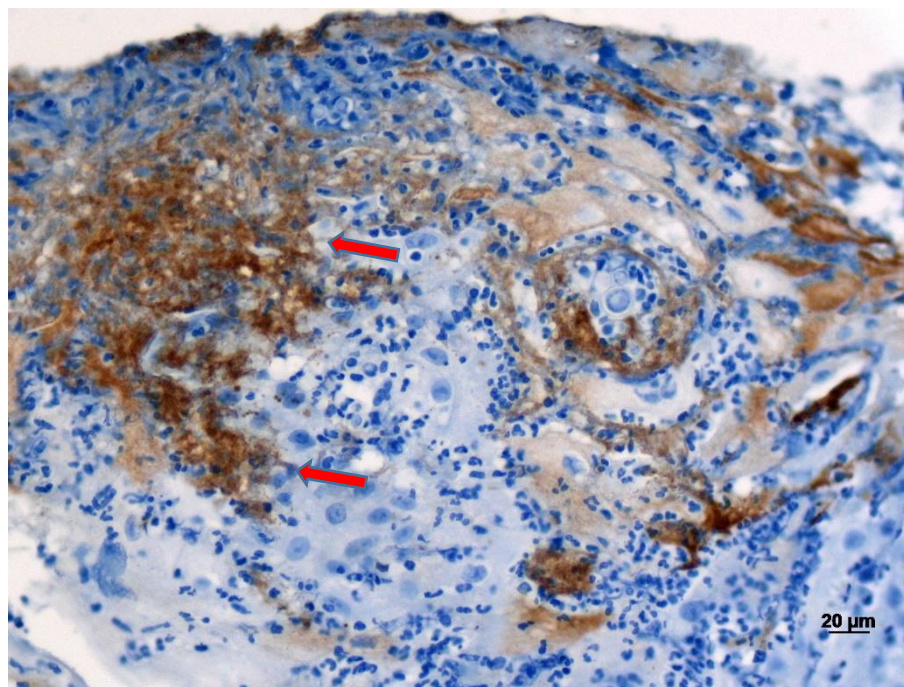
Fonte- Da autora (2022).

**Figura 7-** Imunomarcação pelo VEGF em parede vascular de um vaso neoformado.



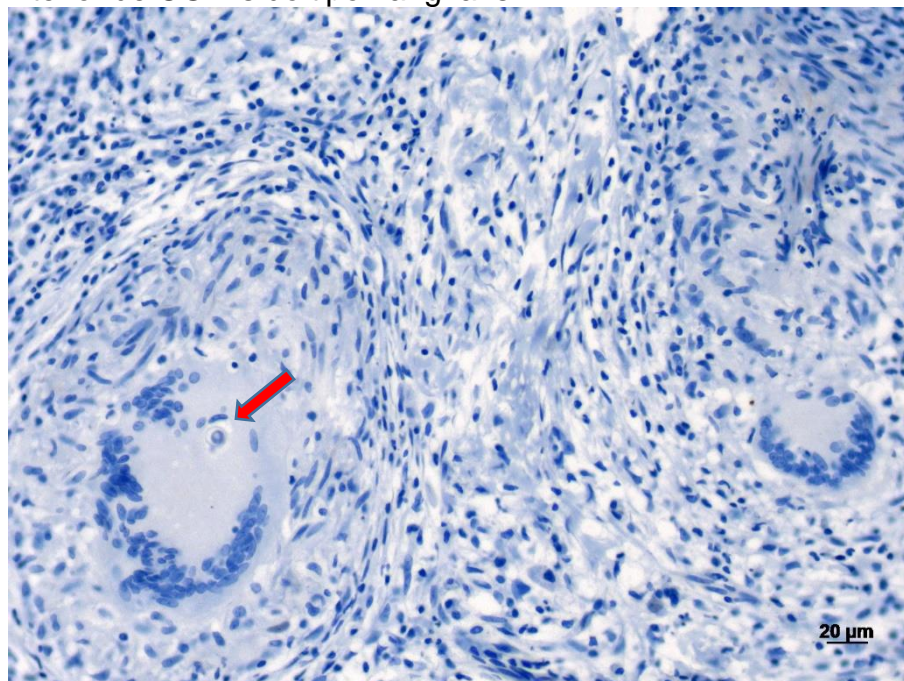
Fonte- Da autora (2022).

**Figura 8-** Imunomarcação pelo VEGF predominantemente em áreas de pseudomembrana serofibrinosa.



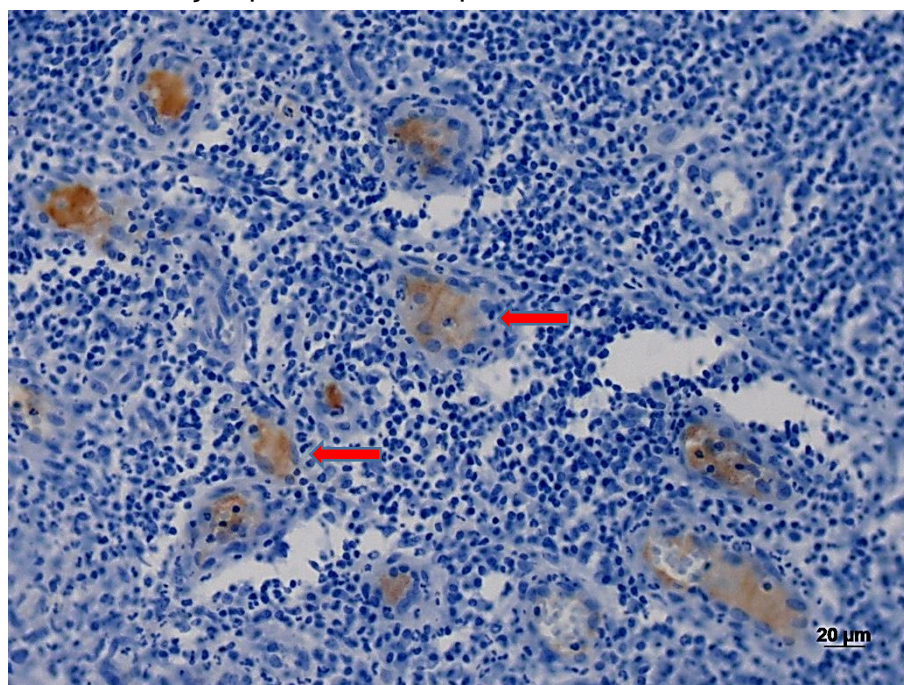
Fonte- Da autora (2022).

