

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS
DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

JANICE MERY CHICARINO DE OLIVEIRA COELHO

ESTUDO HISTOPATOLÓGICO, IMUNO-HISTOQUÍMICO E IMUNOPATOLÓGICO
DOS MICETOMAS EM AMOSTRAS DE LESÕES CUTÂNEAS HUMANAS

Rio de Janeiro

2017

Coelho, Janice Mery Chicarino de Oliveira.

Estudo histopatológico, imuno-histoquímico e imunopatológico dos micetomas em amostras de lesões cutâneas humanas / Janice Mery Chicarino de Oliveira Coelho. - Rio de Janeiro, 2017.

107 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2017.

Orientador: Antonio Carlos Francesconi do Valle.

Co-orientador: Leonardo Pereira Quintella.

Bibliografia: f. 95-103

1. Micetoma. 2. Pele. 3. Patologia. 4. Imunologia. 5. Imuno-histoquímica.
I. Título.

JANICE MERY CHICARINO DE OLIVEIRA COELHO

**ESTUDO HISTOPATOLÓGICO, IMUNO-HISTOQUÍMICO E IMUNOPATOLÓGICO
DOS MICETOMAS EM AMOSTRAS DE LESÕES CUTÂNEAS HUMANAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Francesconi do Valle
Coorientador: Prof. Dr. Leonardo Pereira Quintella

Rio de Janeiro

2017

JANICE MERY CHICARINO DE OLIVEIRA COELHO

**ESTUDO HISTOPATOLÓGICO, IMUNO-HISTOQUÍMICO E IMUNOPATOLÓGICO
DOS MICETOMAS EM AMOSTRAS DE LESÕES CUTÂNEAS HUMANAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Aprovada em: 22/março/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Clara Gutierrez Galhardo (Presidente)
Doutora em: Medicina (Dermatologia)
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

Prof. Dr. Dayvison Francis Saraiva Freitas
Doutor em: Medicina Tropical
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

Prof^a. Dr^a. Maria da Glória Bonecini de Almeida
Doutora em: Biologia Celular e Molecular
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

Prof. Dr. Rodrigo Caldas Menezes
Doutor em: Ciências
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

Prof^a. Dr^a. Tullia Cuzzi Teichner
Doutora em: Medicina (Dermatologia)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Aos meus pais pelo exemplo e incentivo.
À minha família pelo apoio e carinho ao longo dos anos.

Agradecimentos

Aos pesquisadores Antonio Carlos Francesconi do Valle, Maria Clara Gutierrez Galhardo e Leonardo Pereira Quintella pela oportunidade e incentivo, me proporcionando mais este aprendizado.

À pesquisadora Maria da Glória Bonecini de Almeida pelo apoio e contribuição científica.

Ao Dr. Felipe Mauricio Soeiro Sampaio pela colaboração e disponibilização do banco de dados clínicos.

Aos colaboradores do Laboratório de Micologia e Laboratório de Bacteriologia e Bioensaios do INI.

Aos amigos e colaboradores do Serviço de Anatomia Patológica do INI pela contribuição técnica e apoio.

COELHO, J. **Estudo histopatológico, imuno-histoquímico e imunopatológico dos micetomas em amostras de lesões cutâneas humanas**. Rio de Janeiro, 2017. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] . Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz.

Resumo

Os micetomas constituem doenças infecciosas crônicas, endêmicas nas regiões tropicais e subtropicais, podendo ser vistos na Ásia e alguns países do norte da África e nas Américas. No Brasil a prevalência permanece desconhecida. No mundo, cerca de 60% dos casos de micetomas são actinomicetomas e os 40 % restantes são eumicetomas; ocorrem principalmente no sexo masculino entre 20 e 25 anos. Os principais responsáveis pelos actinomicetomas são espécies do gênero *Nocardia*, *Streptomyces* e *Actinomadura* e pelos eumicetomas são *Acremonium* sp. e *Madurella mycetomatis* os mais frequentemente encontrados. A infecção caracteriza-se clinicamente por nódulos cutâneos e subcutâneos acompanhados de abscessos, fistulização e extrusão dos grãos. O diagnóstico baseia-se principalmente na apresentação clínica, análise histopatológica e em exames microbiológicos. Os micetomas são doenças negligenciadas, com poucos casos relatados em nosso país, cujos aspectos histopatológicos e imunopatológicos não se encontram totalmente esclarecidos, justificando o presente estudo. O objetivo do estudo foi descrever os achados histopatológicos e realizar estudos imuno-histoquímicos para identificação e quantificação de células T CD4⁺, T CD8⁺ e CD68⁺, e pesquisar a expressão de TNF- α , TGF- β 1, perforina, NOS 2, IL-10, IL-12 e IL-17 em 22 amostras de lesões cutâneas de micetomas do INI/Fiocruz colhidas entre janeiro de 1998 a julho de 2015; compreendendo 4 amostras de actinomicetomas e 18 de eumicetomas. A análise histopatológica revelou um processo inflamatório crônico granulomatoso com a presença de linfócitos, histiócitos, plasmócitos, eosinófilos, neutrófilos e células gigantes do tipo corpo estranho e do tipo Langhans. Granulomas com padrões supurativo, corpo estranho, epitelióide e intersticial ou necrobiótico foram observados, associados à necrose dos tipos fibrinóide e liquefativa. Grãos de elementos fúngicos apresentaram afinidade tintorial para o ácido periódico de Schiff (PAS) e prata metenamina de Grocott, enquanto grãos de bactérias filamentosas foram refratários ao PAS e positivos pelo Gram Brown-Brenn, Grocott e Wade nos casos de *Nocardia*. Fenômeno de Splendore- Hoeppli e fibrose também foram observados. O estudo imuno-histoquímico detectou a presença de células T CD4⁺, T CD8⁺ e células CD68⁺ com predomínio das últimas nos actinomicetomas e eumicetomas. Foram detectados antígenos para IL-10, IL-12, IL-17, TNF- α , TGF- β 1, perforina e NOS2, indicativos da participação destas interleucinas e mediadores inflamatórios nas respostas inflamatórias dos actinomicetomas e eumicetomas. Tais achados apontam para resposta inflamatória tipo Th1, Th2 e Th17 nos dois grupos de micetomas.

Palavras-chave: eumicetoma, actinomicetoma, pele, imuno-histoquímica, histopatológico, resposta imune-celular.

COELHO, J. **Histopathological, immunohistochemical and immunopathological study of mycetomas in sample human skin lesions.** Rio de Janeiro, 2017. Thesis [Doctoral Degree in Clinical Research in Infectious Diseases] - Evandro Chagas National Institute of Infectology, Oswaldo Cruz Foundation.

Abstract

Mycetomas are chronic infectious diseases, endemic in tropical and subtropical regions in Asia and some countries in North Africa and the Americas. In Brazil the prevalence remains unknown. In the world, about 60% of cases of mycetomas are actinomycetomas and 40% are eumycetomas. They occur mainly in men between 20 and 25 years. The main species responsible for actinomycetomas are those of the *Nocardia*, *Streptomyces* and *Actinomyces* genus. Eumycetomas are usually caused by *Acremonium* sp. and *Madurella mycetomatis*. The infection is clinically characterized by cutaneous and subcutaneous nodules with abscesses, fistulae and extrusion of the grains. The diagnosis relies mainly on clinical, histopathological analysis and microbiological tests. The mycetomas are neglected diseases, with few cases reported in our country, and poorly understood immunopathological and histopathological aspects, justifying the present study. The objective of this study was to describe the histopathological findings and to perform immunohistochemical studies for identification and quantification of CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells and CD68⁺ cells, and search the expression of TNF- α , TGF- β 1, Perforin, NOS 2, IL-10, IL-12 and IL-17 in 22 samples of cutaneous lesions of mycetomas INI/Fiocruz, collected from January 1998 to July 2015, comprising 4 actinomycetomas and 18 samples of eumycetomas. The histopathological analysis revealed a chronic granulomatous inflammatory process with lymphocytes, histiocytes, plasma cells, eosinophils, neutrophils and foreign body and Langhans type giant cells. Suppurative, foreign body, interstitial or necrobiotic and epithelioid granulomatous patterns, were observed, associated with fibrinoid and liquefaction necrosis. Grains of fungal elements presented staining affinity for periodic acid Schiff (PAS) and Grocott's silver methenamine, while grains of filamentous bacteria were resistant to PAS and positive in Brown-Brenn Gram, Grocott and Wade in the case of *Nocardia*. Splendore-Hoeppli phenomenon and fibrosis were also observed. The immunohistochemical study detected the presence of CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells and CD68⁺ with a predominance of the latter in both actinomycetomas and eumycetomas. Antigens were observed for IL-10, IL-12, IL-17, TNF- α , TGF- β 1, perforin and NOS 2, indicating the participation of these interleukins and inflammatory mediators in inflammatory responses of actinomycetomas and eumycetomas. The findings point toward Th1, Th2 and Th17 type inflammatory response in both groups of mycetomas.

Key words: eumycetoma, actinomycetoma, skin, immunohistochemistry, histopathology, cellular immune response.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
1.1	Epidemiologia.....	11
1.2	Histórico	12
1.3	Agentes infecciosos causadores de micetomas.....	13
1.4	Aspectos clínicos.....	15
1.5	Diagnóstico.....	18
1.6	Aspectos anatomopatológicos e microbiológicos.....	18
1.7	Aspectos imunológicos nos micetomas.....	23
2	JUSTIFICATIVA.....	29
3	OBJETIVOS.....	30
3.1	Objetivo geral	30
3.2	Objetivos específicos.....	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	Desenho do Projeto.....	31
4.2	Casuística.....	31
4.3	Crerios de exclusão.....	32
4.4	Estudo Histopatológico.....	33
4.5	Estudo Imuno-histoquímico	35
4.6	Análise microscópica do estudo imuno-histoquímico	36
4.7	Revisão de prontuários e obtenção de dados clínicos e laboratoriais.....	37
5	PLANO DE ANÁLISE.....	38
6	ASPECTOS ÉTICOS	39
7	RESULTADOS.....	40
7.1	Achados histopatológicos nos micetomas.....	40
7.2	Achados imuno-histoquímicos nos micetomas.....	57
7.3	Dados demográficos, criterios de inclusão, exclusão e dados laboratoriais...67	
8	DISCUSSÃO.....	85
9	LIMITAÇÃO DO ESTUDO	93
10	CONCLUSÃO.....	94
11	REFERÊNCIAS.....	95
12	APÊNDICES.....	104
	Apêndice A . Termo de compromisso e responsabilidade	104
	Apêndice B . Formulário de Microscopia	105
	Apêndice C . formulário de avaliação imuno-histoquímica.....	107

Lista de Ilustrações

Tabela 1 . Características macroscópicas e microscópicas ao H&E dos eumicetomas.	21
Tabela 2 - Características macroscópicas e microscópicas ao H&E dos actinomicetomas.	21
Quadro 1 - Amostras cutâneas selecionadas e previamente diagnosticadas como micetoma.	32
Quadro 2 - Definição das variáveis microscópicas.	34
Quadro 3 - Padronização de diluições dos anticorpos primários utilizados.	36
Quadro 4 - Características macroscópica e microscópica dos grãos em 22 casos de micetomas, Rio de Janeiro, Brasil, 1998 a 2015.	54
Figura 1 - Alterações epidérmicas e extensão do comprometimento dérmico nos 22 casos de micetomas em amostras cutâneas, Rio de Janeiro, Brasil, 1998 a 2015.	41
Figura 2 - Actinomicetoma. Processo inflamatório granulomatoso localizado na derme reticular. H&E, 200X.	41
Figura 3 - Actinomicetoma. Grãos hialinos subcórneos compostos por bactérias filamentosas, ao lado de material fibrinonecrotico e trajeto fistuloso. H&E, 400X.	42
Figura 4 - Alterações epidérmicas e extensão do comprometimento dérmico nos quatro casos de actinomicetomas em amostras cutâneas, Rio de Janeiro, Brasil, 1998 a 2015.	43
Figura 5 - Actinomicetoma. Hiperkeratose e parakeratose. H&E, 400X.	43
Figura 6 - Alterações epidérmicas e extensão do comprometimento dérmico nos 18 casos de eumicetomas em amostras cutâneas, Rio de Janeiro, Brasil, 1998 a 2015.	44
Figura 7 - . Células inflamatórias e tipos de granulomas encontrados nas lesões cutâneas de 22 casos de micetomas, Rio de Janeiro, Brasil, 1998 a 2015.	45
Figura 8 - Células inflamatórias e tipos de granulomas encontrados nas lesões cutâneas de actinomicetoma, Rio de Janeiro, Brasil, 1998 a 2015.	46
Figura 9 - Células inflamatórias e tipos de granulomas encontrados nas lesões cutâneas de eumicetoma, Rio de Janeiro, Brasil, 1998 a 2015.	46
Figura 10 - Eumicetoma. Células gigantes multinucleadas do tipo Langhans. (H&E), 400X.	47
Figura 11 - Eumicetoma. Grão de fungos demáceos, envolto por células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho em granuloma tipo corpo estranho. H&E, 400X.	47
Figura 12 - Eumicetoma. Granuloma supurativo contendo grão de fungos demáceos. Hematoxilina & Eosina (H&E), 200X.	48
Figura 13 - Tipos de necrose, fibrose e fenômeno de Splendore-Hoeppli encontrados nas lesões cutâneas de 22 casos de micetomas, Rio de Janeiro, Brasil, 1998 a 2015.	49
Figura 14 - Identificação dos tipos de necrose, presença de grãos na lesão, fibrose e fenômeno de Splendore-Hoeppli encontrados nas lesões cutâneas de actinomicetoma, Rio de Janeiro, Brasil, 1998 a 2015.	50
Figura 15 - - Identificação dos tipos de necrose, presença de grãos na lesão, fibrose e fenômeno de Splendore-Hoeppli encontrados nas lesões cutâneas de eumicetoma, Rio de Janeiro, Brasil, 1998 a 2015.	50

Figura 16. Eumicetoma. Necrose do tipo fibrinoide, ao lado de grãos de fungos demáceos e neutrófilos. Hematoxilina&Eosina (H&E), 400X.	51
Figura 17 - Actinomicetoma. Grão de bactérias filamentosas. Hematoxilina&Eosina (H&E), 400X.	51
Figura 18 - Eumicetoma. Grão hialino composto por elementos fúngicos. Hematoxilina&Eosina (H&E), 400X.	52
Figura 19 - Actinomicetoma. Fenômeno de Splendore- Hoespli caracterizado por área radial de cor fúcsia localizada na periferia do grão. Tricrômico de Gomori, 400X.	52
Figura 20 . Actinomicetoma. Fibrose localizada na derme reticular ao redor do granuloma composta por feixes colágenos corados em verde. Tricrômico de Gomori, 200X.	53
Figura 21- Avaliação das colorações especiais em amostras cutâneas de actinomicetoma, Rio de Janeiro, Brasil, 1998 a 2015.	54
Figura 22 - Avaliação das colorações especiais em amostras cutâneas de eumicetoma, Rio de Janeiro, Brasil, 1998 a 2015.	55
Figura 23 - Eumicetoma. Grão exibindo hifas septadas e elementos redondos de cor acastanhada com impregnação argêntica. Prata metenamina de Grocott, 1000X....	55
Figura 24 - Actinomicetoma.Grão de <i>Nocardia sp</i> contendo filamentos bacterianos álcool-ácido-resistentes de cor fúccia. Wade, 1000X.....	56
Figura 25 - Actinomicetomas. Grão contendo filamentos bacterianos Gram positivos. Gram Brown-Brenn,1000X.	56
Figura 26 - Actinomicetoma. Grão contendo filamentos bacterianos de cor acastanhada pela impregnação argêntica. Prata metenamina de Grocott, 1000X....	57
Figura 27 - Células T CD4 ⁺ localizadas na derme em meio ao processo inflamatório. Técnica de imuno-histoquímica, 400X.....	58
Figura 28 - Numerosos macrófagos CD68 ⁺ localizados na periferia do granuloma.Técnica de imuno-histoquímica, 400X.....	58
Figura 29 - Células T CD8 ⁺ isoladas e perivasculares. Técnica de imuno-histoquímica, 400X.....	59
Figura 30 - Detecção e contagem do número de células/10 CGA (células T CD4 ⁺ , T CD8 ⁺ e CD 68 ⁺) pelo estudo imuno-histoquímico em amostras cutâneas de 22 casos de micetomas, Rio de Janeiro, Brasil, 1998 a 2015.	59
Figura 31 - Detecção e contagem do número de células/10 CGA (células T CD4 ⁺ , T CD8 ⁺ e CD 68 ⁺) pelo estudo imuno-histoquímico em amostras cutâneas de quatro casos de actinomicetomas, Rio de Janeiro, Brasil, 1998 a 2015.	60
Figura 32 - Detecção e contagem do número de células/10 CGA (células T CD4 ⁺ , T CD8 ⁺ e CD 68 ⁺) pelo estudo imuno-histoquímico em amostras cutâneas de 18 casos de eumicetomas, Rio de Janeiro, Brasil, 1998 a 2015.	60
Figura 33 - Identificação de antígenos de IL-17 em linfócitos. Técnica de imuno-histoquímica, 1000X.....	61
Figura 34 - Identificação de antígenos de IL-10 em linfócitos e macrófagos. Técnica de imuno-histoquímica, 400X.	62
Figura 35 - Identificação de antígenos de IL-12 em linfócitos. Técnica de imuno-histoquímica, 400X.....	62
Figura 36 - Identificação de antígenos de TGF- 1, com padrão granular no citoplasma de macrófagos e linfócitos. Técnica de imuno-histoquímica, 400X.....	63
Figura 37 - Identificação de antígenos de TNF- , com padrão granular em macrófagos, plasmócitos e extracelular. Técnica de imuno-histoquímica, 400X.....	63
Figura 38 - Identificação de antígenos de NOS2 com padrão granular no citoplasma	

de macrófagos e extracelular. Técnica de imuno-histoquímica, 400X.....	64
Figura 39 - Identificação de antígenos de perforina com padrão granular no citoplasma de neutrófilo. Técnica de imuno-histoquímica, 1000X.....	64
Figura 40 - Análise do estudo imuno-histoquímico dos antígenos teciduais para pesquisa de citocinas e mediadores inflamatórios pesquisados em amostras cutâneas de 22 casos de micetomas, Rio de Janeiro, Brasil, 1998 a 2015.....	65
Figura 41 - Análise do estudo imuno-histoquímico dos antígenos teciduais para pesquisa de citocinas e mediadores inflamatórios pesquisados em amostras cutâneas de actinomicetomas, Rio de Janeiro, Brasil, 1998 a 2015.	65
Figura 42 - Análise do estudo imuno-histoquímico dos antígenos teciduais para pesquisa de citocinas e mediadores inflamatórios pesquisados em amostras cutâneas de eumicetomas, Rio de Janeiro, Brasil, 1998 a 2015.....	66

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

Os micetomas constituem infecções crônicas, não contagiosas formadoras de grãos, endêmicas nas regiões tropicais e subtropicais, podendo ser vistos na Ásia e alguns países do norte da África.

Os micetomas podem ser encontrados na América Central, América do Norte e América do Sul, com alta incidência na Venezuela e México (WELSH; VERA-CABRERA; SALINAS-CARMONA, 2007). A maioria dos casos reportados nas Américas é proveniente do México, Venezuela, Brasil e Colômbia. Na Índia subcontinental, o maior número de relatos é proveniente do Paquistão e na África foram observados casos na Somália, Sudão e Senegal, de acordo com Rouphael; Talati; Franco-Paredes (2007); Saul (2008), citado por TELLEZ; FRANCO-PAREDES (2010, p. 1). Alguns casos foram descritos por Khalil et al. (1999) na Nigéria, local com baixa ocorrência da doença.

A região compreendida pelos países africanos onde os micetomas são endêmicos é conhecida como o cinturão transafricano, ou Cinturão dos Micetomas. Esta área se estende entre 15° e 30° de latitude norte (NENOFF et al., 2015).

Há relatos de casos em áreas não endêmicas como Boston e Texas, nos Estados Unidos e na Guiana Francesa (IRIART et al., 2011). Os micetomas também podem ser observados na Grécia, Itália, Ilhas do Caribe e Argentina; excepcionalmente raros casos foram observados na Bulgária, Romênia, Albânia e Turquia de acordo com Bounfrate et al. (2014).

Nos países ocidentais, considerados não endêmicos para os micetomas e onde primariamente a doença não ocorre, alguns casos podem ser vistos acometendo imigrantes provenientes de áreas endêmicas como Somália e Senegal, e nestes casos são considerados como infecções importadas (NARS et al., 2016).

Têm sido reportados também casos em viajantes que visitaram áreas endêmicas (ESTRADA et al., 2012).

Recentemente, o primeiro caso autóctone de actinomicetoma na França foi descrito por Gilquin et al. (2016), em um paciente francês portador de leucemia, causado por uma nova espécie de *Nocardia* denominada de *Nocardia boironii* sp.nov. Outro caso autóctone de actinomicetoma foi observado na Europa, causado por

Actinomadura madurae em uma mulher florista italiana e relatado por Mencarini et al. (2016).

O Brasil é considerado um dos países com ocorrência endêmica de micetomas na América Latina de acordo com Castro et al. (1993); Almeida (1936) e Lacaz (1981), e LONDERO (1986, p. 73). A incidência e prevalência dos micetomas no Brasil é desconhecida, uma vez que não é considerado um problema de saúde pública e possui uma frequência menor se comparada a doenças como esporotricose, tuberculose e hanseníase (SAMPAIO et al., 2013).

No Brasil, os micetomas actinomicóticos são mais frequentes que os eumicóticos, segundo Almeida (1936). Castro e Piquero-Casals (2008) descreveram a sua ocorrência com uma relação de 3:1 entre actinomicetoma/eumicetoma, com maior número de casos no Nordeste.

1.2 Histórico

Os micetomas foram primeiramente descritos por Gil (1842), citado por DO VALLE; WELSH; VERA-CABRERA (2006, p.197) e posteriormente por Godfrey (1844), citado por VALLE; WELSH; VERA-CABRERA, (2006, p.197) com a denominação de *Madura foot*, referência ao distrito de Madura, na Índia.

Carter (1861) introduziu o termo micetoma para designar tumorações de natureza fúngica. Posteriormente, Pinoy (1913) citado por DO VALLE; WELSH; VERA-CABRERA (2006, p.197) denominou de actinomicetomas os casos causados por actinomicetos e de eumicetomas os casos causados por fungos.

O termo grão foi inicialmente descrito nos actinomicetomas por Bollinger (1877) citado por GEMEINHARD (1969, p.77-94); NENOFF et al. (2015, p.1-11) e nos eumicetomas por Latapi (1963).

No Brasil, os primeiros relatos de descrições de actinomicetomas diagnosticados datam de 1897, 1903 e 1913, cujo agente infeccioso foi a bactéria *Nocardia brasiliensis*, seguidos de relatos de Pereira Filho em 1917 no Rio Grande do Sul de acordo com Araújo (1930) citado por LONDERO (1986, p. 75).

Relatos de primeiros casos de eumicetomas no Brasil por *Scedosporium apiospermum* foram encontrados em 1916 e 1917, descritos separadamente por Magalhães (1916) e Linhares (1917). Posteriormente, Rocha et al. (1980) descreveram um caso e revisaram outros nove casos, previamente relatados. Purchio

et al. (1981) descreveram mais um caso com o mesmo agente. Os casos relatados posteriores a 1980, relacionados a esse mesmo agente, foram todos de lesões subcutâneas, Linhares (1917); Magalhães (1916) citado por OLIVEIRA et al. (2013, p.4).

1.3 Agentes infecciosos causadores de micetomas

No mundo, cerca de 60% dos casos de micetomas são infecções bacterianas causadas por actinomicetos e os 40 % restantes são causados por fungos (WELSH; VERA-CABRERA; SALINAS-CARMONA, 2007).

Os agentes são encontrados no solo como saprófitos e o diagnóstico de micetoma está vinculado ao achado de grãos, uma vez que um mesmo microrganismo pode desencadear formas diferentes de infecção e apresentações clínicas. Alguns fungos podem causar desde feo-hifomicose até micetoma, por exemplo, dependendo da forma observada (SEVERO; GRAUDENZ, 2015).

Os grãos são conceituados como colônias de microrganismos infectantes *in vivo* (NENOFF et al., 2015), podendo estar envoltos por substância amorfa denominada de cimento.

Espécies de bactérias dos gêneros *Nocardia*, *Streptomyces* e *Actinomadura* são os principais responsáveis pelos actinomicetomas.

Nocardia brasiliensis é responsável por 86% dos casos no México (WELSH; VERA-CABRERA; SALINAS-CARMONA, 2007) e comumente reportada em diferentes países da África, América do Sul e partes da Índia (ADNIKAN; DEY; PAJ, 2010). *Nocardia* constitui um gênero de bactérias gram-positivas, parcial ou fracamente álcool-ácido-resistentes, saprófitas, aeróbicas, que se ramificam em filamentos durante o crescimento, e são encontradas no solo, água e vegetais em decomposição (SOUZA et al., 2014).

Nas áreas endêmicas, algumas pessoas entram em contato com estes agentes infecciosos, no entanto, poucas desenvolvem a doença, com evidências de que a resposta imune pode ser uma das chaves para o controle da infecção por actinomicetos (SOUZA et al., 2014).

As espécies de *Nocardia* podem infectar indivíduos imunocompetentes, mas é mais comum que a infecção seja observada em indivíduos imunocomprometidos (HOGADE; METGUD; SWOOROOPARANI, 2011).

Nos casos de actinomicetomas por *Nocardia* as espécies responsáveis, em ordem de frequência, são *N. brasiliensis*, e espécies do complexo *N. asteroides*, *N. cyriacigeorgica*, *N. abscessus*, *N. transvalensis*-*N. wallacei* complexo, *N. mexicana*, *N. harenae*, *N. takedensis*) e *N. africana* em animais. Recentemente, foi descrito um caso por uma nova espécie denominada de *Nocardia boironii* sp. nov. (GLIQUIN et al., 2016).

Na América Latina *Nocardia brasiliensis* é o agente causal mais frequente dos actinomicetomas segundo Castro et al. (1993) citado por SEVERO; GRAUDENZ (2015, p. 756), enquanto *Scedosporium apiospermum* foi descrito como o agente mais comum nos eumicetomas de acordo com Guarro et al. (2006) citado por SEVERO; GRAUDENZ (2015, p. 756).

Os eumicetomas podem ser causados por diversas espécies de fungos: *Acremonium falciforme*, *A. kiliense*, *A. recifei*, *Aspergillus nidulans*, *Curvularia geniculata*, *C. lunata*, *Exophiala jeanselmei*, *Fusarium moniliforme*, *Leptosphaeria senegalensis*, *L. tompkinsii*, *Madurella grisea*, *M. mycetomatis*, *Neotestudina rosatii*, *Petriellidium boydii* e *Pyrenochaeta romeroi*. Os agentes fúngicos *Acremonium* sp e *Madurella mycetomatis* são os mais comumente encontrados no mundo (CAÇÃO, 2009).

Uma nova espécie de *Madurella* foi descrita no Sudão como causadora de eumicetoma com grão negro, denominada de *Madurella fahalli* (DE HOOG et al., 2012). Um novo patógeno de eumicetoma foi relatado no Sudão, denominado de *Pleurostomophora ochracea*, representando uma espécie da ordem *Calosphaerales*, referido como o primeiro fungo com grão amarelo segundo Mhmoud et al. (2012).

Em 2011, Iriart et al. (2011), descreveram um caso de eumicetoma em um paciente oriundo da Guiana Francesa, causado pelo fungo *Diaporthe phaseolorum* (*Phomopsis phaseoli*), originalmente presente em plantas encontradas em todo o mundo, mas que raramente envolve doenças humanas.

Estudos recentes de biologia molecular demonstraram eumicetomas causados por agentes como *Fusarium keratoplasticum* e *Fusarium. pseudensiforme*, *Fusarium thapsinum* e *Fusarium fujikuroi* (AL-HATMI et al., 2017).

O primeiro caso de eumicetoma por *Aspergillus flavus*, foi relatado por Ahmed et al. (2015) no Sudão com confirmação por isolamento, estudo molecular e análise imuno-histoquímica.

No Brasil, os agentes causadores de micetomas já isolados, de acordo com

Severo; Graudenz (2015) foram os seguintes:

Eumicetomas:

. Grãos brancos: *Acremonium recifei*, *Acremonium kiliense*, *Scedosporium apiospermum* (o mais comum).

. Grãos negros: *Exophiala jeanselmei*, *Pyrenochaeta romeroi*, *Madurella grisea*, *Madurella mycetomatis* (o mais comum).

Actinomicetomas:

. Grãos brancos: *Nocardia asteroides*, *Nocardia otitidiscaviarum*, *Nocardia transvalensis*, *Nocardia brasiliensis* e *Actinomadura madurae* (os dois últimos os mais comuns).

. Grão vermelho: *Actinomadura pelletieri*.

. Grão amarelo: *Streptomyces somaliensis*

1.4 Aspectos clínicos

Os micetomas constituem doenças crônicas formadoras de grãos, secundários ao inóculo dos agentes infecciosos de natureza fúngica ou bacteriana, caracterizados por nódulos, fístulas e acompanhados de secreção sero-sanguinolenta com eliminação de grãos de microrganismos. Os micetomas incidem principalmente em indivíduos do sexo masculino entre 20 e 50 anos de idade, porém podem acometer qualquer faixa etária, inclusive crianças. Podem incidir ainda, no sexo feminino e há relatos durante o período gestacional, podendo nestes casos apresentarem um curso clínico mais agressivo (SAMPAIO et al., 2015).

Na maioria dos casos comprometem pacientes oriundos de regiões rurais, envolvidos em atividades ao ar livre, podendo ser consideradas doenças ocupacionais (HOGADE; METGUD; SWOOROPARANI, 2011). Foram listados como doenças tropicais negligenciadas, incidindo em populações com baixo poder aquisitivo e limitação de recursos, podendo promover debilidade crônica, sequelas e estigmas sociais (HOTEZ et al., 2008).

Os microrganismos penetram na pele e tecido celular subcutâneo através de um evento traumático (DRESCH et al., 2010), embora em alguns casos não exista nenhuma história prévia de traumas.

Os micetomas caracterizam-se clinicamente pelo aparecimento de nódulos isolados ou confluentes localizados na pele e tecido celular subcutâneo, acompanhados de tumefação, abscessos, fistulização e extrusão de grãos em meio a material sero-sanguinolento (WELSH; VERA-CABRERA; SALINAS-CARMONA, 2007; VENKATSWAMI; SANKARASUBRAMANIAN; SUBRAMANYAM, 2012). Em alguns casos pode surgir hiperpigmentação cutânea (NENOFF et al., 2015).

Classicamente, os micetomas são indolores e tardiamente cursam com fibrose local. A dor quando presente, geralmente está associada a infecções bacterianas secundárias (NENOFF et al., 2015).

Embora sejam descritos em extremidades inferiores em cerca de 70% dos casos (KIRAN et al., 2009; FAHAL, 2004), também podem ser vistos em outras topografias como parede abdominal (FAHAL et al., 1994), cabeça, pescoço, tórax, mãos, braços, glúteos e joelho (WELSH; VERA-CABRERA; SALINAS-CARMONA, 2007). Kothiwala et al. (2015) relataram um caso de eumicetoma por grão negro na mama, clinicamente desprovido de fístulas, sinais de drenagem ou extrusão de grãos, diagnosticado inicialmente como fibroadenoma.

Na maioria das vezes, os micetomas são lesões localizadas na pele e tecido celular subcutâneo, porém podem comprometer ainda planos mais profundos como músculos, fáscia, tendões, articulações, tecido ósseo e linfonodos conforme descrito por Murthy e Swain (2011) e infreqüentemente órgãos internos como cérebro (MAHESHWARI et al., 2010), coração (KANAKIS et al., 2014), bexiga e pulmão (FAHAL et al., 2015).

Outros locais raros também foram relatados como olhos, bolsa escrotal, cavidade oral, palato e língua (FAHAL et al., 2015). Micetomas em seios paranasais foram descritos por Klosek et al. (1997).

Lesões não usuais perineais foram relatadas, mimetizando doença sexualmente transmissível em um homem de 36 anos com infecção por *M. mycetomatis* (GUPTA et al., 2010). Clarke (1953) já havia descrito a ocorrência de micetoma nos testículos. Micetoma vulvar foi reportado por Fahal e Sharfy (1998).

Relatos de formas clínicas com apresentação de pequenos micetomas foram denominadas de minimicetomas por Lavalley, Caffiizares e Ed Herman (1992). Os minimicetomas são lesões pequenas, com poucas fístulas e observadas principalmente em crianças e jovens, causados por *Nocardia brasiliensis*. Os minimicetomas foram descritos na face, tronco e membros e clinicamente podem ser

confundidos com foliculites, outras micoses, lesões císticas e neoplasias de partes moles. Casos de minimicetomas causados por espécies de *Madurella* foram descritos, e nestes casos, se preconiza o uso da denominação de micetoma eumicótico pequeno (LÓPEZ-CEPEDA et al., 2005).

A disseminação dos agentes infecciosos dos micetomas pode ocorrer por via linfática e/ou hematogênica (MURTHY; SWAIN, 2011). De acordo com Chandler; Kaplan e Ajello (1980), a disseminação hematogênica e linfática embora raramente ocorra nos micetomas, ela é especialmente infrequente nos eumicetomas, e quando observada, surge nos estágios iniciais da doença.

As lesões podem surgir semanas, meses ou anos após o evento responsável pelo inóculo, e alguns pacientes não se recordam do trauma inicial em alguns casos, dificultando o diagnóstico. A infecção pode evoluir de três a dez anos, com uma média de cinco anos de evolução (MAITI; RAY, 2002).

Os actinomicetomas exibem uma evolução clínica mais rápida quando comparada aos eumicetomas. As lesões dos actinomicetomas exibem bordas menos definidas, enquanto os eumicetomas apresentam evolução e crescimento lentos, com lesões de limites bem definidos e que podem ainda se apresentar encapsuladas (DRESCH et al., 2010).

Sintomas sistêmicos são incomuns e a febre é raramente encontrada (NENOFF et al., 2015). Sintomas respiratórios, neurológicos e outros sintomas, podem estar presentes quando a doença compromete o tórax, cabeça, pescoço e coluna vertebral. A invasão de periósteo pode levar à osteomielite (WELSH; VERA-CABRERA; SALINAS-CARMONA, 2007).

Uma alta incidência de infecção secundária tem sido relatada na literatura, e quando não tratada adequadamente pode levar a complicações graves como septicemia e ao óbito (VENKATSWAMI; SANKARASUBRAMANIAN; SUBRAMANYAM, 2012).

A resposta terapêutica nos micetomas é variável. Os actinomicetomas possuem melhor prognóstico quando tratados com antibioticoterapia adequada e desbridamento local. No entanto, os eumicetomas respondem parcialmente aos agentes antifúngicos com altas taxas de recorrência e podem requerer intervenções cirúrgicas e amputações.

1.5 Diagnóstico

O diagnóstico baseia-se geralmente na apresentação clínica e no tipo do grão, que pode ser pesquisado através de exame direto com solução de potassa (KOH), análise histopatológica e exames microbiológicos e micológicos (WELSH; VERA-CABRERA; SALINAS-CARMONA, 2007). Exames radiológicos, ultrassonografia, citologia, histologia, imunodiagnóstico e cultura são citados por Venkatswami; Sankarasubramanian; Subramanyam (2012) como ferramentas diagnósticas. Em alguns casos, estudos com técnicas de biologia molecular podem ser realizados para a identificação dos elementos infecciosos, especialmente nos casos de eumicetomas (ESTRADA et al., 2012).

Relatos de detecção simultânea de dois diferentes agentes no mesmo paciente são raros (NENOFF et al., 2015), e se necessário deve ser pesquisado. Murty e Swain (2011) relataram um caso de micetoma e cromomicose simultâneos em um paciente da Índia.

1.6 Aspectos anatomopatológicos e microbiológicos

O exame macroscópico das lesões é de grande importância e constitui o primeiro passo para a identificação dos grãos, que podem ser visualizados macroscopicamente. Nas lesões, os grãos se localizam nos seios e nas fístulas, em meio ao exsudato. A identificação e caracterização macroscópica dos grãos, quando presentes nas lesões e exsudatos, podem ser a chave inicial para o diagnóstico.

Os grãos consistem em massas organizadas de hifas de fungos ou filamentos de actinomicetos, que podem ou não estar embebidos em cimento. Os grãos possuem variações de forma, tamanho e consistência de acordo com os agentes etiológicos.

Os grãos têm tamanho que varia de 2,5 μm a 2,0 mm, e podem ser brancos, amarelos, rosa-avermelhados, marrons e pretos (grãos negros). Com relação à consistência, os grãos podem ser amolecidos, friáveis, firmes ou pétreos.

Algumas vezes, material exógeno como espinhos podem ser vistos próximos aos grãos, presumidamente interpretados como prováveis veículos da infecção (CHANDLER; KAPLAN; AJELLO, 1980).

Grandes grãos negros associados à presença de cimento pigmentado são vistos nas infecções por *M. mycetomatis*. *Actinomadura pelletierii* forma grãos levemente

avermelhados e sem cimento, e *Streptomyces somaliensis* produz grãos amarelos e de tamanhos médios com cimento (IBRAHIM et al., 2013). Grãos brancos podem corresponder à etiologia fúngica ou bacteriana (SEVERO; GRAUDENZ, 2015). Recente, o relato do primeiro fungo causador de eumicetoma com grão amarelo denominado de *Pleurostomophora ochraceo* foi realizado por Mhmoud et al. (2012).

Alguns componentes de grãos fúngicos, como lipídeos, proteínas, melanina e altas concentrações de Cu^{+1} , Zn^{+2} e Ca^{+2} ; podem contribuir na sua patogenicidade e capacidade de produzir cimento, que atua como um fator protetor importante contra os mecanismos de defesa do hospedeiro e possibilidade de resistência contra agentes antifúngicos (RODERICK; KEITH, 1992).

A melanina presente em alguns fungos pigmentados contribui com fatores protetores contra a luz UV, a resposta imune do hospedeiro e drogas antifúngicas usadas no hospedeiro (IBRAHIM et al., 2013). Outra característica dos fungos demáceos, como por exemplo *M. mycetomatis*, é a capacidade de se ligarem a alguns metais pesados levando a uma resistência maior aos mecanismos de defesa do hospedeiro (IBRAHIM et al., 2013).

A pesquisa direta de grãos pode ser feita com análise a fresco pela microscopia óptica em solução de KOH (potassa a 10%) entre lâmina e lamínula (MURTHY; SWAIN, 2011), permitindo a identificação de hifas ou filamentos bacterianos.

O exsudato das lesões pode ainda ser aspirado, colocado em fixador de %cell block+, processado e cortado em micrótomo para ser analisado em microscopia óptica. A sensibilidade diagnóstica pela técnica de %cell block+ é de 87,5% e 85,7% nos casos de eumicetomas e actinomicetomas, respectivamente (YOUSIF; FAHAL; SHAKIR, 2010).

A análise microscópica das lesões pode revelar à Hematoxilina-Eosina (H&E) a presença de grãos, e é possível diferenciar os actinomicetomas dos eumicetomas pela aparência dos grãos (SEVERO; GRAUDENZ, 2015).

Os grãos apresentam formato variável, geralmente esférico ou lobular, distribuídos em meio ao infiltrado inflamatório e apresentam uma aparência granular à H&E de acordo com Estrada et al. (2012). O achado microscópico na H&E de área de aspecto radial, amorfa e eosinofílica, presente na periferia do grão é conhecida como fenômeno reacional de Splendore. Hoeppli (CHANDLER; KAPLAN; AJELLO, 1980).

