

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS (UNIFAL-MG)

RENATO DO PRADO GOMES PEDREIRA

**COMPARAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA E CITOMORFOMÉTRICA ENTRE
CÉLULAS GIGANTES MULTINUCLEADAS E FUNGOS EM LESÕES ORAIS
POR PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

**ALFENAS/MG
2015**

RENATO DO PRADO GOMES PEDREIRA

**COMPARAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA E CITOMORFOMÉTRICA ENTRE
CÉLULAS GIGANTES MULTINUCLEADAS E FUNGOS EM LESÕES ORAIS
POR PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre do Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).
ORIENTADOR: Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann
CO-ORIENTADORA: Dra. Marina Lara de Carli

**ALFENAS/MG
2015**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Pedreira, Renato do Prado Gomes

Comparação imunoistoquímica e citomorfométrica entre células gigantes multinucleadas e fungos em lesões orais por paracoccidiodomicose / Renato do Prado Gomes Pedreira. -- Alfenas/MG, 2015.

55 f.

Orientador: João Adolfo Costa Hanemann.

Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2015.
Bibliografia.

1. Paracoccidiodomicose. 2. Células Gigantes. 3. Granuloma. I. Hanemann, João Adolfo Costa. II. Título.

CDD-617.607



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas-Unifal-MG
Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 - Alfenas/MG - CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1392. Fax: (35) 3299-1067



Renato do Prado Gomes Pedreira

“Comparação imunoistoquímica e citomorfométrica entre células gigantes multinucleadas e fungos em lesões orais por paracoccidiodomicose”

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

Aprovado em: 07 / 12 / 2015

Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann

Instituição: UNIFAL-MG

Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: João Adolfo Costa Hanemann

Profª. Dra. Maria Carolina Vaz Goulart

Instituição: UNIFENAS

Universidade José do Rosário Vellano

Assinatura: Maria Carolina Vaz Goulart

Prof. Dr. Alessandro Antônio Costa Pereira

Instituição: UNIFAL-MG

Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: Alessandro Antônio Costa Pereira

Dedico este trabalho,

a **Deus**.

a minha esposa, **Fernanda**, sempre presente na minha vida, pela cumplicidade, companheirismo, apoio, amor e carinho e por me mostrar que não existem limites, somente os que nós mesmos criamos e que podemos mudá-los quando quisermos. Que o futuro nos reserve muito mais surpresas como foram a deste mestrado, que somente existiu devido ao seu incentivo.

a meus pais, **Marcelo e Sônia**, pela educação e amor que me foi dado a vida toda e pelo apoio e paciência nessa “fase mestrado” da vida.

a meus irmãos, **Marina e Renan** pelo incentivo, carinho e amizade.

AGRADECIMENTOS

A meu orientador, **Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann**, por todo o apoio e paciência de ensinar quantas vezes foram preciso, pelas opiniões sempre sinceras, pelos finais de semana em que deixou sua casa para me ajudar e pela grande amizade construída durante o mestrado.

À pós-doutoranda, **Dra. Marina Lara de Carli**, por nunca medir esforços para ajudar, pela paciência, grande contribuição ao trabalho e pela amizade.

Ao **Prof. Luiz Alberto Beijo** pelo apoio na realização da parte estatística.

Ao **Prof. Dr. Felipe Fornias Sperandio** pela amizade, apoio e pelas opiniões que ajudaram a fazer este trabalho melhor.

Aos Professores **Dra. Maria Carolina Vaz Goulart** e **Dr. Alessandro Antônio Costa Pereira** pelas contribuições na avaliação deste trabalho.

Às funcionárias, **Luciana e D. Luzia**, pela eficiência e carinho com que sempre me trataram.

À Universidade Federal de Alfenas.

À Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, na figura do seu pró-reitor, **Prof. Dr. Antônio Carlos Doriguetto**.

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

Aos amigos e companheiros de trabalho do **Instituto Marcelo Pedreira** pelo apoio e por toda ajuda quando me ausentava para a realização deste mestrado.

RESUMO

As Células Gigantes Multinucleadas (CGMs) são consideradas uma característica marcante da inflamação granulomatosa, pois podem desempenhar um papel essencial na resposta do hospedeiro contra patógenos, particularmente o *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb). Este estudo caracteriza as CGMs encontradas na Paracoccidioidomicose (PCM) oral crônica e avalia sua correlação com a quantidade de fungos presentes nos tecidos orais. Foram incluídos neste estudo 26 casos de pacientes portadores de PCM com lesões em mucosa oral. As lesões foram classificadas em granulomas densos e frouxos e avaliou-se o número total de células gigantes, incluindo as do tipo Langhans e corpo-estranho, além do número total de fungos e de fungos intracelulares. Realizou-se a reação imunoistoquímica com o anticorpo antiCD163; as CGMs CD163 positivas foram também quantificadas. Os resultados revelaram que, nos granulomas densos, houve um número maior de células gigantes totais e do tipo corpo-estranho comparado aos granulomas frouxos ($p < 0,05$). O número total de células gigantes demonstrou uma correlação linear positiva com o número de CGMs CD163 positivas ($p = 0,003$; $r = 0,56$) e com a quantidade de fungos localizados no interior das CGMs ($p = 0,045$; $r = 0,40$). Com base nestes resultados, concluiu-se que as lesões orais da PCM crônica contêm principalmente CGMs com fenótipo CD163 positivo, incluindo ambas as células tipo Langhans e corpo-estranho; esse perfil CD163+/M2 pode contribuir para manutenção da forma crônica da doença e persistência das lesões orais. Além disso, quanto maior o número de CGMs, maior a quantidade de fungos no interior das células gigantes, evidenciando que este tipo de CGMs são, de fato, capazes de realizar a fagocitose.

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose. Células gigantes. Granuloma.

ABSTRACT

Multinucleated giant cells (MGC) are considered to be a hallmark of granulomatous inflammation; thus they may play an essential role in the host response against pathogens, particularly *Paracoccidioides brasiliensis*. This study characterizes the MGC found in oral chronic paracoccidioidomycosis and assesses their correlation with the amount of fungi within oral tissues. Twenty-six cases were included. They were classified as loose or dense granulomas and the total MGC, including foreign-body and Langhans giant cells, besides the total and intracellular fungi were taken into consideration. CD163 immunoexpression was performed and CD163+ multinucleated giant cells were also quantified. Our results showed that dense granulomas revealed more foreign-body type and total giant cells than loose granulomas ($P < 0.05$). Total giant cells showed a positive linear correlation with the CD163+cells ($P = 0.003$; $r = 0.56$) and intracellular fungi quantification ($P = 0.045$; $r = 0.40$). Oral chronic paracoccidioidomycosis lesions contain MGC that mainly belong to a CD163+ phenotype, also showing both Langhans and foreign-body arrangements; such CD163+/M2 profile may sustain the chronic form and persistence of PCM oral lesions; additionally, the higher the presence of MGC, the higher the amount of phagocytosed fungi, evidencing that such kind of giant cells are indeed able to perform phagocytosis.

Keywords: Paracoccidioidomycosis. Giant Cells. Granuloma.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição da contagem de células gigantes multinucleadas de acordo com o tipo de granulomas	28
Tabela 2 - Distribuição da contagem de células gigantes multinucleadas de acordo com a contagem de fungos	29
Tabela 3 - Distribuição da contagem de fungos imunomarcados pelo Anti-Pb de acordo com o tipo de granuloma	30
Tabela 4 - Distribuição da contagem de fungos intracelulares imunomarcados pelo Anti-Pb de acordo com o tipo de granuloma	30
Tabela 5 - Dados citomorfométricos de área celular das células gigantes multinucleadas presentes nos casos de paracoccidioidomicose	31
Tabela 6 - Dados citomorfométricos de perímetro celular das células gigantes multinucleadas presentes nos casos de paracoccidioidomicose	32
Tabela 7 - Distribuição da contagem de células gigantes multinucleadas imunomarcadas pelo CD163 de acordo com o tipo de granuloma ...	34
Tabela 8 - Correlação entre células gigantes multinucleadas e células gigantes multinucleadas imunomarcadas pelo CD163	36
Tabela 9 - Correlação entre o número de fungos imunomarcados pelo Anti-Pb e células gigantes multinucleadas imunomarcadas pelo CD163	37
Tabela 10 - Correlação entre o número de fungos intracelulares imunomarcados pelo Anti-Pb e células gigantes multinucleadas imunomarcadas pelo CD163	38
Tabela 11 - Correlação entre o número de fungos intracelulares imunomarcados pelo Anti-Pb e o número de células gigantes multinucleadas	40
Tabela 12 - Correlação entre o número de fungos intracelulares e o número total fungos imunomarcados pelo Anti-Pb	41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	09
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
3	PROPOSIÇÃO	22
4	MATERIAL E MÉTODOS	23
4. 1	QUESTÕES ÉTICAS	23
4. 2	CASUÍSTICA, SELEÇÃO E PREPARO DA AMOSTRA	23
4. 3	REAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA	24
4. 4	ANÁLISE MICROSCÓPICA	25
4. 5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
5	RESULTADOS	28
6	DISCUSSÃO	42
7	CONCLUSÕES	46
	REFERÊNCIAS	47
	ANEXO	54

1 INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica, de natureza granulomatosa, causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* descrita por Adolfo Lutz em 1908. É uma das infecções fúngicas mais importantes da América Latina, ocorrendo em regiões tropicais e subtropicais. O Brasil é considerado um centro endêmico dessa doença, com maior prevalência nas regiões sul, sudeste e centro-oeste (WANKE; LONDERO, 1994; MALUF et al., 2003; VERLI et al., 2005). Tal endemicidade é atribuída às condições locais do solo como umidade, riqueza em matéria orgânica, muito 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 doença ocorre do fungo ocorre pela inalação de propágulos infectantes (conídeos) da forma filamentosa, que é a encontrada no meio ambiente, especialmente em região rural (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). No tecido humano, à temperatura de 37°C, o fungo se transforma em levedura, a forma responsável pela infecção e doença. A forma de levedura não possui transmissibilidade, fato este que coloca a PCM como não-contagiosa (FRANCO et al., 1994).

As manifestações clínicas da paracoccidioidomicose são as de uma doença granulomatosa crônica, comprometendo especialmente tecidos pulmonares e mucosa oral. Na PCM, como em outras infecções granulomatosas crônicas, a resposta imune celular representa uma resposta específica do hospedeiro contra o fungo, na tentativa de destruir e circunscrever o parasita, evitando sua multiplicação e disseminação (BRITO; FRANCO, 1994; NEWORAL et al., 2003).

Os critérios microscópicos para o diagnóstico de PCM são a presença de: hiperplasia pseudoepiteliomatosa; microabscessos intraepiteliais; reação granulomatosa composta por células gigantes multinucleadas (CGM) inflamatórias e um infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear (linfócitos e plasmócitos), além de neutrófilos; e, principalmente, a presença de estruturas circulares de paredes birrefringentes correspondentes aos fungos (SILVA et al., 2007).

O granuloma pode ser classificado em compacto ou frouxo. O granuloma compacto apresenta área central com células fúngicas englobadas por células gigantes multinucleadas, rodeadas, eventualmente, por infiltrado neutrofílico,

evidenciadas com dificuldade e podendo apresentar sinais de inviabilidade. Na região periférica, há densos agregados de células epitelioides circundados por linfócitos (BRITO; FRANCO, 1994). No padrão de resposta granulomatosa dito frouxo, observam-se menor número de células epitelioides e numerosas células polimorfonucleares distribuídas ao redor da região central, que está ocupada por edema, exsudato serofibrinoso e grande quantidade de fungos em ativa multiplicação (MONTENEGRO; FRANCO, 1994).

A configuração morfológica da reação granulomatosa na PCM, baseada no padrão da resposta imunológica, pode ser representada pela configuração de dois polos antagônicos. Em indivíduos com resposta imune celular preservada, observam-se granulomas epitelioides compactos, bem definidos, por vezes confluentes, com poucos fungos e infecção benigna localizada. Nos pacientes que apresentam comprometimento imunológico, a inflamação granulomatosa é desorganizada, com grande número de fungos e granulomas frouxos, mal definidos, com exudação supurativa e áreas de necrose. Ocorrem proliferação e disseminação do fungo, levando à doença generalizada e de mau prognóstico. Sendo assim, a reação granulomatosa que ocorre na PCM humana e na experimental representa a mais especializada e eficiente resposta dos tecidos do hospedeiro na tentativa de bloquear e restringir o fungo, impedindo sua multiplicação e disseminação pelos tecidos (FORTES et al., 2011).

Os macrófagos estão presentes em grande número nas lesões granulomatosas e representam a principal célula de defesa contra o *P. brasiliensis*. Considerando que o *P. brasiliensis* é um fungo intracelular facultativo, os macrófagos podem ter papel essencial na patogênese da doença. Portanto, a investigação de mecanismos relacionados com a fagocitose do fungo por macrófagos e sua atividade funcional torna-se importante para a compreensão da relação hospedeiro-parasita na PCM (BRUMMER et al., 1989; SINGER-VERMES et al., 1994; GONZALEZ et al., 2000).