**Figura 9-** Ausência de imunomarcção pelo VEGF nos fungos localizados no interior de CGMIs do tipo Langhans



Fonte- Da autora (2022).

**Figura 10-** Imunomarcção pelo VEGF no plasma intravascular.



Fonte- Da autora (2022).

Quando se realizou as correlações entre as variáveis clínicas (idade, gênero, cor, localização e aspectos clínicos das lesões) e as variáveis microscópicas, não foi observada significância estatística. Também não foi possível correlacionar a imunexpressão do VEGF com as variáveis clínicas e microscópicas tendo em vista que apenas 10 casos apresentaram imunopositividade, inviabilizando as análises estatísticas.

## 6 DISCUSSÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica, relacionada às atividades agrícolas, com incidência e prevalência subestimadas, pela ausência de notificação em várias Unidades da Federação (UFs). A evolução insidiosa do quadro clínico pode ter como consequência sequelas graves se o diagnóstico e o tratamento não forem instituídos precoce e adequadamente (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2018). Esta condição é endêmica e limitada à América Latina. O Brasil é responsável por mais de 80% dos casos diagnosticados no mundo e as regiões de maior prevalência são a Sudeste, Centro-Oeste e Sul (MAGALHÃES *et al.*, 2014).

Esta doença é causada por fungos termodimórficos de duas principais espécies: *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*. O *P. brasiliensis* é composto por um complexo de pelo menos cinco agrupamentos geneticamente isolados, classificados como espécies filogenéticas: S1a, S1b, PS2, PS3 e PS4. As espécies filogenéticas S1a e S1b são predominantemente encontradas na América do Sul, especialmente nas regiões Sudeste e Sul do Brasil, na Argentina e no Paraguai. A espécie PS2 tem uma distribuição irregular, menos frequentemente identificada e, até agora, os casos humanos foram identificados na Venezuela e na região Sudeste do Brasil. As espécies PS3 e PS4 são exclusivamente endêmicas na Colômbia e Venezuela, respectivamente. Por sua vez, o *P. lutzii* abriga uma única espécie, predominantemente distribuída na região Centro-Oeste do Brasil e na região Amazônica (Brasil e Equador). A incidência real de cada espécie filogenética e sua implicação na prática clínica é difícil de se estabelecer, devido a falta de estudos comparando as formas da PCM e as manifestações clínicas com o perfil genético destas entidades (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2018).

Visto que a PCM não é uma doença de notificação compulsória, ainda não há dados precisos sobre sua incidência no Brasil (MENDES *et al.*, 2017). As estimativas sobre a sua prevalência, incidência e morbidade se baseiam em relatos de inquéritos epidemiológicos, relatos de casos, prontuários de hospitais e dados de mortalidade. Com base nos relatos de experiências de serviços de referência em tratamento de pacientes portadores de PCM, a incidência da doença em áreas endêmicas varia de

três a quatro casos por milhão de habitantes ao ano (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017). Sendo assim, estudos epidemiológicos são de grande importância para se entender a real prevalência desta condição patológica.

Ao longo dos últimos anos, o Laboratório de Anatomopatologia Bucal da Universidade Federal de Alfenas tem se tornado referência no diagnóstico da paracoccidiodomicose, sobretudo de pacientes que apresentam lesões em mucosa bucal. Neste estudo nós analisamos a prevalência de lesões bucais da PCM diagnosticadas no período de 1998 a 2020. Em todos os casos, os pacientes apresentaram lesões mucosas de PCM, onde as manifestações estomatológicas foram o motivo da primeira consulta, como definido por Verli *et al.* (2005). Os resultados revelaram que, de um total 10.667 laudos anatomopatológicos emitidos neste período, foram diagnosticados 98 (0,92%) casos de paracoccidiodomicose bucal, resultado semelhante (0,65%) ao observado por Brazão-silva *et al.* (2010). Em outro recente estudo multicêntrico colaborativo conduzido por Arruda *et al.* (2018), os 320 casos diagnosticados como PCM representavam apenas 0,3% do total de lesões orais e maxilofaciais. Isto se deve provavelmente ao fato dos centros de diagnóstico que forneceram casos para o estudo estarem situados em diferentes regiões do país.

Em relação ao ano do diagnóstico, o maior número de casos ocorreu em 2010 (12 casos), seguido pelos anos de 2013 (9 casos) e 2015 (7 casos). Esta tendência de redução do número de casos nos anos mais recentes pode ser explicada pela grave escassez hídrica que tem ocorrido na região Sul e Sudoeste do Estado de Minas Gerais. Além disso, como já demonstrado na literatura, o uso excessivo e indiscriminado de agrotóxicos nas lavouras pode também estar causando a redução do número de fungos na natureza (BARROZO *et al.*, 2010; ONO *et al.*, 2002).

Várias classificações das formas clínicas da PCM têm sido propostas ao longo dos anos, baseando-se em diferentes critérios como: topografia das lesões, história natural da doença, severidade da apresentação clínica e resultados de exames sorológicos. A classificação mais aceita atualmente é a que foi apresentada no Colóquio Internacional sobre Paracoccidiodomicose, que ocorreu em fevereiro de 1986, em Medellín, Colômbia. De acordo com esta classificação, a PCM se divide em: 1. Paracoccidiodomicose Infecção e 2. Paracoccidiodomicose Doença. Esta última se



subdivide nas formas aguda/subaguda (juvenil) e crônica (do adulto). Há ainda a forma residual ou sequelar (BRAGA *et al.*, 2017; FORTES *et al.*, 2011; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017). O período de incubação da forma crônica é incerto, mas a doença provavelmente se manifesta clinicamente muitos anos após a exposição ao *Paracoccidioides spp* (MARTINEZ, 2017).