De acordo com Londero et al. (2002), os grãos quando analisados pela H&E,

permitem a identificação de alguns agentes como *A. pelletieri* (grãos fraturados, de cor violácea homogênea e sem clavas). *A. madurae* (grãos grandes, de até 2mm, esféricos ou lobulados, com área central eosinofílica, zona média de trama de filamentos basofílicos, circundada por uma coroa de franjas eosinofílicas com cerca de 20 a 50 µm de espessura), *S. somaliensis* (grão esférico ou ovalado, usualmente fraturado, associado à presença de cimento), *M. mycetomatis* (grão grande, 2 mm ou mais, composto por hifas e elementos esféricos hialinos, em meio a cimento acastanhado). *M. grisea*, *P. romeroi* e *E. jeanselmei* produzem grãos semelhantes: esféricos ou arciformes, com região central clara e periferia escura, composta por densa trama de hifas e elementos esféricos. *P. boydii* (*S. apiospermum*) e as três espécies de *Acreminium* possuem grãos brancos, esféricos e lobulados, com centro amorfo e trama periférica composta por hifas de 3 a 5 µm.

As espécies de *Nocardia* produzem grãos pequenos, ovais ou lobulados e homogeneamente corados pela eosina; podem ou não apresentar clavas periféricas e os filamentos tornam-se mais visíveis quando corados pelo Gram Brown-Brenn.

Como os agentes causais dos micetomas diferem nas características dos grãos, Severo e Graudenz (2015) descreveram algumas das principais variações de grãos em agentes de micetomas, melhor ilustradas nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1 . Características macroscópicas e microscópicas ao H&E dos eumicetomas.

Agentes Causais dos Eumicetomas			
Agente Causal	Textura	Cimento	H&E
Grãos brancos			
<i>Acremonium falciforme</i> *	Macio	Não	Borda eosinofílica; complexa rede de micélio hialino e clamidosporo.
<i>A. kiliense</i> *	Macio	Não	Igual anterior.
<i>A. recifei</i> *	Macio	Não	Igual anterior.
<i>Aspergillus nidulans</i>	Macio	Não	Zonas com eosinofilia; densa rede miceliana com grandes clamidosporos.
<i>Fusarium moniliforme</i>	Macio	Não	Eosinofílico, grãos inteiros ou lobulados compostos de massa miceliana; hifas na periferia.
<i>Neostedina rosatii</i>	Duro	Sim	Forma irregular, borda eosinofílica, zona central com micélio desintegrado e clamidosporo.
<i>Scedosporium apiospermum</i> *	Macio	Não	Borda eosinofílica; composto de densa rede de micélio hialino com clamidosporos proeminentes.
Grãos negros			
<i>Curvularia geniculata</i>	Duro	Sim	Lobulado; periferia escura com frouxa rede miceliana e grandes clamidosporos no cimento periférico.
<i>C. lunata</i>	Duro	Sim	Igual anterior.
<i>Exophiala jeanselmei</i> *	Macio	Não	Forma irregular, periferia escura composta de micélio e clamidosporos.
<i>Leptosphaeria senegalensis</i>	Duro	Sim	Ver descrição de <i>C. geniculata</i> .
<i>L. tompkinsii</i>	Duro	Sim	Ver descrição de <i>C. geniculata</i> .
<i>Madurella grisea</i> *	Duro	Variável	Zona periférica escura, forma variável, densa rede interna de micélio com clamidosporos.
<i>M. mycetomatis</i> *	Duro	Sim	Compacto, com formas variáveis de tamanho, com micélio na periferia com clamidosporos.
<i>Pyrenochaeta romeroi</i> *	Macio	Variável	Zona periférica escura, forma variável, densa rede interna de micélio sem clamidosporos.

* Agentes isolados no Brasil.

Fonte: Severo; Graundez (2015).

Tabela 2 - Características macroscópicas e microscópicas ao H&E dos actinomicetomas.

Agentes Causais dos Actinomicetomas			
Agente Causal	Textura	Cimento	H&E
Grãos brancos			
<i>Actinomadura madurae</i> *	Macio	Não	Periferia intensamente hematoxilílica; filamentos não-ácido-resistentes.
<i>Nocardia asteroides</i> *	Macio	Não	Filamentos ácido-resistentes variáveis.
<i>N. brasiliensis</i> *	Macio	Não	Igual anterior.
<i>N. otitidiscaviarum</i> *	Macio	Não	Igual anterior.
<i>N. transvalensis</i> *	Macio	Não	Igual anterior.
<i>Nocardiosis dassonvillei</i>	Macio	Não	Filamentos não-ácido-resistentes.
Grão vermelho			
<i>Actinomadura pelletien</i> *	Firme	Não	Não-ácido-resistentes; intensamente hematoxilílicos.
Grão amarelo			
<i>Streptomyces samaliensis</i> *	Duro	Sim	Não-ácido-resistentes; homogêneos e fracamente eosinofílico.

* Agentes isolados no Brasil; Os grãos de *Nocardia* são indistinguíveis.

Fonte: Severo; Graundez (2015).

Os grãos podem ser vistos em meio ao infiltrado inflamatório, no centro dos granulomas, acompanhados ou não de microabscessos localizados principalmente na derme e tecido celular subcutâneo.

Segundo Kiran et al. (2009), os micetomas mostram granulomas supurativos, compostos por histiócitos e neutrófilos. Observa-se a presença de linfócitos, plasmócitos, neutrófilos, eosinófilos, histiócitos, células epitelioides e células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho e/ou tipo Langhans; em proporções variadas nas lesões. O estroma pode apresentar edema, neovascularização, fibrose e necrose (CHANDLER; KAPLAN; AJELLO, 1980). De acordo com Estrada et al. (2012), abscessos em meio a inflamação, hiperplasia pseudo-epiteliomatosa, tecido de granulação e fibrose podem ser observados.

Técnicas histoquímicas são utilizadas para a pesquisa e identificação dos elementos infecciosos: ácido periódico de Schiff (PAS) e Prata Metenamina de Grocott para fungos com identificação de hifas e elementos esféricos e Gram Brown-Brenn e Giemsa para as formas bacterianas filamentosas (SAMAILA; ABDULLAHI, 2011). Estes filamentos também se coram pela Prata metenamina de Grocott (CHANDLER; KAPLAN; AJELLO, 1980).

Segundo Severo e Graudenz (2015) embora a coloração pela prata metenamina de Grocott não permita a diferenciação entre fungos hialinos e demáceos, sua aplicação na rotina diagnóstica melhora a identificação dos elementos fúngicos. Para os actinomicetos, os autores preconizam a coloração de Gram para tecidos tais como: Brown-Brenn, Brown-Hoops ou McCallumm-Goodpasture.

As colorações especiais utilizadas para pesquisa de bactérias álcool-ácido-resistentes como Fite, Wade ou Ziehl-Neelsen devem ser realizadas e serão positivas nos casos de *Nocardia* spp., se contrapondo aos casos de *Actinomyces*, que não se coram por estas colorações. A técnica de Kinyoun pode ser usada nos actinomicetomas e revela ácido-resistência fraca dos filamentos bacterianos.

Exames microbiológicos e de cultura são necessários para o diagnóstico definitivo dos agentes causais destas lesões. No entanto, quando estes métodos se encontram indisponíveis, ou são inconclusivos, a distinção morfológica macroscópica e microscópica dos grãos possibilita a diferenciação entre actinomicetomas e eumicetomas e pode determinar o tratamento inicial a ser realizado. Nestes casos, a distinção histológica precisa é fundamental para determinar o tratamento e o prognóstico dos pacientes (CHANDLER; KAPLAN; AJELLO, 1980). Outro fator

importante é que a análise histológica demanda menos tempo, quando comparada aos exames microbiológicos e cultura, e biopsias formolizadas são de fácil transporte, manipulação e armazenamento (CHUFAL; THAPLIYAL; GUPTA, 2012).

Os principais diagnósticos diferenciais clínicos e histopatológicos relevantes são botriomicose, osteomielites crônicas inespecíficas, leishmaniose, tuberculose, outras micobacterioses e micoses profundas (KIRAN et al., 2009). Coccidioidomicose, feo-hifomicose e esporotricose são algumas doenças fúngicas citadas como exemplos de diagnóstico diferencial dos micetomas, citados por WELSH; VERA-CABRERA; SALINAS-CARMONA (2007). Doenças não neoplásicas como podoconiose, neoplasias malignas como os sarcomas de pele, partes moles ou ossos e ainda sarcoma de Kaposi endêmico e epidêmico, também são citados (NENOFF et al., 2015).

Quando populações bacterianas do tipo cocos, cocobacilos e bacilos são identificados nos grãos, o diagnóstico de botriomicose pode ser feito (COELHO; DINIZ; SOUZA FILHO, 2009). A botriomicose constitui uma doença bacteriana também formadora de grãos, com apresentação clínica e morfológica semelhante aos micetomas. É considerada um dos seus principais diagnósticos diferenciais, diferindo dos actinomicetomas, por ter como agente causal bactérias microbiotas da pele e tubo digestivo (cocos e bastonetes), que frequentemente são *Staphylococcus aureus* (40%) e *Pseudomonas* sp. (20%). Outros microrganismos reportados são *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus* spp., *Actinobacillus lignieresii*, etc (COELHO; DINIZ; SOUZA FILHO, 2009).

1.7 Aspectos imunológicos nos micetomas

Os eventos observados durante um processo infeccioso compreendem a invasão e a colonização do hospedeiro por determinado agente, evasão da imunidade e, finalmente, a lesão tecidual, que pode se dar por morte celular ou por ação de toxinas.

A defesa inicial por parte do hospedeiro é proporcionada pelo sistema imune inato e, posteriormente, pelo sistema imune adaptativo, que promove resposta imune mais duradoura e eficaz.

A imunidade inata do hospedeiro aos microrganismos consiste, principalmente, em dois mecanismos: modulação do processo inflamatório pelas alterações

vasculares e participação de células inflamatórias. Neste tipo de defesa são fundamentais os papéis das barreiras físicas (epitélios) e de agentes antimicrobianos celulares. A resposta inata celular tem como importantes agentes as células fagocíticas polimorfonucleares e mononucleares, células dendríticas, células Natural Killer+ (NK) e outras células linfoides com receptores gama/delta e as recém-identificadas células linfoides inatas (GRONKE; KOFOED-NIELSEN; DIEFENBACH, 2016).

Formas adicionais de defesa englobam participantes do sistema complemento e mediadores inflamatórios. São descritas duas formas de respostas relacionadas à imunidade adaptativa, denominadas de imunidade humoral e imunidade mediada por células. A imunidade humoral é mediada principalmente pelas secreções de anticorpos produzidos pelos linfócitos B e ocorre de forma especializada e diferente para cada tipo de agente infeccioso. (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015, cap. 1, p. 3). A imunidade mediada por células é promovida pelas subpopulações de linfócitos T e B e anticorpos específicos, que ocorre de forma especializada e diferente para cada tipo de agente infeccioso. São gerados subgrupos diversos de células TCD4+ (Th1, Th2, Th17 e T reguladoras como TR1, TR17 e TR9) e a produção de citocinas anti e pró-inflamatórias. Os subtipos de células T possuem funções efetoras específicas e recrutam diferentes tipos de células para o sítio inflamatório, dependendo do tipo de citocina que secretam (DARDALHON et al., 2008).

As células T gama/delta de memória constituem um tipo específico de células T, que possuem características celulares de ambos os sistemas, inato e adaptativo; atuam na produção de citocinas, que promovem o recrutamento de fagócitos e de respostas inflamatórias celulares e secretam granzimas e perforina que destroem as células alvo infectadas e microrganismos (LALOR; MCLOUGHLIN, 2016).

Os macrófagos e neutrófilos constituem a primeira linha de defesa contra os patógenos invasores, atacando os fungos com uma variedade de enzimas, e compostos oxidativos e nitroativos tóxicos. Células dendríticas direcionam a maturação de células T CD4⁺ helper (T_h) e populações de células T regulatórias (T_{Reg}), levando a reações inflamatórias e mecanismos de proteção à presença do fungo (GOW; NETEA, 2016).

Células Th1 atuam combatendo os patógenos intracelulares e promovem as inflamações teciduais autoimunes. As células Th2 atuam na destruição dos patógenos extracelulares, e uma reação Th2 exacerbada pode induzir à asma, alergias e atopias.

Em contrapartida, células Th17 têm a capacidade de combater patógenos intracelulares e extracelulares e ainda atuar em processos inflamatórios autoimunes (DARDALHON et al., 2008). Células Th17 constituem um subgrupo de células CD4⁺ caracterizadas pela produção de interleucina-17 (IL-17), que constitui uma citocina inflamatória com efeitos importantes sobre as células estromais e mecanismos inflamatórios autoimunes (TESMER et al., 2008).

As citocinas promovem principalmente o crescimento e diferenciação das células do sistema imunológico, a expressão de moléculas de adesão pelos leucócitos e a migração das células linfoides do sangue através do endotélio para o local da inflamação (MHMOUD; FAHAL; VAN DE SANDE, 2013), com regulação entre a imunidade inata e adaptativa. Citocinas como IL-1, IL-6 e TNF- α atuam como pirogênicos endógenos que acentuam a resposta inflamatória aguda (MURRAY et al., 2009). Citocinas como IL-15 e IL10 são produzidas durante a resposta imune inata e regulam a função dos macrófagos (FONSECA et al., 2017). O INF- γ é uma citocina que atua na resposta imune inata e nos linfócitos Th1 CD4⁺ e CD8⁺ citotóxicos (SCHOENBORN; WILSON, 2007).

Segundo estudos de el Hassan et al. (2001) compreendendo uma série de casos de actinomicetomas, foi observada a presença de reação inflamatória tecidual de dois tipos: o tipo 1 é composto por três regiões, a primeira formada por neutrófilos ao redor do grão; a segunda, intermediária, por macrófagos; e terceira, periférica, consiste de plasmócitos e linfócitos; já na do tipo 2 não há a presença de neutrófilos e os grãos são circundados por macrófagos e células gigantes. As citocinas identificadas nas lesões e linfonodos foi do tipo Th2 (IL-10 e IL-4). Os fenótipos celulares demonstrados pelos autores por intermédio de técnicas imuno-histoquímicas, detectaram positividade para CD15 (neutrófilos), CD20 (linfócitos B), CD3 (linfócitos T) e CD68 (macrófagos).

Guimarães et al. (2003) reportaram a presença de populações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ nas reações teciduais cutâneas de actinomicetomas e eumicetomas, associada a uma população de macrófagos, com um maior número de células CD8⁺ nos actinomicetomas. Segundo os autores, apesar da identificação dos fenótipos celulares, não observaram uma estratificação bem organizada destes fenótipos nos focos inflamatórios dos micetomas.

Méndez-Tovar et al. (2004) descreveram baixa produção de INF- γ e altas concentrações de IL-4 e IL-10 e TNF- α em sobrenadante de células linfoides

periféricas de pacientes com actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*, sugerindo que os pacientes possuem produção elevada de IFN- γ e concentrações de IL-4, IL-10 e TNF- α , mediadores presentes na resposta inflamatória linfocitária tipo Th2. Estudos *in vitro* e com sobrenadantes de cultura de células de baço de camundongos mostraram, ainda, a participação de mediadores como IFN- γ , IL-1 e IL-4 nas respostas inflamatórias de infecções causadas por *N. brasiliensis*, (CASTRO-MATTEOTTI et al., 2008).

Salinas-Carmona, Rosas-Taraco e Welsh (2012) descreveram que a infecção por *N. brasiliensis* poderia induzir a uma imunossupressão local provavelmente relacionada à produção de IL-10. Alguns autores sugerem que a IL-10 é responsável por uma maior susceptibilidade a desenvolver micetomas e pode determinar a gravidade das formas clínicas. Aumento dos níveis séricos desta citocina foi encontrado nos pacientes com micetoma (MHMOUD; FAHAL; VAN DE SANDE, 2013).

Nos micetomas e outras micoses, a formação do granuloma e o tipo de resposta imune celular são considerados importantes mecanismos de defesa para eliminação dos microrganismos. O corpo humano é capaz de produzir dois tipos de granulomas para combater os patógenos, denominados de granulomas tipo 1 e 2. O tipo 1 é composto principalmente por células mononucleares e participação de citocinas Th1. Em contraste, o granuloma tipo 2 caracteriza-se pela presença de eosinófilos e citocinas Th2. Tem sido atribuído à IL-10 a participação na formação dos granulomas e a sua expressão nos granulomas de micetomas seria indicativo de que também possui atuação neste tipo de infecção. A IL-10 promove a inibição da atividade fungicida regulada pelo INF- γ nos neutrófilos; e altos níveis de IL-10 nos sítios de infecção, podem resultar em uma resposta imune não efetiva contra os fungos (MHMOUD; FAHAL; VAN DE SANDE, 2013).

Foram relatados níveis altos de citocinas Th1 (IFN- γ , TNF- α , IL-1 e IL-2) e níveis baixos de citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) em pacientes com micetomas por *M. mycetomatis* tratados cirurgicamente quando comparados com pacientes sem intervenção cirúrgica

Os autores sugeriram que estes resultados apontam para uma resposta contra o fungo baseada na fase adaptativa, na qual atuam como fatores regulatórios inflamatórios que interferem na extensão da infecção e o tempo de evolução (NASR et al., 2016).

Estudos relacionados aos tipos de resposta inflamatória em outros agentes infecciosos são encontrados na literatura científica. Algumas cepas de *Cryptococcus neoformans* inibem a produção de citocinas como o TNF- α e a IL-12 por macrófagos e estimulam a produção de IL-10, que por sua vez, inibe a ativação de macrófagos. As células T CD4⁺ e CD8⁺ atuam destruindo as formas leveduriformes deste fungo. *Histoplasma capsulatum* é destruído por mecanismos semelhantes. Estudos referentes a mecanismos de respostas imunológicas relacionados a leishmaniose citam o papel de células Th1 CD4⁺ e de IFN- γ (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015, cap. 16, p. 347-353).

A expressão de óxido nítrico produzido pelos neutrófilos parece determinar o tamanho das lesões nos eumicetomas causados por *M. mycetomatis*. Pacientes com maior concentração de óxido nítrico desenvolveram lesões maiores do que aqueles com menor concentração desta substância (VAN DE SANDE et al., 2007). Os macrófagos ativados pelo IFN- γ são fundamentais para a eliminação de fungos, bem como a produção de óxido nítrico pelos neutrófilos e macrófagos, potente agente antimicrobiano (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009), e pela ação de uma enzima chamada óxido nítrico sintase induzida (NOS2). Esta enzima encontra-se ausente em macrófagos em repouso, porém, pode ser induzida em resposta a produtos microbianos, especialmente em combinação com IFN- γ . A NOS2 catalisa a conversão de arginina em citrulina e o óxido nítrico é liberado. No interior dos fagolisossomos o óxido nítrico pode se combinar com o peróxido de hidrogênio ou superóxido e produzir radicais peroxinitrito que matam os microrganismos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015, cap. 4, p. 77). Vera-Cabrera et al. (2012) atribuíram a presença do polimorfismo genético nos genes para catecol-metil-transferase (COMT) e NOS2 à instalação de micetomas, bem como ao tamanho das lesões. Mutações nestes genes foram observadas em grandes lesões de micetomas. Meester; Rosas-Taraco e Salinas-Carmona (2013) encontraram aumento de expressão de marcadores pró-inflamatórios como GM-CSF, IFN- γ e NOS2 em infecção experimental de *N. brasiliensis*, patógeno causador de actinomicetoma em camundongos BALB-c. Os autores relatam que a infecção experimental aguda e crônica cursa com microabscessos e abundantes neutrófilos. Entretanto, observaram um aumento de linfócitos no período de semi-resolução do processo, que cursou com alta expressão de IFN- γ e aumento de NOS2, e sugerem uma ativação clássica de macrófagos. Descrevem, ainda, aumento local de IL-13 e correlacionam este achado com o

tamanho das lesões.

As principais proteínas citotóxicas das células T CD8⁺ citotóxicas são as granzimas e as perforinas. A perforina constitui uma proteína semelhante ao complemento C9, causadora de perturbação membranar, que atua junto ao processo inflamatório promovendo a morte celular das células alvo, através da apoptose. A perforina induz a captação de granzimas em endossomos das células alvo, ativando caspases e levando à morte celular (ABBAS, LICHTMAN; PILLAI, 2015, cap. 11, p. 236). Relatos da participação da perforina nos processos inflamatórios dos micetomas não foram encontrados.

Os estudos imuno-histoquímicos estão sendo utilizados para um melhor esclarecimento da patogenia e imunologia dos micetomas, no entanto, não encontramos relatos na literatura da disponibilidade de técnicas imuno-histoquímicas pelo método de imunoperoxidase em amostras de tecidos parafinizados que possam contribuir para uma caracterização definitiva das espécies dos agentes etiológicos responsáveis pelos casos de micetoma. A identificação da espécie dos agentes é atualmente realizada utilizando-se métodos de cultura, fenótipo fúngico e biologia molecular.

2 JUSTIFICATIVA

Os micetomas se caracterizam como doenças negligenciadas, que incidem em populações com baixo poder aquisitivo, e provenientes na maioria das vezes de áreas rurais. O pequeno número de casos relatados na literatura, associado ao acesso precário dos pacientes aos serviços de saúde especializados dificultam o seu diagnóstico e tratamento.

Muitos dos casos de micetomas vistos na prática clínica persistem sem uma caracterização definitiva do agente etiológico, apesar da suspeição clínica e apresentação morfológica compatível com micetoma, especialmente nos casos em que não são identificados os grãos nas lesões, dificultando ainda mais o tratamento adequado destes pacientes.

Como são observadas uma variabilidade de apresentações e evoluções clínicas nos casos de micetoma, é possível que exista uma correlação entre os padrões morfológicos encontrados e uma diferença no comportamento dos agentes infecciosos e da resposta imune individual do hospedeiro. Os relatos encontrados na literatura não esgotam os achados morfológicos, o tipo de resposta celular e o papel de algumas citocinas e mediadores inflamatórios envolvidos no processo inflamatório.

Chama a atenção, portanto, a possibilidade de obtenção de novos conhecimentos a partir deste estudo aplicando as técnicas propostas em amostras teciduais cutâneas humanas de micetomas, em uma série de casos diagnosticados no Rio de Janeiro, Brasil.

Análises conjuntas dos resultados poderão fornecer subsídios para uma melhor compreensão da histopatologia, patogenia e imunopatologia destas doenças, proporcionando ainda, a caracterização dos achados histopatológicos dos micetomas em nosso meio com impacto direto na acurácia do diagnóstico histopatológico e melhorias no tratamento.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Descrever os aspectos histopatológicos, imuno-histoquímicos e imunopatológicos em amostras de lesões cutâneas de actinomicetomas e eumicetomas.

3.2 Objetivos específicos

Descrever os achados histopatológicos das amostras de lesões cutâneas com diagnóstico de micetoma.

Caracterizar do ponto de vista morfo-tintorial os agentes etiológicos dos micetomas presentes nas amostras de tecido.

Identificar o perfil de células inflamatórias e sua quantificação tecidual na área da lesão.

Identificar a presença de citocinas e mediadores inflamatórios na área da lesão.

Comparar os achados histopatológicos e imuno-histoquímicos entre os micetomas e eumicetomas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho do Projeto

Foi realizado um estudo transversal descritivo compreendendo amostras emblocadas em parafina de lesões cutâneas de pacientes com diagnóstico histopatológico de micetoma analisadas no Serviço de anatomia Patológica no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) /Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) no período de janeiro de 1998 a julho de 2015.

4.2 Casuística

Foram incluídas amostras cutâneas com diagnóstico prévio histopatológico de micetoma e visualização microscópica de grãos, cujos blocos de parafina continham material biológico suficiente para a realização das técnicas propostas.

O estudo compreende amostras provenientes do Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatologia Infecciosa do INI, analisadas no Serviço de Anatomia Patológica (SEAP) do INI, no período de janeiro 1998 a julho de 2015. Foram identificadas no total 26 amostras com diagnóstico de micetoma, sendo 18 de eumicetomas e 8 de actinomicetomas. Porém, dentre os casos de actinomicetomas, 04 deles não tinham material em bloco de parafina para a realização das técnicas propostas e foram retirados do estudo.

A identificação dos agentes etiológicos foi realizada por exames microbiológicos e/ou estudo molecular. A obtenção destes dados se deu por consultas aos bancos de dados do Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatologia Infecciosa do INI e/ou por consultas aos prontuários dos pacientes.

Para o estudo foram selecionadas um total de 22 amostras de micetomas, dezoito amostras tratavam-se de eumicetomas e quatro, de actinomicetomas, conforme quadro 1 abaixo:

Quadro 1 - Amostras cutâneas selecionadas e previamente diagnosticadas como micetoma.

Casos	Conclusão	Agente etiológico
1	Eumicetoma	<i>Mycelia sterilia (Phomopsis columnaris)</i>
2	Actinomicetoma	<i>Nocardia asteroides</i>
3	Actinomicetoma	Agente desconhecido
4	Eumicetoma	<i>Madurella mycetomatis</i>
5	Eumicetoma	<i>Madurella mycetomatis</i>
6	Actinomicetoma	<i>Nocardia</i> sp
7	Eumicetoma	<i>Scedosporium apiospermum</i>
8	Eumicetoma	<i>Madurella mycetomatis</i>
9	Eumicetoma	<i>Madurella mycetomatis</i>
10	Eumicetoma	<i>Madurella mycetomatis</i>
11	Eumicetoma	<i>Madurella mycetomatis</i>
12	Eumicetoma	<i>Madurella mycetomatis</i>
13	Eumicetoma	<i>Mycelia sterilia (Phomopsis columnaris)</i>
14	Eumicetoma	Agente desconhecido
15	Actinomicetoma	<i>Nocardia brasiliensis</i>
16	Eumicetoma	<i>Acremonium</i> sp
17	Eumicetoma	<i>Mycelia sterilia (Phomopsis columnaris)</i>
18	Eumicetoma	<i>Mycelia sterilia (Phomopsis columnaris)</i>
19	Eumicetoma	<i>Mycelia sterilia (Phomopsis columnaris)</i>
20	Eumicetoma	Agente desconhecido
21	Eumicetoma	<i>Scedosporium apiospermum</i>
22	Eumicetoma	<i>Scedosporium apiospermum</i>

4.3 Critérios de exclusão

Esgotamento prévio da lesão ou a não representação dos grãos nos blocos de parafina para realização do estudo.

Presença de artefatos técnicos que inviabilizassem a análise microscópica.

4.4 Estudo Histopatológico

As amostras teciduais emblocadas em parafina foram cortadas em micrótomo histológico com obtenção de cortes com 4 µm de espessura, posteriormente coradas pelas técnicas histoquímicas de H&E, PAS, prata metenamina de Grocott, Wade, Gram Brown-Brenn e Tricrômico de Gomori (PROPHET et al., 1995). Foram utilizadas lâminas controles específicas para cada coloração, sabidamente positivas de acordo com as técnicas aplicadas.

As lâminas foram analisadas utilizando-se microscópio óptico Nikon Eclipse E200 (NIKON Corporation, Tóquio, Japão).

Foram avaliados parâmetros compreendendo a morfologia das lesões, sua distribuição topográfica na pele e tecido celular subcutâneo (quando presente na amostra), a identificação de granulomas e caracterização de seus subtipos, caracterização da celularidade inflamatória (linfócitos, neutrófilos, plasmócitos, eosinófilos, histiócitos, células gigantes multinucleadas do tipo Langhans e tipo corpo estranho), presença de necrose e os seus subtipos observados, fibrose, identificação de elementos infecciosos sob a forma de grãos e a presença de fenômeno de Splendore-Hoeppli. Os dados foram colhidos utilizando-se formulário de microscopia (Apêndice B).

A falta da análise de alguma variável decorrente da não representação da mesma na amostra ou em algum corte histológico específico foi identificada com o termo NA (não se aplica).

As variáveis analisadas à microscopia óptica encontram-se definidas no quadro 2:

Quadro 2 - Definição das variáveis microscópicas.

Variáveis	Conceito
Acantose ²	Aumento da espessura da camada espinhosa da epiderme.
Hiperkeratose ³	Aumento da espessura do estrato córneo normal anucleado.
Parakeratose ²	Aumento da espessura do estrato córneo com retenção de núcleos de queratinócitos.
Exocitose ²	Presença de células inflamatórias na epiderme.
Espongiose ²	Edema intercelular intraepidérmico.
Ulceração/erosão ²	Comprometimento da epiderme por processo inflamatório com destruição da epiderme.
Derme papilar ⁴	Porção superior e delgada da derme constituída por tecido conjuntivo frouxo que forma as papilas dérmicas.
Derme reticular ⁴	Camada da derme constituída por tecido conjuntivo denso contendo fibras colágenas, reticulina e fibras elásticas localizada entre a derme papilar e hipoderme.
Hipoderme ⁴	Composta por lóbulos de tecido adiposo entremeado por septos de tecido conjuntivo fibroso que une a derme aos órgãos subjacentes.
Células gigantes tipo Langhans ²	Células gigantes multinucleadas histiocíticas com núcleos dispostos perifericamente com imagem em %arradura+.
Células gigantes tipo corpo estranho ²	Células gigantes multinucleadas histiocíticas com disposição nuclear desorganizada.
Granuloma Supurativo ⁷	Consiste em uma coleção de histiócitos epitelioides com ou sem células gigantes multinucleadas e área central com coleção de neutrófilos.
Granuloma Tuberculoide ²	Granuloma bem formado composto por histiócitos epitelioides e células gigantes, preferencialmente do tipo Langhans, com moderado a denso acúmulo de linfócitos e necrose caseosa central.
Granuloma Intersticial/necrobiótico ²	Caracterizado por zona central hipocelular composta por colágeno fragmentado e pouco definido com acentuação da eosinofilia e/ou basofilia. Áreas de necrobiose são circundadas parcialmente ou completamente por histiócitos em paliçada, células inflamatórias e células gigantes multinucleadas.
Granuloma Tipo corpo estranho ²	Composto por histiócitos epitelioides e células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho.
Granuloma Sarcoide ²	Granuloma redondo ou oval composto por histiócitos epitelioides e células gigantes de Langhans ou tipo corpo estranho com esparsos linfócitos periféricos.
Granuloma Epiteloide ⁶	Granulomas mal formados, compostos predominantemente por histiócitos epitelioides sem necrose e supuração.
Necrose Coagulativa ⁵	Caracteriza-se pela morte celular de tecidos decorrentes da desnaturação com preservação da arquitetura tecidual.
Necrose Liquefativa ⁵	Caracteriza-se pela transformação do tecido em material liquefeito composto de células mortas e leucócitos.
Necrose Caseosa ²	Caracteriza-se por degeneração eosinofílica e basofílica do colágeno e estruturas da derme semelhante a caseo.
Necrose Fibrinoide ²	Deposição de material necrótico, amorfo e eosinofílico com acúmulo de fibrina no colágeno dérmico.
Fenômeno de Splendore-Hoeppli ⁷	Área de aspecto radial, amorfa e eosinofílica localizada na periferia do grão.
Fibrose ¹	Aumento do colágeno secundário ao aumento do número de fibroblastos.
Hiperplasia pseudoepiteliomatosa (PEH) ²	Processo reativo caracterizado por proliferação da epiderme estendendo-se profundamente para a derme simulando carcinoma de células escamosas.

- 1 . Chandler; Kaplan; Ajello, 1980; 2 . Farmer; Hood, 2000; 3 . Hood et al., 2002; 4 . Junqueira; Carneiro, 2008; 5 . Kumar; Abbas; Aster, 2005; 6 . Quintella et al., 2011; 7 . Weedon, 2002.

4.5 Estudo Imuno-histoquímico

Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo histológico para a obtenção de cortes com 4 μ de espessura, dispostos em lâminas silanizadas (Easy-path, cod. EP5130185, São Paulo, Brasil), desparafinizadas, reidratados e submetidas às seguintes etapas:

- Bloqueio da peroxidase endógena com imersão em solução de Peridrol 30% (Merck, ref. 1846210, Darmstadt, Alemanha) 45 ml e Metanol (Vetec P.A., ref.102, São Paulo, Brasil) 55 ml por 40 minutos.

- Recuperação antigênica em banho maria modelo MT235 para imuno-histoquímica (Novatecnica, São Paulo, Brasil) a 98,5 C° durante 20 a 30 minutos (pH 6,0/30 minutos e pH 9,0/20 minutos).

- Lâminas deixadas em temperatura ambiente durante 15 minutos e lavadas em água corrente durante 5 a 10 minutos.

- Bloqueio de proteína com o reagente Ultravision Protein Block (ref. TA125-PBQ. Thermo Scientific, Runcorn, Reino Unido) por 10 minutos para reduzir colorações de fundo inespecíficas.

- Aplicação do anticorpo primário nas diluições padronizadas ~~overnight~~.

- Utilização do Kit imuno-histoquímico para imunoperoxidase Cell Marque Hidf Detection HRP Polymer System (ref. 954 d-20, Califórnia, USA) ou similar, conforme recomendação do fabricante.

- Revelação da reação com 3,3 Diaminobenzidina/ DAB (Sigma-Aldrich Sigma fast, DAB tablets, ref. D4418-50, Missouri, USA) ou similar. A pastilha foi diluída em água destilada.

- Utilização de água para o bloqueio da reação.

- Cortes contra-corados com Hematoxilina de Harris, e lâminas montadas com lamínula e meio de montagem.

- Visualização em microscópio óptico Nikon Eclipse E200 (NIKON Corporation, Tóquio, Japão).

- Foram utilizados os seguintes anticorpos primários: CD4, CD8, CD68, TNF- α , TGF- β 1, perforina, NOS2, IL-10, P70/IL-12A e IL17/IL-17A (CELL MARQUE, Rocklin, USA ou Novus Biologicals USA, Littleton, USA).

Lâminas-controle sabidamente positivas e preconizadas pelo fabricante foram utilizadas em cada reação.

Os anticorpos primários foram utilizados em protocolos de acordo com o

quadro 3.

Quadro 3 - Padronização de diluições dos anticorpos primários utilizados.

Anticorpo primário	Marca	Recuperação Antigênica	Diluição	Controle
CD4 clone SP35	Cell Marque	Banho-maria, Tris EDTA 9,0	1:30	Linfonodo reacional
CD8 clone C8/144B	Cell Marque	Banho-maria, Tris EDTA 9,0	1:50	Linfonodo reacional
CD68 clone KP1	Cell Marque	Banho-maria, tampão citrate 6,0	1:200	Linfonodo reacional
P70/IL-12A NBP1-85564	Novus Bio	Banho-maria, tampão citrate 6,0	1:50	Pâncreas
IL-17/IL 17A NBP2-14121	Novus Bio	Banho-maria, tampão citrato 6,0	1:50	Pâncreas
TGF- β 1 clone 7F6	Novus Bio	Banho-maria, tampão citrato 6,0	1:50	Cólon
IL-10 clone JES3-12G8	Novus Bio	Banho- maria, tampão citrato 6,0	1:50	Pâncreas
Perforina dG9	Novus Bio	Banho-maria, tampão citrato 6,0	1:20	Baço
NOS2 clone 4E5	Novus Bio	Banho-maria, tampão citrato 6,0	1:50	Carcinoma ductal de mama
TNF- α NB600-587	Novus Bio	Banho-maria, tampão citrato 6,0	1:100	Linfonodo reacional

4.6 Análise microscópica do estudo imuno-histoquímico

As lâminas provenientes do estudo imuno-histoquímico de cada caso foram analisadas quanto à positividade para os anticorpos primários utilizados. Para os marcadores celulares empregados para fenótipos de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e células CD68⁺ foram realizadas as quantificações das células marcadas por meio de metodologia de contagem celular manual, utilizando-se retículo graduado de 1mm² (BOECHAT et al., 2016) acoplado à ocular de Microscópio Nikon Eclipse E200

(NIKON Corporation, Tóquio, Japão). O número total de células positivas foi obtido em 10 campos de grande aumento (CGA), utilizando-se objetiva de 40X em áreas de maior representatividade ou celularidade da lesão. Os dados foram colhidos utilizando-se formulário de imuno-histoquímica (Apêndice C).

4.7 Revisão de prontuários e obtenção de dados clínicos e laboratoriais

Foram revistos os prontuários dos pacientes selecionados para a obtenção de resultados referentes à identificação do agente etiológico por exame microbiológico e/ou estudo molecular, quando disponíveis. Foi utilizado ainda, banco de dados clínicos e laboratoriais dos referidos pacientes, provenientes do Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatologia Infecciosa do INI/ Fiocruz.

5 PLANO DE ANÁLISE

Os dados coletados foram tabulados e armazenados em planilhas desenvolvidas a partir do Microsoft Excel 2010.

Os resultados foram descritos e posteriormente calculados os percentuais de positividade.

Para os resultados referentes às contagens celulares (células T CD4⁺, CD8⁺ e CD68⁺) foram calculados a mediana, valores mínimo e máximo para cada fenótipo celular.

6 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INI/FIOCRUZ com o número CAAE: 20747213.9.0000.5262.

Foi utilizado ainda o Termo de Compromisso com a assinatura do pesquisador responsável (Apêndice A).

7 RESULTADOS

7.1 Achados histopatológicos nos micetomas

Os achados histopatológicos à H&E mostraram um padrão morfológico de resposta inflamatória específica do tipo granulomatosa nas lesões de eumicetomas e actinomicetomas, chamando a atenção para um padrão mais exsudativo com maior acúmulo de neutrófilos nos micetomas actinomicóticos.

A análise da epiderme nas 22 amostras de micetomas revelou a presença de acantose (64%), hiperkeratose (64%), parakeratose (45%) e exocitose (36%) por células inflamatórias como linfócitos e neutrófilos, ao lado de espongirose (41%) e ulceração (18%), conforme a figura 1. Em oito casos (36%) não foi possível a análise da epiderme pois não houve exposição da mesma na amostra, devido a particularidades da retirada da amostra (amostras profundas) ou decorrente de ulceração ou desnudamento epidérmico

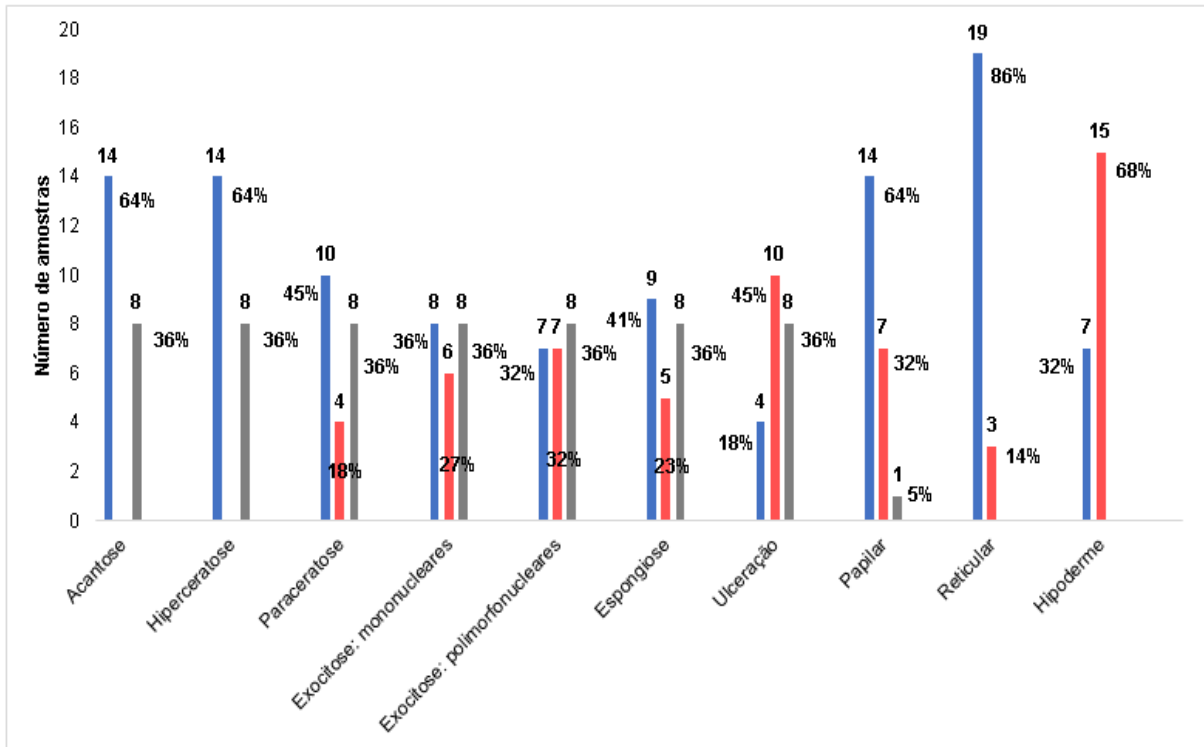
O comprometimento da derme papilar foi observado em 64%, derme reticular média e profunda em 86%, e hipoderme em 32% dos casos, conforme figura 1.