Células gigantes multinucleadas estão presentes em vários tipos de granulomas como, por exemplo, em áreas focais de inflamação granulomatosa. Células gigantes multinucleadas se originam da fusão de células da linhagem monócito/macrófago e têm sido induzidas *in vitro* a partir de monócitos de sangue humano. Morfológicamente, estas células gigantes multinucleadas são classificadas em células gigantes de Langhans, que têm um número mais reduzido de núcleos

dispostos num arranjo circular na periferia da célula gigante, e células gigantes de corpo estranho, que possuem um maior número de núcleos (normalmente acima de 20) e estão dispostos aleatoriamente. As de Langhans frequentemente são encontradas em doenças granulomatosas infecciosas, tais como tuberculose, esquistossomose, hanseníase e paracoccidiodomicose e também em desordens granulomatosas de etiologia desconhecida como a sarcoidose. As de corpo estranho são características em granulomas corpo estranho (WILLIAMS; WILLIAMS, 1983; ANDERSON, 2000; OKAMOTO; MIZUNO; HORIO, 2003; NASCIMENTO et al., 2011).

Williams; Williams (1983) afirmaram que não há diferenças fundamentais entre estes dois tipos de células gigantes e também que não representam significado diagnóstico. Ambas comumente são encontradas coexistindo numa mesma lesão. Formas transicionais têm sido descritas e estudos em cultura de tecidos têm demonstrado que células gigantes de corpo estranho podem sofrer uma “maturação”, tornando-se células de Langhans, provavelmente devido aos movimentos do citoesqueleto intracelular. Apesar das células gigantes multinucleadas terem um reconhecido papel crucial na inflamação granulomatosa, as funções específicas das células gigantes de Langhans e corpo estranho não são ainda conhecidas (OKAMOTO; MIZUNO; HORIO, 2003).

Até o presente, não existem na literatura estudos avaliando as características morfológicas das CGMs em lesões bucais por PCM. Assim, o presente trabalho visa relacionar a quantidade, o tamanho, o perímetro e a área das Células Gigantes Multinucleadas Inflamatórias com a quantidade de fungos *Paracoccidioides brasiliensis* presentes, utilizando-se a imunomarcção para CD163 e Anti-PB, em fragmentos de biópsias obtidas de lesões bucais de pacientes portadores de Paracoccidiodomicose.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A paracoccidioidomicose é uma infecção causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* que é encontrado no solo de países da América Latina estendendo-se desde o México, ao norte, até a Argentina ao sul, sendo endêmica nas regiões sudeste, centro-oeste e sul do Brasil (ALMEIDA; JORGE-JÚNIOR; SCULLY, 2003; NEVES et al., 2003; BORBA et al., 2005, 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 endemicidade é atribuída 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). Representa a maior causa incapacitante e de morte entre trabalhadores rurais adultos jovens, com idade variando entre 29 e 40 anos, durante o período de vida mais produtivo (COUTINHO et al., 2002; RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008).

Esta doença 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*. Entretanto, esta doença foi oficialmente 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).

O *P. brasiliensis* é um fungo dimórfico por apresentar-se sob duas formas: micélio e levedura. A forma de micélio, encontrada na natureza a uma temperatura de 25°C, produz colônias de crescimento lento (3-4 semanas), e é a forma infectante do fungo. A forma de levedura está presente no exsudato dos tecidos do hospedeiro e cresce em cultura a 37°C. Apresentam-se como estruturas ovoides que se reproduzem por brotamento ou gemulação. Esta transição morfológica é determinada pela temperatura ambiente e se correlaciona com a invasão do

hospedeiro (RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008). Apresenta uma dupla camada refringente, sendo que na forma de levedura a camada externa é formada pela α -1,3-glucana e na forma de micélio pela β -1,3-glucana. A camada interna da parede celular é espessa e é formada por quitina justaposta à membrana citoplasmática (ALMEIDA; JORGE-JÚNIOR; SCULLY, 2003). A patogenicidade e a capacidade de invasão do fungo parecem estar associadas com a α -1,3-glucana e com algumas proteases como a Gp-43, uma proteína de 43 kDa, que se constitui no principal antígeno secretado pelo *P. brasiliensis* além de ser o mais específico para o diagnóstico desta infecção (RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008).

O curso clínico da doença pode se dar principalmente sob a forma aguda (juvenil) e crônica (adulta). Ambas estão associadas com uma infecção sistêmica e uma resposta imune celular deficiente (BATISTA; SOARES; LARA, 2005). A forma adulta ocorre em mais de 90% dos casos e 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. Subsequentemente, a doença pode disseminar para outros órgãos e tecidos produzindo lesões secundárias nas membranas mucosas (bucal e nasal), pele, linfonodos e glândulas adrenais. A forma juvenil, ao contrário, desenvolve-se dentro de poucas semanas ou meses, é mais severa, levando a níveis significativos de mortalidade pelo comprometimento primário do sistema fagocitário mononuclear (BORGES-WALMSLEY et al., 2002). 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 (UNTERKIRCHER et al., 2004; MENDES-GIANNINI et al., 2008; RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008).

Estudos utilizando o teste intradérmico da 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).

A principal forma de contágio da PCM é pela inalação de esporos do fungo. Poucas horas após a inalação, os clamidósporos, que são as partículas infectantes, adquirem uma forma fúngica que habita no corpo humano. O *P. brasiliensis* pode levar à formação de um complexo gangliopulmonar 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).

Mulheres em idade fértil são menos afetadas pela PCM devido à presença dos receptores do hormônio β -estradiol no citoplasma das formas de micélio e levedura do *P. brasiliensis*, indicando que este hormônio feminino é capaz de inibir a transição de micélio para a forma de levedura, explicando assim a baixa incidência de casos em mulheres adultas (LOOSE et al., 1983; ARISTIZABAL et al., 1998).

A manifestação clínica da PCM pode ser de forma localizada e benigna até disseminada, severa e progressiva, com evolução fatal. Com a inalação dos parasitas, estes penetram o trato respiratório e os pulmões resultando em PCM pulmonar em 80 a 90% dos casos, sendo usualmente bilateral e localizada na metade inferior dos pulmões. A sintomatologia nesta fase é inespecífica e os pacientes podem apresentar tosse crônica, expectoração, dispneia, dor torácica e hemoptise associada a sintomas sistêmicos como perda de peso, febre e anorexia. Também pode ser assintomática, regredir espontaneamente, progredir para a doença ou permanecer num estado de latência (RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008).

Infecções fúngicas são comumente diagnosticadas através de cultura, sorologia ou histopatologia. Os testes sorológicos revelam a existência do microrganismo antes mesmo dos exames citológico e histopatológico, e são de amplo uso na confirmação da doença (BLOTTA et al., 1999). Um outro método de diagnóstico utilizado é a reação intradérmica. Magalhães et al. (2014) avaliaram a prevalência de PCM infecção através da reação intradérmica em habitantes de áreas rurais de Alfenas-MG. Dos 542 pacientes incluídos no estudo, 46,7% apresentaram positividade aos testes cutâneos. Os autores verificaram também que a prevalência aumentou com o avanço da idade e que o gênero masculino foi mais comumente afetado.

Já o envolvimento pulmonar deve ser confirmado através de exame radiográfico. Além disso, técnicas moleculares têm permitido um diagnóstico de alta especificidade e sensibilidade, particularmente quando se utiliza sondas de DNA. Estas técnicas incluem a identificação molecular do *P. brasiliensis* através da imunistoquímica e da amplificação do DNA ribossômico pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (ALMEIDA; JORGE-JÚNIOR; SCULLY, 2003).

Os critérios microscópicos para o diagnóstico de PCM são a presença de: hiperplasia pseudoepiteliomatosa, microabscessos intra-epiteliais, reação granulomatosa composta por células gigantes inflamatórias e um infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear (linfócitos e plasmócitos), além de neutrófilos; e, principalmente, a presença de estruturas circulares de parede birrefringente correspondente ao fungo (SILVA et al., 2007). Estas estruturas podem ser observadas em cortes histológicos corados pela Hematoxilina e Eosina, mas são mais facilmente identificadas quando coradas pelo Ácido Periódico-Schiff ou pela técnica de Gomori-Grocott (ALMEIDA; JORGE-JÚNIOR; SCULLY, 2003; RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008).

O envolvimento bucal na PCM foi primeiramente descrito por Lutz, em 1908, nos dois pacientes que também apresentavam linfadenopatia cervical. As lesões bucais tipicamente se caracterizam por uma hiperplasia granular eritematosa, entremeada por pontos hemorrágicos purpúreos e um aspecto superficial rugoso denominadas “estomatite moriforme” (ALMEIDA; JORGE-JÚNIOR; SCULLY, 2003; SILVA et al., 2007). O envolvimento dos lábios causa um aumento pronunciado na espessura e consistência, conhecido como macroqueilia. Geralmente, as lesões bucais 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). O diagnóstico diferencial deve incluir carcinoma de células escamosas, linfoma, tuberculose, sarcoidose, sífilis, granulomatose de Wegener, actinomicose cervicofacial, histoplasmose, criptococose e leishmaniose (ALMEIDA; JORGE-JÚNIOR; SCULLY, 2003; RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008).

Segundo os autores Wagner et al (1998), Pagliari et al (2006; 2010) o infiltrado inflamatório associado à presença de *P. brasiliensis* tem sido pouco estudado. Dentre os trabalhos encontrados na literatura, podemos destacar aqueles que envolvem a resposta imunológica inata envolvendo a ação de eosinófilos (),

mastócitos, células NK e outros representados pela resposta imunológica específica pela atuação de células como, por exemplo, monócitos (PERAÇOLI et al., 2003; KUROKAWA et al., 2007) e macrófagos no granuloma imunogênico (KAMINAGAKURA et al., 2007).

Diante do fato de existirem poucos dados na literatura relacionados à descrição e quantificação das células inflamatórias envolvidas na PCM bucal, Kaminagakura et al. (2007) desenvolveram um estudo objetivando caracterizar e descrever as células inflamatórias na PCM bucal, utilizando os anticorpos contra CD68, CD45, CD8, CD4, CD20, CD15 e proteína S-100 para identificar macrófagos, linfócitos T, linfócitos supressores e *helper*, linfócitos B, polimorfonucleares e células dendríticas, respectivamente. Os autores observaram predominância de células T CD4+ em granulomas bem organizados, e um equilíbrio nas células T CD4+ e CD8+ em áreas não granulomatosas. E concluíram que os macrófagos e os linfócitos T são as células predominantes na PCM bucal e que os granulomas bem organizados possuíam poucas partículas fúngicas, indicando uma resposta imune do hospedeiro mais efetiva.

A presença de *P. brasiliensis* no organismo estimula os monócitos a liberarem citocinas pró e anti-inflamatórias tais como o fator de necrose tumoral alfa, a interleucina 1-beta, a interleucina-6, a interleucina-10 e o fator de crescimento transformante beta. Em tecidos da mucosa bucal, a presença do fungo e destas citocinas desencadeiam uma resposta inflamatória granulomatosa caracterizada pela formação de granulomas frouxos e densos. Esta reação imune inicia-se com o acúmulo de macrófagos e células efetoras em resposta às citocinas produzidas pelos linfócitos T. Os macrófagos teciduais são derivados dos monócitos sanguíneos, constituindo-se na principal linha de defesa do hospedeiro contra o *P. brasiliensis*. Contudo, o papel dos macrófagos depende do seu estado de ativação, o que pode habilitá-los a se tornarem microbicidas. Há atualmente duas formas polarizadas distintas de macrófagos: M1 (macrófagos ativados classicamente) e M2 (macrófagos alternativamente ativados). Esta polarização é determinada por mediadores presentes no microambiente inflamatório. Macrófagos M1 são estimulados por interferon gama ou lipopolissacarídeos a produzirem óxido nítrico e destruir patógenos intracelulares e células tumorais. Além disso, macrófagos M1 produzem grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), interleucina-1 beta (IL-1beta), interleucina-12 (IL-12)

e interleucina-23 (IL-23), sendo células efetoras potentes associadas com a resposta imune adaptativa Th1. Por outro lado, macrófagos M2 são estimulados por interleucina-4 (IL-4) ou interleucina-13 (IL-13) e são caracterizados pela baixa produção de citocinas pró-inflamatórias TNF-alfa, IL-1beta e IL-6 e alta produção de IL-10, TGF-beta e arginase-1. Estas citocinas estão presentes na resposta inflamatória tardia, removendo restos necróticos, promovendo angiogênese, remodelação e reparo tecidual e atuando nas células Th2 da resposta imune adaptativa. Citocinas Th2 liberadas no microambiente podem favorecer a progressão da doença, enquanto citocinas produzidas pela resposta imune Th1 estão associadas com uma melhor resistência ao desenvolvimento da PCM (CARLI et al., 2016).