A maioria dos casos de PCM (74 a 96%) são da forma crônica da doença, os quais se manifestam preferencialmente em adultos, com idades entre 30 e 60 anos, e em maior proporção no gênero masculino (ABREU-E-SILVA *et al.*, 2013; AZENHA *et al.*, 2012; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017). A PCM crônica apresenta uma evolução clínica prolongada e um início lento e gradual. Pode ser unifocal, acometendo apenas um único órgão ou sistema, ou multifocal quando afetar mais de um sítio (pele, mucosa, pulmões, glândulas adrenais e linfonodos) (ABREU-E-SILVA *et al.*, 2013). Os sintomas frequentemente persistem por quatro a seis meses, podendo persistir por até um ano. Em alguns casos, a PCM crônica se desenvolve de forma assintomática e os casos são diagnosticados quando exames de imagem ou laboratoriais são solicitados por outra razão. Em 90% dos pacientes há envolvimento pulmonar (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017). Vale destacar que no nosso estudo todos os pacientes eram portadores da forma crônica da PCM.

Quanto aos aspectos demográficos, verificou-se que em nossa casuística houve um predomínio de pacientes do gênero masculino (76,5%), leucodermas (58,2%), com idades variando entre 21 e 80 anos e com uma idade média de 50,2 anos. Além disso, observou-se que o maior número de casos foi diagnosticado na quarta e quinta décadas de vida e apenas 16% dos pacientes apresentavam menos de 40 anos no momento do diagnóstico. Estes resultados são semelhantes aos relatados por Arruda *et al.* (2018), que encontram um predomínio de pacientes do gênero masculino (93,4%) e com uma média de idade de 51,3 anos. A faixa etária mais acometida pela PCM situava-se entre a quinta e sexta décadas de vida. Brazão-silva *et al.* (2010) também verificaram um predomínio de pacientes na quarta a sexta décadas de vida, com uma média de idade de 45,2 anos, bem como uma grande predileção para o gênero masculino (relação masculino/ feminino de 15,5:1). Vale ressaltar que nestes dois estudos foram incluídos pacientes com menos de 20 anos de idade, provavelmente com diagnóstico de PCM

juvenil, diferindo da nossa casuística que incluiu apenas pacientes com a forma crônica da PCM. No estudo de Bicalho *et al.* (2001), os resultados demonstraram um predomínio mais acentuado de acometimento do gênero masculino (relação de 30:1) e uma idade média um pouco inferior (40 anos).

Esta marcante predileção da PCM crônica para o gênero masculino se deve, principalmente, à ausência do hormônio feminino estrógeno, que impede a conversão do fungo na forma de micélio para a de levedura, que é a forma patogênica; fenômeno este já bem estabelecido na literatura (ARISTIZABAL *et al.*, 1998; LOOSE *et al.*, 1983; RESTREPO *et al.*, 1984; SALAZAR; RESTREPO; STEVENS, 1988;). O estrógeno e a progesterona são hormônios que podem atuar na resposta imune e contribuir para a involução de algumas doenças infecciosas tropicais, tais como a amebíase, a leishmaniose e a PCM (BERNIN; LOTTER, 2014). Em recente estudo desenvolvido por nosso grupo avaliando a expressão dos receptores de estrógeno e progesterona em lesões bucais da PCM, os resultados revelaram que o receptor de estrógeno foi expresso somente em mulheres e apresentou uma correlação positiva com a quantidade de fungos nos tecidos. Os autores sugerem que, além do efeito protetor desempenhado pelo estrógeno em mulheres, impedindo a transformação da forma de micélio em levedura, este hormônio pode também influenciar a resposta imune do hospedeiro através da polarização Th1 e Th2 (CAIXETA *et al.*, 2018).

Alguns estudos têm demonstrado uma predileção da PCM em pacientes leucodermas. Dos 62 pacientes portadores de lesões bucais da PCM incluídos no estudo de Bicalho *et al.* (2001), 53 eram leucodermas e apenas 9 eram de cor parda. Entretanto, estes autores afirmam que o alto índice de miscigenação encontrado na população brasileira prejudica o desenvolvimento de análises sobre o envolvimento racial.

Lesões bucais são encontradas numa porcentagem geralmente acima de 80% dos pacientes portadores de PCM e, na maioria dos casos, estas lesões representam o primeiro sinal e/ou sintoma que motiva o paciente a procurar um profissional da área de saúde (BRAZÃO-SILVA *et al.*, 2010). As lesões bucais são tipicamente caracterizadas pela estomatite moriforme, pelo envolvimento periodontal e, eventualmente, pela presença de lesões vegetantes e útero-vegetantes (SILVA *et al.*,

2007). Outro aspecto frequentemente observado nos pacientes portadores de PCM oral é a macroqueilia (RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008). Importante destacar que a maioria dos casos de PCM é diagnosticada quando há o envolvimento da mucosa bucal, pois a doença é assintomática quando ainda está restrita aos pulmões (FORTES *et al.*, 2011). Todos os casos incluídos neste estudo foram diagnosticados através da análise microscópica de fragmentos de biópsias incisoriais de lesões bucais.

O envolvimento da mucosa bucal pela PCM é geralmente multifocal, ou seja, diferentes regiões podem ser acometidas simultaneamente (VERLI *et al.*, 2005). As regiões de maior prevalência são a gengiva/rebordo alveolar, seguidas pelas mucosas labial e jugal, língua e assoalho bucal (ARRUDA *et al.*, 2018; AZENHA *et al.*, 2012; BICALHO *et al.*, 2001; BRAZÃO-SILVA *et al.*, 2010). Em nossa casuística, observamos um predomínio marcante de acometimento da gengiva/ rebordo alveolar, seguido pelo envolvimento de palato duro e mucosa jugal. Quanto às apresentações clínicas da PCM bucal relatadas pelos profissionais contidas nas fichas de biópsias, estomatite moriforme foi a principal apresentação clínica informada.