A acantose foi observada com distribuição difusa ou restrita a uma área da lesão. Hiperplasia pseudo-epiteliomatosa foi encontrada em dois casos.

A reação inflamatória granulomatosa nos micetomas comprometeu principalmente a derme reticular e a hipoderme, e acúmulos de neutrófilos, linfócitos e histiócitos foram vistos no interior ou fora dos granulomas, conforme figura 2. Plasmócitos e eosinófilos foram observados na periferia dos granulomas.

O achado de grãos em processo de eliminação proporcionou a visualização dos mesmos na epiderme (Figura 3) em um caso de actinomicetoma e um caso de eumicetoma.

Figura 1 - Alterações epidérmicas e extensão do comprometimento dérmico nos 22 casos de micetomas em amostras cutâneas, Rio de Janeiro, Brasil, 1998 a 2015.



Coluna azul variável positiva, coluna vermelha variável negativa e coluna cinza variável não avaliada.

Figura 2 - Actinomicetoma. Processo inflamatório granulomatoso localizado na derme reticular. H&E, 200X.

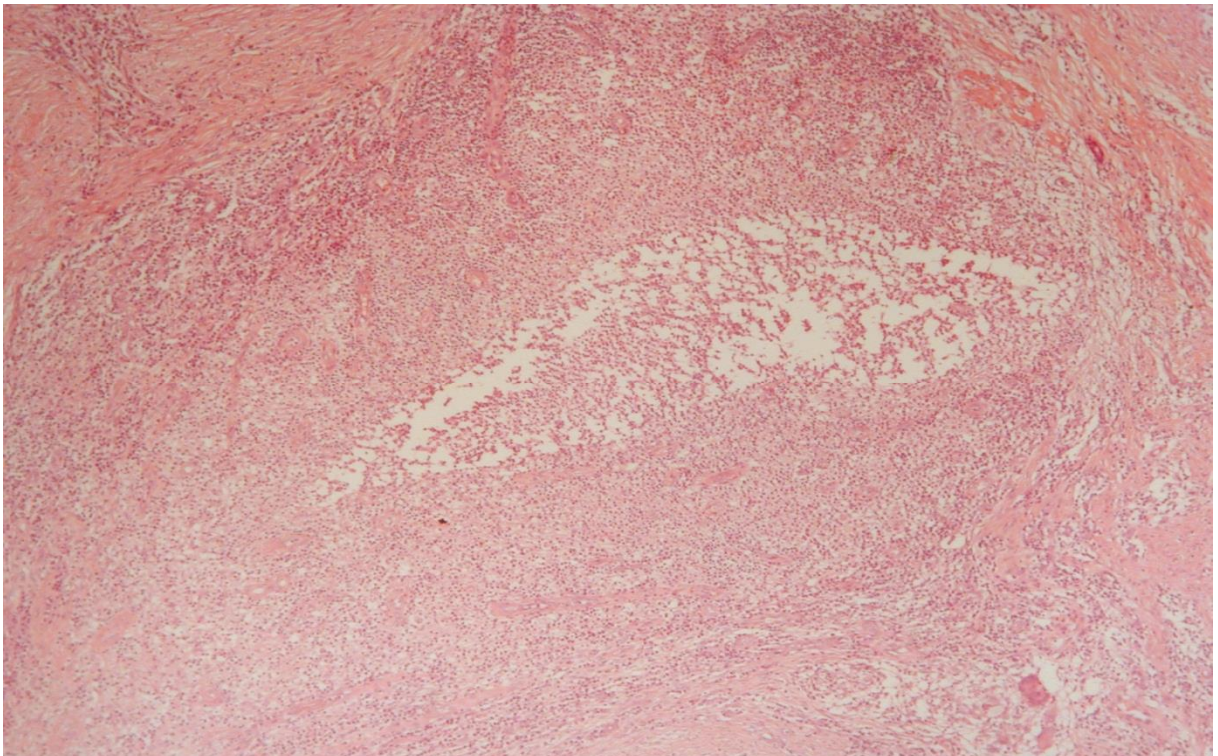
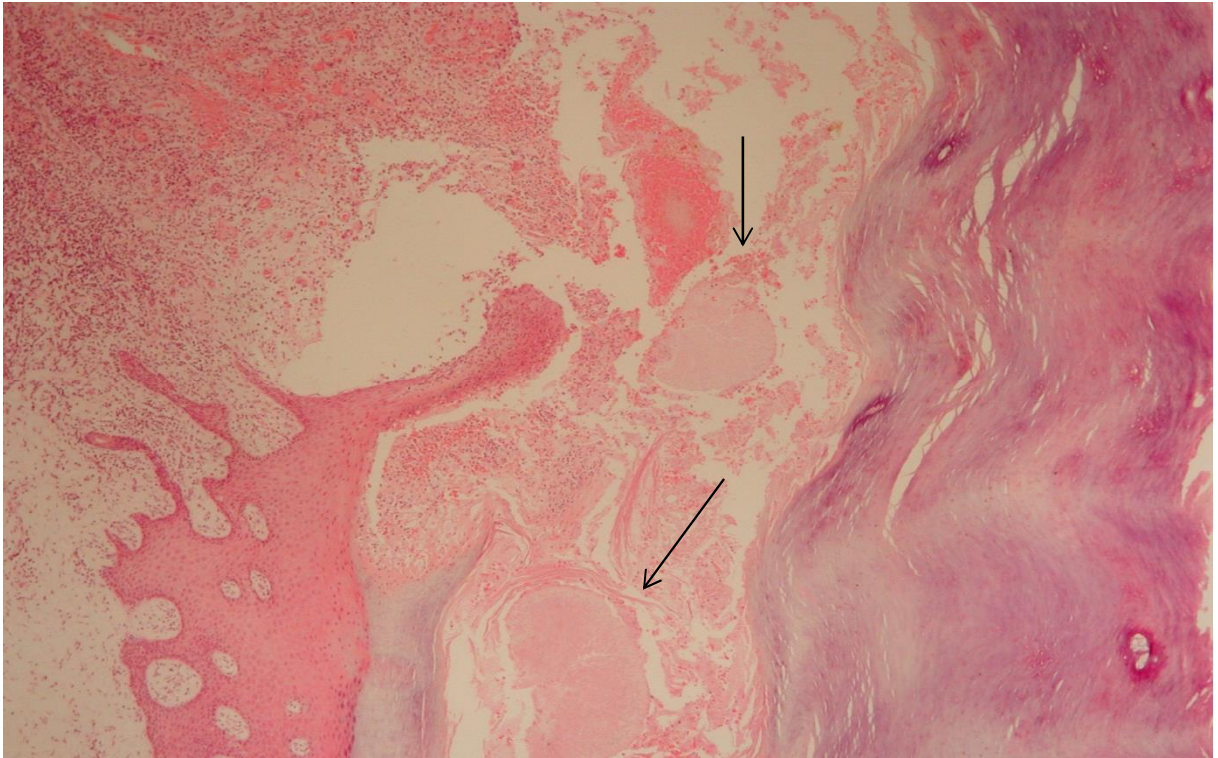


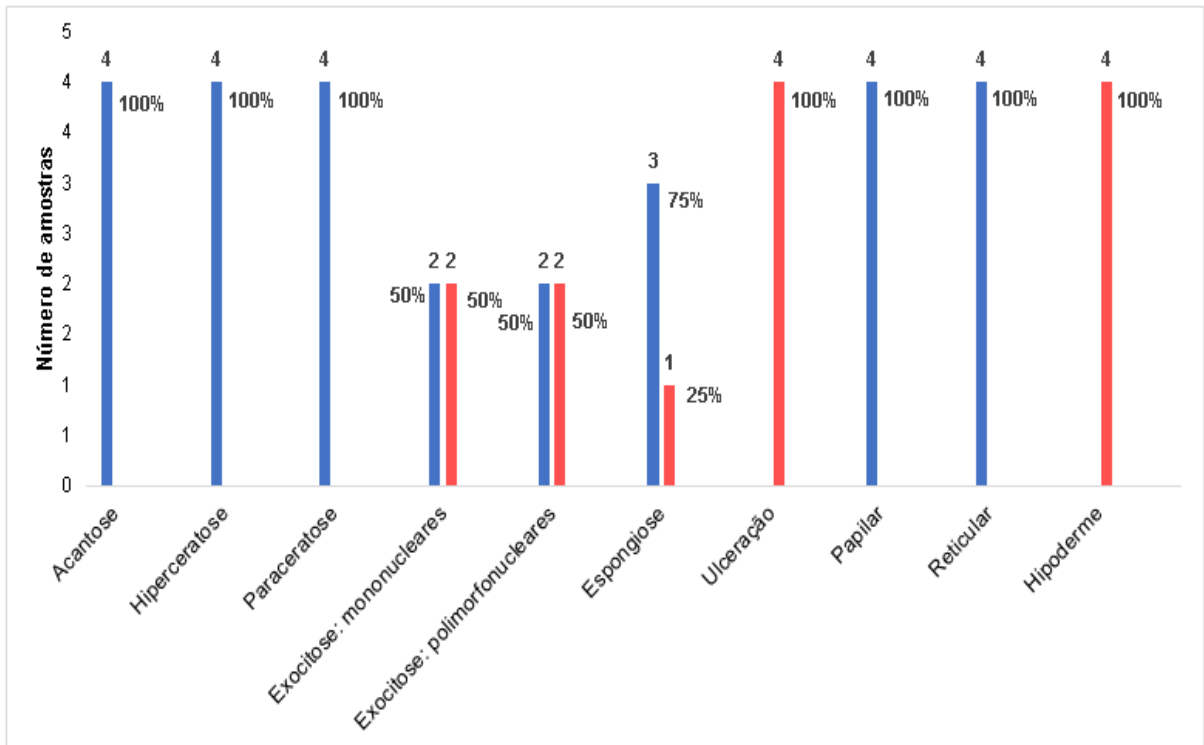
Figura 3 - Actinomicetoma. Grãos hialinos subcórneos compostos por bactérias filamentosas, ao lado de material fibrinonecrótico e trajeto fistuloso. H&E, 400X.



Nos casos de actinomicetomas, o processo inflamatório foi observado estendendo-se da derme papilar a derme reticular. Comprometimento da hipoderme não foi observado (figura 4). Na análise da epiderme observou-se alterações como acantose, hiperqueratose e parakeratose em 100% das amostras de actinomicose (figura 4), melhor ilustrada na figura 5. Não foi observada ulceração nestas amostras.

O grupo de casos de eumicetomas revelou acantose e hiperqueratose em 56% dos casos, 33% de parakeratose, 33% de exocitose por linfócitos e 28% por polimorfonucleares. Espongiose foi vista em 33% dos casos e ulceração em 22%. A derme reticular foi comprometida em 83% e a papilar em 56% das amostras. O envolvimento da hipoderme esteve presente em 39% dos casos, conforme figura 6.

Figura 4 - Alterações epidérmicas e extensão do comprometimento dérmico nos quatro casos de actinomicetomas em amostras cutâneas, Rio de Janeiro, Brasil, 1998 a 2015.



Coluna azul variável positiva, coluna vermelha variável negativa e coluna cinza variável não avaliada.

Figura 5 - Actinomicetoma. Hiperqueratose e paraceratose. H&E, 400X.

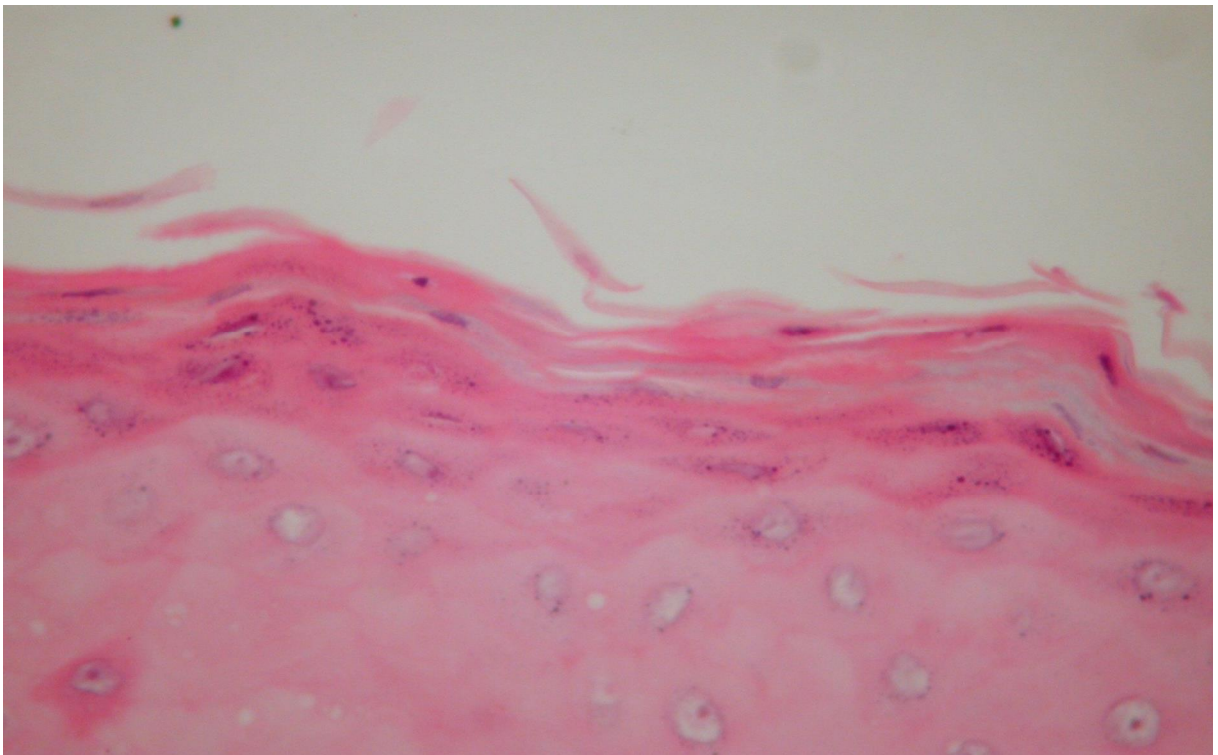
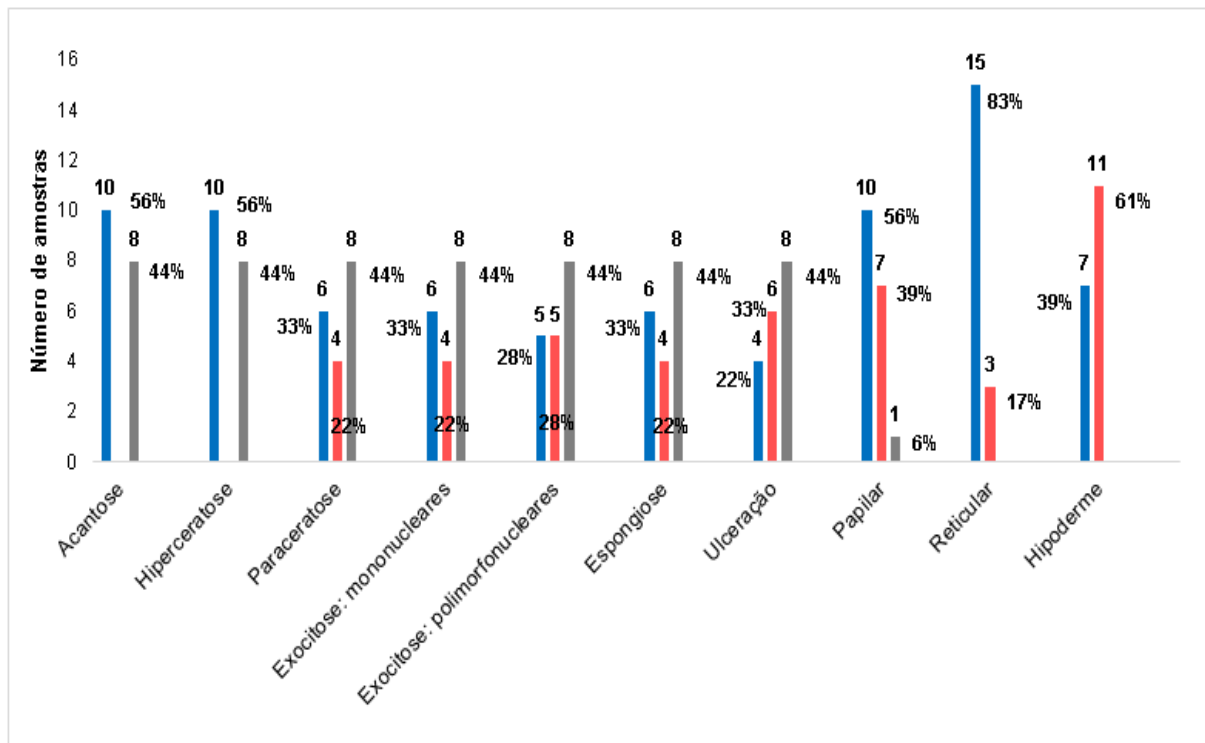


Figura 6 - Alterações epidérmicas e extensão do comprometimento dérmico nos 18 casos de eumicetomas em amostras cutâneas, Rio de Janeiro, Brasil, 1998 a 2015.



Coluna azul variável positiva, coluna vermelha variável negativa e coluna cinza variável não avaliada.

A derme revelou em todos os casos um processo inflamatório misto com componentes celulares mononucleares e polimorfonucleares distribuídos irregularmente e configuração granulomatosa. A derme papilar apresentou na maioria dos casos um infiltrado inflamatório discreto perivascular composto principalmente por linfócitos, plasmócitos e alguns neutrófilos e histiócitos, semelhante ao observado em processos inflamatórios inespecíficos. Quando foram identificados a presença de trajeto fistuloso ou ulceração, o infiltrado inflamatório torna-se significativamente exuberante nesta topografia, podendo ser vistos granulomas e grãos dos microrganismos.

Neutrófilos foram vistos em grande número no centro dos granulomas e ainda, no interior e permeando a parede de vasos.

Na derme reticular média e profunda foi observado exuberante infiltrado inflamatório composto por linfócitos, histiócitos, plasmócitos, neutrófilos, eosinófilos e células gigantes multinucleadas do tipo Langhans e do tipo corpo estranho.

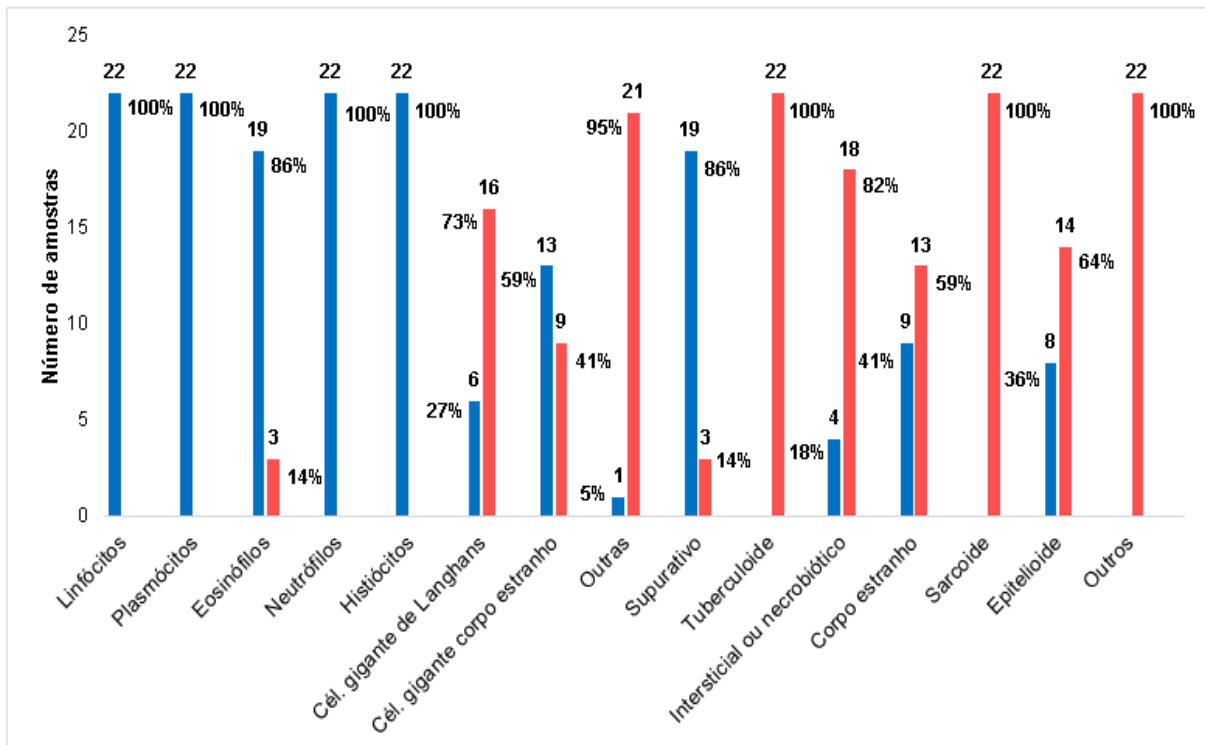
Os linfócitos, histiócitos e plasmócitos foram numerosos nas lesões. Os histiócitos permeavam o processo inflamatório difusamente, e foram vistos configurando granulomas e em grande número na periferia da inflamação. Achados relacionados aos percentuais de células inflamatórias observadas e tipos de granulomas encontrados nos micetomas em geral são ilustrados na figura 7.

A pesquisa de células inflamatórias identificou em 100% dos casos de actinomicetoma a presença de linfócitos, plasmócitos, eosinófilos, neutrófilos e histiócitos (Figura 8).

Os eumicetomas apresentaram 100% de evidência de linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e histiócitos. Eosinófilos foram vistos em 83% neste grupo (Figura 9).

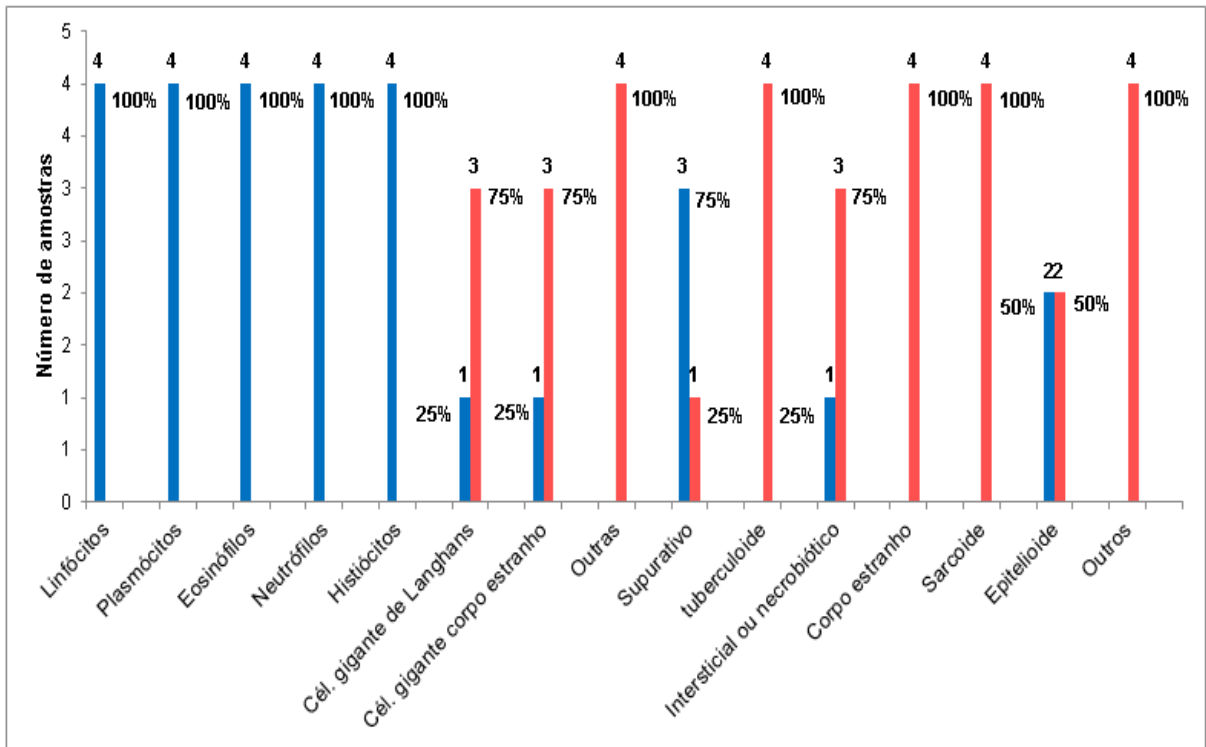
Células gigantes multinucleadas do tipo Langhans (Figura 10) e do tipo corpo estranho (Figura 11) foram vistas em 25% dos casos de actinomicetoma em proporções iguais, enquanto foram observadas em 28% e 67% respectivamente, nos casos de eumicetoma.

Figura 7 - Células inflamatórias e tipos de granulomas encontrados nas lesões cutâneas de 22 casos de micetomas, Rio de Janeiro, Brasil, 1998 a 2015.



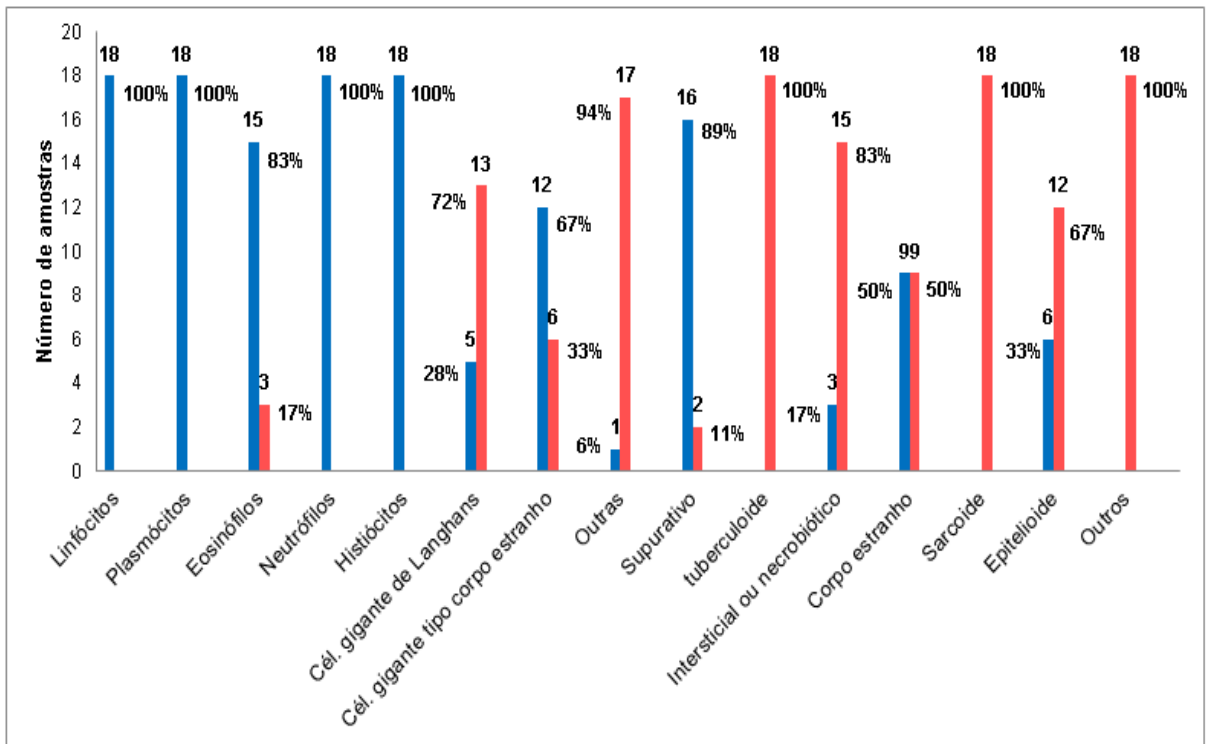
Coluna azul variável positiva e coluna vermelha variável negativa.

Figura 8 - Células inflamatórias e tipos de granulomas encontrados nas lesões cutâneas de actinomicetoma, Rio de Janeiro, Brasil, 1998 a 2015.



Coluna azul variável positiva e coluna vermelha variável negativa.

Figura 9 - Células inflamatórias e tipos de granulomas encontrados nas lesões cutâneas de eumicetoma, Rio de Janeiro, Brasil, 1998 a 2015.



Coluna azul variável positiva e coluna vermelha variável negativa.

Figura 10 - Eumicetoma. Células gigantes multinucleadas do tipo Langhans. (H&E), 400X.

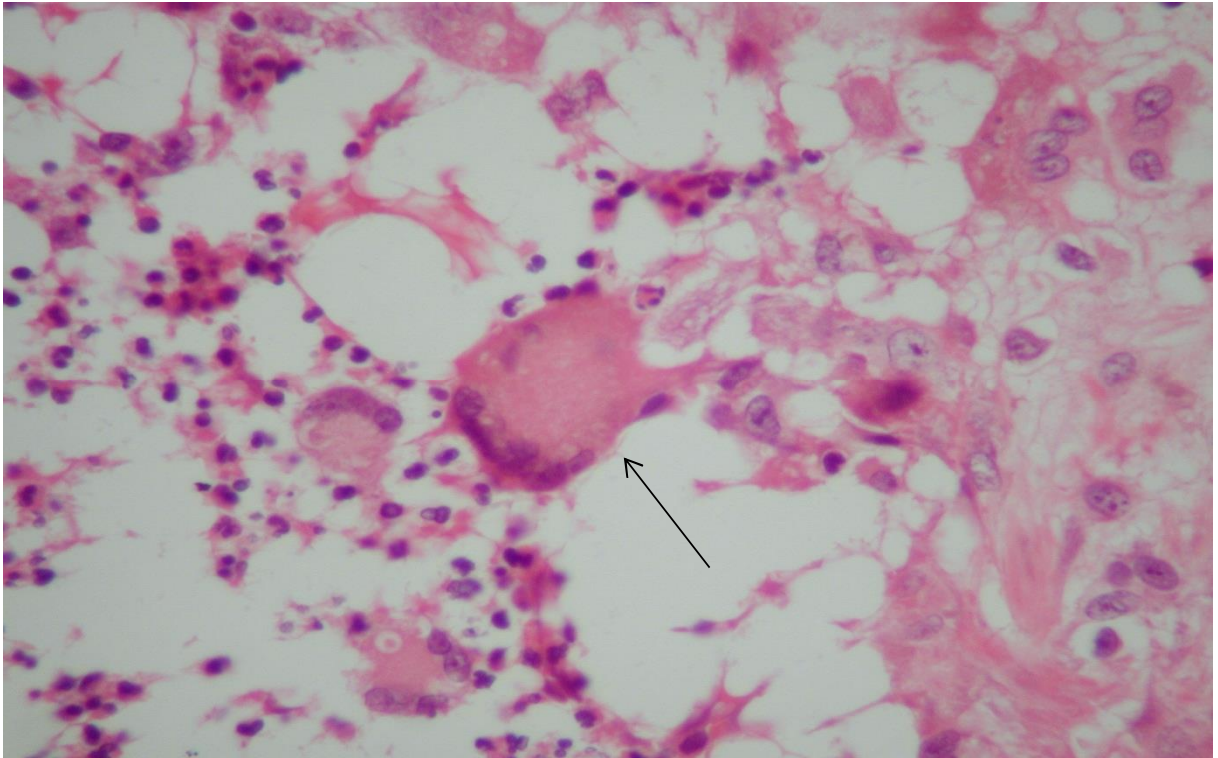
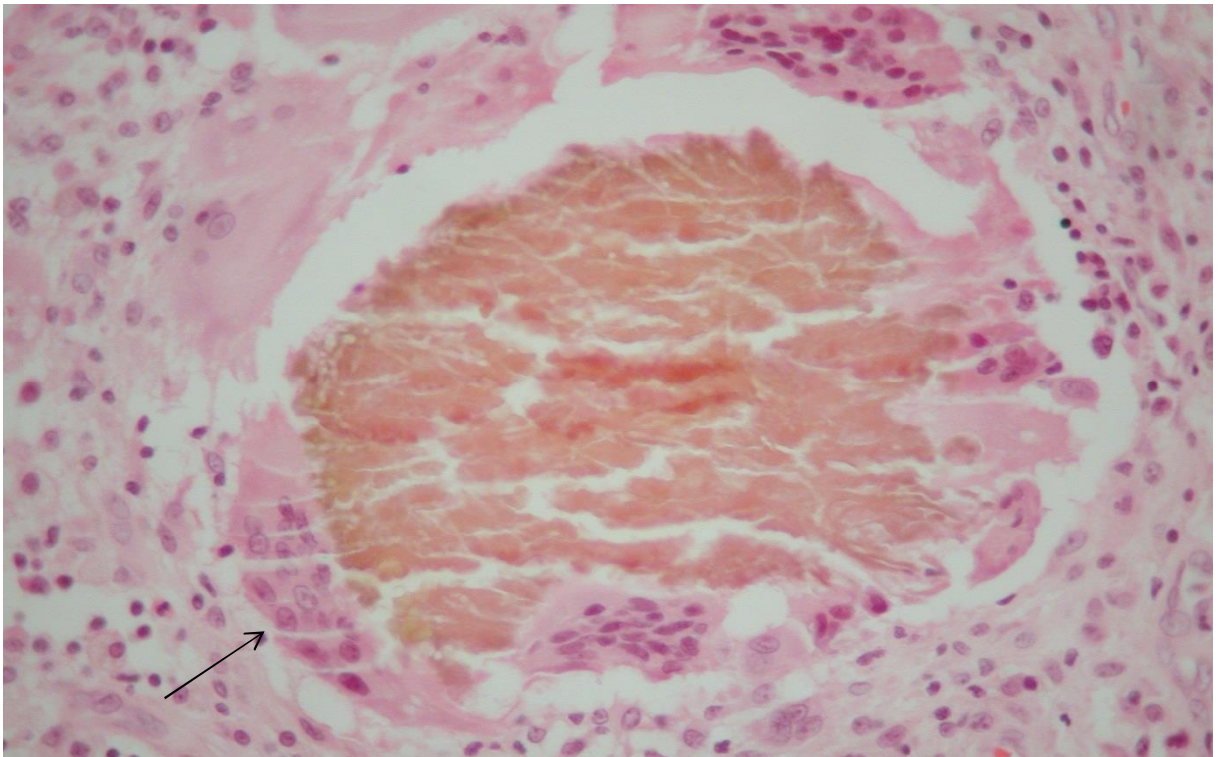


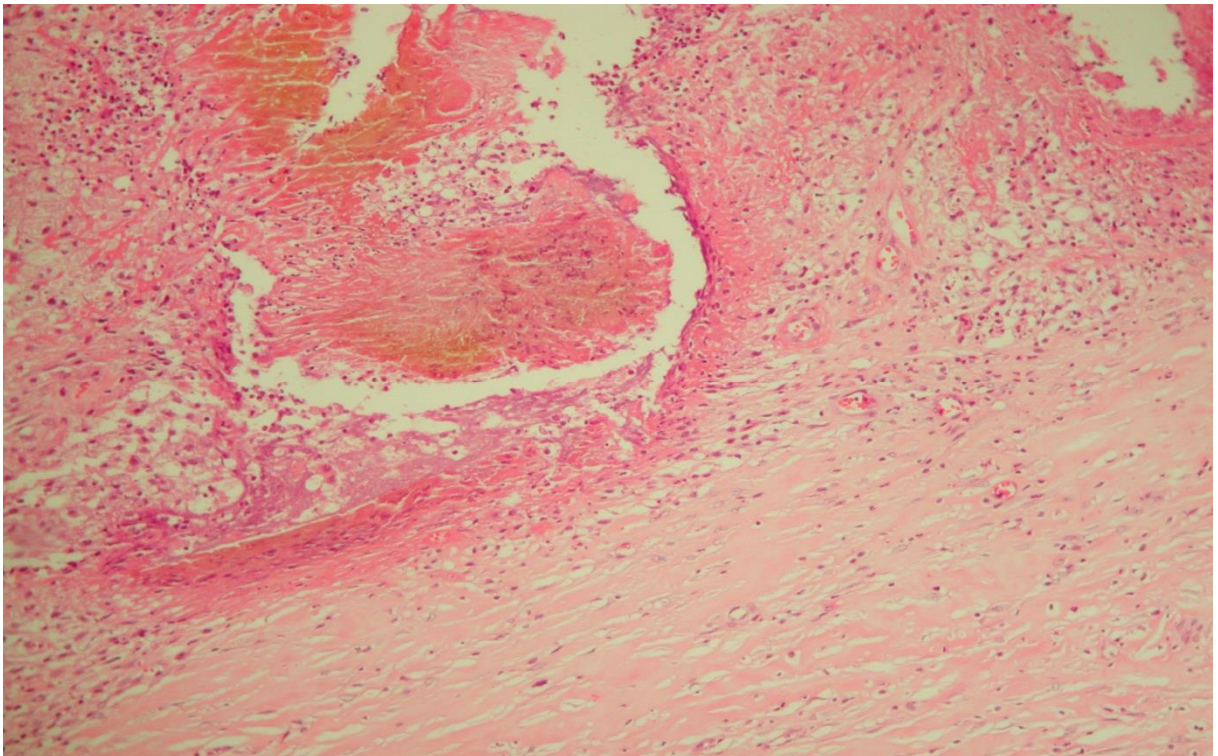
Figura 11 - Eumicetoma. Grão de fungos demáceos, envolto por células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho em granuloma tipo corpo estranho. H&E, 400X.



Nosso estudo identificou granulomas contendo ou não grãos no seu interior, na maioria dos casos com padrões tipo corpo estranho (Figura 11) e supurativo (Figura 12).

O achado de granulomas esteve presente em todas as amostras de ambos os grupos. Nos actinomicetomas foram distribuídos com padrões: supurativo (75%), necrobiótico (25%) e epitelióide (50%). Nos eumicetomas observamos os padrões: supurativo (89%), necrobiótico (17%), corpo estranho (50%) e epitelióide (33%). Não observamos granulomas com padrões tuberculoide e sarcoide, conforme figuras 8 e 9.

Figura 12 - Eumicetoma. Granuloma supurativo contendo grão de fungos demáceos. Hematoxilina & Eosina (H&E), 200X.