Dentre vários marcadores existentes para macrófagos, o CD163 é uma glicoproteína transmembrana de 130 kDa que foi identificada como um receptor que expressa exclusivamente monócitos e macrófagos. É membro da família de receptores de captura ricos em cisteína. Os macrófagos teciduais expressam altos níveis de CD163, o que pode estar relacionado, em alguns casos, ao papel importante na resolução da inflamação. Este receptor também está envolvido na diferenciação dos macrófagos, assim como de monócitos do sangue periférico, células Kupffer no fígado, no baço, macrófagos corticais do timo, macrófagos maduros residentes da medula óssea e no tecido nervoso (VAN DEN HEUVEL et al., 1999).

O CD68 é uma glicoproteína transmembrana de 110 kDa de função desconhecida altamente expressa por monócitos humanos e macrófagos de tecidos. Está presente nos grânulos citoplasmáticos de monócitos, macrófagos, neutrófilos, basófilos e grandes linfócitos. A função da molécula é desconhecida. O anticorpo contra CD68 marca monócitos e macrófagos em ampla gama de tecidos, incluindo macrófagos pulmonares, macrófagos de centros germinativos, células de Kupffer, osteoclastos e precursores mielóides na medula óssea (HOLNESS; SIMMONS, 1993).

Williams; Williams (1983) relataram que a inflamação granulomatosa é melhor definida como uma variedade especial de inflamação crônica em que células do sistema fagocitário mononuclear são predominantes e tomam a forma de macrófagos, células epitelioides e células gigantes multinucleadas. Na maioria das vezes, estas células estão agregadas no interior de lesões focais bem demarcadas

denominadas granulomas. Além destas células, estão também normalmente presentes nestes granulomas linfócitos, plasmócitos e fibroblastos.

A inflamação granulomatosa é um importante componente da resposta imune para muitos patógenos intracelulares e para alguns antígenos não-degradáveis. Estas respostas iniciam-se pelos linfócitos T CD4 positivos com o acúmulo de macrófagos e outras células efetoras em resposta às citocinas produzidas pelos linfócitos T. Os macrófagos formam a principal linha de defesa contra o *P. brasiliensis*. Estas células e seus produtos estão envolvidos no desenvolvimento de inflamação granulomatosa, promovendo o reconhecimento e processamento de antígenos. Eles também exercem um papel essencial na indução da ativação de linfócitos T antígeno-específicos (KAMINAGAKURA et al., 2007). Entretanto, a função do macrófago depende do seu estado de ativação que lhe capacita a exercer sua atividade microbicida (BATISTA; SOARES; LARA, 2005). Além disso, o estudo *in vivo* realizado por Santos; Ferreira; Almeida (2011) demonstrou que, após a interação do fungo *P. brasiliensis* e as células dendríticas, estas migrariam para o linfonodo de drenagem e ativariam as células T CD4.

O granuloma compacto apresenta área central, com células fúngicas englobadas por células gigantes multinucleadas, rodeadas, eventualmente, por infiltrado neutrofílico, evidenciadas com dificuldade e podendo apresentar sinais de inviabilidade. Na região periférica, há densos agregados de células epitelioides circundados por linfócitos (BRITO; FRANCO, 1994). No padrão de resposta granulomatosa dito frouxo, observam-se menor número de células epitelioides e numerosas células polimorfonucleares distribuídas ao redor da região central, que está ocupada por edema, exsudato serofibrinoso e grande quantidade de fungos em ativa multiplicação (MONTENEGRO; FRANCO, 1994).

Quando os granulomas são compactos (densos) eles são efetivamente capazes de conter a proliferação fúngica, entretanto, quando eles são frouxos a sua função protetora deixa de existir e as leveduras do fungo conseguem se multiplicar (COCK et al., 2000). O tipo de resposta imune contra a ação do fungo é que definirá a forma como a doença irá se desenvolver, uma vez que, adquirida a infecção, é o sistema imune do hospedeiro que irá determinar a extensão e a gravidade da doença (RAMOS-E-SILVA, 2004).

Células gigantes multinucleadas são formadas pela fusão de macrófagos e desempenham funções importantes em inúmeros processos fisiológicos e

patológicos. Estas células foram inicialmente descritas por Langhans em 1868, que relatou a presença de células polinucleares em granulomas da tuberculose. Trabalhos subsequentes a estas observações preliminares têm demonstrado que células gigantes multinucleadas são formadas como resultado da fusão de células pertencentes à linhagem monócito/macrófago e representam uma via para a diferenciação terminal dos macrófagos. Sendo assim, a formação de células gigantes representa um processo de hibridização homotípica natural das células, levando à modulação de funções secretoras e sintéticas dos macrófagos. Em indivíduos saudáveis, células gigantes multinucleadas são encontradas nos ossos, onde são denominadas osteoclastos. Entretanto, a formação de células gigantes em tecidos não-esqueléticos pode originar-se como resultado de inflamação crônica devido a presença de material estranho que é indigerível, ou pobremente digerível, ou de patógenos persistentes que não são eliminados por várias razões (QUINN; SCHEPETKIN, 2009).

As células gigantes multinucleadas inflamatórias são um aspecto comum dos granulomas que se desenvolvem em tecidos de doenças infecciosas crônicas como a tuberculose e a PCM. Elas são caracteristicamente formadas em resposta aos patógenos intracelulares que não foram eliminados pelos macrófagos. Nascimento et al. (2008) afirmaram que é provável que as CGMs encontradas no granuloma da PCM estejam envolvidas no sequestro e destruição dos fungos no tecido. Estas células gigantes também representam um componente ativo, possivelmente envolvido na formação e *turnover* do granuloma, assim como na destruição de agentes irritantes.

Morfologicamente, as células gigantes multinucleadas são classificadas em células gigantes de Langhans ou células gigantes de corpo estranho. Células gigantes de Langhans são encontradas em doenças granulomatosas infecciosas tais como tuberculose e esquistossomose ou em desordens granulomatosas de etiologia desconhecida tais como sarcoidose. Células gigantes de Langhans são caracterizadas por um número relativamente pequeno de núcleos, geralmente menos de 20, dispostas em um arranjo periférico circular dentro da célula gigante. As de corpo estranho normalmente apresentam um número maior de núcleos, acima de 20, que se dispõem aleatoriamente na célula gigante. As de Langhans são comumente vistas em granulomas imunes com macrófagos epiteiloides e estão associadas com partículas indigeríveis de organismos circundados por um colar de

linfócitos. O colar de linfócitos circundando os granulomas imunes é indicativo de imunidade mediada por células-T desencadeada pelo agente agressor e os produtos dos linfócitos T ativados, principalmente interferon-gama, iniciam a fusão de monócitos e macrófagos para formar as células gigantes de Langhans. As células gigantes de corpo estranho são mais comumente encontradas em granulomas de corpo estranho, onde o material indigerível ou pobremente digerível está circundado ou encapsulado por uma camada delgada (uma a duas células de espessura) de macrófagos e células gigantes tipo corpo estranho. O colar linfocítico visto nos granulomas imunes não são encontrados nos granulomas corpo estranho. O granuloma corpo estranho mais comum é o granuloma de suturas, em que os macrófagos e as células gigantes estão presentes na superfície da sutura e esta camada de células é encapsulada por tecido conjuntivo fibroso (ANDERSON, 2000).

Em 2008, Helming; Gordon afirmaram que a multinucleação das células gigantes de corpo estranho encontradas durante a resposta do hospedeiro ao material estranho parece induzir um aumento no tamanho destas células e, conseqüentemente, uma capacidade aumentada para degradar partículas maiores com ou sem ingestão. Entretanto, o tamanho destas células realmente importa? Na tuberculose, onde as células gigantes são um aspecto proeminente, as paredes do *Mycobacterium tuberculosis* são pobremente degradáveis e foi encontrado que as células gigantes, particularmente em granulomas tuberculoideos, podem apresentar uma capacidade fagocitária diminuída. Outra possibilidade é que através da fusão dos macrófagos, propriedades de diferentes células individuais são combinadas para adquirir uma nova função na célula multinucleada. Estes autores concluíram que o significado funcional das células gigantes multinucleadas durante a inflamação granulomatosa necessita ser determinado.

Nascimento et al. (2011) avaliaram o efeito modulador do fator estimulador de colônias de macrófagos granulócitos em associação com outras citocinas, tais como interferon-gama, fator de necrose tumoral alfa, interleucina-10 ou fator de crescimento transformante beta na formação de células gigantes multinucleadas dos monócitos sanguíneos periféricos humanos estimulados com o antígeno do *Paracoccidioides brasiliensis*. Os resultados demonstraram que os monócitos incubados com as citocinas pró e antiinflamatórias induziram um número maior de células gigantes de corpo estranho do que de Langhans. Para Okamoto; Mizuno; Horio (2003), algumas citocinas têm uma tendência de induzir células gigantes de

Langhans e outras facilmente induzem de corpo estranho. O equilíbrio destas citocinas produzidas localmente em lesões granulomatosas pode decidir que tipo de células gigantes serão formadas.

A análise citomorfométrica é um método eficiente e aceitável capaz de identificar características estruturais e morfológicas quantitativas de células e tecidos em planos bidimensionais (WHITE; JIN; YANG, 1994; SOMANATHAN; ŠIMUNEK, 2006). Este método tem sido aplicado para avaliar algumas alterações estruturais de células em tecidos normais e anormais, incluindo lesões centrais de células gigantes (ABRAMS; SHEAR, 1977; FORNASIER et al., 1996). A aplicação de técnicas quantitativas associadas com a evolução dos sistemas de análise de imagens tem propiciado uma melhora na precisão de estudos citomorfométricos (PEKTAS et al., 2006).

Ficarra; Kaban; Hansen (1987), Auclair et al. (1988) e Appel et al. (2003) observaram em seus estudos alguns parâmetros celulares e nucleares, quantitativos e morfológicos, como possíveis preditores histológicos de comportamento biológico para estabelecer critérios diagnósticos das variantes agressivas. Assim como Flórez-Moreno et al. (2008) em seu estudo comparativo entre lesões de células gigantes centrais (LCGC) e periféricas (LCGP) na maxila por meio de uma análise citomorfométrica e imuno-histoquímica, observaram que a sobre-expressão de CD68 e a maior proporção de macrófagos a CGMs observadas em LCGCs podem estar associadas ao comportamento clínico das lesões, como a taxa de crescimento, os sintomas, reabsorção óssea ou dentária e recorrência.

Não há estudo na literatura, até o presente momento, que avaliou as características das CGMs em lesões bucais por paracoccidiodomicose e as comparou com a imunomarcagem para CD163. A PCM, endêmica na região de Alfenas-MG, uma importante região produtora e exportadora de café do Brasil, constitui-se uma doença de saúde pública com impacto econômico por comprometer a saúde dos trabalhadores durante sua fase produtiva, a ponto de levá-los a óbito. Uma melhor compreensão do mecanismo envolvido no papel das Células Gigantes Multinucleadas no infiltrado inflamatório do processo infeccioso provocado pelo *P. brasiliensis* nas lesões bucais poderia, então, auxiliar no desenvolvimento de novas terapêuticas contra este fungo.

3 PROPOSIÇÃO

Constituiu-se proposição do presente estudo analisar a presença e a morfologia das Células Gigantes Multinucleadas Inflamatórias, em granulomas inflamatórios do tipo denso e frouxo, imunomarcadas pelo CD163, em fragmentos de biópsias obtidas de lesões bucais de pacientes portadores de paracoccidiodomicose e correlacionar com o número de fungos *Paracoccidioides brasiliensis* imunomarcados pelo Anti-Pb.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O Material e os métodos tiveram os dados coletados e preparados na ordem seguinte.

4.1 QUESTÕES ÉTICAS

O presente estudo foi desenvolvido após apreciação e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da UNIFAL-MG. O número de sua aprovação é 814.059 (ANEXO A).

4.2 CASUÍSTICA, SELEÇÃO E PREPARO DA AMOSTRA

As 26 amostras incluídas neste estudo foram obtidas dos Arquivos do Laboratório de Anatomopatologia Bucal da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). Todos os casos com diagnóstico definitivo de paracoccidiodomicose, confirmados através da análise microscópica de lâminas coradas em hematoxilina e eosina (HE), foram levantados e revistos por dois patologistas experientes (JACH e AACP). Os casos que apresentavam quantidade suficiente de material emblocado em parafina e granulomas densos ou frouxos foram incluídos no estudo. Lâminas (cortes) que apresentaram material insuficiente ou para análise foram excluídas do estudo.

Os tecidos obtidos das biópsias foram previamente fixados em solução neutra tamponada de formalina 10%, por 24 h, a 4°C e então submetidos ao processamento histológico, inclusão em parafina e microtomia. Seis cortes teciduais seriados de espessura de 3 micrometros (μm) foram montados sobre lâminas carregadas positivamente, preparadas através da imersão das mesmas em solução de ATPS (3-aminopropyltriethoxysilene; Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) a 5%. Em seguida as lâminas de vidro contendo os cortes histológicos foram mantidas em

estufa durante 1 hora, a uma temperatura de aproximadamente 50°C, para fixação dos cortes histológicos nas mesmas. Após fixação, os cortes histológicos foram desparafinados através de imersões consecutivas em xilol e reidratados por passagens sucessivas em etanol em concentrações decrescentes (etanol absoluto, etanol 90%, 80% e 70%). Um corte de cada fragmento foi corado pela técnica convencional da HE, seguindo-se os procedimentos histotécnicos de rotina do Laboratório de Anatomopatologia Bucal da UNIFAL-MG, e montados em lâminas de vidro para rotina. Os demais foram reservados para a análise imuno-histoquímica.