As lesões bucais em todas as formas de PCM são microscopicamente caracterizadas pela formação de granulomas com células gigantes multinucleadas inflamatórias e macrófagos epitelioides, além de linfócitos, plasmócitos e neutrófilos (ABREU-E-SILVA *et al.*, 2013a; KAMINAGAKURA *et al.*, 2007). O tecido epitelial de revestimento apresenta uma superfície ulcerada assim como uma hiperplasia pseudoepiteliomatosa. Fungos geralmente são encontrados no interior de CGMIs, dispersos pelo tecido conjuntivo ou nas áreas de microabscessos. Os granulomas podem ser densos ou frouxos. Granulomas densos se caracterizam por células epitelioides densamente agregadas contendo fungos no seu interior e representam as formas mais localizadas da doença. Granulomas frouxos apresentam maior quantidade de exsudato inflamatório, edema e necrose assim como número mais elevado de fungos e são característicos das formas mais severas da doença (ABREU-E-SILVA *et al.*, 2013a; ABREU-E-SILVA *et al.*, 2013b; CARLI *et al.*, 2016; PEDREIRA *et al.*, 2016). Em nosso estudo, os aspectos microscópicos observados estão de acordo com o que vem sendo demonstrado ao longo dos anos na literatura e, em especial, pelos trabalhos

prévios publicados pelo nosso grupo (CARLI *et al.*, 2015; CARLI *et al.*, 2016; CAIXETA *et al.*, 2018; PEDREIRA *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2007).

O VEGF é considerado o principal fator de crescimento endotelial vascular expresso no processo de angiogênese, tanto em condições fisiológicas, quanto em condições patológicas (PEACH *et al.*, 2018). A angiogênese está presente em várias atividades do organismo como o crescimento tecidual, a inflamação, a cicatrização e a resposta imune, além de estar envolvida na etiopatogênese de diversas doenças (VALIATTI *et al.*, 2011; VEMPATI; POPEL; GABHANN, 2014). Com relação às lesões bucais, Vasconcelos *et al.* (2016) observaram uma imunoreatividade nuclear e citoplasmática nas células inflamatórias e endoteliais na doença periodontal, sugerindo que o VEGF está associado ao aumento da inflamação, à capacidade de promover vasodilatação e a angiogênese. Em nosso estudo foi observado um predomínio de imunomarcação pelo VEGF em células inflamatórias compatíveis com macrófagos e uma expressão no plasma intravascular. Bragado *et al.* (1999), verificaram uma maior expressão do VEGF em células endoteliais imaturas, concluindo que o VEGF pode atuar como um fator autócrino na estimulação do endotélio vascular.

Até o momento, não encontramos na literatura estudos que avaliaram a expressão do VEGF em lesões bucais da PCM. Apenas três estudos analisaram a imunexpressão deste marcador em lesões pulmonares de PCM experimental (DONANZAM *et al.*, 2020; FINATO *et al.*, 2020; PAVANELLI *et al.*, 2011). Ferreira *et al.* (2009) também analisaram a expressão de VEGF na cicatrização de feridas induzidas pela PCM experimental em patas de camundongos. Os resultados deste estudo demonstraram uma forte expressão do VEGF nas paredes vasculares dos tecidos irradiados com laserterapia de baixa potência, quando comparada com os tecidos não irradiados. Estes autores concluíram que a fotobiomodulação foi eficiente para minimizar os efeitos locais causados pelo *Paracoccidioides brasiliensis*, acelerando o processo de cicatrização da ferida e, conseqüentemente, reduzindo o desconforto e a dor do paciente. Nosso grupo demonstrou pela primeira vez na literatura a eficácia da terapia fotodinâmica como adjuvante no tratamento das lesões bucais da PCM, por reduzir significativamente a morbidade e melhorar a qualidade de vida dos pacientes (SANTOS *et al.*, 2017).

Em nosso estudo não foi possível correlacionar a imunexpressão do VEGF em lesões bucais da PCM com os aspectos clínicos e microscópicos. Sendo assim, mais estudos devem ser realizados utilizando outros marcadores da angiogênese, como o CD31 e o CD34, para entender melhor este processo e as diferentes manifestações clínicas da doença. O entendimento da ação do VEGF nos tecidos da mucosa bucal afetados pela PCM poderia levar ao desenvolvimento de novos fármacos que potencialmente atuariam acelerando o processo de reparo das lesões bucais, reduzindo as sequelas da doença, em especial as localizadas em mucosa bucal.

## 7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados, podemos concluir que a paracoccidioidomicose em mucosa bucal é uma condição patológica relativamente incomum. Acomete preferencialmente homens, na faixa etária de 40 a 60 anos de idade, leucodermas, e se localiza com maior prevalência na gengiva e rebordo alveolar. Microscopicamente, caracteriza-se pela presença de um intenso infiltrado inflamatório mononuclear e de células gigantes multinucleadas inflamatórias dispersas pelo tecido conjuntivo. Hiperplasia pseudoepiteliomatosa e áreas de microabscessos são frequentes, assim como a formação de granulomas imunogênicos.

Os fungos *Paracoccidioides brasiliensis* podem ser encontrados dispersos pelo tecido conjuntivo, no interior de células gigantes multinucleadas e nas áreas de microabscessos. Em nossa amostra a imunoexpressão do fator de crescimento endotelial vascular foi discreta e observada em um número reduzido de casos.

Observou-se um predomínio de imunomarcagem em macrófagos, uma discreta marcação na parede vascular e plasma intravascular e, de forma mais intensa, em áreas de pseudomembrana serofibrinosa. Não foram observadas marcações nos fungos *Paracoccidioides spp.*

## REFERÊNCIAS

ABREU-SILVA, M.A. *et al.* Interrelationship of clinical, histomorphometric and immunohistochemical features of oral lesions in chronic paracoccidioidomycosis. **J Oral Pathol Med**, Nova Jersey, EUA, v. 42, p. 235-242, 2013. doi:10.1111/jop.12018

ABREU-SILVA, M.A. *et al.* Important aspects of oral paracoccidioidomycosis-a literature review. **Mycoses**, Nova Jersey, EUA, v. 56, p. 189-199, 2013. doi:10.1111/myc.12017

ALMEIDA, O.P, JORGE-JÚNIOR, J, SCULLY, C. Paracoccidioidomycosis of the mouth: an emerging deep mycosis. **Crit Rev Oral Biol Med**, S.I, v.14, p.377-83, 2003. doi: 10.1177/154411130301400508

APTE, R.S, CHEN, D.S, FERRARA, N. VEGF in signaling and disease: beyond discovery and development. **Cell**, S.I, v.176, p.1248-64, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.021>

ARRUDA, J.A.A. *et al.* Multicentre study of oral paracoccidioidomycosis: Analysis of 320 cases and literature review. **Oral Diseases**, Oxford, Inglaterra, v.24, p.1492-1502, 2018. doi: 10.1111/odi.12925