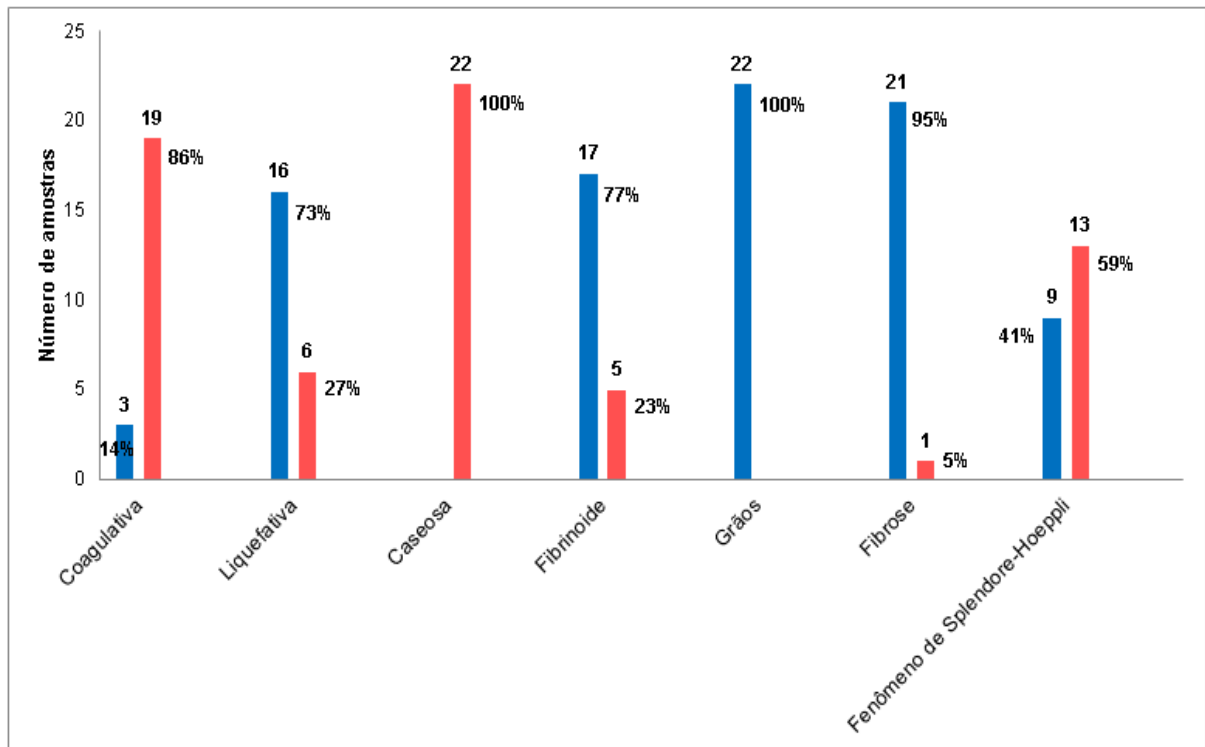
Foi observada necrose nos dois grupos de agentes (Figura 13). Nos eumicetomas, observou-se necrose tipo fibrinoide (89%), liquefativa (74%), e coagulativa (16%); enquanto nos actinomicetomas ocorreu necrose tipo liquefativa (75%) e fibrinoide (25%). A necrose do tipo caseosa não foi observada (Figuras 14,

15 e 16).

Encontramos grãos dispostos principalmente na derme reticular média e profunda (Figuras 17 e 18) e tecido celular subcutâneo, porém foi possível identificá-los na derme superior e em meio à camada córnea, relacionados à eliminação de grãos (dois casos). Fenômeno de Splendore-Hoepli foi visto em 47% dos eumicetomas e 25% nos actinomicetomas (Figura 19).

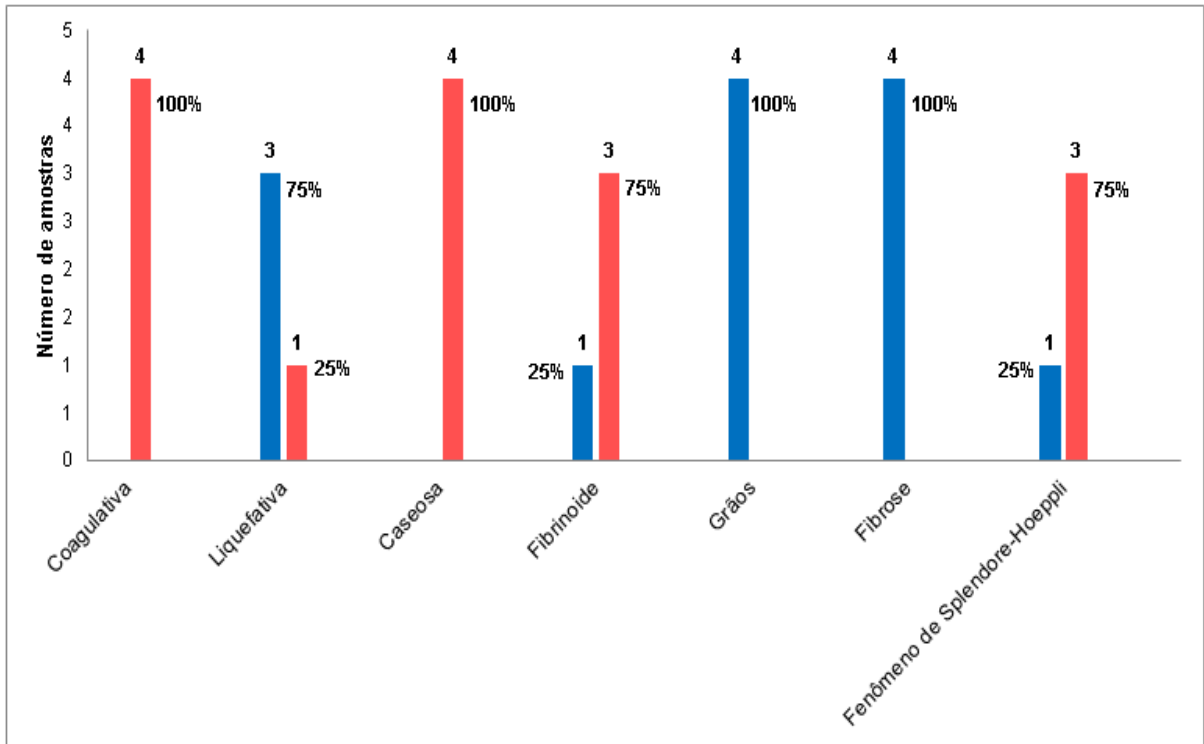
A fibrose foi observada em 100% dos actinomicetomas e em 95% dos eumicetomas, localizada na derme, conforme figuras 13, 14, 15 e 20.

Figura 13 - Tipos de necrose, fibrose e fenômeno de Splendore-Hoepli encontrados nas lesões cutâneas de 22 casos de micetomas, Rio de Janeiro, Brasil, 1998 a 2015.



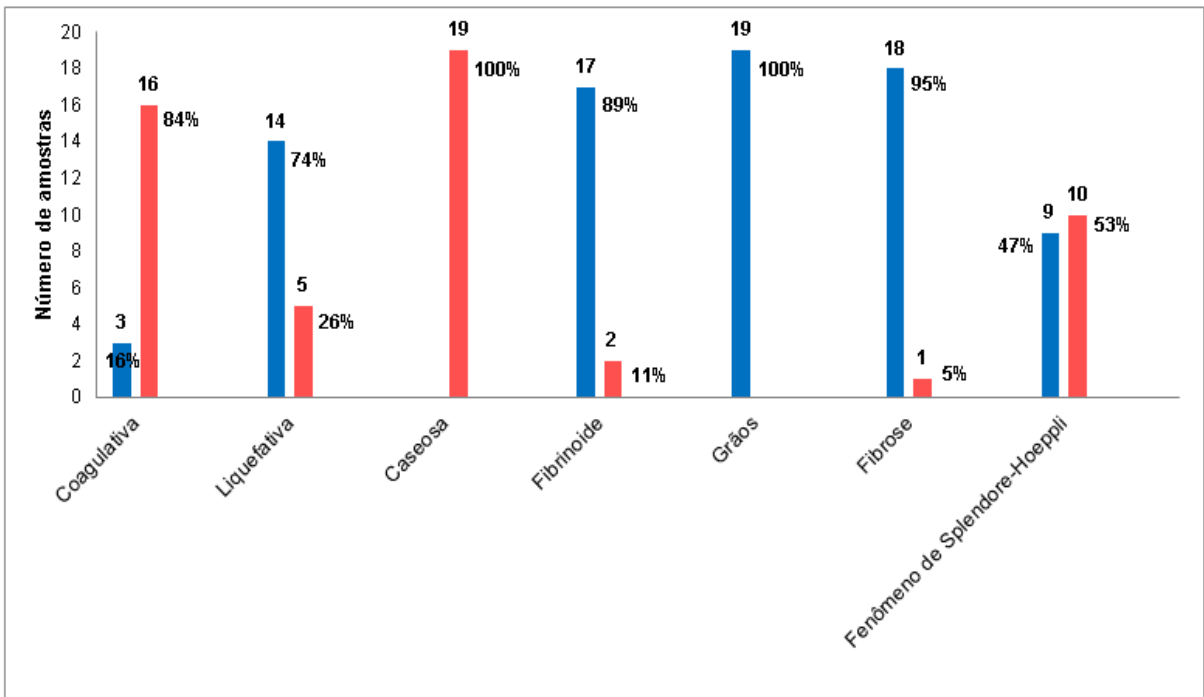
Coluna azul variável positiva e coluna vermelha variável negativa.

Figura 14 - Identificação dos tipos de necrose, presença de grãos na lesão, fibrose e fenômeno de Splendore-Hoeppli encontrados nas lesões cutâneas de actinomicetoma, Rio de Janeiro, Brasil, 1998 a 2015.



Coluna azul variável positiva e coluna vermelha variável negativa.

Figura 15 - Identificação dos tipos de necrose, presença de grãos na lesão, fibrose e fenômeno de Splendore-Hoeppli encontrados nas lesões cutâneas de eumicetoma, Rio de Janeiro, Brasil, 1998 a 2015.



Coluna azul variável positiva e coluna vermelha variável negativa.

Figura 16 Eumicetoma. Necrose do tipo fibrinoide, ao lado de grãos de fungos demáceos e neutrófilos. Hematoxilina&Eosina (H&E), 400X.

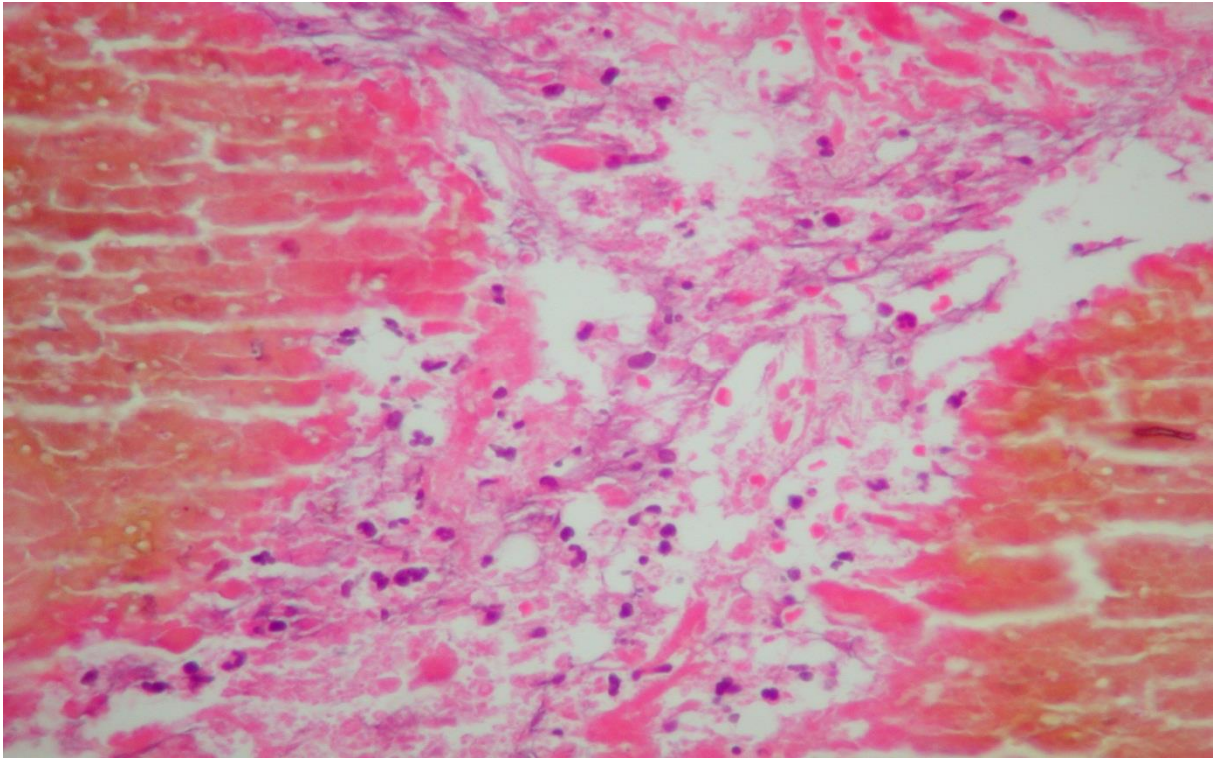


Figura 17 - Actinomycetoma. Grão de bactérias filamentosas. Hematoxilina&Eosina (H&E), 400X.

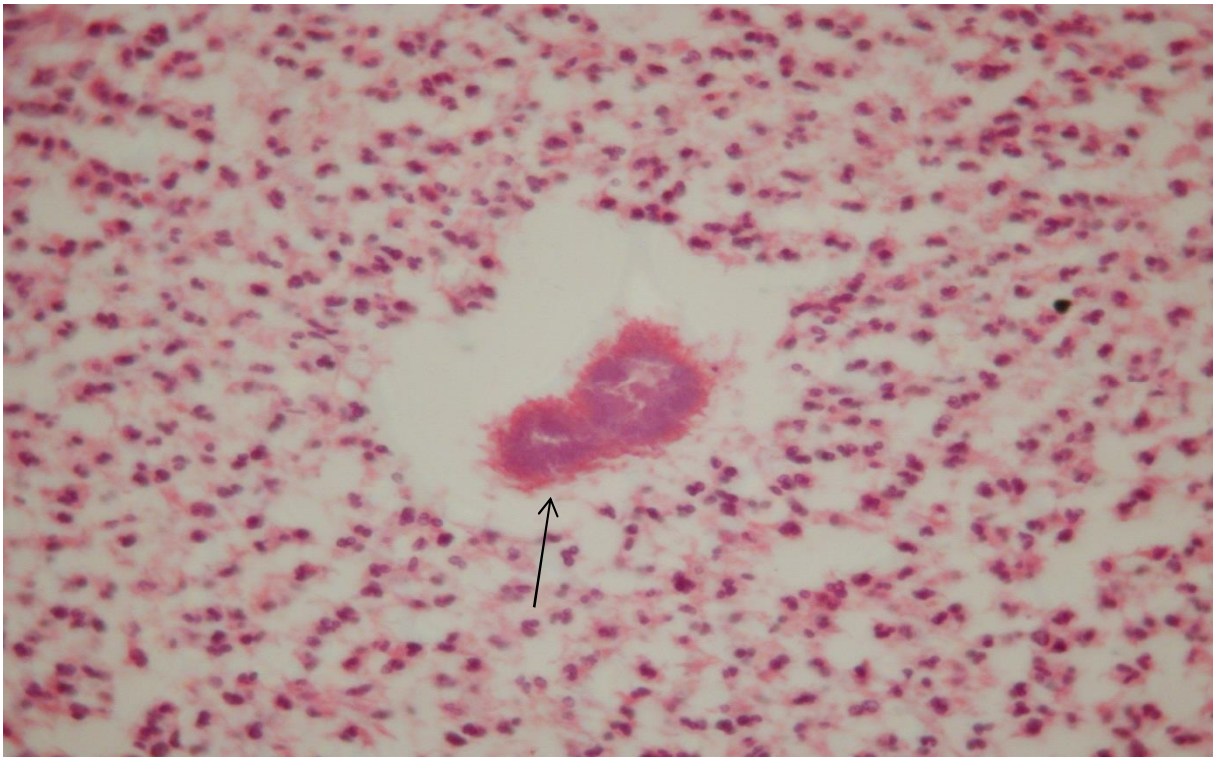


Figura 18 - Eumicetoma. Grão hialino composto por elementos fúngicos. Hematoxilina&Eosina (H&E), 400X.

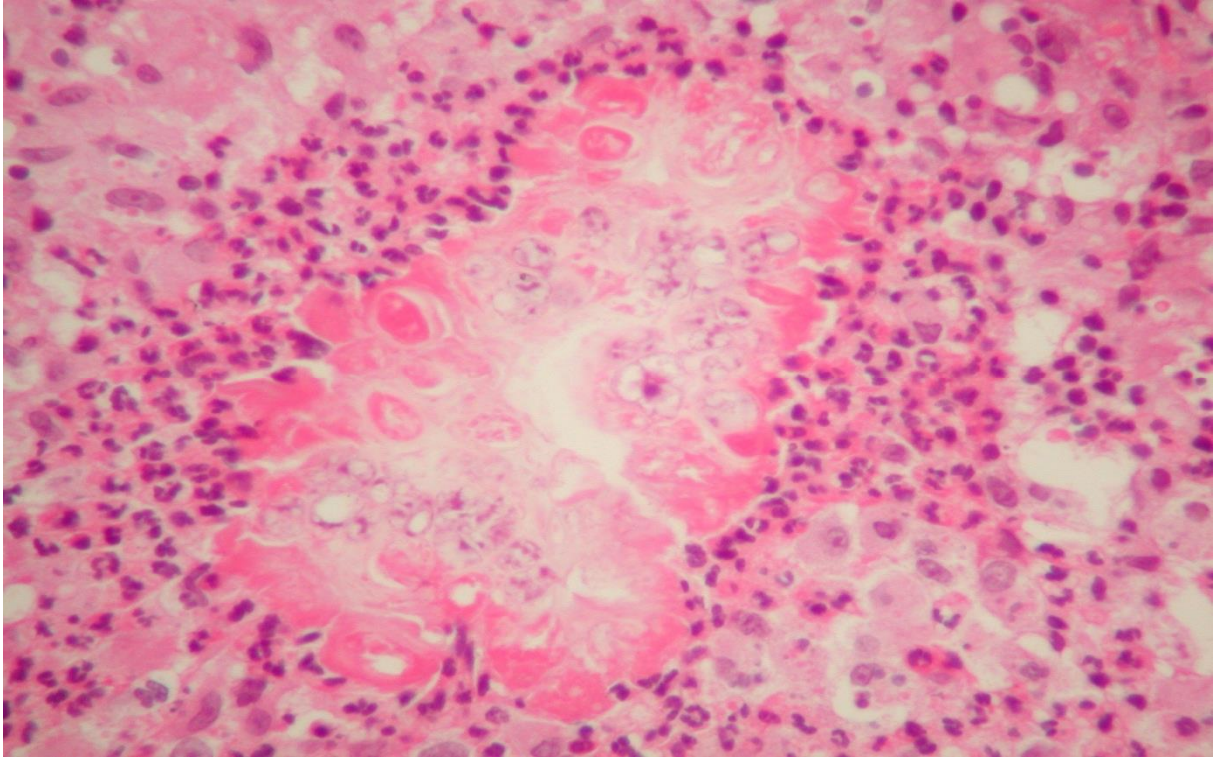


Figura 19 - Actinomicetoma. Fenômeno de Splendore- Hoeppli caracterizado por área radial de cor fúcsia localizada na periferia do grão. Tricrômico de Gomori, 400X.

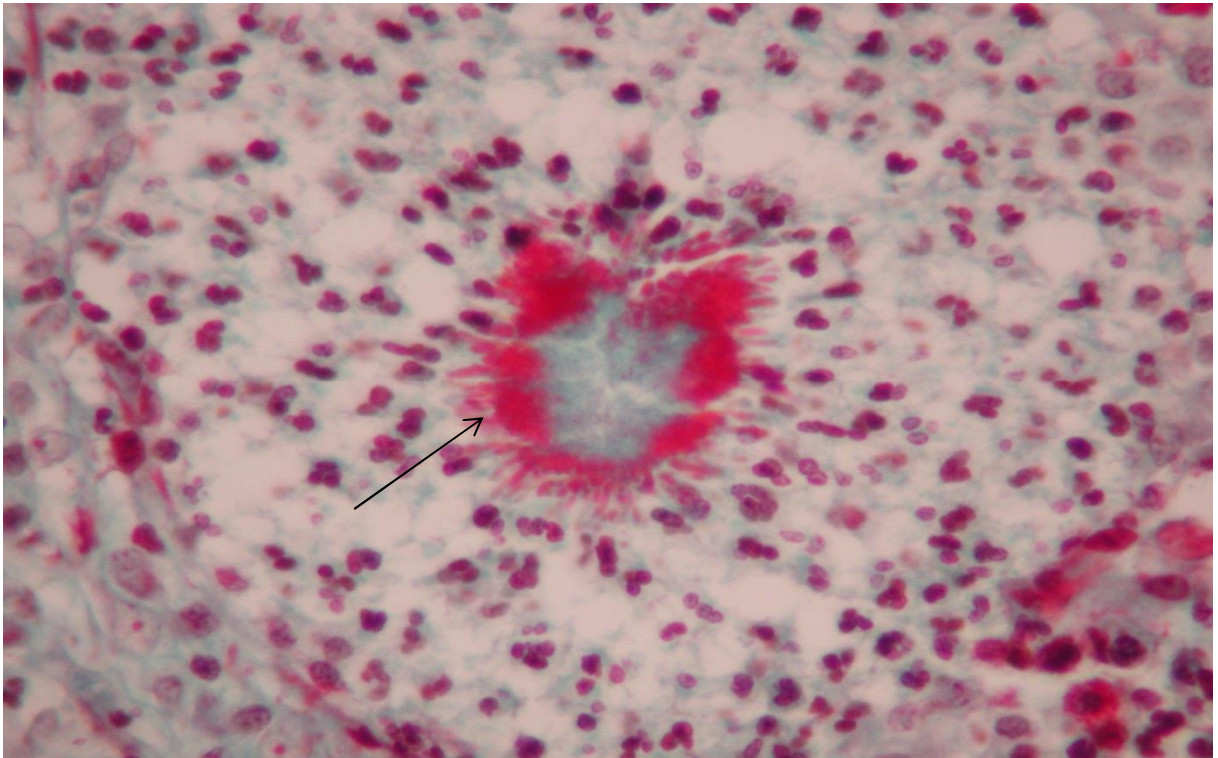
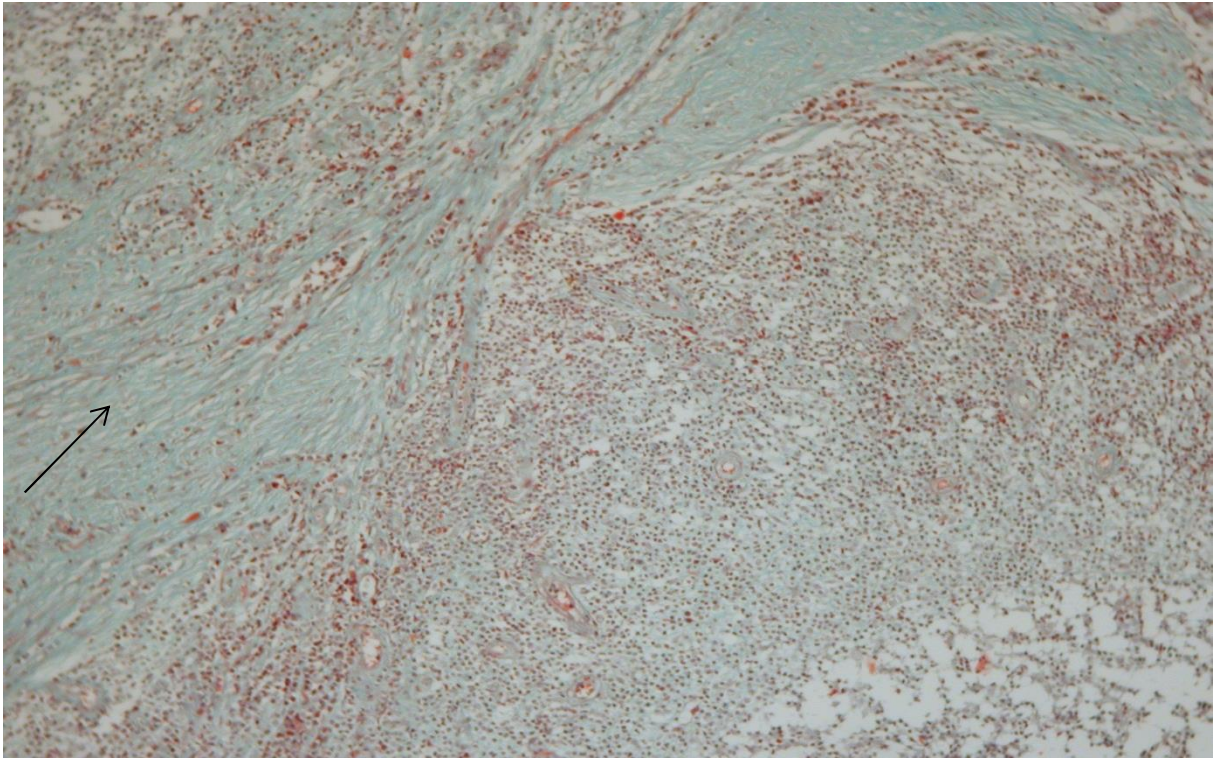


Figura 20 É Actinomicetoma. Fibrose localizada na derme reticular ao redor do granuloma composta por feixes colágenos corados em verde. Tricrômico de Gomori, 200X.

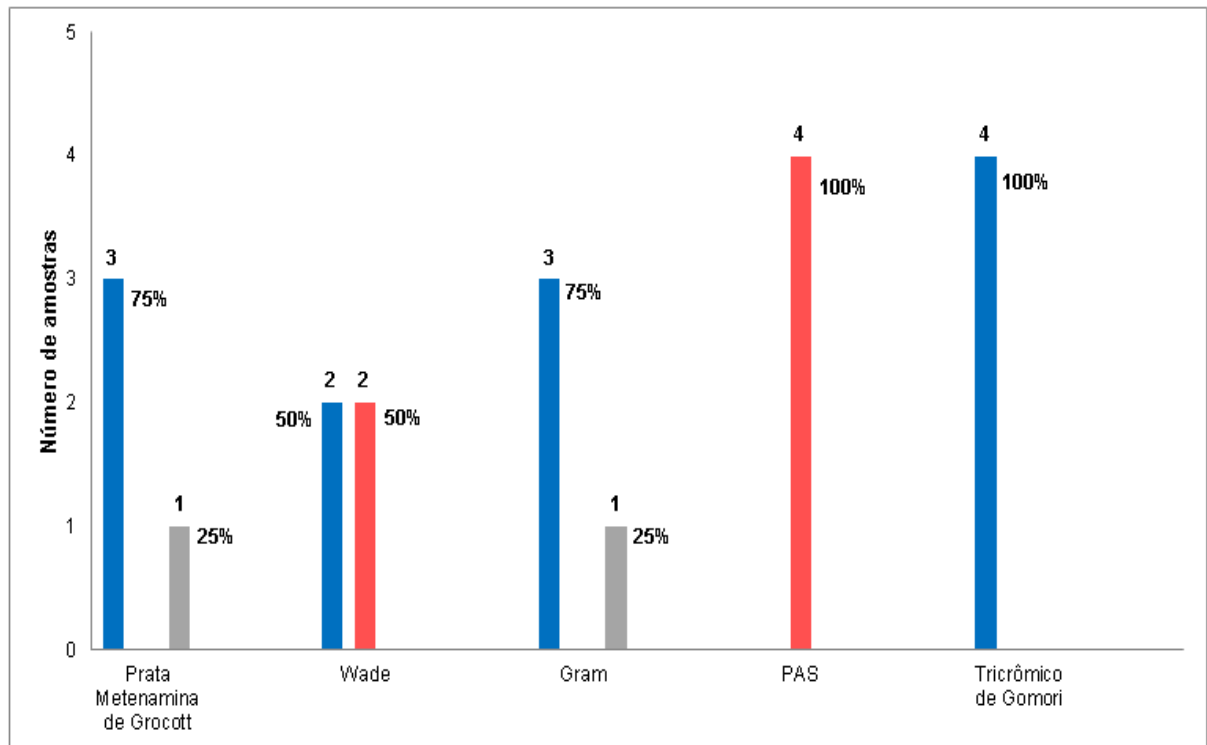


A identificação dos agentes infecciosos presentes nos grãos foi realizada pelas colorações especiais propostas no estudo e foram diferentes nos casos de actinomicetomas, quando comparados aos casos de eumicetomas, de acordo com as afinidades titoriais presentes nos elementos bacterianos filamentosos e nos elementos fúngicos, de acordo com as figuras 21 e 22, respectivamente. Os fungos foram positivos quando corados por colorações especiais pelo método de PAS e impregnados pela Prata metenamina de Grocott, podendo-se facilmente identificar as estruturas redondas e as filamentosas (do tipo hifa), (Figura 23). Os elementos bacterianos filamentosos foram positivamente corados pelo Wade nos casos de *Nocardia* (Figura 24), Gram Brown-Brenn (Figura 25) e Grocott (Figura 26) e refratários ao PAS com morfologia delicada, representados por delgados filamentos alongados, conforme figuras 21 e 22. Características macroscópicas e microscópicas observadas ao H&E e colorações especiais dos grãos foram tabuladas no quadro 4.

Quadro 4 - Características macroscópica e microscópica dos grãos em 22 casos de micetomas, Rio de Janeiro, Brasil, 1998 a 2015.

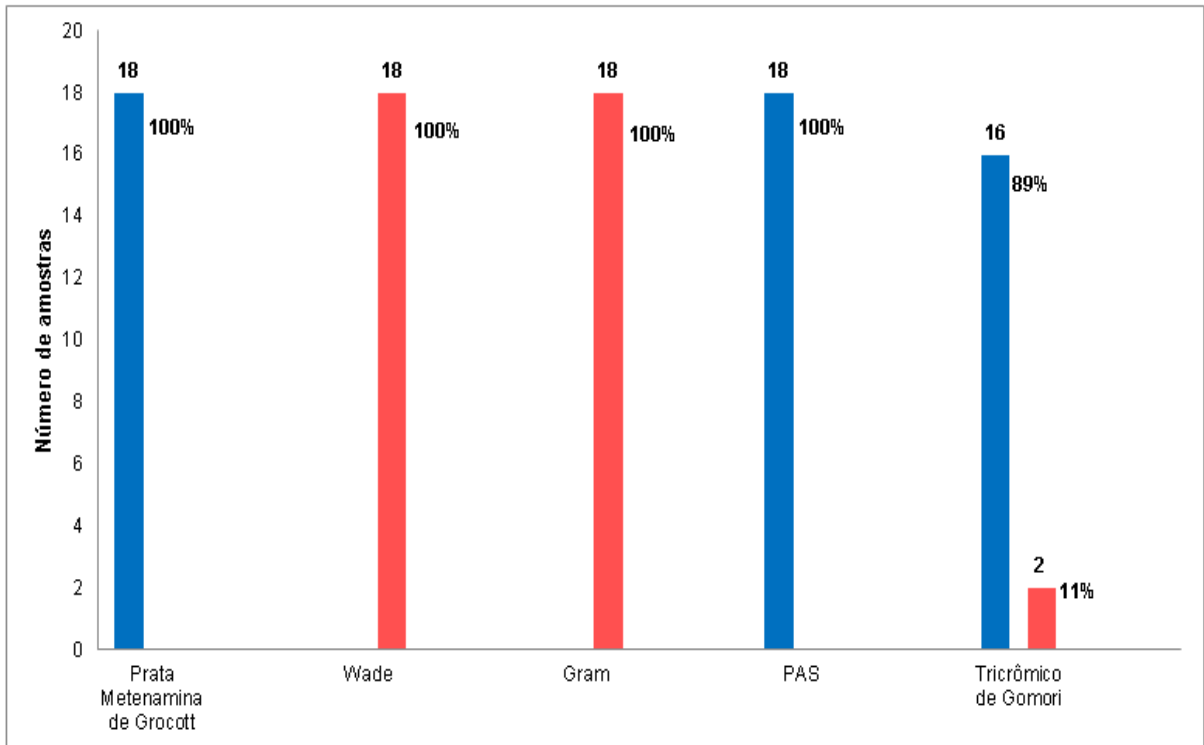
Casos	Agente etiológico	Macroscópia	Microscopia						Conclusão
			Formato	Coloração de H&E	Afinidade tintorial (Colorações especiais)				
					Wade	Gram	Grocott	PAS	
1	<i>Mycelia sterilia (Phomopsis columnaris)</i>	Sem relato	Redondo ou oval	Hialino	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Eumicetoma
2	<i>Nocardia asteroidis</i>	Branco	Oval	Hialino	Positivo	Positivo	Não se aplica	Negativo	Actinomicetoma
3	Agente desconhecido	Branco	Oval	Hialino	Negativo	Não se aplica	Positivo	Negativo	Actinomicetoma
4	<i>Madurella mycetomatis</i>	Negro	Redondo ou oval	Acastanhado	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Eumicetoma
5	<i>Madurella mycetomatis</i>	Negro	Redondo ou oval	Acastanhado	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Eumicetoma
6	<i>Nocardia sp</i>	Branco	Oval	Hialino	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Actinomicetoma
7	<i>Scedosporium apiospermum</i>	Branco	Oval	Hialino	Negativo	Negativo	Positivo	positivo	Eumicetoma
8	<i>Madurella mycetomatis</i>	Negro	Redondo ou oval	Acastanhado	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Eumicetoma
9	<i>Madurella mycetomatis</i>	Negro	Redondo ou oval	Acastanhado	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Eumicetoma
10	<i>Madurella mycetomatis</i>	Negro	Redondo ou oval	Acastanhado	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Eumicetoma
11	<i>Madurella mycetomatis</i>	Negro	Redondo ou oval	Acastanhado	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Eumicetoma
12	<i>Madurella mycetomatis</i>	Negro	Redondo ou oval	Acastanhado	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Eumicetoma
13	<i>Mycelia sterilia (Phomopsis columnaris)</i>	Sem relato	Redondo ou oval	Hialino	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Eumicetoma
14	Agente desconhecido	Sem relato	Oval	Hialino	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Eumicetoma
15	<i>Nocardia brasiliensis</i>	Branco	Oval	Hialino	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Actinomicetoma
16	<i>Acremonium sp</i>	Branco	Oval	Hialino	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Eumicetoma
17	<i>Mycelia sterilia (Phomopsis columnaris)</i>	Sem relato	Redondo ou oval	Hialino	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Eumicetoma
18	<i>Mycelia sterilia (Phomopsis columnaris)</i>	Sem relato	Redondo ou oval	Hialino	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Eumicetoma
19	<i>Mycelia sterilia (Phomopsis columnaris)</i>	Sem relato	Redondo ou oval	Hialino	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Eumicetoma
20	Agente desconhecido	Sem relato	Oval	Hialino	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Eumicetoma
21	<i>Scedosporium apiospermum</i>	Branco	Branco	Oval	Hialino	Negativo	Negativo	Positivo	positivo
22	<i>Scedosporium apiospermum</i>	Branco	Branco	Oval	Hialino	Negativo	Negativo	Positivo	positivo

Figura 21- Avaliação das colorações especiais em amostras cutâneas de actinomicetoma, Rio de Janeiro, Brasil, 1998 a 2015.



Coluna azul variável positiva, coluna vermelha variável negativa e coluna cinza não houve representação do grão nesta variável.

Figura 22 - Avaliação das colorações especiais em amostras cutâneas de eumicetoma, Rio de Janeiro, Brasil, 1998 a 2015.



Coluna azul variável positiva e coluna vermelha variável negativa.

Figura 23 - Eumicetoma. Grão exibindo hifas septadas e elementos redondos de cor acastanhada com impregnação argêntica. Prata metenamina de Grocott, 1000X.

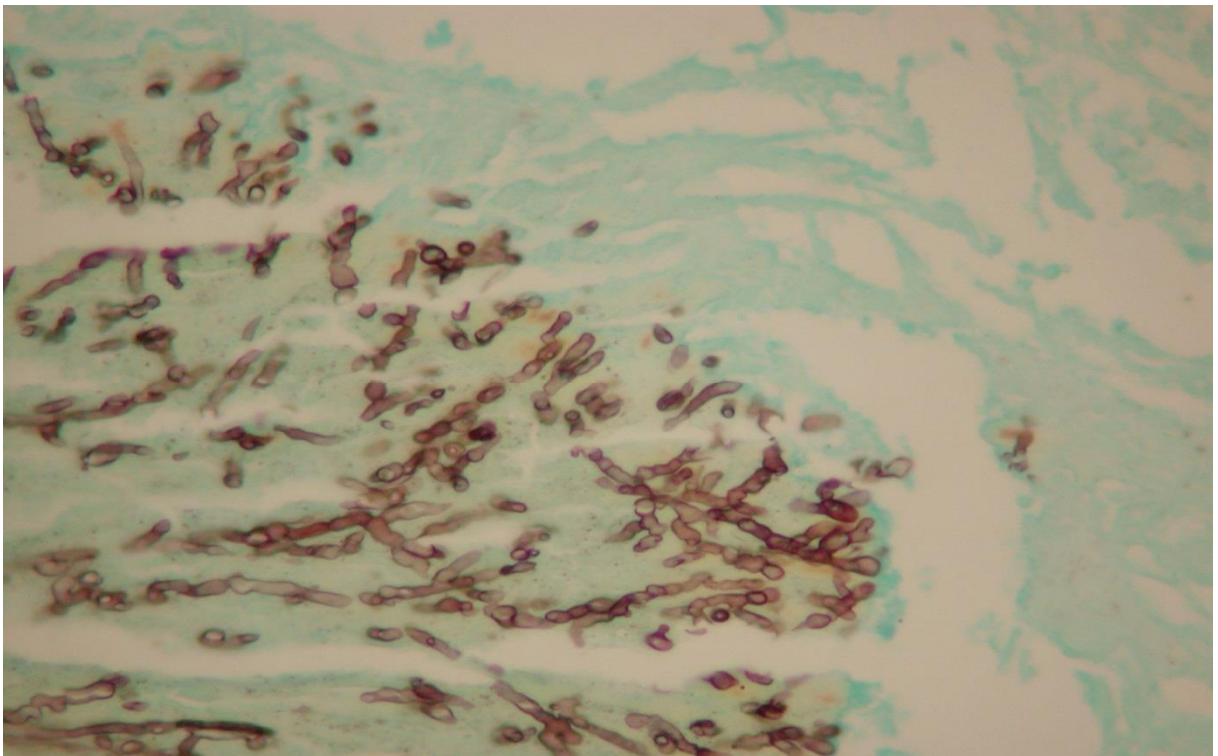


Figura 24 - Actinomicetoma. Grão de *Nocardia* sp contendo filamentos bacterianos álcool-ácido-resistentes de cor fúccia. Wade, 1000X.

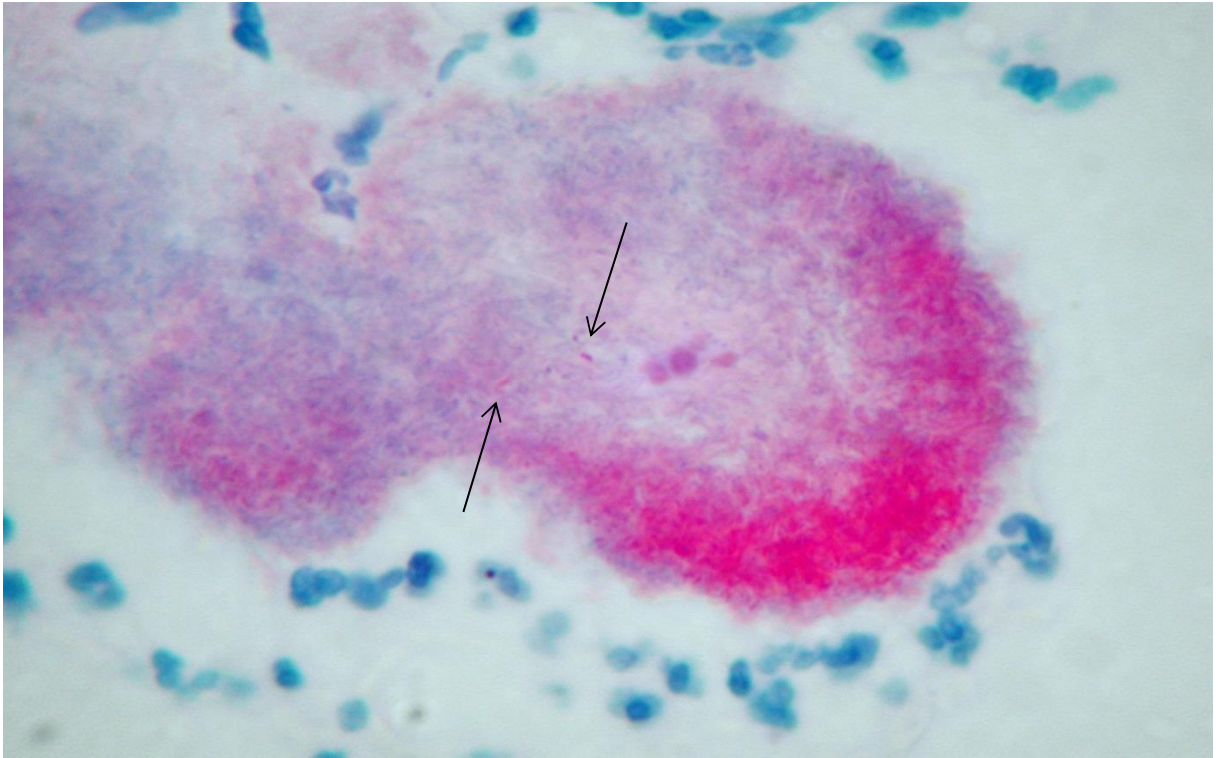


Figura 25 - Actinomicetomas. Grão contendo filamentos bacterianos Gram positivos. Gram Brown-Brenn, 1000X.