4.3 REAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA

Após a desparafinização e a reidratação, o bloqueio da peroxidase endógena dos tecidos foi realizado com o objetivo de eliminar reações inespecíficas. Para tanto, as lâminas foram imersas em solução de peróxido de hidrogênio a 1,5% e metanol absoluto (v/v) durante 20 minutos, com posterior lavagem em água destilada. Previamente à incubação com o anticorpo primário, as amostras foram submetidas à reativação antigênica, com a finalidade de recuperar os sítios antigênicos mascarados pela fixação e inclusão do tecido em formol e parafina. Para este fim, as lâminas foram imersas em tampão citrato 0,01 M, pH 6,0 durante 35 minutos, em banho-maria ajustado para 95–98°C e logo após, mantidas durante 20 minutos à temperatura ambiente, fora do banho-maria, e lavadas em água destilada e PBS. A imunodeteção das proteínas de interesse foi realizada utilizando os anticorpos anti-humanos para CD163 (10D6, 1:500, Vector Labs cat#VP-C374, Burlingame, CA, EUA) e Pb (polyclonal, 1:200.000, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, Brasil). A solução contendo cada anticorpo foi adicionada sobre os cortes teciduais, individualmente, e as lâminas foram mantidas em câmara úmida durante 12–16 horas, a uma temperatura de 2–8°C. A seguir, as lâminas passaram por uma lavagem em PBS e os cortes histológicos, incubados com o anticorpo secundário biotilado anti-IgG (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA), seguindo a especificidade adequada aos anticorpos primários, em câmara úmida durante 50 minutos à temperatura ambiente. As lâminas lavadas em PBS e a detecção foram realizadas utilizando o sistema da streptavidina-biotina-peroxidase

(Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA). Após 30 minutos de incubação em câmara úmida dos cortes com a solução de streptavidina-biotina-peroxidase à temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas com PBS e a detecção foi completada utilizando-se uma solução cromógena contendo 0,03% de 3,3'-diaminobenzidina (3,3',4,4'-tetraaminobifeniltetrahydrocloro) e 0,3% de peróxido de hidrogênio (Merck, Whitehouse Station, NJ, EUA). Posteriormente foi realizada contra-coloração dos cortes histológicos em solução de hematoxilina de Harris, desidratação das mesmas através de imersões em concentrações crescentes de etanol (etanol 70%, 80%, 90% e etanol absoluto), diafanização em xilol e montagem em meio de montagem permanente. Para cada reação foi utilizado um controle negativo, o qual foi incubado somente com a solução diluente (abolição do anticorpo primário).

4.4 ANÁLISE MICROSCÓPICA

A análise microscópica foi realizada sem o conhecimento prévio dos dados clínicos dos pacientes, utilizando-se um microscópio óptico binocular (Axio Lab - Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) contendo uma lente objetiva N-Achroplan de 40X/0,65, resultando num aumento final de 400X. O tamanho das Células Gigantes Inflamatórias foi determinado através das medidas da área celular e do perímetro celular. As Células Gigantes Multinucleadas foram classificadas como tipo Langhans ou tipo corpo estranho, conforme descrito por Anderson (2000). Além disso, realizou-se a contagem de células gigantes em cada campo capturado e também a contagem do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*.

As lâminas coradas pelos marcadores CD163 e Anti-Pb foram analisadas em microscópio de luz com objetivas de 10X e 40X, percorrendo toda a extensão do corte. Foram capturados 10 campos consecutivos de cada amostra com aumento de 400X para análise.

Através de um teste cego foi realizado com o auxílio de um programa de captura de imagens (AxioVision Rel. 4.8.2- Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) instalado em um microcomputador, a demarcação dos tamanhos das células através da área celular (AC) e perímetro celular (PC). Além disso, foi realizada a contagem

de células em cada campo capturado. Para a aquisição das imagens, utilizou-se uma câmera fotográfica digital (AxioCam MRc 1.4 Mb- Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) acoplada a um microscópio óptico binocular (Axio Lab- Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) contendo uma lente objetiva N-Achroplan de 40X/0,65; resultando num aumento final de 400X.

As medições foram feitas traçando os contornos das Células Gigantes Multinucleadas com um conjunto de mesa e caneta digitalizadora (Genius WizardPen 8x6; KYE Systems Europe, Langenfeld, Alemanha) como proposto por Florez-Moreno et al. (2008) (FIGURA 1).

A quantificação do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* foi realizada através da imunomarcação com o anticorpo Pb em 10 campos aleatórios para cada caso, utilizando o software AxioVision Rel. 4.8.2. Obteve-se a média de fungos por campo analisado para cada caso. Somente foram quantificados os fungos considerados viáveis, quando apresentaram sua morfologia totalmente preservada. Quando houve células em estágio reprodutivo por gemulação, estas foram contadas como apenas uma única célula, como preconizado por Batista; Soares; Lara (2005).

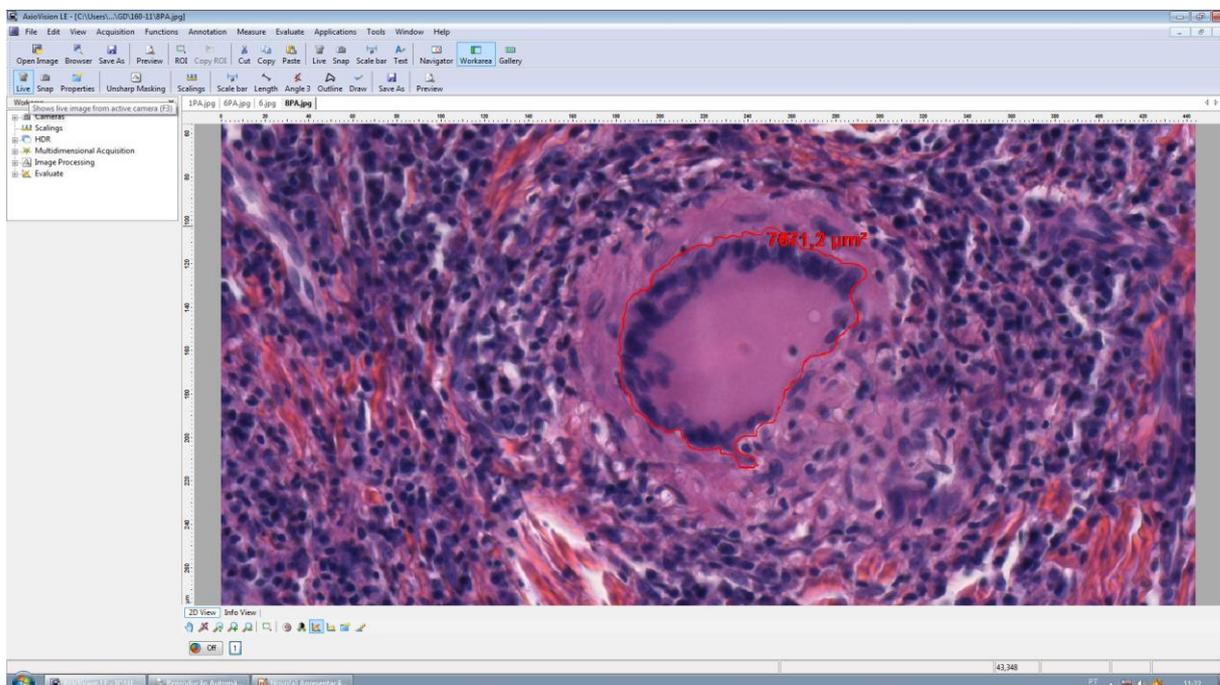


Figura 1 - Imagem ilustrando como foram realizadas as contagens das áreas e dos perímetros das Células Gigantes Multinucleadas.

Fonte: Do autor.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os registros das informações microscópicas dos pacientes portadores de PCM foram armazenados em um banco de dados, elaborado em planilha eletrônica do Microsoft Excel.

A correlação entre as variáveis microscópicas: número de CGMs, perímetro e área das CGMs e a quantidade de fungos nos tecidos foi realizada pelos testes Teste *t* de Student e o Teste de Spearman e U Mann Whitney considerando-se o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

A quantidade de células gigantes multinucleadas totais, de Langhans e de corpo estranho presentes nos granulomas frouxos e densos estão descritas na Tabela 1. Quando se levou em conta apenas a variável número total de células gigantes, verificou-se que, nos 14 casos em que os granulomas eram frouxos, houve uma variação de 1,8 a 4,7 células gigantes com um valor médio de 2,7 células gigantes por caso. Nos 12 casos classificados como granulomas densos, o valor médio foi de 3,4, com uma variação 1,9 a 5,5 células gigantes por caso. Comparando-se apenas a presença de células gigantes tipo corpo estranho presentes nos 26 casos, o número médio foi maior nos granulomas densos (1,6 contra 0,9) e houve uma variação de 0,9 a 2,6; valores estes estatisticamente significantes. Em relação às células gigantes de Langhans, tanto o número médio quanto a variação apresentaram valores muito semelhantes nos dois tipos de granulomas estudados.

Tabela 1 - Distribuição da contagem de células gigantes multinucleadas de acordo com o tipo de granuloma

Variável	Categoria / Medidas	Granulomas		p
		Frouxo	Denso	
Células Gigantes Totais	N	14	12	0,172 *
	Variação (mín-máx)	1,8 – 4,7	1,9 – 5,5	
	Mediana	2,5	3,2	
	Média	2,7	3,4	
	Desvio Padrão	0,7	1,2	
Células Gigantes de Corpo Estranho	N	14	12	<0,001*
	Variação (mín-máx)	0,5 – 1,8	0,9 – 2,6	
	Mediana	0,8	1,4	
	Média	0,9	1,6	
	Desvio Padrão	0,3	0,5	
Células Gigantes de Langhans	N	14	12	0,837*
	Variação (mín-máx)	0,9 – 4,0	0,6 – 3,4	
	Mediana	1,7	1,4	
	Média	1,8	1,7	
	Desvio Padrão	0,8	0,9	

* valor de p obtido pelo teste *t student*

Fonte: Do autor.

Para a realização da comparação entre o número de células gigantes e o número de fungos *Paracoccidioides brasiliensis* marcados pelo anticorpo Anti-Pb, os casos foram classificados, de acordo com o número médio de fungos, em dois grupos: menor ou igual a 5,4 e maior que 5,4. Ao analisar o número total de células gigantes, observou-se que, nos casos em que o número de fungos era menor ou igual a 5,4; o número médio de células gigantes era de 2,8 (com uma variação de 2,3 a 4) e, nos casos em que o número de fungos era maior que 5,4; o número total de células gigantes variava de 1,8 a 5,5 (com uma média de 3,2). Quando se comparou o número de células gigantes corpo estranho e de Langhans com o número de fungos, não se observou diferenças expressivas (TABELA 2). Há que se destacar que em um caso não foi possível fazer a contagem de fungos.

Tabela 2 - Distribuição da contagem de células gigantes multinucleadas de acordo com a contagem de fungos

Variável	Categoria	Anti-Pb		p
		Freq. ≤ 5,4	Freq. > 5,4	
Células Gigantes Totais	N	12	13	0,806 *
	Varição (mín-máx)	2,3 – 4,0	1,8 – 5,5	
	Mediana	2,6	2,5	
	Média	2,8	3,2	
	Desvio Padrão	0,5	1,3	
Células Gigantes de Corpo Estranho	N	12	13	0,891 *
	Varição (mín-máx)	0,6 – 2,0	0,5 – 2,6	
	Mediana	1,1	1,2	
	Média	1,2	1,3	
	Desvio Padrão	0,4	0,7	
Células Gigantes de Langhans	N	12	13	0,683 *
	Varição (mín-máx)	0,9 – 2,6	0,6 – 4,0	
	Mediana	1,6	1,4	
	Média	1,6	1,9	
	Desvio Padrão	0,6	1,1	

* valor de p obtido pelo teste *U de Mann-Whitney*

Fonte: Do autor.

A quantidade de fungos *Paracoccidioides brasiliensis* marcados pelo anticorpo Anti-Pb nos casos classificados como granulomas frouxos variou entre 1,4 e 64, com uma média de nove fungos por caso. Nos granulomas densos, o número médio de fungos por caso foi de 5,2; com uma variação de 1,3 a 10,3 fungos por caso (TABELA 3). Em um caso não foi possível fazer a contagem de fungos.