AZENHA, M.R, CALIENTO, R, BRENTAGANI, L.G, LACERDA, A.S. Retrospective study of oral manifestations in patients with paracoccidioidomycosis. **Braz Dent J**, São Paulo, Brasil, v. 23, p. 753-757, 2012. doi:

ARISTIZABAL, B.H, CLEMONS, K.V, STEVENS, D.A, RESTREPO, A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. **Infect. Immun**, San Jose, Califórnia, v. 66, p. 5587-91, 1998. doi

BARROZO, L.V. *et al.* First description of a cluster of acute/subacute paracoccidioidomycosis cases and its association with a climatic anomaly. **Plos Negl Trop Dis**, São Paulo, Brasil, v.4, p.643, 2010. doi:10.1371/journal.pntd.0000643

BELLÍSSIMO-RODRIGUES, F, MACHADO, A.A, MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycosis epidemiological features of a 1000-cases series from a hyperendemic area on the South east of Brazil. **Am J Trop Med**, S.I, v.85, p.546-550, 2011. doi:10.4269/ajtmh.2011.11-0084

BERNIN, H, LOTTER, H. Sex bias in the outcome of human tropical infectious diseases: influence of steroid hormones. **J Infect Dis**, Oxford, Inglaterra, v.209, p.107-113, 2014. doi:10.1093/infdis/jit610

BICALHO, R.N. *et al.* Oral paracoccidioidomycosis: a retrospective study of 62 Brazilian patients. **Oral Diseases**, {Oxford, Inglaterra, v. 7, p. 56-60, 2001. doi:

BOCCA, A.L. *et al.* Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. **Future Microbiol**, S.I, v. 8, p. 1177-1191, 2013.doi: 10.2217/fmb.13.68

BORBA, C.M, VINHAS, E.A.L, LOPES-BEZERRA, L.M, SILVA, N.L. Morphological, biochemical and molecular approaches for comparing typical and atypical *Paracoccidioides brasiliensis* strains. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Delft, Holanda, v.88, p.257-66, 2005.doi: 10.1007/s10482-005-8154-7

BRAGA, F.G. *et al.* Functional and phenotypic evaluation of eosinophils from patients with the acute form of paracoccidioidomycosis. **Plos Negl Trop Dis**, São Paulo, Brasil, v.11, p.1-17, 2017.doi: 10.1371/journal.pntd.0005601

BRAGADO, R. *et al.* Increased expression of vascular endothelial growth factor in pyogenic granulomas. **Acta Derm Venereol**, Escandinavia, Europa, v. 79, p. 422-425, 1999.doi:

BRAZÃO-SILVA, M.T. *et al.* Paracoccidioidomycosis: a series of 66 patients with oral lesions from an endemic area. **Mycoses**, Nova Jersey, EUA, v. 54, p.189-195, 2010. doi:10.1111/j.1439-0507.2010.01873.x

BRUMMER, E, CASTANEDA, E, RESTREPO, U.M. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin. Microbiol. Rev**, S.I, v. 6, p. 89-117, 1993.doi:10.1128/CMR.6.2.89

CAIXETA, C.A. *et al.* Estrogen receptor-alfa correlates with higher fungal cell number in oral paracoccidioidomycosis in women. **Mycopathologia**, Berlim, Alemanha, v. 183, p. 785-791, 2018. doi.org/10.1007/s11046-018-0272-7

CARLI, M.L. *et al.* Serum antibody levels correlate with oral fungal cell numbers and influence the patients' response to chronic paracoccidioidomycosis. **Mycoses**, Nova Jersey, EUA, v. 58, p. 356-361, 2015. doi:10.1111/myc.12325

CARLI, M.L. *et al.* M2 macrophages and inflammatory cells in oral lesions of chronic paracoccidioidomycosis. **J Oral Pathol Med**, Nova Jersey, EUA, v. 45, p. 141-147, 2016. doi:10.1111/jop.12333

DEVELOUX, M. Cancer and mycoses and literature review. **Bull Soc Pathol Exot**, Lavoisier, França, v. 110, p. 80-84, 2017. doi: 10.1007/s13149-017-0543-9

DIKICI, S. *et al.* 2-deoxy-d-ribose (2dDR) upregulates vascular endothelial growth factor (VEGF) and stimulates angiogenesis. **Microvascular Research**, S.I, v.131, p.1-11, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2020.104035>

DONANZAM, D.F.A. *et al.* Exoantigens of *Paracoccidioides spp.* promote proliferation and modulation of human and mouse pulmonary fibroblasts. **Front Cell Infect Microbiol**, São Paulo, Brasil, v. 10, p. 590025, 2020. doi:10.3389/fcimb.2020.590025



FÁTIMA, L.A, PAPA, P.C. Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF): regulação transcricional e pós-transcricional. **Revista da Biologia**, São Paulo, Brasil, v. 4, p. 22-27, 2010. doi:

FERREIRA, M.C. *et al.* Effect of low intensity helium- neon (HeNe) laser irradiation on experimental paracoccidioidomycotic wound healing dynamics. **Photochem and Photobiol**, Nova Jersey, EUA, v. 85, p. 227-233, 2009. doi:10.1111/j.1751-1097.2008.00423.x

FINATO, A.C *et al.* Evaluation of antifibrotic and antifungal combined therapies in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. **Med Mycol**, Oxford, Inglaterra, v. 58, p. 1-12, 2020. doi:10.1093/mmy/myz100

FORTES, M.R.P, MIOT, H.A, KUROKAWA, C.S, MARQUES, M.E.A, MARQUES, A.S. Immunology of paracoccidioidomycosis. **An Bras Dermatol**, São Paulo, Brasil, v. 86, p. 516-525, 2011. doi:10.1590/s0365-05962011000300014

GIRARDI, F.M, SCROFERNECKER, M.L. Oral paracoccidioidomycosis mimicking lip carcinoma. **Braz J Infect Dis**, S.I, v.20, p.103-104, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2015.08.015>

GOLDANI, Z.L, WIRTH, F. Animal models and antifungal agents in paracoccidioidomycosis: An overview. **Mycopathologia**, Berlim, Alemanha, v.182, p.633-43, 2017. doi: 10.1007/s11046-017-0130-z

HILLEN, F, GRIFFIOEN, A. W. Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. **Cancer Metastasis Rev**, Berlim Alemanha, v. 26, p. 487- 502, 2007. doi 10.1007/s10555-007-9094-7

KAMINAGAKURA, E, BONAN, P.R.F, JORGE, J, ALMEIDA, O.P, SCULLY, C. Characterization of inflammatory cells in oral paracoccidioidomycosis. **Oral Dis**, Oxford, Inglaterra, v. 13, p. 434-439, 2007. doi:10.1111/j.1601-0825.2006.01319.x

KEIFER- JÚNIOR, O. P, O'CONNOR, D. M, BOULIS, N. M. Gene and protein therapies utilizing VEGF for ALS. **Pharmacol Ther**, Oxford, Inglaterra, v. 141, p. 261-271, 2014. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.10.009.