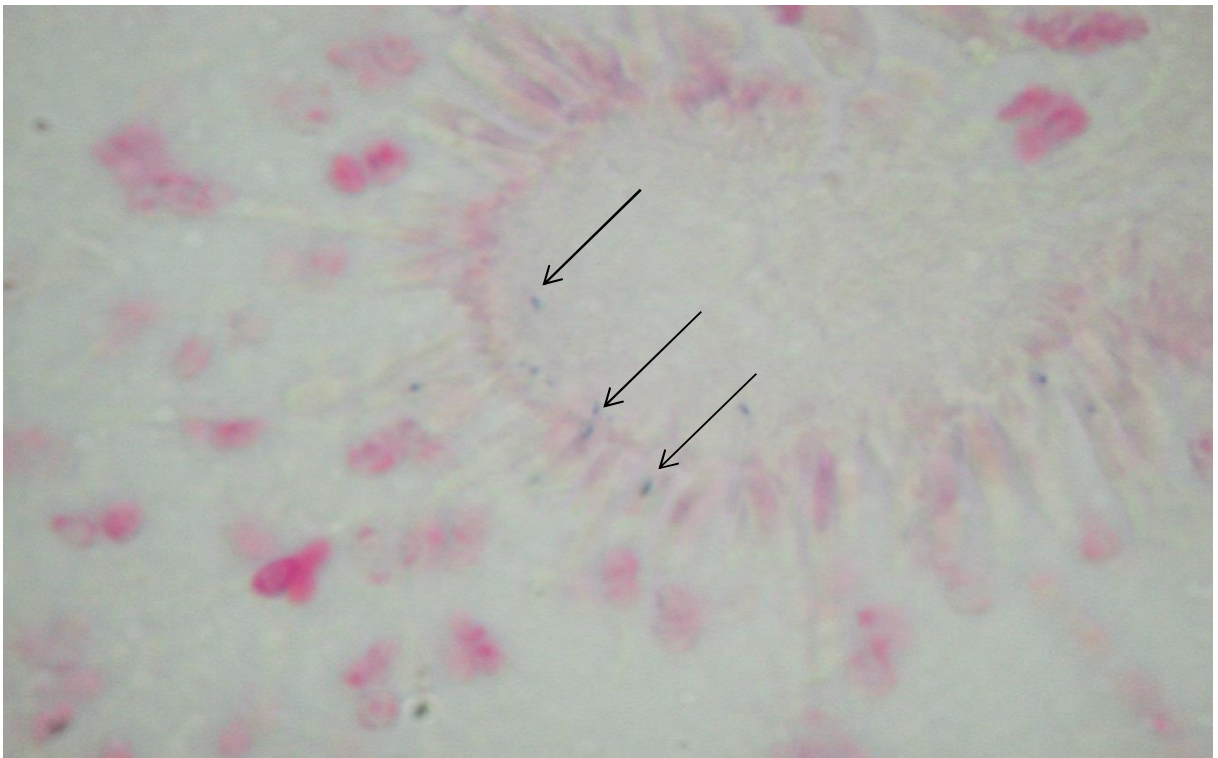
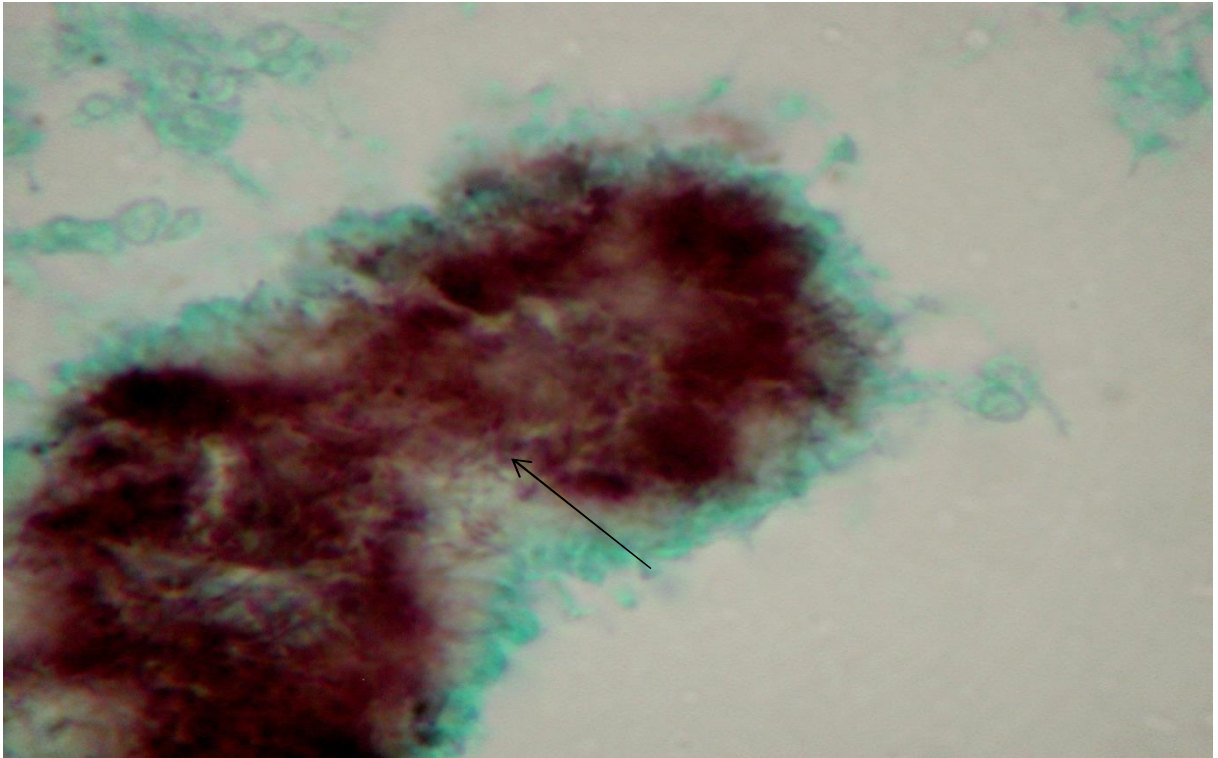


Figura 26 - Actinomicetoma. Grão contendo filamentos bacterianos de cor acastanhada pela impregnação argêntica. Prata metenamina de Grocott, 1000X.



7.2 Achados imuno-histoquímicos nos micetomas

O estudo imuno-histoquímico revelou linfócitos com fenótipo CD4⁺ (Figura 27), CD8⁺ e células CD68⁺ (Figura 28), presentes em proporções variáveis em cada caso, dispostas principalmente na derme e hipoderme em meio ao processo inflamatório e granulomas. As células CD68⁺ localizaram-se no interior e predominantemente na periferia dos granulomas. Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ foram observados ao redor dos granulomas e mais periféricamente nas lesões, quando comparados às células CD68⁺. Linfócitos CD8⁺ foram observados ao redor de vasos e próximos aos locais de inflamação (Figura 29). A contagem de número total de células inflamatórias/10 campos de grande aumento (CGA) revelou a seguinte distribuição nos eumicetomas: CD4⁺: 2583 (17%), CD8⁺: 4897 (33%), CD68⁺: 7517 (50%) do total de células contadas e nos actinomicetomas: CD4⁺: 570 (22%), CD8⁺: 728 (29%), CD68⁺: 1222 (49%). Dados de contagem celular no total dos casos de micetomas estão ilustrados na Figura 30 e, separadamente, os dados referentes aos actinomicetomas e eumicetomas nas figuras 31 e 32, respectivamente.

Figura 27 - Células T CD4⁺ localizadas na derme em meio ao processo inflamatório. Técnica de imuno-histoquímica, 400X.

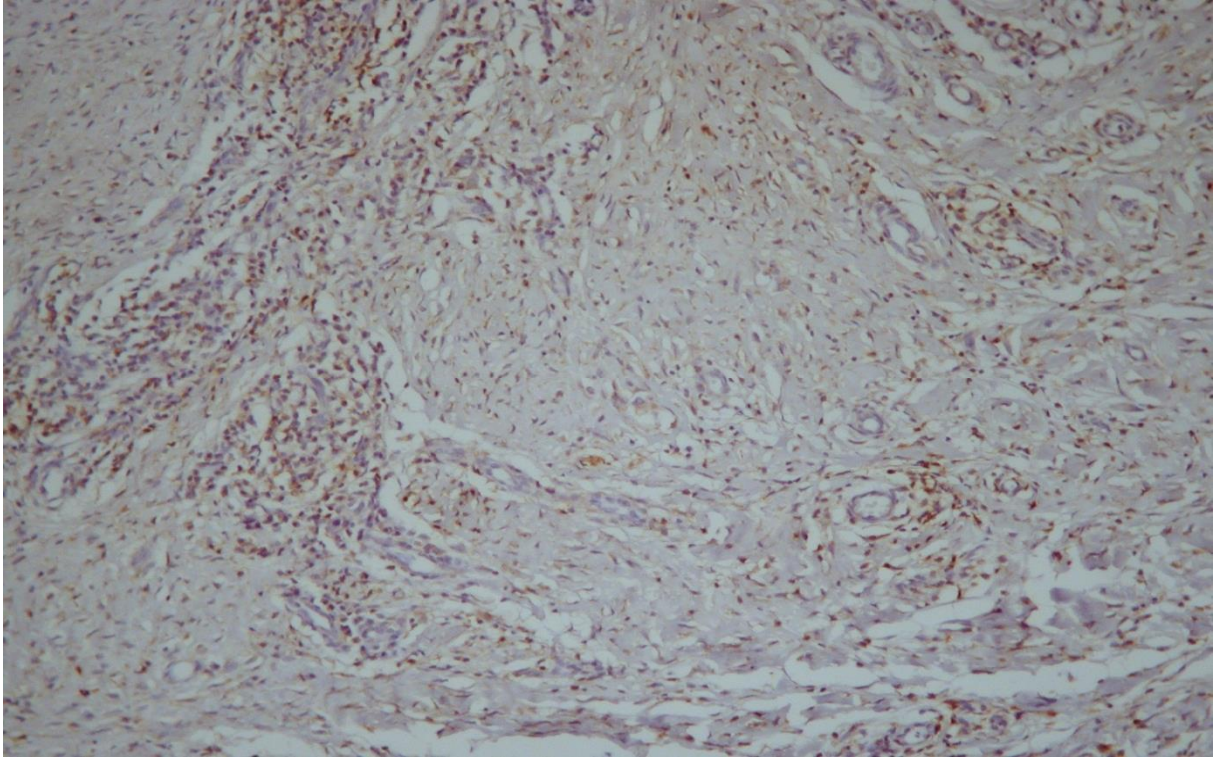


Figura 28 - Numerosos macrófagos CD68⁺ localizados na periferia do granuloma. Técnica de imuno-histoquímica, 400X.

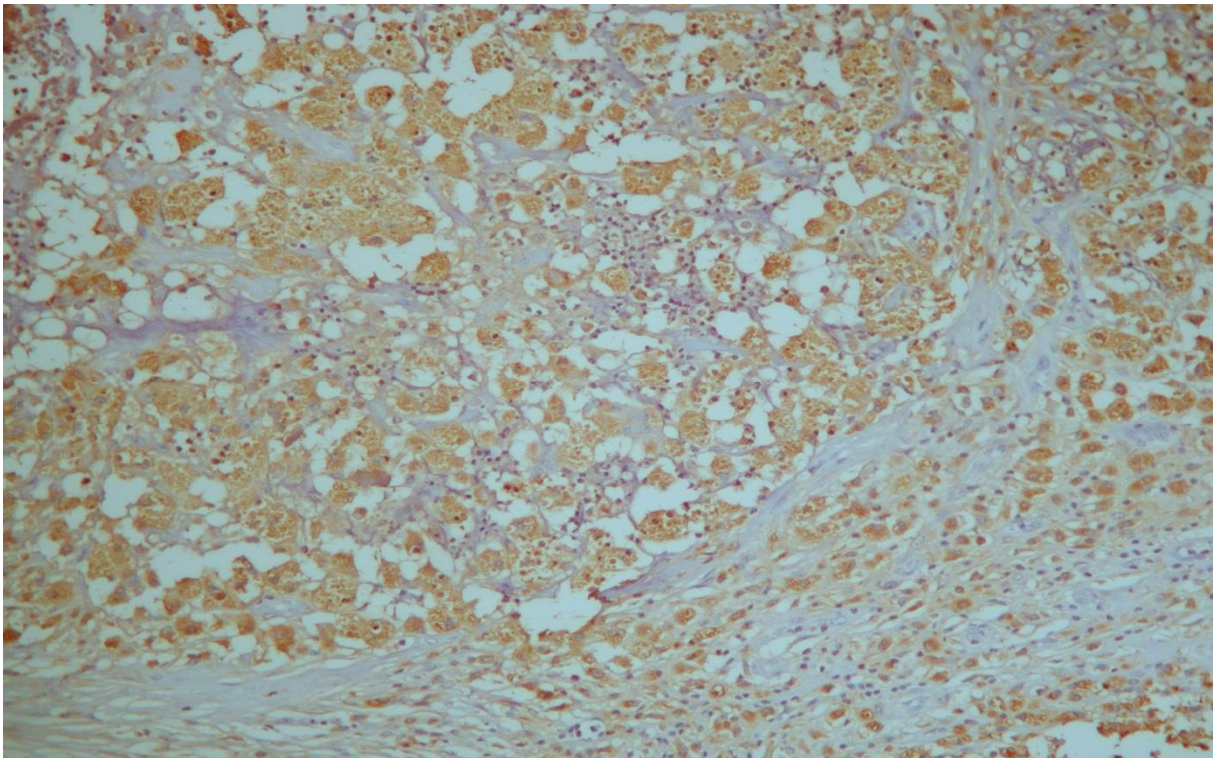


Figura 29 - Células T CD8⁺ isoladas e perivasculares. Técnica de imuno-histoquímica, 400X.

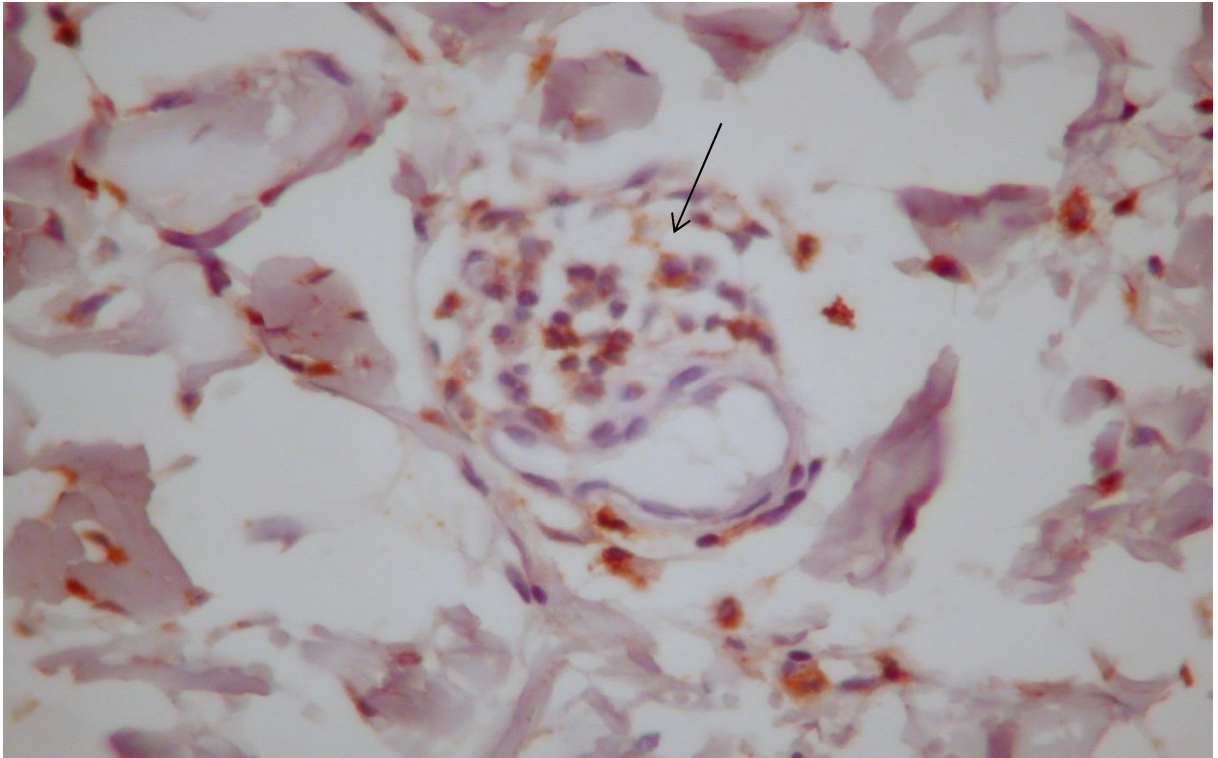


Figura 30 - Detecção e contagem do número de células/10 CGA (células T CD4⁺, T CD8⁺ e CD 68⁺) pelo estudo imuno-histoquímico em amostras cutâneas de 22 casos de micetomas, Rio de Janeiro, Brasil, 1998 a 2015.

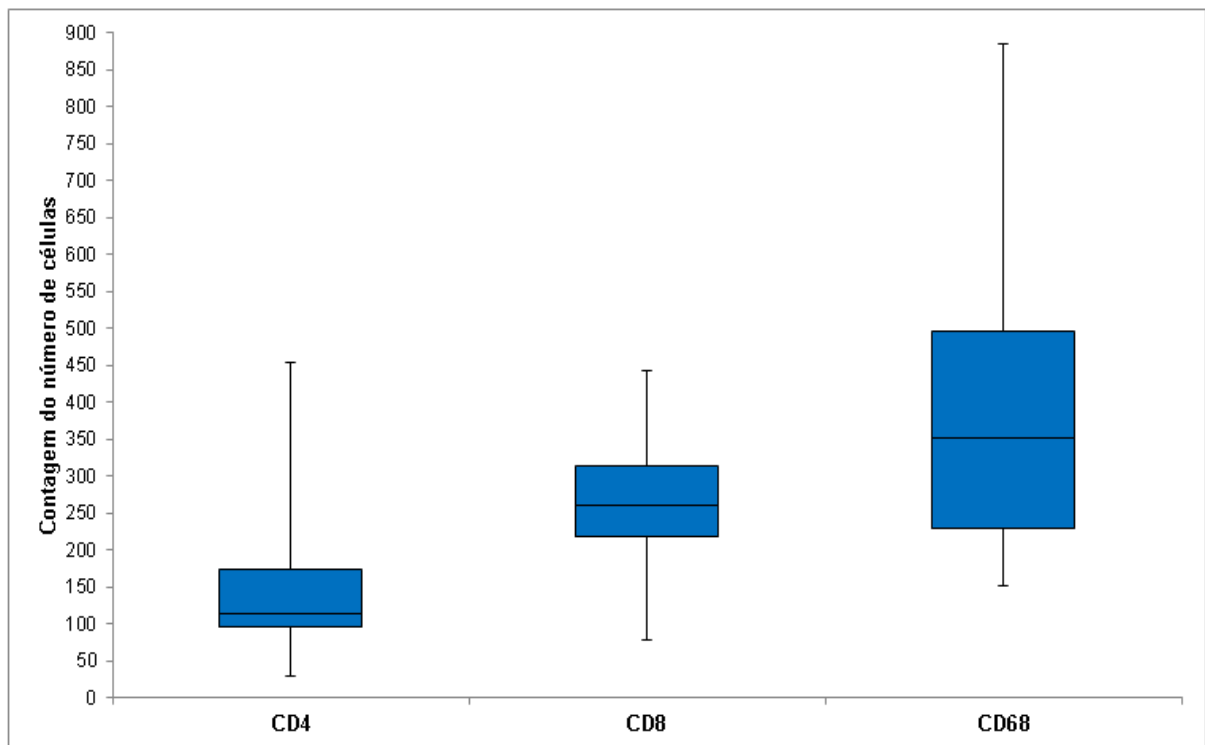


Figura 31 - Detecção e contagem do número de células/10 CGA (células T CD4⁺, T CD8⁺ e CD 68⁺) pelo estudo imuno-histoquímico em amostras cutâneas de quatro casos de actinomicetomas, Rio de Janeiro, Brasil, 1998 a 2015.

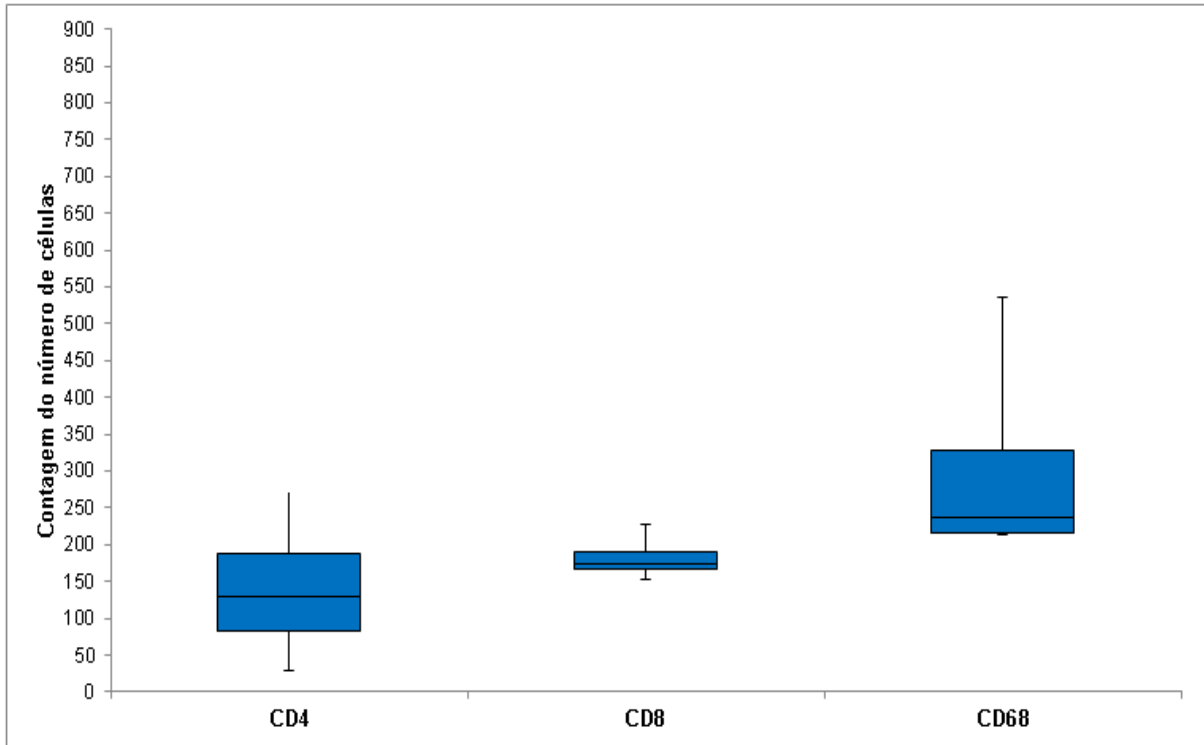
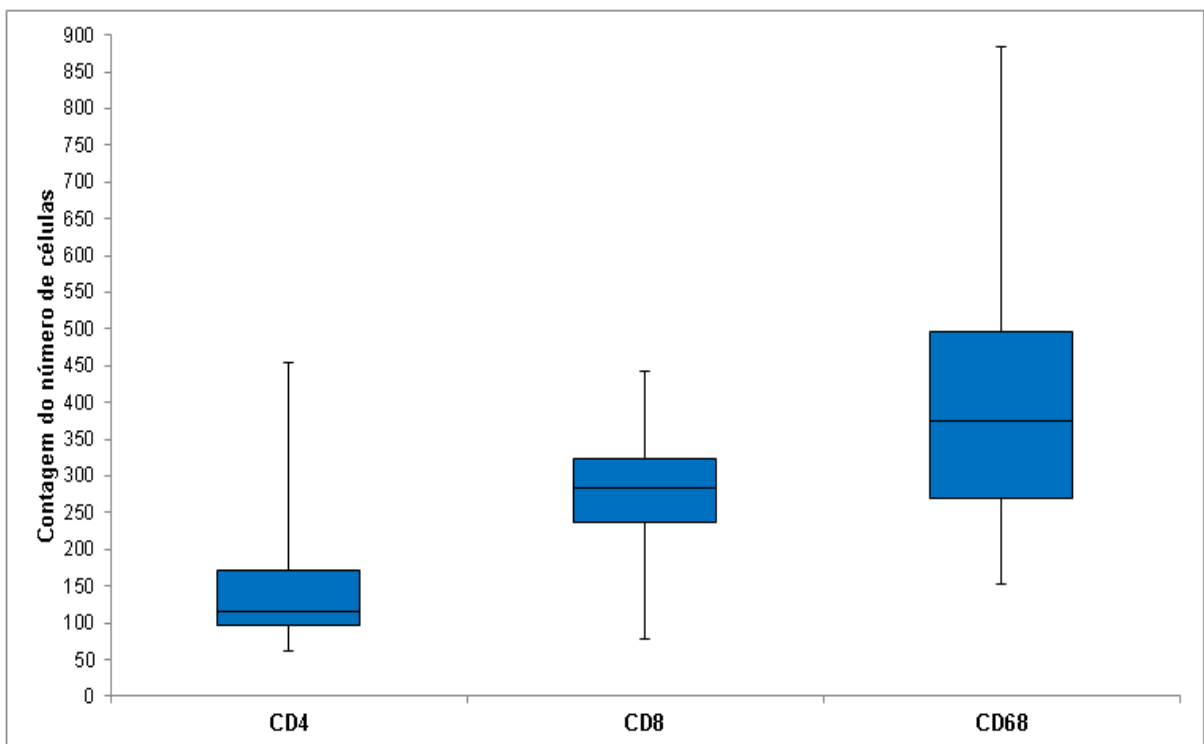


Figura 32 - Detecção e contagem do número de células/10 CGA (células T CD4⁺, T CD8⁺ e CD 68⁺) pelo estudo imuno-histoquímico em amostras cutâneas de 18 casos de eumicetomas, Rio de Janeiro, Brasil, 1998 a 2015.



Análise dos casos de micetomas em conjunto revelaram que as citocinas IL-17, IL-10 e IL-12 (Figuras 33, 34 e 35, respectivamente) foram identificadas no interior das células inflamatórias (linfócitos e macrófagos) e ainda, com disposição extracelular. Antígenos para perforina foram identificados no citoplasma de neutrófilos e NOS2 em macrófagos e células mesenquimais em todas as amostras. Foram identificadas IL-10 (73%), IL-12 (95%), IL-17 (95%), TNF- α (100%), TGF- β 1 (95%), NOS2 (100%), perforina (91%) (Figuras 36, 37, 38 e 39, respectivamente) compreendendo a totalidade dos micetomas, conforme figura 40.

Nos actinomicetomas foram observados antígenos para IL-10 (75%) e demais marcadores como IL-12 (100%), IL-17 (100%), TNF- α (100%), TGF- β 1 (100%), NOS2 (100%) e perforina (100%). Os eumicetomas apresentaram positividade de 100% somente para TNF- α e NOS2, e valores inferiores para os demais marcadores, conforme figura 41 e 42.

Figura 33 - Identificação de antígenos de IL-17 em linfócitos. Técnica de imuno-histoquímica, 1000X.

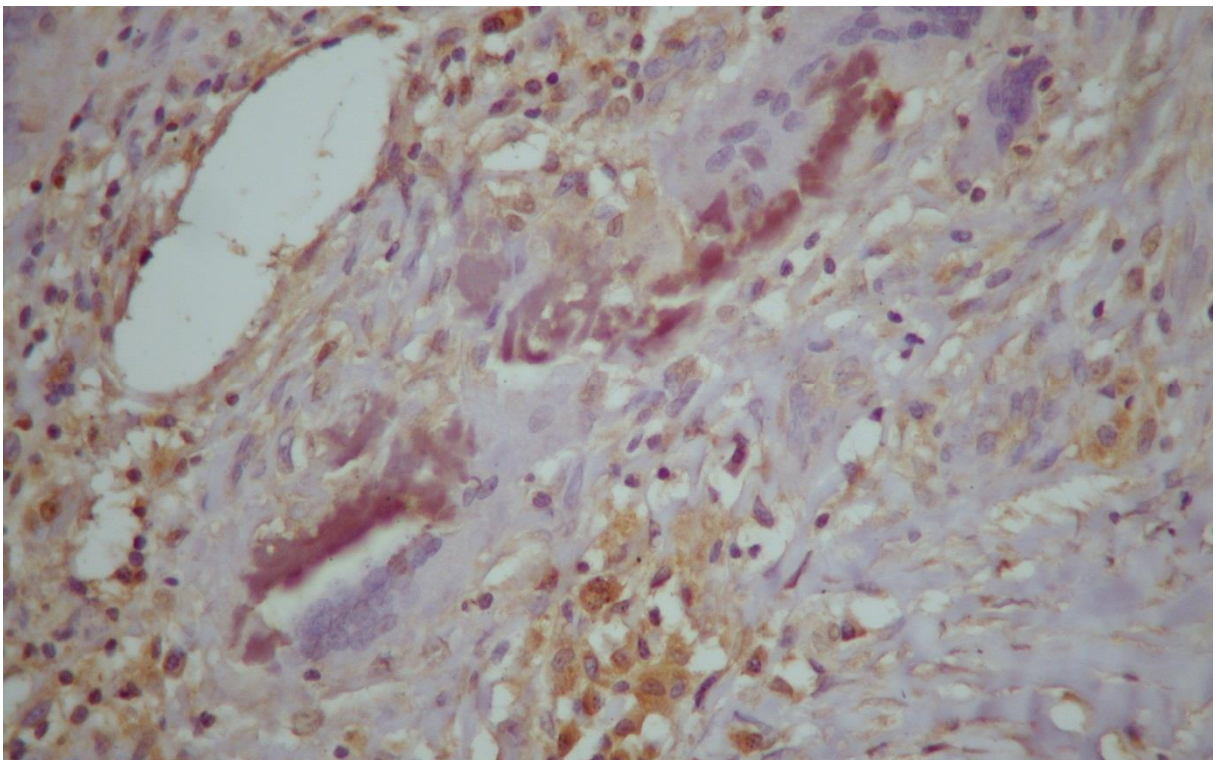


Figura 34 - Identificação de antígenos de IL-10 em linfócitos e macrófagos. Técnica de imuno-histoquímica, 400X.

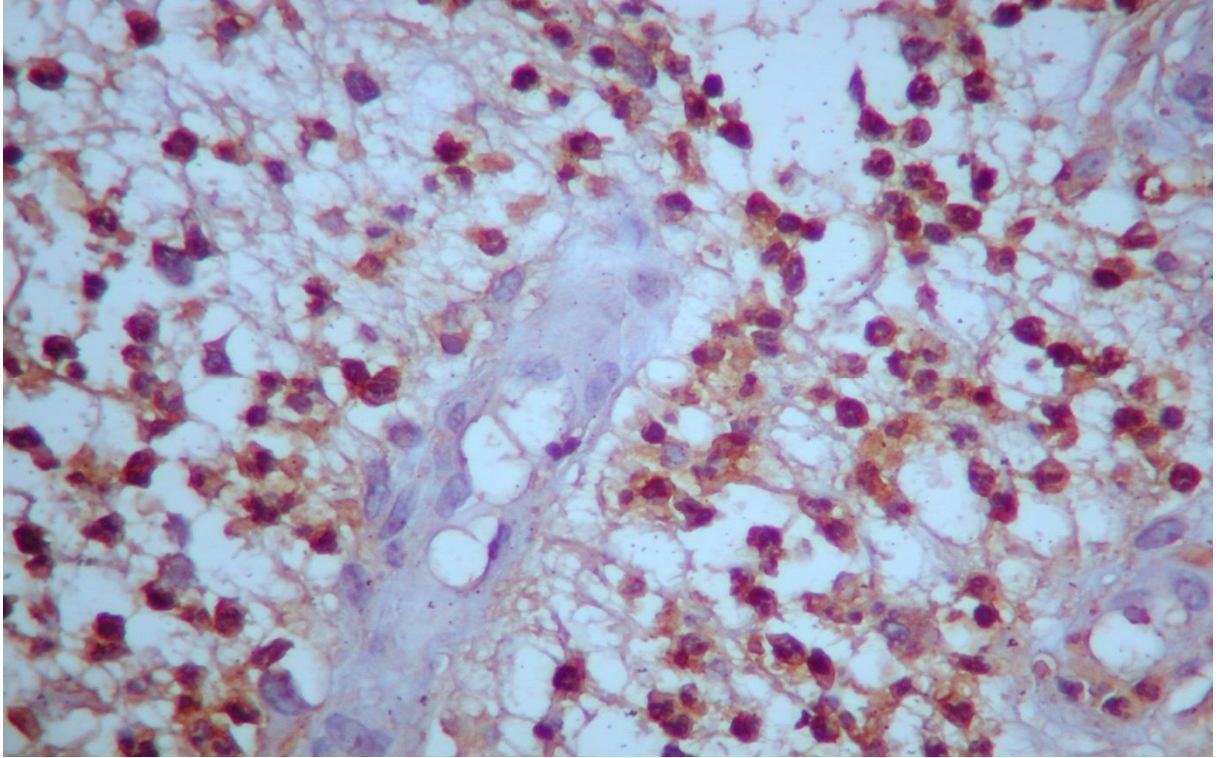


Figura 35 - Identificação de antígenos de IL-12 em linfócitos. Técnica de imuno-histoquímica, 400X.

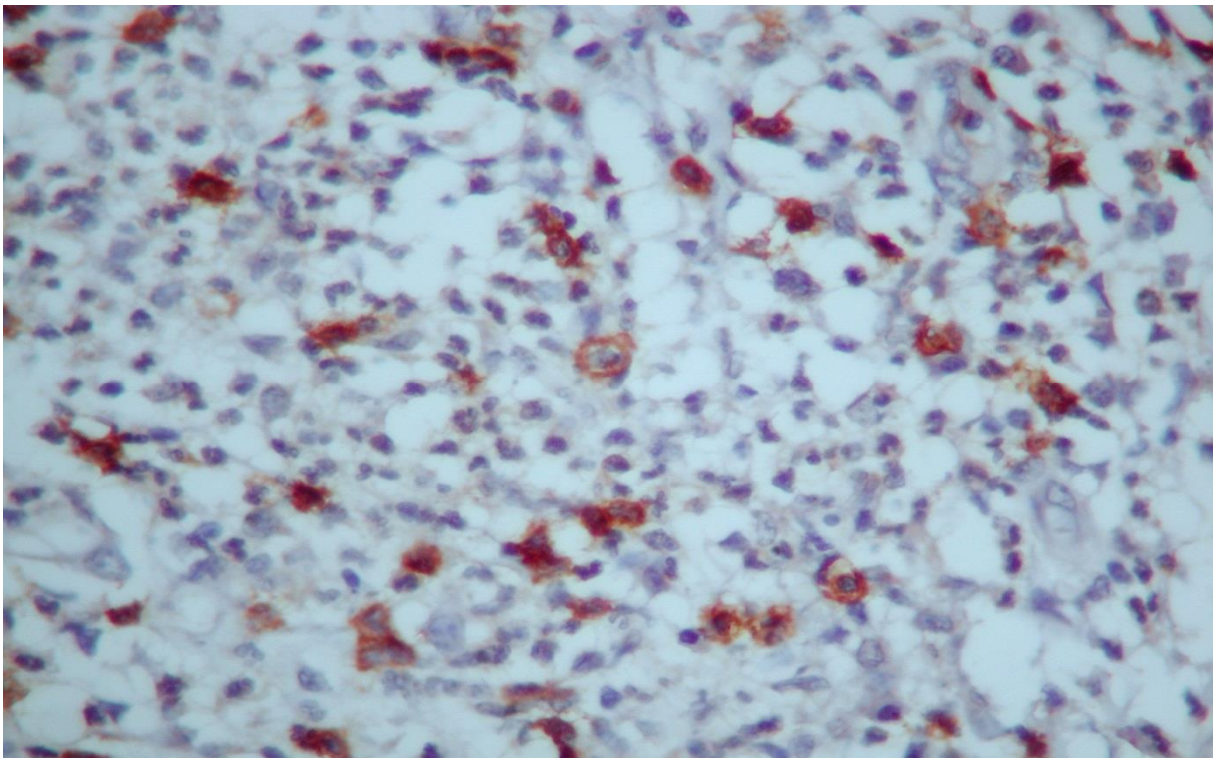


Figura 36 - Identificação de antígenos de TGF- 1, com padrão granular no citoplasma de macrófagos e linfócitos. Técnica de imuno-histoquímica, 400X.

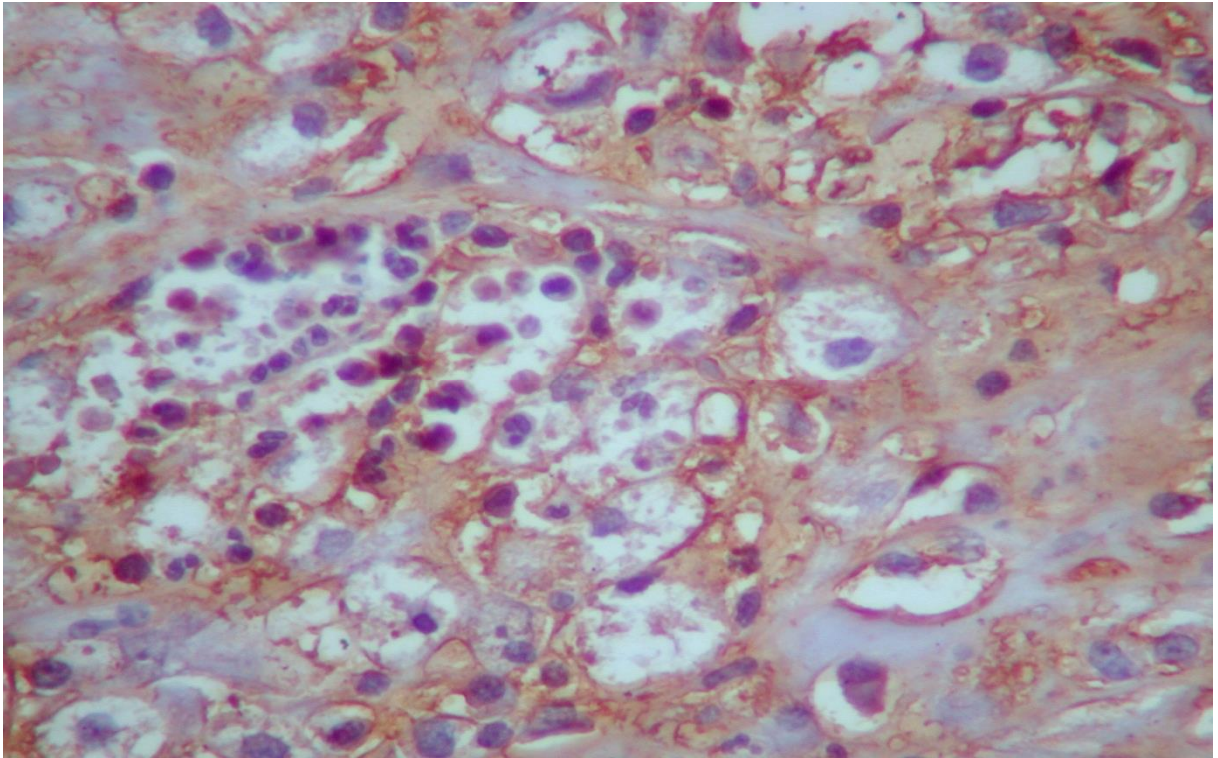


Figura 37 - Identificação de antígenos de TNF- , com padrão granular em macrófagos, plasmócitos e extracelular. Técnica de imuno-histoquímica, 400X.