Tabela 3 - Distribuição da contagem de fungos imunomarcados pelo Anti-Pb de acordo com o tipo de granuloma

Variável	Categoria / Medidas	Granulomas		p
		Frouxo	Denso	
Fungos imunomarcados pelo Anti-Pb	N	14	11	0,40
	Varição	1,4 – 64	1,3 – 10,3	
	Mediana	3,9	5,4	
	Média	9,0	5,2	
	Desvio Padrão	16,15	2,89	

* valor de *p* obtido pelo teste *t student* / Análise feita com logarítimo natural do valor
Fonte: Do autor.

Quando se levou em conta apenas os fungos *Paracoccidioides brasiliensis* marcados pelo anticorpo Anti-Pb que estavam localizados no interior das células gigantes multinucleadas, observou-se que nos casos classificados como granulomas frouxos o número de fungos era maior (3,41) que o observado nos casos classificados como granulomas densos (1,89), como descrito na Tabela 4. A contagem de fungos não pode ser realizada em um caso.

Tabela 4 - Distribuição da contagem de fungos intracelulares imunomarcados pelo Anti-Pb de acordo com o tipo de granuloma

Variável	Categoria / Medidas	Granulomas		p
		Frouxo	Denso	
Fungos imunomarcados pelo Anti-Pb intracelular	N	14	11	0,47
	Varição	0,2 – 25,4	0,6 – 3,5	
	Mediana	1,7	1,8	
	Média	3,41	1,89	
	Desvio Padrão	6,4	1,05	

* valor de *p* obtido pelo teste *t student*
Fonte: Do autor.

As células gigantes multinucleadas presentes nos casos classificados como granulomas frouxos apresentavam um tamanho médio de 1671,58 micrometros quadrados (μm^2) e, nos granulomas densos, de 1781,38 μm^2 . Comparando-se apenas as células gigantes de corpo estranho, notou-se que as de tamanho médio maior estavam presentes nos granulomas densos. Já em relação às células gigantes de Langhans, observou-se que nos granulomas frouxos houve uma maior variação no tamanho (966,75-2608,98 μm^2), entretanto o tamanho médio foi ligeiramente inferior ao encontrado nos granulomas densos (TABELA 5 e FIGURAS 2 e 3).

Tabela 5 – Dados citomorfométricos de área celular das células gigantes multinucleadas presentes nos casos de paracoccidiodomicose

Variável	Categoria	Granuloma Frouxo	Granuloma Denso
Área das Células Gigantes Totais	N	14	12
	Varição (mín-máx)	1025,23 - 2614,55	831,88 - 3933,47
	Média (μm^2)	1671,58	1781,38
	Mediana (μm^2)	1335,77	1443,02
Área das Células Gigantes de Corpo Estranho	N	14	12
	Varição (mín-máx)	884,37 – 3701,37	1015,14 - 6087,73
	Média (μm^2)	2063,83	2460,35
	Mediana (μm^2)	1584,46	1965,43
Área das Células Gigantes de Langhans	N	14	12
	Varição (mín-máx)	965,75 – 2608,98	786,35 - 1915,82
	Média (μm^2)	1428,04	1432,04
	Mediana (μm^2)	1315,20	1236,90

* valor de *p* obtido pelo teste *t student*

Fonte: Do autor.

No que diz respeito ao perímetro das células gigantes multinucleadas, nos granulomas frouxos o perímetro médio foi de 181,45 μm e, nos granulomas densos, de 183,86 μm . O perímetro médio das células gigantes de corpo estranho era maior nos granulomas densos (222,88 μm) e bem semelhante nos dois tipos de granulomas, quando se levou em conta apenas as células gigantes de Langhans (TABELA 6 e FIGURAS 2 e 3).

Tabela 6 – Dados citomorfométricos de perímetro celular das células gigantes multinucleadas presentes nos casos de paracoccidiodomicose

Variável	Categoria	Granuloma Frouxo	Granuloma Denso
Perímetro Células Gigantes Totais	N	14	12
	Varição (mín-máx)	135,04 – 258,26	119,44 – 255,68
	Média (μm)	181,45	183,86
	Mediana (μm)	166,32	179,62
Perímetro Células Gigantes de Corpo Estranho	N	14	12
	Varição (mín-máx)	115,29 – 272,08	136,45 – 379,26
	Média (μm)	193,95	222,88
	Mediana (μm)	169,55	199,23
Perímetro Células Gigantes de Langhans	N	14	12
	Varição (mín-máx)	137,38 – 206,52	114,80 – 220,32
	Média (μm)	169,42	166,52
	Mediana (μm)	165,45	159,65

* valor de p obtido pelo teste *t student*

Fonte: Do autor.

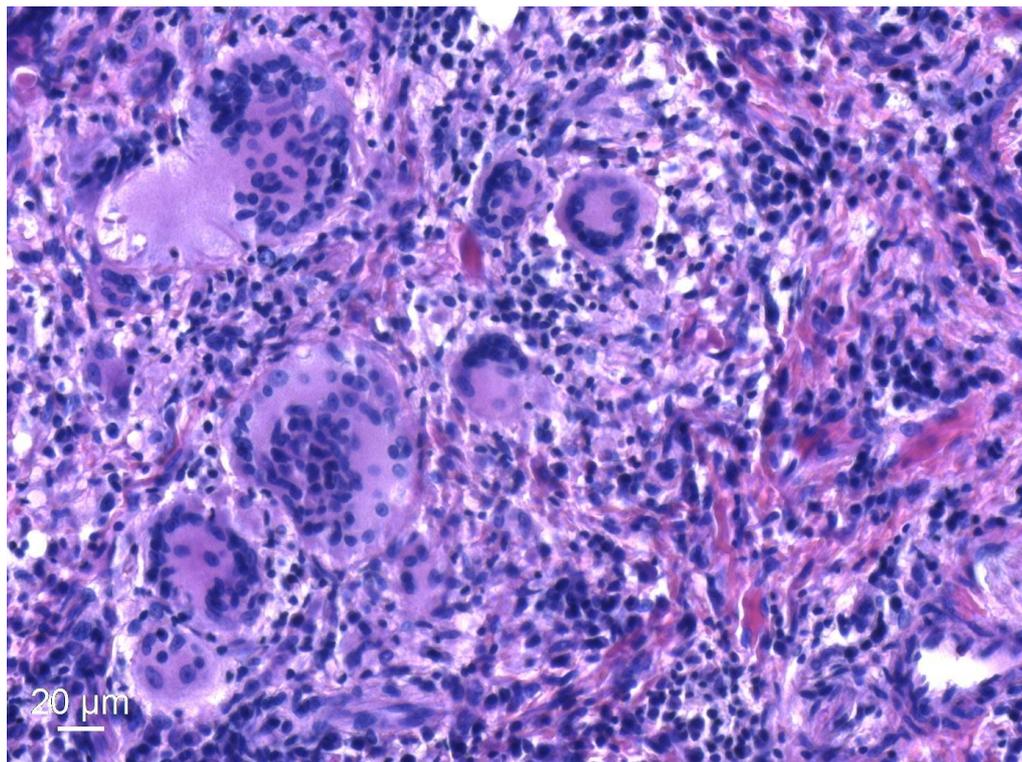


Figura 2 - Imagem microscópica de um caso classificado como granuloma frouxo apresentando inúmeras células gigantes multinucleadas dos tipos Langhans e corpo estranho (Coloração: H.E.)

Fonte: Do autor.

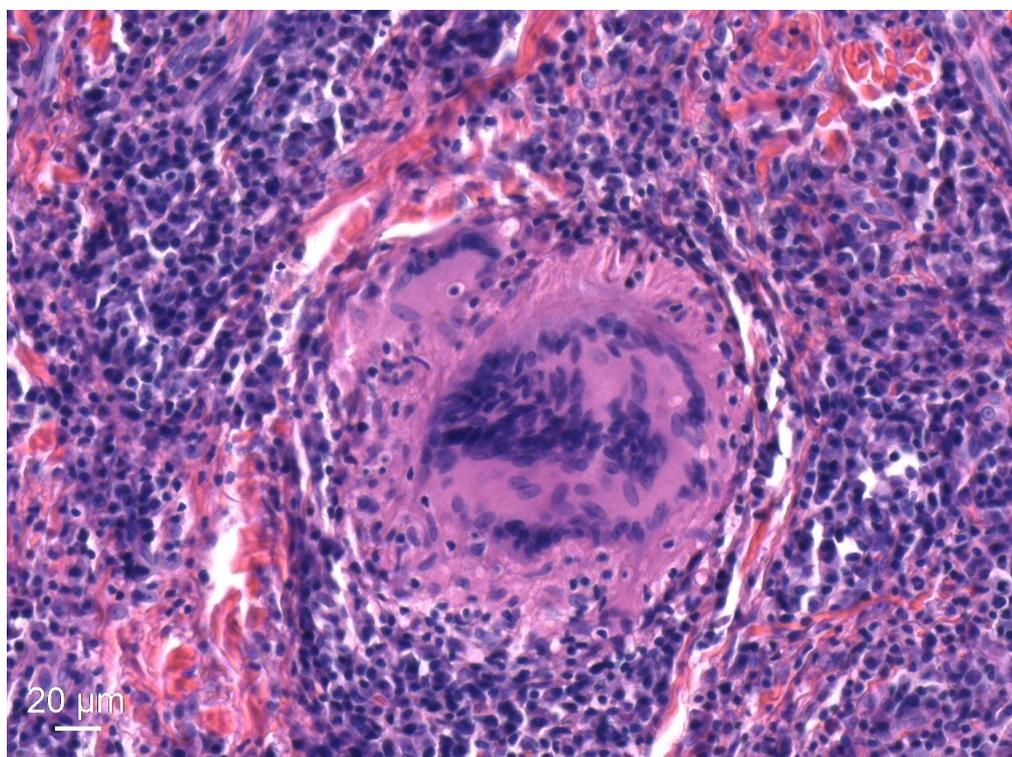


Figura 3 - Imagem microscópica de um caso classificado como granuloma denso apresentando apenas duas células gigantes multinucleadas dos tipos Langhans e corpo estranho. A do tipo corpo estranho apresenta-se com uma área maior que a de Langhans (Coloração: H.E.)

Fonte: Do autor.

O número de células gigantes multinucleadas imunomarcadas pelo CD163 encontrado nos casos classificados como granulomas frouxos variou de 0,8 a 5,4; com uma média de 2,25 por caso. Nos casos classificados como granulomas densos, houve uma variação menor (0,3-4,3) assim como um número menor de células gigantes imunomarcadas pelo CD163 (TABELA 7 e FIGURAS 4 e 5).

Tabela 7 - Distribuição da contagem de células gigantes multinucleadas imunomarcadas pelo CD163 de acordo com o tipo de granuloma

Variável	Categoria / Medidas	Granulomas		p
		Frouxo	Denso	
Células Gigantes CD163+	N	14	12	0,42
	Variação (mín-máx)	0,8 – 5,4	0,3 – 4,3	
	Mediana	2,05	1,45	
	Média	2,25	2,15	
	Desvio Padrão	1,19	1,47	

* valor de *p* obtido pelo teste *t student*

Fonte: Do autor.

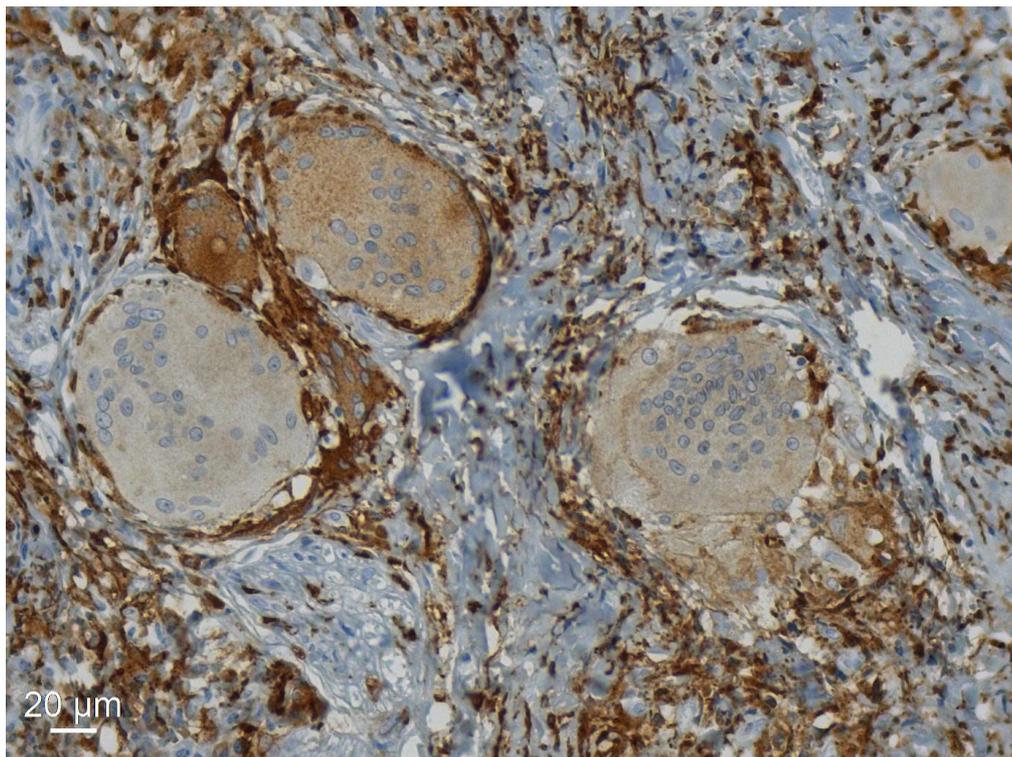


Figura 4 - Padrão de marcação do anticorpo CD163 de um caso classificado como granuloma frouxo apresentando inúmeras células gigantes multinucleadas dos tipos Langhans e corpo estranho (Coloração: Anti CD163)

Fonte: Do autor.