KLEIN, M. *et al.* Vascular endothelial growth factor gene and protein: strong expression in thyroiditis and thyroid carcinoma. **J Endocrinology**, Grã Bretânia, Reino Unido, v. 161, p. 41-49, 1999. doi: 10.1677/joe.0.1610041.

KLEIN, M. *et al.* Increased expression of the Vascular Endothelial Growth Factor is a pejorative prognosis marker in papillary thyroid carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab**, Grã Bretânia, Reino Unido, v. 86, p. 656-658, 2001. doi: 10.1210/jcem.86.2.7226

LI, Y. *et al.* VEGF-B inhibits apoptosis via VEGFR-1- mediated suppression of the expression of BH3-only protein genes in mice and rats. **J Clin Invest**, S.I, v. 118, p. 913-923, 2008. doi: 10.1172/JCI33673

LOOSE, D.S, STOVER, E.P, RESTREPO, A, STEVES, D.A, FELDMAN, D. Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Proc Natl Acad Sci USA**, Dale Kaiser, EUA, v. 80, p. 7659-63, 1983. doi: 10.1073/pnas.80.24.7659

LOPERA, D. *et al.* Structural and topographic dynamics of pulmonary histopathology and local cytokine profiles in *Paracoccidioides brasiliensis* conidia-infected mice. **PLoS Negl Trop Dis**, S.I, v. 5, p. 1232, 2011. doi:10.1371/journal.pntd.0001232

LÓPEZ-MARTÍNEZ, R. *et al.* Paracoccidioidomycosis in Mexico: clinical and epidemiological data from 93 new cases (1972-2012). **Mycoses**, Nova Jersey, EUA, v. 57, p. 525-530, 2014. doi: 10.1111/myc.12190

LOTH, E, CASTRO, S.V, SILVA, J.R, GANDRA, R.F. Occurrence of 102 cases of paracoccidioidomycosis in 18 months in the Itaipu Lake region, Western Paraná. **Rev Soc Bras Med Trop**, S.I, v. 44, p. 636-637, 2011. doi: 10.1590/s0037-86822011000500023

LU, L, DEEGAN, A, MUSA, F, XU, T, YANG, Y. The effects of biomimetically conjugated VEGF on osteogenesis and angiogenesis of MSCs (human and rat) and HUVECs co-culture models. **Colloids Surf B Biointerfaces**, S.I, v. 167, p. 550-559, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.04.060>

MAGALHÃES, S.E.M. *et al.* Prevalence of paracoccidioidomycosis infection by intradermal reaction in rural areas in Alfenas, Minas Gerais, Brazil. **Rev Inst Med Trop**, Sao Paulo, Brasil, v. 56, p. 281-285, 2014. doi: 10.1590/S0036-46652014000400002

MARQUES, A.S. Paracoccidioidomycosis. **Clin Dermatol**, São Paulo, Brasil, v. 30, p. 610-615, 2017. doi:

MARTINEZ, R. New Trends in Paracoccidioidomycosis Epidemiology. **J Fungi (Basel)**, S.I, v. 3, p. 1, 2017. doi:10.3390/jof3010001

MENDES, R.P. *et al.* Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. **Open Microbiol**, S.I, v. 31, p. 224-282, 2017. doi: 10.2174/1874285801711010224

MENDES-GIANNINI, M.J.S, SILVA, J.L.M, SILVA, J.F, DONOFRIO, F.C, MIRANDA, E.T, ANDREOTTI, P.F, SOARES, C.P Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: recent advances. **Mycopathologia**, Berlim, Alemanha, v. 165, p. 237-248, 2008. doi: 10.1007/s11046-007-9074-z

MENESES-GARCIA, A, TAYLOR, A.M, LUZ, R.M, RIVERA, L.M.R.G. Paracoccidioidomycosis: report of 2 cases mimicking squamous cell carcinoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, S.I, v. 94, p. 609-613, 2002. doi: 10.1067/moe.2002.129179.

MEURMAN, J.H, TARKKILA, L, TIITINEN, A. The menopause and oral health. **Maturitas**, Austrália, v. 63, p. 56-62, 2009. doi: 10.1016/j.maturitas.2009.02.009

MIGLIARI, D.A, SUGAYA, N.N, MIMURA, M.A, CUCÉ, L.C Periodontal aspects of the juvenile form of paracoccidioidomycosis. **Rev Inst Med Trop**, São Paulo, Brasil, v. 40, p. 15-18, 1998. doi: 10.1590/s0036-46651998000100004

ONO, M.A, ETAMO, E.N, MIZUNO, L.T, MIZUNO, E.H.F, CAMARGO, Z.P. Inhibition of *Paracoccidioides brasiliensis* by pesticides: is this a partial explanation for the difficulty in isolating this fungus from the soil? **Med Mycol**, Oxford, Inglaterra, v. 40, p. 493-499, 2002. doi: 10.1080/mmy.40.5.493.499

PAVANELLI, W.R. *et al.* Experimental chemotherapy in paracoccidioidomycosis using ruthenium NO donor. **Mycopathologia**, v. 172, p. 95-107, 2011. doi:10.1007/s11046-011-9416-8

PEACH, C. J, MIGNONE, V.W, ARRUDA, M.A, ALCOBIA, D.C, HILL, S.J, KILPATRICK, L.E, WOOLARD, J. Molecular Pharmacology of VEGF-A Isoforms: Binding and Signalling at VEGFR2. **Int J Mol Sci**, S.I, v. 19, p. 1264, 2018. doi:10.3390/ijms19041264