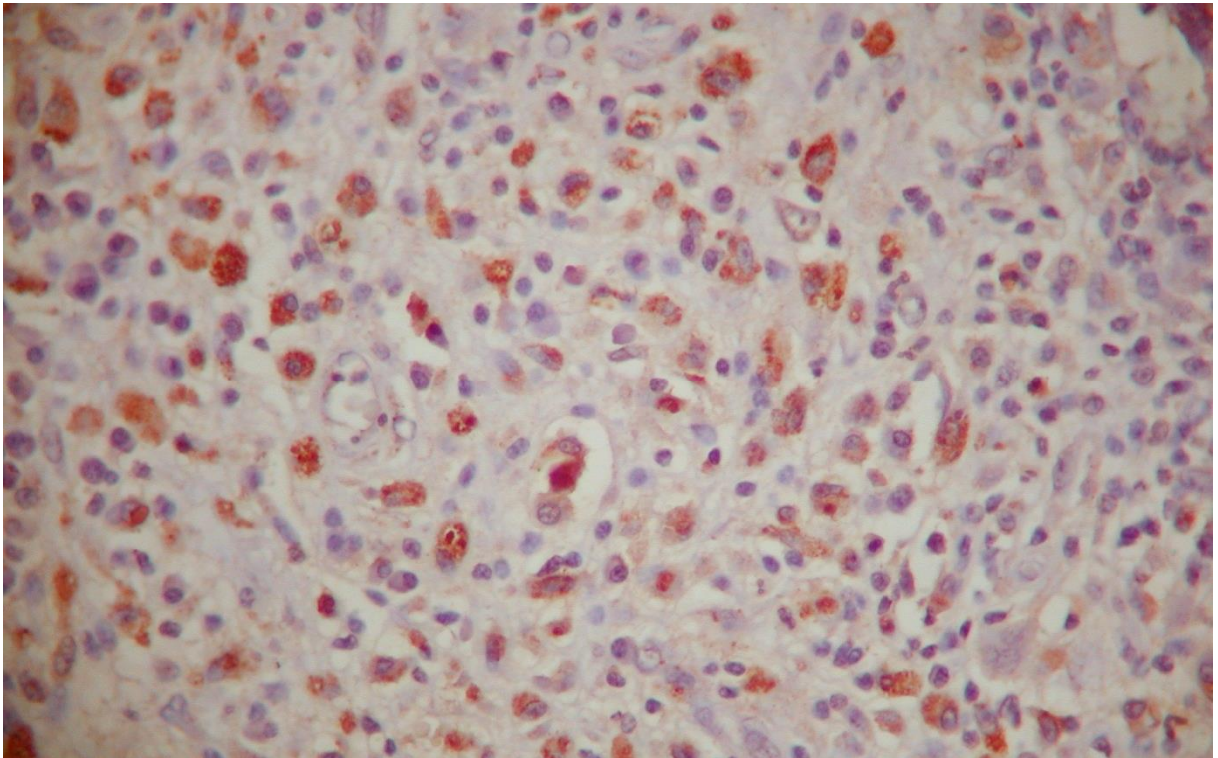


Figura 38 - Identificação de antígenos de NOS2 com padrão granular no citoplasma de macrófagos e extracelular. Técnica de imuno-histoquímica, 400X.

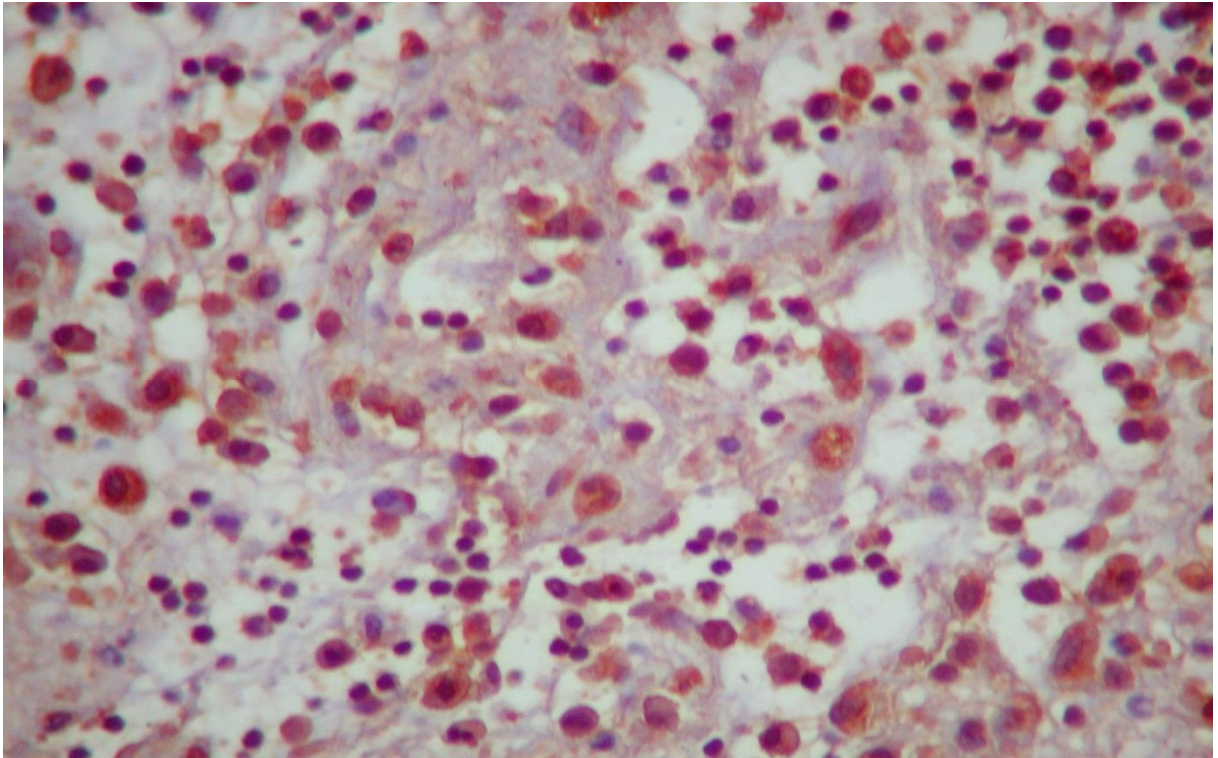


Figura 39 - Identificação de antígenos de perforina com padrão granular no citoplasma de neutrófilo. Técnica de imuno-histoquímica, 1000X.

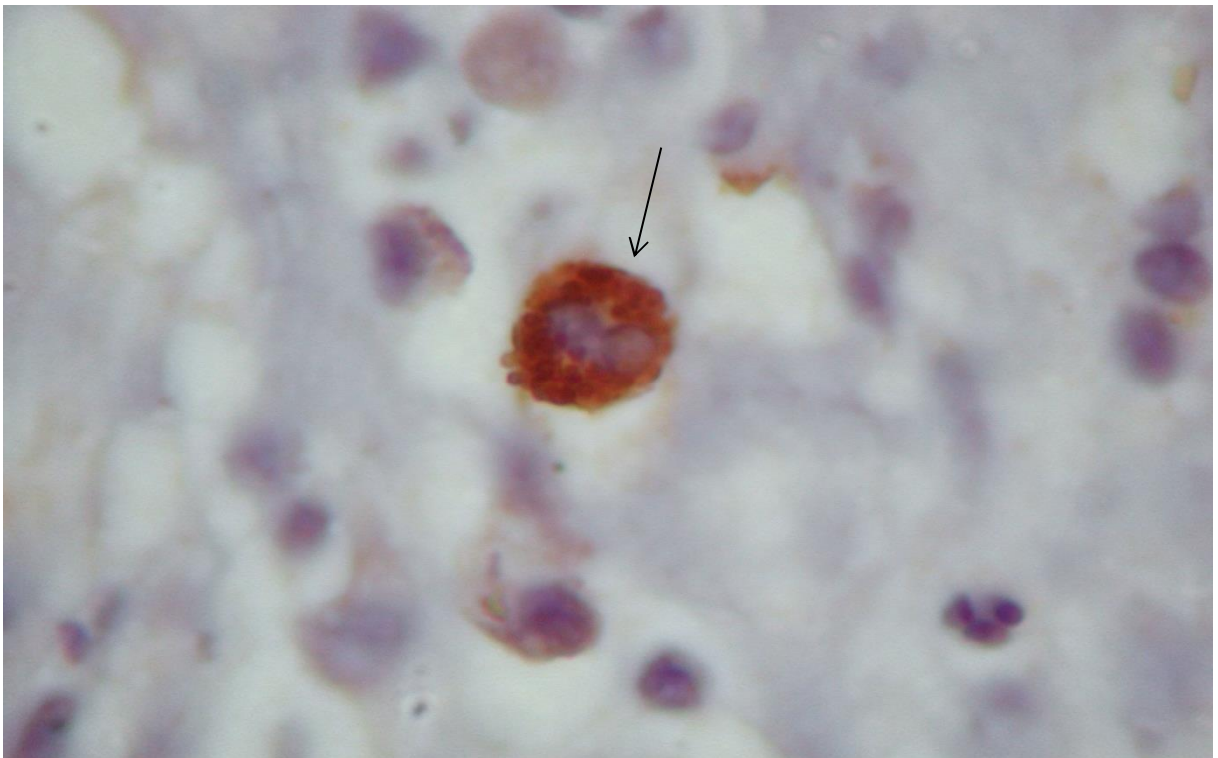
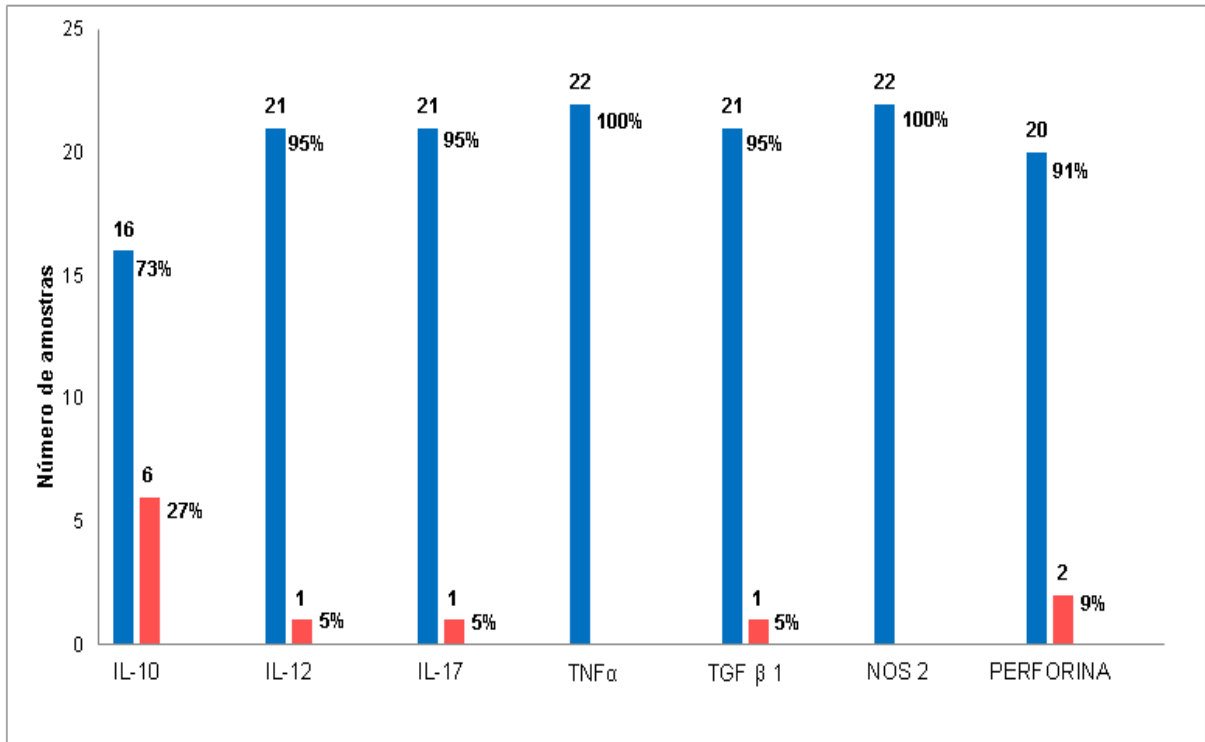
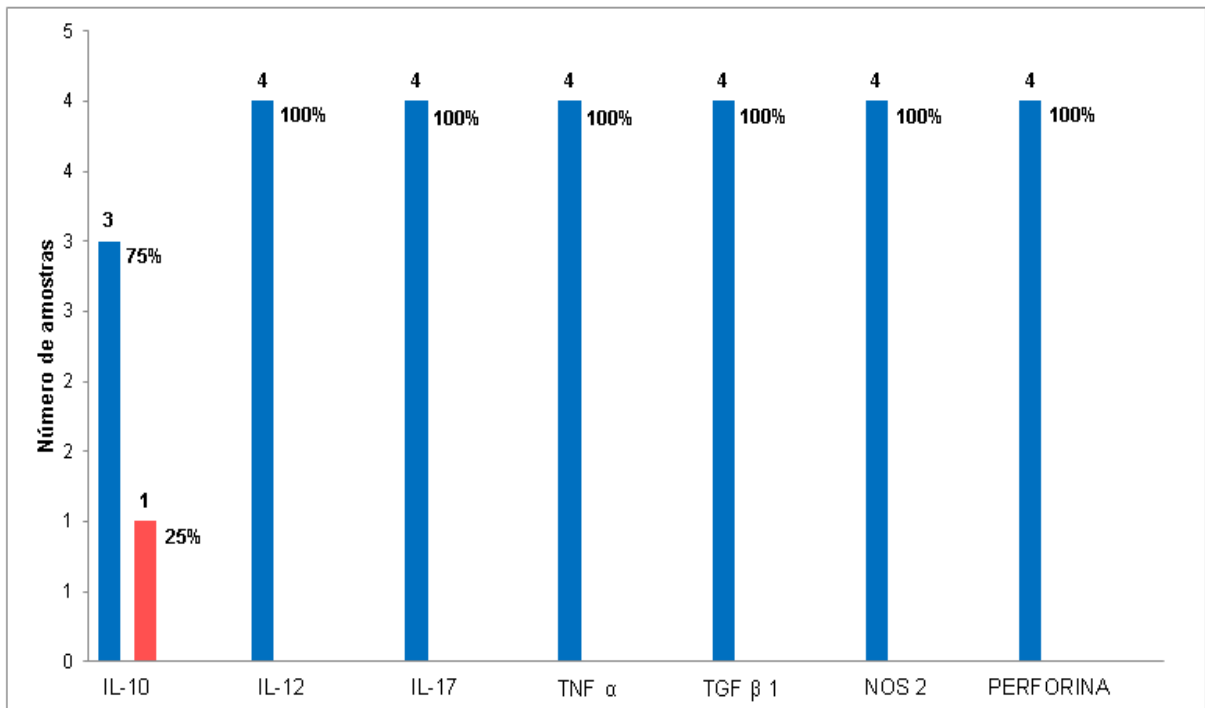


Figura 40 - Análise do estudo imuno-histoquímico dos antígenos teciduais para pesquisa de citocinas e mediadores inflamatórios pesquisados em amostras cutâneas de 22 casos de micetomas, Rio de Janeiro, Brasil, 1998 a 2015.



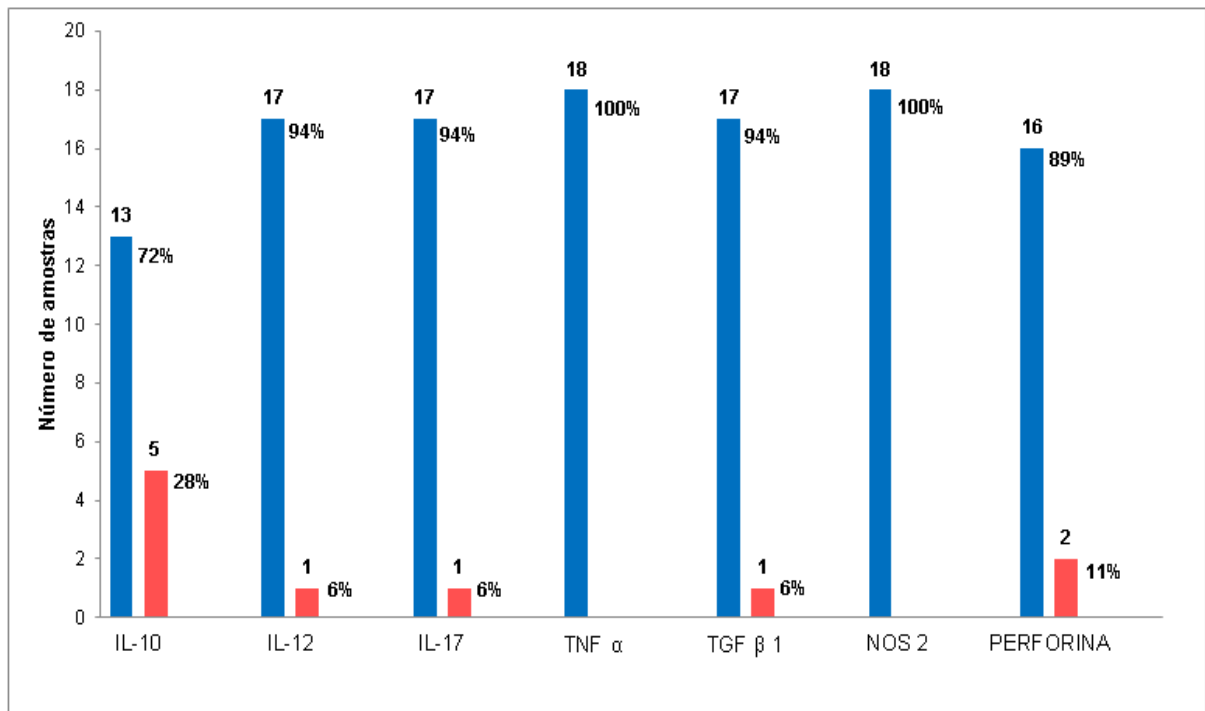
Coluna azul variável positiva e coluna vermelha variável negativa.

Figura 41 - Análise do estudo imuno-histoquímico dos antígenos teciduais para pesquisa de citocinas e mediadores inflamatórios pesquisados em amostras cutâneas de actinomicetomas, Rio de Janeiro, Brasil, 1998 a 2015.



Coluna azul variável positiva e coluna vermelha variável negativa.

Figura 42 - Análise do estudo imuno-histoquímico dos antígenos teciduais para pesquisa de citocinas e mediadores inflamatórios pesquisados em amostras cutâneas de eumicetomas, Rio de Janeiro, Brasil, 1998 a 2015.



Coluna azul variável positiva e coluna vermelha variável negativa.

7.3 Dados demográficos, critérios de inclusão, exclusão e dados laboratoriais

Os dados referentes à casuística estudada, diagnóstico histopatológico e microbiológicos foram parcialmente utilizados e publicados no artigo submetido na PLOS Neglected Tropical Diseases, 2017. O artigo publicado teve como foco principal os aspectos clínicos e epidemiológicos.

RESEARCH ARTICLE

Review of 21 cases of mycetoma from 1991 to 2014 in Rio de Janeiro, Brazil

Felipe Maurício Soeiro Sampaio^{1*}, Bodo Wanke, Dayvison Francis Saraiva Freitas, Janice Mery Chicarino de Oliveira Coelho, Maria Clara Gutierrez Galhardo, Marcelo Rosandiski Lyra, Maria Cristina da Silva Lourenço, Rodrigo de Almeida Paes, Antonio Carlos Francesconi do Valle

National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation - Rio de Janeiro - Brazil

* felipe.mauricio@ufc.com.br



Abstract

Mycetoma is caused by the subcutaneous inoculation of filamentous fungi or aerobic filamentous bacteria that form grains in the tissue. The purpose of this study is to describe the epidemiologic, clinic, laboratory, and therapeutic characteristics of patients with mycetoma at the Oswaldo Cruz Foundation in Rio de Janeiro, Brazil, between 1991 and 2014. Twenty-one cases of mycetoma were included in the study. There was a predominance of male patients (1.3:1) and the average patient age was 46 years. The majority of the cases were from the Southeast region of Brazil and the feet were the most affected anatomical region (80.95%). Eumycetoma prevailed over actinomycetoma (61.9% and 38.1% respectively). Eumycetoma patients had positive cultures in 8 of 13 cases, with isolation of *Scedosporium apiospermum* species complex ($n = 3$), *Madurella mycetomatis* ($n = 2$) and *Acremonium* spp. ($n = 1$). Two cases presented sterile mycelium and five were negative. Six of 8 actinomycetoma cases had cultures that were identified as *Nocardia* spp. ($n = 3$), *Nocardia brasiliensis* ($n = 2$), and *Nocardia asteroides* ($n = 1$). Imaging tests were performed on all but one patients, and bone destruction was identified in 9 cases (42.68%). All eumycetoma cases were treated with itraconazole monotherapy or combined with fluconazole, terbinafine, or amphotericin B. Actinomycetoma cases were treated with sulfamethoxazole plus trimethoprim or combined with cycles of amikacin sulphate. Surgical procedures were performed in 9 (69.2%) eumycetoma and in 3 (37.5%) actinomycetoma cases, with one amputation case in each group. Clinical cure occurred in 11 cases (7 for eumycetoma and 4 for actinomycetoma), and recurrence was documented in 4 of 21 cases. No deaths were recorded during the study. Despite of the scarcity of mycetoma in our institution the cases presented reflect the wide clinical spectrum and difficulties to take care of this neglected disease.

OPEN ACCESS

Citation: Sampaio FMS, Wanke B, Freitas DFS, Coelho JMCJO, Galhardo MCG, Lyra MR, et al. (2017) Review of 21 cases of mycetoma from 1991 to 2014 in Rio de Janeiro, Brazil. PLoS Negl Trop Dis 11(2): e0005301. doi:10.1371/journal.pntd.0005301

Editor: Joseph M. Vinetz, University of California San Diego School of Medicine, UNITED STATES

Received: September 13, 2016

Accepted: January 3, 2017

Published: February 13, 2017

Copyright: © 2017 Sampaio et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: We are thankful for the support of Grant —Apolo Emergencial BBP/PPG FAPERJ, processo E-26/203.563/2015. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Author summary

Mycetoma is a major health problem in tropical areas and is prevalent among people of low socio-economic status. As in many other regions of the world, the incidence and prevalence of mycetoma in Brazil is unknown. This study describes some aspects of mycetoma

patients in 24 years of experience at the National Institute of Infectious Diseases at the Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil and contribute to the knowledge on mycetoma epidemiology globally.

Introduction

Mycetoma is a chronic subcutaneous infections caused by the inoculation of filamentous fungi (eumycetoma) or aerobic filamentous bacteria (actinomycetoma) that form grains in the affected tissues [1]. It's considered a neglected disease by the World Health Organization (WHO) since 2016 and remains without any control program for prevention or surveillance [1, 2].

Mycetoma occurs worldwide and prevails in tropical and subtropical regions, especially in sub-Saharan areas of Africa, India, and Mexico [3,4]. In South America, cases have been reported in Venezuela, Colombia, Brazil, and Argentina [1,3,5]. The incidence and prevalence of mycetoma in Brazil are unknown, since it is not considered a public health problem, as its frequency is smaller than other diseases such as sporotrichosis, tuberculosis, leprosy, and dengue (the latter two are classified as neglected diseases by the WHO) [6]. Mycetoma evolves slowly in its clinical manifestation. Laboratory diagnosis and treatment are difficult, presenting significant medical, occupational and socioeconomic impacts [2,7].

In this study, we describe the epidemiological, clinical, laboratory, and therapeutic aspects of patients treated at a reference hospital in Rio de Janeiro, Brazil, between 1991 and 2014.

Methods

Ethics

The study was approved by the Research Ethics Committee of the INI / Fiocruz, on November 25, 2013 under the number 477.037. All participants gave their written consent, with the exception of those who died before the study. In all cases the identity and information of each patient were preserved.

Laboratorial diagnosis

Histological examination was performed using haematoxylin-eosin, Grocott's methenamine silver, Periodic acid-Schiff, and Gram-Brown-Brenn stains. Biopsy specimens were submitted for direct microscopic examination with 10% potassium hydroxide where grains were classified according to their size, shape, colour, consistency and presence of hyphae or filamentous bacteria. Culture on Sabouraud's Dextrose Agar 2% and Mycobiotic Agar was performed for eumycotic grains and in/on Lowenstein-Jensen medium, defibrinated sheep blood agar chocolate agar and thioglycolate medium with resazurina for actinomycotic grains.

Bacterial and fungal etiologic agents were identified by examination of the colonies in culture.

Imaging tests

Ultrasound, radiography, computerized tomography (CT), and magnetic resonance imaging (MRI) were performed to determine deep tissue and bone involvement and presence of grains.

Treatment

Actinomycetoma patients were treated with oral sulfamethoxazole-trimethoprim (SMX-TMP) 800/160 mg BD, alone or in combination with alternate cycles of 15 mg/kg/day intravenous amikacin for three weeks in cases with bone destruction. Other antimicrobials were given in case of secondary infections. Eumycetoma patients were treated with itraconazole (200 mg, BD) alone or, in cases without consistent clinical response after six months, in combination with fluconazole 200 mg/day, terbinafine 250 mg/day, or amphotericin B 1 mg/kg. Surgical treatment was indicated for small and delimited lesions and in cases of bone destruction. Amputation was indicated in cases lacking a satisfactory antimicrobial response associated to severe bone destruction of the affected segment.

Follow-up

The patients were followed-up bimonthly at the outpatient clinic to assess clinical responses to treatment and drug side effects. A complete cure was defined with the healing of lesions, bone remodelling, and absence of grains upon imaging examination. After the determination of the clinical cure, outpatient follow-up turned annual, to assess the possibility of recurrence.

Statistics

Data retrieved from patients records were analysed using descriptive statistics with the Statistical Package for the Social Sciences, version 20.0. Data were summarized as percentages for categorical variables and mean, median, and range for continuous variables.

Results

A total of 21 mycetoma cases were included in the present study: 13 eumycetoma and 8 actinomycetoma patients.

The main sociodemographic aspects of the mycetoma patients are summarised in [Table 1](#). In brief, the male to female ratio was 1.3:1, and the mean age was 46 years old (range 28–93 years). However, the mean age for eumycetoma was 51.3 years old and 38.6 years old for actinomycetoma. The non-white ethnicity/race predominated with 66,66%. Most patients (71.43%) came from the southeast region of Brazil, and 28,57% came from the northeast region. These regions correspond to the possible original infection sites.

Comorbidities occurred in 10 patients. Eight of them presented a single comorbidity and the others had two comorbidities. In general, high blood pressure, diabetes mellitus, HIV positive ([Figs 1 and 2](#)), and asthma were found.

The time from onset of signs and symptoms to medical care ranged from 2 to 420 months (mean = 77.68 months). The average time was higher for eumycetoma (mean = 105.76 months) than actinomycetoma (mean = 36.75 months).

The foot ([Figs 3, 4 and 5](#)) was affected in 17 cases (80.9%), the thigh was affected in two cases, and the hand and ankle were affected in one case each. A history of trauma was reported in 17 (80.9%) cases.

The grains were mainly identified through histopathological examination with 90.4% positivity in these methods and 9.6% through direct microscopy. We retrieved the etiological agents in 61.5% eumycetoma cases ([Table 2](#)) and in 75% of actinomycetoma cases ([Table 3](#)).

In the eumycetoma group, the *Scedosporium apiospermum* species complex was identified in three cases, *Madurella mycetomatis* was isolated from two cases and *Acremonium* sp. was isolated from one case. From the remaining two patients, the isolated filamentous fungi could

Table 1. Demographic, clinical and laboratorial characteristics of 21 patients diagnosed with mycetoma at the Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro—Brazil, from 1991 to 2014.

Demographic characteristics	Number	Percentage
Gender		
Male	12	57.14
Female	9	42.85
Ethnicity/color		
White	7	33.33
Non-white	14	66.66
Geographic Origin		
Southeast Brazil	15	71.42
Northeast Brazil	6	28.57
Age (years)		
< 30	3	14.28
30–50	9	42.85
> 50	9	42.85
Comorbidity		
Systemic hypertension	7	33.33
Diabetes Mellitus	3	14.28
HIV	1	4.76
Asthma	1	4.76
None	11	52.38
Anatomical regions		
Foot	17	80.95
Ankle	1	4.76
Hand	1	4.76
Thighs and buttocks	2	9.52
Bone involvement		
Yes	9	42.85
No	12	57.14

HIV: human immunodeficiency virus.

* Some patients have more than one comorbidity.

doi:10.1371/journal.pntd.0005301.t001

not be identified, as they only produced hyphae without any conidia or spores, and therefore they were named *Mycelia sterilia* (cases 7 and 8, [Table 2](#)). It is important to note that these two organisms were consistently isolated as pure cultures in at least three consecutive mycological examinations.

In the actinomycetoma group we isolated *Nocardia* spp. from three cases, *Nocardia brasiliensis* from two cases and *Nocardia asteroides* from one case ([Table 3](#)). In two cases the culture were negative.

All patients underwent radiography of the affected site with exception of patient 7 of [Table 3](#), who underwent complete excision with security margin of the lesion during the diagnostic procedure ([Fig 6](#)).



Fig 1. HIV patient with actinomycetoma before treatment.

doi:10.1371/journal.pntd.0005301.g001

Ultrasonography was performed in 18 cases, with the observation of subcutaneous nodules in all of them. Ten patients underwent CT scans and seven patients underwent MRI. Bone involvement was present in 9 cases, five from eumycetoma and four from actinomycetoma.

Secondary bacterial infection was diagnosed in four cases, two of them had *Staphylococcus aureus* associated infection treated with systemic antibiotics guided by susceptibility tests. The other two cases were treated empirically.

Patients with eumycetoma received 200 mg BD itraconazole alone (8/13) or in combination with 200 mg/day fluconazole (3/13), or 250 mg/day terbinafine (2/13). In case 1 (Table 2), when the patient became pregnant during itraconazole treatment, this drug was suspended and we tried to use liposomal amphotericin B due to clinical worsening, without success.

Actinomycetoma patients received 800/160 mg sulfamethoxazole-trimethoprim BD in most of cases (75%). As monotherapy in five cases, one case with cycles of 15 mg/kg/day amikacin sulphate and another case received 500 mg cephalexin four times a day. The used of cephalexin occurred because of the repeated secondary bacterial infection. The case 7 (Table 3) with a small and well delimited lesion in lower limb underwent complete excision with security margin and therefore was not treated with antimicrobials. The case 8 (Table 3), who presented with multiple foci of bone destruction, was submitted to amikacin cycles, which had to be stopped after the fifth cycle due to changes in audiometry and increased creatinine levels, without lifelong clinical consequences. Itraconazole was used in all cases and combined with another antifungal agents (38%) in refractory cases.

The average treatment time was 35.04 months (range 6–144 months). The mean treatment time was 42.53 months for eumycetoma and 22.87 months for actinomycetoma. The average



Fig 2. HIV patient with actinomycetoma after treatment.

[doi:10.1371/journal.pntd.0005301.g002](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005301.g002)



Fig 3. Foot affected with actinomycetoma.

[doi:10.1371/journal.pntd.0005301.g003](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005301.g003)



Fig 4. Right foot affected with actinomycetoma and the left foot without disease.

[doi:10.1371/journal.pntd.0005301.g004](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005301.g004)



Fig 5. Right foot affected with actinomycetoma after treatment.

[doi:10.1371/journal.pntd.0005301.g005](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005301.g005)

Table 2. Main characteristics of 13 patients with Eumycetoma.

Patient	Sex	Etiologic agent	Grains	Treatment	Time for treatment (months)	Surgery	Bone involvement	Outcome
1	F	<i>Maduraia mycetomatis</i>	H	ITZ / AMB	24	Yes*	Yes	Cure
2	M	<i>Maduraia mycetomatis</i>	H/DM	ITZ + FLZ	60	Yes	No	Cure
3	M	<i>Acromonium</i> sp.	H	ITZ + FLZ	144	Yes	Yes	No Cure
4	M	<i>Scedosporium apiospermum</i>	H/DM	ITZ	46	Yes	No	Cure
5	M	<i>Scedosporium apiospermum</i>	H/DM	ITZ + TBF	**	No	No	**
6	M	<i>Scedosporium apiospermum</i>	H	ITZ + TBF / ITZ + FLZ	74	No	Yes	***
7	M	Flamentous fungi	H	ITZ	123	Yes	No	Cure
8	F	Flamentous fungi	H/DM	ITZ	**	No	Yes	**
9	F	Negative culture	H/DM	ITZ	24	Yes	No	Cure
10	F	Negative culture	H	ITZ	36	Yes	Yes	No cure
11	M	Negative culture	H	ITZ	7	Yes	No	Cure
12	F	Negative culture	H	ITZ	9	Yes	No	Cure
13	M	Negative culture	H	ITZ	6	No	No	***

F: female; M: male

H: histopathology; DM: direct microscopy; ITZ: itraconazole; FLZ: fluconazole; TBF: terbinafine; AMB: amphotericin B.

*Amputation;

** Abandon of follow up;

*** Still in treatment.

doi:10.1371/journal.pntd.0005301.t002

treatment time for patients with bone destruction was 70 months (median 55 months) for eumycetoma cases and 33 months (median 36 months) for actinomycetoma cases.

Amputation was recommended for three patients with eumycetoma, one of them accepted the procedure and the other two remain receiving drug treatment until now. In the actinomycetoma group, one patient accepted amputation. Surgical excision of small lesions were performed in nine eumycetoma patients and three actinomycetoma patients.

Table 3. Main characteristics of 8 patients with Actinomycetoma.

Patient	Sex	Etiologic agente	Grains	Treatment	Time for treatment (months)	Surgery	Bone involvement	Outcome
1	M	<i>Nocardia brasiliensis</i>	H	TMP + SMX	48	Yes	Yes	***
2	M	<i>Nocardia brasiliensis</i>	H/DM	TMP + SMX	38	No	Yes	**
3	F	<i>Nocardia</i> sp.	DM	TMP + SMX	36	No	No	Cure
4	M	<i>Nocardia</i> sp.	DM	TMP + SMX	10	No	No	Cure
5	M	<i>Nocardia</i> sp.	H	TMP + SMX	8	No	No	***
6	F	<i>Nocardia asteroides</i>	H	TMP + SMX / cefalexin	19	Yes *	Yes	Cure
7	F	Negative culture	H	—	0	Yes	No	Cure
8	F	Negative culture	H	TMP + SMX/ 5 cycles of amikacine	24	No	Yes	***

F: female; M: male

H: histopathology; DM: direct microscopy; TMP + SMX: Trimethoprim/sulfamethoxazole.

* Amputation;

** Abandon of follow up;

*** Still in treatment.

doi:10.1371/journal.pntd.0005301.t003



Fig 6. Radiography showing bone destruction.

[doi:10.1371/journal.pntd.0005301.g006](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005301.g006)

Clinical cure occurred in 11 (52.38%) of all cases. Of the 13 eumycetoma patients, seven were cured, two abandoned follow up and another two patients are still under antifungal treatment. Of the five eumycetoma patients with bone involvement, one underwent amputation, two remained in treatment, one remain under observation and one abandoned treatment.

Of the eight actinomycetoma patients, four were cured, one abandoned the treatment and three are under treatment. Of the four actinomycetoma cases with bone involvement, one patient was underwent amputation, two remained in treatment and one abandoned treatment. If we consider the cure without sequelae (amputation), the rate falls to 42.8%.

Recurrence of infection was observed in four patients: one with actinomycetoma and three with eumycetoma. The time to recurrence was 24 months for the actinomycetoma case and ranged from 8 to 96 months (mean = 36.6 months) for eumycetoma cases.

Treatment dropouts was high (23%) and recurrence was also frequent (19%) and prevailed in patients that had undergone surgery, especially in the eumycetoma group.

The broad range of treatment duration until clinical cure (6–114 months) was a striking observation of this study.

Discussion and review of the literature

The 21 mycetoma cases diagnosed in the 24-year period of this study demonstrate the low frequency of mycetoma in our institution at Rio de Janeiro, Brazil. Most reports of mycetoma in Brazil describe one or a few cases, reinforcing the scarcity of the disease in this country. To achieve a better comprehension on this subject we performed a search of articles on PubMed (from 1980 to 2014) using the MESH terms "Mycetoma", "Actinomycetoma", and "Eumycetoma" alone or in combination with "Brazil". During this period, 272 mycetoma cases were reported (Table 4). This number is smaller than that observed in Sudan and Mexico [8, 9, 10]. For instance, in Mexico, where 483 mycetoma cases were diagnosed at a single hospital during the same period [11]. In 2013, van de Sande et al. [1] estimated the prevalence of mycetoma cases in Mexico and the Sudan as 0.15 and 1.81 cases per 100,000 inhabitants, respectively, compared to the prevalence of less than 0.001 per 100,000 inhabitants in Brazil.

The predominance of eumycetoma in our study might not represent the real scenery of mycetoma in Brazil, as the Brazilian literature reveals a higher frequency of actinomycetoma (Table 4) [12, 13, 14, 15]. The involvement of male individuals above 30 years old with an acral location likely due to increased risk exposure during labour activity without safety equipment is in accordance with mycetoma characteristics [5, 16, 17].

Although eumycetoma and actinomycetoma share similar clinical aspects, we noted that eumycetoma cases usually tend to be more silent and chronic, while actinomycetoma cases were more inflammatory and painful. This fact may explain why patients with eumycetoma take longer to seek medical care.

We noted that six of our patients moved from the Northeast region of Brazil to the Rio de Janeiro state, in the Southeast region, probably attracted for job possibilities in a state with higher socio-economic index, higher urbanization of population and better health infrastructure. For this reason, we assume that, for these patients, the place where infection occurred was not in Rio de Janeiro.

Comorbidities are not associated to more severe or atypical forms of mycetoma and there are no changes in the course of mycetoma in the HIV infected patient [18, 19, 20]. Although it requires further investigation, pregnancy may be linked to more severe clinical course of mycetoma [21, 22, 23, 24] as in case 1 (Table 2) that developed severe bone destruction during pregnancy, resulting in amputation of the affected limb [25].

Table 4. Mycetoma cases in Brazil published during 1980–2014.