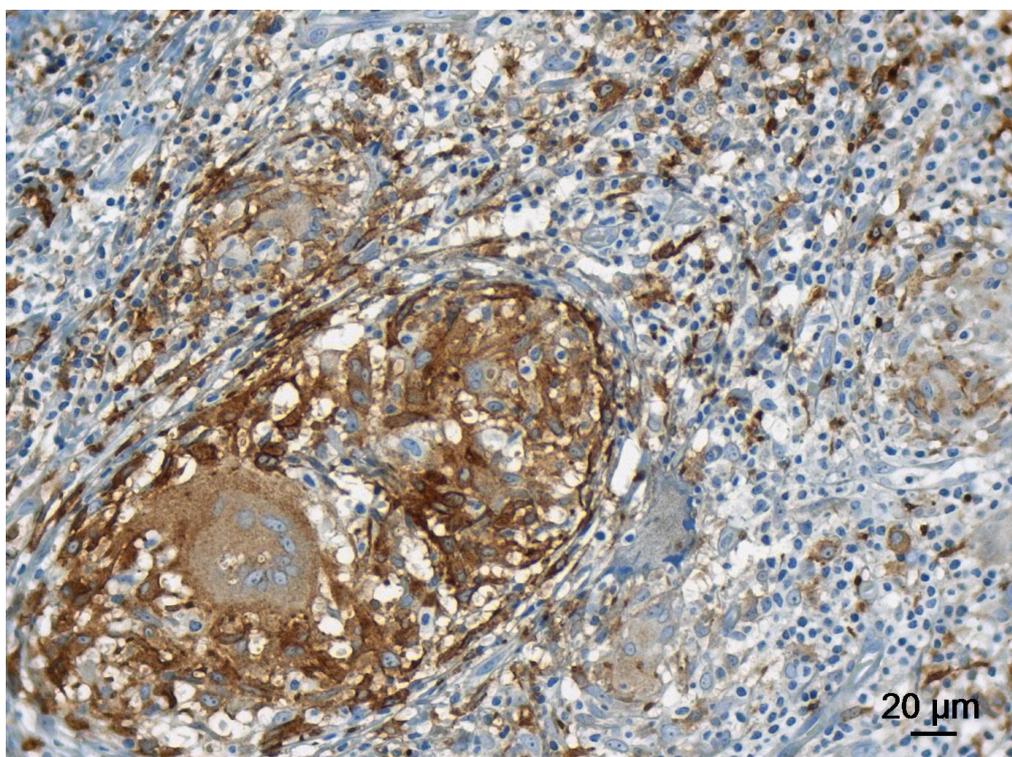


Figura 5 - Padrão de marcação do anticorpo CD163 de um caso classificado como granuloma denso. Destaca-se o número menor de células gigantes multinucleadas imunomarcadas (Coloração: Anti CD163)

Fonte: Do autor.

Quando se comparou o número total de células gigantes multinucleadas com o número de células gigantes multinucleadas imunomarcadas pelo CD163 presentes nos dois tipos de granulomas, frouxo e denso, verificou-se que nos granulomas densos o número médio de células gigantes foi de 3,38; enquanto que havia apenas 2,15 células imunomarcadas pelo CD163. Nos casos classificados como granulomas frouxos, observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre a média de células gigantes (2,62) e a de células gigantes positivas para CD163. Valores semelhantes estatisticamente significativos também foram encontrados quando não se levou em conta o tipo de granuloma, conforme demonstrado na Tabela 8.

Tabela 8 - Correlação entre células gigantes multinucleadas e células gigantes multinucleadas imunomarcadas pelo CD163

Variável	Categoria / Medidas	CGM	CD163	<i>p</i>
Granuloma Denso	N	12	12	0,08*
	Variação (mín-máx)	2,2 – 5,5	0,3 – 4,3	
	Mediana	3,1	1,45	
	Média	3,38	2,15	
	Desvio Padrão	1,14	1,47	
Granuloma Frouxo	N	14	14	0,007*
	Variação (mín-máx)	1,8 – 4,7	0,8 – 5,4	
	Mediana	2,5	2,05	
	Média	2,62	2,25	
	Desvio Padrão	0,7	1,19	
Total (Denso e Frouxo)	N	26	26	0,003*
	Variação (mín-máx)	0,9 – 4,0	0,6 – 3,4	
	Mediana	1,7	1,4	
	Média	1,8	1,7	
	Desvio Padrão	0,8	0,9	

* valor de *p* obtido pelo coeficiente de Spearman adotando-se 5% como nível de significância
Fonte: Do autor.

Na Tabela 9 encontramos a correlação entre o número de fungos imunomarcados pelo Anti-Pb e o número de células gigantes multinucleadas marcadas pelo anticorpo CD163 nos diferentes tipos de granulomas. Embora se tenha notado um número médio maior de fungos imunomarcados nos casos de granulomas frouxos (9,0) contra 5,2 nos granulomas densos, estes valores não foram estatisticamente significativos. Quanto ao número de células gigantes CD163 positivas, o número médio foi bem semelhante nos dois tipos de granulomas.

Tabela 9 - Correlação entre o número de fungos imunomarcados pelo Anti-Pb e células gigantes multinucleadas imunomarcadas pelo CD163

Variável	Categoria / Medidas	Anti-PB	CD163	<i>p</i>
Granuloma Denso	N	11	11	0,14*
	Variação (mín-máx)	1,3 – 10,3	0,9 – 4,3	
	Mediana	5,4	1,5	
	Média	5,2	2,32	
	Desvio Padrão	2,89	1,41	
Granuloma Frouxo	N	14	14	0,94*
	Variação (mín-máx)	1,4 – 64	0,8 – 5,4	
	Mediana	3,9	2,05	
	Média	9,0	2,25	
	Desvio Padrão	16,15	1,19	
Total (Denso e Frouxo)	N	25	25	0,14*
	Variação (mín-máx)	1,3 – 64	0,8 – 5,4	
	Mediana	4,7	2	
	Média	7,35	2,28	
	Desvio Padrão	12,18	1,27	

* valor de *p* obtido pelo coeficiente de Spearman adotando-se 5% como nível de significância
Fonte: Do autor.

O número médio de fungos no interior das células gigantes multinucleadas foi mais elevado nos casos classificados como granulomas frouxos (3,41). Por outro lado, o número médio de células gigantes multinucleadas imunomarcadas pelo CD163 foi maior nos casos de granulomas densos. Vale ressaltar que não houve diferenças estatisticamente significativas entre estas variáveis (TABELA 10 e FIGURAS 6 e 7).

Tabela 10 - Correlação entre o número de fungos intracelulares imunomarcados pelo Anti-Pb e células gigantes multinucleadas imunomarcadas pelo CD163

Variável	Categoria / Medidas	Anti-Pb IC	CD163	P
Granuloma Denso	N	11	11	0,16*
	Variação (mín-máx)	0,6 – 3,5	0,9 – 4,3	
	Mediana	1,8	1,5	
	Média	1,89	2,32	
	Desvio Padrão	1,05	1,41	
Granuloma Frouxo	N	14	14	0,93*
	Variação (mín-máx)	0,2 – 25,4	0,8 – 5,4	
	Mediana	1,7	2,05	
	Média	3,41	2,25	
	Desvio Padrão	6,41	1,19	
Total (Denso e Frouxo)	N	25	25	0,21*
	Variação (mín-máx)	0,2 – 25,4	0,8 – 5,4	
	Mediana	1,7	2	
	Média	2,74	2,28	
	Desvio Padrão	4,83	1,27	

* valor de *p* obtido pelo coeficiente de Spearman adotando-se 5% como nível de significância
 Fonte: Do autor.

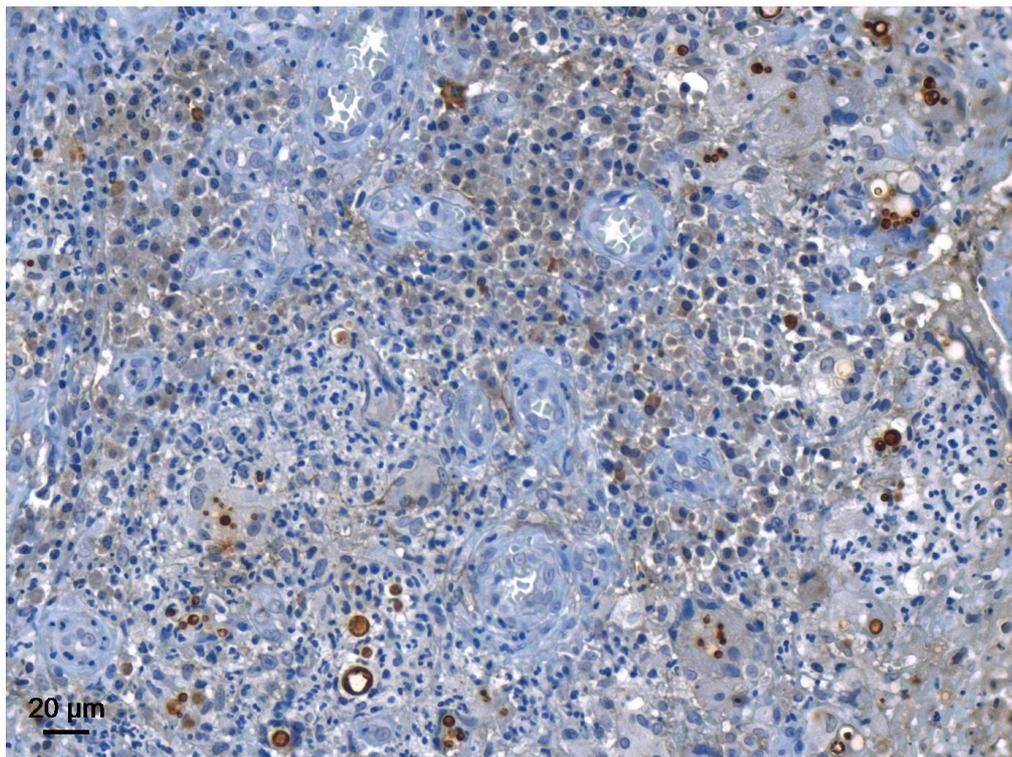


Figura 6 - Fotomicrografia de um caso classificado como granuloma frouxo. Destaca-se o número elevado de estruturas compatíveis com o fungo *Paracoccidioides brasiliensis* coradas pelo Anti-Pb (Coloração: Anti-Pb)

Fonte: Do autor.

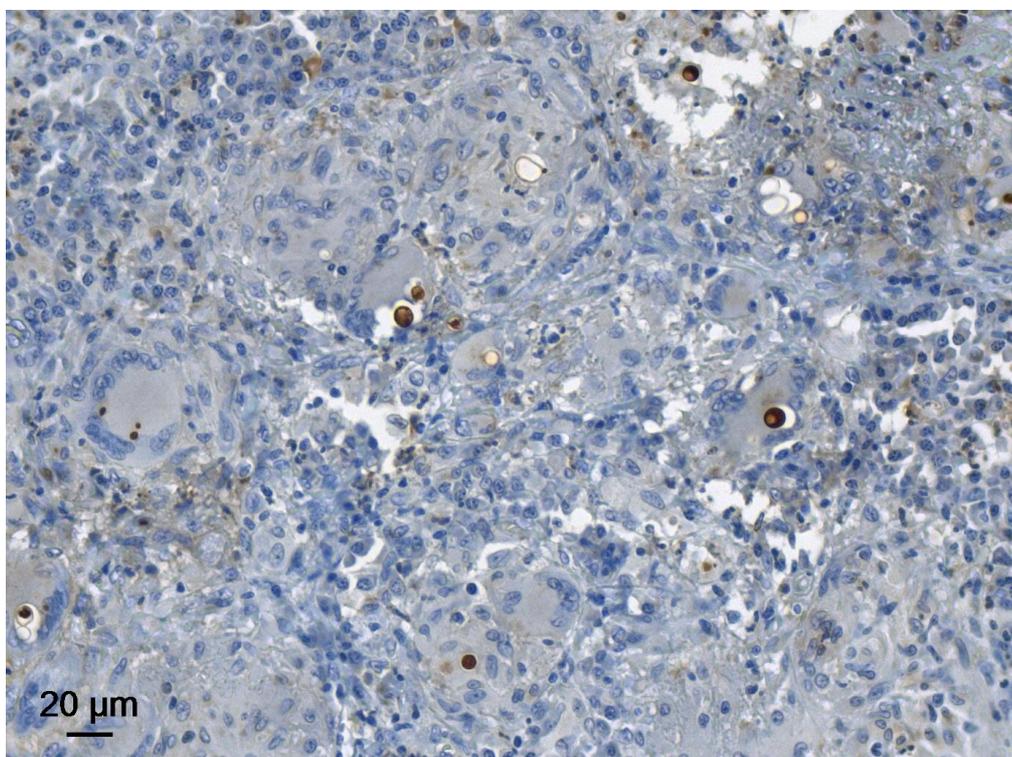


Figura 7 - Fotomicrografia de um caso classificado como granuloma denso. Observa-se que a maioria dos fungos corados pelo Anti-Pb localiza-se no interior das células gigantes multinucleadas de Langhans (Coloração: Anti-Pb)

Fonte: Do autor.