PEDREIRA, R.P.G. *et al.* Oral Paracoccidioidomycosis Granulomas are Predominantly Populated by CD163+ Multinucleated Giant Cells. **Mycopathologia**, Berlim, Alemanha, v. 181, p. 709-716, 2016. doi:10.1007/s11046-016-0016-5

PIRES, F.R. *et al.* Clinicopathologic features, microvessel density, and immunohistochemical expression of ICAM-1 and VEGF in 15 cases of secondary syphilis with oral manifestations. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, S.I, v. 121, p. 274-81, 2016. doi: 10.1016/j.oooo.2015.09.022

POLVERINI, P.J. The pathophysiology of angiogenesis. **Crit Rev Oral Biol Med**, Michigan, EUA, v. 6, p. 230-47, 1995. doi: 10.1177/10454411950060030501

QUEIROZ-TELLES, F. *et al.* Neglected endemic mycoses. **Lancet Infect Dis**, S.I, v. 17, p.367-77, 2008. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30306-7

RAMOS-SILVA, M, SARAIVA, L.E.S. Paracoccidioidomycosis. **Dermatol Clin**, Rio de Janeiro, Brasil, v. 26, p. 257-269, 2008 . doi:10.1016/j.det.2007.11.005

RESTREPO, A. *et al.* Estrogens Inhibit Mycelium-to-Yeast Transformation in the Fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: Implications for Resistance of Females to

Paracoccidioidomycosis. **Infect Immun**, S.I, v. 46, p. 346-353, 1984. doi: 10.1128/iai.46.2.346-353.1984

RODRIGUES-VENDRAMINI, F.A. *et al.* Promising new antifungal treatment targeting chorismate synthase from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Antimicrob Agents and Chemotherapy**, S.I, v. 63, p. 1097-18, 2019. <https://doi.org/10.1128/AAC.01097-18>

SALAZAR, M.E, RESTREPO, A, STEVENS, D.A. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infect Immun**, San Jose, Califórnia, v. 56, p. 711-713, 1988. doi: 10.1128/iai.56.3.711-713.1988.

SAN-BLAS, G. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Med Vet Mycol**, S.I, v. 31, p. 99-113, 1993. doi:

SAN-BLAS, G, VEJA, G.N, ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and Paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med Mycol**, Oxford, Inglaterra, v. 40, p. 225-242, 2002. doi: 10.1080/mmy.40.3.225.242

SANTOS, L.F.M. *et al.* Photodynamic inactivation of *Paracoccidioides brasiliensis* helps the outcome of oral paracoccidioidomycosis. **Lasers Med Sci**, Berlim, Alemanha, v. 32, p. 921-930, 2017. doi: 10.1007/s10103-017-2193-y

SHANKAR, J, RESTREPO, A, CLEMONS, K.V, STEVENS, D.A. Hormones and the resistance of women to paracoccidioidomycosis. **Clin Microbiol Rev**, S.I, v. 24, p. 296-313, 2011. doi:10.1128/CMR.00062-10

SHIKANAI-YASUDA, M. A. *et al.* Paracoccidioidomycosis Brazilian Guidelines. **Rev Soc Bras Med Trop**, S.I, v. 50, p. 715-740, 2017. doi: 10.1590/0037-8682-0230-2017

SHIKANAI-YASUDA, M.A. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Epidemiol Serv Saude**, Brasília, Brasil, v. 16, p. 27, 2018. doi: 10.5123/S1679-49742018000500001

SILVA, C.O. *et al.* Gingival involvement in oral paracoccidioidomycosis. **J Periodontol**, Nova Jersey, EUA, v. 78, p. 1229-34, 2007. doi:10.1902/jop.2007.060490

SIMONETTI, O. *et al.* Microvessel density and VEGF, HIF-1alfa expression in primary oral melanoma: correlation with prognosis. **Oral Diseases**, Nova Jersey, EUA, v.19, p.620-627, 2013. doi:10.1111/odi.12048

STACKER, A.S, ACHEN, M.G. Emerging Roles for VEGF-D in Human Disease. **Biomolecules**, Tampa, EUA, v. 8, p. 1, 2018.doi:10.3390/biom8010001

TRINDADE, A.H. *et al.* Oral paracoccidioidomycosis: Retrospective analysis of 55 Brazilian patients. **Mycoses**, Nova Jersey, EUA, v. 60, p. 521-525, 2017. doi: 10.1111/myc.12622

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

VALIATTI, F.B. *et al.* Papel do fator de crescimento vascular endotelial na angiogênese e na retinopatia diabética. **Arq Bras Endocrinol Metab**, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, v. 55, p. 106-13, 2011. doi: 10.1590/S0004-27302011000200002

VASCONCELOS, R.C. *et al.* Immunoexpression of HIF-1 alfa and VEGF in peridental disease and healthy gingival tissues. **Braz Dent J**, Ribeirão Preto, Brasil, v. 27, p. 117-122, 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-6440201600533>

VEMPATI, P, POPEL, A.S, GABHANN, F.M. Extracelular regulation of VEGF: isoforms, proteolysis, and vascular patterning. **Cytokine Growth Factor Rev**, Maryland, EUA, v. 25, p. 1-19, 2014 doi:10.1016/j.cytogfr.2013.11.002.