Reference	Year	Study	Classification	Number of cases	Etiologic agent	Region
[28]	1980	Clinical report + review	unknown	4	Unknow	Amazonas (North)
[49]*	1980	Clinical report	Eumycetoma	1	<i>Petriellidium boydii</i> (<i>Scedosporium apiospermum</i>)	-
[20]	1981	Clinical report	Eumycetoma	1	<i>Petriellidium boydii</i> (<i>Scedosporium apiospermum</i>)	Minas Gerais (Southeast)
[12]	1981	Retrospective (1944–1978)	■Eumycetoma ■Actinomycetoma	41 113	■Unknown (Histopathological aspects) ■**** Review (1916–1980): 26 cases	Unknow
[27]	1982	Clinical report	Actinomycetoma	6	<i>Nocardia</i> sp.	São Paulo (Southeast)
[39]*	1982	Clinical report	Eumycetoma	1	<i>Madurella grisea</i>	-
[35]	1984	Clinical report + review	Actinomycetoma	1	■ <i>Actinomyadura medusa</i> ■**** Review 10 cases	São Paulo (Southeast)
[74]	1986	Case series	Actinomycetoma	4	<i>Nocardia brasiliensis</i>	Rio Grande do Sul (South)
[75]	1988	Retrospective	Unknown	2	Unknown	Amazonas (North)
[46]	1988	Clinical report + review	Eumycetoma	1	■ <i>Acromonium falciforme</i> ■**** Review 6 cases	Bahia (Northeast)
[22]*	1988	Clinical report	Eumycetoma	1	<i>Exophiala jeikei</i>	-
[40]*	1989	Clinical report	Eumycetoma	1	<i>Madurella grisea</i>	-
[41]	1989	Clinical report	Eumycetoma	1	<i>Madurella grisea</i>	-
[76]	1990	Communication	Actinomycetoma	1	Unknown	Ceará (Northeast)
[42]	1991	Clinical report	Eumycetoma	1	<i>Madurella grisea</i>	Goiás (Midwest)
[77]*	1991	-	-	-	-	Goiás-Goiás (Midwest)
[13]	1992	Clinical report + review	Actinomycetoma	2	■ <i>Actinomyadura medusa</i> ■**** Review: Actinomycetoma 61 cases Eumycetoma 33 cases	Rio de Janeiro (Southeast) Pernambuco (Northeast)
[43]	1992	Clinical report	Eumycetoma	2	■ <i>Madurella grisea</i> ■**** Review 6 cases	Bahia (Northeast)
[33]	1993	Clinical report	Actinomycetoma	1	<i>Nocardia asteroides</i>	Rio de Janeiro (Southeast)
[14]	1993	Retrospective 1978–1989	■Eumycetoma ■Actinomycetoma	13 28	■ <i>Madurella grisea</i> —3 ■ <i>Scedosporium apiospermum</i> —2 ■ <i>Madurella mycetomatis</i> —1 ■Culture negative—7 ■ <i>Nocardia brasiliensis</i> —13 ■ <i>Actinomyadura medusa</i> —1 ■ <i>Actinomyadura pelletieri</i> —1 ■ <i>Nocardia asteroides</i> —1 ■Culture negative—12	Northeast Southeast South
[37]	1993	Clinical report	Eumycetoma	2	<i>Madurella mycetomatis</i>	Bahia and Paul (Northeast)
[26]	1994	Clinical report + review	Actinomycetoma	1	■ <i>Nocardia brasiliensis</i> ■**** Review: 1954–1990: 26 cases	Pará (North)
[28]	1995	Clinical report	Actinomycetoma	1	<i>Nocardia brasiliensis</i>	Minas Gerais (Southeast)
[18]	1999	Clinical report	Actinomycetoma	1	Unknown	São Paulo (Southeast)
[44]	1999	Clinical report	Eumycetoma	1	<i>Exophiala jeikei</i>	Rio Grande do Sul (South)
[47]	1999	Clinical report	Eumycetoma	1	<i>Acromonium kilense</i>	Bahia (Northeast)
[29]	1999	Clinical report	Eumycetoma	1	■ <i>Madurella grisea</i> ■**** Review 8 cases	Rio Grande do Sul (South)
[51]	2002	Clinical report	Eumycetoma	1	<i>Fusarium solani</i>	São Paulo (Southeast)
[29]	2004	Clinical report	Actinomycetoma	1	<i>Nocardia brasiliensis</i>	Minas Gerais (Southeast)

(Continued)

Table 4. (Continued)

Reference	Year	Study	Classification	Number of cases	Etiologic agent	Region
[45]	2004	Clinical report	Eumycetoma	1	■ <i>Madurella grisea</i> ■ **** Review 11 cases	Rondônia (North)
[30]	2007	Case series	Actinomycetoma	1	<i>Nocardia brasiliensis</i>	Rio Grande do Sul (South)
[15]	2008	Retrospective	■ Eumycetoma ■ Actinomycetoma	13/14	■ <i>Madurella mycetomatis</i> —3 ■ <i>Madurella grisea</i> —1 ■ <i>Acremonium kiliense</i> —1 ■ <i>Acremonium</i> sp.—1 ■ Culture negative—7 ■ <i>Nocardia brasiliensis</i> —3 ■ <i>Nocardia asteroides</i> —1 ■ <i>Streptomyces somaliensis</i> —1 ■ Culture negative—9	Southeast Northeast Southeast Northeast
[36]	2010	Clinical report	Actinomycetoma	1	<i>Actinomadura maduræ</i>	Parabá (Northeast)
[34]**	2010	Clinical report	Actinomycetoma	1	<i>Nocardia caviae</i> (<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>)	Minas Gerais (Southeast)
[31]	2011	Clinical report	Actinomycetoma	1	<i>Nocardia brasiliensis</i>	Northeast
[79]	2011	Clinical report	Eumycetoma	1	-	São Paulo (Southeast)
[93]	2011	Clinical report	Eumycetoma	1	<i>Exophiala jeanselmei</i>	Paraná (South)
[38]***	2013	Clinical report	Eumycetoma	1	<i>Madurella mycetomatis</i>	Ceará (Northeast)
[48]	2013	Clinical report + review	Eumycetoma	1	<i>Scedosporium apiospermum</i>	Rio Grande do Sul (Southeast)
[32]	2014	Clinical report	Actinomycetoma	1	<i>Nocardia brasiliensis</i>	São Paulo (Southeast)
[25]***	2014	Clinical report	Eumycetoma	1	<i>Madurella mycetomatis</i>	Rio de Janeiro (Southeast)

* Article with reference but not found.

** Article with doubt about the diagnostic proposed by the author because he has not reported the existence of grain.

*** Case report inside the study.

**** Review of the author.

doi:10.1371/journal.pntd.0005301.t004

The mycetoma agents identified in our study are consistent with previous reports. In the actinomycetoma group, *Nocardia* spp., particularly *N. brasiliensis*, predominated and in the eumycetoma group, *Scedosporium apiospermum*. From 1980 to 2014, the main bacterial agents identified in Brazil were *Nocardia brasiliensis* [15,26,27–32], *Nocardia asteroides* [15,33], *Nocardia caviae* [34], *Actinomadura maduræ* [13,35,36], *Actinomadura pelletieri* [14], and *Streptomyces somaliensis* [15]. For eumycetoma were *Madurella mycetomatis* [15,25,37,38], *Madurella grisea* [39–45], *Acremonium falciforme* [46], *Acremonium kiliense* [47], *Scedosporium apiospermum* [12,18,48,49,50], *Fusarium solani* [51], *Exophiala jeanselmei* [44,52,53] and *Aspergillus* sp. [12].

In our series of cases the diagnosis of mycetoma was made mainly by histopathological examination of affected tissues with visualization of the grains (approximately 91% of cases), while the isolation of the etiologic agent by culture was obtained in 66.6% of cases [15]. Implementation of molecular tools have recently demonstrated an improvement in the sensitivity and specificity in diagnosing mycetoma [16].

Radiography and ultrasonography were the most often used imaging because of their low cost and accessibility. Ultrasonography was crucial in identifying the presence of grains before diagnosis, during and after the therapeutic follow-up. Magnetic resonance imaging is the gold standard imaging method for mycetoma diagnosis and was important to delineate the involvement of internal structures and surgical planning [54]. CT scan was used if no bone involvement was detected by radiography.

Mycetoma treatment is challenging and usually requires long periods of drug therapy with or without surgical procedures (complete excision of the lesion, bone curettage, amputation) [1,5,8,10]. Itraconazole is the most common antifungal agent used for eumycetoma treatment [2]. Voriconazole and posaconazole have been indicated for refractory cases of mycetoma [58] primarily caused by *S. apiospermum* and *Acremonium* sp. [48,59–62]. They are expensive in underdeveloped countries and are not available in our institution. Isavuconazole and ravuconazole seem to be satisfactory against *M. mycetomatis* [63,64] but their effectiveness against other eumycetoma agents need to be investigated.

The first patient in this series of cases was evaluated in 1991, and because of this, the combination of drugs used was based on the available drugs at that time in our institution. The combined itraconazole/fluconazole, and itraconazole/terbinafine treatment in this study was chosen because of our good experience in treating extensive cutaneous lesions of chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* [55]. However, currently the itraconazole/fluconazole combination for mycetoma is not effective. Although liposomal amphotericin B are no longer recommended for first-line eumycetoma treatment, due to the high minimum inhibitory concentrations required for most eumycetoma agents [16,17,21,56,57], we tried to use only in one case due to clinical worsening during pregnancy, without success [25].

The recommended treatment for actinomycetoma is SMX/TMP as monotherapy or in combination with amikacin sulphate [10]. The association usually gives a cure rate above 90% [2, 65, 66]. Laboratory tests are required to assess possible adverse effects, as ototoxicity (cochlear lesions) and nephrotoxicity, which are permanent injuries, but are not progressive when treatment is suspended. In case 8 of Table 3 a combination with amikacin sulphate was used due to bone destruction. Amoxicillin and clavulanate are alternative drugs during pregnancy, for resistant cases or for patients with adverse effects from aminoglycoside [3]. Rifampicin can be used, but in Brazil it is reserved for tuberculosis and leprosy treatment, diseases with a high burden in our country. Minocycline and moxifloxacin are also treatment options for actinomycetoma [2, 67].

Surgery is indicated for small well localised lesions or in patients who are not responding to medical therapy or to reduce disease burden in massive lesions to allow a better response to medical therapy. [68]. Usually, actinomycetoma require less surgery management than eumycetoma [10]. Amputation are indicated for those patients with massive disease with no response to medical treatment or with massive bone destruction or in case with severe secondary bacterial infection not responding to medical treatment or with severe drug side-effects [3].

Although our institution has provided all antimicrobials necessary for the treatment free of cost to all patients, the cure rate in this study was low, which reflects the difficulties in treating this disease. Besides the inconvenience to take pills every day for a long period, the total cost of mycetoma treatment is unaffordable for people living in poor regions where the disease commonly occurs. We suggest that the low rate of cure in our study is multifactorial, including the delay to obtain a correct diagnosis, and the scarcity of specialized surgical services with knowledge about this disease that allow the management of the most advanced cases. The postponement of diagnosis favours the occurrence of severe cases that are refractory to the treatment due to the low bioavailability and efficiency of some drugs in advanced lesions. Some patients of our study took more than a year to obtain a correct diagnosis and initiate adequate treatment.

In our cases, treatment dropouts was high and they were likely related to delayed clinical responses and the prolonged treatment times. Recurrence was also frequent [56] and prevailed in patients that had undergone surgery, especially in the eumycetoma group [38]. The reasons are unknown, but may be likely due to the existence of undiagnosed subclinical lesions fungal

defence mechanisms against antifungal drugs or incomplete surgical procedures. It is interesting to note that in case 2 (Table 2), the patient was considered clinically cured, but presented recurrence at the eighth year of follow-up [38]. In this case, however, exogenous reinfection cannot be ruled out. We did not observe a relationship between recurrence and a specific etiologic agent.

In rarely cases, mycetoma can spread along the lymphatics to the regional lymph node [6,68]. Few blood-spread mycetoma cases [7,16,69,70,71,72] and deaths related to the infection were reported [4,9,70], but they were not observed in our study.

Although with few cases, this study, highlights the wide spectrum of clinical manifestations of mycetoma, such as localized lesions, bone disease, worsening with pregnancy, recurrence and amputation cases. We also emphasize the challenges to treat and control this neglected disease. The accurate management of each case requires multiple experts including clinicians, surgeons, microbiologists, radiologists working together to assess the best therapeutic approach, which includes a prolonged treatment followed by a long follow up after achieving clinical cure. Rehabilitation is necessary in cases of deformity and amputation, unacceptable sequelae in the 21st century.

Acknowledgments

We are thankful for Marcel de Souza Borges Quintana, who helped during the statistic conclusions.

Author Contributions

Conceptualization: FMSS MCGG ACFdV.

Data curation: FMSS.

Formal analysis: FMSS MRL.

Investigation: FMSS MCGG ACFdV.

Methodology: FMSS MCGG ACFdV.

Project administration: FMSS.

Resources: MCdSL JMCdOC RdAP.

Software: FMSS MCGG ACFdV.

Supervision: BW.

Validation: FMSS BW DRSE.

Visualization: FMSS.

Writing – original draft: FMSS MCGG ACFdV.

Writing – review & editing: BW.

References

1. van de Sande WW. Global burden of human mycetoma: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013 Nov 7; 7(11): e2550. doi: [10.1371/journal.pntd.0002550](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002550) PMID: [24244780](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24244780/)
2. Welsh O, Al-Abdely HM, Salinas-Carmona MC, Fahal AH. Mycetoma Medical Therapy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Oct 16; 8(10): e3218. doi: [10.1371/journal.pntd.0003218](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003218) PMID: [25330342](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25330342/)
3. Zain HA, Fahal AH, Mahgoub el S, El Hassan TA, Abdel-Rahman ME. Predictors of cure, amputation and follow-up dropout among patients with mycetoma seen at the Mycetoma Research Centre,

- University of Khartoum, Sudan. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012; 106(11): 639–644. doi: [10.1016/j.trstmh.2012.07.003](https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.07.003) PMID: [22854685](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22854685/)
4. Mohamed NA, Fahal AH. Mycetoma pulmonary secondaries from a gluteal eumycetoma: an unusual presentation. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 6; 10(10): e0004945. doi: [10.1371/journal.pntd.0004945](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004945) PMID: [27711109](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27711109/)
 5. Fahal AH. Review Mycetoma. *Khartoum Medical Journal.* 2011; 4(1): 514–523.
 6. Freitas DF, Valle AC, da Silva MB, Campos DP, Lyra MR, de Souza RV, Veloso VG, Zancopé-Oliveira RM, Bastos FI, Galhardo MC. Sporotrichosis: an emerging neglected opportunistic infection in HIV-infected patients in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014 Aug 28; 8(8): e0110. doi: [10.1371/journal.pntd.0003110](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003110) PMID: [25166475](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25166475/)
 7. Queiroz-Teles F, Nucci M, Colombo AL, Tobón A, Restrepo A. Mycoses of implantation in Latin America: an overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Med Mycol.* 2011; 49(3): 225–236. doi: [10.3109/13693786.2010.539631](https://doi.org/10.3109/13693786.2010.539631) PMID: [21128710](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21128710/)
 8. Fahal A, Mahgoub el S, El Hassan AM, Abdel-Rahman ME, Alshambaty Y, Hashim A, Hago A, Zijstra EE. A new model for management of mycetoma in the Sudan. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 30; 8(10): e3271. doi: [10.1371/journal.pntd.0003271](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003271) PMID: [25356640](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25356640/)
 9. López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ, Bonifaz A, Arenas R, Mayorga J et al. Update on the epidemiology of mycetoma in Mexico. A review of 3933 cases. *Gac Med Mex.* 2013; 149(5):586–92.
 10. Zijstra E. E., Van De Sande Wendy W J, Welsh O., Mahgoub E. S., Goodfellow M., & Fahal A. H. Mycetoma: A unique neglected tropical disease. *The Lancet Infectious Diseases.* 2016; 16(1), 100–112. doi: [10.1016/S1473-3099\(15\)00359-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00359-X) PMID: [26738840](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26738840/)
 11. Bonifaz A, Tirado-Sánchez A, Calderón L, Saúl A, Anziza J, Hernández M, González GM, Ponce RM. Mycetoma: experience of 482 cases in a single center in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014 Aug 21; 8(8): e01102. doi: [10.1371/journal.pntd.0003102](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003102) PMID: [25144462](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25144462/)
 12. Lacaz CS. Distribuição geográfica dos micetomas no Brasil. *An Bras Dermatol.* 1981; 56: 167–172.
 13. Wanke NC, Wanke B, Caiuby MJ, Towersay L, Londero AT, Dias MF, Siqueira SP. Mycetoma due to *Actinomyces madurae*. A report of 2 cases. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1992; 34(4): 367–372. PMID: [1342098](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1342098/)
 14. Castro LG, Belda W Junior, Salebian A, Cucó LC. Mycetoma: a retrospective study of 41 cases seen in São Paulo, Brazil, from 1978 to 1989. *Mycoses.* 1993; 36: 89–95. PMID: [8366891](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8366891/)
 15. Castro LG, Piquero-Casas J. Clinical and mycologic findings and therapeutic outcome of 27 mycetoma patients from São Paulo, Brazil. *Int J Dermatol.* 2008; 47(2): 160–163. doi: [10.1111/j.1365-4632.2008.03447.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2008.03447.x) PMID: [18211487](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18211487/)
 16. Ahmed AO, van Leeuwen W, Fahal A, van de Sande W, Verbrugh H, van Belkum A. Mycetoma caused by *Maduraea mycetomatis*: a neglected infectious burden. *Lancet Infect Dis.* 2004; 4(9): 566–574. doi: [10.1016/S1473-3099\(04\)01131-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)01131-4) PMID: [15336224](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15336224/)
 17. Estrada R, Chávez-López G, Estrada-Chávez G, López-Martínez R, Welsh O. Eumycetoma. *Clin Dermatol.* 2012; 30(4): 389–396. doi: [10.1016/j.clinidermatol.2011.09.003](https://doi.org/10.1016/j.clinidermatol.2011.09.003) PMID: [22682188](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22682188/)
 18. Castro LG, Valente NY, Germano JA, Vaccari EM, da Silva Lacaz C. Mycetoma in an HIV-infected patient. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo.* 1999; 54(5): 169–171. PMID: [10788840](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10788840/)
 19. Greenberg AK, Knapp J, Rom WN, Addrizzo-Harris DJ. Clinical presentation of pulmonary mycetoma in HIV-infected patients. *Chest.* 2002; 122(3): 886–892. PMID: [12226028](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12226028/)
 20. Gibson JN, Fulco PP. Concurrent atazanavir and voriconazole in a patient with multidrug-resistant HIV and a mycetoma. *AIDS.* 2011; 23; 25(16): 2054–2056. doi: [10.1097/QAD.0b013e328346abc9](https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328346abc9) PMID: [21987893](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21987893/)
 21. Moudgal VV, Sobel JD. Antifungal drugs in pregnancy: a review. *Expert Opin Drug Saf.* 2003; 2(5): 475–483. doi: [10.1517/14740338.2.5.475](https://doi.org/10.1517/14740338.2.5.475) PMID: [12946248](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12946248/)
 22. Lamont HF, Blogg HJ, Lamont RF. Safety of antimicrobial treatment during pregnancy: a current review of resistance, immunomodulation and teratogenicity. *Expert Opin Drug Saf.* 2014; 5: 1–13.
 23. Butler DC, Heller MM, Murase JE. Safety of dermatologic medications in pregnancy and lactation: Part II. Lactation. *J Am Acad Dermatol.* 2014; 70(3): 417.e1–10; quiz 427. doi: [10.1016/j.jaad.2013.09.009](https://doi.org/10.1016/j.jaad.2013.09.009) PMID: [24528912](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24528912/)
 24. Murase JE, Heller MM, Butler DC. Safety of dermatologic medications in pregnancy and lactation: Part I. Pregnancy. *J Am Acad Dermatol.* 2014; 70(3): 401.e1–14; quiz 415. doi: [10.1016/j.jaad.2013.09.010](https://doi.org/10.1016/j.jaad.2013.09.010) PMID: [24528911](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24528911/)
 25. Sampaio FM, Gufierrez Galhardo MC, De Farias Cardoso R, de Oliveira Coelho JM, Rosandiski Lyra M, Francoconi do Valle AC. Eumycetoma on the Foot Caused by *Maduraea mycetomatis*: Amputation After Significant Worsening During Pregnancy. *Acta Derm Venereol.* 2014 Sep 2.

26. Silva DB, Macedo C. Micetoma por *Nocardia brasiliensis*. *An Bras Dermatol*. 1994; 69(6): 485–487.
27. Mello Filho A, Proença NG, Rosa IP, Pereira WA. Mycetoma due to *Nocardia brasiliensis*: Re-evaluation twelve years after clinical cure. *An bras dermatol*. 1982; 57(4): 215–218.
28. Buihan AC Jr, Sena A-Z, Loidia ALP, Avelar JGL, Mattedi MGS, Vitória LC. Podalic mycetoma for *Nocardia brasiliensis*: a case report. *An Bras Dermatol*. 1995; 70(5): 447–449.
29. Moffa FL, Vilela RV, Lambertucci JR. Actinomycetoma caused by *Nocardia brasiliensis*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2004; 37(3): 287–288. PMID: [15330073](#)
30. Chedid MB, Chedid MF, Porto NS, Severo CB, Severo LC. Nocardial infections: report of 22 cases. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2007; 49(4): 239–246. PMID: [17823754](#)
31. Cordeiro F, Bruno C, Reis C. Mycetoma. *Am J Trop Med Hyg*. 2011; 85(5):791. doi: [10.4269/ajtmh.2011.10-0637](#) PMID: [22049027](#)
32. Sousa JM, Wachholz PA, Sette CS, Marques GF, Barreto JA. Mycetoma caused by *Nocardia brasiliensis* in an immunocompetent patient. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2014; 12(10): 903–905. doi: [10.1111/ddg.12331](#) PMID: [25136693](#)
33. Saraça GD, Towersey L, Hay RJ, Londero AT, Martins Ede C, Amora AT, Reis KM, Mendonça AM, Estrela RR. Mycetoma by *Nocardia asteroides*: a 9 year follow-up. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1993; 35(2): 199–204. PMID: [8284606](#)
34. Magalhães GM, Oliveira SC, Soares AC, Machado-Pinto J, de Resende MA. Mycetoma caused by *Nocardia caviae* in the first Brazilian patient. *Int J Dermatol*. 2010; 49(1): 56–58. doi: [10.1111/11365-4632.2009.04263.x](#) PMID: [20488613](#)
35. Lacaz CS, da Silva JG, Sabba LMB, de Melo NT, Heins-Vaccari EM, Calvis LA, Santos IO. Actinomycetoma por *Actinomyces madurae* com extensas lesões ósseas. *An Bras Dermatol*. 1984; 59(5): 244–248.
36. Dresch TF, de Magalhães TC, Piñeiro-Macoina J, Akli T, Ramos-e-Silva M. Combined therapy for mycetoma: medical and surgical. *Dermatol Surg*. 2010; 36(8): 952–954. doi: [10.1111/1524-4725.2009.01418.x](#) PMID: [20039916](#)
37. Levites J, Aolchome AOA, Gompertz OF. Fistulografia e cintilografia no estadiamento dos micetomas por *Madurella mycetomatis*. *An Bras Dermatol*. 1993; 68(4): 233–237.
38. Sampaio FM, Galhardo MC, Quintella LP, Souza PR, Coelho JM, Valle AC. Eumycetoma by *Madurella mycetomatis* with 30 years of evolution: therapeutic challenge. *An Bras Dermatol*. 2013; 88(6 Suppl 1): 82–84. doi: [10.1590/ab.d1806-4841.20132136](#) PMID: [24346887](#)
39. Heins-Vaccari EM, Takahashi N, Oliveira NRB, Lacaz CS, Porto E. Eumycetoma de grão preto por *Madurella grisea*. Registro de um caso. *Rev Inst Trop S Paulo*. 1982; 29: 116–123.
40. Arruda Neto E, Pignatari ACC, Castello Filho A, Colombo AL, Longo JC, Camargo ZP. Eumycetoma mycetoma. Report of a case caused by *Madurella grisea*. *Rev microbiol (S Paulo)*. 1989; 20: 485–500.
41. Belda W Junior, Cueli LC, Dias MC, Lacaz CS. Eumycetoma de grãos pretos por *Madurella grisea*. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 1989; 31: 195–199.
42. Silva MRR, Fernandes OFL, Oliveira LM, Costa MB, Castro LC. Eumycetoma por *Madurella grisea*. Relato de Caso. *Rev soc bras med trop*. 1991; 24: 51–54.
43. Machado LAP, Rivitti MCM, Cueli LC, Salebian A, Lacaz CS, Heins-Vaccari EM, Belda W Junior, Takahashi N. Eumycetoma de grãos pretos por *Madurella grisea*. Registro de dois casos. *Rev Inst med trop São Paulo*. 1992; 34(6): 569–580.
44. Severo LC, Oliveira FM, Vettorato G, Londero AT. Mycetoma caused by *Exophiala jeikei* sp. Report of a case successfully treated with itraconazole and review of the literature. *Rev Iberoam Micol*. 1999; 16(1): 57–59. PMID: [18473696](#)
45. Vilela R, Duarte OM, Rosa CA, Castro JG, Lyon S, Motta RL, Moura AC. A case of eumycetoma due to *Madurella grisea* in northern Brazil. *Mycopathologia*. 2004; 158(4): 415–418. doi: [10.1007/s11046-004-2844-y](#) PMID: [15630550](#)
46. Zaitz C, Lacaz CS, Salebian A, Ruiz LR, Heins-Vaccari EM, de Melo NT. Eumycetoma podal por *Acremonium falciforme*. Registro de um caso. *An Bras Dermatol*. 1988; 63(5): 413–418.
47. Lacaz CS, Pereira AD, Castro LGM, Nunes RS, Heins-Vaccari EM, de Freitas RS, Anigada GLH. Eumycetoma podal por *Acremonium kilianii*: registro de um caso. *An bras dermatol*. 1999; 74(6): 591–595.
48. Oliveira FM, Unis G, Hochhegger B, Severo LC. *Scedosporium apiospermum* eumycetoma successfully treated with oral voriconazole: report of a case and review of the Brazilian reports on scedosporiosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2013; 55(2): 121–123. PMID: [23563766](#)
49. da Rocha OM, Lacaz Cda S, Porto E, Heins EM, Schaif S, Hirose-Pastor E, Cossermel W. Articular mycetoma caused by *Petridium boydii*. Report of a case. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1980; 22(1): 24–29. PMID: [7192011](#)

50. Puchio A, Gambale W, Paula CR, Yamamura I, Cavalcante ASB. Mycetoma of the arm by *Petrellidium boydii*. A case report. *an bras dermatol*. 1981; 56(4): 281–284.
51. Tomimori-Yamashita J, Ogawa MM, Hirata SH, Fischman O, Michalany NS, Yamashita HK, Alchome M. Mycetoma caused by *Fusarium solani* with osteolytic lesions on the hand: case report. *Mycopathologia*. 2002; 153(1): 11–14. PMID: [11913759](#)
52. Queiroz Telles Filho F, Queiroz Telles JE. Exophiala jeanselmei mycetoma: a clinico-pathological and ultrastructural study of one case. *Rev Iber Micol*. 1988; 5(suppl 1): S98.
53. Hoffmann Cde C, Danucalov IP, Putim KS, Queiroz-Telles F. Infections caused by dematiaceous fungi and their anatomoclinical correlations. *An Bras Dermatol*. 2011; 86(1): 138–141. PMID: [21437537](#)
54. van de Sande WW, Maghoub el S, Fahal AH, Goodfellow M, Welsh O, Zijlstra E. The mycetoma knowledge gap: identification of research priorities. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 27; 8(3): e2667. doi: [10.1371/journal.pntd.0002667](#) PMID: [24675533](#)
55. Mouchatouf M de F, Gutierrez Galhardo MC, Zancopé-Oliveira RM et al. Chromoblastomycosis: a clinical and molecular study of 18 cases in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Dermatol*. 2011 Aug; 50(8): 981–986. doi: [10.1111/j.1365-4632.2010.04729.x](#) PMID: [21781072](#)
56. Venkateswami S, Sankarasubramanian A, Subramanyam S. The madura foot: looking deep. *Int J Low Extrem Wounds*. 2012; 11(1):31–42. doi: [10.1177/1534734612438549](#) PMID: [22334597](#)
57. Van Belkum A, Fahal AH, van de Sande WW. In vitro susceptibility of *Madurella mycetomatis* to posaconazole and terbinafine. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55(4): 1771–1773. doi: [10.1128/AAC.01045-10](#) PMID: [21283090](#)
58. Paugam A. The latest data on posaconazole. *Med Mal Infect*. 2007 Feb; 37(2):71–76. doi: [10.1016/j.medmal.2006.11.002](#) PMID: [17267154](#)
59. Porte L, Khatibi S, Hajj LE, Cassaing S, Bery A, Massip P, Linas MD, Magnaval JF, Sans N, Marchou B. *Scedosporium apiospermum* mycetoma with bone involvement successfully treated with voriconazole. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2006; 100(9): 891–894. doi: [10.1016/j.trstmh.2005.12.010](#) PMID: [16714039](#)
60. Keynan Y, Sprecher H, Weber G. *Acromonium* vertebral osteomyelitis: molecular diagnosis and response to voriconazole. *Clin Infect Dis*. 2007; 1; 45(1): e5–6. doi: [10.1093/cid/cni000](#) PMID: [17554690](#)
61. Herbrecht R, Letscher-Bru V, Fohrer C, Campos F, Natarajan-Ame S, Zamfir A, Waller J. *Acromonium* strictum pulmonary infection in a leukemic patient successfully treated with posaconazole after failure of amphotericin B. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2002; 21(11): 814–817. doi: [10.1007/s10096-002-0828-8](#) PMID: [12461692](#)
62. Fernández-Siva F, Capilla J, Mayayo E, Sutton DA, Hernández P, Guarro J. Evaluation of the efficacy of Amphotericin B, Posaconazole, Voriconazole, and Anidulafungin in a murine disseminated infection by the emerging opportunistic Fungus *Sarcodinium* (*Acromonium*) *kiliense*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(12): 6265–6269. doi: [10.1128/AAC.01484-13](#) PMID: [24100490](#)
63. Kloezen W, Meis Jacques F, Curfs-Breuker Ise et al. In Vitro Antifungal Activity of Isovucanazole against *Madurella mycetomatis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56(11): 6054–6056. doi: [10.1128/AAC.01170-12](#) PMID: [22984246](#)
64. Ahmed SA, Kloezen W, Duncanson F, Zijlstra EE, de Hoog GS, Fahal AH, van de Sande WW. *Madurella mycetomatis* is highly susceptible to ravuconazole. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 19; 8(6): e2942. doi: [10.1371/journal.pntd.0002942](#) PMID: [24945848](#)
65. Welsh O, Saucedá E, Gonzalez J, Ocampo J. Amikacin alone and in combination with trimethoprim-sulfamethoxazole in the treatment of actinomycotic mycetoma. *J Am Acad Dermatol*. 1987; 17(3): 443–448. PMID: [3308980](#)
66. Gomez-Flores A, Welsh O, Said-Fernández S, Lozano-Garza G, Tavaréz-Alejandro RE, Vera-Cabrera L. In vitro and in vivo activities of antimicrobials against *Nocardia brasiliensis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48(3): 832–837. doi: [10.1128/AAC.48.3.832-837.2004](#) PMID: [14982772](#)
67. Antunes J, Pacheco D, Travassos R, Sequeira H, Filipe P, Marques MS. Actinomycetoma of the chest wall attributed to *Nocardia nova* after reconstructive surgery. *Dermatol Online J*. 2012; 15; 18(1): 4. PMID: [22331041](#)
68. Suleiman SH, Wadaifa el S, Fahal AH. The Surgical Treatment of Mycetoma. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 23; 10(6):e0004690. doi: [10.1371/journal.pntd.0004690](#) PMID: [27336736](#)
69. Fahal AH. Mycetoma thorn on the flesh. Review article. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2004; 98(1)3–11. PMID: [14702833](#)
70. Ahmed AA, van de Sande WW, Fahal A, Bakker-Woudenberg I, Verbrugh H et al. Management of mycetoma: major challenge in tropical mycoses with limited international recognition. *Curr Opin Infect Dis*. 2007; 20(2):146–51. doi: [10.1097/QCO.0b013e31803438f6](#) PMID: [17496572](#)

71. Mohamed el SW, Saif El Din N, Fahal AH. Multiple Mycetoma Lung Secondaries from Knee Eumycetoma: An Unusual Complication. *Plos Negl Trop Dis*. 2016; 21; 10(7): e0004735. doi: [10.1371/journal.pntd.0004735](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004735) PMID: [27442612](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27442612/)
72. Arbab MA, el Hag IA, Abdul Gadir AF, Siddik H el-R. Intra-spinal mycetoma: report of two cases. *Am J Trop Med Hyg*. 1997; 56(1):27–29. PMID: [9063396](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9063396/)
73. Talhari Sinésio, Gadelha Acidarta Dos Reis, Cunha Maria Da Graça Souza, Fernandes Gilberto, Paes Marcolene Gomes et al. Deep mycosis in Amazonia—Study of diagnosed cases in Manaus—Amazon as State, from 1973 to 1978. *An Bras Dermatol*. 1980; 55(3): 133–136.
74. Londero AT, Ramos CD, Matte SW. Micetomas actinomicóticos no Rio Grande do Sul: relato de quatro casos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1988; 81(1): 73–77
75. Talhari S, Cunha MG, Schettini AP, Talhari AC. Deep mycoses in Amazon region. 1988; 27(7): 481–484.
76. Mapurunga ACP, Gonçalves HMG, Silva JB, Cabral SESX, Diógenes MJN. Micoses profundas no Ceará. Estudo dos casos diagnosticados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Ceará (1983 a 1988). *An bras dermatol*. 1990; 65(3): 117–118.
77. Silva MRR, Fernandes OFL, Silva HM. Agentes etiológicos de micetoma ocorridos em Goiânia-Goiás. *Rev microbiol(S Paulo)*. 1991; 22:39–41.
78. Severo LC, Vetratto G, Oliveira Fde M, Londero AT. Eumycetoma by *Madurella grisea*: Report of the first case observed in the southern Brazilian region. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1999; 41(2): 139–142. PMID: [10413963](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10413963/)
79. Nai GA, Stuan ML, Stuan LA. Oral cavity eumycetoma. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2011; 53(3): 165–168. PMID: [21755239](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21755239/)

8 DISCUSSÃO

Os achados histopatológicos observados ao H&E mostraram um padrão inflamatório semelhante nas lesões nos eumicetomas e actinomicetomas. A reação inflamatória encontrada foi específica, de padrão granulomatoso, comprometendo principalmente a derme reticular e a hipoderme, composta principalmente por granulomas bem formados e supurativos na maioria das amostras.

Os granulomas supurativos apresentaram microabscessos centrais, em meio à necrose e debris celulares. Achados semelhantes foram descritos por Chandler, Kaplan e Ajello (1980) e Welsh, Vera-Cabrera e Salinas-Carmona (2007). Kiran et al. (2009), relataram granulomas supurativos compostos por histiócitos e neutrófilos nos micetomas. Porém, observamos ainda, granulomas tipo corpo estranho, epitelióide, e intersticial ainda que em número menor de casos, configurando resposta inflamatória aos agentes microbianos.

As alterações epidérmicas encontradas como acantose, hiperkeratose, parakeratose, espongiose, exocitose e ulceração, provavelmente são secundárias ao envolvimento dérmico pelo processo inflamatório. A acantose foi observada nos dois grupos de micetomas com distribuição difusa ou restrita a uma área da lesão, com alongamento dos cones interpilares, acompanhada ou não de hiperkeratose e parakeratose. Porém, acantose sob a forma de hiperplasia pseudo-epiteliomatosa foi encontrada em dois casos (um de eumicetoma e um de actinomicetoma). Achados referentes à hiperplasia pseudo epiteliomatosa nos micetomas, também foram observados por Estrada et al. (2012). A descrição dos demais achados epidérmicos acima relatados não foi encontrada na literatura.

A exocitose é atribuída por autores como Farmer e Hood (2000) como uma das alterações epidérmicas relacionadas aos processos inflamatórios da pele. Estes achados nos eumicetomas e actinomicetomas, embora previsíveis, não possuem relatos de sua frequência na literatura.

Ulceração e eliminação de grãos foram vistos em dois casos (um de actinomicetoma e um de eumicetoma) com o encontro dos grãos na derme papilar e epiderme, corroborando para relatos clínicos descritos na literatura de saída espontânea de grãos através dos trajetos fistulosos (DO VALLE; WELSH; VERA-CABRERA, 2006).

A derme revelou em todos os casos um processo inflamatório misto com

componentes celulares mononucleares e polimorfonucleares distribuídos irregularmente, indicativos dos fenótipos CD4⁺, CD8⁺ e CD68⁺ vistos nos estudos imuno-histoquímicos. Os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ foram identificados na periferia dos granulomas e mais periféricamente aos histiócitos presentes nos granulomas. A derme reticular média e profunda encontrou-se invariavelmente comprometida com exuberante infiltrado inflamatório composto por linfócitos, histiócitos, plasmócitos, neutrófilos, eosinófilos e células gigantes multinucleadas, semelhante aos achados da literatura (WELSH; VERA-CABRERA; SALINAS-CARMONA, 2007; SAMPAIO et al., 2015).

A derme papilar apresentou na maioria dos casos, um infiltrado inflamatório discreto perivascular composto principalmente por linfócitos, plasmócitos e alguns neutrófilos e histiócitos, semelhante ao observado em processos inflamatórios inespecíficos. Nos actinomicetomas observamos infiltrados inflamatórios mais exuberantes nesta localização, indicativos de comprometimento mais superficial da derme pelo processo inflamatório, se comparado aos achados das amostras dos eumicetomas, onde o comprometimento foi mais profundo, envolvendo derme reticular e hipoderme.

A descrição da localização das células inflamatórias observadas, bem como a sua localização microscópica na pele e tecido celular subcutâneo contribui para um melhor entendimento do processo inflamatório nos micetomas e conseqüentemente proporciona uma melhor acurácia no diagnóstico histopatológico. Portanto, biópsias superficiais de lesões de micetomas, onde não há a representação da área principal de inflamação, caracterizada pelos granulomas e presença de grãos comprometem a acurácia do diagnóstico histopatológico definitivo de micetoma. Nestas situações, diagnósticos de processos inflamatórios inespecíficos poderiam ser atribuídos às biópsias, o que levariam a novos procedimentos de retiradas de amostra para exames histopatológicos, retardo no diagnóstico e tratamento adequado. É fundamental enfatizar a importância de obtenção de amostras para estudo histopatológico com representação substancial da derme e hipoderme em biópsias de nódulos cutâneos e subcutâneos na investigação diagnóstica de micetomas.

Os linfócitos, histiócitos e plasmócitos são numerosos nas lesões. Os neutrófilos foram observados dispostos difusamente ou organizados sob a forma de microabscessos. Estes últimos, dispostos no interior dos granulomas ou ao redor dos grãos. Neutrófilos puderam ser vistos ainda, no interior de vasos e permeando a

parede dos mesmos. Quando havia a presença de trajeto fistuloso ou ulceração, o infiltrado inflamatório tornou-se significativamente exuberante nesta topografia, podendo ser vistos granulomas e grãos dos microrganismos. Tais achados são indicativos de que as áreas de maior reação inflamatória e sinais de flogose, parecem ser as mais prováveis do encontro dos grãos e devem ser preferencialmente as escolhidas como local de biópsias para o diagnóstico dos micetomas.

Os macrófagos constituíram a população de células inflamatórias mais proeminentes nos micetomas, em especial nos eumicetomas. Foram observadas ainda, histiócitos com diferenciação para células epitelioides, células gigantes multinucleadas do tipo Langhans e do tipo corpo estranho, em meio ao processo inflamatório. Histiócitos xantomatosos com amplo citoplasma claro foram observados na periferia dos granulomas. Células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho foram mais frequentemente observadas em relação às do tipo Langhans nos nossos casos, e encontradas em maior número nos eumicetomas, quando comparados aos actinomicetomas. Geralmente as células gigantes tipo corpo estranho são mais frequentemente encontradas em processos inflamatórios de natureza fúngica, enquanto as células gigantes do tipo Langhans são descritas nas micobacterioses, em especial na tuberculose. Não encontramos na literatura trabalhos com descrição quantitativa da população de células gigantes nos micetomas.

Nosso estudo identificou granulomas contendo ou não grãos no seu interior, na maioria dos casos com padrões do tipo corpo estranho e supurativo. Chamou a atenção que granulomas com padrão sarcóide e tuberculóide, encontrados em outros tipos de processos granulomatosos, não foram observados em nosso estudo.

Necrose no interior dos granulomas foi vista, e os padrões fibrinoide (com aspecto hialino e amorfo) e liquefativo (com grande número de neutrófilos e restos celulares) foram os mais frequentemente observados, decorrentes da morte celular e destruição de microrganismos. Necrose caseosa não foi observada em nenhuma de nossas amostras. Não encontramos na revisão da literatura uma descrição morfológica detalhada dos tipos de granulomas e necrose possíveis de serem encontrados nos micetomas e sua distribuição nas lesões.

A fibrose, localizada na derme, foi observada em 100% dos casos de actinomicetomas e em 95% dos eumicetomas. Observamos que a fibrose cicatricial foi vista mesmo na vigência de grãos nas lesões, promovendo a distorção do colágeno dérmico e a hialinização da derme na H&E. A fibrose encontrava-se

distribuída difusamente na derme e/ou ao redor dos granulomas e grãos; melhor visualizada pela técnica de tricrômico de Gomori. A presença da fibrose nas lesões pode ser um fator indicativo da perpetuação dos agentes infecciosos nas lesões e mecanismo de proteção aos grãos de microrganismos dos agentes antimicrobianos. Achados citando a fibrose em micetomas são vistos na literatura nos eumicetomas e actinomicetomas, como por exemplo, os descritos por Welsh; Vera-Cabrera; Salinas-Carmona (2007); Ibrahim et al. (2013) e Severo e Graudenz (2015), porém não encontramos estudos quantitativos nas lesões.

A hipoderme quando exposta na amostra e não comprometida pela lesão revelou infiltrado inflamatório misto discreto e traves fibróticas delgadas. Tais achados foram vistos nos casos de actinomicetomas. Este achado pode ser atribuído ao fato dos processos inflamatórios presentes nestas amostras, se localizarem preferencialmente na derme, decorrendo em processos reparativos e cicatriciais (fibrose) nesta mesma localização.

Em nosso estudo encontramos grãos dispostos principalmente na derme reticular média e profunda, e tecido celular subcutâneo, porém foi possível identificá-los na derme superior e em meio à camada córnea e subcórnea, nos casos em que foi possível surpreender histologicamente a eliminação de grãos (dois casos). Achados semelhantes foram descritos por Nenoff et al. (2015).

A identificação de grãos fúngicos e actinomicóticos foi baseada nas características histológicas dos grãos ao H&E como tamanho, forma e presença ou não de pigmentação, e contribuíram para a indicação do provável agente etiológico e permitiram a diferenciação entre eumicetomas e actinomicetomas, conforme já descrito na literatura por Londero et al. (2002); Welsh; Vera-Cabrera; Salinas-Carmona (2007); Ibrahim et al. (2013) e Severo e Graudenz (2015).

A presença de material radiado e hialino ao H&E, conhecido como fenômeno de Splendore-Hoeppli, foi identificada na periferia dos grãos com formação de cimento e observado nos eumicetomas e actinomicetomas, e pode ser atribuída a depósito de debris celulares e imunoglobulinas (RODIG; DORFMAN, 2001). Tal achado foi citado nos micetomas por Chandler; Kaplan; Ajello (1980).

Os microrganismos fúngicos foram melhor visualizados pela microscopia óptica quando corados por colorações especiais pelo método de PAS e Prata metenemina de Grocott, podendo facilmente se identificar as estruturas fúngicas, na maioria sob a formas de hifas ramificadas, e negativos pelas colorações de Gram e Wade.

Os elementos bacterianos filamentosos foram positivamente corados pelo Wade, Gram Brown-Brenn e Grocott com morfologia delicada e delgados filamentos alongados. A positividade pelo Wade revelou fraca álcool-ácido resistência dos filamentos bacterianos, o que permitiu a afirmação do gênero *Nocardia*. Achados semelhantes foram relatados por Samaila e Abdullahi (2011) e Severo e Graudenz (2015).

O presente estudo procura consubstanciar as descrições histopatológicas encontradas na literatura ressaltando o valor do exame histopatológico como instrumento diagnóstico nos micetomas. O exame histopatológico possui algumas vantagens em relação à métodos diagnósticos, como demandar menos tempo que os exames microbiológicos, além da facilidade de armazenamento e transporte das amostras. Vale ressaltar que amostras emblocadas em parafina, quando adequadamente armazenadas, permanecem indefinidamente disponíveis para novos estudos histopatológicos, imuno-histoquímicos e moleculares, se necessário.

O estudo imuno-histoquímico identificou linfócitos com fenótipo CD4⁺, CD8⁺ e células CD68⁺, localizados em maior número na derme e hipoderme, e por vezes na epiderme, determinando a presença dessas células na resposta inflamatória dos micetomas. Achados semelhantes foram descritos por Guimarães, Castro e Sotto (2003), que reportaram a população de linfócitos T nas reações teciduais cutâneas de micetomas com a presença de fenótipos CD4⁺ e CD8⁺. Em nosso estudo a quantificação realizada pelo método de contagem celular, identificou estas duas populações de células e revelou maior participação de linfócitos CD8⁺ em relação aos linfócitos CD4⁺ nos actinomicetomas e eumicetomas. No entanto, houve um predomínio de células CD68⁺ nos dois grupos, com uma maior presença deste fenótipo nos eumicetomas.

Nossos achados com relação aos fenótipos de células linfoides CD4⁺, CD8⁺ e CD68⁺ identificados nos micetomas são similares aos descritos anteriormente nas respostas imunes em micetomas causados por *S. somaliensis* com técnicas de imuno-histoquímica com o uso de anticorpos anti-CD15⁺, CD3⁺, CD20⁺ e células com fenótipo CD68⁺, demonstrando a participação de populações de linfócitos, neutrófilos e macrófagos nas lesões (EL-HASSAN et al., 2001).

Os linfócitos foram observados localizados principalmente na periferia dos granulomas e ainda, dispostos ao redor de vasos. A disposição perivascular teve um predomínio dos linfócitos T CD8⁺, cuja descrição não encontramos na literatura. A

presença de linfócitos perivasculares poderia ser atribuída ao recrutamento dos linfócitos aos locais de inflamação, a partir da população de monócitos circulantes.

Recentemente, foi atribuído às células T CD4⁺ e CD8⁺ a participação nas respostas inflamatórias de algumas infecções fúngicas e descrito a capacidade destas células em destruir leveduras de alguns fungos como de *Cryptococcus neoformans* e *Histoplasma capsulatum*. Outros estudos referentes a mecanismos de respostas imunológicas relacionados à leishmaniose tegumentar americana também citam o papel de células Th1 CD4⁺ e modulação pelo IFN- γ (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015, cap. 16, p.347-353). Papel semelhante no combate aos elementos microbianos pode ser atribuído a estas células nos micetomas.

Nosso estudo detectou antígenos para citocinas IL-17, IL-10 e IL-12 com padrão granular citoplasmático em células inflamatórias como linfócitos, neutrófilos e macrófagos e com disposição extracelular nas lesões teciduais dos actinomicetomas e eumicetomas.

Estudos anteriores também identificaram a presença de IL-10 e IL-12 em lesões por algumas cepas de *Cryptococcus neoformans*, demonstrando a inibição da produção de citocinas como o TNF- α e a IL-12 por macrófagos, que por sua vez, estimulam a produção de IL-10 e a inibição da ativação de macrófagos, diminuindo sua participação na resposta inflamatória, fazendo uma autorregulação negativa.

Outros estudos envolvendo o papel de algumas citocinas em micetomas relataram níveis altos de citocinas Th1 (IFN- γ , TNF- α , TGF- β 1 e IL-2) em pacientes com micetomas por *M. mycetomatis* tratados cirurgicamente quando comparados com pacientes sem intervenção cirúrgica; em contraste com níveis baixos de citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) quando feita a mesma comparação. Os autores sugeriram que estes resultados apontam para uma resposta contra o fungo baseada na fase adaptativa, bem como a extensão da infecção, tempo de evolução e prognóstico (NASR et al., 2016). Estes achados são indicativos da circulação sanguínea destas citocinas em pacientes com micetomas e nosso estudo corrobora com estes achados, com a demonstração de algumas destas citocinas na resposta inflamatória tecidual nos locais da lesão.

Pesquisas envolvendo citocinas e micetomas, em sobrenadantes de células linfoides periféricas de pacientes portadores de actinomicetomas por *N. brasiliensis*, sugerem que os pacientes possuem produção elevada de IFN- γ e concentrações de IL-4, IL-10 e TNF- α circulantes, mediadores presentes na resposta inflamatória

linfocitária tipo Th2 (MÉNDEZ-TOVAR et al., 2004). Em nosso estudo identificamos a presença de antígenos para IL-10, TNF. α e TGF- β 1 nas lesões de actinomicetomas e eumicetomas, tais achados são indicativos da participação destas citocinas na regulação da resposta inflamatória. O encontro de antígenos para IL-10 e IL12 são fatores importantes para um padrão de resposta tipo Th1 e Th2 nos eumicetomas e actinomicetomas.

Alguns autores sugerem ainda, que a IL-10 seja responsável por uma maior susceptibilidade a desenvolver micetomas e pode determinar a gravidade das formas clínicas. Aumento dos níveis séricos desta citocina foi encontrado nos pacientes com micetoma (MHMOUD; FAHAL; VAN DE SANDE, 2013) e Salinas-Carmona, Rosas-Taraco e Welsh (2012) descreveram que a infecção por *N. brasiliensis* poderia induzir a uma imunossupressão local provavelmente relacionada à produção de IL-10.

Antígenos para perforina foram encontrados no citoplasma de neutrófilos localizados na derme e epiderme, com padrão granular citoplasmático, presentes em todos os casos de actinomicetomas e 16/18 casos de eumicetomas. De acordo com a atuação da perforina nos processos inflamatórios descritos na literatura, podemos concluir que o seu encontro nas lesões teciduais são indicativos de sua participação nos mecanismos de respostas inflamatórias teciduais de actinocetomas e eumicetomas, atuando na morte celular. Achados semelhantes não foram encontrados na literatura.

Nosso estudo demonstrou a presença de NOS2 em todos os casos de actinomicetomas e eumicetomas estudados, sugerindo sua participação na resposta inflamatória tecidual, atuando nos mecanismos de morte celular das células alvo, através de formação de peroxinitritos. A produção de óxido nítrico, presente em neutrófilos e macrófagos, é induzida pela enzima NOS. O óxido nítrico constitui um potente agente antimicrobiano (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). Estudos imuno-histoquímicos demonstrando a presença de NOS2 em lesões teciduais em séries de actinomicetomas e eumicetomas não foram encontrados.

Meester, Rosas-Taraco e Salinas-Carmona (2013) encontraram aumento de expressão de marcadores pró-inflamatórios como GM-CSF, IFN- e NOS em infecção experimental de *N. brasiliensis*, patógeno causador de actinomicetoma em camundongos BALB-c. Os autores relatam que a infecção experimental aguda e crônica cursa com abscessos e abundantes neutrófilos. Entretanto, observaram um aumento de linfócitos no período de semi-resolução do processo, que cursou com

alta expressão de IFN- e aumento de NOS2, e sugerem uma ativação clássica de macrófagos. Descrevem ainda, um aumento local de IL-13 e correlacionam este achado com o tamanho das lesões.

A produção de óxido nítrico produzido pelos neutrófilos parece determinar o tamanho das lesões nos eumicetomas causados por *M. mycetomatis*. Pacientes com maior concentração de óxido nítrico desenvolveram lesões maiores do que aqueles com menor concentração desta substância (VAN DE SANDE et al., 2007). A identificação de NOS2 e TGF- β 1 em lesões teciduais de actinomicetomas e eumicetomas, descritas em nossa pesquisa é indicativa da participação dessas substâncias na resposta inflamatória observada e provável participação na resolução do processo, com ativação de linfócitos NK, macrófagos, células T reg e aumentando a síntese de colágenos pelos fibroblatos.

Os estudos realizados no presente protocolo permitiram demonstrar no tecido a participação e quantificação dos fenótipos de células inflamatórias T CD4⁺, T CD8⁺ e CD68⁺, ao lado da demonstração da participação de citocinas presentes nas respostas Th1, Th2 e Th17 nos actinomicetomas e eumicetomas. Substâncias como a perforina, presente em grânulos de células T NK e neutrófilos e o óxido nítrico parecem atuar na resposta imune aos micetomas. A identificação nos locais das lesões, permite uma maior compreensão dos mecanismos inflamatórios e de morte celular.

Os achados morfológicos e imuno-histoquímicos encontrados não se encontram descritos em conjunto na literatura e contribuíram para um melhor entendimento da patogenia dos micetomas quando comparados aos dados descritos anteriormente. Aspectos do comprometimento epidérmico e dérmico dos micetomas puderam ser constatados e descritos detalhadamente, com ênfase na descrição do tipo de resposta inflamatória, identificação dos subtipos de granulomas, necrose tecidual e fibrose reparativa nos grupos de actinomicetomas e eumicetomas.

9 LIMITAÇÃO DO ESTUDO

O presente estudo possui um número pequeno de casos de actinomicetomas (N= 4), e eumicetomas (N= 18), pois somente foram selecionados casos com grãos vistos no estudo histopatológico. Embora o número de casos não permita um estudo estatístico mais detalhado, os achados permitem um estudo com desenho descritivo. Porém, sabemos que a ocorrência mundial de micetomas é pequena, e que novas contribuições que possam enriquecer o conhecimento da doença são importantes para a literatura e a prática médica.

10 CONCLUSÃO

Os achados histopatológicos da pele e tecido celular subcutâneo dos eumicetomas e dos actinomicetomas, ao H&E, são semelhantes, com padrão de reação inflamatória tecidual granulomatosa associada a fibrose e maior frequência de achados supurativos nos eumicetomas.

O encontro de grãos no estudo histopatológico em H&E, e a identificação de bactérias filamentosas positivas ao Grocott e ao Gram Brown-Brenn ou de fungos positivos ao Grocott e ao PAS permitem o diagnóstico de actinomicetoma ou eumicetoma, respectivamente.

Os fenótipos das células inflamatórias presentes nas lesões de pele e tecido celular subcutâneo, identificados por intermédio de estudos imuno-histoquímicos, definem a participação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e células CD68⁺ nos eumicetomas e actinomicetomas, com predomínio de células CD68⁺ nos dois grupos estudados, com numerosas células CD68⁺ nas amostras de eumicetomas. Células CD8⁺ foram observadas em maior número nos actinomicetomas e eumicetomas quando comparadas às células CD4⁺.

As interleucinas IL-10, IL-12, IL-17, TNF- α , TGF- β 1, foram identificadas nas lesões teciduais de pele e tecido celular subcutâneo dos eumicetomas e actinomicetomas por intermédio de estudos imuno-histoquímicos, indicando a participação destas interleucinas como fatores autorregulatórios positivos e negativos da resposta inflamatória nos micetomas.

Os achados imuno-histoquímicos dos fenótipos celulares somados aos marcadores de interleucinas estudados apontam para respostas inflamatórias teciduais do tipo Th1, Th2 e Th17 presentes nos eumicetomas e actinomicetomas.

A presença de antígenos nos locais das lesões de pele e tecido celular subcutâneo para perforina e NOS2, sugere a participação destas na resposta inflamatória dos eumicetomas e actinomicetomas colaborando para a facilitação de mecanismos de morte celular e combate aos agentes infecciosos.

11 REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Diferenciação e funções das células T CD8+ efectoras. In: ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Saunders/Elsevier, 2015. Cap. 11, p. 231-338. ISBN 978-85-352-8164-4.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Imunidade aos Microrganismos. In: ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: [s.n.], 2015. Cap. 16, p. 339-358. ISBN 978-85-352-8164-4.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Imunidade Inata. In: ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Saunders/Elsevier, 2015. Cap. 4, p. 51-86. ISBN 978-85-352-8164-4.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Propriedades e Visão Geral das Respostas Imunes. In: ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Saunders/Elsevier, 2015. Cap. 1, p. 1-12. ISBN 978-85-352-8164-4.
- ADNIKAN, L.; DEY, S.; PAJ, K. Mycetoma due to *Nocardia farcínica*. **Journal of Global Infectious Diseases**, 2 may-aug 2010. 194-195.
- AHMED, A. O.; ABUGROUN, E. S. Unexpected high prevalence of secondary bacterial infection in patients with mycetoma. **Journal of Clinical Microbiology**, 36, mar 1998. 850-851.
- AHMED, S. A. et al. Seventeen years of subcutaneous infection by *Aspergillus flavus*; eumycetoma confirmed by immunohistochemistry. **Wiley Online Library**, v. 58, p. 728-734, 2015. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/myc.12422/full>>. Acesso em: 28 dez. 2016.
- AL-HATMI, A. M. S. et al. *Fusarium* species causing eumycetoma: report of two cases and comprehensive review of the literature. **Mycoses**, v. 60, n. 3, p. 204-212, mar 2017.
- ALMEIDA, F. P. Considerações em torno da distribuição dos micetomas no Brasil. **Folha Clin. Biol.**, v. 8, p. 127-132, 1936.
- BOECHAT, V. C. et al. Occurrence of *Leishmania infantum* and associated histological alterations in the genital tract and mammary glands of naturally infected dogs. **Parasitology Research**, n. 115, p. 2371-2379, jun 2016. ISSN 10.1007/s00436-016-4987-4.
- BOUNFRATE, D. et al. Autochthonous cases of mycetoma in Europe: report of two cases and review of literature. **PLoS One**, 2014. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0100590>>. Acesso em: 28 dec 2016.
- CAÇÃO, F. M. Micoses Profundas. **MedicinaNet**, 25 janeiro 2009. Disponível em:

<http://www.medicinanet.com.br/conteudos/revisoes/1523/micoses_profundas.htm>. Acesso em: 31 ago 2012.

CARTER, H. V. On a new and striking form of fungus disease, principally affecting the foot, and prevailing endemically in many parts of India. **HistoryofMedicine.com**, p. 104-142, 1860. Disponível em: <<http://www.historyofmedicine.com/author/d/henry-vandyke-carter>>. Acesso em: 2015.

CASTRO, L. G. et al. Mycetoma: a retrospective study of 41 cases seen in São Paulo, Brazil, from 1978 to 1989. **Mycoses**, São Paulo, 36, n. 3-4, mar-apr 1993. 89-95.

CASTRO, L. G.; PIQUERO-CASALS, J. Clinical and Mycologic Findings and Therapeutic Outcome of 27 Mycetoma Patients From São Paulo. **International Journal of Dermatology**, 47, n. 2, 2008. 160-163.

CASTRO-MATTEOTTI, B. et al. Immune response to *Nocardia brasiliensis* extracellular antigens in patients with mycetoma. **Mycopathologia**, v. 3, n. 165, p. 127-134, mar 2008.

CHANDLER, F. W.; KAPLAN, W.; AJELLO, L. Mycetomas. In: CHANDLER, F. W.; KAPLAN, W.; AJELLO, L. **Color atlas and textbook of the histopathology**. 3. ed. Michigan: Wolf Medical Publications, 1980. p. 333. ISBN 0723407541.

CHUFAL, S. S.; THAPLIYAL, N. C.; GUPTA, M. K. An approach to histology-based diagnosis and treatment of Madura foot. **Journal of Infection in developing countries**, 6, n. 9, 17 sep 2012. 684-686.

CLARKE, P. R. Mycetoma of the testis. **The Lancet**, 262, 26 Dec 1953. 1341.

COELHO, W. S.; DINIZ, L. M.; SOUZA FILHO, B. Cutaneous botryomycosis - case report. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 84, p. 396-399, jul-ago 2009. ISSN 0365-0596.

DARDALHON, V. et al. Interleukin 4 inhibits TGF- β -induced-Foxp3⁺T cells and generates, in combination with TGF- β , Foxp3⁺ effector T cells that produce interleukins 9 and 10. **Nature Immunology**, 9, n. 12, dec 2008. 1347-1355.

DE HOOG, G. S. et al. New species of *Madurella*, causative agents of black-grain mycetoma. **Journal of Clinical Microbiology**, 3, mar 2012. 988-994.

DO VALLE, A.; WELSH, O.; VERA-CABRERA, L. Mycetoma. In: TYRING, S. K.; LUPI, O.; HENGGE, U. R. **Tropical Dermatology**. [S.l.]: Elsevier, 2006. p. 197-200.

DRESH, T. F. L. R. et al. Combined therapy for Mycetoma: medical and surgical. **Dermatologic Surgery**, v. 36, n. 6, p. 952-954, jun 2010.

EL HASSAN, A. M. et al. The immunopathology of actinomycetoma lesions caused by *Streptomyces somaliensis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, n. 95, p. 89-92, jan-feb 2001. ISSN 10.1016/S0035-

9203(01)90346-3.

ÉLODIE, S.; SEBASTIAN, A. Les cellules dendritiques inflammatoires. **Médecine/Sciences**, Paris, v. 30, n. 1, p. 64-68, 24 jan 2014.

ESTRADA, R. et al. Eumycetoma. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 4, p. 389-396, julho 2012.

FAHAL, A. H. Mycetoma: a thorn in the flesh. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 1, p. 3-11, jan 2004.

FAHAL, A. H. et al. Abdominal wall mycetoma: an unusual presentation. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 88, January. February 1994. 78-80.

FAHAL, A. H. et al. Mycetoma in the Sudan: an update from the Mycetoma Research Centre, University of Khartoum, Sudan. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 9, 27 mar 2015.

FAHAL, A. H.; SHARFY, A. R. Vulval mycetoma: a rare cause of bladder outlet obstruction. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 92, n. 6, nov-dec 1998. 652-653.

FARMER, E. R.; HOOD, A. F. **Pathology of the Skin**. 2. ed. [S.l.]: McGraw-Hill, 2000. 987 p. ISBN 0838580793.

FONSECA, A. B. D. L. et al. The influence of innate and adaptative immune responses on the differential clinical outcomes of leprosy. **Infectious Diseases of Poverty**, p. 2-8, 2017. Disponível em: <<http://doi.org/10.1186/s40249-016-0229-3>>. Acesso em: fevereiro 2017.

GEMEINHARDT, H. Zum begriff und zur diagnostischen bedeutung der "pilzdruse". In: ALBERTINI, A. V.; GRUMBACH, A.; MOOSER, H. **Pathologia et Microbiologia**. [S.l.]: S. Karger, v. 33, 1969. p. 77-94.

GLIQUIN, J. M. et al. First Case of Actinomycetoma in France Due to a Novel *Nocardia* Species, *Nocardia boironii* sp. **mSphere**, 2016. Disponível em: <<https://msphere.asm.org/content/1/6/eoo309-16>>. Acesso em: 28 dec 2016.

GOW, N. A. R.; NETEA, M. G. Medical mycology and fungal immunology: new research perspectives addressing a major world health challenge. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, 371, n. 1709, 5 dec 2016.

GRONKE, K.; KOFOED-NIELSEN, M.; DIEFENBACH, A. Innate lymphoid cells, precursors and plasticity. **Immunology Letters**, v. 179, p. 9-18, jun 2016.

GUARRO, J. et al. *Scedosporium apiospermum*: changing clinical spectrum of a therapy-refractory opportunist. **Medical Mycology**, 44, n. 4, jun 2006. 295-327.

GUIMARÃES, C. C.; CASTRO, L. G. M.; SOTTO, M. N. Lymphocyte subsets,

macrophages and langerhans cells in actinomycetoma and eumycetomatissue reaction. **ACTA Tropica**, v. 87, p. 377-384, 28 april 2003.

GUPTA, S. et al. Mycetoma: Nonvenereal perineal lesions. **Indian Journal Sexually Transmitted Diseases and AIDS**, 31, n. 1, 2010. 39-41.

HOGADE, S.; METGUD, S. C.; SWOOROOPARANI. Actinomycetes mycetoma. **Journal of Laboratory Physicians**, n. 3, 2011. 43-45.

HOOD, A. F. et al. **Primer of Dermatopathology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002.

HOTEZ, P. J. et al. The Neglected Tropical Diseases of Latin America and the Caribbean: A Review of Disease Burden and Distribution and a Roadmap for Control and Elimination. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2, n. 9, 2008.

IBRAHIM, A. I. et al. A histopathological exploration of *Madurella mycetomatis* Grain. **PLoS One**, 6 mar 2013. Disponivel em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0057774>>. Acesso em: 28 dez. 2016.

IRIART, X. et al. Eumycetoma caused by *Diaporthe phaseolorum* (*Phomopsis phaseoli*): a case report and a mini-review of *Diaporthe/Phomopsis* spp invasive infections in humans. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 10, p. 1492-1494, oct 2011.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. Cap. 18, p. 364-365.

KANAKIS, M. et al. Multiple cardiac mycetomas in an immunosuppressed child. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, 45, n. 1, 2014. 200.

KHALIL, M. et al. Some deep mycoses diagnosed by histopathology in South Eastern Nigeria. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 16, p. 221-224, 1999.

KIRAN, A. et al. Histological Diagnosis of Madura Foot (Mycetoma): A Must for Definitive Treatment. **Journal of Global Infectious Diseases**, 1, n. 1, jan-jun 2009. 64-67.

KLOSSEK, J. M. et al. Functional Endoscopic Sinus Surgery and 109 Mycetomas of Paranasal Sinuses. **Laryngoscope**, v. 107, p. 112-117, jan 1997. ISSN 10.1097/00005537-199701000-00021.

KOTHIWALA, S. K. et al. Black grain eumycetoma of the breast misdiagnosed as fibroadenoma. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, 81, 28 aug 2015. 521-523.

KULIK, M. M. Symptomless infection, persistence, and production of pycnidia in host and non-host plants by *Phomopsis batatae*, *Phomopsis phaseoli*, and *Phomopsis*

sojæ, and the taxonomic implications. **Mycologia**, 76, n. 2 0027-5514, 1984. 274-291.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. Robins and Cotran Pathologic Basis of Disease. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robins and Cotran Pathologic Basis of Disease**. 7. ed. [S.l.]: Elsevier Saunders, 2005. Cap. 1, p. 21-22. ISBN 10: 0721601871.

LACAZ, C. S. Distribuicao geografica dos micetomas no Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 56, n. 3, p. 167-172, 1981.

LALOR, S. J.; MCLOUGHLIN, R. M. Memory T Cells. Newly Appreciated Protagonists in Infection and Immunity. **Trends in Immunology**, v. 37, n. 10, p. 692-702, oct 2016.

LATAPI, F. Mycetoma. In: MARCHIONINI, A.; GÖTZ, H. **Handbuch der haut-und geschlechtskrankheiten**. Berlin: Springer, 1963. Cap. IV.

LAVALLE, P.; CAFIIZARES, O.; EDHERMAN, R. Mycetoma clinical tropical dermatology. **England Blackwell Scientific**, p. 41-60, 1992.

LIN, X. et al. Advances in distinguishing natural from induced Foxp3+ regulatory T cells. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, 15 jan 2013. 116-123.

LINHARES, D. V. **Sobre um caso de clínica cirúrgica (Mycetoma podal)**. [Tese]. Faculdade Nacional de Medicina. Rio de Janeiro. 1917.

LONDERO, A. T. et al. **Micologia Médica**. Rio de Janeiro, p. 22-25. 2002.

LONDERO, A. T.; RAMOS, C. D.; MATTE, S. W. Micetomas actinomicóticos no Rio Grande do Sul - relato de quatro casos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 1, p. 73-77, jan/mar 1986.

LÓPEZ-CEPEDA, L. D. et al. Small eumycetic mycetoma due to black grain. **JAMA Dermatology**, 141, n. 6, june 2005. 793-794.

MACALLAN, D. C.; BORGHANS, J. A. M.; ASQUITH, B. Human T cell memory: a dynamic view. **Vaccines (Basel)**, 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2076-393X/5/1/5>>. Acesso em: 2017.

MAGALHÃES, P. S. Um caso de micetoma podal de grãos branco-amarelados. **An Policlínica Geral do Rio de Janeiro**, v. 3, p. 151-158, 1916.

MAHESHWARI, S. et al. *Madurella* mycetoma--a rare case with cranial extension. **Word Neurosurg**, 73, n. 1, 2010. 69-71.

MAITI, P. K.; RAY, A.; BANDYOPADHYAY, S. Epidemiological aspects of mycetoma from a retrospective study of 264 cases in West Bengal. **Tropical Medicine International Health**, 7, n. 9, sep 2002. 788-792.

MEESTER, I.; ROSAS-TARACO, A. G.; SALINAS-CARMONA, M. C. Retnla down-regulation and IL-13-rich environment correlate with inflammation severity in experimental actinomycetoma by *Nocardia brasiliensis*. **Pathogens and Disease**, 67, n. 3, 2013. 214-220.

MENCARINI, J. et al. Madura foot in Europe: diagnosis of an autochthonous case by molecular approach and of the literature. **New Microbiologica**, v. 39, n. 2, p. 156-159, 2016. ISSN 1121-7138.

MÉNDEZ-TOVAR, L. J. et al. Cytokine production and lymphocyte proliferation in patients with *Nocardia brasiliensis* actinomycetoma. **Mycophatologia**, n. 158, p. 407-414, nov 2004. ISSN 4.

MHMOUD, N. A. et al. *Pleurostomophora ochracea*, a novel agent of human eumycetoma with yellow grains. **Journal of Clinical microbiology**, 50, n. 9, sep 2012. 2987-2994.

MHMOUD, N. A.; FAHAL, A. H.; VAN DE SANDE, W. W. The association between the interleukin-10 cytokine and CC chemokine ligand 5 polymorphisms and mycetoma granuloma formation. **Medical Mcology**, 51, n. 5, jul 2013. 527-533.

MIRANDA, L. H. M. et al. Feline sporotichosis: histopathological profile of cutaneous lesions and their correlation with clinical presentation. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, 2013. Disponivel em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2013.03.005>>. Acesso em: dez 2016.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. Respostas imunes celulares aos agentes infeccioos. In: MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. [S.l.]: Mosby/Elsevier, v. 3, 2009. p. 962. ISBN 0323033032.

MURTHY, R.; SWAIN, J. P. Concurrent mycetoma and chromomycosis. **Indian Journal of medical microbiology**, 4, oct-dec 2011. 437-439.

NASR, A. et al. Th-1, Th-2 Cytokines Profile among *Madurella mycetomatis* Eumycetoma Patients. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 19 July 2016. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Th1%2C+Th2+cytokines+profile+among+madurella+mycetomatis>>. Acesso em: 28 dez 2016.

NENOFF, P. et al. Podoconiosis - non-filarial geochemical elephantiasis - a neglected tropical disease? **Journal of the German Society of Dermatology**, 8, jan 2010. 7-14.

NENOFF, P. et al. Eumycetoma and actinomycetoma--an update on causative agents, epidemiology, pathogenesis, diagnostics and therapy. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, 29, oct 2015. 1873-1883.

OHKURA, N.; KITAGAWA, Y.; SAKAGUCHI, S. Development and Maintenance of regulatory T cells. **Immunity Review**, v. 38, p. 414-423, mar 2013.

OLIVEIRA, F. D. M. et al. *Scedosporium apiospermum* eumycetoma successfully treated with oral voriconazole: report of a case and review of the Brazilian reports on scedosporiosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 55, n. 2, mar/apr 2013. ISSN 1678-9946.

PROPHET, E. B. et al. **Métodos Histotecnológicos**. Washington, D.C.: Inst. de Patol. de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos (AFIP) e Registro de Patologia dos Estados Unidos da América (ARP), 1995. 280 p. ISBN 1881041212 9781881041214.

PURCHIO, A. et al. Micetoma do antebraço por *Petriellidium boydii*: registro de um caso. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 56, p. 281-284, 1981.

QUINTELLA, L. P. et al. Histopathology of cutaneous sporotrichosis in Rio de Janeiro: a series of 119 consecutive cases. **Journal of Cutaneous Pathology**, 38, 2011. 25-32.

ROCHA, O. M. et al. Micetoma articular por *Petriellidium boydii*: registro de um caso. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 22, p. 24-29, 1980.

RODERICK, N. M.; KEITH, W. Microbial Infection. In: ARNOLD, E. **Muir's Textbook of Pathology**. 13. ed. London: CRC Press, 1992. p. 1040. ISBN 0340662336.

RODIG, S. J.; DORFMAN, D. M. Splendore-Hoeppli phenomenon. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 125, n. 11, p. 1515-1516, nov 2001. ISSN 1543-2165.

ROUPHAEL, N. G.; TALATI, N. J.; FRANCO-PAREDES, C. A painful thorn in the foot: a case of eumycetoma. **The American Journal of the Medical Sciences**, 334, n. 2, aug 2007. 142-144.

SALINAS-CARMONA, M. C.; ROSAS-TARACO, A. G.; WELSH, O. Systemic increased immune response to *Nocardia brasiliensis* co-exists with local immunosuppressive microenvironment. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 102, oct 2012. 473-480.

SAMAILA, M. O.; ABDULLAHI, K. Cutaneous manifestations of deep mycosis: an experience in a tropical pathology laboratory. **Indian Journal of Medical Microbiology**, 56, n. 3, may-jun 2011. 282-286.

SAMPAIO, F. M. S. et al. Eumycetoma por *Madurella mycetomatis* com 30 anos de evolução: desafio terapêutico. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 88, n. 6 (supl 1), p. 82-84, 2013.

SAMPAIO, F. M. S. et al. Eumycetoma on the foot caused by *Madurella mycetomatis*: amputation after significant worsening during pregnancy. **ACTA Dermato-Venereologica**, 95, mar 2015. 375-375.

SAMPAIO, F. M. S. et al. Review of 21 cases of mycetoma from 1991 to 2014 in Rio de Janeiro, Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, fev 2017. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0005301>>. Acesso em: fev 2017.

SANDRITTER, W. **Color Atlas and Textbook of the Histopathology**. 3. ed. [S.l.]: Year Book Medical Publishers, 1980. 375 p. ISBN 0815175523.

SAUL, A. Mycetoma. In: SAUL, A. **Lecciones de Dermatologia**. 15. ed. Mexico: Mendez Editores, 2008.

SCHOENBORN, J. R.; WILSON, C. B. Regulation of interferon- γ during innate and adaptive immune responses. **Advances in Immunology**, v. 96, p. 41-101, 2007.

SEVERO, L. C.; GRAUDENZ, M. S. Micetomas. In: TAVARES, W.; MARINHO, L. A. C. **Rotinas de Diagnóstico e Tratamento das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 4. ed. [S.l.]: Atheneu, 2015. Cap. 119, p. 756-760.

SOUSA, J. P. et al. Mycetoma caused by *Nocardia brasiliensis* in an immunocompetent patient. **Journal of the German Society of Dermatology**, 12, n. 10, oct 2014. 903-905.

TELLEZ, I.; FRANCO-PAREDES, C. A woman with chronic subcutaneous swelling of the right foot associated with sinus tracts discharging yellow grains. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 4, n. 9, sep 2010. e772.

TESMER, L. A. et al. Th17 cells in human disease. **Immunological Reviews**, 223, jun 2008. 87-113.

VAN DE SANDE, W. W. et al. Polymorphisms in genes mycetoma susceptibility involved in innate immunity predispose to disease. **The Journal of Immunology**, 179, sep 2007. 3065-3074.

VENKATSWAMI, S.; SANKARASUBRAMANIAN, A.; SUBRAMANYAM, S. The Madura foot: looking deep. **The International Journal of Lower Extremity Wounds**, 11, n. 1, mar 2012. 31-42.

VERA-CABRERA, L. et al. Host defenses in subcutaneous mycoses. **Clinics in Dermatology**, v. 4, n. 30, p. 382-388, jul 2012. ISSN 10.1016.

WEEDON, D. **Skin Pathology**. 2. ed. [S.l.]: Elsevier, 2002. 205-206 p.

WELSH, O.; VERA-CABRERA, L.; SALINAS-CARMONA, M. C. Mycetoma. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 195-202, março 2007.

YANES, R. E. et al. Lymphocyte generation and population homeostasis throughout life. **Seminars in Hematology**, v. 54, p. 33-38, 2017.

YOUSIF, B. M.; FAHAL, A. H.; SHAKIR, M. Y. A new technique for the diagnosis of mycetoma using fixed blocks of aspirated material. **Transactions Royal Soc**

Tropical Medicine & Hygiene, v. 104, n. 1, p. 6-9, jan 2010. ISSN
10.1016/j.trstmh.2009.06.015.

12 APÊNDICES

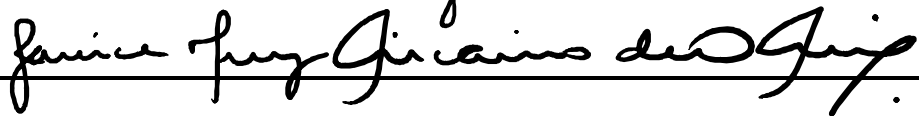
Apêndice A É Termo de compromisso e responsabilidade

Eu, Janice Mery Chicarino de Oliveira Coelho, autora do projeto de pesquisa intitulado, Estudo histopatológico, imuno-histoquímico e imunopatológico dos Micetomas em amostras de lesões cutâneas humanas, comprometo-me em manter a confidencialidade assim como a privacidade dos participantes do projeto em todas as etapas da pesquisa.

A identidade dos participantes, assim como os resultados obtidos com este projeto, será mantida em um banco de dados sob a minha responsabilidade.

Os resultados obtidos com esta pesquisa serão divulgados em comunicações científicas mantendo o anonimato dos participantes e o material utilizado não será empregado em outras pesquisas, a não ser quando abertos novos protocolos.

Rio de Janeiro, 30 de julho de 2013.



Apêndice B É Formulário de Microscopia

Identificação

Número de bancada: _____

Caso número: _____

Análise Microscópica

Alterações da epiderme			
Acantose	P	N	NA
Hiperkeratose	P	N	NA
Parakeratose	P	N	NA
Exocitose: mononucleares	P	N	NA
Exocitose: polimorfonucleares	P	N	NA
Espongiose	P	N	NA
Ulceração	P	N	NA
Comprometimento da derme/hipoderme			
Papilar	P	N	NA
Reticular	P	N	NA
Hipoderme	P	N	NA
Presença de células inflamatórias			
Linfócitos	P	N	NA
Plasmócitos	P	N	NA
Eosinófilos	P	N	NA
Neutrófilos	P	N	NA
Histiócitos	P	N	NA
Células gigantes: tipo Langhans	P	N	NA
Células gigantes: tipo corpo estranho	P	N	NA
Outros	P	N	NA
Presença de granulomas			
Supurativo	P	N	NA
Tuberculoide	P	N	NA
Intersticial ou necrobiótico	P	N	NA
Corpo estranho	P	N	NA

Sarcoide	P	N	NA
Epitelioide	P	N	NA
Outros	P	N	NA
Presença de necrose			
Coagulativa	P	N	NA
Liquefativa	P	N	NA
Caseosa	P	N	NA
Fibrinoide	P	N	NA
Presença de			
Grãos	P	N	NA
Fibrose	P	N	NA
Fenômeno de Splendore-Hoepli	P	N	NA
Colorações especiais			
Prata Metenamina de Grocott	P	N	NA
Wade	P	N	NA
Gram	P	N	NA
PAS	P	N	NA
Tricômico de Gomori	P	N	NA
OBS:			

Legenda

P . Positivo

N . Negativo

NA . Não se aplica

Apêndice C É formulário de avaliação imuno-histoquímica

Número de bancada: _____

Caso número: _____

Análise Microscópica:

IL-10	P	N
IL-12	P	N
IL-17	P	N
TNF-	P	N
TGF- 1	P	N
NOS2	P	N
Perforina	P	N
Marcadores celulares- contagem celular/10CGA		
CD4	P	N
CD8	P	N
CD68	P	N

Legenda

P . Positivo
N . Negativo