Quando se comparou o número de fungos localizados no interior das células gigantes multinucleadas com o número de células gigantes multinucleadas presentes nos dois tipos de granulomas, o número médio de fungos observado nos granulomas frouxos foi maior que o observado nos granulomas densos. Já, em relação ao número de células gigantes multinucleadas, o número mais elevado foi observado nos granulomas densos (TABELA 11).

Tabela 11 - Correlação entre o número de fungos intracelulares imunomarcados pelo Anti-Pb e o número de células gigantes multinucleadas

Variável	Categoria / Medidas	Anti-Pb IC	CGM	<i>p</i>
Granuloma Denso	N	11	11	0,02*
	Variação (mín-máx)	0,6 – 3,5	2,2 – 5,5	
	Mediana	1,8	3	
	Média	1,89	3,38	
	Desvio Padrão	1,05	1,2	
Granuloma Frouxo	N	14	14	0,24*
	Variação (mín-máx)	0,2 – 25,4	1,8 – 4,7	
	Mediana	1,7	2,5	
	Média	3,41	2,62	
	Desvio Padrão	6,41	0,71	
Total (Denso e Frouxo)	N	25	25	0,04*
	Variação (mín-máx)	0,2 – 25,4	1,8 – 5,5	
	Mediana	1,7	2,7	
	Média	2,74	2,95	
	Desvio Padrão	4,83	1,01	

* valor de *p* obtido pelo coeficiente de Spearman adotando-se 5% como nível de significância
Fonte: Do autor.

Na Tabela 12 podemos notar que tanto o número médio de fungos presentes no interior das células gigantes multinucleadas quanto o número médio total de fungos imunomarcados pelo Anti-Pb foram estatisticamente significativos mais elevados nos granulomas frouxos.

Tabela 12 - Correlação entre o número de fungos intracelulares e o número total fungos imunomarcados pelo Anti-Pb

Variável	Categoria / Medidas	Anti-Pb IC	Anti-Pb	<i>p</i>
Granuloma Denso	N	11	11	0,006*
	Variação (mín-máx)	0,6 – 3,5	1,3 – 10,3	
	Mediana	1,8	5,4	
	Média	1,89	5,2	
	Desvio Padrão	1,05	2,89	
Granuloma Frouxo	N	14	14	0,002*
	Variação (mín-máx)	0,2 – 25,4	1,4 – 64	
	Mediana	1,7	3,9	
	Média	3,41	9,0	
	Desvio Padrão	6,41	16,15	
Total (Denso e Frouxo)	N	25	25	0,0001*
	Variação (mín-máx)	0,2 – 25,4	1,3 – 64	
	Mediana	1,7	4,7	
	Média	2,74	7,35	
	Desvio Padrão	4,83	12,18	

* valor de *p* obtido pelo coeficiente de Spearman adotando-se 5% como nível de significância
Fonte: Do autor.

6 DISCUSSÃO

A paracoccidioidomicose é uma doença infecciosa endêmica no Brasil causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis* que é transmitido ao hospedeiro através da inalação. É mais prevalente em indivíduos do gênero masculino e trabalhadores rurais e a incidência parece aumentar com o avanço da idade (MAGALHÃES et al., 2014). Há várias formas clínicas de PCM e a forma crônica representa aproximadamente 90% dos casos, acometendo preferencialmente homens com idades variando entre 30 e 50 anos (SHINKANAI-YASUDA et al., 2006; FERREIRA, 2009). A PCM crônica caracteriza-se por lesões granulomatosas que se desenvolvem em vários tecidos como pulmões, mucosa oral, pele e linfonodos (ALMEIDA et al., 2003; SILVA et al., 2007; GARCIA et al., 2014). A reação granulomatosa é formada por uma organização nodular de macrófagos epitelioides e células gigantes multinucleadas, circundada por um “cinturão” de linfócitos e plasmócitos e quantidade variável de fibrose colagênica (FORTES et al., 2011).

A inflamação granulomatosa que se desenvolve na PCM humana é caracterizada por uma resposta mais especializada e eficaz do hospedeiro numa tentativa de limitar e eliminar o fungo evitando o seu avanço para outros tecidos (FORTES et al., 2011). A chave da reação granulomatosa é a participação predominante de fagócitos mononucleares que podem se diferenciar em células epitelioides ou células gigantes multinucleadas (KAYE, 2000).

A função exata das células gigantes multinucleares encontradas em granulomas não está clara. Algumas moléculas comumente encontradas em células gigantes do tipo corpo estranho e em osteoclastos sugerem que as CGMs apresentam uma capacidade de degradação aumentada (HELMING; GORDON, 2009). Por outro lado, CGMs produzidas após serem estimuladas por *Mycobacterium tuberculosis* perdem a capacidade de realizar fagocitose (LAY et al., 2007), mas desencadeiam um aumento da secreção de quimiocinas, tais como CXCL8, que contribui para o recrutamento de células inflamatórias para o local da infecção (ZHU; FRIEDLAND, 2006). Desta forma, as CGMs parecem desempenhar um papel essencial na resposta do hospedeiro contra patógenos, particularmente o *Paracoccidioides brasiliensis*.

Na PCM, a infecção pode apresentar ambas as variantes das CGMs (FORTES et al., 2011, PEDREIRA et al., 2014), como observado em nosso estudo. As células gigantes de corpo estranho e as CGMs totais foram mais numerosas em granulomas densos do que nos frouxos ($p < 0,03$). Estes dados corroboram com o fato de que as células gigantes são essenciais para a formação de granulomas (QUINN; SCHEPETKIN, 2009), e contribuem para o agregado bem organizado de células observadas nos granulomas densos. As células gigantes de corpo estranho são as células gigantes predominantes formadas quando os monócitos periféricos do sangue humano são estimulados com os antígenos do Pb (NASCIMENTO et al., 2011).

A formação da CGM de corpo estranho é induzida pela interleucina 4 (IL-4), pela interleucina 13 (IL-13) ou por uma combinação de IL-4 e fator de estimulação de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) presentes no microambiente (QUINN; SCHEPETKIN, 2009; HELMING; GORDON, 2007; BRODBECK; ANDERSON, 2009). A IL-4 e a IL-13 promovem a ativação de células M2 ou macrófagos alternativamente ativados (MANTOVANI et al., 2004), que produzem citocinas anti-inflamatórias, tais como a interleucina 10 (IL-10) e o fator de crescimento transformante beta (TGF- β) (VARIN; GORDON, 2009; MOSSER; EDWARDS, 2008). Além disso, elas são essenciais para a reação inflamatória tardia, eliminando detritos, estimulando a angiogênese e a reparação dos tecidos (GORDON; MARTINEZ, 2010; HEUSINKVELD; VAN DER BURG, 2011). Portanto, as células gigantes de corpo estranho se desenvolvem a partir da fusão de macrófagos M2-polarizados (QUINN; SCHEPETKIN, 2009). Estes macrófagos são identificados pelo imunomarcador CD163 (WANG; LIANG; ZEN, 2014) e representam a principal resposta imunológica contra a PCM (CARLI et al., 2016). As CGMs imunomarcadas pelo CD163 estavam presentes em todos os casos incluídos em nosso estudo, mostrando uma correlação linear positiva significativa com a contagem total de CGMs. Estes dados revelaram que as CGMs marcadas pelo CD163 são as células gigantes predominantes na PCM crônica oral, de acordo com os nossos resultados (CARLI et al., 2016).

Por outro lado, a formação das CGMs do tipo Langhans ocorrem através da presença de interferon gama (IFN- γ) e interleucina 3 (IL-3) no microambiente, resultante da fusão de macrófagos polarizados ativados M1 ou classicamente ativados (QUINN, SCHEPETKIN, 2009; ANDERSON, 2000). Estes macrófagos

secretam uma quantidade abundante de citocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral-alfa $TNF-\alpha$, interleucina 12 e interleucina 23) e erradicam agentes patógenos intracelulares, sendo as células efetoras da resposta imune do tipo Th1 (FAIRWEATHER; CIHAKOVA, 2009), que estão associadas com a resistência ao avanço da PCM (KASHINO et al., 2000). No entanto, os agentes infecciosos persistentes podem estimular uma mudança de fenótipo M1 para M2 à medida que essa reação inflamatória evolui de aguda para crônica (FAIRWEATHER; CIHAKOVA, 2009). Desta forma, os macrófagos M2 provavelmente estão envolvidos na formação de células gigantes Langhans durante infecções crônicas (QUINN; SCHEPETKIN, 2009). Nossos resultados mostraram que ambos os tipos de CGMs, de Langhans ou corpo estranho, apresentaram-se positivos para CD163. O equilíbrio de citocinas liberadas no microambiente pode decidir quais os tipos de CGM são formados na reação granulomatosa (OKAMOTO; MIZUNO; HORIO, 2003).

As CGMs apresentam uma capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio (LAY et al., 2007), que desempenham um papel fundamental na defesa contra patógenos (QUINN; SCHEPETKIN, 2009). Entretanto, nossos resultados não mostraram nenhuma correlação entre as CGMs imunomarcadas pelo CD163 e o número de fungos imunomarcados pelo anticorpo Anti-Pb sugerindo que estas células não podem matar os fungos. De fato, as culturas de CGMs tratadas com IL-10, $TGF-\beta$ ou $TNF-\alpha$ (citocinas liberadas principalmente por macrófagos M2) mostram baixa atividade fungicida contra o Pb em comparação com culturas tratadas com $IFN-\gamma$ ou GM-CSF (NASCIMENTO et al., 2011). Por outro lado, a correlação linear positiva entre a quantidade total de Pb e a quantidade de Pb intracelular sugere que as CGMs realizam fagocitose dos fungos. Estes resultados não estão de acordo com Lay et al. (2007), que relataram uma diminuição da expressão de receptores de fagocitose nas CGMs estimuladas com *M. tuberculosis* reduzindo a absorção fagocítica bacteriana. Além disso, macrófagos M2 também mostraram a absorção reduzida fagocítica de *Neisseria meningitidis* e *Escherichia coli*, bem como de outras partículas, tais como zimosan, quando elas são estimuladas com IL-4 (VARIN et al., 2010). Não se pode ignorar que as CGMs apresentam heterogeneidade relacionada com os estímulos indutores e/ou a doença ou microambiente (HELMING; GORDON, 2009), o que poderia explicar a diferente função fagocitária das CGM estimuladas com Pb e outros microorganismos.

Assim, CGMs do tipo Langhans e corpo estranho nas lesões orais crônicas da PCM apresentam fenótipo CD163 positivas, podendo influenciar a resposta do hospedeiro contra o fungo e promover a manutenção da infecção.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados, pode-se concluir que as lesões bucais da Paracoccidioidomicose se caracterizam microscopicamente por:

a) um número mais elevado de células gigantes multinucleadas nos casos classificados como granulomas densos e que, em sua maioria, são do tipo corpo estranho;

b) um número maior de células gigantes nos casos em que havia maior quantidade de fungos *Paracoccidioides brasiliensis*;

c) células gigantes de maior área e perímetro presentes nos casos de granulomas densos;

d) um número médio de células gigantes multinucleadas CD163 positivas semelhante nos dois tipos de granulomas;

e) uma correlação positiva entre o número médio de fungos imunomarcados pelo Anti-Pb presentes no interior das células gigantes multinucleadas e o número destas células gigantes.

REFERÊNCIAS

ABRAMS, B.; SHEAR, M. Estimation of the volumes of multinucleate giant cells. **Journal Oral Pathology**, v. 6, n. 5, p. 264-267, Sep. 1977.

ALMEIDA, O. P.; JORGE JUNIOR, J.; SCULLY, C. Paracoccidioidomycosis of the mouth: an emerging deep mycosis. **Critical Review in Oral Biology and Medicine**, v. 14, n. 4, p. 268-274, Jul. 2003.

ALMEIDA, S. M. et al. Central nervous system paracoccidioidomycosis: clinical features and laboratory findings. **The Journal of Infection**, v. 48, n. 2, p.193-198, Feb. 2004.

ANDERSON, J. M. Multinucleated giant cells. **Current Opinion in Hematology**, v. 7, n. 1, p. 40-47, Jan. 2000.

APPEL, T. et al. Predictive variables for the biological behaviour of basal cell carcinoma of the face: relevance of morphometry of the nuclei. **The British Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 41, n. 3, p. 147-150, Jun. 2003.

ARISTIZABAL, B. H. et al. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 11, p. 5587-5591, Nov. 1998.

AUCLAIR, P. L. et al. A clinical and histomorphologic comparison of the central giant cell granuloma and the giant cell tumor. **Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology**, v. 66, n. 2, p. 197-208, Aug. 1988.

BATISTA, A. C.; SOARES, C. T.; LARA, V. S. Failure of nitric oxide production by macrophages and decrease in CD4+ T cells in oral paracoccidioidomycosis: possible mechanisms that permit local fungal multiplication. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 5, p. 267-273, Sep./Out. 2005.

BLOTTA, M. H. et al. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 3, p. 390-394, Sep. 1999.

BORBA, C. M. et al. Morphological, biochemical and molecular approaches for comparing typical and atypical *Paracoccidioides brasiliensis* strains. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 88, n. 3-4, p. 257-266, Oct./Nov. 2005.

BORGES-WALMSLEY, M. I. et al. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends in Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 80-87, Feb. 2002.

BRITO, T.; FRANCO, M. F. Granulomatous inflammation. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 36, n. 2, p. 185-192, Mar./Apr. 1994.

BRODBECK, W. G.; ANDERSON, J. M. Giant cell formation and function. **Current Opinion in Hematology**, v. 16, n. 1, p. 53-57, Jan. 2009.

BRUMMER, E. et al. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 8, p. 2289-2294, Aug. 1989.

CARLI, M. L. et al. M2 macrophages and inflammatory cells in oral lesions of chronic paracoccidioidomycosis. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 46, n. 2, p. 141-147, Fev. 2016.

COCK, A. M. et al. Fibrotic sequelae in pulmonary paracoccidioidomycosis: histopathological aspects in BALB/c mice infected with viable and non viable *Paracoccidioides brasiliensis* propagules. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, n. 2, p. 59-66, Mar./Apr. 2000.

COUTINHO, Z. F. et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 5, p.1441-1454, Sep./Oct. 2002.

FAIRWEATHER, D.; CIHAKOVA, D. Alternatively activated macrophages in infection and autoimmunity. **Journal of Autoimmunity**, v. 33, n. 3-4, p. 222-230, Nov./Dec. 2009.

FERREIRA, M. S. Paracoccidioidomycosis. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 10, n. 4, p. 161-165, Dec. 2009.

FICARRA, G.; KABAN, L. B.; HANSEN L. S. Central giant cell lesions of the mandible and maxilla: a clinicopathologic and cytometric study. **Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology**, v. 64, n. 1, p. 44-49, Jul. 1987.

FLÓREZ-MORENO, G. A. et al. Cytomorphometric and immunohistochemical comparison between central and peripheral giant cell lesions of the jaws. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v. 105, n. 5, p. 625-632, May. 2008.

FORNASIER, V. L. et al. The prognostic significance of histomorphometry and immunohistochemistry in giant cell tumors of bone. **Human Pathology**, v. 27, n. 8, p. 754-760, Aug. 1996.

FORTES, M. R. et al. Immunology of paracoccidioidomycosis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 3, p. 516-524, May/Jun. 2011.

FRANCO, M. et al. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton, CRC Press, 1994, p.109-120.

FRANCO, M. et al. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton, CRC Press, 1994, p. 410-411.

GARCIA, N. G. et al. Extensive cutaneous lesions in paracoccidioidomycosis successfully treated with itraconazole and β -glucan. **International Journal of Dermatology**, v. 53, n. 3, p. 168-170, Mar. 2014.

GONZALEZ, A. et al. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *P. brasiliensis* conidia. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 5, p. 2546-2552, May. 2000.

GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. **Immunity**, v. 32, n. 5, p. 593-604, May. 2010.

HELMING, L.; GORDON, S. Molecular mediators of macrophage fusion. **Trends in Cell Biology**, v. 19, n. 10, p. 514-522, Oct. 2009.

HELMING, L.; GORDON, S. The molecular basis of macrophage fusion. **Immunobiology**, v. 212, n. 9-10, p. 785-793, Jan. 2008.

HEUSINKVELD, M.; VAN DER BURG, S. H. Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. **Journal of Translational Medicine**, v. 16, n. 9, p. 216, Dec. 2011.

HOLNESS, C. L.; SIMMONS, D. L. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. **Blood**, v. 81, n. 6, p. 1607-1613, Mar. 1993.

KAMINAGAKURA, E. et al. Characterization of inflammatory cells in oral paracoccidioidomycosis. **Oral Diseases**, v. 13, n. 4, p. 434-439, Jul. 2007.

KASHINO, S. S. et al. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 20, n. 1, p. 89-97, Jan. 2000.

KAYE, P. Granulomatous diseases. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 81, n. 5, p. 289-290, Oct. 2000.

KUROKAWA, C. S. et al. Pro-and anti-inflammatory cytokines produced by human monocytes challenged in vitro with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbiology and Immunology**, v. 51, n. 4, p. 421-428, 2007.

LAY, G. et al. Langhans giant cells from *M. tuberculosis*-induced human granulomas cannot mediate mycobacterial uptake. **The Journal of Pathology**, v. 211, n. 1, p. 76-85, Jan. 2007.

LOOSE, D. S. et al. Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, n. 24, p. 7659-7663, Dec. 1983.

MAGALHÃES, E. M. S. et al. Prevalência da paracoccidioidomicose por intradermorreação em áreas rurais de Alfenas, Minas Gerais, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 56, n. 4, p. 281-285, ago. 2014.

MALUF, M. L. et al. Prevalence of paracoccidioidomycosis infection determined by sorologic test in donors' blood in the Northwest of Parana, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 11-16, Jan./Feb. 2003.

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

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

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. Pathology. IN: FRANCO, M. et al. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 131-150.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature reviews**. Immunology, v. 8, n. 12, p. 958-969, Dec. 2008.

NASCIMENTO, M. P. et al. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor enhances the modulatory effect of cytokines on monocyte-derived multinucleated giant cell formation and fungicidal activity against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 6, p. 735-741, Sep. 2011.

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

NEVES, A. R. et al. Negative immunodiffusion test results obtained with sera of paracoccidioidomycosis patients may be related to low-avidity immunoglobulin G2 antibodies directed against carbohydrate epitopes. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, n. 5, p. 802-807, Sep. 2003.

NEWORAL, E. P. et al. Immunocytochemical localization of cytokines and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in oral mucosa and lymph nodes of patients with paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, v. 21, n. 5, p. 234-241, Mar. 2003.

OKAMOTO, H.; MIZUNO, K.; HORIO, T. Monocyte-derived multinucleated giant cells and sarcoidosis. **Journal of Dermatological Science**, v. 31, n. 2, p. 119-128, Apr. 2003.

PAGLIARI, C. et al. Characterization of cytotoxic immune response in skin and mucosal lesions of paracoccidioidomycosis. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 37, n. 5, p. 565-570, May. 2010.

PAGLIARI, C. et al. Role of mast cells as IL10 producing cells in paracoccidioidomycosis skin lesions. **Mycopathologia**, v. 162, n. 5, p. 331-335, Nov. 2006.

PEDREIRA, R. P. G. et al. Paracoccidioidomycosis mimicking squamous cell carcinoma on the dorsum of the tongue and review of published literature. **Mycopathologia**, v. 177, n. 5-6, p. 325-329, Apr. 2014.

PEKTAS, Z. O. et al. Evaluation of nuclear morphometry and DNA ploidy status for detection of malignant and premalignant oral lesions: quantitative cytologic assessment and review of methods for cytomorphometric measurements. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 64, n. 4, p. 628-635, Apr. 2006.

PERAÇOLI, M. T. S. et al. Production of pro- and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 5, p. 413-418, Apr. 2003.

QUINN, M. T.; SCHEPETKIN, I. A. Role of NADPH oxidase in formation and function of multinucleated giant cells. **Journal of Innate Immunity**, v. 1, n. 6, p. 509-526, Jul. 2009.

RAMOS-E-SILVA, M. Facial and oral aspects of some venereal and tropical diseases. **Acta Dermatovenereologica Croatica**, v. 12, n 3, p.173-180, 2004.

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

SANTOS, S. S.; FERREIRA, K. S.; ALMEIDA, S. R. Paracoccidioides brasiliensis-induced migration of dendritic cells and subsequent T-cell activation in the lung-draining lymph nodes. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, p. e19690, May. 2011.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Consenso em paracoccidioidomicose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 39, n. 3, jun. 2006 .

SILVA, C. O. et al. Gingival involvement in oral paracoccidioidomycosis. **Journal of Periodontology**, v. 78, n. 7, p. 1229-1234, Jul. 2007.

SINGER-VERMES, L. M. et al. Pathogenicity and immunogenicity of Paracoccidioides brasiliensis isolates in the human disease and in an experimental murine model. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 97, n. 1, p. 113-119, Jul. 1994.

SOMANATHAN, R. V.; SIMUNEK, A. Evaluation of the success of beta-tricalciumphosphate and deproteinized bovine bone in maxillary sinus augmentation

using histomorphometry: a review. **Acta Medica** (Hradec Králové), v. 49, n. 2, p.87-89, Apr. 2006.

UNTERKIRCHER, C. S. et al. **Natural antibodies in paracoccidioidomycosis. Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 1-2, p.59-63, Jun. 2004.

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

VARIN, A. et al. Alternative activation of macrophages by IL-4 impairs phagocytosis of pathogens but potentiates microbial-induced signalling and cytokine secretion. **Blood**, v. 115, n. 2, p. 353-362, Jan. 2010.

VARIN, A.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: immune function and cellular biology. **Immunobiology**, v. 214, n. 7, p. 630-641, Jul. 2009.

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. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 3, p. 234-237, maio/jun. 2005.

WAGNER, J. M. et al. Localization of eosinophil granule major basic protein in paracoccidioidomycosis lesions. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 1, p. 66-72, Jul. 1998.

WANG; LIANG; ZEN, Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. **Frontiers in Immunology**, v 5, n 3, p 614-619, Nov. 2014

WANKE B, LONDERO AT. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection Quantitative cellular and nuclear volumetric alterations in epithelium from lichen planus lesions of human buccal mucosa. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 23, n. 5, p. 205-208, May. 1994.

WILLIAMS, G. T.; WILLIAMS, W. J. Granulomatous inflammation - a review. **Journal of Clinical Pathology**, v. 36, n. 7, p. 723-733, Jul. 1983.

ZHU, X.W.; FRIEDLAND, J. S. Multinucleate giant cells and the control of chemokine secretion in response to Mycobacterium tuberculosis. **Clinical Immunology**, v. 120, n. 1, p. 10-20, Jul. 2006.

ANEXO

ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALFENAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: COMPARAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA E CITOMORFOMÉTRICA ENTRE CÉLULAS GIGANTES MULTINUCLEADAS E FUNGOS EM LESÕES ORAIS POR PARACOCCIDIOIDOMICOSE

Pesquisador: João Adolfo Costa Hanemann

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 28344814.4.0000.5142

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 814.059

Data da Relatoria: 17/09/2014

Apresentação do Projeto:

Constitui-se proposição do presente estudo, avaliar a presença e a morfologia das Células Gigantes Multinucleadas Inflamatórias em fragmentos de biópsias obtidas de lesões bucais de pacientes portadores de Paracoccidiodomicose e correlacionar com o número de fungos Paracoccidiodoides brasiliensis e com a imunomarcagem para CD68 e CD163.

Uma melhor compreensão do mecanismo envolvido no papel das Células Gigantes Multinucleadas no infiltrado inflamatório do processo infeccioso provocado pelo *P. brasiliensis* nas lesões bucais poderia, então, auxiliar no desenvolvimento de novas terapêuticas contra este fungo.

Objetivo da Pesquisa:

Este estudo tem como objetivo avaliar a presença e a morfologia das Células Gigantes Multinucleadas Inflamatórias em fragmentos de biópsias obtidas de lesões bucais de pacientes portadores de Paracoccidiodomicose e correlacionar com o número de fungos Paracoccidiodoides brasiliensis.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os benefícios superam os riscos.

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALFENAS



Continuação do Parecer: 814.028

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O trabalho apresentado atende aos princípios propostos na Resolução 466/2012. Aborda tema de extrema relevância em saúde pública, principalmente regional, dada a elevada ocorrência de casos e suas complicações. O texto é conciso, bem fundamentado e dentro das normas cultas de redação. A metodologia está bem descrita e adequada aos objetivos propostos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos apresentados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências ou adequações.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado "ad referendum" ao colegiado do CEP.

ALFENAS, 01 de Outubro de 2014

Assinado por:
Cristiane da Silva Marciano Grasselli
(Coordenador)

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