VERLI, F.D. *et al.* Perfil clínico-epidemiológico dos pacientes portadores de paracoccidioidomicose no Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. **Rev Soc Bras Med Trop**, S.I, v. 38, p. 234-237, 2005. doi:

WADA, H. *et al.* Distinct characteristics of VEGF-D and VEGF- C to predict mortality in patients with suspected or known coronary artery disease. **J Am Heart Assoc**, Nova Jersey, EUA, 9:15761, 2020.doi: 10.1161/JAHA.119.015761

WEBBER, L.P. *et al.* Disseminated paracoccidioidomycosis diagnosis based on oral lesions. **Contemp Clin Dent**, S.I, v. 5, p. 213-216, 2014. doi: 10.4103/0976-237X.132340

## APÊNDICES

### APÊNDICE A- Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Unifal-MG.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
ALFENAS



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** IMUNOEXPRESSÃO DE FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR EM PARACOCIDIIDOMICOSE

**Pesquisador:** João Adolfo Costa Hanemann

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 40286520.1.0000.5142

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.516.062

##### Apresentação do Projeto:

Versão 2. A paracoccidioidomicose é uma infecção fúngica profunda, sistêmica, causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. Esta condição é considerada uma doença endêmica na América do Sul, com predileção ao sexo masculino. O fungo é encontrado na natureza em forma de micélio a uma temperatura de 25°C em vegetações e plantações, a contaminação se dá através da inalação do fungo que se aloja nos pulmões causando falta de ar e tosse. Quando não eliminado do organismo, este fungo à temperatura de 37°C adquire a forma de levedura que é sua forma patogênica. Clinicamente, as manifestações bucais se apresentam como estomatite moriforme, periodontite oculta ou generalizada e lesões ulcerovegetantes. Histologicamente esta doença apresenta um epitélio hiperplásico pseudoepiteliomatoso com áreas de microabscesso com intenso infiltrado inflamatório polimorfonuclear; e tecido conjuntivo com intenso infiltrado inflamatório mononuclear difuso. A angiogênese é um processo bastante complexo regulado por fatores de inibição e de estimulação da proliferação vascular, o desequilíbrio desses fatores leva a uma angiogênese fisiológica ou patológica. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é uma glicoproteína próinflamatória de 45kDa, que é expressa no citoplasma e membrana de vários tipos celulares com uma importante função nas etapas do processo angiogênico. Dessa forma, inúmeros trabalhos têm sido realizados com o objetivo de se utilizar o VEGF de forma mais eficiente como alvo ou agente terapêutico em doenças onde a angiogênese está alterada. O objetivo desse trabalho é avaliar, através de

**Endereço:** Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700

**Bairro:** centro

**CEP:** 37.130-001

**UF:** MG

**Município:** ALFENAS

**Telefone:** (35)3701-9153

**Fax:** (35)3701-9153

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

## APÊNDICE A- continuação.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
ALFENAS

Continuação do Parecer: 4.516.062

Declaração de Pesquisadores	pdf	14/01/2021 11:59:18	João Adolfo Costa Hanemann	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TAI_Elisangela_final.pdf	14/01/2021 11:58:54	João Adolfo Costa Hanemann	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_revisado_final.pdf	14/01/2021 11:58:21	João Adolfo Costa Hanemann	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TCUD_Elisangela_ok.pdf	19/11/2020 15:34:43	João Adolfo Costa Hanemann	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_Elisangela_ok.pdf	19/11/2020 15:32:40	João Adolfo Costa Hanemann	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Dispensa_TCLE_Elisangela.pdf	16/11/2020 10:40:04	João Adolfo Costa Hanemann	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

ALFENAS, 29 de Janeiro de 2021

Assinado por:

**DANIEL AUGUSTO DE FARIA ALMEIDA**  
 (Coordenador(a))
**Endereço:** Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700**Bairro:** centro**CEP:** 37.130-001**UF:** MG**Município:** ALFENAS**Telefone:** (35)3701-9153**Fax:** (35)3701-9153**E-mail:** comite.etica@unifal-mg.edu.br

## APÊNDICE B- Formulário de coleta de dados

## PROJETO DE PESQUISA

IMUNOEXPRESSION DE FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR EM  
PARACOCIDIOIDOMICOSE

Mestranda: Elisângela de Souza Santos Dias  
Orientador: Prof. Dr. João Adolfo Costa ~~UNIVERSIDADE~~  
Coordenadora: Prof.ª Dr.ª Carine Evelyn de Oliveira



	Iniciais do paciente:	Número no estudo:		
	Número do laudo AP:			
1.	Idade: ____ anos			
2.	Gênero: 1( ) Masculino	2( ) Feminino	3( ) NI	
3.	Cor: 1( ) <del>Leucoderma</del>	2( ) <del>Feoderma</del>	3( ) <del>Melanoderma</del>	4( ) NI
4.	Tabagismo: 0( ) Não	1( ) Sim	2( ) NI	
5.	Etilismo: 0( ) Não	1( ) Sim	2( ) NI	
6.	Profissão:			
7.	Locais acometidos pelas lesões:			
	1( ) Lábio superior	5( ) Borda lateral de língua	09( ) Palato mole	
	2( ) Lábio inferior	6( ) Assoalho bucal	10( ) Orofaringe	
	3( ) Dorso de língua	7( ) Gengiva/ rebordo alveolar	11( ) Mucosa jugal	
	4( ) Ventre de língua	8( ) Palato duro	12( ) Comissura labial	
			13( ) NI	
8.	Aspecto clínico da lesão:			
	1( ) Estomatite <del>moriforme</del>	2( ) Úlcera vegetante	3( ) Periodontite	
	4( ) NI			
9.	Diagnóstico clínico:			
	1.	2.	3.	
	4.	5.	6.	
<b>ANÁLISE MICROSCÓPICA (HE)</b>				
10.	<del>Hiperplasia pseudoepiteliomatosa:</del>	0( ) não	1( ) sim	
11.	<del>Microabscessos:</del>	0( ) não	1( ) sim	
12.	Intensidade do infiltrado inflamatório:	1( ) discreto	2( ) moderado	3( ) intenso
13.	Localização do infiltrado inflamatório:	1( ) difuso	2( ) <del>subepitelial</del>	3( ) perivascular
14.	<del>CGMIs Tipo Langhans:</del>	0( ) não	1( ) sim	
15.	<del>CGMIs Tipo Corpo Estranho:</del>	0( ) não	1( ) sim	
16.	Granulomas imunogênicos:	0( ) não	1( ) sim	
17.	Localizações dos fungos:	1( ) dispersos	2( ) no interior das CGMIs	3( ) nos <del>microabscessos</del>
<b>ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA (VEGF)</b>				
18.	Localização:	1( ) <del>subepitelial</del>	2( ) profundo	
19.	Intensidade:	0( ) ausente	1( ) discreto	2( ) moderado
				3( ) intenso
20.	Quantidade:	0( ) ausente	1( ) Até 30%	2( ) Entre 30 e 60%
				3( ) Mais de 60%
21.	Intensidade X Quantidade:	0( )	1( )	2( )
				3( )
				4( )
				6( )
				9( )

\* OBSERVAÇÕES: